

Aus dem Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

# **Charakterisierung von kolloidal löslichen Zusatzstoffen für Wein sowie Entwicklung von Nachweisverfahren**

Dissertation  
zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

-Dr. rer. nat.-

Im Fachbereich Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl. Lebensmittelchemikerin Sabrina Sprenger

Gießen 2017

*Vielmehr als die Vergangenheit interessiert mich die Zukunft,*

*denn in ihr gedenke ich zu leben.*

*(Albert Einstein)*

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Dietrich (Hochschule Geisenheim University)
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Zorn (Justus-Liebig-Universität Gießen)

Prüfer: Prof. Dr. G. Hamscher (Justus-Liebig-Universität Gießen)

Prüfer: Prof. Dr. C. Kunz (Justus-Liebig-Universität Gießen)

Tag der Prüfung: 26. April 2017

## Eigenständigkeitserklärung

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

Dankeschön

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2010 bis Dezember 2013 am Institut für Weinanalytik und Getränkeforschung der Hochschule Geisenheim angefertigt. Finanziert wurde das Projekt (Az. 8503.093/4) durch den FDW (Forschungsring des Deutschen Weinbaus e.V.)

Herrn **Prof. Dr. Helmut Dietrich** möchte ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung herzlich danken. Jede Phase dieser Arbeit wurde intensiv betreut und begleitet. Weiterhin möchte ich mich für die großen wissenschaftlichen Freiräume bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn **Prof. Dr. Holger Zorn** möchte ich für den regelmäßigen wissenschaftlichen Austausch und die Unterstützung seitens der Justus-Liebig-Universität in Gießen danken.

Besonders möchte ich mich bei **Prof. Dr. Frank Will** für seine unermüdliche und professionelle Unterstützung in allen praktischen und theoretischen Fragestellungen und der konstruktiven und ausgezeichneten Hilfe bei den Veröffentlichungen dieser Arbeit bedanken.

Herrn **Dr. Klaus Meylahn** möchte ich für die Möglichkeit der Isotopenanalytik am Lebensmittelinstitut in Oldenburg und der fachlichen Kompetenz, der guten wissenschaftlichen Gespräche und der persönlichen Unterstützung herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin meinen lieben Doktorandenkollegen und dem gesamten Teams des Instituts für Weinanalytik und Getränkeforschung der Hochschule Geisenheim, die die Zeit unvergesslich für mich werden ließen.

Meiner lieben Freundin und Kollegin **Anne Zaar** möchte ich für die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung während der gesamten Zeit danken.

Meiner Familie und meinem Freund **Markus** bin ich dankbar für die großartige Unterstützung während des Studiums der Lebensmittelchemie in Halle und der Doktorarbeit in Geisenheim.

## Zusammenfassung

Das Ergebnis des natürlichen Ausfalls von Weinsäure in Verbindung mit Kalium- oder Calciumionen, allgemein bekannt als Weinstein, wird von Verbrauchern häufig nicht akzeptiert. Die kristallinen Ablagerungen am Boden einer Weinflasche gelten als Qualitätsmangel. Während früher Weine durch die lange Lagerung über den Winter bereits vor der Abfüllung natürlicherweise Weinstein absetzten, müssen diese heutzutage schnell vermarktet und verkauft werden. Vor der Abfüllung bleibt marktwirtschaftlich meist keine Zeit zur natürlichen oder künstlich durch Kälte oder Elektrodialyse herbeigeführten Stabilisierung und es wird auf Zusatzstoffe zurückgegriffen. Der Einsatz von Zusatzstoffen, die als sogenannte „*protective colloids*“ wirken, hat sich als kostengünstige und ökonomisch sinnvolle Alternative herausgestellt. Diese polymeren Stoffe belegen die Kristallisationsoberflächen und verhindern das Ausfallen von Weinstein. Im Gegensatz dazu sind die Stabilisierung durch das Kälteverfahren oder die Elektrodialyse teuer und zeitaufwendig.

Da die gesetzlichen Vorgaben variieren, stellt die Nutzung der Zusatzstoffe Metaweinsäure (MWS), Gummi Arabikum (GA) und Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC) für Importeure und Exporteure eine Herausforderung dar. Der Zusatz im Wein ist in Europa, Australien und Neuseeland erlaubt, in den USA, Japan und Südafrika generell verboten. In Europa unterliegen MWS und CMC einem gesetzlichen Grenzwert von 100 mg/L (10 g/hL). Für GA gilt kein Grenzwert, eine Einsatzmenge von 300 mg/L (30 g/hL) wird von den Herstellern der oenologischen Produkte empfohlen. In Europa ist der Zusatz dieser Stoffe zu Traubensaft zudem verboten. Aufgrund der gesetzlichen Bestimmungen ist es zwingend erforderlich, die Zusatzstoffe in Wein oder Traubensaft analytisch nachzuweisen. Bei der Verwendung der Zusatzstoffe kann es zu oenologischen Problemen kommen, als Beispiel sei hier die kostenintensive Verblockung der Filterflächen bei der Endfiltration von Wein und Traubensaft genannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Zusatzstoffe in ihren Handelsformen zur Weinsteinstabilisierung analytisch charakterisiert. Zur Überprüfung der gesetzlichen Vorgaben auf Zusatz eines der Stoffe und zur Überprüfung der Grenzwerte, wurden verschiedene analytische Methoden getestet.

Sieben MWS–Produkte von unterschiedlichen Herstellern wurden hinsichtlich Zusammensetzung und Molekulargewicht untersucht. Analysen zu Größenausschlusschromatografie kombiniert mit Lichtstreuung zeigten, dass MWS als polymere Substanz niedrige Molekulargewichte von 2 – 9 kDa aufweist und hoch polydispers ist. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die Produkte viel unveresterte monomere Weinsäure enthalten. Diese lag im Bereich von 9 – 18 % der untersuchten Zusatzstoffe (9 – 18 mg/100 mg). Der Anteil an monomerer Weinsäure in den untersuchten Produkten lag im Mittel bei 13 %. Als nicht-stabilisierend wirkende Substanz gelangen so etwa 10 bis 20 % des Zusatzstoffes in den Wein. Die Identifizierung und die Quantifizierung von MWS gelangen mittels Massenspektrometrie. Es konnte eine quantitative Bestimmungsmethode entwickelt werden. MWS konnte mittels Anionentauschermaterial (SPE - solid phase extraction) aus Wein und Traubensaft aufkonzentriert bzw. aufgereinigt und mittels HPLC in oligomere MWS, dimere Weinsäure und monomere Weinsäure chromatografisch getrennt und massenspektrometrisch detektiert werden.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit in der Monosaccharid Zusammensetzung von Gummi Arabikum (GA), weineigenen Arabinogalactanproteinen und Arabinogalactanen, gestaltete sich die Entwicklung einer selektiven analytischen Nachweismethode für diesen Zusatzstoff schwierig. Vier kommerzielle und acht ungereinigte GA-Produkte wurden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht. Im Wesentlichen besteht GA aus L-Rhamnose, L-Arabinose und D-Galactose sowie einen beachtlichen Anteil an D-Glucuronsäure.

Über Ultrafiltration wurden die Kolloidfraktionen aus verschiedenen Weißweinen isoliert, gleichermaßen wurde die Kolloidfraktion aus den gleichen, aber mit GA behandelten Weißweinen gewonnen und analysiert. GA konnte durch statistische Methoden über den Gesamtkolloidgehalt, Zusammensetzung der Monosaccharide und der Analytik der Isotopenverhältnisse der Elemente Wasserstoff, Sauerstoff, Kohlenstoff und Stickstoff von mit GA behandelten zu unbehandelten Weinen unterschieden werden. Die Gehalte an L-Arabinose, D-Galactose, D-Glucuronsäure wurden hoch signifikant erhöht und der Gehalt an D-Mannose signifikant verringert. Zusätzlich konnte das L-Arabinose/ D-Galactose Verhältnis isolierter Polysaccharide aus Wein zur Differenzierung herangezogen

werden. Weiterhin veränderte sich der  $\delta^{18}\text{O}$ -Wert der Polysaccharide aus GA-haltigen Weinkolloiden wesentlich; dieser wurde signifikant positiver.

Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC) besteht aus D-Glucose und aus im Wein nicht vorhandenen Carboxymethylglucose-Einheiten, die als analytischer Ansatzpunkt zur Identifizierung von CMC in Wein gewählt wurden. Für CMC konnte eine qualitative Methode etabliert werden. Die durch Ultrafiltration erhaltene CMC-haltige Weinkolloidfraktion konnte mit einer sauren Hydrolyse in die Monosaccharide gespalten werden. Mit der chromatografischen Analyse der Monosaccharide und der gepulsten amperometrischen Detektion (HPAEC-PAD) war eine klare Separierung der neutralen Monosaccharide der Weinkolloide, von den Carboxymethylglucosen der CMC möglich. Zusätzlich konnte ein linearer Zusammenhang der Peakflächen zur Konzentration der CMC im Wein abgeleitet werden.

Ohne großen analytischen Aufwand konnte weiterhin die Quantifizierung von MWS und CMC nach Fällung mit dem Protein Lysozym und der Messung der konzentrationsabhängigen Streulichtintensität der Trübung gezeigt werden. Eine Differenzierung zwischen MWS und CMC ist anhand der charakteristischen Infrarotbanden des isolierten Niederschlags möglich. Durch die Esterbindung der Weinsäuremoleküle der Metaweinsäure und der Etherbindungen der Monosaccharide im CMC-Polymer, kann eine eindeutige Unterscheidung zwischen beiden Polymeren erfolgen. Diese Methodik lässt sich sowohl für Wein als auch für Traubensaft anwenden. Bei Gummi Arabikum konnten keine messbaren Trübungen erzielt werden, da sich das neutral geladene Polymer nicht mit Lysozym fällen lässt und demzufolge keine messbare Trübung entstand.

Die Überprüfung der Aussage, dass beispielsweise GA das Mundgefühl verbessert und die Bestimmung der Reiz- und Geschmacksschwellen der Zusatzstoffe gelangen durch Verkostungen von Weinen mit aufsteigenden Gehalten an Zusatzstoffen mittels geschultem Prüferpanel. Für MWS lag die Reizschwelle bei 300 mg/L und war damit 3-mal höher als der gesetzliche Grenzwert von 100 mg/L. Für GA wurde die Reizschwelle bei 750 mg/L (75 g/hL) ermittelt und ist somit ebenfalls 2,5-mal höher, als die empfohlene Dosage von 300 mg/L. Zusätzlich wurde für CMC mit einer Reizschwelle von 500 mg/L die bereits 1991 postulierte Reizschwelle, welche unterhalb von 600 mg/L lag, bestätigt. Dieser Wert ist 5-mal höher als der erlaubte Grenzwert von 100 mg/L.

Die Zusatzstoffe beeinflussen nach jetzigem Kenntnisstand die Weinsensorik, in Form von einer Verbesserung des Mundgefühls oder zur Erlangung von mehr Fülle, nicht. Neben der Bestimmung der Reizschwellen wurden auch andere beschreibbare Geschmackseindrücke erfasst. Für alle Zusatzstoffe wurde vorwiegend die „*bittere*“ Geschmacksnote benannt. Für GA wurde von zwei Prüfern eine Adstringenz festgestellt. Zusammenfassend konnte für alle drei Zusatzstoffe gezeigt werden, dass die Reiz- und Geschmacksschwellen weit oberhalb der gesetzlich erlaubten bzw. üblichen Dosagen liegen.

Zusätzlich wurden die Handelsprodukte der oenologischen Zusatzstoffe analytisch charakterisiert. Für GA und CMC konnten die Literaturdaten zu Molekulargewichtsverteilungen und absolutem Molekulargewicht bestätigt werden.

Ein Schichtenfiltrationsversuch zeigte, dass durch die Adsorption von Metaweinsäure an die Filterschicht am Anfang der Filtration nicht-stabiler Wein abgefüllt werden könnte. Die Ergebnisse der LC-MS-Analytik bekräftigen die Annahme, dass es von Vorteil ist, das Endprodukt während der Filtration im Kreislauf laufen zu lassen und somit die entkeimende Wirkung der Filtration und die Stabilisierung der gesamten Charge zu gewährleisten.

GA und CMC werden meistens als flüssige Produkte angeboten. Hier fielen bei der Charakterisierung die Gehalte von stabilisierend wirkender Essig- und Citronensäure auf. Für GA wurden Gehalte von 3 % und für CMC bis zu 6 % Essigsäure ermittelt. Die CMC-Produkte enthielten weiterhin 0,1 % Chlorid, welches aus der Synthese mit Chloressigsäure resultiert und mit zunehmendem Substitutionsgrad des Polymers auf bis zu 0,3 % ansteigen kann. GA enthält als Naturprodukt den höchsten Gehalt an Asche (2 %) und demnach auch die höchsten Konzentrationen an Mineralstoffen und Spurenelementen. Insbesondere fielen hier die Mineralstoffe Natrium, Kalium und Calcium auf. MWS ist ein sehr reines Produkt. Es konnten keine Mineralstoffe und Spurenelemente detektiert werden.

## Abstract

In most cases customers are not willing to accept crystalline deposits in wine bottles even if they are originating from a natural grape source like tartaric acid. Before the delivery of domestic or international trade, particularly white wines have to be stabilized against tartar precipitation. Tartrate stability can be achieved by adding of the popular oenological additives, for example Metatartaric acid (MTA), Sodium-Carboxymethyl-Cellulose (CMC) or Gum Arabic (GA).

The addition of these industrial manufactured food additives is an economically priced alternative in comparison to cost-intensive techniques like electro dialysis or cold stabilization. CMC and MTA are acting as "*protective colloids*" covering the crystallization surfaces of tartar and preventing the crystal growth, their use is limited to 100 mg/L in wine (10 g/hL). Another popular colloidal wine additive is Gum Arabic (GA). GA is one of the oldest industrial gums widely used in the food industry. Reasons for its use in wine are colloidal stabilization, enhancement of the effect of MTA, or sensory purposes. GA addition to wine is not limited ("*quantum satis*"), and the suppliers are recommending a dosage of 300 mg/L (30 g/hL). All above additives are not approved for grape juice. The use of MTA, CMC and GA is allowed in Europe, Australia, and New Zealand but not in the US, Japan or South Africa which are major global wine markets. Regardless of the differing legal situations an addition of the additives should be detectable in wine and grape juice. This also required a physico-chemical characterization of the substances.

Seven different MTA products provided from four suppliers were investigated regarding molecular masses and composition. Combined size-exclusion chromatography with multi-angle-light scattering (MALS) detection showed that the products had medium molecular masses in a range of 2 to 9 kDa. All samples were highly polydispersed products with a broad molecular weight distribution. Beside oligomeric or polymeric contents the products contained an average of 13 g/100 g monomeric tartaric acid. Furthermore an analytical method to determine MTA in wines and grape juices based on an anion-exchange clean up step, HPLC separation, and MS detection was developed. The analytical detection method presented here shows a sufficient robustness to evaluate important enological or food legal aspects in connection with MTA.

The close structural similarity of GA to native grape cell wall arabinogalactans occurring in wine complicated the development of a suitable analytical detection method. The approach for a method development was the major sugar composition and multi-element (H, O, C, N) stable isotope analysis of the colloids. For this purpose the colloids from non-spiked, authentic (control) and spiked (300 mg/L gum arabic) German white wines were isolated and analyzed for their monosaccharide composition. An addition of 300 mg/L changed the total colloid content and the content of monosaccharides L-arabinose, D-galactose, D-mannose and D-glucuronic acid with high statistical significance.

Additionally the oxygen stable isotope ratios of the isolated polysaccharides were shifted. Furthermore, commercial and authentic GA products were characterized in contrast to isolated genuine and GA-spiked wine colloids. Principle component analysis (PCA) indicated the grouping of untreated and treated samples with 300 mg/L gum Arabic. The system was highly influenced by the content of L-arabinose and D-galactose, D-glucuronic acid, total colloid content, total monosaccharide content and  $\delta^{18}\text{O}$  values. It could also be concluded that a high content of L-arabinose and D-galactose was accompanied with a significantly lower content of D-mannose. The control samples were only influenced by a significantly higher D-mannose content.

For the detection of CMC the total colloids of spiked wines were isolated, hydrolyzed and the resulting sugar monomers were analyzed by HPAEC-PAD. The chromatograms showed the typical peak pattern of CMC monomers like 6-O-carboxymethylglucose, 2-O-carboxymethylglucose, and 3-O-carboxymethylglucose. The mono-substituted carboxymethylglucoses were clearly separated from the neutral sugar monomers of the genuine wine colloids. Mono-substituted carboxymethylglucoses were not available as analytical standard substances and could not be synthesized. Therefore, CMC could not be quantified and the method could not be validated.

A more simple approach for the detection of CMC and MTA in wines and grape juices was the precipitation of the additives with the protein lysozyme. The resulting turbidities of the precipitation reactions measured nephelometrically (FNU-units) were linear and could be calibrated. Precipitation and combined nephelometry could not differentiate between MTA and CMC. For a differentiation and also the confirmation the precipitations were isolated and after washing and

drying subjected to ATR spectroscopy (ATR technique). The identification of MTA was possible with the help of the characteristic fingerprint bands of the ester bond (-CO-O-). CMC could be identified on the basis of the ether bonds (-C-O-C-).

To verify the sensory effects of the additives especially the recognition thresholds and organoleptic characteristics wines were spiked with different concentrations and degusted by a trained panel. The concentrations ranged from 100 to 2000 mg/L for MTA and GA. Wines were prepared with CMC concentrations of 100 to 1000 mg/L. A concentration of 300 mg/L MTA in wine changes noticeably the organoleptic characteristics. The results indicated thresholds up to 750 mg/L for GA and 500 mg/L for CMC. All detected thresholds were above of the legal limit of 100 mg/L for CMC and MTA or above the usual quantity of 300 mg/L for GA. Sensory experiments to determine the treated wines in the range of 100 – 2000 mg/L (30 - 200 g/hL) or 100 to 1000 mg/L (10 – 100 g/hL) failed because of non-significant results. Wines were not affected by the additives with regard to improve the mouth feeling or to obtain more wealth. For all additives which were tested predominantly a bitter taste was noticed.

In addition, the commercial products of oenological additives were characterized analytically. For GA and CMC, the literature data on molecular weight distributions and absolute molecular weight were confirmed.

GA and CMC are mostly offered as liquid products. Obvious in regards to characterization were the contents of stabilizing acting acetic and citric acid. For GA contents of 3 % and CMC up to 6 % acetic acid were determined. GA-products contains as natural products the highest content of ash (2 %) and thus also the highest concentrations of minerals and trace elements. GA contains many particular minerals for example sodium, potassium and calcium. MTA samples are very pure products. There were no minerals and trace elements detected.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen und Akronyme</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Problemstellung .....	1
1.1.1 Polysaccharide im Wein (Kolloide) .....	3
1.2 Stand der Wissenschaft .....	6
1.2.1 Der Begriff Stabilität in der Weinbereitung.....	13
1.2.2 Einordnung der Zusatzstoffe im europäischen Weinrecht .....	20
1.2.3 Gummi Arabikum (GA) – natürliches Pflanzenexsudat.....	22
1.2.3.1 Chemische Struktur von Gummi Arabikum (GA).....	25
1.2.3.2 Stabilisotopenverteilung (H,O und N,C) – Rebe und Akazie .....	27
1.2.4 Metaweinsäure .....	31
1.2.5 Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC).....	37
<b>2 Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
2.1 Gummi Arabikum - qualitativer Nachweis .....	40
2.1.1 Gesamtkolloidgehalt nach Gummi Arabikum-Zusatz.....	40
2.1.2 Zuckerbausteinanalytik von Gummi Arabikum und Weißweinkolloiden .	41
2.1.3 Statistische Betrachtung der Monosaccharide von Weißweinkolloiden .	44
2.1.3.1 L-Arabinose/D-Galactose-Verhältnis.....	46
2.1.4 Stabilisotopenanalytik der vier Elemente (H,O und N,C) .....	48
2.1.5 Multivariate Statistik - Hauptkomponentenanalyse (PCA) .....	51
2.2 Nachweis von Metaweinsäure - Kalkulation der spezifischen Massen.....	55
2.2.1 Massenspektrometrische Detektion von MWS (HPLC-UV-MS).....	56
2.2.2 Analyse von Metaweinsäure in Weißwein und Traubenmost .....	58

2.2.2.1	Quantitativer Nachweis von Metaweinsäure in Wein .....	61
2.2.2.2	Validierung der HPLC-MS-Methode für Metaweinsäure .....	63
2.3	Natrium-Carboxymethylcellulose - Nachweis über HPAEC-PAD .....	65
2.4	Charakterisierung von oenologischen Zusatzstoffen.....	70
2.4.1	Bestimmung des Brechungsindexinkrement (dn/dc).....	70
2.4.2	Bestimmung von relativem und absoluten Molekulargewicht .....	73
2.4.3	MWS - relatives und absolutes Molekulargewicht (SEC-RI-MALS) .....	76
2.4.4	CMC - relatives und absolutes Molekulargewicht (SEC-RI-MALS).....	79
2.4.5	GA - relatives und absolutes Molekulargewicht (SEC-RI/UV-MALS).....	81
2.5	Trübungsphotometrie und Infrarotspektroskopie der Zusatzstoffe .....	84
2.5.1	Infrarotspektroskopie von Metaweinsäure .....	86
2.5.2	Infrarotspektroskopie von Carboxymethylcellulose.....	87
2.6	Zusammensetzung der kommerziellen Zusatzstoffe .....	90
2.6.1	Metaweinsäure .....	91
2.6.1.1	Metaweinsäure - monomerer Weinsäuregehalt.....	91
2.6.1.2	Einfluss der Schichtenfiltration auf den Metaweinsäuregehalt .....	93
2.6.2	Gummi Arabikum .....	95
2.6.3	Natrium-Carboxymethylcellulose .....	96
2.6.3.1	Chloridgehalt von CMC-Produkten.....	97
2.6.3.2	Glucosegehalt von CMC-Produkten.....	97
2.7	Sensorik - Ermittlung der Reizschwelle der Zusatzstoffe .....	98
2.8	Bestimmung der Viskosität von Wein mit Zusatzstoffen.....	100
2.9	Befragung kleinerer Betriebe zur Verwendung der Zusatzstoffe .....	104
<b>3</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>105</b>
3.1	Gummi Arabikum (GA).....	105
3.2	Metaweinsäure (MWS).....	112
3.3	Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC) .....	115
3.4	Bedeutung der Ergebnisse für die Önologie .....	120

3.4.1	Ausblick .....	125
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>127</b>
4.1	Proben und Probenaufarbeitung .....	127
4.1.1	Gummi Arabikum (GA) .....	127
4.1.2	Metaweinsäure (MWS) .....	128
4.1.3	Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC).....	128
4.1.4	Verwendete Weine und Moste.....	128
4.1.5	Isolierung von Kolloiden mittels Ultrafiltration .....	129
4.2	Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung und des absoluten Molekulargewichtes (SEC-UV-MALS-RI).....	129
4.3	Bestimmung des dn/dc-Wertes von Kolloiden.....	132
4.4	Bestimmung der monomeren Zuckerbausteine (saure Hydrolyse) .....	133
4.4.1	Saure Hydrolyse von Kolloiden allgemein .....	133
4.4.2	Saure Hydrolyse von Natrium-Carboxymethylcellulose .....	134
4.4.3	HPAEC-PAD Analyse .....	134
4.5	Massenspektrometrische Detektion von Metaweinsäure nach SPE .....	138
4.5.1	Identifizierung von Metaweinsäure mittels Massenspektrometer.....	138
4.5.2	Bestimmung von Metaweinsäure in Wein und Traubensaft.....	139
4.6	Analyse der Stabilisotopenverhältnisse von Gummi Arabikum und Weinkolloiden mittels IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry) .....	141
4.6.1	Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes und des $\delta^{15}\text{N}$ -Wertes (Euro/EA/IRMS) .....	141
4.6.2	Bestimmung des $\delta^2\text{H}$ -Wertes und des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes (TC/EA/IRMS) ....	141
4.7	Bestimmung von Spurenelementen mittels TRFA .....	144
4.8	Bestimmung von Trockenmasse, Asche und Mineralstoffen (AAS) .....	145
4.8.1	Bestimmung der Trockenmasse .....	145
4.8.2	Bestimmung des Aschegehaltes.....	145
4.9	Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) .....	145
4.10	Bestimmung von Chlorid in CMC-Zusatzstoffen .....	146

4.11	Enzymatische Bestimmung organischer Säuren.....	146
4.12	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) .....	146
4.13	Bestimmung von Weinsäure in MWS-Zusatzstoffes (HPLC-UV) .....	147
4.14	Schichtenfiltration von Metaweinsäure in verschiedenen Medien .....	148
4.15	Identifizierung von Aminosäuren im Proteinteil bei Gummi Arabikum .....	149
4.16	Trübungsphotometrie und ATR Analysen .....	151
4.16.1	Fällung und Nachweis von CMC und MWS mittels Lysozym .....	151
4.17	Sensorische Beurteilung der Zusatzstoffe.....	152
4.17.1	Ermittlung des Schwellenwertes.....	152
4.17.2	Bestimmung der dynamischen Viskosität.....	153
4.18	Statistische Datenauswertung.....	153
4.19	Verwendete Software.....	154
<b>5</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>155</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	

## Abkürzungen und Akronyme

AH	Anhydrofaktor
ANOVA	Analysis of Variance
AGP	Arabinogalactanprotein
arb.	arbiträr
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
cm <sup>-1</sup>	Wellenzahl
CMC	Carboxymethylcellulose
CMG	Carboxymethylglucose
δ	Delta
Da	Dalton
D-Gal.A.	D-Galacturonsäure
D-Glu.A.	D-Glucuronsäure
dn/dc	Brechungsindexinkrement
EG	Europäische Gemeinschaft
ESI	Electrospray Ionization
ff.	folgende
GA	Gummi Arabikum
HPAEC-PAD	High-Performance-Anion-Exchange-Chromatography with Pulsed-Amperometric-Detection
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilodalton
L	Liter
μ	Mikro
M	Molar
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
min	Minute
MALS	Multi-angle light scattering
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight
mPas	Megapascal pro Sekunde

MS	Massenspektrometrie
$M_w$	Mittelwert
$M_w$	mittleres Molekulargewicht
MWS	Metaweinsäure
n	Versuchsanzahl/Prüferanzahl
n	Brechungsindex
OIV	Internationale Organisation für Rebe und Wein
PCA	principal compound analysis
RI	Refractive Index
RT	Raumtemperatur
$\mu\text{S}$	Mikrosiemens
SIM	selected ion monitoring
SOP	Standard Operating Procedure
t	Zeit
$t_0$	Zeit zum Zeitpunkt 0
UV	Ultraviolett
TIC	Total Ion Count
vgl.	vergleiche
VO	Verordnung
$\bar{x}$	Mittelwert
z. T.	zum Teil
z. Z.	zurzeit
$\emptyset$	Durchmesser

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Kristallisationskinetik von KHT	9
Abbildung 1-2 Kaliumhydrogentartrat, Kaliumbitartrat, Kalium-Calcium Tartrat, Calcium-Tartrat	16
Abbildung 1-3 Schematische Illustration des AGP im GA Molekül	26
Abbildung 1-4 Metaweinsäure Zusatzstoffe als Pulver und Granulat	31
Abbildung 1-5 Polyveresterungsreaktion von Weinsäure zu Metaweinsäure	33
Abbildung 1-6 Mechanismus der Fischer Veresterung	34
Abbildung 1-7 Veresterung zum cyclischen Dimer der Metaweinsäure	36
Abbildung 1-8 Chemische Struktur von CMC	37
Abbildung 1-9 Peakabfolge hydrolysierter Natrium-Carboxymethylcellulose mittels Perchlorsäure,	39
Abbildung 2-1 Gesamtkolloidgehalt von deutschen Weißweinen (n=25)	40
Abbildung 2-2 Prozentualer Vergleich der monomeren Zuckerbausteine verschiedener Kolloide	42
Abbildung 2-3 Ergebnisse der Analytik der Stabilisotopenverhältnisse (H,O und C, N)	49
Abbildung 2-4 PCA Analyse (PC1 und PC2) von K und P	53
Abbildung 2-5 Negatives ESI-MS Spektrum von MWS (Probe C)	56
Abbildung 2-6 Intensitätsmuster der spezifischen Massen von MWS-Produkten (A-G)	58
Abbildung 2-7 Chromatogramm Versuchswein mit Metaweinsäure nach SPE	60
Abbildung 2-8 Kalibrierung von Metaweinsäure über die Summe der Intensitäten.	62
Abbildung 2-9 Detektionsmuster der Intensitäten der spezifischen Metaweinsäureoligomere	62
Abbildung 2-10 Chromatogramm der sauren Hydrolysate von CMC	66
Abbildung 2-11 Chromatogramm der Zuckerstandardsubstanzen für die HPAEC-PAD Analyse	67
Abbildung 2-12 Chromatogramm eines CMC-haltigen Kolloids	67
Abbildung 2-13 Linearer Zusammenhang der einzelnen Peakflächen	69
Abbildung 2-14 Linearer Zusammenhang der Summe der Peakflächen	69
Abbildung 2-15 RI Signal der dn/dc Bestimmung von Metaweinsäure	71
Abbildung 2-16 Elutionsprofil der Kalibrierung der Säule Superose 12	74
Abbildung 2-17 Elutionsprofil der Kalibrierung der Säule Superose 6	75
Abbildung 2-18 Elutionsprofil der Kalibrierung der Säule Superose 12	75
Abbildung 2-19 SEC-RI-Chromatogramm (Superose 12 10/300 GL) von Metaweinsäure	77
Abbildung 2-20 SEC-RI-Chromatogramm (Superose 6, 10/300 GL) von CMC	80
Abbildung 2-21 SEC-UV-RI-Elutionsprofil der Probe AA1	82
Abbildung 2-22 Linearer Konzentrationszusammenhang von CMC und Lysozymtrubbildung	85
Abbildung 2-23 Linearer Konzentrationszusammenhang von MWS und Lysozymtrubbildung	85
Abbildung 2-24 Infrarotspektrum-Spektrum von Metaweinsäure	87
Abbildung 2-25 Infrarotspektrum von Natrium-Carboxymethylcellulose	87
Abbildung 2-26 ATR Spektrum von Lysozym	88
Abbildung 2-27 ATR Spektrum von Metaweinsäure-Trub (MWS)	89
Abbildung 2-28 ATR-Spektrum von CMC-Trub	90

Abbildung 2-29 Monomerer Weinsäure Gehalte in MWS-Produkten (Produkt A - G)	91
Abbildung 2-30 Filtrationsverlauf (Schichtenfiltration) von Metaweinsäure in Weißwein	94
Abbildung 2-31 Filtrationsverlauf (Schichtenfiltration) von Metaweinsäure in Wasser	95
Abbildung 2-32 Bestimmung der Chloridgehalte in kommerziellen CMC-Produkten	97
Abbildung 2-33 Glucosegehalte der kommerziellen CMC-Produkte	98
Abbildung 2-34 Schwellenwertprüfung - CMC eines Prüferpanels mit 11 Teilnehmern	99
Abbildung 2-35 Schwellenwertprüfung - MWS eines Prüferpanels mit 11 Teilnehmern	99
Abbildung 2-36 Schwellenwertprüfung - GA eines Prüferpanels mit 11 Teilnehmern	100
Abbildung 2-37 Viskositätsbestimmung von Wein versetzt mit CMC (0 - 1000 mg/L)	101
Abbildung 2-38 Viskositätsbestimmung von Wein versetzt mit GA (0 - 2000 mg/L)	102
Abbildung 2-39 Viskositätsbestimmung von Wein versetzt mit MWS (0 – 2000 mg/L)	103
Abbildung 4-1 Bestimmung des Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ )	133
Abbildung 4-2 Kleinmengenfiltrationsstand zur Schichtenfiltration	149

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Häufigste Tartrat Verbindungen in Wein	15
Tabelle 1-2 Produktspezifische Literaturangaben zu CMC, MWS und GA	22
Tabelle 1-3 Mittlere natürliche Häufigkeiten der stabilen Isotope	28
Tabelle 2-1 Monosaccharidverteilung von kommerziell erhältlichen Zusatzstoffen (CA) und von authentischen Gummi Arabikum Proben (AA) aus dem Sudan	43
Tabelle 2-2 Signifikante Mittelwertvergleiche der isolierten Kolloide	45
Tabelle 2-3 L-Arabinose/D-Galactose-Verhältnisse	47
Tabelle 2-4 Kalkulierte (monoisotopische) Massen der Metaweinsäureoligomere	55
Tabelle 2-5 Vergleich kalkulierter Massen der Metaweinsäureoligomere	56
Tabelle 2-6 Grundanalytik des verwendeten Versuchsweins Traubensaftes	59
Tabelle 2-7 Validierungsparameter der Bestimmung von Metaweinsäure in Weißwein	63
Tabelle 2-8 dn/dc-Werte von verschiedenen Metaweinsäureprodukten	72
Tabelle 2-9 dn/dc-Werte von CMC, GA und MWS	73
Tabelle 2-10 Absolute Molekulargewichte von MWS-Proben	78
Tabelle 2-11 Absolute Molekulargewichte von CMC-Proben	80
Tabelle 2-12 Ergebnisse der SEC-RI-MALS-Analytik von GA1-GA4 und AA1-AA8	83
Tabelle 4-1 Verwendete Standardgeräte	127
Tabelle 4-2 Dextran- und Protein Standardsubstanzen (Kalibrierung des RI- oder UV-Signals)	131
Tabelle 4-3 Programmierung des Detektors (Carbohydrates Standard Quad. Potential)	136
Tabelle 4-4 Standardsubstanzen für die HPAEC-PAD	137
Tabelle 4-5 Kalibrier- und Qualitätsstandards der IRMS-Analysen	143

# 1 Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten und durch steigende Wettbewerbskonkurrenz werden Weine beschleunigt ausgebaut und schnellstmöglich auf den Markt gebracht. Das hat den Nachteil, dass diese Produkte auch nach der Endfiltration und der Füllung in die Flasche zu „Weinstein“ neigen (Zoecklein *et al.* 1995). Hohe Kundenansprüche und die geringe Akzeptanz von Kristallausscheidungen erfordern, Weine nach der Erzeugung schnellstmöglich als klares und stabiles Endprodukt auf den Markt zu bringen (Bott 1988). Die Konzentration von Ethanol, Kolloiden, Weinsäure, Kalium- und Calciumionen, der pH-Wert des Weines sowie die Lagertemperatur und die Dauer der Lagerung, aber auch die Beschaffenheit der Behältnisse (Rauheit der Oberfläche) sind die bekanntesten Parameter, die die Kristallausscheidung beeinflussen können (Pilone 1965) und (Wucherpfennig *et al.* 1984). Die Kristallstabilisierung für junge Weine erfolgt meist durch subtraktive oder additive Verfahren. Bei subtraktiven Verfahren werden Kristallisationspartner entfernt oder vermindert. Hierzu zählt das Kälteverfahren, das Kältekontaktverfahren oder die Elektrodialyse (Rhein 1979) und (Uitslag *et al.* 1996). Als additives Verfahren wird der Zusatz von Inhibitoren, die das Ausfallen von Kristallen chemisch verhindern, gesehen (Marchal 2009). Zu diesen Inhibitoren gehören die polymeren Zusatzstoffe Natrium-Carboxymethylcellulose, Metaweinsäure und Gummi Arabikum. Natrium-Carboxymethylcellulose und Gummi Arabikum zählen zu den hydrophilen und gut löslichen Polysacchariden, während Metaweinsäure als Hydrokolloid aus polymerisierter Weinsäure besteht (Bosso *et al.* 2015). Metaweinsäure ist als Schutzpolymer gegen Weinsteinkristallisation seit 1957 bekannt und bereits 1962 wurde diesem Stoff eine Schutzwirkung, ab einer Einsatzmenge von 10 g pro 100 L Wein, über 9 Monate zugeschrieben (Wucherpfennig 1962). Die Zusatzstoffe Natrium-Carboxymethylcellulose und Metaweinsäure sind seitens des Gesetzgebers auf eine Höchstmenge von 100 mg/L (10 g/hL) beschränkt. Für Gummi Arabikum wird eine Einsatzmenge von 300 mg/L (30 g/hL) empfohlen. Eine Kennzeichnung dieser Stoffe ist nach europäischem Weinrecht nicht erforderlich. Die Zusatzstoffe sind für Wein zugelassen, jedoch ist die Anwendung im Traubensaft untersagt. Japan als wichtigstes Exportland akzeptiert deren Verwendung weder im Wein noch im Traubensaft (Sprenger *et al.* 2014). Zusätzlich sind die Zusatzstoffe in den USA

und Südafrika nicht zugelassen. Häufig kommt es bei der Klärung der Frage, ob und wieviel zugesetzt wurde, zu Schwierigkeiten, da der modernen Weinanalytik die geeigneten analytischen Nachweismethoden fehlen. Des Weiteren stehen die Zusatzstoffe unter Verdacht, Probleme bei der technologischen Verarbeitung, speziell der Filtration, von Wein oder Traubenmost zu verursachen (Crespy 2004). Von großem Interesse ist ebenso die Instabilität des ersten filtrierte Weines, da die polymeren Zusatzstoffe vom Filtermaterial adsorbiert werden und der erste Teil somit unstabilisiert in die Flasche gelangen kann (Vernhet *et al.* 1999) und (Belleville *et al.* 1999). Bei den üblichen statischen Membranfiltrationen als auch bei der Cross-Flow Filtration (CFF) wirken alle natürlichen Polysaccharide im Wein sowie die Zusatzstoffe am Aufbau einer Deckschicht mit. Die Verblockung von Filtermaterial, die sogenannte Fluxhemmung, verursacht durch natürliche Polysaccharide, wird nach Literaturangaben am stärksten hervorgerufen durch Mannane, Arabinogalactanproteine (APG) und Rhamnogalacturonane (RG I/ II) (Dietrich 2009) und (Wörner *et al.* 1994). Durch den Zusatz polymerer Stoffe kann dieses Problem noch verstärkt werden. Weiterhin kann sich der Einsatz von GA und CMC im Rotwein nachteilig auf die Farbe auswirken oder zu unerwünschten Trübungen führen (Riber au-Gayon *et al.* 2000) (S. 299 ff.).

Die Zusatzstoffe enthalten lediglich zwingend notwendige Angaben zu Gehalt, Qualität und Anwendung. Meist ist die firmenspezifische Charakterisierung der Produkte unzureichend, alle gelten als nicht-gesundheitsgef hrend und können nach heutigem Wissenstand bedenkenlos verzehrt werden. Aufgrund der fehlenden Spezifikation kann z. Z. keine Aussage über die genauen Eigenschaften und die Qualität der Produkte gemacht werden. Zusätzlich kommt es beim Im- und Export von Traubensaft und Wein, zwischen Produzenten und auch Herstellern von Filterschichten, zu Streitfällen. Zudem wird über die Wirksamkeit der kolloidalen Zusatzstoffe, sowohl chemisch als auch sensorisch, kontrovers diskutiert.

### 1.1.1 Polysaccharide im Wein (Kolloide)

„(...) Die Wissenschaft der Kolloide ist eine Wissenschaft der Mikrostruktur der Materie (...) Alle Lebewesen sind aus Kolloiden aufgebaut, fast alle unsere Nahrungsstoffe, die Rohstoffe unserer Kleider und unsere Baumaterialien (...) Im großen Reich der Wissenschaft von der Struktur der Materie, gehört der Kolloidwissenschaft jenes Teilgebiet, das zwischen den Dimensionen der Moleküle und jenen der makroskopischen Gebilde liegt (Svedberg 1921)“.

Der Begriff Kolloid stammt aus dem Griechischen und leitet sich aus den Begriffen „Kolla“ (Leim) und „Eidos“ (Gestalt) ab. Geprägt wurde der Begriff „Kolloid“ bereits 1861 von T. Graham. Neben natürlichen Polysacchariden im Wein werden auch die Zusatzstoffe Natrium-Carboxymethylcellulose, Metaweinsäure und Gummi Arabikum der Gruppe der Kolloide zugeordnet (Dietrich 2009).

Natürliche Kolloide wie Weinpolysaccharide stammen aus der Beerenhaut sowie aus dem Fruchtfleisch der Trauben und werden durch enzymatischen Abbau zu löslichen Pektin-Bruchstücken gespalten. Die alkoholische Gärung und die enzymatischen Abbaureaktionen verändern das Polysaccharidprofil von Most zu Wein merklich. Pektin ist chemisch aus einer Galakturonsäurekette aufgebaut, die partiell (70 – 80 %) mit Methanol verestert ist. Polygalacturonsäure oder Homogalacturonan sind Synonyme für diese bestimmte chemische Struktur, saurer löslicher Pektin-Abbauprodukte. Weiterhin kommen Nicht-Pektinpolysaccharide oder auch Pflanzengummis, welche überwiegend aus L-Arabinose, L-Rhamnose, D-Galactose und kleineren Mengen D-Xylose, D-Mannose und D-Glucose aufgebaut sind, im Most vor. Diese strukturbildenden Polysaccharide stammen ebenfalls aus den Zellwänden der Weintraube und werden durch endogene und exogene Pektinasen im Most freigesetzt. Es handelt sich dabei um Heteropolysaccharide mit einem weiten Molekulargroßenbereich (10.000 bis über 200.000 Dalton) und stark variierender Monomierzusammensetzung. Hier finden sich sowohl neutrale Fraktionen, die viel L-Arabinose und D-Galactose enthalten, als auch saure Fraktionen mit hohen Gehalten an D-Galakturonsäure und niedrigen Gehalten an L-Rhamnose, L-Arabinose und D-Galactose (Riberçau-Gayon *et al.* 2000) (S. 82 ff).

Die ersten detaillierten Studien zum chemischen Aufbau von löslichen Pektinstoffen aus Trauben stammen von (Dubourdieu *et al.* 1981), (Brillouet 1987), (Saulnier; Thibault 1987) sowie (Saulnier; Brillouet 1988). Diese Arbeiten lieferten erstmals

ausführliche Beschreibungen der chemischen Strukturen von löslichen Polysacchariden in Traubenmost und Wein.

Demnach werden saure Homogalacturonane nochmals chemisch unterteilt in Rhamnogalacturonane (RG-I und RG-II) und Arabinogalactane (AG-I und AG II). Neutrale Pektinabbauprodukte bestehen hauptsächlich aus Arabanen und Typ II Arabinogalactanen. Arabane sind kleine Polymere mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht um die 6.000 Dalton. Neutrale Arabinogalactane Typ II enthalten zu 88 % neutrale Zucker, zu 3 % Uronsäuren und ca. 8 % Protein und werden deshalb auch als Arabinogalactanprotein (AGP) bezeichnet.

Die Polysaccharide des Weines lassen sich im Wesentlichen in drei große Gruppen einteilen. Polysaccharide reich an L-Arabinose und D-Galactose (PRAG), RG I und RG II, welche reich an Rhamnogalacturonanen sind sowie Mannoproteine (MP), die zum Großteil aus D-Mannose bestehen (Apolinar-Valiente *et al.* 2013). Analytierte Polysaccharide im Rotwein bestehen zu 42 % aus Arabinogalactanprotein, zu 35 % aus MP, zu 19 % aus RG II und zu 4 % aus RG I (Vidal *et al.* 2003).

Saure und neutrale Pektinabbauprodukte im Most werden während der alkoholischen Gärung durch enzymatische Reaktionen weiter abgebaut, so dass im Wein beispielsweise keine Homogalacturonane mehr vorhanden sind. Überwiegend bestehen die Polysaccharide im Wein aus neutralen Pektinabbauprodukten. Natürliche Trauben Pektinasen, z. B. endo- und exo-Polygalacturonase, endo-Pektinlyase, endo- und exo-Pectatlyase und Pectinmethylesterase verändern die Polysaccharide bereits im Most. Die Hefe stellt die zweitwichtigste Quelle für lösliche Polysaccharide im Wein dar. Dabei werden vor allem Mannoproteine mit einem Mannose-Gehalt von über 90 % und 10 % Protein sowie Glucomannoproteine während der Gärung durch die Hefe in den Wein freigesetzt. Arabinogalactane, Arabinogalactanprotein, Rhamnogalacturonane und Mannane aus der Hefezellwand prägen somit das Polysaccharid-Profil im Wein.

Als weitere Quelle für Polysaccharide im Wein gilt ebenfalls der Befall von Trauben mit dem Pilz *Botrytis cinera* und dem daraus resultierenden Gehalt an  $\beta$ -1,3-1,6-D-Glucan. Dieses verzweigte und langkettige Polysaccharid bildet der Pilz während des Wachstums zur Nährstoffspeicherung. Polysaccharide im Wein werden oft mit Struktur, Vollmundigkeit bzw. Weichheit des Weines in Verbindung gebracht. Bewiesen ist, dass Weine mit diesen organoleptischen Eigenschaften, quantitativ höhere Gehalte an Pektinabbauprodukten enthalten. Isolierte lösliche Polysaccharide

aus Wein, die dann mittels Modellweinflösung und mit Polysaccharid-Gehalten im g/L-Bereich verkostet wurden, erzielten jedoch keine sensorisch signifikanten Ergebnisse. Vielmehr wird davon ausgegangen, dass die sensorischen Effekte aus einem Zusammenspiel von Polysacchariden und phenolischen Substanzen resultieren (Riberřau-Gayon *et al.* 2000) (S. 82 ff).

Durchschnittlich enthält ein Weinkolloid nachfolgende Zucker: 20–30 % D-Mannose, 5 – 15 % D-Galactose, 2 – 10 % L-Arabinose, 1 – 5 % L-Rhamnose, < 2 % Glucose und als saure Monosaccharide 2 – 6 % D-Galakturonsäure und in Spuren D-Glucuronsäure (< 1 %) (Llaubères *et al.* 1987). Neuere Arbeiten untersuchten die Polysaccharide der spanischen Rebsorte „Monastrell“ unter verschiedenen Ausbauvariationen hinsichtlich der Zuckerbausteine der mit Ethanol gefällten Kolloidfraktion. Danach erfolgten die Hydrolyse mit Trifluoressigsäure und die Analyse der acetylierten Monomere mittels GC-MS. Bei dieser Methodik werden neben L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Galactose, D-Glucose und D-Mannose auch D-Apiose sowie die methylierten Zucker 2-O-Methylfucose und 2-O-Methylxylose erfasst. Diese Arbeit postuliert ebenfalls als Hauptzucker D-Mannose gefolgt von D-Galactose und L-Arabinose sowie L-Rhamnose und D-Glucose (Apolinar-Valiente *et al.* 2013).

Letztendlich enthält ein durchschnittlicher Weißwein zwischen 150 und 500 mg/L weineigene Kolloide. Der Gehalt an Kolloiden kann zusätzlich durch Klima, Rebsorte und Verarbeitung bzw. des Einsatzes von polymeren Zusatzstoffen beeinflusst werden (Sprenger *et al.* 2014).

### 1.2 Stand der Wissenschaft

Obwohl die Zusatzstoffe Metaweinsäure (MWS), Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC) und Gummi Arabikum (GA) lange bekannt sind, gibt es wenig aktuelle Veröffentlichungen zu analytischen Nachweismethoden und zur Wirkungsweise im Wein.

Metaweinsäure (MWS) und Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC) werden bevorzugt zur Verhinderung des Weinsteinausfalls bei endfiltrierten Weinen angewendet. Zur Vorbeugung von proteinbedingten Trübungen wird der Zusatz von Mannoprotein neben der problembehafteten Schönung mit Bentonit empfohlen (Dupin *et al.* 2000) und (Bosso *et al.* 2015).

Seit 1977 ist GA als Zusatzstoff für Wein im Fokus der Weinindustrie, seit 1979 in der EU zugelassen und wird vor allem vorbeugend gegen durch Metallionen verursachte kolloidale Niederschläge eingesetzt. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit sind GA-Lösungen bis zu 50 % möglich. GA ist bevorzugt in warmem Wasser anzusetzen. Die guten Lösungseigenschaften erleichtern die oenologische Anwendung erheblich. Je nach Herstellungsverfahren können die Produkte unlösliche Fraktionen enthalten, weshalb geschwefelte Lösungen von 150 – 300 g/L als Weinbehandlungsmittel hergestellt werden. Die Behandlung der Reben mit kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln aber auch die Verwendung von kupferhaltigem Equipment (Bronze) während des Weinausbaus, kann zu kupferhaltigen Kolloidniederschlägen führen. Dosagen von 10 – 15 g/hL können diesem Problem entgegen wirken, vorausgesetzt der Wein enthält nicht mehr als 1 mg/L Kupfer. Wenn darüber hinaus mehr Kupfer enthalten ist, kann überschüssiges Kupfer mittels Kaliumhexacyanoferrat, bekannt als Blauschönung, entfernt werden und zusätzlich als vorbeugende Maßnahme GA zugesetzt werden. Darüber hinaus ist GA effektiver bei höheren pH-Werten. Der Zusatzstoff verhindert aber nicht die Bildung von kolloidalem Kupfersulfid, sondern das Ausflocken dieser Trübung wird durch einen Zusatz von GA verhindert. Weniger effektiv ist der Zusatz gegen Eisentrübungen. Kolloidale Eisen-III-Phosphat-Trübungen haben eine wesentlich größere Masse als die kupferbasierten Trübungen und würden höhere GA Dosagen erfordern. Jedoch ist die Wirkung von GA von Wein zu Wein unterschiedlich und ist keine allumfassende Lösung für die beschriebenen Probleme. Empfohlene Dosagen von 20 – 25 g/hL sind als ergänzende Behandlung, beispielweise in Kombination mit Citronensäure bis 0,5 g/hL, zur Bildung von löslichem Eisencitrat anzusehen. Diese

Verfahrensweise wird gern zur Stabilisierung von Rotweinen gegen die Ausflockung von Eisen-III-tannat genutzt. Jedoch wird GA im Rotwein eher eingesetzt, um die Ausflockung von Phenolen und roten Farbstoffen (Anthocyane) zu verhindern. Es ist bekannt, dass die roten Farbpigmente in Rotweinen kolloidale Strukturen aufweisen können. Der Zusatz von GA eliminiert diese Farbstoffe nicht, wie beispielsweise die Behandlung mit Gelatine oder Eialbumin, sondern hält die Pigmente in Lösung und beeinträchtigt somit nicht die Farbe. GA wird zudem eine dauerhafte Wirkung während der Lagerung zugeschrieben. Wenn GA in zu hohen Dosen eingesetzt wird, kann sich der schützende Effekt umkehren und es können sich Niederschläge bilden (Riberçau-Gayon *et al.* 2000) (S. 298-300). Der Nachweis, dass GA nicht vor Weinsteinausscheidungen schützt, wurde bereits in den 80er Jahren und in neueren Arbeiten belegt (Wucherpfennig *et al.* 1984), (Rosch 2007) und (Köhler 2009).

Während der Vermarktung von GA-Zusatzstoffen für Wein werden diese immer wieder mit positiven Einflüssen auf die Weinsensorik in Verbindung gebracht. Speziell das Mundgefühl soll verbessert werden, da dem Wein durch Zusatz von Gummi Arabikum mehr Fülle verliehen wird. In der Arbeit von Constantin (2011) wurde der sensorische Einfluss von GA auf Wein mit geschulten Verkostern in Dreieckstests untersucht. Verkostet wurden 10 unterschiedliche Weine mit Zusatz von 200 – 300 mg/L gegen die unbehandelte Probe des gleichen Weines. Bei keiner Probe konnten die Prüfer die Zugabe von GA signifikant von der unbehandelten Probe unterscheiden. Weiterhin wurden die Viskositäten der mit GA versetzten Weine zwischen 0 – 2000 mg/L bestimmt. Bei einem Zusatz von 0 – 2000 mg/L GA änderte sich die Viskosität lediglich um 0,04 – 0,05 mPaS in beiden Weinen. Ausgehend vom 0-Wert hatten beide Weine sehr unterschiedliche Grundviskositäten. Der Viskositätsunterschied zwischen jedem verkosteten Paar (unbehandelte Probe gegen Probe mit Zusatz) beträgt in der beschriebenen Arbeit zwischen 0,007 und 0,05 mPaS, diese verhalten sich nicht signifikant. Somit schlussfolgert diese Arbeit, dass GA weder einen Einfluss auf das Mundgefühl hat, noch einen messbaren oder sogar signifikanten Einfluss auf Sensorik und Viskosität nimmt. GA beeinflusst somit ebenfalls nicht die organoleptischen Eigenschaften von behandelten Weinen. Anhand der geringen Viskositätsänderungen lässt sich darüber hinaus vermuten, dass auch eine Erhöhung der Dosen, die weit über der üblichen Einsatzmenge von 10 – 30 g/hL liegen, keine sensorischen Effekte zu erwarten sind (Constantin *et al.* 2011).

Diesen Aspekt greift eine weitere Arbeit aus dem Jahr 2009 auf und kommt zu dem Schluss, dass bei einer immensen Löslichkeit von 500 g/L GA, die Verzweigung des Polymers, und des damit einhergehenden geringen Durchmessers von nur 20 nm bzw. 36 nm, verantwortlich für die geringen Viskositäten hochkonzentrierter Lösungen sind. Zusätzlich beschreibt diese Arbeit, dass GA eindeutig nicht gegen Kupfer- und geringe Eisentrübungen wirkt. Vielmehr wird die zyklische Form des Hauptbestandteils von GA (Arabinogalactan) eher als kontraproduktiv im Hinblick auf die Wirkungsweise eines Schutzkolloids diskutiert (Renard *et al.* 2009) und (Mahendran *et al.* 2008). Somit sind keine Viskositätserhöhungen und keine Verbesserungen des Mundgefühls oder der Fülle eines Weines zu erwarten.

Den Untersuchungen von (Crespy 2004) nach zu urteilen, mindert GA die Adstringenz von Rotweinen bei Einlagerung in neue Barriquefässer.

Für die stabilisierende Wirkung gegen Weinstein sind vielmehr Metaweinsäure und Natrium-Carboxymethylcellulose im Gespräch. Abbildung 1-1 zeigt die Abnahme der Leitfähigkeit als Indikator für entstehenden Weinstein in einem mit unterschiedlichen Methoden finalisierten Weißwein. Klar zu erkennen ist hier, dass der Wein der mit MWS behandelt wurde, über vier Stunden bei 0 °C, kaum eine Änderung der Leitfähigkeit zeigt und der Wein als stabil anzusehen ist. Wohingegen die Kontrollprobe einen deutlichen Leitfähigkeitsabfall bereits nach einer Stunde von ca. 80  $\mu\text{S}/\text{cm}$  zeigt und als instabil anzusehen ist (instabil  $> 30 \mu\text{S}/\text{cm}$ ). Auch der Wein, der mit GA behandelt wurde, zeigt einen ähnlichen Leitfähigkeitsabfall wie die Kontrollprobe über den dargestellten Zeitraum, was einen klaren Beweis gegen die Wirkung von GA gegen Weinstein darstellt (Riberçau-Gayon *et al.* 2000) (S. 36).

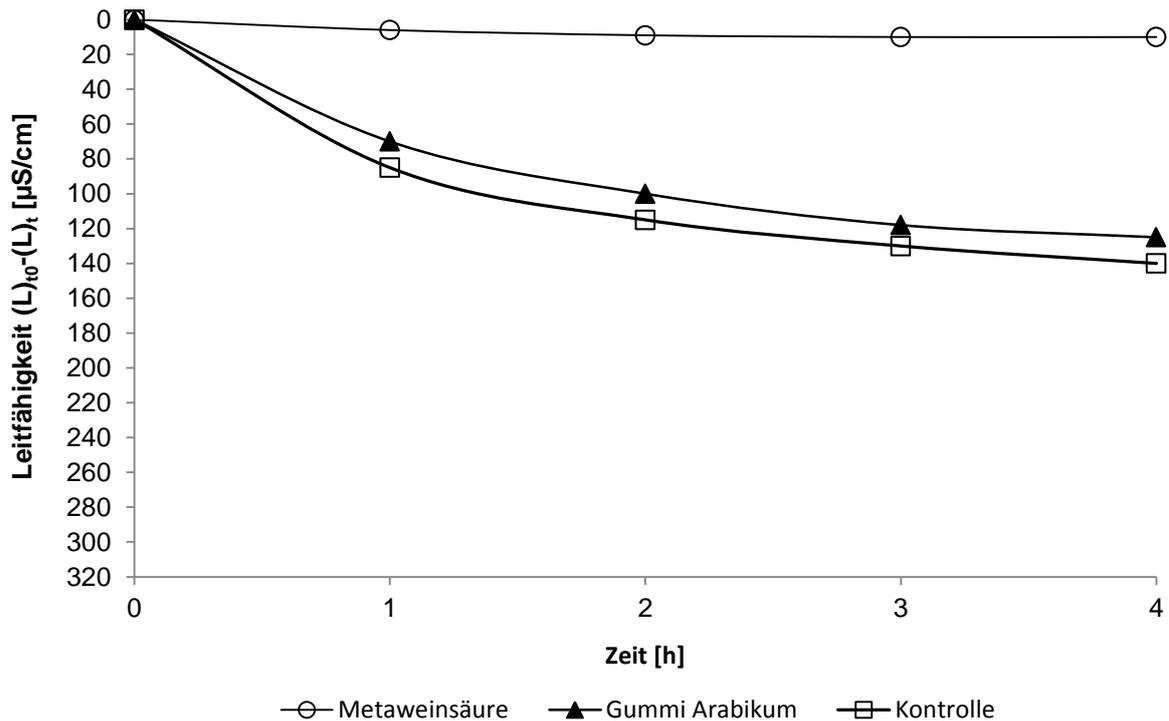


Abbildung 1-1 Kristallisationskinetik von KHT bestimmt mittels Leitfähigkeitsmessung eines Weines, aufgeteilt nach der jeweiligen Behandlung des Weines kurz vor Abfüllung, Lagerung bei 2 °C und versetzt mit 5 g/L KHT als Kontaktweinstein: In Anlehnung an (Riberçau-Gayon et al. 2000) S. 36

Die Schutzwirkung von MWS ist abhängig von der Lagertemperatur des Weines, da die Hydrolyse der Metaweinsäure stark temperaturabhängig ist. Metaweinsäure ist hygroskopisch und unter Wasseranlagerung hydrolysiert das Polymer wieder in monomere Weinsäure. Aus diesem Grund sollte der Zusatzstoff trocken gelagert werden und der Vermahlungsgrad sollte nicht zu fein sein. Von Herstellern wird eine Kristallstabilität von etwa 24 Monaten bei einer Lagertemperatur von 10 – 12 °C angegeben, wobei sich die Lagerzeit in Abhängigkeit von der Lagertemperatur wie folgt ändert (Riberçau-Gayon *et al.* 2000) (S.43):

- 3 Monate bei 20 °C
- 1 Monat bei 25 °C
- 1 Woche bei 30 °C
- wenige Stunden bei 35 – 40 °C

Die Temperaturabhängigkeit stellt einen erheblichen Nachteil der MWS dar. Metaweinsäure wird auf Grund seiner hygroskopischen Eigenschaften als Pulver eingesetzt und muss wegen der Hydrolyse bei höheren Temperaturen in kaltem

Medium angerührt werden. Da MWS sehr gut löslich ist, stellt dies aber keinen Nachteil dar. MWS ist kein einzelnes großes Molekül sondern vielmehr eine Zusammensetzung verschiedener Polymere mit unterschiedlichem Molekulargewicht, abhängig von der Veresterungsrate der freien Säuregruppen des L-Weinsäuremoleküls. Dass die Größe des Polymers Einfluss auf die Schutzwirkung nimmt, ist nicht bekannt, dennoch resultieren aus einer schlechten Veresterungsrate mehr freie Reaktionsstellen und die Hydrolyse der MWS könnte schneller verlaufen. Zusätzlich stellt sich die Frage, wie viel unveresterte Weinsäure im Produkt verbleibt und wie sich der Gehalt der Gesamtsäure des Weines verändert. Schon bei einer Lagertemperatur von 18 – 20 °C über 20 Tage ist eine deutliche Abnahme der Veresterungsrate zu erkennen. Da dies keine unüblichen Lagertemperaturen sind, eröffnet sich die Frage nach der Sinnhaftigkeit des Einsatzes von MWS. Dieser Zusatzstoff wird dem Wein ebenfalls nach der Schönung und kurz vor der Endfiltration zugegeben. Wenn MWS vor der Schönung eingesetzt wird, kann es zu Flockungen beispielsweise mit Bentonit oder Kaliumhexacyanoferrat kommen. Die Verwendung von hochveresterten Produkten kann zu einer Opaleszenz des Weines führen, weshalb empfohlen wird, MWS vor der abschließenden Filtration zuzugeben. Diese Verfahrensweise wirft die Frage auf, wieviel unstabiler Wein nach der Abschlussfiltration abgefüllt wird und wieviel MWS im Filtermaterial verbleibt (Riberřau-Gayon *et al.* 2000) (S. 40 – 43).

Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC) verändert nachweislich die Viskosität eines Weines. Zur stabilisierenden Wirkung von CMC im Wein ist bekannt, dass CMC zu den Langzeitstabilisatoren zählt. Aufgrund der chemischen Stabilität unterliegt das Polymer im Wein keiner Veränderung und ist nicht anfällig gegenüber der Lagertemperatur. Vielmehr wird dem Zusatzstoff eine temperaturunabhängige Stabilität über 12 Monate und mehr zugeschrieben. Nachteilig im Hinblick auf Farbverluste oder Trübungen kann sich die Reaktion zwischen positiv geladenen Biomolekülen, wie Anthocyanen im Rotwein oder Proteinen, mit dem negativ geladenen CMC-Polymer auswirken (Claus *et al.* 2014) und (Marsh 2013). Zusätzlich postuliert eine weitere Arbeit einen äquivalenten stabilisierenden Effekt bereits bei 20 mg/L (2 g/hL) CMC im Gegensatz zu 100 mg/L Metaweinsäure (Gerbaud *et al.* 2010).

Bei einem Versuch mit MWS (10 g/hL) und CMC (4 g/hL) über 5 – 30 Tagen mit einer regelmäßigen Wärmebehandlung von 55 – 60 °C zeigte CMC keinen Wirkverlust,

wohingegen auch hier der mit MWS behandelte Wein bereits nach 5 Tagen Instabilitäten aufwies. Gleichmaßen stabil war die Probe, die mit CMC behandelt und bei 4 °C einen Monat lang gelagert wurde. Bereits ab einer Konzentration von 2 mg/L (0,2 g/hL) verringert der CMC Zusatz das Kristallwachstum um das Siebenfache. Diese positiven Ergebnisse, in Kombination mit der einfachen Handhabung und des relativ kostengünstigen Einsatzes zeigen, dass CMC ein wirksames Mittel mit weniger Nachteilen als GA und MWS für die beschriebenen Einsatzgebiete darstellt (Riberëau-Gayon *et al.* 2000) (S. 46-48).

Die Entwicklung einer analytischen Nachweismethode hängt zum einen von den in der Literatur bereits beschriebenen Sachverhalten ab und zum anderen spielt die analytische Ausstattung eine wesentliche Rolle. Der grundlegende Gedanke ist, dass eine Nachweismethode einfach, schnell und dennoch spezifisch für den jeweiligen Analyten sein sollte. Spezifität tritt hier in Konkurrenz mit dem analytischen Aufwand der betrieben wird, um eine Substanz zweifelsfrei identifizieren zu können und gegebenenfalls zu quantifizieren.

Ein beschriebener Nachweis von Metaweinsäure ist die Fällung mit Cadmiumacetat. Metaweinsäure bildet in Verbindung mit Cadmiumacetat in einem leicht sauren Milieu einen unlöslichen Niederschlag. Ein aliquoter Teil Wein wird demnach mit 96%igem Ethanol versetzt und anschließend wird eine 5%ige Cadmiumacetatlösung zugegeben. Nach 10 Minuten soll sich in Anwesenheit von Metaweinsäure ein filmartiger Niederschlag bilden. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 30 mg/L (Tanner 1987) (S. 143-144). Diese Methode ist aufgrund des schwermetallhaltigen Reagenzes nicht praktikabel und auch nicht-spezifisch. Weiterhin würde diese Methodik lediglich einen qualitativen Nachweis zulassen.

In einer weiteren Arbeit wird die Hitzeinstabilität von MWS zum Nachweis genutzt. Hierzu wird die Änderung der Leitfähigkeit im Wein, vor und nach Erhitzung, was die Hydrolyse von MWS bewirkt, ermittelt. Zusätzlich ist eine Differenzierung der Weinsäuregehalte vor und nach dieser Hydrolyse mittels HPLC beschrieben (Cayotte *et al.* 2003). Die Analytik mittels Leitfähigkeitsänderung ist ebenfalls unspezifisch und ob die geringen Änderungen sowohl der Leitfähigkeit, als auch der HPLC-Methodik, nicht unter methodenspezifische Schwankungen fallen, gilt noch zu klären.

Bei einem durchschnittlichen Weinsäuregehalt von 2 – 6 g/L wird der geringe Zusatz von maximal 100 mg/L MWS keine signifikante Änderung des

Gesamtweinsäuregehaltes bewirken, die nicht in die methodenspezifische Standardabweichung fällt.

Eine weitere qualitative Möglichkeit wurde bereits 1971 beschrieben. Nach Fällung der Metaweinsäure mittels Essigsäure, Calciumacetat und Ethanol wird die Probe gekühlt und zentrifugiert. Im Anschluss wird das Präzipitat mit Salzsäure aufgenommen und zur dünnschichtchromatografischen Trennung auf Kieselgurplatten, unter Verwendung von Butanol als Fließmittel, aufgetragen. Nach dem Trocknen und einer Farbreaktion mit in Essigsäure gelöstem Eisenacetat lassen sich Flecken oder Ringe in ziegelroter Färbung erkennen (Stella 1971).

Alle beschriebenen Methoden für MWS sind unspezifisch und entsprechen somit nicht den eingangs geforderten Anforderungen nach Spezifität und Quantität einer Analyseverfahren.

Gummi Arabikum (GA) ist ein gut charakterisierter Naturstoff. Die meisten Arbeiten beschäftigen sich seit einigen Jahrzehnten mit den strukturellen Grundlagen dieses hochkomplexen Moleküls (Islam *et al.* 1997), (Mahendran *et al.* 2008) und (Nie *et al.* 2013).

Durch die Ähnlichkeit zu den Polysacchariden des Weines ist eine analytische Differenzierung von GA im Wein schwierig. Eine Arbeit aus dem Jahr 2004 greift diesen Aspekt auf. Hier wird ein mit GA behandelter Wein über Größenausschlusschromatographie (SEC) getrennt und der Ausschlussvolumenpeak auf die Anwesenheit von D-Glucose und D-Mannose hin untersucht. Da diese beiden Zucker in GA nicht vorkommen, wird bei Abwesenheit von D-Glucose und D-Mannose im Ausschlussvolumenpeak der SEC-Trennung geschlussfolgert, dass GA enthalten ist. Hier wird davon ausgegangen, dass der Ausschlussvolumenpeak nur GA enthält. Bei dieser Herangehensweise wird übersehen, dass Weine von Natur aus Arabinogalactane enthalten, die auf Grund ihrer Größe ebenfalls im Ausschlussvolumen einer SEC-Säule eluieren und zu falsch-positiven Ergebnissen führen können (Gallina *et al.* 2004).

Für GA ergab sich somit aus der Literatur kein Leitgedanke, mit der sich die Analytik zweifelsfrei im Wein oder im Traubensaft umsetzen ließ.

Für CMC und MWS konnten Angaben aus der Literatur umgesetzt und auf Wein bzw. Traubensaft übertragen werden. Die beschriebene Literatur der Analytik der Verteilung von funktionellen Gruppen im CMC-Polymer liefert Ansatzpunkte hinsichtlich saurer Hydrolyse des Polymers mittels Schwefelsäure und Perchlorsäure

sowie der darauffolgenden Trennung der spezifischen CMC-Monomere mit HPAEC-PAD. Ziel ist es, eine quantitative Nachweismethode zu etablieren (Kragten *et al.* 1992), (Puls *et al.* 1998) und (Horner 1999).

Allgemein gibt es über den Zusatzstoff Metaweinsäure (MWS) und im speziellen über die Identifizierung im Wein oder Traubensäften nur wenige Literaturquellen. Eine Diplomarbeit wurde bei der GfL (Gesellschaft für Lebensmittelforschung) in Berlin, zum Thema: „Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Metaweinsäure in Traubensäften“, angefertigt (Lehner 2010). Die Grundidee kann auf Weißwein übertragen werden (Hirn 2013). Die Methodik der Aufkonzentrierung mittels SPE (solid phase extraction), der anschließenden chromatografischen Trennung und massenspektrometrischen Detektion (HPLC-MS), zielt auf eine quantitative Nachweismethode ab.

### **1.2.1 Der Begriff Stabilität in der Weinbereitung**

Flaschentrübungen können eine Vielzahl von Ursachen haben. Sowohl aus der natürlichen Chemie des Weines, als auch aus der Behandlung der Rebstöcke im Weinberg (Spritzmittel) können Ablagerungen in der Flasche resultieren. Aber auch die Bedeutung der Weinbereitung und die Behandlung des Weines im Keller können von großer Wichtigkeit sein. Hier sind zum Beispiel die fehlerhafte Entsäuerung mittels Calciumcarbonat und die anschließende entgegenwirkende Behandlung mit D,L-Weinsäure zu nennen. Zusätzlich können aber auch Nährsalzzusatz, die Behandlung von Weißweinen mit Bentoniten zur Eiweißstabilisierung oder Schwermetallschönungen bzw. Silikatverbindungen im Korken eine entscheidende Rolle spielen. Mit der Erhöhung des Grenzwertes beispielsweise für das Nährsalz Di-Ammoniumhydrogenphosphat von 30 g/hL auf 100 g/hL erlangt die Eisentrübung derzeit wieder an Bedeutung. Di-Ammoniumhydrogenphosphat dient bei der Gärung als Stickstoff- und Phosphatquelle für die Hefe und liefert gleichzeitig die Grundlage für eine Eisen-(III)-Phosphat-Trübung. Zu den niederschlagsbildenden und somit kristall- bzw. trübungsrelevanten Verbindungen im Wein zählen die Salze der Weinsäure als Kalium- oder Calciumtartrat, Schwermetalltrübungen (vorrangig Eisen und Kupfer) sowie Kolloidausflockungen in Verbindung mit anorganischen Kationen oder Proteinen. Aber auch Kupfer bzw. Eisentrübungen (Weißer- oder Grauer Bruch) oder Eiweiß-Tannin Komplexe als gelbliche Schleier können eine Ursache für Ablagerungen in der Flasche sein. Seltener sind hingegen Instabilitäten

resultierend aus Schleimstoffen, sogenannte Pectat Trübungen (*Riber au-Gayon et al.* 2000).

Im Hinblick auf die Stabilität bei der Weinbereitung spielen jedoch anorganische Kationen eine entscheidende Rolle. Kalium kommt am häufigsten in Weißwein vor (0,5 – 2 g/L). Rotwein kann hingegen weitaus mehr Kalium enthalten. Trauben die mit Edelfäule (Grauf ule), also mit Auftreten des Schimmelpilzes *Botrytis cinerea*, verarbeitet werden, haben ebenfalls einen erhöhten Kaliumgehalt. Calcium hingegen hat eine durchschnittliche Konzentration im Weißwein von 80 – 140 mg/L, im Rotwein ist die Konzentration sogar geringer. Calcium produziert ebenfalls einige unlösliche Salze, zu denen in erster Linie Calciumoxalat gehört. In gleicher Weise kommen aber auch Calciumtartrat, Calciumgluconat und Calciummucate vor. In Gegenwart von Ethanol ist Calciumtartrat unlöslich. Beispielsweise durch die Entsäuerung bei der Weinbereitung mit Calciumcarbonat, kann es zu einer Erhöhung des Calciumgehaltes des Weines kommen. Als zweiwertiges anorganisches Kation ist Calcium im Gegensatz zu Kalium eher an der KolloidAusflockung oder der Niederschlagsbildung, resultierend aus Eisen-(III)-Phosphat oder eines Eiweiß-Tannin Komplexes, beteiligt. Obwohl Natrium das häufigste anorganische Kation der Erde ist, enthält Weißwein nur zwischen 10 und 40 mg/L. Höhere Gehalte finden sich in Weinen, die mit Natriumbisulfit geschwefelt wurden oder die mit ungereinigten Bentoniten zur Proteinstabilisierung behandelt wurden. Weine die in der Nähe des Meeres angebaut werden, haben nicht nur einen erhöhten Chlorid- sondern auch einen erhöhten Natriumgehalt (*Riber au-Gayon et al.* 2000) (S. 95 ff).

Die wichtigste organische Säure im Wein ist die L-Weinsäure. Diese zählt zu den starken organischen Säuren mit einem  $pK_s$ -Wert von 3,01 sowie 4,5 entsprechend der beiden Dissoziationsstufen und liegt im Wein m ig dissoziiert vor. Mit Konzentrationen beispielsweise um die 15 g/L für Moste aus unreifen Trauben stellt L-Weinsäure die wichtigste organische Säure im Wein dar. Je nach Lage des Weinbergs variieren die Gehalte für nördliche Lagen um die 6 g/L und für südliche Lagen um die 2 – 3 g/L. L-Weinsäure ist verantwortlich für den durchschnittlichen pH-Wert von 3,0 – 3,5 eines Weines. In der Lebensmittelindustrie wird Weinsäure unter der Nummer E334 ebenfalls als Lebensmittelzusatzstoff in vielen Bereichen verwendet. Weitere wichtige Säuren sind L-Äpfelsäure und die Citronensäure. Trauben aus nördlichen Regionen enthalten zwischen 4 – 6,5 g/L und Trauben aus südlichen Standorten 1 – 2 g/L Äpfelsäure. Citronensäure, mit einer

durchschnittlichen Konzentration von 0,2 – 1 g/L, gehört ebenfalls zu den nennenswerten organischen Säuren im Wein (Riberřau-Gayon *et al.* 2000) (S. 1 ff.). Bei Weinstein handelt es sich um Salze der L-Weinsäure die bevorzugt mit Kalium- oder Calciumionen Komplexe bilden und daraufhin ausfallen. Weinsäure fällt in erster Linie mit Kalium als sogenannter „*echter Weinstein*“ (KHT) aus. Dieser tritt mengenmäßig aufgrund der deutlich höheren Kaliumkonzentration am häufigsten auf. Dabei handelt es sich chemisch um Kaliumhydrogentartrat (KHT). Entsprechend der Dissoziationsstufe der Weinsäure kann auch Di-Kaliumtartrat (K<sub>2</sub>T), als gut lösliches Salz, gebildet werden (vgl.

Abbildung 1-2 und Tabelle 1-1). Weinsäure in Verbindung mit Calcium fällt als Calciumtartrat aus. Meistens besteht eine Kristallablagerung aus einer Mischung der in Tabelle 1-1 genannten Verbindungen (Gerbaud *et al.* 2010), (Pellerin 1998) und (Riberřau-Gayon *et al.* 2000) (S. 21 ff.).

Tabelle 1-1 Häufigste Tartrat Verbindungen in Wein

<b>Verbindung</b>	<b>chemische Formel</b>
Kaliumhydrogentartrat (KHT)	(KC <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> )
Di-Kaliumtartrat (K <sub>2</sub> T)	(K <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> )
Calciumtartrat (CaT)	(CaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> )
Kalium-Calciumtartrat (KCaT)	KCaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>

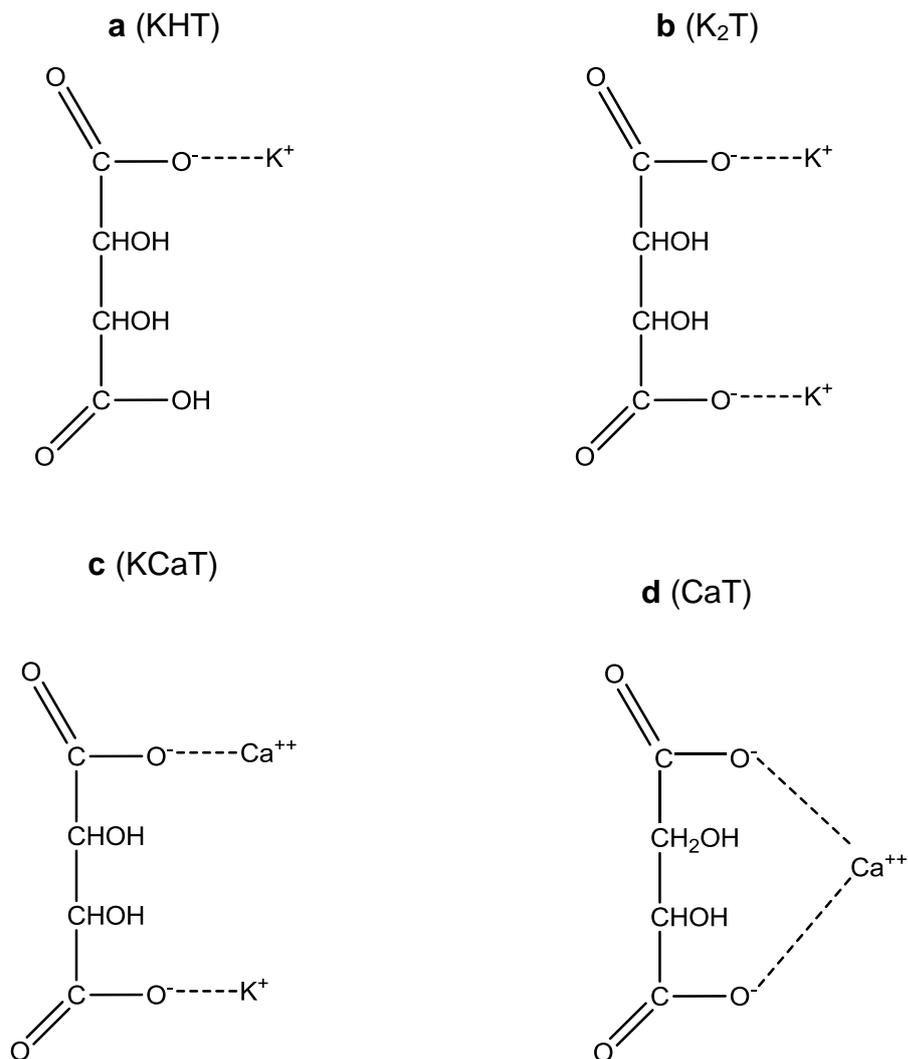


Abbildung 1-2 Kaliumhydrogentartrat KHT (a), Kaliumbitartrat K<sub>2</sub>T (b), Kalium-Calcium Tartrat KCaT (c) und Calcium-Tartrat (CaT) als Reaktionsprodukte von L-Weinsäure und Kalium- bzw. Calciumionen (Riberçau-Gayon *et al.* 2000) (S. 21 ff.)

Di-Kaliumtartrat (K<sub>2</sub>T) ist sehr gut löslich in Wasser und fast unlöslich in Alkohol. In einer 10%igen Alkohollösung beträgt die Löslichkeit von Kaliumbitartrat nur 20,9 g/L. Liegen die Konzentrationen von Weinsäure und Kalium im Überschuss vor und die Konzentration des Salzes ist größer als dessen Löslichkeit, fällt das Salz der Weinsäure in Verbindung mit Kalium- oder Calciumionen aus und setzt sich am Flaschenboden ab. Diese Prozesse sind, abgesehen von der Konzentration an anorganischen Ionen, noch von weiteren Faktoren abhängig. So spielen die Temperatur, der Alkoholgehalt, pH-Wert und der Kolloidgehalt des Weines eine entscheidene Rolle. Aufgrund der Kolloide im Wein kommt es zur Verschleppung

Ausscheidung von Weinstein, da diese Stoffe die Kristallisationsoberflächen von entstehendem Weinstein belegen und das Ausfallen verzögern. (Riberřau-Gayon *et al.* 2000) (S. 21 ff.)

Wie bereits in Abschnitt 1.1 erwähnt, werden zur Stabilisierung von Wein einige subtraktive Verfahren angewendet, die das Endprodukt für die Zeit bis zum Verzehr stabil in den Handel bringen sollen. Zu den wohl aufwändigsten und teuersten gehört hierbei das Kälte- bzw. Kältekontaktverfahren. Historisch bedingt wurden Weine früher über den Winter bei niedrigen Temperaturen über Monate hinweg gelagert und es kam zu einem natürlichen Absatz von Weinstein. Heutzutage wird dieser Prozess stark beschleunigt und verkürzt, um die Weine nach der Produktion schnellstmöglich zu vermarkten. Bei dieser Art der Kristallstabilisierung wird der Wein auf 0 – 4 °C herabgekühlt und die Löslichkeit von Weinstein sinkt. Beim Kältekontaktverfahren wird sogenannter Kontaktweinstein zugegeben. Diese Kondensationskeime beschleunigen zusätzlich die Auskristallisation des Salzes. Hierbei kristallisieren die Kaliumsalze wesentlich schneller als die Verbindungen mit Calcium. Calciumtartrate scheiden sich bei diesem Verfahren nur sehr verzögert ab. Dies liegt an der unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten der Salze. So ist die temperaturabhängige Änderung der Löslichkeit bei KHT wesentlich stärker ausgeprägt als bei Verbindungen mit Calcium (Rhein u. Neradt 1979).

Eine wichtige, jedoch nicht häufig angewendete Methode ist die seit 2001 in der EU zugelassene, technische Elektrodialyse von Wein. Durch einen Membranprozess werden elektrisch geladene Teilchen (Ionen) aus dem Wein entfernt. Der Übergang der Ionen durch die Membran wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes bewirkt. Eine Elektrodialyse besteht im Wesentlichen aus drei Kammern, in deren Mitte sich der Wein befindet. Sowohl auf der einen als auch auf der anderen Seite befinden sich Membranen, die selektiv durchlässig für positiv oder negativ geladene Ionen sind. In den Nachbarkammern fließt angesäuertes Wasser (Spülflüssigkeit). Auf der Kathodenseite reichern sich  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^{+}$ -Ionen an und auf der Anodenseite das negativ geladene Bitartrat. Dadurch werden dem Wein die Kristallisationspartner entzogen, wodurch die Weinsteinstabilität erreicht wird. Als Maß der Elektrodialyse von Wein dient dabei die elektrische Leitfähigkeit des Weines, ausgedrückt in Mikrosiemens ( $\mu\text{S}$ ) (Soares *et al.* 2009) und (Bories *et al.* 2011). Die Techniken der Elektrodialyse oder die Zugabe von Kontaktweinstein in Verbindung mit Kälte sind teuer und in kleinen Betrieben schwer zu realisieren. Erste positive Versuche auf

dem Gebiet der additiven Verfahren waren bereits 1977 durch die Arbeiten von Riber au-Gayon et al. mit dem Zusatz von Polyphosphat zu verzeichnen. Sogenannte polymere Kondensationsprodukte von Salzen der ortho-Phosphorsäure wurden damals eingesetzt. Jedoch führte die Notwendigkeit von hohen Konzentrationen in einigen Weinen zur Bildung von Eisen-(III)-Komplexen und demnach zu anderen Instabilitäten. Im Bereich der Zusatzstoffe oder Inhibitoren gilt Metaweinsäure als der Stoff, der in der Weinbereitung am meisten angewendet wird (Riber au-Gayon et al. 2000) (S. 40 ff.). Bevor jeder Winzer entscheidet, ob er ein Stabilisierungsverfahren anwendet, stehen ihm verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, den Wein hinsichtlich Kristallinstabilit t zu testen. Etablierte und einfache Möglichkeiten bieten die Konduktometrie oder das Minikontaktverfahren, bzw. auch ein einfacher K hlschranktest bringen schon die gewünschten Informationen. Die Konduktometrie (Leitfähigkeit) für den Nachweis von entstehendem Weinstein zu nutzen, stammt bereits aus den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts. Grundlage hierfür ist, dass beim Übergang der dissoziierten L-Weinsäure, in Verbindung mit den positiven Ionen des Kaliums oder Calciums zu einem Salz, messbarer Strom erzeugt wird. Hierzu wird der Wein auf 0 – 4  C gekühlt. Die elektrische Leitfähigkeit wird zum Zeitpunkt  $t_0$  bestimmt, anschließend wird KHT als Kontaktweinstein zugegeben, um die Kristallgeburt zu erleichtern. Danach wird die Lösung gerührt, um eine Ionenwanderung zu erzielen. Wenn Weinstein ausf llt, sinkt die elektrische Leitfähigkeit gegenüber des bestimmten  $t_0$  Wertes ab. Stabile Weine zeigen eine geringe Leitfähigkeitsänderung von  $< 30 \mu\text{S}$ . Weine deren Leitfähigkeitsänderung bei  $> 30 \mu\text{S}$  liegt, gelten als instabil. Für den K hlschranktest werden ca. 100 mL des Weines über 4 – 6 Tage bei 0  C gelagert und im Anschluss visuell auf Kristalle untersucht. Diese Methodik stellt wohl das einfachste Verfahren dar, wozu es keinerlei technischer Ausrüstung bedarf (Würdig und Woller 1989).

Der Zusatz von Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC), Metaweinsäure (MWS) oder Gummi Arabikum (GA) gilt als effiziente und kostengünstige Alternative, um Weine kristallstabil in die Flasche zu f llen. Die Vermeidung von Kristallisationen beruht dabei auf dem Grundprinzip des „*protective colloids*“. Die polymeren Zusatzstoffe belegen demnach die Kristallisationsoberflächen von entstehendem Weinstein und verhindern so die Ablagerung am Flaschenboden (Gerbaud et al. 2010).

Jedoch ist der Gebrauch von kolloidalen Zusatzstoffen nicht ohne Risiko. So finden sich beispielsweise für CMC unterschiedliche Angaben in den Produktdatenblättern

der Hersteller. Aufgelistet werden Zugabezeitpunkte von 24 Stunden, 4 – 5 Tage und sogar 7 Tage vor Endfiltration. Die CMC Produkte sollen in der 5 – 10fachen Menge Wein gelöst oder verdünnt werden. Bei festen Stoffen kann die Ansatzlösung auf bis zu 60 °C erwärmt werden, um eine bessere Löslichkeit zu erwirken. Einige Hersteller weisen darauf hin, dass im Vorfeld Stabilitätstests durchgeführt werden sollten. Bei Sättigungstemperaturen (Minikontaktverfahren  $\Delta \mu\text{S}$ ) über 20 °C kann die Stabilisierung durch Kälte nicht ausreichend sein. Oft richten sich auch die Dosageempfehlungen nach dem Grad der Sättigungstemperaturen.

GA sollte dem blanken und vorfiltrierten Wein zwischen 24 Stunden und bis zu 5 Tage vor der Endfiltration zugegeben werden. Bei GA erfolgt weiterhin der Hinweis der Verbesserung des Mundgefühls des Weines. Diese Aussage wurde bereits populärwissenschaftlich diskutiert (Rosch 2007) und (Köhler 2009).

Vor der Anwendung von CMC und MWS im Rosé oder Rotwein wird grundsätzlich gewarnt, da es zu negativen Farbreaktionen kommen kann. Zusätzlich müssen bei der Verwendung von CMC, MWS und GA alle Weine eiweißstabil und voll ausgeschönt sein, da es sonst zu unerwünschten Reaktionen und Trübungen kommen kann. Vermehrt finden sich Hinweise zur synergistischen Wirkung von MWS in Verbindung mit GA. Die Haltbarkeit der Stoffe wird bei einigen Herstellern mit 30 Monaten angegeben (vgl. Produktdatenblätter der Hersteller)<sup>1</sup>.

Des Weiteren wird in den Produktdatenblättern darauf hingewiesen, dass Metaweinsäure nur in kaltem Wasser bzw. in kaltem Wein angerührt werden darf, da sonst das Polymer in monomere L-Weinsäure hydrolysiert. Aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften ist MWS trocken zu lagern. Einzig ein Hersteller verweist darauf, dass MWS nur dem füllfertigen, vorfiltrierten Wein zugesetzt werden darf, da sonst ein Wirkstoffverlust auftritt, nur die Abfüllfiltration sollte noch erfolgen<sup>1</sup>. Wird der Zusatzstoff im Wein mit endfiltriert, kann dies zu einer partiellen Eliminierung führen. Bei MWS empfiehlt es sich eine konzentrierte Lösung von 200 g/L in kaltem Wasser herzustellen und diese schnellstmöglich zu verbrauchen. Hochveresterte Produkte können zur Opaleszenz der Lösung führen (Riberëau-Gayon *et al.* 2000) (S. 40 ff.).

---

<sup>1</sup> Quellen: <http://www.sulfometa.at/produkte-wb.htm> (Abruf 26.10.2014)  
<http://www.laffort.com/de/produkte/stabilisierung> (Abruf 26.10.2014)  
<http://www.erbsloeh.com/de/produkte/wein/stabilisierung/kristalle> (Abruf 26.10.2014)  
<http://www.eaton.de/EatonDE/ProdukteundLoesungen/Filtration/Products-und-Dienstleistungen/Getraenkebehandlungsmittel/Stabilisierung/index.htm> (Abruf 26.10.2014)  
<http://pharmaandfood.dow.com/en/food-solutions/products/clear-stable> (Abruf 26.10.2014)

### **1.2.2 Einordnung der Zusatzstoffe im europäischen Weinrecht**

Innerhalb der europäischen Union (EU) regelt die VO (EG) Nr. 1333/2008 die Verwendung von Lebensmittelzusatzstoffen. Definiert sind Zusatzstoffe hier als: „ (...) *Stoffe, die in der Regel nicht selbst als Lebensmittel verzehrt, sondern Lebensmitteln aus in dieser Verordnung dargelegten technologischen Gründen, wie etwa zu deren Konservierung, zugesetzt werden.*“ Als weitere Anforderung definiert diese VO: „(...) *Lebensmittelzusatzstoffe müssen den genehmigten Spezifikationen entsprechen, die eine verlässliche Identifizierung des Zusatzstoffes einschließlich seines Ursprungs erlauben und die zulässigen Reinheitskriterien beschreiben.*“ In der VO (EU) 1129/2011 (zur Änderung des Anhangs II der VO (EG) Nr. 1333/2008 sind unter den E-Nummern E 466, E 414 und E 353 die Zusatzstoffe Natrium-Carboxymethylcellulose, Gummi Arabikum und Metaweinsäure aufgeführt. Teil C dieser VO bestimmt Zusatzstoffgruppen, wobei Kategorie Nr. 14 Getränke allgemein abbildet. Unter der Kategorie Nr. 14.2 stehen in übergeordneter Gruppe: „*Alkoholische Getränke, einschließlich ihrer alkoholfreien Entsprechungen oder ihrer Entsprechungen mit geringem Alkoholgehalt*“ und nachfolgend in der Kategorie Nr. 14.2.2 dieser Verordnung sind Zusatzstoffe für „*Wein und andere Produkte gemäß der VO (EG) Nr. 1234/2007 und die alkoholfreien Entsprechungen*“ aufgeführt. Definiert wird unter diesem Punkt die Zulässigkeit des Einsatzes von Zusatzstoffen in den unter der Kategorie Nr. 14.2 aufgezählten Produkten sowie der Verweis auf die Durchführungsbestimmungen: „*Die Verwendung von Zusatzstoffen ist nach der Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 des Rates, dem Beschluss 2006/232/EG des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 606/2009 der Kommission sowie deren Durchführungsbestimmungen zulässig.*“ Dabei gilt zu beachten, dass die VO (EG) 1234/2007 von der VO (EU) Nr. 1308/2013 „*DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTES UND DES RATES am 17. Dezember 2013 über eine gemeinsame Marktorganisation für landwirtschaftliche Erzeugnisse*“ zum 01. Januar 2014 abgelöst wurde.

Im Anhang 1 A der VO (EG) 606/2009 sind die oenologischen Verfahren, die Bedingungen und die Grenzwerte für die Anwendung aufgelistet. Die Weinsteinstabilisierung beinhaltet hierbei das oenologische Verfahren unter dem alle drei Zusatzstoffe aufgelistet sind. Für Natrium-Carboxymethylcellulose, Metaweinsäure und Gummi Arabikum gilt als Bedingung für die Anwendung: „*Bei teilweise gegorenem, in unverarbeiteter Form zum unmittelbaren menschlichen Verbrauch bestimmtem Traubenmost und bei den in Anhang IV Nummern 1, 3, 4, 5,*

6, 7, 8, 9, 15 und 16 der Verordnung (EG) Nr. 479/2008 definierten Erzeugnissen“. Die VO (EG) Nr. 479/2008 ist die Verordnung zur gemeinsamen Marktorganisation von Wein, welche im Anhang IV Kategorien von Weinbauerzeugnissen definiert und unter Punkt 1 Wein, 3 Likörwein, 4 Schaumwein, 5 Qualitätsschaumwein, 6 Aromatischer Qualitätsschaumwein, 7 Schaumwein mit zugesetzter Kohlensäure, 8 Perlwein, 9 Perlwein mit zugesetzter Kohlensäure, 15 Wein aus eingetrockneten Trauben sowie 16 Wein aus überreifen Trauben beschreibt. Aus diesem Kontext und dem Ausschluss von Punkt 10 bis 14 der VO (EG) Nr. 479/2008 ergibt sich, dass der Einsatz dieser Zusatzstoffe für Traubensaft und andere Traubensaftprodukte untersagt ist. Als Grenzwerte für Natrium-Carboxymethylcellulose und Metaweinsäure gibt diese Durchführungsverordnung (EG) Nr. 606/2009 100 mg/L vor (Zeile 42 und 27). Für Gummi Arabikum ist kein Grenzwert definiert, auch fehlt die Angabe *quantum satis* (so viel wie nötig).

Die internationale Organisation für Rebe und Wein, kurz OIV, erstellt Beschreibungen (OIV Kodex) für Produkte chemischen und physikalischen Ursprungs, die für den Ausbau und die Lagerung von Wein verwendet werden. Qualität und Nachweismethoden für oenologische Produkte sind in diesen Monographien beschrieben. Der Kodex definiert jedes Produkt hinsichtlich Name, Synonym, ggf. Formel, Molekulargewicht, allgemeine chemische Eigenschaften und einfache Nachweismethoden (wenn bekannt) sowie die Bestimmung von Verunreinigungen und der zulässigen Grenzwerte. Für Metaweinsäure, Natrium-Carboxymethylcellulose und Gummi Arabikum existieren diese Monographien mehrsprachig.<sup>2</sup>

Tabelle 1-2 zeigt in Kurzform die wichtigsten Inhalte der Vorgaben der OIV. Auffällig ist, dass sich die empfohlenen Anwendungsgebiete unterscheiden. MWS und CMC werden gegen den Ausfall von Weinstein eingesetzt. GA wird eine Verwendbarkeit gegen die Ausfällung von Anthocyanen (Rotwein), gegen Kupfer- und Eisenrübungen zugeschrieben. Als sonstige Angaben finden sich einige wenige analytische Parameter, anhand derer die Identität bzw. die Qualität eingeschätzt werden kann. Auffällig ist hier, dass für Metaweinsäure keine analytischen Werte, die den Zusatzstoff beschreiben, aufgeführt sind.

---

<sup>2</sup> Quelle: <http://www.oiv.int/oiv/info/frspecificationproduit?lang=fr> (Abruf 02.12.2015)  
Resolution OIV/Oeno 366/2009 (CMC/ deutsch); OIV/Oeno 31/2000 (MWS/ englisch); OIV/Oeno 27/2000 (GA/ englisch)

Tabelle 1-2 Produktspezifische Literaturangaben zu CMC, MWS und GA<sup>3</sup>

Produkt (Synonyme)	Ziel, Herkunft und Anwendungsbereich	Empfohlene Anwendung	Sonstige Angaben
<p><b>CMC</b> Carboxymethylcellulose CMC Natrium-CMC Cellulosegummi Natriumsalz des Carboxymethyl- ethers der Cellulose NaCMC</p>	<p>„(...) für oenologische Zwecke wird ausschließlich aus Holz hergestellt, und zwar durch die Behandlung mit Alkali und Monochloressigsäure oder dessen Natriumsalz (...).“</p>	<p>CMC hemmt den Weinsteinniederschlag durch den (...) schützenden Effekt der Kolloide (...).“ Die Anwendungsmenge ist beschränkt (...).“</p>	<p>- weißes Pulver - Substitutionsgrad 0,60 bis 0,95 - Molekulargewicht 17 000 und 300 000 Da - Trockenmassesubstanz 99,5 % (Festschubstanz) - mindestens 3,5 % (Lösungen) - Natriumgehalt 12,4 % in der TM</p>
<p><b>MWS</b> Metaweinsäure</p>	<p>MWS entsteht durch trockene Erhitzung und unter Druck, bei 150 - 170 °C, aus monomerer Weinsäure. Die Wirksamkeit steht in direkter Beziehung zum Veresterungsgrad Produkte enthalten variable Mengen an unveresterter Weinsäure, Brenztraubensäure und unbekannte Polyestersäuren.</p>	<p>MWS kann Weinstein in der Flasche verhindern.</p>	<p>Weiß bis gelbliches Granulat oder Pulver mit karamellartigem Geruch, hydrolysiert bei 100 °C in Wasser. - Schwermetallgehalt weniger als 10 mg/kg MWS sollte in luftdicht verschlossenen Behältern aufbewahrt werden, geschützt vor Luft und Feuchtigkeit (hygrokopisch).</p>
<p><b>GA</b> Gummi Arabikum</p>	<p>Gummiartige Ausscheidung, die an der Luft aushärten, hervorgerufen durch Verletzungen bei Baumstämmen und Ästen der Leguminose Art <i>Acacia senegal</i> und anderen afrikanischen Akazienarten.</p>	<p>Bietet Schutz vor Ausfällung von Anthocyanen im Rotwein, Kupfer- oder Eisentrübungen.</p>	<p>- Fällbar mit Ethanol - Aschegehalt <math>\leq 4\%</math> - Gesamtstickstoff <math>\leq 4\text{ g/kg}</math> (0.25 % - 0.4 % (m/m) für <i>Acacia senegal</i> und 0.10 % - 0.20 % (m/m) für <i>Acacia seyal</i> Sorten) Trockene Produkte sind sehr lange haltbar. Flüssige Anwendungen sind begrenzt haltbar und enthalten Schwefeldioxid.</p>

### 1.2.3 Gummi Arabikum (GA) – natürliches Pflanzenexsudat

Gummi Arabikum (GA) dient in der Lebensmittelindustrie als Stabilisator, Emulgator sowie Verdickungs- und Suspendiermittel. Speziell im Süßwarenereich bietet GA Schutz vor Auskristallisation von Zucker, im Pharmabereich als Überzugsmittel für Tabletten sowie im technischen Bereich als Emulgator. Der vielfältige Einsatz geht

<sup>3</sup> Quelle: <http://www.oiv.int/oiv/info/frspecificationproduit?lang=fr> (Abruf 02.12.2015)  
Resolution OIV/Oeno 366/2009 (CMC/ deutsch); OIV/Oeno 31/2000 (MWS/ englisch); OIV/Oeno 27/2000 (GA/ englisch)

auf die besonders gute Wasserlöslichkeit im breiten Konzentrationsspektrum und die dabei kaum merklich entstehende Viskosität zurück (Kennedy *et al.* 2012).

Angebaut wird Gummi Arabikum im sogenannten Gummi-Gürtel von Afrika. Dieser erstreckt sich südlich der Sahara vom nördlichen Teil Westafrikas bis in den Osten Richtung Sudan und Äthiopien. Kleinstmengen stammen aus Indien. Unter dem Oberbegriff *Acacia Gum* werden umgangssprachlich alle Gummis von Akazienarten zusammengefasst. Im Bereich der Lebensmittelzusatzstoffe wird allgemein der Begriff Gummi Arabikum verwendet, der das getrocknete Exsudat von Stämmen und Ästen der Leguminose *Accacia Senegal* und eng verwandter Arten einschließt. Im Sudan wird zwischen zwei Arten von Pflanzenexsudaten unterschieden, die hergestellt und vermarktet werden. Es handelt sich dabei um Hashab (*Acacia Senegal*) und Talha (*Acacia Seyal*). Somit beschreibt der Begriff Gummi Arabikum keine einheitliche botanische Quelle, sondern vielmehr eine Handelsform (Coppen 1995).

Der weltweite Export von Hashab (95 %) und Talha (5 %) wurde nach den Dürreperioden von 1973/1974 und 1982/1984 im Jahr 2008 erstmals wieder auf 60.000 Tonnen geschätzt. Damit ist GA einer der bedeutendsten natürlich gewonnenen Zusatzstoffe (Kennedy *et al.* 2012) und (Coppen 1995). Gewonnen wird GA aus der verletzten Rinde der Leguminose Arten *Acacia Senegal* und *Acacia Seyal*. Diese Akazienarten wachsen im subtropischen Klima des Sudans, aber auch Nigeria, Chad, Mali und Senegal zählen zu kleineren Anbaustaaten. Mit einer jährlichen Produktion von 40.000 Tonnen ist der Sudan Hauptlieferant und liefert qualitativ sehr hochwertige GA-Produkte (Islam *et al.* 1997). Geerntet wird GA als tränenförmige Absonderung an verletzten Ästen und Stämmen der Akazienarten, anschließend erfolgt eine Zerkleinerung mittels Hammermühle in grobes Granulat. Die Nassreinigung und Sprühtrocknung sowie die anschließende Feinvermahlung erzeugt ein feinpudriges Endprodukt (Coppen 1995).

Seit 1979 ist der Einsatz von GA in der Weinbereitung erlaubt und unterliegt dabei keinem gesetzlichen Grenzwert, es gilt *quantum satis* (so viel wie nötig). Für Traubenmoste und Säfte ist der Zusatz verboten. Bereits 1933 wurde der Nutzen von GA als Weinstabilisierungsmittel und zur Verbesserung der organoleptischen Eigenschaften von Weiß- und Rotweinen in der Weinbereitung von Riberçau-Gayon *et al.* (2000) beschrieben. Dass GA Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften, das Mundgefühl und auf die Kristallstabilität nimmt, wird derzeit kontrovers diskutiert.

Vielmehr unterstützen die zahlreichen Werbeaussagen der Hersteller der Weinbehandlungsmittel diese allgemeine Auffassung vom Nutzen des Zusatzes und der Auffassung eines „*protective colloid*“. Geworben wird mit Aussagen wie: „(...) GA unterstützt die Kolloidstabilität (...)“; „(...) verstärkt die Wirkung von Metaweinsäure (...)“, „(...) schützt vor Kupfer und leichten Eisen-Trübungen und Ablagerungen bei niedrigen Temperaturen (...)“, „(...) beeinflusst positiv die Wahrnehmung von Säure und Bitterkeit sowie der Adstringenz von Tanninen(...)“ und „(...) schützt junge Rotweine vor Pigmentablagerungen (...)“ (Kennedy *et al.* 2012).

GA wird kurz vor der Füllung, in empfohlenen Mengen von 100 – 300 mg/L (10 – 30 g/hL) zugesetzt. Der sensorische Einfluss ist erst ab einer Menge von weit über 100 g/hL wahrnehmbar (Constantin *et al.* 2011). Der Zusatz in hohen Dosagen vor der Endfiltration kann zu Membranverblockungen führen (Crespy 2004). Die flüssigen Handelsprodukte sind meist Formulierungen aus 25 – 30 % GA und Citronensäure zur Stabilisierung. Andere pulvrige Produkte bestehen aus einer Kombination von Metaweinsäure und GA.

### 1.2.3.1 Chemische Struktur von Gummi Arabikum (GA)

GA ist ein hellbrauner bis orange-braun gefärbter Feststoff und ein neutrales bis leicht saures Heteropolysaccharid mit einem mittleren Molekulargewicht von 380.000 Dalton. Mit 36 nm ist das GA Molekül sehr kompakt, wodurch eine gute Filtrierbarkeit im gelösten Zustand erklärt werden kann (Mahendran *et al.* 2008), (Dror *et al.* 2006).

GA kommt als Calcium-, Magnesium- oder Kalium-Salz vor, ist hochverzweigt und komplex aufgebaut. GA von *Accacia Senegal* besteht im Wesentlichen aus 39 – 42 % D-Galactose, 24 – 27 % L-Arabinose und 12 – 16 % L-Rhamnose, zu 15 – 16 % aus D-Glucuronsäure und zu 1,5 – 2,6 % aus Protein (Jurasek *et al.* 1993), (Abdel-Maksoud 2011) und (Islam *et al.* 1997).

Defaye und Wong beschrieben bereits 1986 den strukturellen Aufbau von GA (Defaye 1986). So besteht das Polysaccharid aus einer Hauptkette von  $\beta$ -D-Galactopyranosylresten, die über (1 $\rightarrow$ 3)-Bindungen miteinander verknüpft sind (Anderson u. Karamalla 1966), (Cui *et al.* 2007). Von dieser Hauptkette gehen (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl Äste ab. In Position 3 bzw. 6 zweigen Seitenketten von diesen Ästen ab, welche aus  $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl und  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl- und Uronsäuregruppen bestehen können. In den Endgruppen können 4-O-Methylglucuronsäuren vorkommen (Islam *et al.* 1997), (Randall *et al.* 1989) und (Mahendran *et al.* 2008).

Neuere Studien postulieren eine etwas andere Struktur von GA der Sorte *Acacia Senegal*. Bestätigt wurde in dieser Arbeit der Aufbau der Hauptkette aus  $\beta$ -D-Galactopyranosylresten, die über (1 $\rightarrow$ 3)-Bindungen miteinander verknüpft sind. Analysiert mit modernsten NMR-Techniken wird derzeit davon ausgegangen, dass die Hauptkette zusätzlich an Position O-2, O-4 und O-6 mit Resten, bestehend aus 2,3,6- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-, 2,6-Galactopyranose- sowie 3,4,6-Galactopyranose, substituiert ist. Hinzu kommen neue Erkenntnisse über weitere noch nicht identifizierte Substitutionen an O-2, O-4 und O-6 der Hauptkette (Nie *et al.* 2013). Der Proteinanteil besteht hauptsächlich aus Hydroxyprolin (710  $\mu$ g/g), Serin (300  $\mu$ g/g) und Threonin (190  $\mu$ g/g) sowie Prolin (180  $\mu$ g/g) (Mahendran *et al.* 2008). Gummi Arabikum besteht aus verschiedenen Fraktionen, zu 89 – 98 % aus Arabinogalactan (Heteropolysaccharid), zu 10 % aus einem Arabinogalactan-Proteinkomplex (AGP) und zu weniger als 1 % aus Glycoprotein. Abbildung 1-3 zeigt den von Mahendran (2008) postulierten Aufbau des AGP. Demnach ist AGP ca.

2.000 000 Dalton groß und besteht aus hochverzweigten Kohlenhydratblöcken, die sich zu einer ellipsenartigen Struktur zusammenfügen. Diese Kohlenhydratblöcke haben eine Größe von ca. 45.000 Dalton und sind über Serin und Hydroxyprolin an Polypeptidketten gebunden. Diese Peptidketten haben ca. 45 – 250 Aminosäuren und sind ebenfalls mit Seitenketten aus L-Arabinose verknüpft.

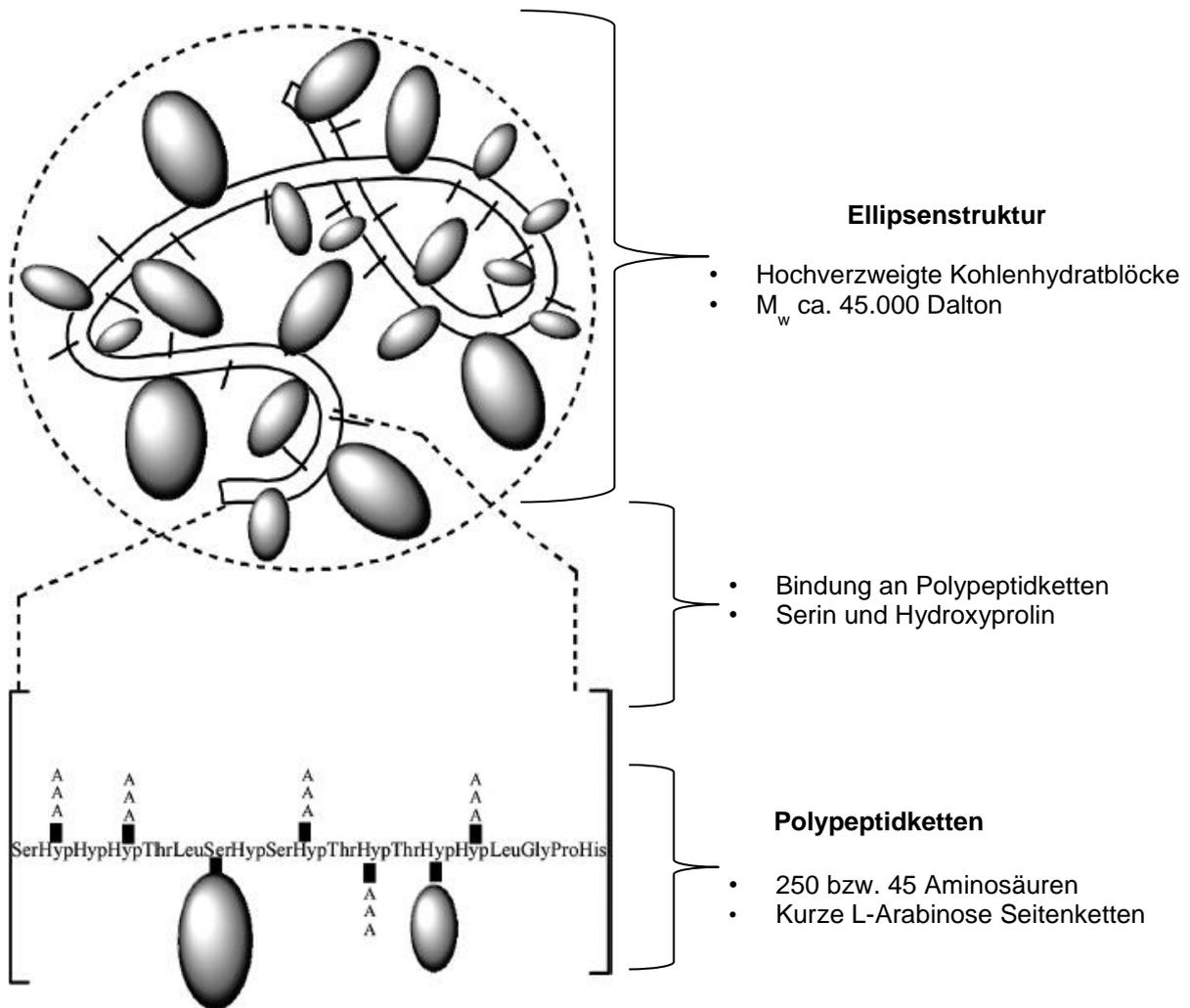


Abbildung 1-3 Schematische Illustration des AGP im GA Molekül mit Erlaubnis des Nachdrucks von ACS-Publications (Mahendran *et al.* 2008)

### 1.2.3.2 Stabilisotopenverteilung (H,O und N,C) – Rebe und Akazie

GA und die Polysaccharide des Weines sind sich chemisch ähnlich. Beide bestehen im Wesentlichen in unterschiedlichen Konzentrationen aus den Monosacchariden L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Galactose, D-Glucose und den sauren Anteilen aus D-Galacturon- bzw. D-Glucuronsäure. Als einziger Unterschied der Weinpolysaccharide ist der höhere Anteil an D-Mannose gegenüber GA zu nennen (vgl. Abschnitt 1.1.1 und 1.2.3.1). Eine sichere analytische Trennung und demnach eine geeignete Nachweismethode zu finden, gestaltet sich aus diesem Grund schwierig. Ein Ansatzpunkt ist daher die Verschiedenheit der geografischen Ursprünge beider Pflanzen und deren Stabilisotopenzusammensetzungen der Elemente (H,O und C,N) zu analysieren (Sprenger *et al.* 2014).

Die moderne Lebensmittelanalytik verwendet die Zusammensetzung der Isotopenverhältnisse der Elemente zur Bestimmung der Herkunft oder zur Ermittlung des Ursprungs eines Lebensmittels. Die geografische Verschiedenheit des Ursprungs von Rebe und Akazie sowie z. T. stoffwechselrelevante Unterschiede beider Pflanzenspezies lassen den Schluss zu, dass der Zusatz von afrikanischem GA zu europäischem Weißwein eine Veränderung der Isotopenzusammensetzung der Elemente (H,O und C,N) der Polysaccharide hervorruft (Rossmann 2001).

Isotope sind Atomkerne mit gleicher Kernladungszahl aber unterschiedlicher Neutronen- und Massenzahl eines Elementes (Tabelle 1-3). Es wird zwischen stabilen und nicht-stabilen (radioaktiven) Isotopen unterschieden. Die unterschiedliche Anzahl von Neutronen im Atomkern verursacht geringe Unterschiede in den Atommassen eines Elements. In der Analytik der stabilen Isotope der Elemente wird immer das Verhältnis R des schwereren zum leichteren Isotop des jeweiligen Elements betrachtet. Für Wasserstoff ist das die mittlere relative Häufigkeit des Deuteriums ( $D/{}^2\text{H}$ ) zur mittleren relativen Häufigkeit des Wasserstoffs ( ${}^1\text{H}$ ):

$$R_{\text{Wasserstoff}} = \frac{D}{{}^1\text{H}} = \frac{0,0146 \text{ Atom-\%}}{99,985 \text{ Atom-\%}} = 0,000146 \quad (1)$$

Tabelle 1-3 Mittlere natürliche Häufigkeiten der stabilen Isotope der Elemente H,O und C, N

Element	Stabile Isotope	Relative natürliche Häufigkeit (Atom-%)
Wasserstoff	$^1\text{H}$	99,985
	D ( $^2\text{H}$ )	0,0146 <sup>a</sup>
Sauerstoff	$^{16}\text{O}$	99,672
	$^{17}\text{O}$	0,0375
	$^{18}\text{O}$	0,2039 <sup>a</sup>
Kohlenstoff	$^{12}\text{C}$	98,892
	$^{13}\text{C}$	1,1114 <sup>a</sup>
Stickstoff	$^{14}\text{N}$	99,634
	$^{15}\text{N}$	0,3663 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Variationen in der Natur werden in der vierten Nachkommastelle beobachtet

Diese Elemente haben nahezu identische chemische Eigenschaften. Physikalische und chemische Naturprozesse haben allerdings einen signifikanten Einfluss auf die Fraktionierung von leichten und schweren Isotopen von beispielsweise den Elementen Wasserstoff (D/H), Sauerstoff ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ), Kohlenstoff ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) und Stickstoff ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) (Bigeleisen 1965), (Hoefs 2009).

Für organische Verbindungen ergeben sich in den relativen Häufigkeiten dieser Elemente geringe zeitliche und örtliche Abweichungen. Da diese Differenzen sehr gering sind, kommen sie erst in der dritten bzw. vierten Nachkommastelle der Isotopenverhältnisse vor. Deshalb werden die genauen Isotopenkonzentrationen mit der Delta-Notation wiedergegeben (Formel 2 und 3). Der Delta ( $\delta$ )-Wert bezieht das Isotopenverhältnis (R) auf einen internationalen Standard. Die international gültige Einheit ist Promille (‰) (Carter 2011).

Delta Notation:

$$\delta_{\text{Probe}} [\text{‰}] = \left( \frac{R_{\text{(Probe)}} - R_{\text{(Standard)}}}{R_{\text{(Standard)}}} \right) * 1000 \quad (2)$$

$$\delta_{\text{Probe}} [\text{‰}] = \left( \frac{R_{\text{(Probe)}}}{R_{\text{(Standard)}}} - 1 \right) * 1000 \quad (3)$$

Diese feinen Unterschiede im Isotopenverhältnis des schwereren zum leichteren Isotopolog beeinflussen örtlich und zeitlich das Isotopenmuster organischer Verbindungen. Die Gründe für diese Unterschiede liegen in Fraktionierungs-

prozessen wie beispielsweise Equilibrierungsreaktionen, welche den Isotopenaustausch zwischen zwei Phasen beschreiben. Hier sind zum Beispiel die Umwandlung von Wasserdampf in Niederschlag und umgekehrt zu nennen.  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisse sind stark abhängig von der Entfernung zum Meer und der Höhe über Normalnull. Süßwasser zeigt, im Gegensatz zu Meerwasser mit 0 ‰, eine erhebliche Varietät in den  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotopenverhältnissen von +4 bis -55 ‰ und für D/H Isotopenverhältnisse zwischen +40 bis -500 ‰. Je nach geografischer Herkunft ist dieser Effekt mehr oder weniger ausgeprägt. Auch Fraktionierungen aufgrund von physikalischen oder (bio-) chemischen Prozessen, wie beispielsweise die Assimilation von  $\text{CO}_2$  über bestimmte Photosynthesewege (CAM, C3 oder C4 Pflanzen) führen zu Veränderungen des Isotopenmusters eines Elementes (Criss 1999).

Die Biomasse- und Kohlenhydrat-Produktion bzw. die Umsetzung von  $\text{CO}_2$  aus der Luft, erfolgt bei der Rebe und auch bei der Akazie unter normalen Temperaturen und Lichtverhältnissen über den C3 Photosyntheseweg (Gebrekirstos *et al.* 2011) und (Santesteban *et al.* 2015).

Das  $\text{CO}_2$  der Luft zeigt gegenüber dem internationalen Referenzstandard einen  $\delta^{13}\text{C}$  Wert von -8 ‰. Dieser Wert ist jedoch nicht konstant und wird im Laufe der Zeit durch das an  $^{13}\text{C}$ -abgereicherte Industriekohlendioxid negativer. Der  $\text{CO}_2$ -Promille-Wert der Atmosphäre spiegelt sich nicht eins zu eins in der Biomasse der Pflanzen wider, vielmehr zeigt die gebildete Biomasse, in Abhängigkeit vom Photosyntheseweg, abgereicherte  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse. Zwei wesentliche Prozesse diskriminieren das schwerere Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  während des C3-Photosynthese Prozesses beim Aufbau von Kohlenhydraten, Lipiden und Aminosäuren in C3-Pflanzen. Zum einen ist die Diffusionsrate des schwereren  $^{13}\text{CO}_2$  durch die Stomata geringer als die des leichteren  $^{12}\text{CO}_2$ . Zum anderen reagiert das primäre Carboxylierungsenzym Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase-Oxygenase) vorrangig mit  $^{12}\text{C}$ . Dies liegt in der geringeren Reaktivität des  $^{13}\text{C}$ -Atoms im  $\text{CO}_2$ . Beide Prozesse bestimmen die negativere Kohlenstoffisotopensignatur in Pflanzen. Isotopenverhältnisse von C3-Pflanzen liegen im Bereich von -22 bis -32 ‰. Durchschnittlich zeigen sie einen  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von -27 ‰ (O'Leary 1988), (Santesteban *et al.* 2015) und (Gebrekirstos *et al.* 2011).

Unterschiede ergeben sich auch aus der Fixierung von elementarem Stickstoff, wenn beispielsweise die Akazie symbiotisch mit Knöllchenbakterien vergesellschaftet ist.

Die Leguminose Arten *Acacia Senegal* und *Acacia Seyal* erhalten elementaren Stickstoff über die symbiotische Lebensweise mit Knöllchenbakterien (*Rhizobien*), welche Stickstoff über heterotrophe Respiration an den Wurzeln in sogenannten Knöllchen der Akazie fixieren. Solche stickstofffixierenden Bakterien kommen natürlicherweise hauptsächlich in gemäßigten, subtropischen und tropischen Klimazonen vor. Diese Verstoffwechslung von elementarem Stickstoff mit einem Isotopenwert von nahe 0 ‰, führt zu positiveren  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten in der Pflanze und somit auch im Exsudat der Akazien Arten ( $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von 4 bis 7 ‰). Die Alternative und gleichzeitig häufigste Art der Stickstoffaufnahme stellt die Aufnahme von stickstoffhaltigen Stoffen über Vegetationsbedürfnisse im Boden dar. Grundlage hierfür ist eine Differenz in der Nährstoffkonzentration, die die Pflanze zur Aufnahme von Stickstoff über den Boden bewegt. Dabei handelt es sich nicht um elementaren Stickstoff, sondern Stickstoff in Form von organischem oder anorganischem Material (Gülle bzw. Kompost oder Ammoniumnitrat). Anorganische Düngemittel zeigen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von -1,4 bis 2,6 ‰, organische hingegen 3,5 bis 16,2 ‰, im Mittel liegt der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte bei 0,2 bis 8,1 ‰. Die organische oder anorganische Stickstoffversorgung bewirkt geringe Fraktionierungserscheinungen und führt lediglich zu  $\delta^{15}\text{N}$ -Verschiebungen von -3 bis 1 ‰. Im konventionellen Weinbau setzt die Weinrebe meist Stickstoff aus anorganischer Substanz im Boden um und fixiert keinen elementaren Stickstoff. Die natürliche Abreicherung von  $^{15}\text{N}$  im Boden, durch zahlreiche Reaktionen im Stickstoffkreislauf führt somit zu geringfügig negativeren  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten im Pflanzgut (Raddad *et al.* 2005) und (Santesteban *et al.* 2015). Nach den theoretischen Grundlagen der Isotopenanalytik könnte sich die geografische Lage des Anbaus von Rebe und Akazie wesentlich in  $\delta^{18}\text{O}$ -Werten der Polysaccharide widerspiegeln, aber auch ein Einfluss auf die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte ist denkbar. Einen geringen oder keinen Einfluss ist bei  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten und bei  $\delta^1\text{H}$ -Werten zu erwarten. Im immer noch seltenen ökologischen Weinbau ist die Förderung des Bodenlebens und die sinnvolle Begrünung der Weinbergsflächen Pflicht. Hierzu werden Begrünungsmischungen eingesetzt, die auch Leguminose-Arten enthalten wie beispielsweise Klee, Wicken oder Esparsetten-Arten, die wie die Akazie elementaren Stickstoff verwerten. Diese neueren Methoden der Weinbergsbewirtschaftung können die hier zu Grunde liegenden Annahmen negativ beeinflussen (Steinberg 2005) S.1-3 (Koller *et al.* 2000).

#### 1.2.4 Metaweinsäure

Metaweinsäure (MWS), ein Polyester der Weinsäure, ist ein gut lösliches, kristallines, weißes bis karamellfarbenes Granulat oder Pulver (Abbildung 1-4). Unter Vakuum und bei 150 – 170 °C verestert L-Weinsäure intermolekular unter Wasserabspaltung und es entsteht das polymerisierte Produkt. L-Weinsäure besteht chemisch aus einem C4-Grundkörper mit zwei Hydroxylgruppen (OH) und zwei endständigen Carboxylgruppen. Aufgrund eines Wasserstoffatoms in direkter Nachbarschaft der Hydroxylgruppe (OH), handelt es sich um sekundäre Alkoholfunktionen (siehe Abbildung 1-5).



Abbildung 1-4 Metaweinsäure Zusatzstoffe als Pulver und Granulat

Riberëau-Gayon (2000) bezeichnet die veresterten Reaktionsprodukte als „dispergierte Polymere“, die eine Vielzahl von unterschiedlich großen und unterschiedlich stark veresterten MWS-Molekülen enthalten. Daraus ergeben sich Zusatzstoffe von unterschiedlicher Qualität hinsichtlich der kristallisationshemmenden Eigenschaften. MWS ist kein reines Produkt, es entstehen gefärbte und karamellartig riechende Stoffe, die nachweislich oxidierbare Bestandteile sowie als Verunreinigung hauptsächlich Brenztraubensäure (1 – 6 %) oder Oxalessigsäure enthalten. Zur Entstehung dieser Verunreinigungen trägt die Dauer der Herstellung der Produkte maßgeblich bei. Beide Nebenprodukte resultieren aus der intramolekularen Wasserabspaltung und der Decarboxylierung eines Weinsäuremoleküls. Chemisch ist Metaweinsäure kein definierbarer Stoff bzw. keine definierbare Verbindung, da nur ein Schmelzbereich von 168 – 170 °C und kein fester Schmelzpunkt angegeben werden kann. MWS-Moleküle verestern unkontrolliert an allen freien Hydroxylgruppen zu mehr oder weniger

hochmolekularen Strukturen. Großtechnisch wird feinvermahlene Weinsäure unter leichtem Vakuum für mehrere Stunden auf ca. 140 °C erhitzt. Durch diese schonende Verarbeitung soll erreicht werden, dass das Endprodukt hochverestert ist, möglichst hell gefärbt und frei von geschmacklichen oder geruchlichen Komponenten, die im Wein nachträglich negative sensorische Veränderungen hervorrufen können. Über die Qualität, die Molekülgröße oder den genauen Grad der Veresterung gibt es wenige Angaben.

Unter Vakuum und ab einer Temperatur von 160 °C verschiebt sich das thermodynamische Gleichgewicht zugunsten des Reaktionsproduktes. Dies wurde für Metaweinsäure durch Ermittlung der Veresterungsrate bei unterschiedlichen Reaktionsparametern ermittelt. So liegt die Veresterungsrate bei 175 °C und unter Normaldruck nach 90 Minuten lediglich bei ca. 30 %, wohingegen bei 160 °C und unter Vakuum bereits nach 55 Minuten ca. 40 % der L-Weinsäure umgesetzt sind. Wenn dem System Wasser entzogen wird, wird die Entstehung des Reaktionsproduktes zusätzlich begünstigt. Von den Herstellern der oenologischen Produkte wird meist ein Veresterungsgrad zwischen 40 – 42 % angegeben (Riberđau-Gayon *et al.* 2000) (S. 41 ff.).

Abbildung 1-65 stellt die Polyveresterungsreaktion von Weinsäure zu Metaweinsäure dar. Die roten Markierungen zeigen die reaktiven Stellen der beiden Moleküle. Es reagiert jeweils eine Carboxylgruppe (COOH) eines Moleküls mit der sekundären Alkoholgruppe (OH) eines zweiten Moleküls. In Wirklichkeit reagieren nicht alle Carboxylgruppen der Weinsäure. Daraus resultieren Reaktionsprodukte unterschiedlicher Molekülgrößen. Riberđau-Gayon (2000) geht davon aus, dass aus dieser unkontrollierten Veresterungsreaktion Produkte resultieren, die mitunter keine stabilisierenden Eigenschaften bzw. sehr unterschiedliche Stabilisierungswirkung auf Weinstein haben (Riberđau-Gayon *et al.* 2000) S.41.

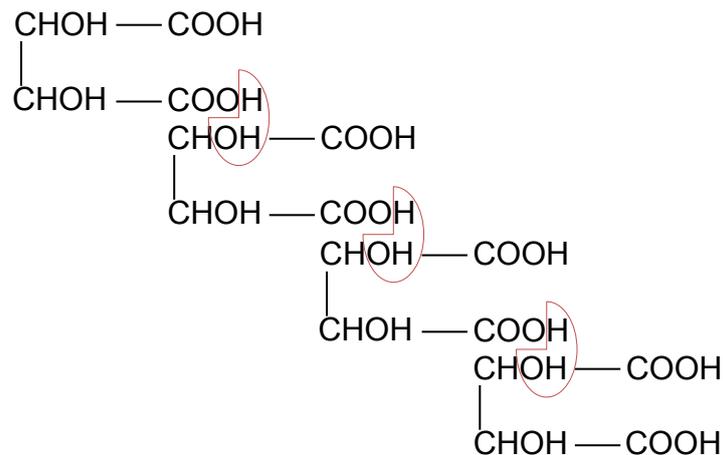
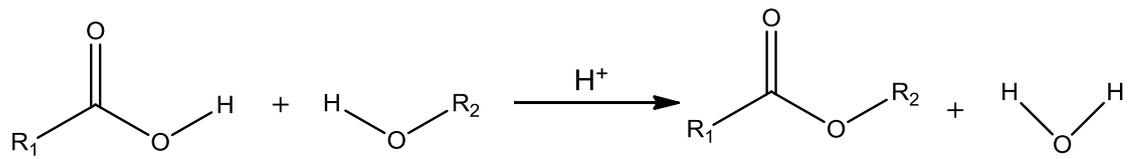


Abbildung 1-5 Polyveresterungsreaktion von Weinsäure zu Metaweinsäure (in Anlehnung an (Riberçau-Gayon *et al.* 2000) (S.41)

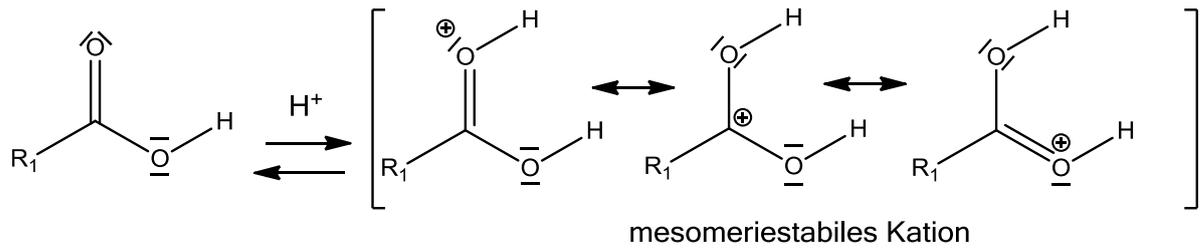
Bisher sind keine Veröffentlichungen verfügbar, die die genauen Reaktionsschritte der Veresterung von Weinsäure zur Metaweinsäure demonstrieren. Aufgrund der Tatsache, dass bei der Reaktion eine Carboxylgruppe mit einer sekundären Alkoholfunktion reagiert, können die Grundlagen der organischen Chemie zur Darstellung der Entstehung von Metaweinsäure herangezogen werden.

Abbildung 1-6 erklärt allgemein alle beteiligten Reaktionsschritte der Fischer-Veresterung. Im ersten Schritt erfolgt säurekatalytisch die Protonierung der Carboxylgruppe. Dabei lagert sich ein Proton an das negativ polarisierte Carbonyl-Sauerstoffatom an und die positive Ladung wird auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom verschoben. Es ist ein in seinen Grenzformeln stabiles Carbeniumion entstanden, welches leicht von Nucleophilen angegriffen werden kann. Durch das Anlagern eines Alkohols entsteht so eine kovalente Bindung zwischen dem negativ polarisierten, nucleophilen Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe des Alkohols und dem positiv geladenen, elektrophilen Kohlenstoffatom der Carbonsäure. Dabei bildet sich eine tetraedische Zwischenstufe mit zwei gleichwertigen Hydroxylgruppen, infolgedessen sich die positive Ladung auf das Sauerstoffatom des Alkohols verschiebt (Oxoniumion). Durch einen Protonensprung wird die Abgangsgruppe Wasser vorgebildet und abgespalten. Nach erfolgter Deprotonierung, als Umkehrreaktion des ersten Schrittes, liegt ein Carbonsäureester vor (Vollhardt 2012).

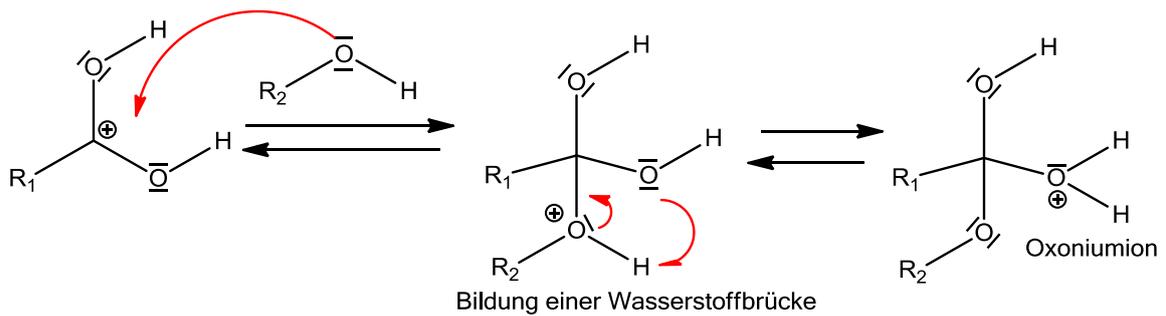
Fischer Veresterung allgemein:



1. Protonierung der Carbonsäure



2. Nucleophiler Angriff der Hydroxylgruppe des sek. Alkohols



3. Wasserabspaltung und Deprotonierung

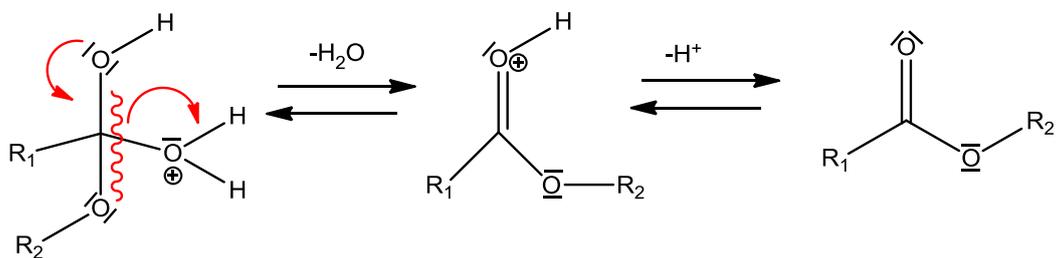


Abbildung 1-6 Mechanismus der Fischer Veresterung

Die auf Grundlage der Fischer-Veresterungen möglichen Moleküle der Metaweinsäure sind vielfältig. Durch zwei sekundäre Alkoholfunktionen und zwei Carboxylgruppen je Weinsäuremolekül sind unterschiedlichste Produkte verschiedenster Kettenlänge denkbar. Im Größenbereich der Oligomere sind lineare Ketten bis zu mehreren hundert Molekülen wahrscheinlich. Zusätzlich ist aber auch eine weiterführende Veresterung linearer Metaweinsäureketten zu cyclischen Produkten möglich. Dennoch verestern nicht alle freien reaktiven Gruppen (Riberëau-Gayon *et al.* 2000) (S. 41 ff.).

Abbildung 1-7 zeigt beispielhaft die mögliche Veresterung eines offenkettigen zu einem cyclischen MWS-Dimer.

Ausgehend von einer erneuten Protonierung der Carbonylgruppe einer Carbonsäurefunktion im Dimer der Metaweinsäure, können verschiedenste sekundäre Alkoholgruppen zusätzlich mit vorhandenen Carbonsäurefunktionen reagieren. Durch diesen Schritt würden drei mesomeriestabile Kationen entstehen, wovon das mit dem positiv geladenen Carbonylkohlenstoff der Säurefunktion von den freien Elektronenpaaren der sekundären Alkoholgruppe im Weinsäuremolekül nucleophil angegriffen wird. Dies führt zu einem Ringschluss. Das entstandene cyclische Dimer würde sich unter Wasserabspaltung und der anschließenden Deprotonierung zu einem stabilen cyclischen Molekül mit lactonähnlicher Struktur der Metaweinsäure ausbilden. Die intramolekulare Veresterung von Carbonsäureestern führt zu Lactonen und ist in der organischen Chemie hinreichend bekannt (Vollhardt 2012).

Das entstandene Produkt hat somit eine Molekularmasse von 264 g/mol. Das lineare Dimer hat hingegen eine Molekularmasse von 282 g/mol.

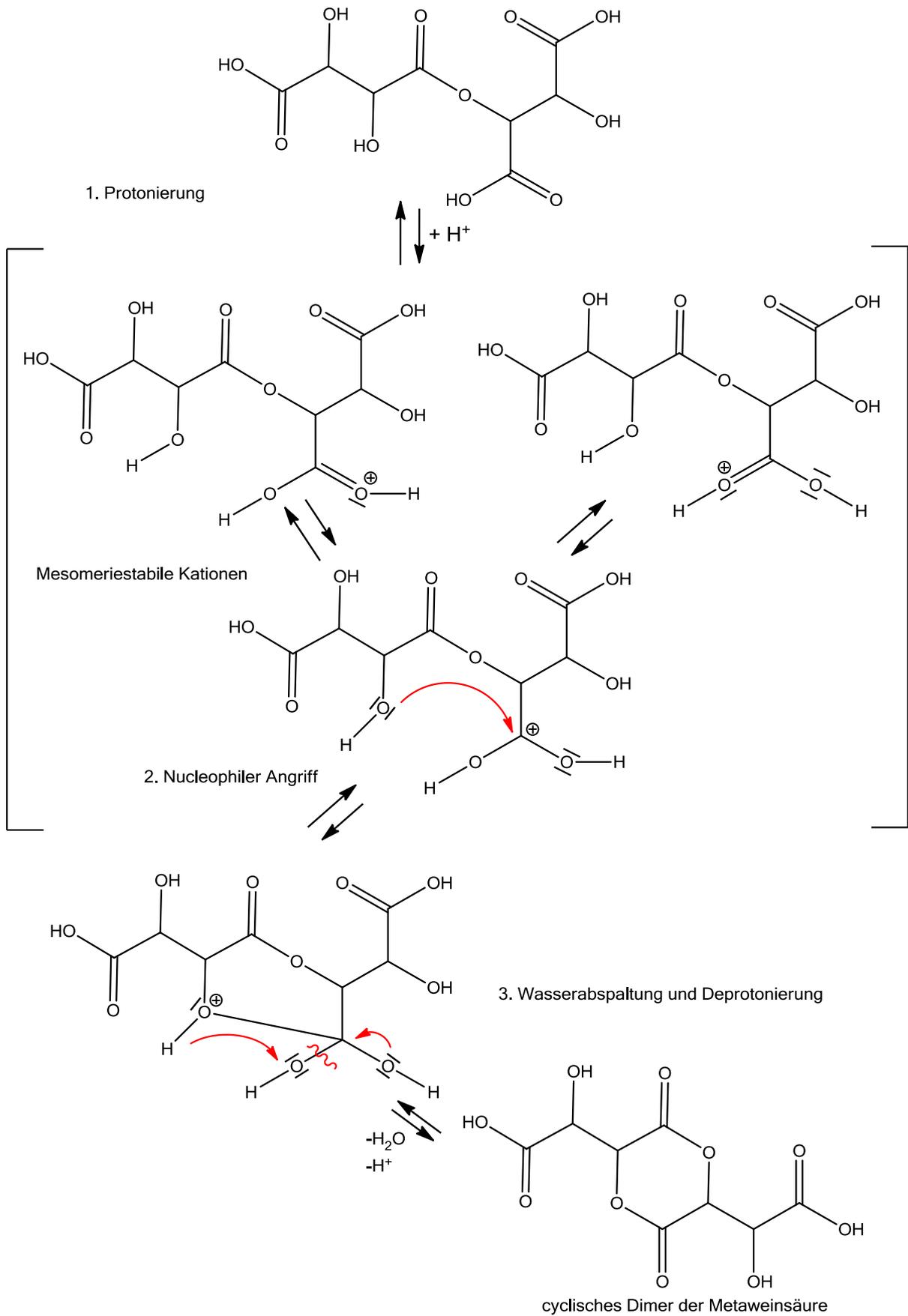


Abbildung 1-7 Veresterung zum cyclischen Dimer der Metaweinsäure

### 1.2.5 Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC)

Natrium-Carboxymethylcellulose wurde erstmals 1918 synthetisiert und ab 1920 großtechnisch genutzt. Ausgehend von natürlicher Cellulose wird dieses wasserunlösliche Naturpolymer mit Natriumhydroxid und Chloressigsäure zu einer funktionalisierten Cellulose umgesetzt, welche Carboxylgruppen enthält und dadurch wasserlöslich ist. Je nach Polymerisationsgrad und Verteilung der funktionellen Gruppen ist die Wasserlöslichkeit unterschiedlich. Die funktionellen Gruppen an C2, C3, und C6 bestimmen zudem Eigenschaft und Einsatzgebiet der Celluloseether (vgl. Abbildung 1-8). Die Carboxylgruppen (COO<sup>-</sup>) je Glucose-Einheit sind verantwortlich für das Löslichkeitsverhalten und die Viskositätseigenschaften des Endproduktes. In der Weinbereitung werden gewöhnlich CMC-Produkte mit einem Substitutionsgrad (DS) zwischen 0,65 – 0,9 eingesetzt, wobei ein DS Grad von 0,65 eine Veretherung von 65 Glucopyranoseeinheiten pro 100 Glucopyranoseeinheiten mit Natrium-Chloracetatgruppen darstellt (Heinze 2005).

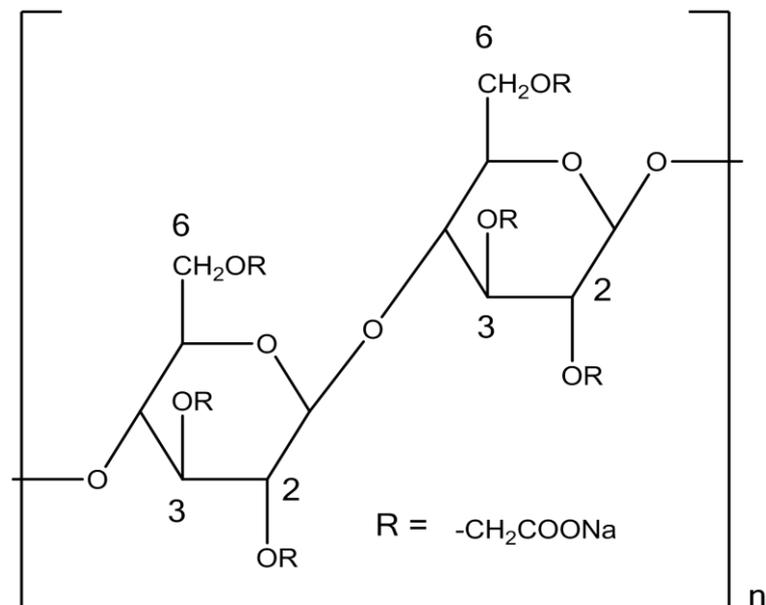


Abbildung 1-8 Chemische Struktur von CMC

Als häufigste Grundbausteine kommen unsubstituierte Glucose und die einfach substituierten Carboxymethylglucoseeinheiten in CMC vor (siehe Abbildung 1-9). Ein großer Zweig der Wissenschaft im Polymerbereich beschäftigt sich mit der Synthese

solcher funktionalisierten Polymere und der Aufklärung der Substituenten und funktionellen Gruppen pro Monomereinheit. Für die Analyse der Struktur und Eigenschaftsbeziehungen der synthetisch hergestellten Produkte müssen diese partiell abgebaut werden, um die Analyse der funktionellen Gruppen entlang der Kette zu ermitteln. Für die Entwicklung eines Nachweisverfahrens von CMC in Weißwein ist es von großem Interesse, das Polymer aus Wein zu isolieren und die monomeren Bausteine durch eine saure oder enzymatische Hydrolyse zu erhalten. Die Grundlage dieser Vorüberlegungen lieferte die Arbeit von (Heinze *et al.* 1994), die sich hauptsächlich mit der Charakterisierung von verschiedenen synthetisierten CMC-Produkten beschäftigte. Als Hydrolysemethoden wurden die publizierten sauren Hydrolysen durch Perchlorsäure oder Schwefelsäure, als sinnvolle Probenvorbereitung, für die Anionentauscherchromatografie angedacht (Saake *et al.* 2001) und (Puls *et al.* 1998).

Die monomeren Bausteine der CMC, die natürlicherweise in Weißwein nicht vorkommen, von den weineigenen Zuckerbausteinen mittels geeigneter chromatografischer Methode zu trennen, schien ein geeigneter Lösungsansatz zu sein. Abbildung 1-9 zeigt die chromatografische Abfolge der CMC-Bausteine einer mittels 70%iger Perchlorsäure hydrolysierten Natrium-Carboxymethylcellulose. Die chromatografische Trennung wurde an einer Anionentauschersäule mit basischen Natriumhydroxid-Gradienten und gepulster amperometrischer Detektion durchgeführt (HPAEC-PAD: **high-performance-anion-exchange-chromatography with pulsed-amperometric-detection**). Die HPLC-Säule besteht dabei aus quartanären-endständigen Ammoniumverbindungen (z. B.  $-N(CH_3)^+OH^-$ ) und das Prinzip der Trennung beruht auf Ionenaustausch. Die Abbildung zeigt die Peakabfolge, bei der zuerst die unsubstituierte Glucose und dann die einfach substituierten Carboxymethylglucosen eluieren. Im weiteren Verlauf eluieren die zweifach- bis dreifach-substituierten Carboxymethylglucosen, wobei jedoch der Detektor-Response bei den mehrfach-substituierten Glucosemolekülen stark abnimmt. Dies ist auf die Anzahl der freien Hydroxylgruppen im analysierten Molekül zurückzuführen. Mit steigender Substitution der Glucose, verringert sich die Anzahl freier Hydroxylgruppen und der Detektor Response des PAD wird schlechter. Dies liegt an der elektrochemischen Reaktion im PAD Detektor, bei der die freien Hydroxylgruppen an einer Goldelektrode oxidiert werden und ein messbarer Strom entsteht. Kragten (1992) veröffentlichte Responsefaktoren von Glucose und einfach-

substituierten Carboxymethylglucosen. Die Responsefaktoren liegen relativ zu Glucose für 2-O-Carboxymethylglucose bei 0,71, für 3-O-Carboxymethylglucose bei 0,37 und für 6-O-Carboxymethylglucose bei 0,77 (Kragten *et al.* 1992).

Mengenmäßig kommen die einfach substituierten Carboxymethylglucosen am häufigsten im CMC-Polymer vor und können in ausreichender Menge chromatografisch detektiert werden (Saake *et al.* 2001).

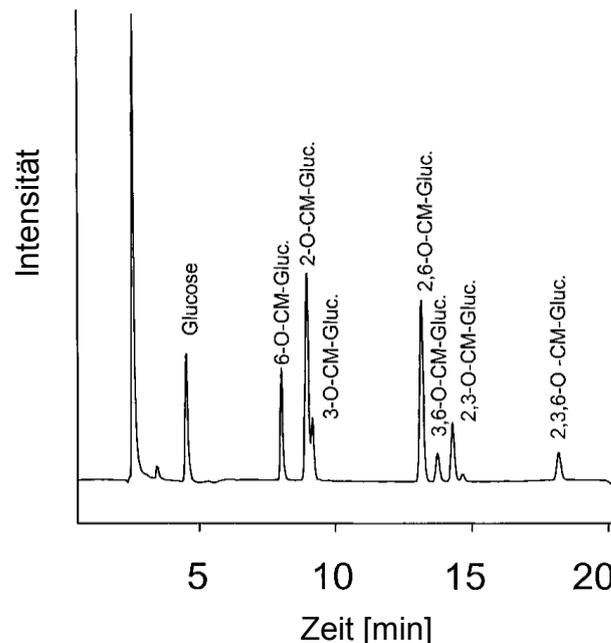


Abbildung 1-9 Peakabfolge hydrolysierter Natrium-Carboxymethylcellulose mittels Perchlorsäure, analysiert mittels HPAEC-PAD (Dionex LC-System mit PAD-1 Detektor Säule: Carbowac PA 1 (250x9 mm) Laufmittel: Gradient mit 0,1 M NaOH inklusive 1 M NaOAc aus (Saake *et al.* 2001) mit freundlicher Genehmigung von Springer

Eine weitere Möglichkeit der Hydrolyse von CMC ist die Anwendung von spezifischen Enzymen. Cellulasen des Stamms *Trichoderma reesei*, im speziellen Endo- und Exoglucanasen, sind fähig, das Polymer unter geeigneten Bedingungen vom Ende her und in Teilbruchstücke abzubauen und die monomeren Bausteine freizusetzen. Ein großer Vorteil dieser Methodik ist, dass es zu keinen Verlusten während des Abbaus, beispielsweise durch Oxidation der Produkte, kommt und auch die weitere Analytik mittels HPAEC-PAD meist unkompliziert durchgeführt werden kann (Kragten *et al.* 1992). Ein Nachteil ist, dass der Abbau nie ganz vollständig erfolgt und sich in den studierten Arbeiten eine aufwendige präparative Größenausschlusschromatografie (SEC) an den enzymatischen Abbau anschließt (Karlsson *et al.* 2002) und (Puls *et al.* 1998).

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Gummi Arabikum - qualitativer Nachweis

#### 2.1.1 Gesamtkolloidgehalt nach Gummi Arabikum-Zusatz

Zur Analyse des Gesamtkolloidgehaltes verschiedener deutscher Weißweine wurden 25 Weißweine aus sechs unterschiedlichen deutschen Anbauregionen, jeweils ohne Zusatz und mit 300 mg/L GA, ultrafiltriert (Cuttoff 10 kDa). Das aufkonzentrierte Retentat wurde gefriergetrocknet und der Gehalt aus dem Rückstand gravimetrisch bestimmt. Abbildung 2-1 zeigt die statistisch ausgewerteten Ergebnisse.

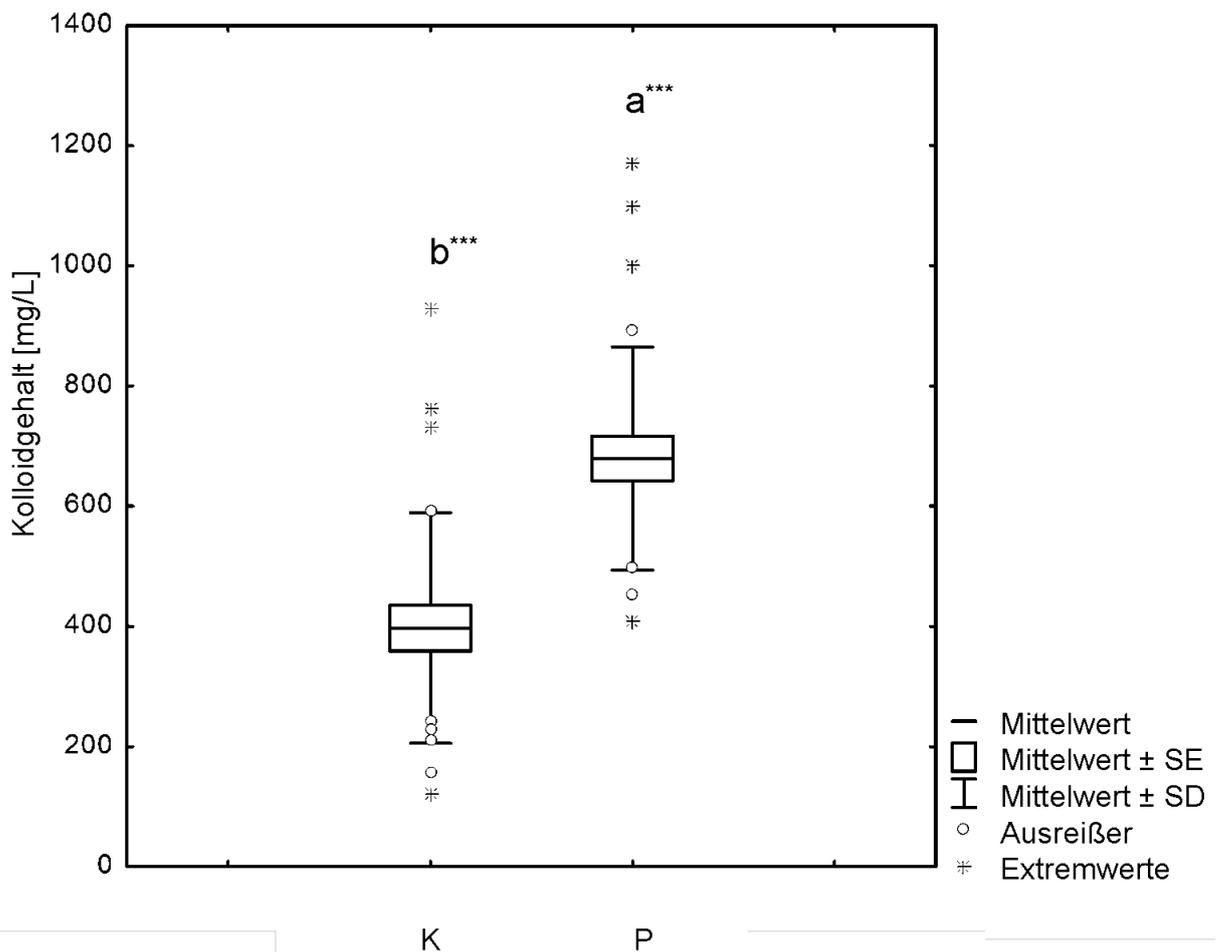


Abbildung 2-1 Gesamtkolloidgehalt von deutschen Weißweinen (n=25) unbehandelt (**K**ontrolle) und behandelt (**P**robe) mit 300 mg/L GA-Zusatz gezeigt als Box-Whisker Plot mit Mittelwert, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SE) und Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD)

Die unterschiedlichen Buchstaben in Abbildung 2-1 zeigen die signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben mit einer statistischen Sicherheit von  $\alpha \leq 0,05$  (gepaarter T-Test). Durch Zugabe von 300 mg/L GA zu Weißwein erhöhte sich der Gesamtkolloidgehalt signifikant (Abbildung 2-1).

Die behandelten Proben (P) zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Proben die höchste statistische Signifikanz von  $\alpha \leq 0,001$ . Mit einer statistischen Genauigkeit von 99,999 % führt die Zugabe von 300 mg/L GA signifikant zu einer Erhöhung des Gesamtkolloidgehaltes eines Weines. Erfahrungsgemäß haben deutsche Weißweine einen Gesamtkolloidgehalt von 150 – 500 mg/L. Durchschnittlich sind es etwa 400 mg/L. Diese Spannbreite ist in der Tabelle A im Anhang gut zu erkennen. Der Mittelwert der unbehandelten Proben (K) betrug  $397 \pm 191$  mg/L und der behandelten Weine (P)  $679 \pm 185$  mg/L. Die daraus resultierenden Ausreißer und Extremwerte der Weißweine (vgl. Abbildung 2-1) bestätigten die deutlichen Schwankungen des natürlichen Gesamtkolloidgehaltes eines Weißweins. Anhand dieser Ergebnisse konnte kein Wert ermittelt werden, ab dem von einem möglichen Zusatz von GA auszugehen ist. Es ist ebenso nicht möglich, GA über die Analyse des Gesamtkolloidgehaltes in einem Wein zu identifizieren, lediglich ein Gesamtkolloidgehalt über 700 mg/L könnte als analytischer Hinweis dienen.

### **2.1.2 Zuckerbausteinanalytik von Gummi Arabikum und Weißweinkolloiden**

Abbildung 2-2 zeigt den prozentualen Vergleich der chromatografischen HPAEC-PAD-Analyse eines Kolloids, isoliert aus deutschem Weißwein, einer Mischprobe von 300 mg/L Gummi Arabikum (GA) und Kolloid aus Weißwein und zwei authentische GA-Proben aus dem Sudan. Die Kolloidfraktion des unbehandelten und des behandelten Weines wurden mittels Ultrafiltration isoliert, getrocknet und analysiert. Die GA-Proben wurden als pulverige Substanzen direkt analysiert. Hydrolysiert wurden die Proben mittels 72%iger Schwefelsäure bei 120 °C für 45 Minuten im Thermoblock (Seaman Hydrolyse).

#### **Zusammensetzung des Weinkolloids:**

Das Weißweinkolloid enthielt als Hauptzucker D-Mannose (47 %), gefolgt von D-Galactose (7 %), L-Rhamnose (3 %), L-Arabinose (2 %) und D-Galacturonsäure (2 %) sowie D-Glucuronsäure (1 %).

#### **Zusammensetzung der authentischen GA-Proben:**

Die GA-Proben enthielten ca. 30 – 31 % D-Galactose sowie 25 – 32 % L-Arabinose. Diese beiden Zuckerbausteine stellen somit den Hauptteil des Polysaccharides dar. Mit 4 – 4,5 % war D-Glucuronsäure und mit 0,4 – 2 % L-Rhamnose vertreten.

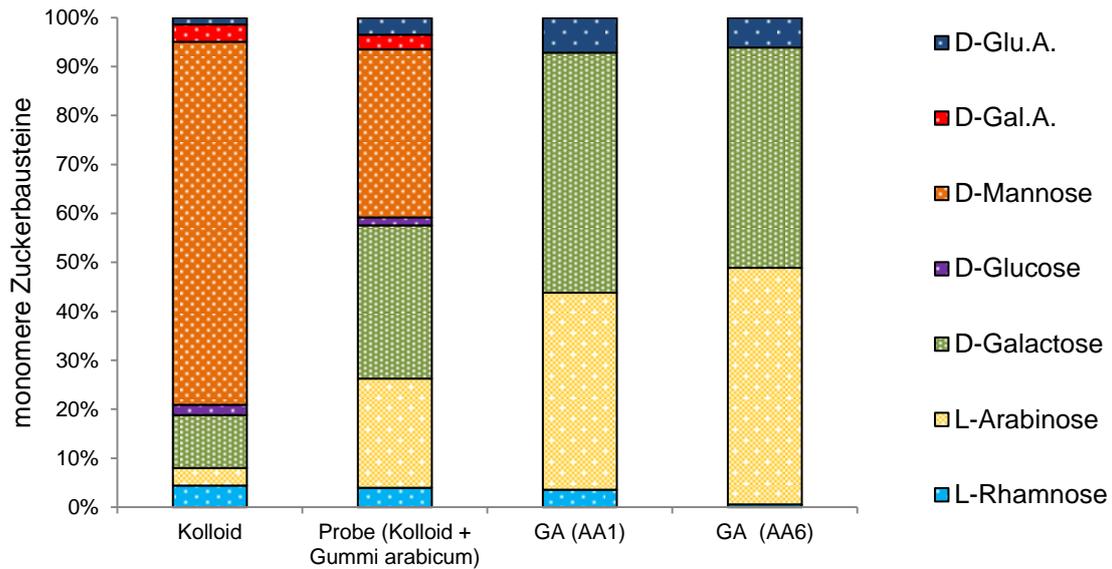


Abbildung 2-2 Prozentualer Vergleich der monomeren Zuckerbausteine verschiedener Kolloide: Weißwein Kolloid, Probe mit 300 mg/L GA und GA Proben aus dem Sudan (AA1 und AA6); HPAEC-PAD Analyse nach zweistufiger Säurehydrolyse

### Zusammensetzung der Weinprobe, versetzt mit 300 mg/L GA:

Die Mischprobe aus einem Weißwein, der mit 300 mg/L GA versetzt und analysiert wurde, enthielt als Hauptzucker zu 21 % D-Mannose und zu 20 % D-Galactose. Ebenfalls erhöhte sich der Gehalt an D-Glucuronsäure mit 2 % im Vergleich zum Weinkolloid erheblich, wohingegen der Gehalt an D-Galacturonsäure mit 1,9 % nahezu unverändert blieb. Der Gehalt an L-Arabinose erhöhte sich auf 14 % während der Gehalt an D-Rhamnose mit 2,5 % nahezu unverändert blieb.

Aus der Abbildung 2-2 geht eindeutig hervor, dass sich Kolloide aus deutschen Weißweinen erheblich in der Zusammensetzung von GA-Proben unterscheiden. Der Hauptzucker bei Weinkolloiden ist D-Mannose, welcher aus der Vergärung mit Hefe stammt (Hefezellwand). GA-Proben enthalten als Hauptzucker hingegen D-Galactose und L-Arabinose, aber keine D-Mannose. Als saurer Zucker kommt in Weinkolloiden vermehrt D-Galacturonsäure vor, wogegen GA-Proben eher D-Glucuronsäure enthalten.

**Zusammensetzung von kommerziellen GA-Proben:**

Zum Vergleich wurden vier kommerzielle oenologische GA-Zusatzstoffe und acht authentische GA-Proben, mit Angabe der Herkunft und Vorbehandlung, analysiert (vgl. Tabelle 2-1). Die Betrachtung der Ergebnisse spiegeln die ersten Annahmen wider. GA-Proben bestehen im Wesentlichen aus den Zuckern D-Galactose und L-Arabinose. Der häufigste saure Zucker ist D-Glucuronsäure, in geringeren Konzentrationen ist L-Rhamnose enthalten und es konnte keine D-Galacturonsäure nachgewiesen werden.

Tabelle 2-1 Monosaccharidverteilung von kommerziell erhältlichen Zusatzstoffen (CA) und von authentischen Gummi Arabikum Proben (AA) aus dem Sudan, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der HPAEC-Analyse nach zweistufiger Säurehydrolyse (n = 2)

GA	Code	L-Rhamnose (%)	L-Arabinose (%)	D-Galactose (%)	D-Galacturon-säure (%)	D-Glucuron-säure (%)	Gesamtzucker-gehalt (%)
Kommerzielle Zusatzstoffe	CA1	2,11 $\pm$ 0,06	31,58 $\pm$ 0,14	29,77 $\pm$ 0,18	n.n.	2,78 $\pm$ 0,22	66,24
	CA2	3,75 $\pm$ 0,01	29,36 $\pm$ 1,13	31,79 $\pm$ 0,43	n.n.	3,89 $\pm$ 0,22	68,80
	CA3	9,38 $\pm$ 0,13	22,93 $\pm$ 0,30	34,65 $\pm$ 0,43	n.n.	6,14 $\pm$ 0,04	73,10
	CA4	9,07 $\pm$ 0,13	19,96 $\pm$ 0,48	32,76 $\pm$ 0,31	n.n.	6,06 $\pm$ 0,11	67,85
Authentische Zusatzstoffe	<sup>a</sup> AA1**	2,25 $\pm$ 0,79	25,46 $\pm$ 2,61	30,96 $\pm$ 1,76	n.n.	4,51 $\pm$ 0,11	63,17
	<sup>2</sup> AA2***	1,74 $\pm$ 0,07	28,70 $\pm$ 0,40	28,28 $\pm$ 0,10	n.n.	3,70 $\pm$ 0,04	62,42
	<sup>2</sup> AA3*	1,86 $\pm$ 0,10	29,66 $\pm$ 0,37	28,62 $\pm$ 0,21	n.n.	3,56 $\pm$ 0,08	63,70
	<sup>1</sup> AA4*	8,35 $\pm$ 1,12	19,12 $\pm$ 1,82	31,00 $\pm$ 2,08	n.n.	7,58 $\pm$ 0,02	66,04
	<sup>2</sup> AA5*	1,60 $\pm$ 0,04	31,66 $\pm$ 0,40	28,28 $\pm$ 0,17	n.n.	3,25 $\pm$ 0,03	64,78
	<sup>1</sup> AA6*	0,41 $\pm$ 0,08	31,84 $\pm$ 0,08	29,65 $\pm$ 0,16	n.n.	4,03 $\pm$ 0,05	65,93
	<sup>2</sup> AA7*	1,85 $\pm$ 0,03	28,34 $\pm$ 0,30	27,27 $\pm$ 0,49	n.n.	3,45 $\pm$ 0,04	60,90
	<sup>2</sup> AA8**	1,87 $\pm$ 0,11	27,53 $\pm$ 0,18	26,65 $\pm$ 0,09	n.n.	3,41 $\pm$ 0,12	59,46

\* Sudan; gereinigt und vorfiltriert

\*\* Sudan; sprühgetrocknet

\*\*\* Sudan; Bio Qualität und ungereinigt

<sup>1</sup> Verek Akacia

<sup>2</sup> Seyal Acacia

<sup>a</sup> ohne Spezifikation

n.n. nicht nachweisbar

### **2.1.3 Statistische Betrachtung der Monosaccharide von Weißweinkolloiden**

Die im vorigen Abschnitt 2.1.2 dargestellten Ergebnisse lieferten Grund zu der Annahme, einen GA-Zusatz über die Konzentrationsänderungen der Monosaccharide in isolierten Kolloiden aus GA-haltigen Weinen und der dazugehörigen Kontrollprobe zu identifizieren. Dafür wurden die individuellen Gehalte der Zuckerbausteine der isolierten Kolloide von 25 deutschen Weißweinen analysiert und konnten für 22 Proben statistisch betrachtet werden.

Aus jedem Wein wurden die Kolloide einmal mit 300 mg/L GA und einmal ohne einen Zusatz durch Ultrafiltration gewonnen und analysiert.

Tabelle B im Anhang zeigt die Ergebnisse der Analyse der Monosaccharide der 22 Weißweine P (Probe) mit 300 mg/L und K (Kontrolle) ohne 300 mg/L GA-Zusatz, deren Summe der Monosaccharide in den unterschiedlichen Anbauregionen sowie die jeweilige Rebsorte des analysierten Weißweines. Die Gehalte der Monosaccharide in GA-haltigen Kolloiden (P) unterschieden sich teilweise stark signifikant von der jeweiligen Variante ohne Zusatz (K) (vgl. Tabelle 2-2). Der Mittelwertvergleich (Tukey-HSD) ergab, dass sich die Konzentrationen an L-Arabinose und D-Galactose in allen Weinanbauregionen am deutlichsten signifikant erhöhten. So erhöhte sich der Mittelwert der Konzentration von L-Arabinose der untersuchten Weine beispielsweise der ersten Gruppe Rheingau, Rheinhessen und Nahe der Kolloide isoliert aus den Kontrollweinen (K) signifikant zu behandelten Proben von 8,21 g/100 g auf 23,57 g/100 g und die Konzentration von D-Galactose von 15,34 g/100 g auf 28,97 g/100 g. Diese Monosaccharide stellen den Hauptanteil im GA dar. Im Gegensatz dazu verringerten sich die D-Mannose-Gehalte von den unbehandelten Varianten (K) zu den mit 300 mg/L behandelten Proben (P) der ersten Gruppe von 26,97 g/100 g auf 12,20 g/100 g. Der Zusatz von GA beeinflusste ebenfalls den Gehalt an D-Glucuronsäure der Gruppe P in allen Weinbauregionen signifikant. So erhöhte sich der D-Glucuronsäure-Gehalt in der ersten Gruppe von 0,94 g/100 g in den Kolloiden der unbehandelten Weine (K) auf 2,88 g/100 g der mit 300 mg/L behandelten Proben (P). Ebenso war der Gesamtzucker Gehalt signifikant erhöht. Eine Unterscheidung zwischen Rebsorte und/oder Jahr hatte keinen statistischen Einfluss auf die Ergebnisse. Der Gehalt an L-Rhamnose, D-Glucose und D-Galacturonsäure wurde in keiner Gruppe signifikant beeinflusst.

## Ergebnisse

Tabelle 2-2 Signifikante Mittelwertvergleiche der isolierten Kolloide aus Weißwein der Monosaccharide sowie des Gesamtzuckergehaltes; K (Kontrolle) ohne GA-Zusatz; P (Probe) mit 300 mg/L GA-Zusatz der verschieden Weinanbaugruppen

	Code	L- Arabinose (%)	D- Galactose (%)	D- Mannose (%)	D- Glucuronsäure (%)	Gesamt- zuckergehalt (%)
Rheingau, Rheinessen, Nahe	K	8,21 <sup>*</sup>	15,34	<b>26,97<sup>***</sup></b>	0,94	59,45
	P	<b>23,57<sup>**</sup></b>	<b>28,97<sup>***</sup></b>	12,20	<b>2,88<sup>***</sup></b>	<b>74,08<sup>**</sup></b>
Württemberg	K	3,76	13,14	<b>24,50<sup>*</sup></b>	1,32	52,14
	P	<b>15,99<sup>***</sup></b>	<b>22,24<sup>**</sup></b>	13,81	<b>2,80<sup>**</sup></b>	<b>60,75<sup>*</sup></b>
Mosel	K	3,22	11,67	<b>27,97<sup>**</sup></b>	0,87	53,42
	P	<b>19,17<sup>**</sup></b>	26,90	12,97	<b>2,80<sup>*</sup></b>	68,13
Franken	K	0,75	4,94	<b>32,96<sup>**</sup></b>	0,31	42,13
	P	<b>14,72<sup>*</sup></b>	<b>17,49<sup>*</sup></b>	18,37	<b>2,34<sup>**</sup></b>	55,61

Prüfwert \*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,005$ ; \*\*\*  $\leq 0,0005$

### 2.1.3.1 L-Arabinose/D-Galactose-Verhältnis

Die Versuchsergebnisse unterstützen ebenfalls die Auswertungen des L-Ara/D-Gal-Verhältnisses der Kontrollen (K), Proben (P) und Zusatzstoffe (Z; AZ). Tabelle 2-3 demonstriert die Verschiebung der Zuckerkonzentration und -relation anhand des L-Ara/D-Gal-Verhältnisses für jede Probe und zusätzlich als Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Aus den Konzentrationen der Weinkolloide (K), die ohne einen Zusatz von GA isoliert wurden, geht hervor, dass die Konzentrationen von L-Arabinose und D-Galactose sehr heterogen verteilt waren. Die L-Arabinose-Gehalte schwankten zwischen 0,4 g/100 g und 23,8 g/100 g Kolloid. Die D-Galactose-Gehalte schwankten zwischen 3,4 g/100 g und 20,2 g/100g. Als mittleren Wert ergab sich ein L-Ara/D-Gal-Verhältnis von 1:0,3 in unbehandelten Proben. Die Gehalte von L-Arabinose der mit 300 mg/L behandelten Proben (P) schwankten zwischen 11,4 g/100g und 30,7 g/100g. Die D-Galactose-Gehalte der behandelten Proben (P) schwankten zwischen 14,0 g/100 g und 41,3 g/100g. Als mittleres L-Ara/ D-Gal-Verhältnis ergab sich ein Wert für die Gruppe P von 1:0,8. Die analysierten Zusatzstoffe haben eine L-Ara/D-Gal-Verhältnis von 1:1. In etwa zu gleichen Teilen ist je L-Arabinose ( $\bar{x} = 27,2$  g/100g) und D-Galactose ( $\bar{x} = 30,0$  g/100 g) enthalten. Das L-Ara/D-Gal-Verhältnis der mit 300 mg/L GA behandelten Proben (P) verschiebt sich in Richtung des L-Ara/D-Gal-Verhältnis der Zusatzstoffe (CA/AA). Das L-Ara/D-Gal-Verhältnis kann somit zur Interpretation von Analysenergebnissen herangezogen werden.

## Ergebnisse

Tabelle 2-3 L-Arabinose/D-Galactose-Verhältnisse der Kontrollen (Weißweinkolloid ohne GA-Zusatz), Proben (Weißweinkolloid mit 300 mg/L GA) und der Zusatzstoffe CA und AA bestimmt aus den L-Arabinose- und D-Galactose-Gehalten der jeweiligen Behandlung

	Behandlung	L- Arabinose (%)	D- Galactose (%)	Verhältnis Ara/Gal -	Verhältnis Ara/Gal Mittelwert
<b>Kontrolle (Weinkolloide unbehandelt)</b>	K1	23,8	18,0	1,3	1:0,3
	K2	13,5	20,2	0,7	
	K3	3,0	15,6	0,2	
	K4	2,8	16,0	0,2	
	K5	17,3	15,9	1,1	
	K6	1,6	11,0	0,1	
	K7	2,3	13,8	0,2	
	K8	1,5	12,2	0,1	
	K9	3,5	14,9	0,2	
	K10	2,7	17,1	0,2	
	K11	4,3	16,2	0,3	
	K12	5,3	18,2	0,3	
	K13	1,0	5,7	0,2	
	K14	2,3	6,9	0,3	
	K15	7,2	13,0	0,6	
	K16	1,3	3,7	0,4	
	K17	1,3	5,0	0,3	
	K18	4,1	18,2	0,2	
	K19	6,1	19,8	0,3	
	K20	0,4	3,7	0,1	
	K21	0,4	3,4	0,1	
	K22	1,4	7,7	0,2	
<b>Probe (Weinkolloid und 300 mg/L GA)</b>	P1	30,6	26,0	1,2	1:0,8
	P2	30,4	37,9	0,8	
	P3	30,7	41,3	0,7	
	P4	24,7	37,1	0,7	
	P5	20,6	20,3	1,0	
	P6	17,0	22,5	0,8	
	P7	15,9	21,4	0,7	
	P8	18,7	25,3	0,7	
	P9	12,5	19,9	0,6	
	P10	18,1	26,0	0,7	
	P11	17,4	26,1	0,7	
	P12	19,0	28,7	0,7	
	P13	15,1	16,5	0,9	
	P14	13,9	19,5	0,7	
	P15	15,9	18,8	0,8	
	P16	15,1	17,5	0,9	
	P17	14,3	17,1	0,8	
	P18	23,1	37,2	0,6	
	P19	24,2	35,8	0,7	
	P20	11,4	14,0	0,8	
	P21	13,0	14,9	0,9	
	P22	19,7	23,6	0,8	
<b>Zusatzstoff (authentische AA und kommerziell CA)</b>	CA1	31,6	29,8	1,1	1:1
	CA2	29,4	31,8	0,9	
	CA3	22,9	34,7	0,7	
	CA4	20,0	32,8	0,6	
	AA1	25,5	31,0	0,8	
	AA2	31,8	29,6	1,1	
	AA3	28,3	27,3	1,0	
	AA4	27,5	26,6	1,0	
	AA5	29,7	28,6	1,0	
	AA6	19,1	31,0	0,6	
	AA7	31,7	28,3	1,1	
	AA8	28,7	28,3	1,0	

### 2.1.4 Stabilisotopenanalytik der vier Elemente (H,O und N,C)

Die Analytik der Stabilisotopenverhältnisse der vier Elemente, ausgedrückt als  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  und  $\delta^{13}\text{C}$ , der isolierten Weißweinkolloide mit und ohne GA-Zusatz ist in Tabelle C (Anhang) im Kontext mit Abbildung 2-3 dargestellt. Abbildung 2-3 demonstriert die Ergebnisse grafisch als Box-Whisker Plot. Tabelle C im Anhang gibt einen Überblick über den Median, den Mittelwert und die Minimal- und Maximalwerte der analysierten Weinanbaugebiete aus den Jahren 2011 und 2012. Die Stabilisotopenanalytik der vier Elemente ist stark abhängig von Jahrgängen und den damit einhergehenden Witterungsbedingungen, somit wurden die Weine nach dem Herstellungsjahr aufgeteilt. Um Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen, wurde der Versuch statistisch mittels parametrischer oder nicht-parametrischer einfaktorieller ANOVA ausgewertet. Abbildung 2-3 beinhaltet alle Proben aus allen Weinanbaugebieten, wohingegen Tabelle C im Anhang die Ergebnisse zusätzlich nach Weinanbaugebiet aufschlüsselt.

Anhand der Ergebnisse in Abbildung 2-3 ist ersichtlich, dass sich der größte signifikante Unterschied im  $\delta^{18}\text{O}$ -Isotopenverhältnis zeigte. Kommerzielle Zusatzstoffe (CA) und die authentischen Zusatzstoffe (AA) hatten  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von durchschnittlich 32 ‰ und sind mit einem Prüfwert  $p < 0,0001$  höchstsignifikant höher gegenüber K (Kontrolle; unbehandelt) und P (Probe; mit 300 mg/L GA) in 2011 und 2012 (vgl. Abbildung 2-3). Der mittlere  $\delta^{18}\text{O}$ -Wert weineigener Kolloide (K) lag bei 24 ‰ in 2011 und bei 23 – 25 ‰ in 2012. Die wesentlich positiveren  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte der kommerziellen Zusatzstoffe (CA) hatten zur Folge, dass die isolierten GA-haltigen Weinkolloide (P)  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von bis zu 27 ‰ für 2012 und bis zu 25 ‰ für 2011 aufwiesen. Die positiveren  $\delta^{18}\text{O}$  Werte der kommerziellen Zusatzstoffe (CA) wiesen eine Signifikanz von  $p < 0,05$  gegenüber der Mischproben (P) der Weine aus dem Jahr 2012 auf. Die Proben aus 2011 zeigten keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,126$ ), es lässt sich aber eine Tendenz vermuten. Der mittlere  $\delta^{18}\text{O}$ -Wert für die isolierten Weinkolloide ohne Zusatz (K) in 2011 lag bei 23 ‰ und für Kolloide mit 300 mg/L GA-Zusatz (P) bei 25 ‰. Dies kann unter Umständen an einem zu kleinen Probenvolumen liegen. Aufgeschlüsselt nach Weinanbaugebiet und Jahren minimierte sich die Stichprobenanzahl und führte zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen (vgl. Tab. C im Anhang).

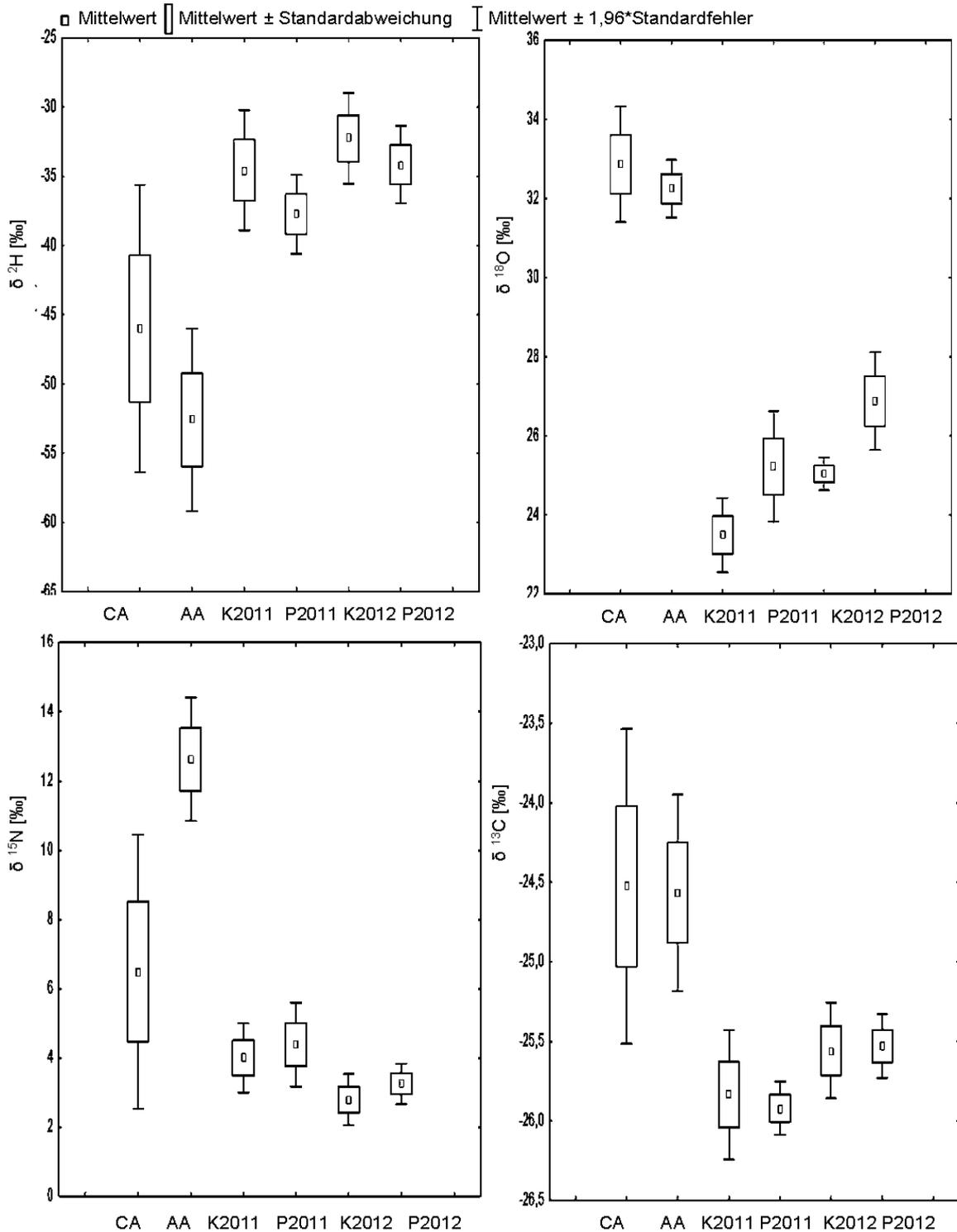


Abbildung 2-3 Ergebnisse der Analytik der Stabilisotopenverhältnisse (H,O und C, N), dargestellt als Box-Whisker Plot mit Mittelwert, Mittelwert ± Standardabweichung und Mittelwert ± 1,96 x Standardfehler der isolierten Kolloide (K unbehandelte Kontrolle; P Weißwein mit 300 mg/L GA) in den Jahren 2011 und 2012 sowie kommerziell erhältliche Zusatzstoffe (CA) und authentische Zusatzstoffe (AA) aus dem Sudan

Basierend auf den chemischen und physikalischen Isotopenfraktionierungsprozessen (vgl. Abschnitt 1.2.3.2) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollproben (K) und analysierten Kolloiden aus behandelten Weinproben (P) im  $\delta^2\text{H}$  und  $\delta^{13}\text{C}$  in den Jahren 2011 und 2012 (vgl. Abbildung 2-3). Obwohl die oenologischen Zusatzstoffe (CA) und die authentische Zusatzstoffe (AA) mit Mittelwerten von  $-46\text{‰}$  für kommerzielle Zusatzstoffe (CA) und  $-52,6\text{‰}$  für authentische Zusatzstoffe (AA) im  $\delta^2\text{H}$  wesentlich negativer gegenüber der Kontrollen (K) mit  $-33,91\text{‰}$  und der Kolloide aus behandelten Weinen (P) mit  $-34,48\text{‰}$  waren. Für  $\delta^2\text{H}$  lag der Prüfwert im Jahr 2011 der Kontrollen (K) gegenüber der kommerziellen Zusatzstoffe (CA) bei einem signifikanten Wert von  $p = 0,01$  (2012  $p = 0,001$ ) und der Kontrollen (K) gegenüber der authentischen Zusatzstoffe (AA) mit einer Höchstsignifikanz bei  $p = 0,0001$  (2012  $p = 0,0001$ ). Diese statistischen Differenzen führten aber zu keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,92$ , 2011 und  $p = 0,83$ , 2012) zwischen Kontrollen (K) und Kolloiden aus behandelten Weinen (P) im  $\delta^2\text{H}$ . Damit ergab sich lediglich eine statistische Unterscheidbarkeit von Weinkolloiden (K) zu GA Zusatzstoffen (CA) und authentischen Zusatzstoffen (AA) im  $\delta^2\text{H}$ , diese hatten aber keinen Einfluss auf die isolierten Kolloide aus behandelten Weinen (P).

Gleichermaßen verhielt es sich mit den behandelten Proben (P) gegenüber der kommerziellen Zusatzstoffe (CA) und der authentischen Zusatzstoffe (AA). Hier lag der Prüfwert von P gegenüber CA in 2011 bei  $p = 0,04$  (2012  $p = 0,07$ ) im  $\delta^2\text{H}$ . Der Prüfwert für P gegenüber AA lag 2011 bei  $p = 0,0001$  und wies damit eine Höchstsignifikanz auf (2012  $p = 0,02$ ).

Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Kolloide (K) und der GA-haltigen Kolloide (P) unterschieden sich gegenüber den oenologischen bzw. kommerziellen Zusatzstoffe (CA) und den authentischen Zusatzstoffen (AA) mit geringen Signifikanzen von  $p < 0,05$ . Daraus resultierten keine Signifikanzen im  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Vergleich von K und P in den Jahren 2011 und 2012.

Auffällig war der niedrige mittlere  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von  $6,5\text{‰}$  der kommerziellen Zusatzstoffe (CA) gegenüber den authentischen Zusatzstoffen (AA) mit  $12,63\text{‰}$ . Mit einem statistischen Prüfwert von  $p = 0,001$  unterschieden sich diese beiden Gruppen hoch signifikant voneinander. Die authentischen Zusatzstoffe (AA) waren deklariert mit Bio-Qualität, ungereinigt und sprühgetrocknet (siehe Tabelle 2-1 im Abschnitt 2.1.3). Die kommerziellen Zusatzstoffe (CA) waren handelsübliche und zum direkten

Gebrauch bestimmte Produkte. Die kommerziellen Erzeugnisse (CA) waren bereits vorfiltrierte, gereinigte, filtrierte und getrocknete GA-Produkte. Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der kommerziell erhältlichen Produkte (CA) streuten von 0,61 – 9,34 ‰, die der authentischen Zusatzstoffe (AA) lediglich von 8,19 – 14,81 ‰ (vgl. Tabelle C im Anhang). Verglichen mit den Kontrollen (K) und mit den aus behandelten Weinen isolierten Kolloiden (P) in den Jahren 2011 und 2012, waren die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der kommerziellen (CA) und authentischen (AA) GA-Stoffe erheblich positiver (vgl. Abbildung 2-3). Durch die starke Streuung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der kommerziell erhältlichen Zusatzstoffe (CA) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen K und P. Hochsignifikant waren lediglich die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von AA zu K und P mit einem Prüfwert  $p < 0,0001$  in beiden Jahren. Die breite Streuung der Werte könnte an den geringen Proteingehalten der Zusatzstoffe liegen (vgl. Abschnitt 2.6.2). Die signifikanten Unterschiede die zwischen AA und K sowie P in den Isotopenverhältnissen aufgezeigt wurden, spielen in der Praxis keine Rolle, da hier nur kommerziell aufgearbeitete und gereinigte GA-Produkte (CA) zum Einsatz kommen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein positiverer  $\delta^{18}\text{O}$ -Wert auf einen Zusatz von GA schließen lässt. Für diese Aussage sollte allerdings der  $\delta^{18}\text{O}$ -Wert weineigener Kolloide ohne GA-Zusatz jährlich verfolgt werden.

### **2.1.5 Multivariate Statistik - Hauptkomponentenanalyse (PCA)**

Basierend auf Gesamtkolloidgehalt, Gesamtzuckergehalt, Gehalt der einzelnen Monosaccharide und der Isotopenverhältnisse der vier Elemente wurde der Datensatz der analysierten Weine (Kontrolle und Probe) und der Zusatzstoffe (CA und AA) mittels Hauptkomponentenanalyse veranschaulicht (s. Abbildung 2-4). Zur Dimensionsreduzierung und zur Beschreibung der Variabilität des Systems wurde die multivariate Statistik verwendet. Betrachtet man zunächst den Score Plot (A), so sind eindeutig zwei voneinander getrennte Gruppen zu erkennen, welche sich als Kontrolle (K) und Probe (P) identifizieren lassen.

Basierend auf der Zuckerbausteinzusammensetzung, dem Gesamtkolloidgehalt, dem Gesamtzuckergehalt und der Isotopenverhältnisanalytik der vier Elemente wurden die Proben mit 300 mg/L GA-Zusatz (P) von den Kontrollen (K) eindeutig separiert. Die Trennung der Gruppen in K und P ist stark beeinflusst von der Wichtung der einzelnen Parameter. Maßgeblich für die Gruppentrennung waren hier D-Glucuronsäure, der Gesamtkolloidgehalt, der Gesamtzuckergehalt und die  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte (vgl. Abbildung 2-4 B). Darüber hinaus wurde das System ebenfalls stark von

L-Arabinose und D-Galactose beeinflusst. Ferner kann angenommen werden, dass hohe Gehalte an L-Arabinose und D-Galactose einhergehen, mit einem geringen Gehalt an D-Mannose. Dies wird ersichtlich durch die gegensätzliche Ausrichtung der Parameter entlang der horizontalen Linie im Loading Plot (B).

Mit 41,09 % hatet Faktor 1 (F1) den größten Einfluss auf das System, im Kontext mit dem Loading Plot (B) konnte daraus geschlossen werden, dass der Faktor F1 durch die neutralen und sauren Zucker repräsentiert wurde. Deren Änderung durch die Zugabe von 300 mg/L GA hatte den größten Einfluss auf die Trennung der Proben (P) von den Kontrollen (K). Der zweite Faktor (F2) beeinflusste die Studie mit 16,12 % und kann als Stabilisotopenanalyse der vier Elemente betrachtet werden. Der Zusatz von GA zu Wein und die Analytik der Veränderungen in der kolloidalen Zusammensetzung sind in der monomeren Zuckerbausteinzusammensetzung am eindeutigsten. Zwar sind die Stabilisotopenverhältnisse im  $\delta^{18}\text{O}$  signifikant von K zu P, dennoch haben diese Veränderungen den kleineren Einfluss auf das betrachtete System.

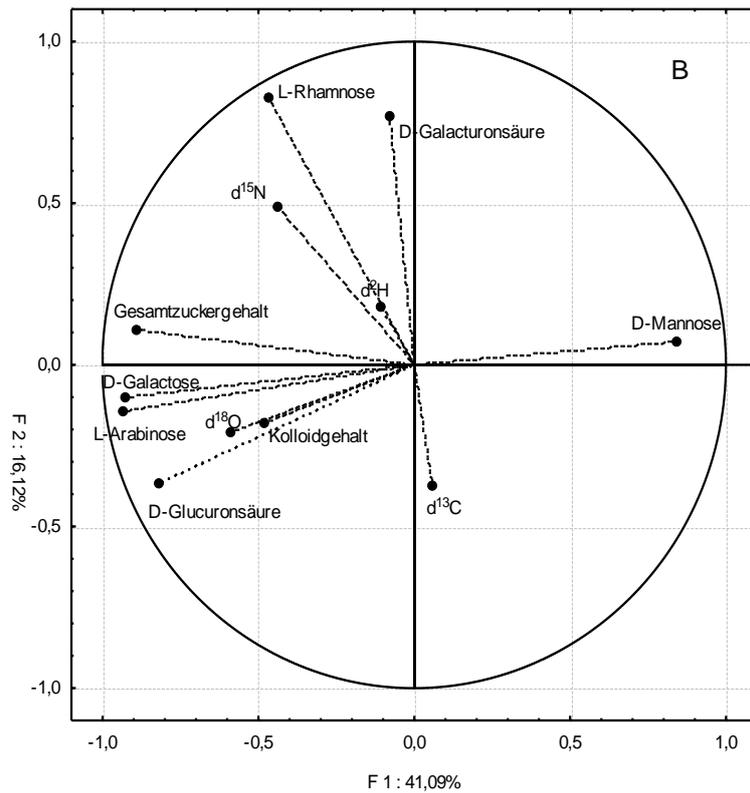
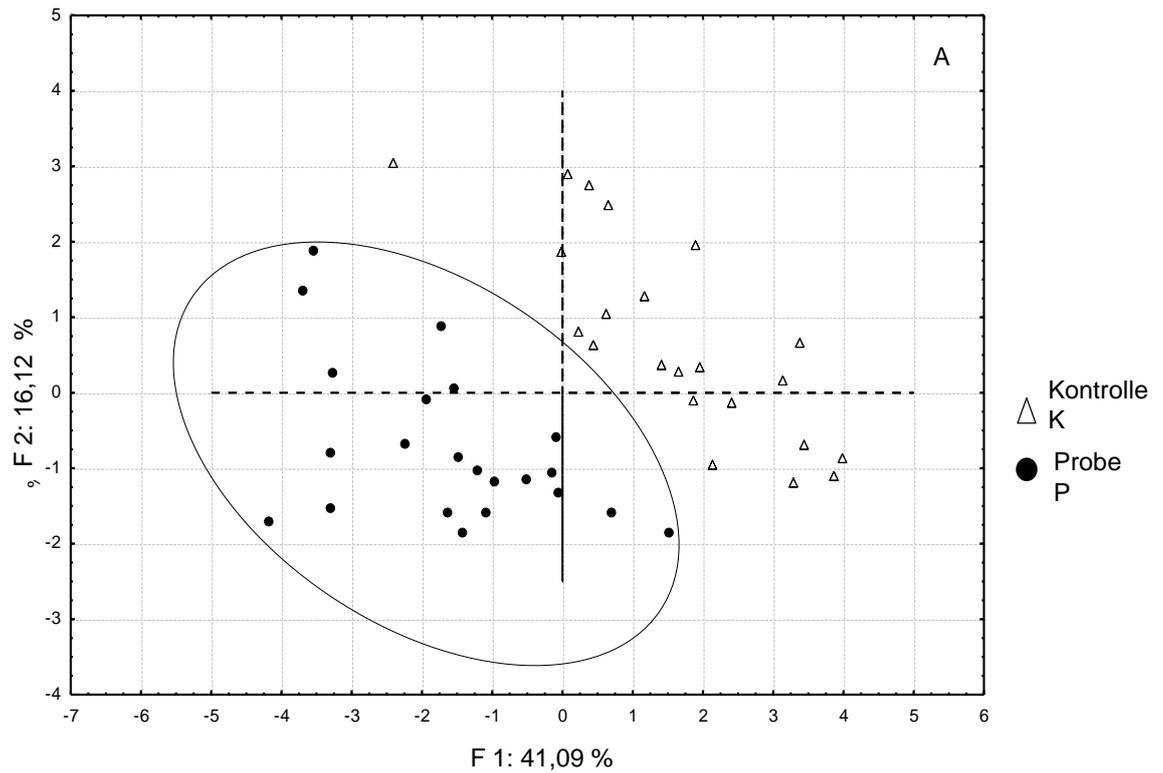


Abbildung 2-4 PCA Analyse (PC1 und PC2) von K und P, dargestellt als Score Plot (A), erzeugt aus Monosacchariden, Gesamtkolloidgehalt, Gesamtzuckergehalt und Isotopenverhältnissen der vier Elemente (H, O und N,C) des Loading Plots (B) (n = 22)

Im Loading Plot (B) wurden zusätzlich die Variablen bestimmt, die auf die Trennung von K und P den geringsten Einfluss ausübten. Hierbei handelte es sich um die fast senkrechten Ausrichtungen der Variablen die durch den Gehalt an L-Rhamnose und D-Galacturonsäure bzw. der Isotopenverhältnisse von  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$  und  $\delta^2\text{H}$  gekennzeichnet waren. (vgl. Abbildung 2-4 B). Wie bereits in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, wurden keine signifikanten Unterschiede im Mittelwertsvergleich der monomeren Zuckerbausteine L-Rhamnose, D-Glucose und D-Galacturonsäure gefunden. Die Gehalte dieser Monosaccharide veränderten sich durch einen Zusatz von 300 mg/L GA nicht. Gleichermaßen unbeeinflusst blieben die Isotopenverhältnisse von  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$  und  $\delta^2\text{H}$  (vgl. Abschnitt 2.1.4).

Durch Eliminierung der Parameter L-Rhamnose, D-Galacturonsäure und der Isotopenparameter  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$  und  $\delta^2\text{H}$  sowie der Summe der hydrolysierten Monosaccharide und der erneuten PCA-Analyse bekam das System eine Erklärbarkeit von 80,34 % (F1+F2). Dabei kristallisierte sich heraus, dass L-Arabinose und D-Galactose mit dem Gegenspieler von D-Mannose in Kombination mit Gesamtkolloidgehalt und der  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte den größten Effekt auf die Trennung der Proben von den Kontrollen hatten. Die Abbildungen (Score und Loading Plot) zur reduzierten PCA-Analyse befinden sich im Anhang (Abbildung A).

## 2.2 Nachweis von Metaweinsäure - Kalkulation der spezifischen Massen

Die Kalkulation der spezifischen Massen wurde wie in Formel 4 gezeigt durchgeführt. Die Masse des Weinsäuremoleküls (150,01 g/mol) wurde mit der Anzahl der in den Oligomeren vorhandenen Weinsäuremoleküle multipliziert und für jede mögliche Bindung die Masse des abgespaltenen Wassers subtrahiert. Bei der Synthese der Metaweinsäure sind sowohl offenkettige als auch cyclische Oligomere denkbar (vgl. Abschnitt 1.2.4). Bei cyclischen Oligomeren muss pro Ringschluss zusätzlich die Masse der abgespaltenen Wassermoleküle subtrahiert werden.

Allgemeine Berechnung für offenkettige Oligomere:

$$M_{MWS} = (n \times M_{WS}) - [M_{H_2O} \times (n - 1)] \quad (4)$$

$M_{MWS}$ : Molekulargewicht des Metaweinsäureoligomers

$M_{WS}$ : Molekulargewicht Weinsäure (150,01 g/mol)

$M_{H_2O}$ : Molekulargewicht Wasser (18,01 g/mol)

$n$ : Anzahl der Weinsäuremoleküle im Oligomer

Tabelle 2-4 Kalkulierte (monoisotopische) Massen der Metaweinsäureoligomere (Dimer bis Hexamer)

Bezeichnung	Berechnete Masse (g/mol)
Dimer	282,01
Dimer (cyclisch)	264
Trimer	414,01
Trimer (cyclisch)	396
Tetramer	546,01
Tetramer (cyclisch)	528
Pentamer	678,01
Pentamer (cyclisch)	660
Hexamer	810,01
Hexamer (cyclisch)	792

### 2.2.1 Massenspektrometrische Detektion von MWS (HPLC-UV-MS)

Zu Beginn wurde ein hochkonzentrierter Metaweinsäurestandard (500 mg/L, MWS Produkt C) in Reinstwasser direkt in das Massenspektrometer injiziert und ein Massenspektrum aufgezeichnet (Abbildung 2-5).

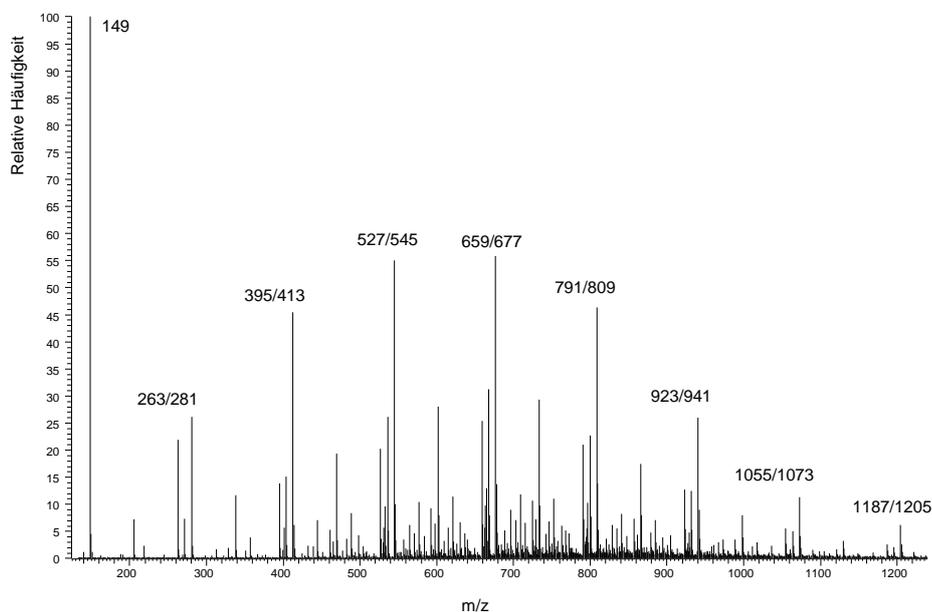


Abbildung 2-5 Negatives ESI-MS Spektrum von MWS (Probe C) nach direkter Injektion in die ESI-Quelle

Die detektierten  $m/z$ -Verhältnisse wurden mit den zuvor kalkulierten Massen der Oligomere der Metaweinsäure abgeglichen (Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5 Vergleich kalkulierter Massen der Metaweinsäureoligomere und detektierter  $m/z$ -Verhältnisse

Bezeichnung	Berechnete Masse (g/mol)	[M-H] <sup>-</sup>
Dimer	282,01	280,92
Trimer	414,01	412,78
Tetramer	546,01	544,76
Pentamer	678,01	676,72
Hexamer	810,01	808,73

Eine zufriedenstellende Detektion der Oligomere der Metaweinsäure wurde unter nachfolgenden Bedingungen erreicht.

Zuerst wurde von Probe C ein ESI-Massenspektrum im negativen Modus aufgenommen (vgl. Abbildung 2-5). In der aufgegebenen Standardlösung konnten die Massen der monomeren Weinsäure sowie der Oligomere der Metaweinsäure vom Dimer bis zum Decamer detektiert werden. Alle analysierten MWS-Produkte zeigten als Hauptfragment die monomere Weinsäure ( $m/z$  149 [M-H]<sup>-</sup>), gefolgt vom Tetramer ( $m/z$  545 [M-H]<sup>-</sup>) und Pentamer ( $m/z$  677 [M-H]<sup>-</sup>).

In Abbildung 2-5 lassen sich zwei homologe Reihen der  $m/z$ -Verhältnisse der Oligomere der Metaweinsäure erkennen. Zwischen den  $m/z$ -Verhältnissen liegt hierbei entweder immer die Differenz in Größe der Masse eines Wassermoleküls (18,01 g/mol) oder eine Differenz von 132, der dem Weinsäuremolekül (150,01 g/mol) abzüglich der Masse eines Wassermoleküls entspricht. Die Intensitäten der Massen der cyclischen Oligomere liegen dabei deutlich unter denen der offenkettigen Oligomere. Ebenso ist zu erkennen, dass die Intensitäten der Massen ab dem Hexamer stark zurückgingen (vgl. Massenspektren MWS A-G Abb. G im Anhang). Es sind keine Daten verfügbar, die die prozentuale Verteilung der Moleküle nach der Veresterungsreaktion von Weinsäure aufzeigen. Die Intensitäten eines MS-Spektrums können neben den Stabilitäten von Molekülen auch zu deren Konzentrationsbestimmung herangezogen werden, weshalb vermutet wurde, dass die höhermolekularen Strukturen der MWS-Oligomere in geringeren Konzentrationen, in dem analysierten MWS-Gemisch, enthalten waren. Zur Identifizierung der Metaweinsäure wurden daher im weiteren Verlauf die  $m/z$ -Verhältnisse vom Trimer bis zum Hexamer der offenkettigen Oligomere der Metaweinsäure verwendet. Die Detektion erfolgte während der Vorversuche im Scan-Modus. Sämtliche Metaweinsäurepräparate wiesen dabei die gleichen Intensitätsmuster auf (Abbildung 2-6). In den MWS-Produkten A-G konnten vom Trimer bis zum Hexamer vergleichsweise ähnliche Intensitäten detektiert werden, wobei auch hier in jedem Produkt der Rückgang der Intensität mit steigendem Molekulargewicht zu verzeichnen war.

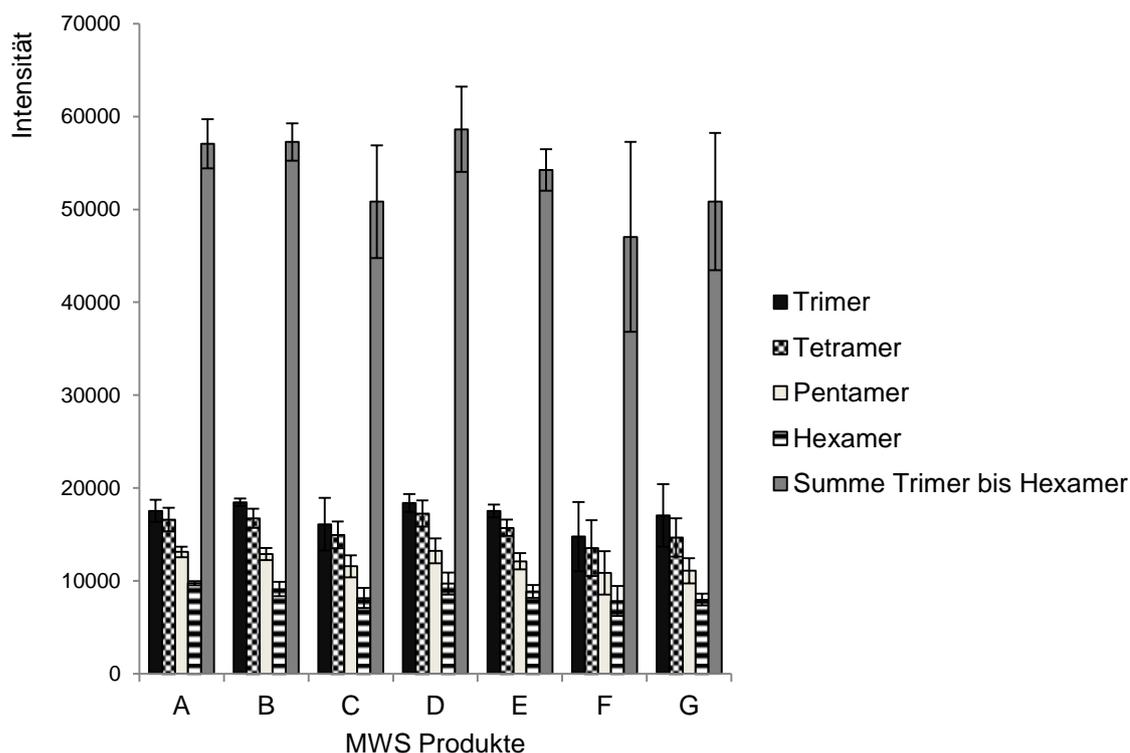


Abbildung 2-6 Intensitätsmuster der spezifischen Massen von MWS-Produkten (A-G) 500 mg/L in Wasser bestimmt mittels LC-MS

### 2.2.2 Analyse von Metaweinsäure in Weißwein und Traubenmost

Als Probenvorbereitung und als Clean up für mit Metaweinsäure versetzte Weißweine und Traubensäfte wurden verschiedene SPE-Schritte (Festphasenextraktion) getestet. Ziel der Versuche war die möglichst vollständige Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen und eine eventuelle Aufkonzentrierung der MWS für bessere Intensitäten der MS-Analyse. SPE-Kartuschen vom Typ Strata-X-A, welche als Material einen starken Anionentauscher enthalten, konnten detektierbare MWS-Konzentrationen retardieren.

Im Fokus der Methodenentwicklung stand, eine eventuelle pH-Wert Abhängigkeit der SPE-Schritte auszuschließen. So wurden in einigen Vorversuchen Wein bzw. Traubensaft mit 100 mg/L Metaweinsäurezusatz und pH-Werten von 2,8; 3,6; 4,2 sowie unverändertem pH-Wert von 3,2 mittels SPE aufgereinigt und die Peakflächen des Metaweinsäureoligomers analysiert (siehe Abbildung 2-7). Die pH-Werte wurden mit 6%iger HCL bzw. 50%iger NaOH eingestellt. Die größtmögliche Aufkonzentrierung konnte mit einem unveränderten pH-Wert von 3,2 des Weines bzw. des Traubensaftes erreicht werden. Hierbei wurden fünffach höhere Peakflächen des Metaweinsäureoligomers erreicht, als bei den Proben, deren pH-Werte wie zuvor beschrieben, eingestellt wurden.

Der unveränderte pH-Wert der MWS-haltigen Proben lieferte somit die besten Ergebnisse. Eine pH-Wert Abhängigkeit kann dennoch nicht ausgeschlossen werden und sollte bei weiteren Versuchen erneut getestet werden. Im Anschluss folgte eine Methodenoptimierung an der HPLC. Zuerst wurde die Zusammensetzung des Elutionsmittels variiert. Für die Säule des Typs Varian Hi-Plex-H (300 x 7,7 mm 8 µm) wurde die Ameisensäurekonzentration auf 0,05 % reduziert. Eine Erhöhung der Säulentemperatur von 50 °C auf 70 °C ergab keine verbesserte Trennung. Die Verringerung des Injektionsvolumens auf 10 µL sowie die Erhöhung der Flussrate auf 400 µL/min erbrachten deutlich schmalere und schärfere Peaks. Nach der erfolgreichen Methodenoptimierung wurde die in Abschnitt 4.5 beschriebene Methode für alle weiteren Versuche verwendet.

Sowohl der Weißwein als auch der Traubensaft wiesen Gehalte zwischen 2 und 4 g/L freie Weinsäure und zwischen 3 und 5 g/L freie Äpfelsäure auf. Beide organischen Säuren konnten chromatografisch von der Metaweinsäure getrennt werden.

Tabelle 2-6 Grundanalytik des verwendeten Versuchsweins (Weißwein Q.b.A. 2011) und des verwendeten Traubensaftes (Traubensaft weiß 2010) zur Methodenentwicklung bestimmt mittels FTIR

Parameter	Einheit	Weißwein	Traubensaft
		Analysenergebnis	Analysenergebnis
Dichte	20/20	0,992	1,071
Alkohol	g/L	105,5	0,1
Extrakt	g/L	21,9	185,5
zuckerfreier Extrakt	g/L	18,1	22,5
vergärbare Zucker	g/L	3,8	163,0
Glucose	g/L	1,6	77,3
Fructose	g/L	2,2	85,7
Gesamtsäure	g/L	6,5	7,3
pH-Wert	-	3,2	3,2
Weinsäure	g/L	2,1	4,3
Äpfelsäure	g/L	2,7	4,7
Milchsäure	g/L	n.n.	n.n.
flüchtige Säure	g/L	0,2	0,3
Glycerin	g/L	6,9	0,8

Die Analyse von Versuchswein mit 100 mg/L Metaweinsäure, welcher mit zuvor beschriebener Methode aufgearbeitet wurde, ergab das in Abbildung 2-7 gezeigte Chromatogramm. Metaweinsäure eluiert bei 9.66 Minuten gefolgt von dimerer

Weinsäure (10.01 min,  $m/z$  281  $[M-H]^-$ ). Monomere Weinsäure eluiert bei 12.23 Minuten und ist klar getrennt von Metaweinsäure.

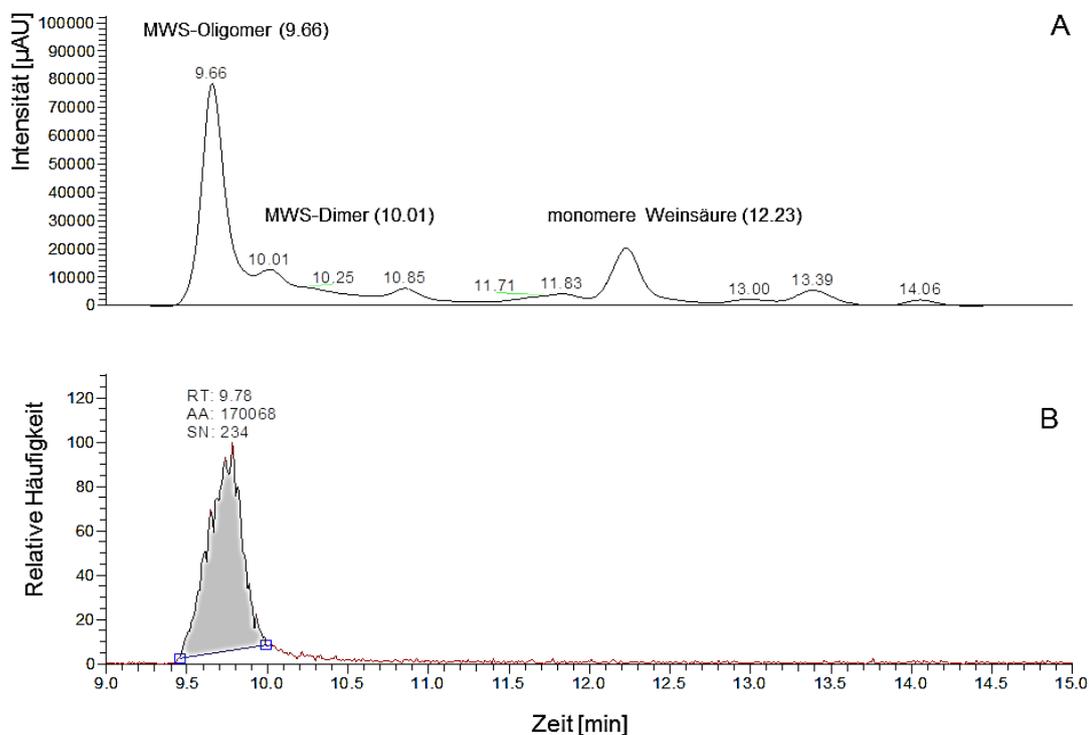


Abbildung 2-7 Chromatogramm Versuchswein mit Metaweinsäure nach SPE (Produkt C; 100 mg/L) (Säule Varian Hi-Plaex H; 230 nm; UV/VIS-Signal bei 210 nm (A); MS Signal im TIC-Modus (B) für die Quantifizierung)

Der Peak bei 13.39 Minuten ist der im Wein enthaltenen Äpfelsäure zuzuordnen. Aufgrund der Co-Elution einer unbekannt Substanz unter dem Metaweinsäure-Peak konnte das UV-Signal (210 nm) nicht zur quantitativen Auswertung verwendet werden. Weitere Anstrengungen zur Verbesserung der Probenvorbereitung und zur Eliminierung störender Substanzen hatten keinen nennenswerten Erfolg. Die störende Substanz konnte weder identifiziert noch minimiert werden. Zur Quantifizierung der Metaweinsäuregehalte wurde anschließend der Totalionenstrom (TIC) herangezogen. Ausgewertet wird hier die Summe aller Ströme, die von den Ionen aller  $m/z$ -Werte im Spektrum erzeugt werden. Bei dem eingesetzten Messaufbau war das Massenspektrometer in Serie an den UV/VIS-Detektor gekoppelt. Dadurch ergab sich eine Zeitverzögerung von etwa fünf Sekunden zwischen UV/VIS- (A) und MS-Signal (B) (vgl. Abbildung 2-7. Das gezeigte Massenspektrum (Abbildung 2-5 und Abbildung 2-6) konnte für jedes analysierte Metaweinsäure-Produkt gleichermaßen detektiert werden. Aufgrund dessen wurde der Peak der Metaweinsäure zusammen mit dem darunterliegenden

Massenspektrum und dem daraus erzeugten TIC-Signal für die qualitativen und quantitativen Analysen von Metaweinsäure in Weißwein verwendet.

### **2.2.2.1 Quantitativer Nachweis von Metaweinsäure in Wein**

Zur Kalibrierung der Methode wurde, unter Verwendung eines Standards und vorangegangener SPE Aufreinigung, das kumulierte Masse Signal, also die Summe der Intensitäten der spezifischen Massen vom Trimer bis zum Hexamer des Metaweinsäuremoleküls ( $m/z$  413, 545, 677, 809 [M-H]<sup>-</sup>), herangezogen und die Fläche des TIC-Signals in Abhängigkeit von der Konzentration ausgewertet. Abbildung 2-8 zeigt die daraus resultierende Kalibriergerade der Methode. Mit einem Korrelationswert von  $R = 0,9981$  ist diese Kalibrierung im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 200 mg/L als linear anzusehen. Um die gleichbleibenden Bedingungen sicherzustellen, wurden die Intensitäten der spezifischen Massen jedes verwendeten Matrixstandards auf Konstanz untersucht. Abbildung 2-9 zeigt die Detektionsmuster der einzelnen Konzentrationen der Standards vom Trimer bis zum Hexamer. Ab einer Konzentration von 25 mg/L weisen die Detektionsmuster nur geringfügige Schwankungen auf. Dies spricht für konstante Bedingungen, auch im Hinblick auf die Ionisierung der Metaweinsäure.

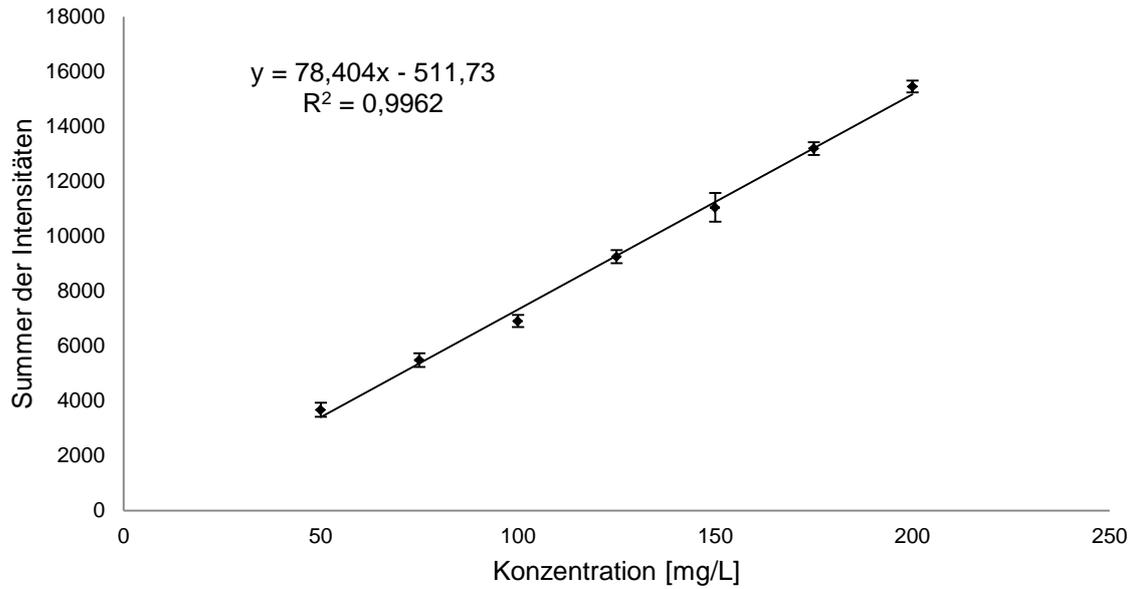


Abbildung 2-8 Kalibrierung von Metaweinsäure über die Summe der Intensitäten. Gezeigt wird das TIC-Signal von  $m/z$  413, 545, 677, 809 [M-H]<sup>-</sup> in Weißwein (50 – 200 mg/L) nach SPE in Doppelbestimmung

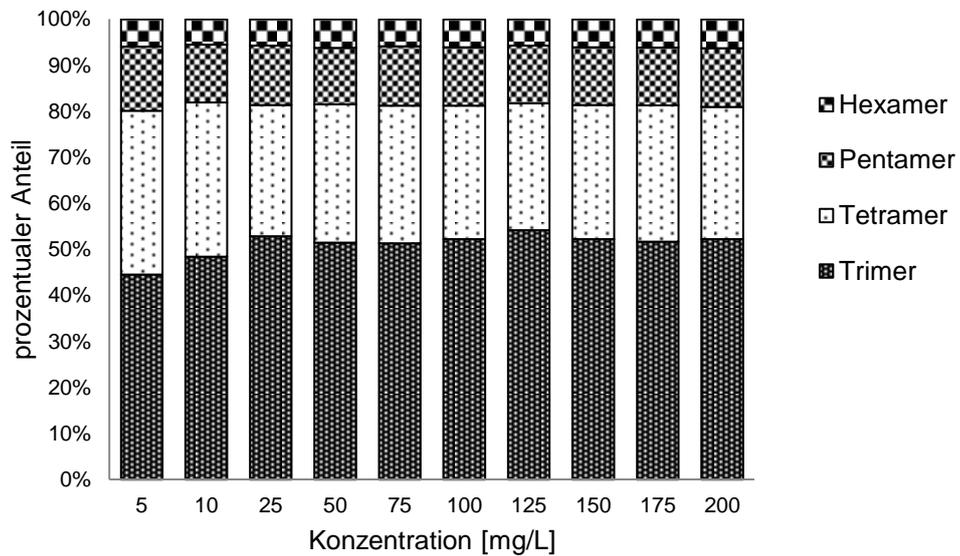


Abbildung 2-9 Detektionsmuster der Intensitäten der spezifischen Metaweinsäureoligomere in Prozent von 5 – 200 mg/L

### 2.2.2.2 Validierung der HPLC-MS-Methode für Metaweinsäure

Tabelle 2-7 gibt einen Überblick über die ermittelten Parameter zur Absicherung der HPLC-MS-Methode für die Bestimmung von Metaweinsäure in Weißwein.

Tabelle 2-7 Validierungsparameter der Bestimmung von Metaweinsäure in Weißwein (für die entwickelte HPLC-MS-Methode)

Validierungsparameter	Experimentelle Werte
Linearität (Arbeitsbereich)	50 – 200 mg/L ( $R^2 = 0,992$ )
Wiederfindung	$99 \pm 3 \%$
Präzision (Variationskoeffizient)	0,015 %
Nachweisgrenze (LOD)	10 mg/L
Bestimmungsgrenze (LOQ)	35 mg/L

Die Identität des Analyten wird durch eine ausreichende Detektion mit einem geeigneten Detektor sichergestellt. Da die Massenspektrometrie eine der selektivsten Detektionsarten ist, wurden die spezifischen Massen der möglichen Metaweinsäureoligomere berechnet und mit den analysierten Massen verglichen. Somit wurde durch die Analyse der zur Verfügung stehenden MWS-Produkte die Selektivität der Methode überprüft.

Die Selektivität wurde sichergestellt, indem Metaweinsäure direkt in das Massenspektrometer injiziert wurde und die detektierten Massen ( $m/z$ ) mit den zuvor kalkulierten Massen verglichen wurden (vgl. hierzu Tabelle 2-7). Für die Bestimmung der Präzision wurde ein Metaweinsäure-Standard (500 mg/L) in fünffacher Wiederholung analysiert und daraus die Präzision der Methode berechnet. Der systematische Fehler der Methode liegt bei 0,015 %, somit erfüllt die Methode die Validierungsvorgaben für die Methodenpräzision ( $< 2 \%$ ) (Kromidas 2000). Die Linearität wurde aus sechs Konzentrationen zwischen 50 und 200 mg/L aus Weißwein nach SPE-Aufbereitung in Doppelbestimmung bestimmt. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,996 und die Methode ist als linear anzusehen. Die Wiederfindung wurde aus unterschiedlichen Konzentrationen von Metaweinsäure in Wein nach SPE-Aufbereitung bestimmt. Mit  $99 \pm 3 \%$  erfüllt auch hier die Methode die analytischen Anforderungen. Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und

LOQ) wurden nach der Blindwertmethode ermittelt. Die minimal detektierbare Menge (LOD) von Metaweinsäure in Weißwein liegt bei 10 mg/L, daraus ergibt sich eine quantitative Bestimmungsgrenze von 35 mg/L. Mit diesen Werten ist ein linearer Arbeitsbereich zwischen 50 und 200 mg/L als sicher anzusehen (vgl. Tabelle 2-7).

### 2.3 Natrium-Carboxymethylcellulose - Nachweis über HPAEC-PAD

Grundvoraussetzung für den Nachweis von CMC mit High-Performance-Anion-Exchange-Chromatography (HPAEC) und gepulster-amperometrischer-Detektion (PAD) ist die saure Spaltung von CMC in Monomere (vgl. Abschnitt 1.2.5). Dieser Schritt gelang durch eine zweistufige Hydrolyse mit 80%iger Schwefelsäure. Die Vorhydrolyse verläuft zuerst bei Raumtemperatur über ca. 12 h mit konzentrierter Säure, darauf folgt die Verdünnung auf ca. 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit Reinstwasser. Schon bei der Vorhydrolyse mit konzentrierter Säure zeigten die Proben stark dunkelgefärbte Oxidationsprodukte, sodass die Probenlösung fast schwarz war. Die Haupthydrolyse der verdünnten Proben findet bei 100 – 110 °C über fünf Stunden im Thermoblock statt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit festem Calciumcarbonat (CaCO<sub>3</sub>) neutralisiert und das ausgefallene Calciumsulfat (CaSO<sub>4</sub>) abfiltriert.

Die Trennung der CMC-Monomere erfolgte mittels Natriumhydroxid-Gradienten, in dem Natriumacetat enthalten war, um eine Elution der Monomere zu bewirken. Durch die Carboxy-Gruppen (-COO<sup>-</sup>) der Analyten kommt es zu einer starken Retardierung auf der Anionentauschersäule. Abbildung 2-10 zeigt ein typisches Chromatogramm des Polysaccharids (CMC 6) nach der beschriebenen Hydrolyse. Ersichtlich sind alle acht Bausteine der Natrium-Carboxymethylcellulose. Mengemäßig am häufigsten tritt Glucose auf (4 – 6 Minuten), gefolgt von den einfach substituierten Carboxymethylglucosen (12 – 14 Minuten). Wesentlich weniger und kaum detektierbar waren die höher substituierten Carboxymethylglucosen (21 – 28 Minuten) bis hin zum komplett substituierten 2,3,6-O-Carboxymethylglucose Monomer (ca. 35 Minuten). Während der Peakabfolge scheint von unsubstituierter zu mono- bis hin zu mehrfach-substituierten Carboxymethylglucosen der Detektorresponse des PAD-Detektors stark abzunehmen. Dies liegt an den freien Hydroxylgruppen, die mit zunehmender Substitution des Glucosemoleküls weniger werden (vgl. Abschnitt 1.2.5).

Die Peakidentifizierung erfolgte anhand von Literaturangaben. Die Arbeiten von Kragten *et al.*, Puls *et al.* und Saake *et al.* lieferten hierzu die Grundlage (Kragten *et al.* 1992), (Puls *et al.* 1998) und (Saake *et al.* 2001). In den Arbeiten wurden sowohl sauer hydrolysierte als auch durch Enzymierung gespaltene CMC-Produkte mittels HPAEC-PAD analysiert und die Peakabfolge der Glucose, der monosubstituierten und der mehrfach substituieren Carboxymethylglucose beschrieben.

Standardsubstanzen, um die Spezifität der Methode zu überprüfen oder im späteren Verlauf die Methode zu validieren, waren kommerziell nicht erhältlich. Das charakteristische Peakmuster der 6-O-CMG (6-O-Carboxymethylglucose), 2-O-CMG (2-O-Carboxymethylglucose) und der 3-O-CMG (3-O-Carboxymethylglucose) stellt sich in der Höhe der Peaks immer im Verhältnis 1:1,5:0,5 dar und ist charakteristisch für einen CMC-Zusatz.

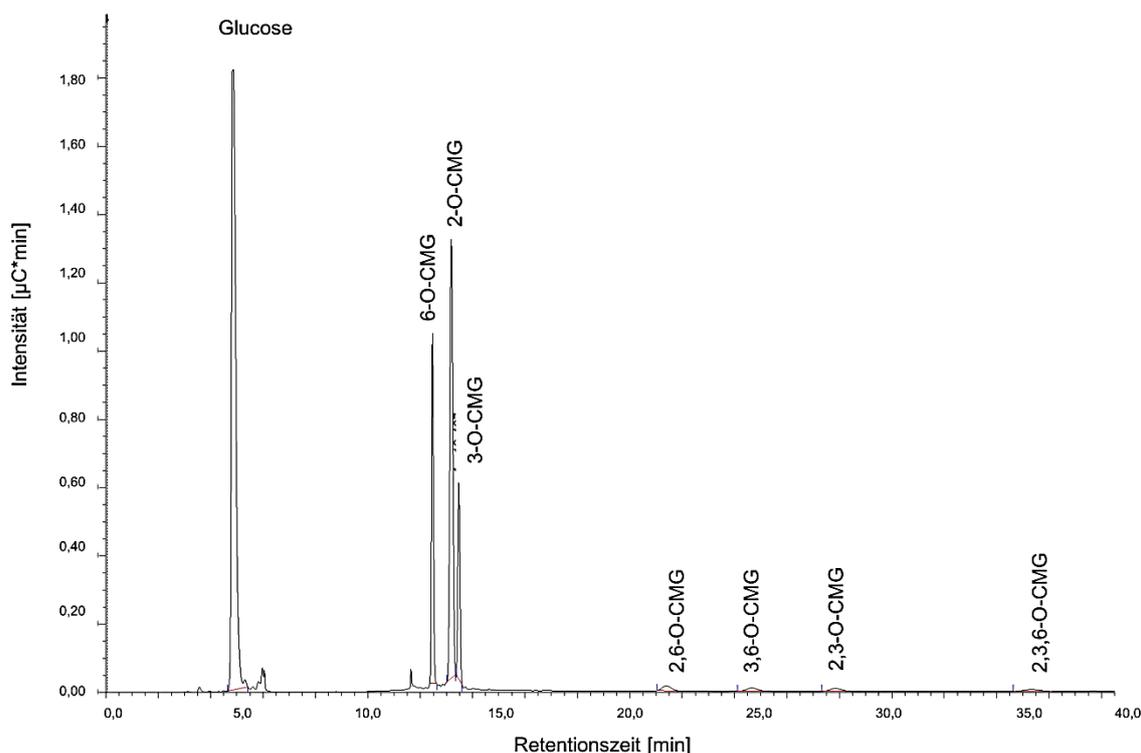


Abbildung 2-10 Chromatogramm der sauren Hydrolysate von CMC Probe 6 (80%ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mit Glucose, 6-O-Carboxymethylglucose (6-O-CMG), 2-O-Carboxymethylglucose (2-O-CMG), 3-O-Carboxymethylglucose (3-O-CMG), 2,6-O-Carboxymethylglucose (2,6-O-CMG), 3,6-O-Carboxymethylglucose (3,6-O-CMG), 2,3-O-Carboxymethylglucose (2,3-O-CMG) und 2,3,6-O-Carboxymethylglucose (2,3,6-O-CMG) mittels HPAEC-PAD (Säule: Carbowac PA 100 (4x250 mm) mit Vorsäule (4x50 mm)) und NaOH-Gradienten

Aus den ersten Versuchen ging somit hervor, dass die Trennung der hydrolysierten CMC-Bausteine mit der verwendeten Analysetechnik möglich ist. Weiterhin wurden Versuche durchgeführt, die belegen, dass CMC als Zusatzstoff im Wein qualitativ über das Peakmuster der einfach-substituierten Carboxymethylglucosen nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde mit der beschriebenen HPLC-Methode zusätzlich Zuckerstandardsubstanzen, welche natürlicherweise in Weinkolloiden vorhanden sind (vgl. Abschnitt 1.1.1), analysiert. Abbildung 2-11 zeigt ein typisches Chromatogramm aus dem hervor geht, dass die natürlicherweise in Weinkolloiden enthaltenen monomeren Zuckerbausteine mit der HPLC-Methode unterhalb von

10 Minuten eluieren und das typische Peakmuster der CMC nicht überdecken.

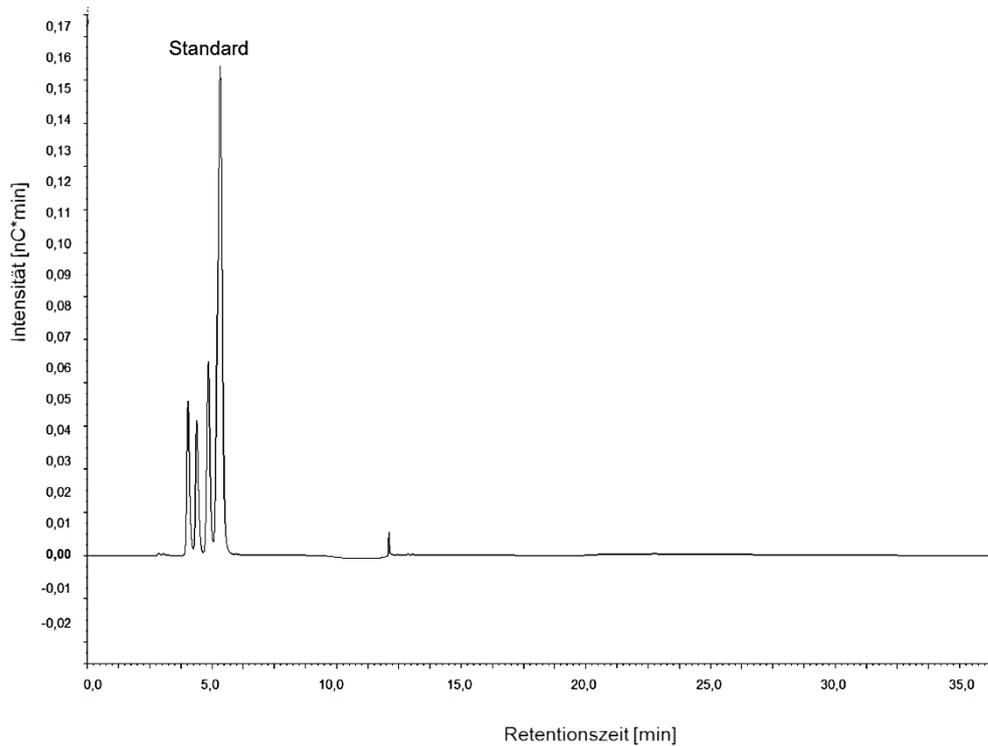


Abbildung 2-11 Chromatogramm der Zuckerstandardsubstanzen für die HPAEC-PAD Analyse (Mischstandard enthält: L-Fucose, L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Galactose, D-Glucose und D-Mannose) analysiert mittels HPAEC-PAD (Säule: Carbopac PA 100 (4x250 mm) mit Vorsäule (4x50 mm)) und NaOH-Gradienten

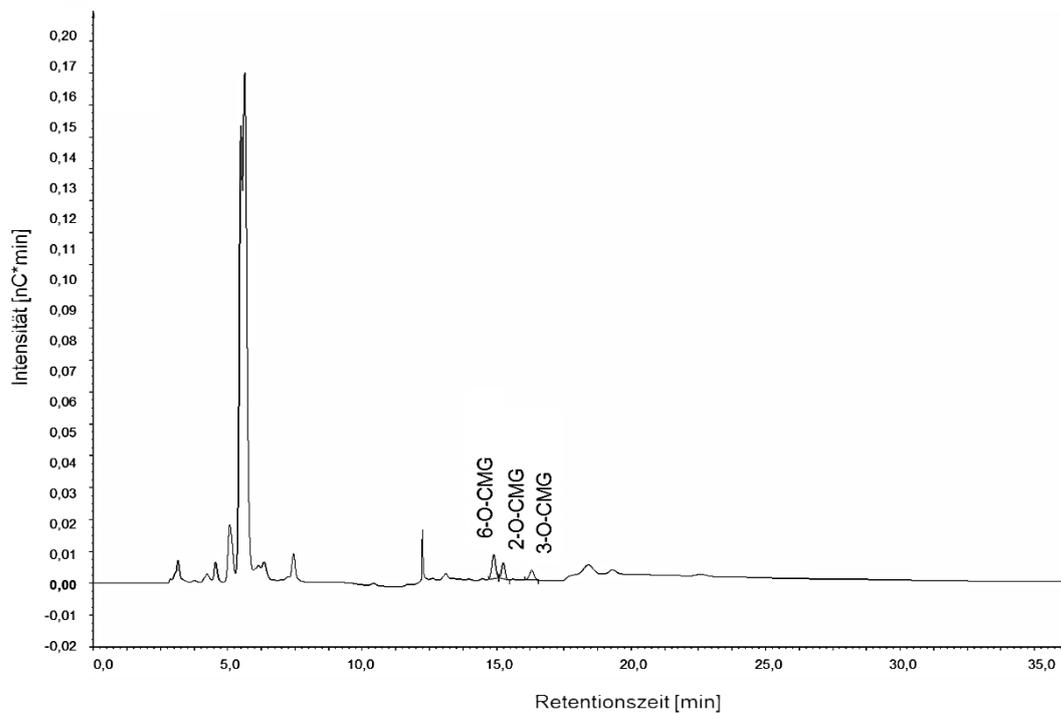


Abbildung 2-12 Chromatogramm eines CMC-haltigen Kolloids analysiert mittels HPAEC-PAD (Säule: Carbopac PA 100 (4x250 mm) mit Vorsäule (4x50 mm)) und NaOH-Gradienten

Abbildung 2-12 zeigt ein typisches Chromatogramm, das die Selektivität der Methode gegenüber CMC-Monomeren belegt. Diese Probe bestand aus gleichen Teilen CMC und Weißweinkolloid, welches aus einem deutschen Wein ohne Zusatzstoff isoliert wurde.

Für die Analyse wurden jeweils 50 mg CMC oder CMC und Weinkolloid eingewogen und sauer hydrolysiert ( $c = 1 \text{ g/L}$ ). Die Zuckerstandards wurden eingewogen und analysiert ( $c = 0,2 \text{ g/L}$ ). Es fällt auf, dass die neutralen Zucker (L-Fucose, L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Galactose, D-Mannose, D-Glucose) unterhalb von 10 Minuten eluierten und sich von dem typischen Peakmuster der drei Carboxymethylglucosen separieren ließen. Somit stellt das charakteristische Peakmuster zwischen 12 und 17 Minuten eine Unterscheidungsmöglichkeit bzw. einen qualitativen Hinweis auf CMC-Zusatz dar. Aufgrund der Gradientenelution kann es zu geringen Verschiebungen der Peaks innerhalb des Chromatogramms kommen, jedoch sind die Analyten so klar voneinander separiert, dass das Unterscheidungsmerkmal gegeben ist. Diese Versuche belegen die Selektivität der HPLC-Methode, um CMC in Weißwein qualitativ nachweisen zu können. Die saure Hydrolyse ermöglicht einen hinreichenden Abbau der CMC in Weißweinkolloiden, so dass diese im Folgenden chromatographisch von monomeren Zuckerbausteinen der Weinkolloide getrennt werden können. Zusätzlich wurde ein Versuch durchgeführt, der beweisen sollte, dass sich die Peaks des charakteristischen Peakmusters der CMC-Monomere linear verhalten und eine quantitative Methode unter Verwendung geeigneter Standardsubstanzen möglich ist. Abbildung 2-13 demonstriert den linearen Zusammenhang der drei monosubstituierten Carboxymethylglucosen in Abhängigkeit ihrer Konzentration in der Probenlösung der Hydrolyse von CMC 6. Hierzu wurde das Hydrolysat ( $c = 1 \text{ g/L}$ ) eines festen CMC-Pulvers zwischen 50 und 500 mg/L verdünnt und analysiert. Aufgetragen wurden die gemessenen Peakflächen der einfach-substituierten Carboxymethylglucosen in Verbindung mit der jeweiligen Konzentration.

Die Summe der einzelnen Peakflächen und die dazugehörige Kalibriergleichung ist in Abbildung 2-14 dargestellt.

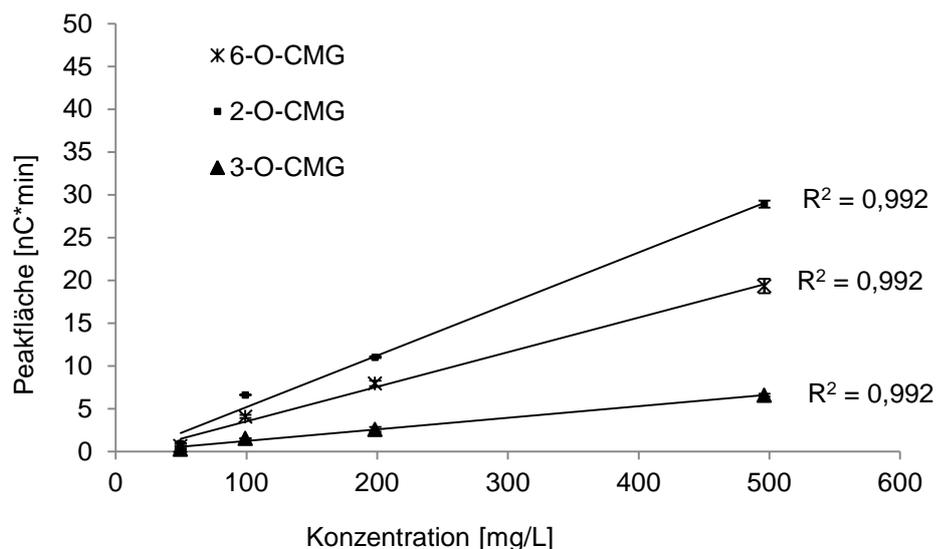


Abbildung 2-13 Linearer Zusammenhang der **einzelnen Peakflächen ± Standardabweichung** zu Konzentration der monosubstituierten CMC- Bausteine (CMC Probe 6) und der 6-O-CMG (6-O-Carboxymethylglucose), 2-O-CMG (2-O-Carboxymethylglucose) und 3-O-CMG (3-O-Carboxymethylglucose) (n = 2)

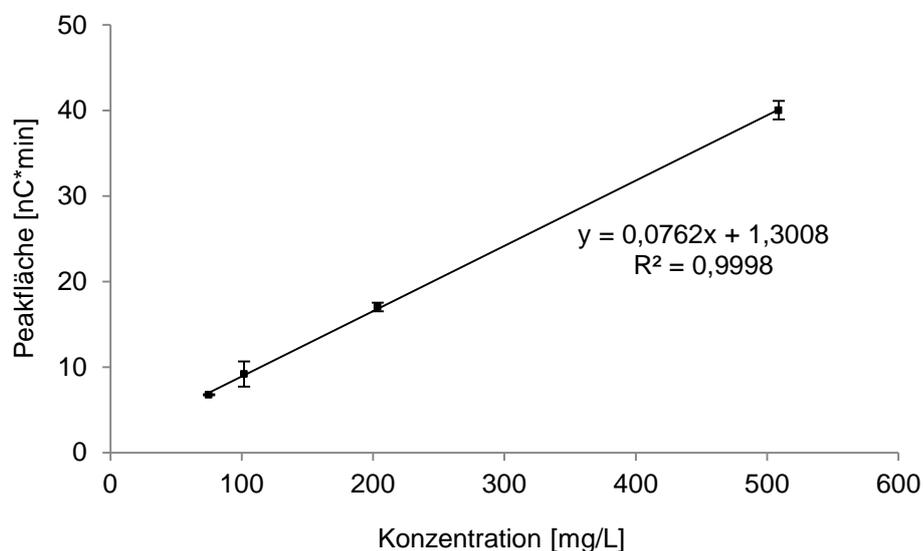


Abbildung 2-14 Linearer Zusammenhang der **Summe ± Standardabweichung** der Peakflächen zu Konzentration der monosubstituierten CMC Bausteine (CMC Probe 6) 6-O-CMG (6-O-Carboxymethylglucose), 2-O-CMG (2-O-Carboxymethylglucose) und 3-O-CMG (3-O-Carboxymethylglucose) (n = 2)

## 2.4 Charakterisierung von oenologischen Zusatzstoffen

Aufgrund des Polymercharakters war es von großem Interesse, alle drei Zusatzstoffe hinsichtlich der Molekulargewichtsverteilung (SEC-UV-RI), des absoluten Molekulargewichtes (SEC-UV/RI-MALS) und der zugehörigen Brechungsindexinkremente ( $dn/dc$ -Werte) zu charakterisieren.

### 2.4.1 Bestimmung des Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ )

Das Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ ) beschreibt die Änderung des Lichtes als Brechungsindex zwischen zwei Medien (Luft/Probenlösung). Der  $dn/dc$ -Wert ist für jede Probe und für jedes Lösungsmittel unterschiedlich und geht in die Berechnung des absoluten Molekulargewichtes über die Lichtstreuung ein. Die  $dn/dc$ -Werte für CMC und GA sind bereits hinreichend publiziert (Picton *et al.* 1996) und (Huglin 1989). Für Metaweinsäure existierten keine Daten zum Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ ) in 0,1 M Natriumchlorid-Lösung.

Abbildung 2-15 stellt ein typisches Chromatogramm der Bestimmung des  $dn/dc$ -Wertes für Metaweinsäure im Batch-Modus (Direktinjektion in den Detektor) am 3-Winkel-Lichtstredetektor (MALS-Detektor) dar. Bei der Bestimmung wurde der Messbereich (0 – 90 mV bei 100 mV Analogausgang) des RI-Detektors mit den Konzentrationen 0,1 – 1 mg/mL MWS in 0,1 M NaCl Lösung voll ausgenutzt. Die Abbildung zeigt die Injektion der sechs Konzentrationen als Signal des Differentialrefraktometers (RI). Die Injektion einer Konzentration bewirkt das Ansteigen des konzentrationsabhängigen RI-Signals und es bildet sich ein Plateau. Zwischen den einzelnen Konzentrationen wurde Reinstwasser oder 0,1 M NaCl-Lösung injiziert, wonach sich das Messsignal wieder erniedrigt. Die mathematische Beziehung zur Ermittlung des Brechungsindexinkrements lässt sich wie folgt darstellen:

$$S^{RI} = k^{RI}c(dn/dc) \quad (8)$$

$S^{RI}$  (Signal des RI-Detektors)

$k^{RI}$  ( $RI_{\text{konstante}}=1,7297 \cdot 10^{-3}$  bei 950 nm)

$c$  (Konzentration)

$dn/dc$  (Brechungsindexinkrement)

Gleichung (8) wird zur Berechnung nach  $dn/dc$  aufgelöst. Wenn die Messergebnisse graphisch aufgetragen werden, sollten die Ergebnisse einen linearen

Zusammenhang zeigen, deren Proportionalitätskonstante das Brechungsindexinkrement der Lösung darstellt (Coto *et al.* 2007).

Die anschließende Berechnung des  $dn/dc$ -Wertes des Lösungsmittels erfolgte über die Software des MALS-Detektors. Dieser Versuch wurde für alle sieben zur Verfügung stehenden MWS-Produkte durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3).

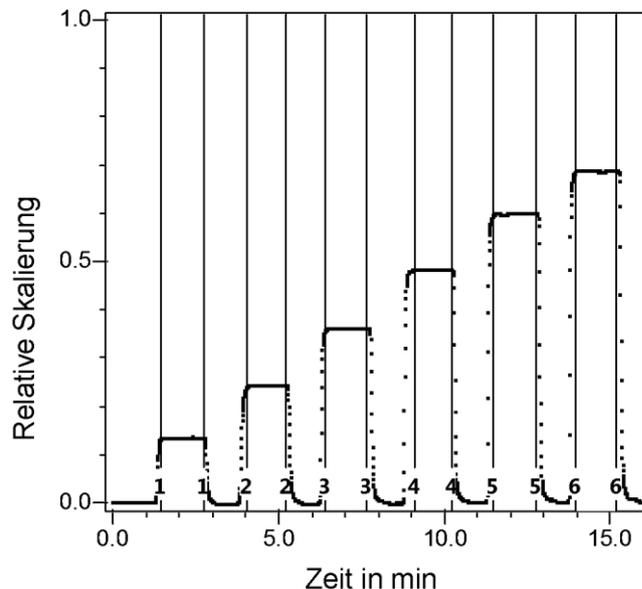


Abbildung 2-15 RI Signal der  $dn/dc$  Bestimmung von Metaweinsäure

Tabelle 2-8 gibt einen Gesamtüberblick der bestimmten  $dn/dc$ -Werte der sieben analysierten MWS-Handelsprodukte. Die Ergebnisse lagen in einem engen Bereich von 0,1122 bis 0,1186 mL/g. Die wiederholten Bestimmungen der  $dn/dc$ -Werte, verschiedener Konzentrationen von Metaweinsäure in 0,1 M Natriumchlorid-Lösung, ergaben einen mittleren  $dn/dc$ -Wert von  $0,1157 \pm 0,0022$  mL/g. Die linearen Auftragungen der Messergebnisse der analysierten MWS-Produkte zeigten insgesamt einen Korrelationskoeffizienten von 0,99. Demzufolge sind die Messergebnisse als sicher zu betrachten. Wenn die Einzelbestimmungen der  $dn/dc$ -Werte unbekannter polymerer Substanzen nicht mehr als 10 % voneinander abweichen, kann ein sogenannter Misch- $dn/dc$ -Wert gebildet werden, der für weitere Analysen verwendet wird. Ist dies nicht der Fall, muss der  $dn/dc$ -Wert für jede Probe neu bestimmt werden. Dies tritt auf, wenn sich beispielsweise polymere Stoffe in unterschiedlichen Mengen aus Polysacchariden, Proteinen sowie Glycoproteinen zusammensetzen. Da MWS ein reines Produkt ist, das keine anderen polymeren Bestandteile als polymerisierte Weinsäure enthält, kann der Mittelwert der  $dn/dc$ -

Werte für die Berechnungen der absoluten Molekulargewichte von MWS herangezogen werden.

Tabelle 2-8 dn/dc-Werte von verschiedenen Metaweinsäureprodukten bestimmt in 0,1 M NaCl Lösung

<b>Produkt</b>	<b>dn/dc-Wert [mL/g]</b>	<b>Korrelations- koeffizient</b>
A	0,1140	0,9996
B	0,1161	0,9995
C	0,1154	0,9968
D	0,1152	0,9900
E	0,1181	0,9996
F	0,1122	0,9994
G	0,1186	0,9992

Tabelle 2-9 gibt einen Überblick über die publizierten dn/dc-Werte von CMC und GA, jeweils in wässriger bzw. in 0,1 M NaCl-Lösung sowie für die experimentell ermittelten Werte für CMC, GA und MWS. Zur Auswertung der Molekulargewichte über MALS wurden für alle untersuchten Zusatzstoffe von CMC und GA die Literaturwerte herangezogen, für MWS wurde der experimentell ermittelte Wert von sieben MWS-Produkten verwendet (siehe Tabelle 2-9). Zusätzlich und zur Absicherung der Ergebnisse wurde eine Referenzmessung von Metaweinsäure aus acht Verdünnungen eines Produktes von der Firma Wyatt (Dernbach, Deutschland) durchgeführt. Die Referenzmessung ergab einen dn/dc-Wert für MWS von 0,1138 mL/g und bestätigte den in dieser Arbeit ermittelten Wert von 0,1157 mL/g. Der Unterschied zwischen experimentell ermitteltem dn/dc-Wert und den Angaben aus der Literatur liegt für CMC bei 6,5 % und bei GA bei 3,4 %. Bei MWS beträgt der Unterschied zwischen beiden ermittelten Werten lediglich 1,6 %.

Tabelle 2-9 dn/dc-Werte von CMC, GA und MWS (Literaturangaben) im Vergleich zu den experimentell ermittelten Werten  $\pm$  Standardabweichung (n = 2)

Stoff	dn/dc Wert [mL/g]	dn/dc exp. (NaCl <sub>aq.</sub> ) [mL/g]
CMC	0,1470 (NaCl <sub>aq.</sub> )**	0,1374 $\pm$ 0,0050
GA	0,1450 (H <sub>2</sub> O)	0,1400 $\pm$ 0,0018
MWS	0,1138 (H <sub>2</sub> O)	0,1157 $\pm$ 0,0022

\*Referenzmessung von Fa. Wyatt (Dernbach)  
\*\* Literaturwerte

### 2.4.2 Bestimmung von relativem und absoluten Molekulargewicht

Für die Bestimmung des relativen mittleren Molekulargewichtes über Größenausschlusschromatografie (SEC) ist eine Kalibrierung des RI- bzw. des UV-Detektors mit Standards bekannter Molekularmasse erforderlich. Nachfolgendes Chromatogramm (Abbildung 2-16) zeigt exemplarisch die Kalibrierung der Superose 12-Säule mittels Dextranstandards bekannter Größe und die dazugehörigen Retentionszeiten. Die Kalibrierung mit Dextranstandards wird insbesondere bei der Analytik von polymeren Substanzen genutzt, die nicht UV-aktiv sind und somit mittels Brechungsindexdetektor (RI) analysiert werden können. Die Säule des Typs Superose 12 weist ein Ausschlussvolumen von 280 kDa auf und Dextran T2000 mit 2000 kDa sowie Dextran T500 mit 500 kDa eluieren im Ausschlussvolumenpeak und zeigen somit die obere Grenze der Säule auf. Stachyose mit 738 Da beschreibt den Salzpeak, mit einer unteren Säulenbegrenzung von 1 kDa. Der kalibrierte Trennbereich dieser Säule liegt somit zwischen 70.000 Dalton und 10.000 Dalton. Anhand des Vergleiches der Retentionszeiten von Standards und Probe ist eine Einschätzung der Molekulargewichtsverteilung für Stoffe unbekannter Molekularmasse möglich.

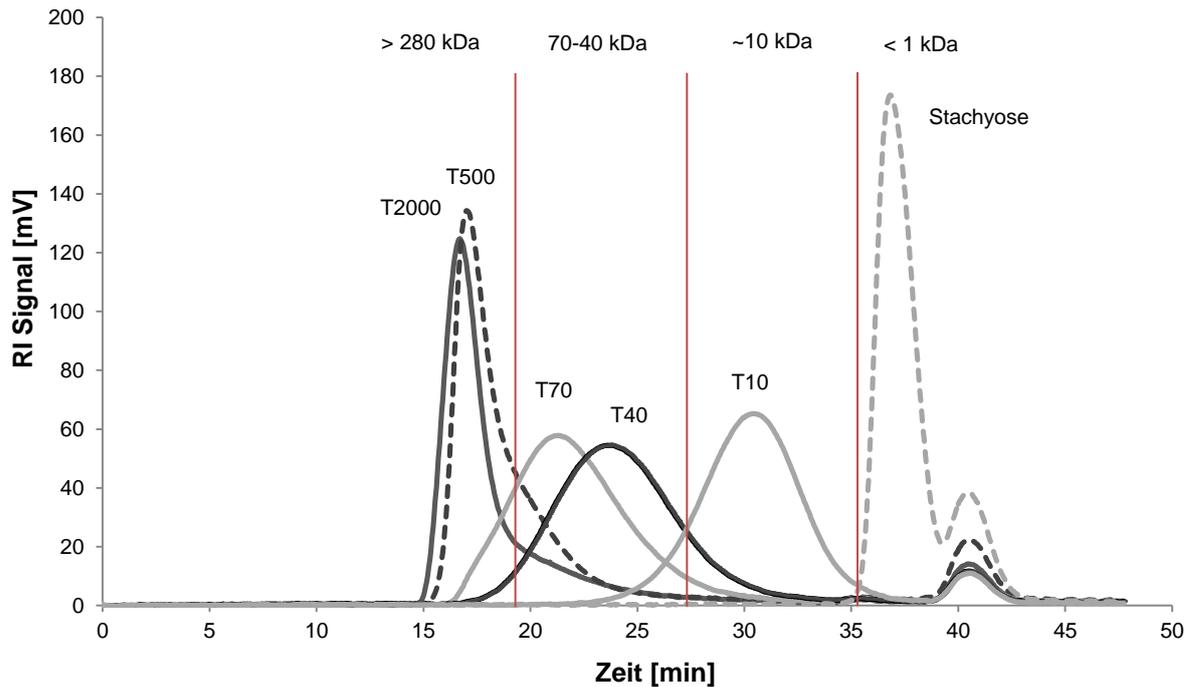


Abbildung 2-16 Elutionsprofil der Kalibrierung der Säule Superose 12 (10/300 GL) mit Einteilung nach Retentionszeit der eluierenden Dextranstandards (Dextran T2000 mit 2.000 kDa, Dextran T500 mit 500 kDa, Dextran T70 mit 70 kDa, Dextran T40 mit 40 kDa, Dextran T10 mit 10 kDa und Stachyose mit 738 Da) nach Retentionszeit von > 280 kDa bis < 1kDa für die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung (SEC-RI-MALS)

Neben der Kalibrierung mit Dextranstandards kann ebenfalls eine Kalibrierung über den UV-Detektor erfolgen, um proteinhaltige Teile eines Stoffes zu charakterisieren. Ebenso können andere Säulen zum Einsatz kommen, die eine breitere Verteilung der Molekulargewichte zulassen oder eingesetzt werden, um besonders große Stoffe zu analysieren. Für diese Arbeit wurde zusätzlich die Superose 6-Säule (10/300 GL) mit einem Ausschlussvolumen von 500.000 Dalton verwendet. Für die Charakterisierung von CMC-Produkten wurde diese SEC-Säule mit den beschriebenen Dextranstandards kalibriert. Zusätzlich wurde die Superose 12-Säule (10/300 GL) mit UV-aktiven Proteinstandards bekannter Größe kalibriert. Letzteres diente der Charakterisierung proteinhaltiger Anteile in Gummi Arabikum-Proben. Abbildung 2-17 und Abbildung 2-18 zeigen diese Kalibrierungen.

Bei den Kalibrierungen der Superose 12-Säule (10/300 GL) und der Superose 6-Säule (10/300 GL) fällt auf, dass sich der Bereich zwischen 70 – 40 kDa nicht ausreichend trennen ließ. Bei der Auswertung zur Lichtstreuung (MALS) wurde dieser Bereich deshalb nicht getrennt voneinander betrachtet. Unterhalb von < 1000 Da, im Ausschlussvolumen der Säule mit  $t = > 35$  min, ist die Beurteilung von

Ergebnissen fehlerbehaftet. Dies gilt es im Speziellen bei der Auswertung des Lichtstreuungssignals (MALS-Detektor) in diesem Bereich zu beachten.

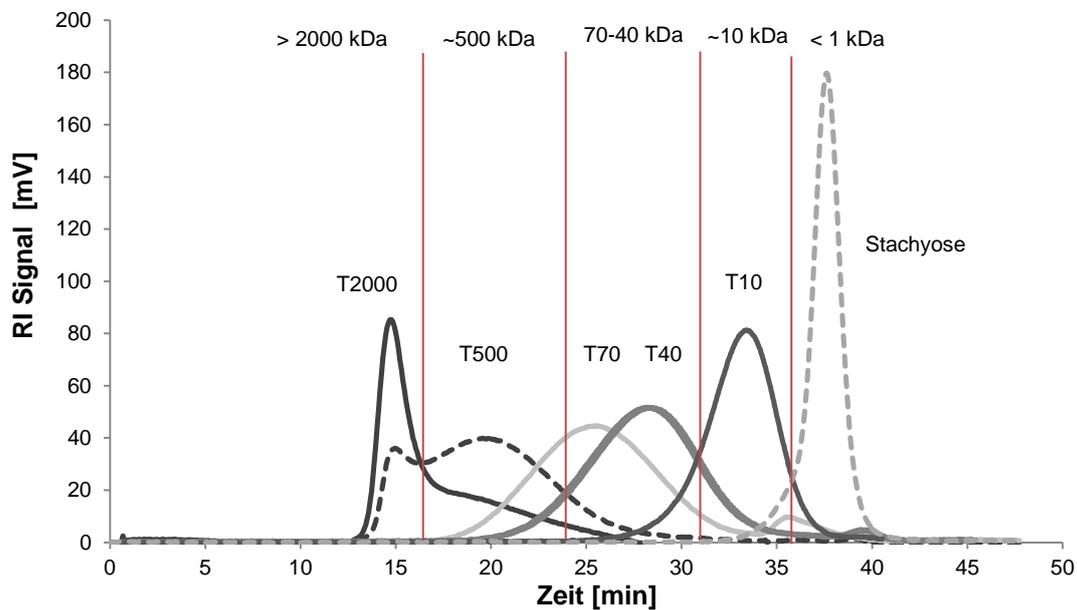


Abbildung 2-17 Elutionsprofil der Kalibrierung der Säule Superose 6 (10/300 GL) mit Einteilung nach Retentionszeit der eluierenden Dextranstandards (Dextran T2000 mit 2.000 kDa, Dextran T500 mit 500 kDa, Dextran T70 mit 70 kDa, Dextran T40 mit 40 kDa, Dextran T10 mit 10 kDa und Stachyose mit 738 Da) nach Retentionszeit von > 280 kDa bis < 1kDa für die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung (SEC-RI-MALS)

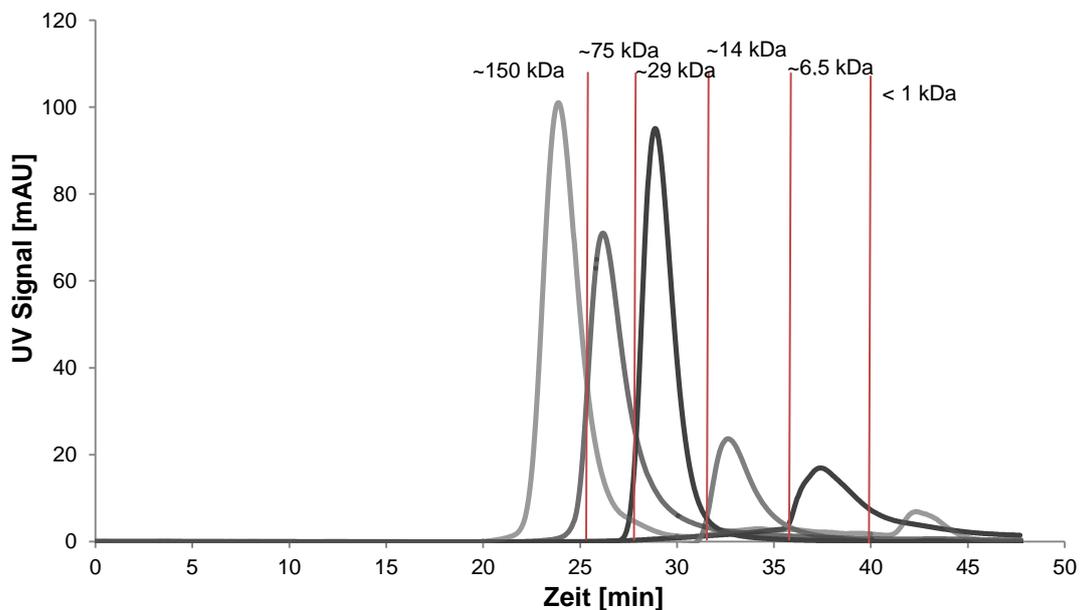


Abbildung 2-18 Elutionsprofil der Kalibrierung der Säule Superose 12 (10/300 GL) mit Einteilung nach Retentionszeit der eluierenden Proteinstandards (Alc. Dehydrogenase mit 150 kDa, Coalbumin mit 75 kDa, Carbonic Anhydrase mit 29 kDa, Ribonuclease A mit 14 kDa, BSA mit 6,5 kDa und Aprotinin mit 1 kDa) für die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung (SEC-UV-MALS)

Abbildung 2-18 zeigt die Kalibrierung der Superose 12 (10/300 GL) mit Proteinstandards bekannter Größe. Mit den Proteinstandards konnte eine hinreichende Trennung der Größenbereiche erzielt werden.

### **2.4.3 MWS - relatives und absolutes Molekulargewicht (SEC-RI-MALS)**

Metaweinsäureprodukte werden mit Angaben des Veresterungsgrades von 40 – 42 % verkauft (vgl. Abschnitt 1.2.4). Diese Angabe lässt allerdings keinen Schluss über die Größe der Moleküle zu. MWS-Produkte gelten als „dispergierte Polymere“, die eine Vielzahl von unterschiedlich großen und unterschiedlich stark veresterten MWS-Molekülen enthalten. Mit der Analytik der Molekulargewichtsverteilungen sollte geklärt werden, zu welchen Ergebnissen die eingangs beschriebene säurekatalytische Veresterung führt. Metaweinsäure ist nicht UV-aktiv und deshalb erfolgte die Auswertung der Analytik der Molekulargewichtsverteilungen über Dextranstandardsubstanzen bekannter Größe (vgl. Kalibrierung Abbildung 2-17).

Abbildung 2-19 zeigt exemplarisch die Analyse der Molekulargewichtsverteilung von Metaweinsäurepräparaten über Größenausschlusschromatografie (SEC) mit RI-Detektion (vgl. hierzu auch Abb. C MWS A-G im Anhang).

Anhand von Abbildung 2-19 ist ersichtlich, dass MWS eine breite Verteilung mit zwei Peakmaxima zwischen 10 kDa und unter 1 kDa zeigte. Eine genauere Aussage über die Größe des Moleküls konnte so jedoch nicht getätigt werden, da der niedrige nominale Trennbereich (280 kDa – 1 kDa) der Säule größtenteils unterschritten wurde.

Abschließend lässt diese Analyse den Schluss zu, dass Metaweinsäure nicht hochmolekular ist und der nominal größte Anteil sich um die 10 kDa bewegt. Die Auswertung der zur Verfügung stehenden Metaweinsäureprodukte hinsichtlich der Molekulargewichtsverteilung jedes Produktes ergab keine weiteren Erkenntnisse, als die grobe Einschätzung, dass die Produkte im Mittel 10 kDa groß sind. Die Analyse des absoluten Molekulargewichtes mit einem MALS-Detektor (**multi-angle light scattering**) sollte schlüssigere Ergebnisse bringen.

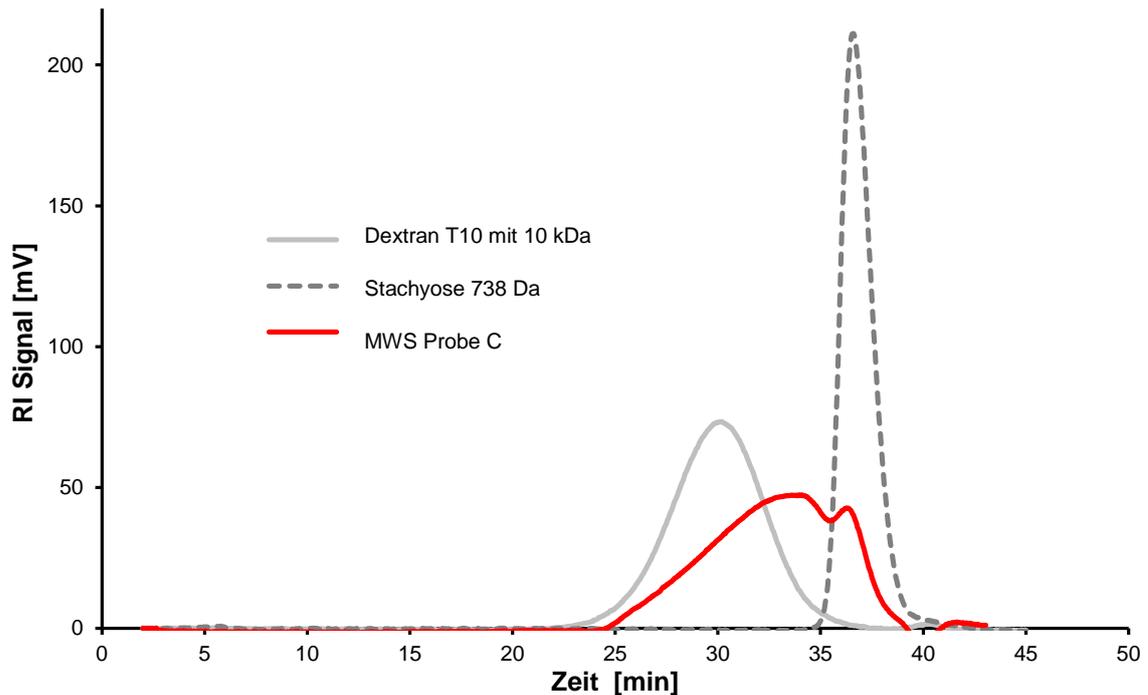


Abbildung 2-19 SEC-RI-Chromatogramm (Superose 12 10/300 GL) von Metaweinsäure (Probe C) in Vergleich mit Dextran T10 (10 kDa) und Stachyose (738 Da)

Für die Bestimmung des absoluten Molekulargewichtes mittels statischer Lichtstreuung (MALS) sind Parameter wie der Brechungsindex des Lösungsmittels von wässriger Natriumchlorid-Lösung ( $n = 1,331$ ), die Kalibrierkonstante des Lichtstredetektors ( $K = 4,9644 \times 10^{-5} \text{ 1/(V cm)}$ ), welche experimentell bestimmt werden kann sowie die genaue Konzentration ( $c$ ) und das Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ ) der Probe erforderlich. Für die Auswertung des absoluten Molekulargewichtes über Lichtstreuung ist eine externe Kalibrierung nicht nötig, diese dient lediglich der Einschätzung der Molekulargewichtsverteilung (relatives Molekulargewicht).

Der Mittelwert der  $dn/dc$ -Bestimmungen der zur Verfügung stehenden MWS-Produkte wurde für alle weiteren Molekulargewichtsanalysen verwendet ( $dn/dc = 0,1157 \text{ mL/g}$ ). Die SEC-Analyse, kombiniert mit MALS-Detektion, bietet verschiedene Ergebnisparameter, von denen besonders das mittlere absolute Molekulargewicht der gesamten Messung ( $M_W$ ) von Interesse ist. Des Weiteren werden  $M_N$  und  $M_Z$  ermittelt, die die Anteile kleiner ( $M_N$ ) und die Anteile großer ( $M_Z$ ) Molekulargewichte aufzeigen. Ebenfalls wird die Polydispersität jeder Probe aus den großen ( $M_Z$ ) und den kleinen Anteilen ( $M_N$ ) an Molekulargewichten berechnet. Ein

Wert ( $M_z/M_N$ ) von 1 – 2 wird als geringe Polydispersität angesehen. Stoffe mit Werten darüber gelten als mittel polydispers und mit Werten ab 4 gelten Stoffe als hoch polydispers (Wyatt Technology Europe 2012). In der Herstellung polymerer Substanzen wird eine geringe Polydispersität angestrebt, da diese für eine gleichmäßige Polymerisierung und ein gleichmäßig großes Endprodukt spricht.

Tabelle 2-10 demonstriert die ermittelten Parameter der absoluten Molekulargewichte der untersuchten MWS-Präparate. Die mittleren absoluten Molekulargewichte ( $M_w$ ) streuen in einem Bereich von 2 – 9 kDa, wobei die Produkte C, E und F auch die nominal größten absoluten Molekulargewichtsanteile ( $M_z$ ) aufweisen. Die Polydispersität ( $M_z/M_N$ ) aller Proben war sehr hoch, was bedeutet, dass MWS-Produkte sehr heterogene Produkte sind. Die Veresterung der monomeren Weinsäure bei der Herstellung führt zu unterschiedlich großen Endprodukten mit unterschiedlichen Qualitäten. Dies lässt den Schluss zu, dass die zeit- und temperaturabhängige Hydrolyse zu monomerer Weinsäure, bei Produkten geringerer Qualität, schneller voran schreiten kann.

Tabelle 2-10 Absolute Molekulargewichte von MWS-Proben aufgezeigt als Mittelwert der SEC-Analyse kombiniert mit MALS-Detektion (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus Doppelbestimmungen)

Produkt	$M_N$ [g/mol]	$M_w$ [g/mol]	$M_z$ [g/mol]	$M_z/M_N$
A	451 $\pm$ 20	3124 $\pm$ 754	8532 $\pm$ 2938	19
B	466 $\pm$ 355	2378 $\pm$ 245	6277 $\pm$ 352	34
C	588 $\pm$ 42	5854 $\pm$ 98	22025 $\pm$ 935	37
D	430 $\pm$ 232	2838 $\pm$ 134	9097 $\pm$ 266	30
E	851 $\pm$ 137	8873 $\pm$ 251	40883 $\pm$ 3123	50
F	746 $\pm$ 258	4446 $\pm$ 601	14610 $\pm$ 1870	21
G	445 $\pm$ 90	2233 $\pm$ 174	5889 $\pm$ 301	14

#### **2.4.4 CMC - relatives und absolutes Molekulargewicht (SEC-RI-MALS)**

Natrium-Carboxymethylcellulose ist ein homogenes Polymer, das bei der Analyse mittels SEC-RI eine Peakmaxima zwischen 15 und 20 min zeigte, welches im Bereich von 2000 kDa bis 500 kDa lag (Abbildung 2-20).

Aufgrund der gelbildenden Eigenschaften gestaltete sich die Analyse der CMC-Produkte über die Superose 12 (10/300 GL) und über die Superose 6 (10/300 GL) sehr schwierig. Bei einer Einwaage von 2 mg/mL Zusatzstoff in 0,1 M NaCl-Lösung, die die benötigte Konzentration für das Lichtstreusignal sicherstellte, kam es zu unerwarteten Wechselwirkungen mit der Säule (vgl. Abbildung F im Anhang CMC 3,5,6-9).

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Analytik von CMC-Produkten sind in Tabelle 2-11 die absoluten Zahlenwerte der Lichtstreuendetektion (MALS) der festen CMC-Produkte dargestellt. Hier ergaben sich Fehler von ca. 5 %. Diese Versuchsergebnisse können dennoch als sicher betrachtet werden. Von der OIV werden Molekulargewichte im Bereich von 17.000 – 300.000 Dalton angegeben (vgl. Abschnitt 1.2.2). Bereits aus der Analyse des relativen Molekulargewichtes der Produkte ging hervor, dass fast alle CMC-Produkte einen Anteil enthalten, der größer ist als 500.000 Dalton. Die Analyse des absoluten Molekulargewichtes erbrachte sehr heterogene Ergebnisse. Das mittlere Molekulargewicht schwankte zwischen 101.000 Dalton und 650.000 Dalton. Die Polydispersität zeigte Werte zwischen 2 und 4, was auf eine mittlere Polydispersität der Produkte schließen lässt.

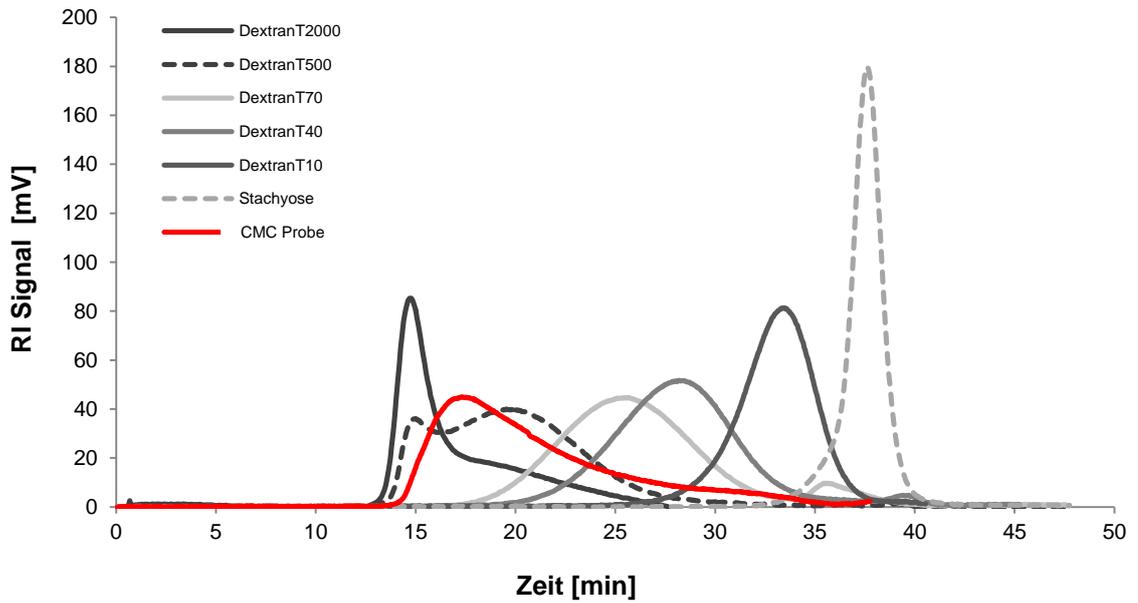


Abbildung 2-20 SEC-RI-Chromatogramm (Superose 6, 10/300 GL) von Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC Probe 6) in Vergleich mit Dextranstandards

Tabelle 2-11 Absolute Molekulargewichte von CMC-Proben aufgezeigt als Mittelwert der SEC-Analyse kombiniert mit MALS-Detektion (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus Doppelbestimmungen)

Produkt	$M_N$ [g/mol]	$M_W$ [g/mol]	$M_Z$ [g/mol]	$M_Z/M_N$
5	151.300 $\pm$ 1192	196.100 $\pm$ 4110	382.200 $\pm$ 36.691	2
6	83.450 $\pm$ 796	100.800 $\pm$ 887	135.000 $\pm$ 3064	2
7	92.520 $\pm$ 946	125.500 $\pm$ 1326	176.400 $\pm$ 4762	2
8	181.300 $\pm$ 7252	529.600 $\pm$ 5317	737.100 $\pm$ 17.469	4
9	452.400 $\pm$ 10.405	645.800 $\pm$ 25.832	1.679.000 $\pm$ 50.370	4

#### **2.4.5 GA - relatives und absolutes Molekulargewicht (SEC-RI/UV-MALS)**

Das SEC-Elutionsprofil der verwendeten GA-Produkte (siehe Abbildung 2-21) unterschied sich je nach verwendetem Detektor. Der RI-Detektor reagiert sensitiv auf Konzentrationsunterschiede und detektiert sowohl den Polysaccharidanteil als auch den Proteinanteil des Polymers. Der UV-Detektor reagiert ebenfalls sensitiv auf Konzentrationsunterschiede, jedoch lediglich auf die des Proteinanteils bei 280 nm. Die Analytik erfolgte in einem SEC-Lauf unter Verwendung des UV- und RI-Detektors und zusätzlich wurde das Lichtstreusignal (MALS) detektiert. Die Auswertung erfolgte separat, indem bei der Lichtstreuung entweder als Konzentrationsdetektor der RI- oder der UV-Detektor gewählt wurde. Der Lichtstreudetektor ist sensitiv gegenüber Konzentration und Molekülmassen. Durch Vergleich der Kalibrierungen werden Molekulargewichtsbereiche beschrieben und keine absoluten Zahlenwerte, wie bei der Lichtstreuung, ermittelt. Bei allen drei Auswertungen wurde das Elutionsprofil der externen Kalibrierung berücksichtigt.

Je nach Herkunft waren die Molekulargewichtsgrößen verschiedener GA-Produkte sehr heterogen. Die SEC-Analysen zeigten, dass GA aus drei Molekulargewichtsfractionen besteht (vgl. Abbildung 2-21), welche einen unterschiedlichen Proteinanteil hatten. Alle RI-Elutionsprofile der GA-Proben waren geprägt von zwei Hauptpeaks (vgl. Abbildung 2-21 sowie Abb. D (GA 1-4) und (AA 1-8) im Anhang). Der erste Peak (< 20 min) lag über dem oberen nominalen Trennbereich der Säule (> 280 kDa) und weist den größten Proteinanteil auf. Diese Fraktion kann als AGP identifiziert werden. Der zweite Peak grenzte sich nicht klar vom Ausschlussvolumenpeak ab; somit ist anzunehmen, dass der Hauptteil der GA-Moleküle größer als 280 kDa war. Ab 35 Minuten ist das Totalvolumen der Säule erreicht, es eluierten Substanzen < 1 kDa. In der Literatur wird der Hauptteil des GA-Moleküls bestehend aus ca. 90 % als Arabinogalactan (AG) beschrieben, das unter 1 % Protein enthält. Als zweite Komponente ist das Arabinogalactanprotein (AGP) zu nennen, das die restlichen 10 % des GA-Moleküls darstellt und im Wesentlichen aus Protein besteht. Die Molekulargewichte des AG liegen im Bereich  $2,5 \times 10^5$  Dalton und die des AGP bei  $1 - 2 \times 10^6$  Dalton (Mahendran *et al.* 2008), (Vandeveldde u. Fenyo 1985).

Der Proteinanteil (UV-Signal) war sehr gering und die Intensitäten der analysierten Proben lagen unter 15 mAU bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Ursache scheint

ein geringer Gesamtproteinanteil im GA zu sein, der laut Literatur nur zwischen 1,5 und 2,6 % liegt (Mahendran *et al.* 2008).

Der Hauptanteil des Proteins eluierte bei 15 Minuten und ein wesentlich kleinerer Teil ab 18 Minuten. Die Intensitäten waren aber deutlich geringer, als die der RI-Detektion, weshalb eine Auswertung der absoluten Molekulargewichte über das UV-Signal kombiniert mit Lichtstreuung, da dieses stark konzentrationsabhängig ist, nicht möglich war (vgl. Abb. E (GA1-4) und (AA1-8) im Anhang). Nach der Kalibrierung mittels Proteinstandards (Abbildung 2-18 im Abschnitt 2.4.2) war lediglich die Aussage möglich, dass der Proteinanteil der analysierten GA-Proben größer war als 150 kDa.

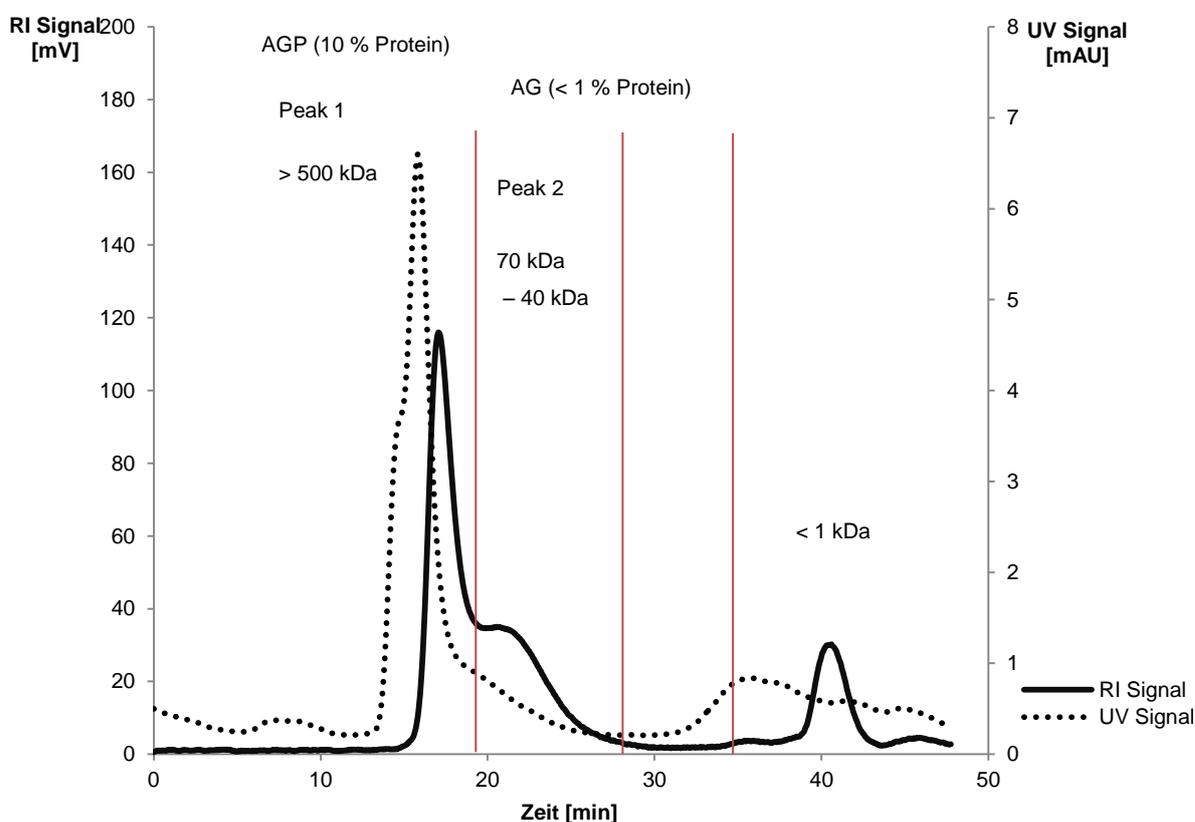


Abbildung 2-21 SEC-UV-RI-Elutionsprofil der Probe AA1

Die zusätzliche Auswertung des mitgeführten Lichtstreuungssignals erbrachte konkretere Ergebnisse.

Tabelle 2-12 stellt die mittleren Molekulargewichte ( $M_w$ ) jedes analysierten Peaks, der gesamten Probe und die Polydispersität der analysierten GA-Zusatzstoffe (GA1-

GA4) sowie der authentischen Zusatzstoffe (AA1-AA8) dar. Auf eine Auswertung der Teile  $M_z$  und  $M_N$  konnte aufgrund der geringen Polydispersität (1 – 2) verzichtet werden. Der erste Peak aller Proben (800 kDa – 1700 kDa) lag außerhalb der nominalen Trenngrenze der Säule, der zweite Peak (166 kDa – 500 kDa) lag ebenfalls an der oberen Grenze. Die Verteilungen der mittleren Molekulargewichte ( $M_w$ ) zeigten sehr unterschiedliche Werte, entsprachen in ihrer Größenordnung jedoch den postulierten Werten aus der Literatur des AG von  $2,5 \times 10^5$  Dalton und die des AGP bei  $1 - 2 \times 10^6$  Dalton (Mahendran *et al.* 2008).

Tabelle 2-12 Ergebnisse der SEC-RI-MALS-Analytik von GA1-GA4 und AA1-AA8 (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung einer Doppelbestimmung) (Peak 1 und Peak 2 nach Einteilung wie in Abbildung 2-21 gezeigt) sowie der gesamten Elution

Probe	Peak 1 [g/mol] > 280 kDa	Peak 2 [g/mol] 70 – 40 kDa	gesamt* [g/mol] > 280 – 10 kDa	$M_z/M_N$
<b>GA 1</b>				
Mw	818.000 $\pm$ 14.969	240.000 $\pm$ 3.528	516.500 $\pm$ 2.596	1,48
<b>GA 2</b>				
Mw	1.101.000 $\pm$ 25.103	338.700 $\pm$ 9.856	809.000 $\pm$ 19.076	1,34
<b>GA 3</b>				
Mw	883.500 $\pm$ 8.234	508.000 $\pm$ 22.453	715.700 $\pm$ 15.731	1.98
<b>GA 4</b>				
Mw	641.500 $\pm$ 13.843	166.900 $\pm$ 4.556	324.100 $\pm$ 7.460	1,17
<b>AA 1</b>				
Mw	1.737.000 $\pm$ 42.382	295.200 $\pm$ 10.833	934.200 $\pm$ 24.494	1,21
<b>AA 2</b>				
Mw	966.000 $\pm$ 19.493	269.800 $\pm$ 7.014	665.100 $\pm$ 13.967	1,17
<b>AA 3</b>				
Mw	1.393.000 $\pm$ 32.596	324.700 $\pm$ 9.611	1.085.000 $\pm$ 26.040	1,44
<b>AA 4</b>				
Mw	1.034.000 $\pm$ 21.610	233.000 $\pm$ 6.570	518.400 $\pm$ 11.669	1.40
<b>AA 5</b>				
Mw	1.001.000 $\pm$ 21.971	297.100 $\pm$ 7.249	695.300 $\pm$ 15.505	1.45
<b>AA 6</b>				
Mw	1.530.000 $\pm$ 33.966	368.900 $\pm$ 11.620	1.119.000 $\pm$ 25.737	1.27
<b>AA 7</b>				
Mw	1.683.000 $\pm$ 37.901	438.400 $\pm$ 12.998	892.200 $\pm$ 26.699	1.27
<b>AA 8</b>				
Mw	1.426.000 $\pm$ 33.083	376.900 $\pm$ 11.985	750.800 $\pm$ 18.319	2.01

gesamt: beinhaltet das gesamte Elutionsprofil bestehend aus Peak 1 und Peak 2

## 2.5 Trübungsphotometrie und Infrarotspektroskopie der Zusatzstoffe

Die Trübungsphotometrie wird in der Getränkeindustrie zur Qualitätsüberwachung und zur Prozesskontrolle genutzt. Analysiert werden ungelöste Substanzen, die die Qualität eines Produktes negativ beeinflussen können. Kolloide sind im chemischen Sinne keine echt gelösten Moleküle, vielmehr bewegt sich ihr Lösungsverhalten zwischen echt gelösten Substanzen, wie Zucker, Alkohol und Säuren, und grob disperser Partikel der Größe bis 1 µm. Kolloide erscheinen wie echt gelöste Moleküle aber auch wie diskrete Partikel mit großer Grenz- und Oberfläche (klar und opaleszent) (Boulton *et al.* 1998). MWS und CMC sind im pH-Bereich von Wein und Traubensaft negativ geladene Biopolymere. Die Grundidee, dass diese mit positiv geladenen Biopolymeren (Proteine), speziell des Enzyms Lysozym, eine Trübung bilden, deren Intensität mittels Streulichtphotometrie erfasst werden kann, wurde mit Weißwein und Traubensaft für die Zusatzstoffe getestet. Ferner wurde versucht, eine Korrelation zwischen Konzentration und Trübung festzustellen. Lysozym ist für die biologische Stabilisierung, speziell zur Vorbeugung der malolaktischen Gärung seit 2001, in allen Herstellungsstufen von Wein bis hin zur Versektung, zugelassen. Die Einsatzmenge ist hier auf einen Wert von 50 g/hL (500 mg/L) vom Gesetzgeber festgesetzt (Riber au-Gayon *et al.* 2000) S.319, (Gerbaux *et al.* 1997) und (Sigler 2004). Es wurde eine frische Lysozym-Stammlösung der Konzentration 1 g/L verwendet. Von den Zusatzstoffen MWS und CMC wurden Verdünnungen von 20 – 400 mg/L in Traubensaft und Wein hergestellt. In Reagenzgläsern wurden jeweils 10 mL Probe mit 10 mL der Lysozym-Stammlösung versetzt und die Trübung mittels Trübungsphotometer bestimmt. Die Trübung in den zusatzstoffhaltigen Proben ohne Lysozymzusatz wurde als Blindwert verwendet. Zeigte die Trübung der Probe eine Intensität gr o er als 1200 FNU, wurde die Probe verdünnt. Abbildung 2-22 und Abbildung 2-23 zeigen beispielhaft den linearen Konzentrationszusammenhang von CMC und MWS in Weißwein. Mit steigenden Konzentrationen kam es in Gegenwart von Lysozym zu verstärkter Trubbildung und einem Anstieg der Streulichtintensität. Weitere Werte für beispielsweise Traubensaft sind Tabelle G und Abbildung B im Anhang zu entnehmen. Die Versuche wurden bis zu einer Konzentration von 400 mg/L durchgeführt, es zeigte sich jedoch, dass die Methode nur von 20 – 150 mg/L linear ist.

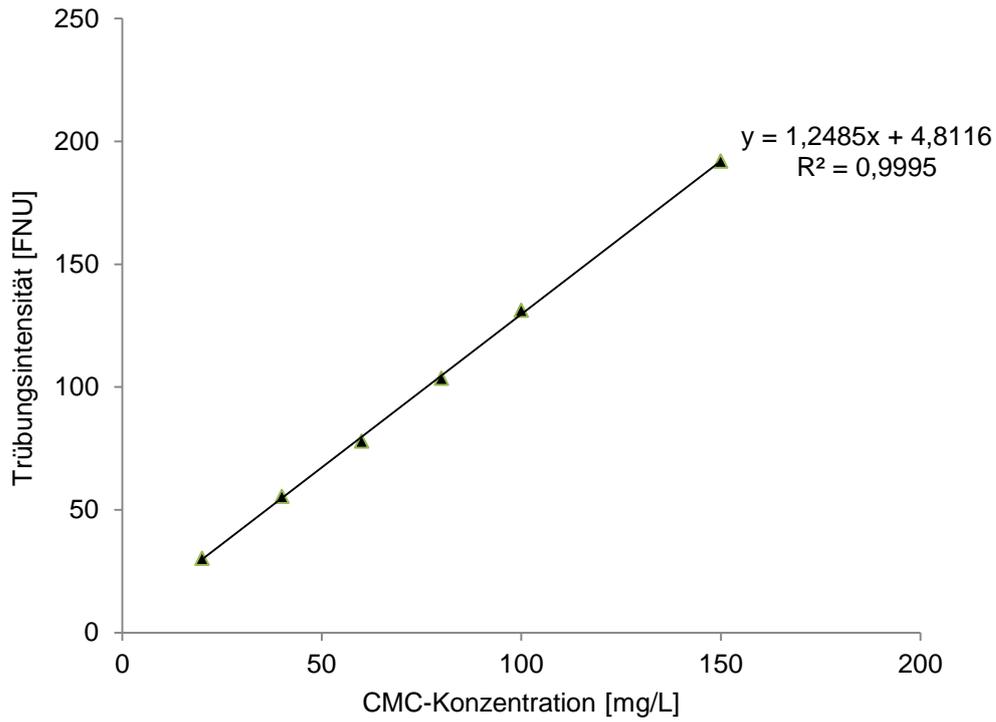


Abbildung 2-22 Linearer Konzentrationszusammenhang von CMC und Lysozymtrubblung

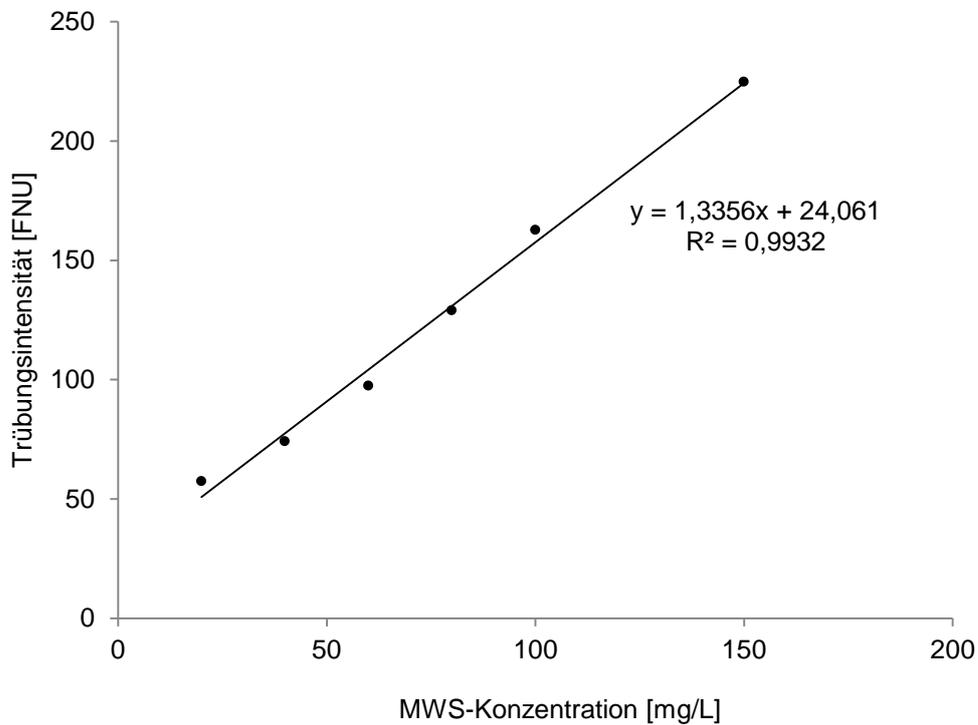


Abbildung 2-23 Linearer Konzentrationszusammenhang von MWS und Lysozymtrubblung

Tabelle G im Anhang zeigt zusätzlich die Werte für Gummi Arabikum, allerdings konnte hier kein linearer Zusammenhang festgestellt werden. Die aufgetretene Trübung war gering und teilweise nicht messbar. MWS und CMC ließen sich nicht anhand der Trübung unterscheiden. Deshalb wurden die Trübungen von MWS und CMC aus Weißwein isoliert, gewaschen und getrocknet. Daraufhin wurden IR-Analysen (ATR-attenuated total reflection) durchgeführt, um anhand der Banden im Fingerprintbereich ( $< 1500 \text{ cm}^{-1}$ ), beide Zusatzstoffe unterscheiden zu können. Zusätzlich wurden die Zusatzstoffe als reine Substanzen mittels Infrarotspektroskopie untersucht.

### 2.5.1 Infrarotspektroskopie von Metaweinsäure

Ziel der Trubanalysen mit Infrarotspektroskopie war eine detailliertere Charakterisierung der untersuchten Handelsprodukte der Zusatzstoffe.

Eine Vergrößerung der Oberfläche durch Vermahlung der Produkte wurde vermieden, da Metaweinsäure ein hygroskopischer Stoff ist. Ebenso war die Vortrocknung im Trockenschrank nicht möglich, weil Metaweinsäure bei erhöhter Temperatur hydrolysiert. Der Feststoff wurde mit einer Pinzette auf das Diamantfenster der ATR-Einheit aufgebracht und mit dem Anpressstempel fixiert. Die IR-Spektren zeigten wenige charakteristische Banden. Der Bereich über  $3300 \text{ cm}^{-1}$  zeigte in allen Produkten eine breite Bande, welche den, über Wasserstoffbrücken verbundenen, OH-Gruppen des vorhandenen Kristallwassers zugewiesen werden konnten (vgl. Abbildung 2-24). Durch das Vorhandensein von unveresterter Weinsäure (vgl. Abschnitt 2.6.1.1) aus der Herstellung von Metaweinsäure verteilte sich diese Bande bis  $2500 \text{ cm}^{-1}$  und es ist davon auszugehen, dass sich hierunter die Schwingungen der stark verbrückten OH-Gruppen der Carbonsäuren befanden. Bei einer Wellenzahl von  $1730 \text{ cm}^{-1}$  zeigten alle Produkte als scharfe Bande die charakteristische ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ )-Streck- bzw. Valenzschwingung. Gleichzeitig konnte diese scharfe Bande der Carbonsäure zugeordnet werden. Unter  $1200 \text{ cm}^{-1}$ , im so genannten Fingerprint-Bereich eines IR-Spektrums, waren in allen Produkten drei charakteristische Banden zu erkennen. Es handelte sich dabei um eine als Doppelbande zu sehende Schwingung der Esterbindung ( $1330 - 1050 \text{ cm}^{-1}$ ) im Metaweinsäuremolekül und einer schwachen vermutlich isolierten H-Schwingung bei  $890 \text{ cm}^{-1}$ .

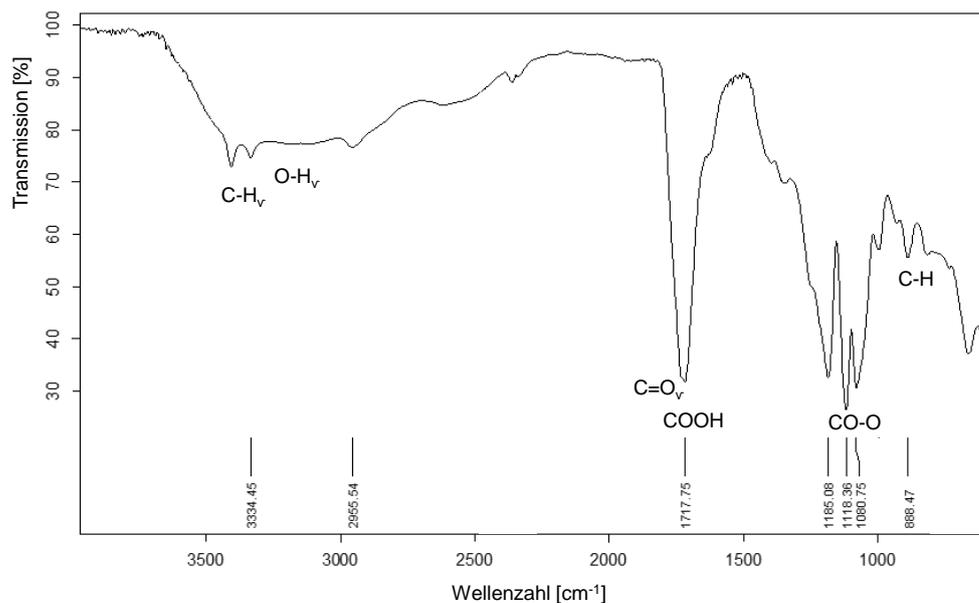


Abbildung 2-24 Infrarotspektrum-Spektrum von Metaweinsäure

### 2.5.2 Infrarotspektroskopie von Carboxymethylcellulose

Die ATR-Spektren der analysierten CMC-Produkte zeigten die charakteristischen Banden für polymere Kohlenhydrate (siehe Abbildung 2-25). Es traten hier die ( $\nu(\text{CHO})$ )-Streckschwingung der Aldehydgruppe bei einer Wellenzahl von  $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$  und die ( $\nu(\text{C-O-C})$ )-Valenzschwingung der Ethergruppe bei einer Wellenzahl von  $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$  der Zuckerbausteine auf. Weiterhin war die Carboxylgruppe ( $-\text{COOH}$ ) bei einer Wellenzahl von  $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$  klar zu erkennen, diese war jedoch durch die charakteristischen Proteinbanden des Lysozyms in der Trubanalyse verdeckt (siehe Abbildung 2-28).

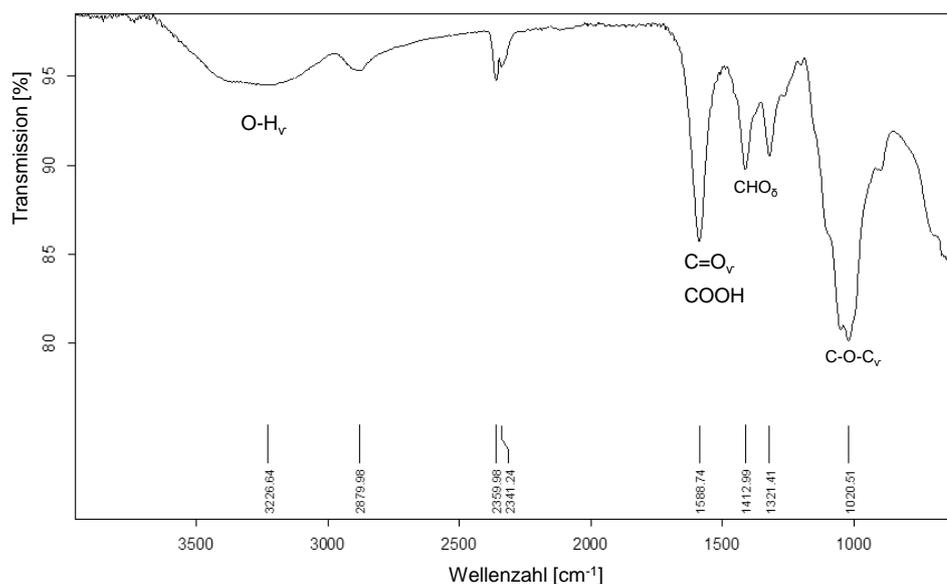


Abbildung 2-25 Infrarotspektrum von Natrium-Carboxymethylcellulose

Abbildung 2-26 zeigt das ATR-Spektrum von Lysozym als Einzelsubstanz. In einem Infrarotspektrum von Proteinen können bis zu neun infrarotaktive Schwingungen auftreten, resultierend aus Peptid- (-CONH-) oder auch Amidbindungen. Da Lysozym ein Protein ist, sind hier die charakteristischen Schwingungen der Peptidbindung von großem Interesse. Diese sind im Bereich von  $1690 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  zu finden. Hier ist zum einen die charakteristische ( $\nu_s(\text{C}=\text{O})$ )-Streckschwingung der Amidgruppe vertreten und zum anderen die ( $\delta(\text{N-H})$ )-Deformationsschwingung (Beugeschwingung) sowie die ( $\nu(\text{C-N})$ )-Streckschwingung. Weiterhin sind noch die ( $\delta(\text{N-H})$ )-Deformationsschwingung und die ( $\nu(\text{C-N})$ )-Valenzschwingung bei  $1575 - 1480 \text{ cm}^{-1}$  charakteristisch. Proteine werden anhand dieser starken Protein-Amid Banden eindeutig identifiziert.

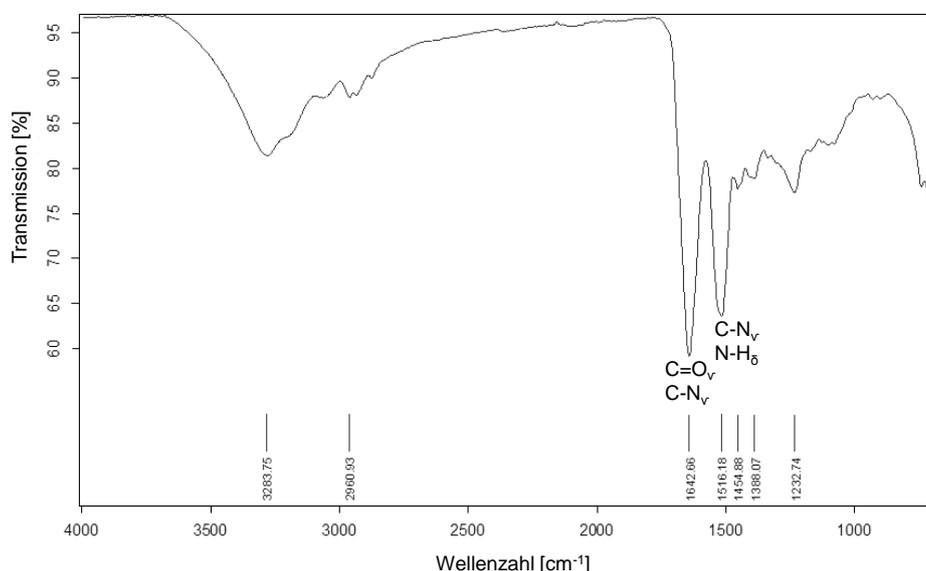


Abbildung 2-26 ATR Spektrum von Lysozym

Abbildung 2-27 zeigt das ATR-Spektrum des isolierten Trubs von MWS gefällt mit Lysozym. Charakteristisch für Metaweinsäure waren die Esterbindung (-CO-O-) bei  $1330 - 1050 \text{ cm}^{-1}$  und eine schwache vermutlich isolierte ( $\nu(\text{C-H})$ )-Schwingung bei  $890 \text{ cm}^{-1}$ . Die Banden bei  $1575 - 1480 \text{ cm}^{-1}$  und  $1690 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  sind der charakteristischen Protein-Amid-Gruppe des Lysozyms zuzuordnen.

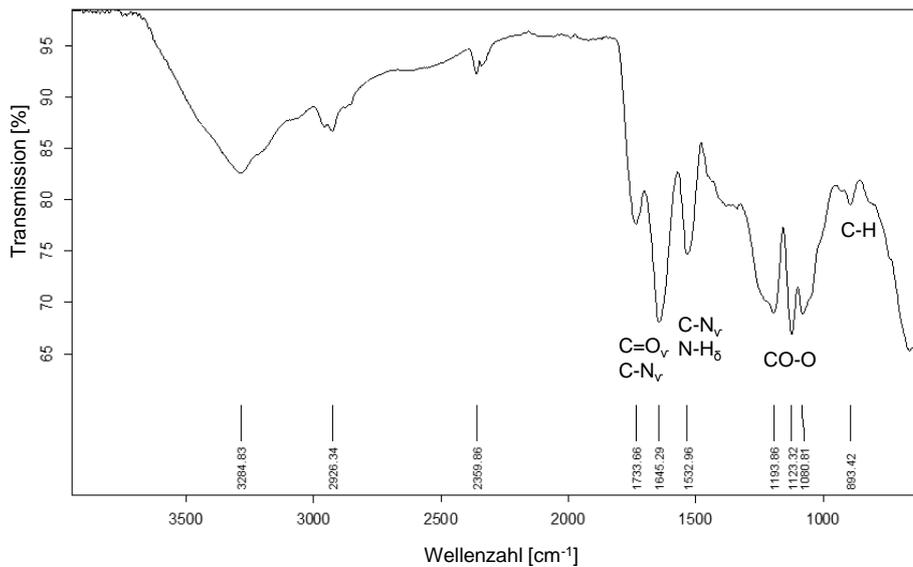


Abbildung 2-27 ATR Spektrum von Metaweinsäure-Trub (MWS) (gefällt aus Weißwein mit Lysozym)

Diese charakteristischen Banden des Proteins fanden sich ebenfalls in der ATR-Analyse des Trubs von CMC (vgl. Abbildung 2-28). Dennoch unterschieden sich beide Trubanalysen unterhalb von  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Wie in Abbildung 2-28 ersichtlich, traten hier die ( $\nu(\text{CHO})$ )-Streckschwingung der Aldehydgruppe und die ( $\nu(\text{C-O-C})$ )-Valenzschwingung der Ethergruppe der Zuckerbausteine auf. Die ( $\nu(\text{C=O})$ )-Schwingung der Carbonsäure trat bei den Trubanalysen mit den charakteristischen Banden des Lysozyms auf und diente daher nicht zur weiteren Zuordnung.

Als analytische Konsequenz ergibt sich eine einfache Analysenmethode, mit der der Zusatz von CMC und MWS quantitativ festgestellt und gegebenenfalls unterschieden werden kann. GA konnte mit dieser Methodik nicht erfasst werden. Lysozym wird als E1105 wie die Zusatzstoffe ebenfalls kurz vor der Fällung zur Verhinderung der malolaktischen Gärung eingesetzt (Riberçau-Gayon *et al.* 2000) S.319. Als negative oenologische Konsequenz ist eine auftretende Trübung, verursacht durch einen Zusatz von MWS oder CMC mit Lysozym, anzunehmen.

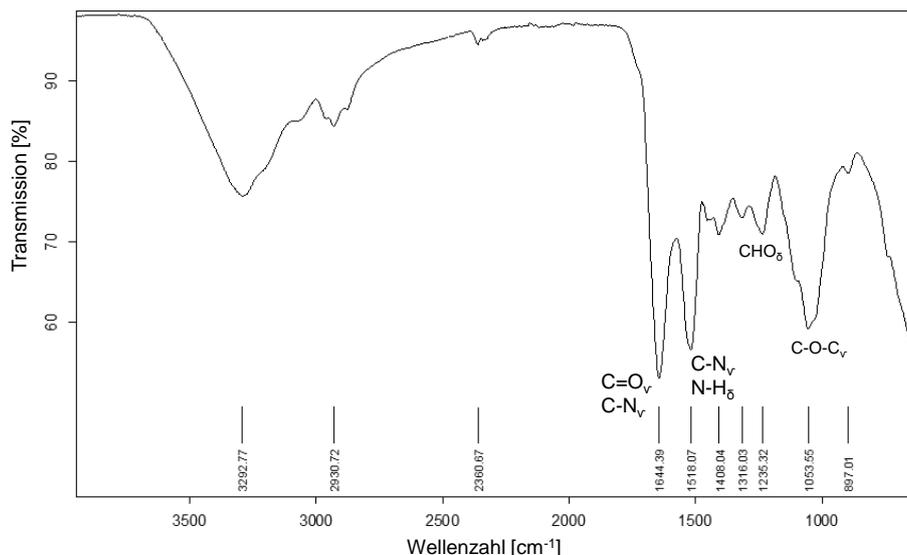


Abbildung 2-28 ATR-Spektrum von CMC-Trub (isoliert aus Weißwein mit Lysozym gefällt)

Anhand der Banden, die bei Metaweinsäure klar der Esterbindung zugeordnet werden konnten und der charakteristischen Banden des Zuckermoleküls bei CMC, ist eine eindeutige Differenzierung der beiden Zusatzstoffe möglich. Zur besseren Trennung von CMC und MWS wurden zusätzlich die reinen Zusatzstoffe mittels ATR analysiert und verglichen. Alle Zusatzstoffe zeigten die hier zur Differenzierung zwischen MWS und CMC aufgeführten charakteristischen Banden.

## 2.6 Zusammensetzung der kommerziellen Zusatzstoffe

Zur Analytik von eventuellen Verunreinigungen und um die Qualität der kommerziellen Zusatzstoffe einschätzen zu können, wurde die Trockenmasse, der Aschegehalt und die Mineralstoffe sowie die Spurenelemente jedes Produktes analysiert (Tabelle D-F im Anhang). Mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) wurden aus der Asche des jeweiligen Produktes die Elemente Calcium, Magnesium, Kalium sowie Kupfer, Eisen, Zink und Natrium bestimmt. Mittels Röntgenfluoreszenanalyse (TRFA) konnte aus den getrockneten nicht-veraschen Produkten ein Gesamtüberblick über die enthaltenen Spurenelemente gewonnen werden. Zusätzlich wurden produktspezifische Analysen durchgeführt.

### 2.6.1 Metaweinsäure

Tabelle D im Anhang gibt einen Gesamtüberblick über die ermittelten Daten für die MWS-Produkte A - G. Metaweinsäure ist ein organisches und sehr reines Produkt, weshalb die Bestimmung des Aschegehaltes nicht möglich war. Hohe Einwaagen wurden getestet und erbrachten keinen nennswerten Erfolg. Demzufolge war keine Analyse der Mineralstoffe mittels AAS möglich und auch die TRFA-Analytik der trockenen nicht-veraschten Proben zeigte, dass MWS wenige Elemente in nicht nennenswerten Konzentrationen enthält. Der Mittelwert der Trockenmasse lag für die analysierten Produkte bei  $96 \pm 2 \%$ , wobei auch diese Werte aufgrund der Hydrolyse von MWS bei Hitze einwirkung kritisch hinterfragt werden müssen.

#### 2.6.1.1 Metaweinsäure - monomerer Weinsäuregehalt

Die Charakterisierung des monomeren Weinsäuregehaltes von sieben verschiedenen MWS-Produkten (A-G) wurde zum Vergleich mit zwei Methoden durchgeführt (siehe Abbildung 2-29). Zum Einsatz kamen dabei die routinemäßige Bestimmung von organischen Säuren mittels Ionenchromatografie (IC) und die entwickelte LC-MS-Methode. Um die Hydrolyse von MWS-Proben zu verhindern, wurden die Proben frisch angesetzt, in Reinstwasser (400 mg/L) gelöst und mittels HPLC-UV bei 230 nm analysiert.

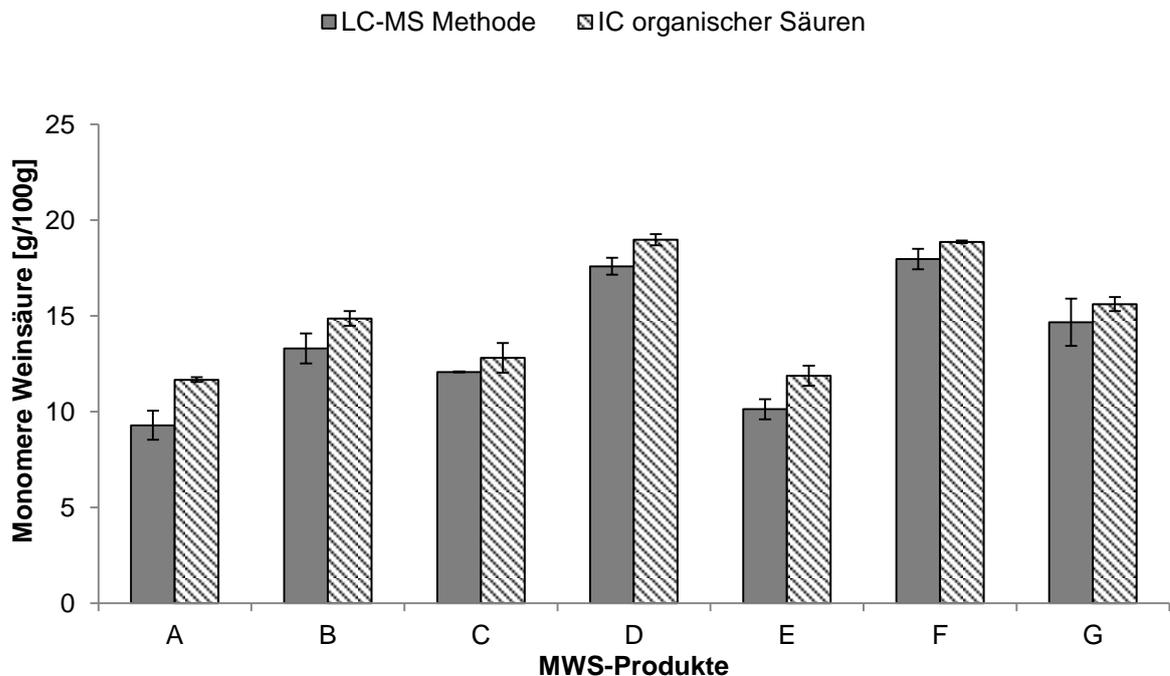


Abbildung 2-29 Monomerer Weinsäure Gehalte in MWS-Produkten (Produkt A - G) Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Gehalte der trockenen Zusatzstoffe analysiert mittels IC (Ionenchromatographie) und LC-MS (n = 3)

Der mittlere Weinsäuregehalt der Produkte lag bei  $14,6 \pm 0,25$  % (analysiert mittels IC) und bei  $13,5 \pm 0,4$  % (analysiert mittels LC-MS). Somit unterschieden sich beide Methoden im Bereich von 0,5 – 2 %. Die Ionenchromatographie kann als sensitiver betrachtet werden. Dennoch ist der Unterschied zwischen beiden Methoden als gering zu betrachten.

Abbildung 2-29 zeigt, dass in allen Produkten ein relativ hoher Anteil an unveresterter monomerer Weinsäure enthalten war. Die Weinsäuregehalte schwanken zwischen 9 – 18 g/100g Metaweinsäureprodukt. Im Mittel lag der Anteil bei den untersuchten Produkten bei 13 %.

### **2.6.1.2 Einfluss der Schichtenfiltration auf den Metaweinsäuregehalt**

Für die Filtrationsversuche wurden Tiefenfilterschichten des Typs Eaton Begerow® BECO Steril S 80 (60 mm; rund) verwendet. Die nominelle Abtrennrates dieses Typs liegt bei 0,2 µm. Die theoretische Filterfläche (ø 60 mm) der Tiefenfilterschichten beträgt 28,274 cm<sup>2</sup>. Die tatsächliche Filterfläche der Schichten (ø 50 mm), durch Anpressen der Schichtenhalterung bedingt, betrug 19,635 cm<sup>2</sup>. Es sollten die Filtrationsbedingungen für eine Sterilfiltration vor der Abfüllung möglichst genau nachempfunden werden. Zur Filtration wurde daher ein maximaler Differenzdruck von 1,2 bar eingesetzt. Der Filtrationsversuch in Wein erfolgte mit einer Metaweinsäurekonzentration von 100 mg/L (0-Wert in Abbildung 2-30). Der Wasserwert der Filterschicht betrug 35,84 s/100 mL bei 1,5 bar. Nach der Konditionierung der Filterschicht und der Entlüftung der Kleinmengenfiltrationsanlage erfolgte die Filtration. Die durchschnittliche Filtrationsleistung betrug 4,71 min/ 250 mL Probelösung. Der Filtrationsdruck musste im Verlauf der Filtration und der zunehmenden Verblockung der Filterschicht geringfügig nachjustiert werden. Die Bestimmung der Filtratmenge erfolgte volumetrisch in 250 mL Messkolben (Abweichung ± 2 mL durch Wechsel der Auffanggefäße). Die Bestimmung der Metaweinsäuregehalte wurde mit der entwickelten LC-MS-Methode (vgl. Abschnitt 2.2.1) durchgeführt.

In Abbildung 2-30 sind die Metaweinsäuregehalte während des Filtrationsverlaufes in Abhängigkeit des Filtrationsvolumens pro m<sup>2</sup> Filterfläche dargestellt. Hierbei verringerte sich der Ausgangsmetaweinsäuregehalt von 100 mg/L, nach einem Filtrationsvolumen von 127 L/m<sup>2</sup> um 35 % auf 65 mg/L. Anschließend stieg der Metaweinsäuregehalt nach einem Filtrationsvolumen von 254 L/m<sup>2</sup> auf 118 mg/L und lag damit 18 mg/L über dem Ausgangsmetaweinsäuregehalt vor der Filtration. Im weiteren Verlauf der Filtration bzw. nach einem Filtrationsvolumen von 763 L/m<sup>2</sup> wurde das Ausgangsniveau des Metaweinsäuregehaltes wieder erreicht.

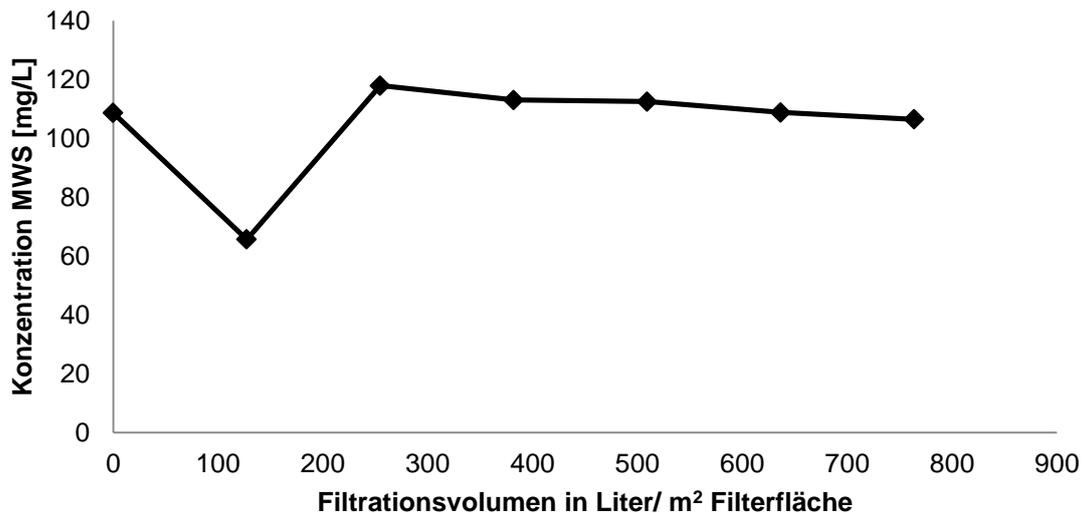


Abbildung 2-30 Filtrationsverlauf (Schichtenfiltration) von Metaweinsäure in Weißwein (100 mg/L) mittels Filtrationsstand zur Kleinmengenfiltration (0-Wert detektierter MWS-Gehalt vor Filtrationsbeginn; n=1)

Die Schichtenfiltrationsversuche dienten der Überprüfung des Rückhaltevermögens von Tiefenfilterschichten in Bezug auf den MWS-Gehalt. Eine mögliche Erklärung für die über dem Ausgangsniveau liegenden MWS-Gehalte bei vorangegangener Filtration sind beispielsweise Effekte, die in Zusammenhang mit der Deckschichtbildung auf der Filterschicht bzw. einer Verblockung der Poren der Filterschicht stehen. Durch das sich ausbildende Zeta-Potential der Filterschicht wird die Metaweinsäure zusammen mit anderen Partikeln erst stark zurückgehalten, um im weiteren Verlauf wieder gelöst zu werden, um dann den absoluten MWS-Gehalt zu erhöhen. In weiteren Versuchen wurde MWS in Reinstwasser filtriert, hier tritt dieser Effekt nicht auf. Grund hierfür können die fehlenden Matrixbestandteile des zuvor verwendeten Versuchswines sein (vgl. Abbildung 2-31). Hier fiel der Ausgangsmetaweinsäuregehalt nach 50 L/m<sup>2</sup> auf 170 mg/L MWS ab. Erst ab einem Filtrationsvolumen von 150 L/m<sup>2</sup> erreichte der MWS-Gehalt wieder das Ausgangsniveau. Die bisher erworbenen Erkenntnisse sind nicht direkt auf den Großmaßstab in der Weinbereitung übertragbar, da die Endfiltrate des Weines nicht direkt in Flaschen, sondern vielmehr nach guter fachlicher Praxis im Kreislauf gepumpt werden sollen. Aus den Versuchen ist jedoch abzuleiten, dass kleinere Kellereien, die filtrieren und direkt füllen, Gefahr laufen, dass unstabilisierter Wein abgefüllt wird. Die Ergebnisse bestätigen zudem das in der Literatur beschriebene Rückhaltevermögen von Kolloiden bis 65 % während einer Filtration (Wucherpfennig et al. 1987). In anderen Beiträgen wird das Rückhaltevermögen von MWS bei einer

entkeimenden Schichtenfiltration beschrieben. Demnach können 200 – 400 Flaschen des Weines, der durch frische Filterschichten filtriert wird, unstabilisiert und praktisch frei von stabilisierender MWS sein (Scholten *et al.* 2003).

Die Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass es von Vorteil ist, das Endprodukt während der Filtration im Kreislauf laufen zu lassen und somit die entkeimende Wirkung der Filtration und die Stabilisierung der gesamten Charge zu gewährleisten.

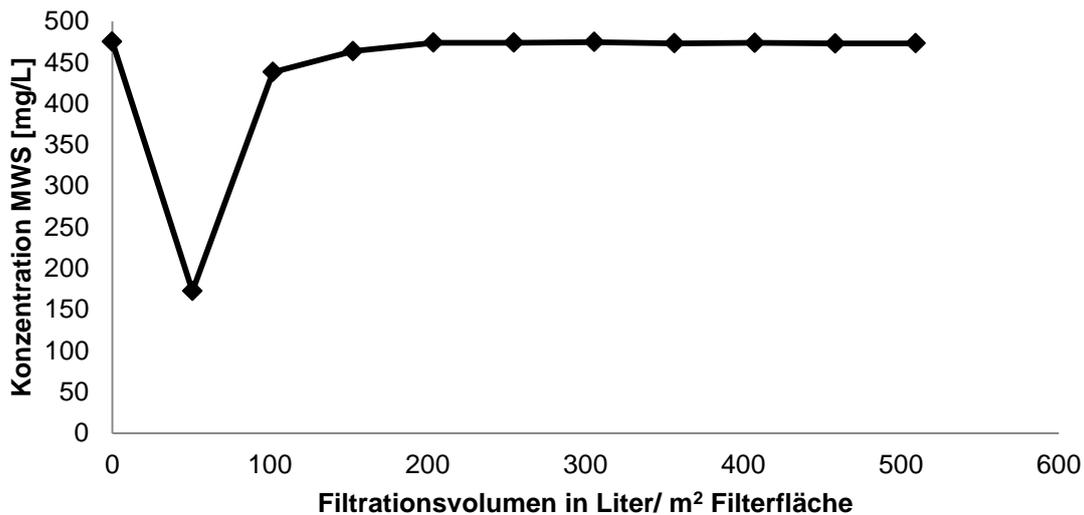


Abbildung 2-31 Filtrationsverlauf (Schichtenfiltration) von Metaweinsäure in Wasser (500 mg/L) mittels Filtrationsstand zur Kleinmengenfiltration (0-Wert detektierter MWS Gehalt vor Filtrationsbeginn; n=1)

### 2.6.2 Gummi Arabikum

Die Ergebnisse der untersuchten Gummi Arabikum-Produkte (GA) sind der Tabelle E im Anhang zu entnehmen. Die flüssigen Produkte enthielten im Mittel  $24,52 \pm 0,01$  % Trockenmassesubstanz, die Feststoffe  $90,89 \pm 0,07$  %. In den Produktdatenblättern der flüssigen Produkte finden sich Angaben von Trockenmassegehalte von 27 %, welche bestätigt werden konnten. Der Aschegehalt der Proben (bestimmt aus der Trockensubstanz) lag bei  $1,87 \pm 0,02$  % (Vorgabe  $< 4\%$ ; vgl. Abschnitt 1.2.2). Stabilisiert wurden die flüssigen Produkte beispielsweise mit Citronensäure, hier fällt insbesondere GA 3 mit 53 g/L auf (Angabe im Analysenzertifikat 35 g/L)<sup>4</sup>. GA 1 und GA 3 enthielten Essigsäure zwischen 2,8 g/L und 4,0 g/L, was bedeuten würde, dass bei einer Einsatzmenge von 300 mg/L GA ca. 1 mg Essigsäure in den Wein gelangt.

<sup>4</sup> Quelle: <http://www.laffort.com/de/produkte/stabilisierung> (Abruf 25.11.2015)

GA 4 enthielt zu gleichen Teilen (ca. 0,3 g/L) Citronen- und Essigsäure. In den meisten Analysezertifikaten ist allerdings kein Hinweis auf die Stabilisierung der Produkte mit organischen Säuren enthalten. Lediglich GA 2 enthielt als einzige Festsubstanz keine Stabilisierungsmittel. Alle Produkte wurden für die Analyse der organischen Säuren frisch geöffnet und enzymatisch analysiert. Als Verderbnisparameter wurde zusätzlich der Milchsäuregehalt aller Produkte bestimmt. In allen flüssigen Produkten konnte Milchsäure (Mittelwert  $0,710 \pm 0,003$  g/L) gefunden werden. Hierbei fiel besonders GA 2 mit  $1,67 \pm 0,01$  g/L auf.

Mittels TRFA und AAS wurden zusätzlich einige Mineralstoffe und Spurenelemente im mg- bzw.  $\mu$ g-Bereich detektiert. Erwähnenswert sind hier die Elemente Natrium (0,25 – 14,24 mg/g), Kalium (2,16 – 29,95 mg/g), Magnesium (0,62 – 1,76 mg/g) und Calcium (2,48 – 9,89 mg/g) sowie in Spuren Strontium und Mangan. Diese Elemente wurden ebenfalls von Mahendran (2008) veröffentlicht und stimmen mit den Analysenwerten überein (Mahendran *et al.* 2008). Die Identifizierung von Aminosäuren im Proteinanteil der analysierten Produkte mittels Aminosäureanalysator ergab als häufigste Aminosäuren Hydroxyprolin (2 mg/g), Prolin (0,5 mg/g), Serin (0,2 mg/g) sowie Threonin (0,1 mg/g). Zusätzlich wurde versucht, den Gesamtproteinanteil mittels der Kjeldahl-Methode zu bestimmen. Aufgrund des geringen Gehaltes, konnten für die Produkte GA1 – GA4 keine repräsentativen Ergebnisse ermittelt werden. Der Gehalt an hydrolysierten monomeren Zuckern L-Arabinose, D-Galactose, L-Rhamnose sowie des sauren Zuckers D-Glucuronsäure liegt im Mittel bei 69 % (vgl. Tab. E im Anhang).

### 2.6.3 Natrium-Carboxymethylcellulose

Die Ergebnisse der untersuchten Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC) Produkte sind der Tabelle F (im Anhang) zu entnehmen. Bei der Analyse der anorganischen Elemente mittels TRFA oder AAS fiel auf, dass CMC ein sehr reines Produkt ist. Der ermittelte Natriumgehalt in allen Proben war auffällig hoch, lag im Mittel aber bei  $8 \pm 1$  % und entsprach somit den Vorgaben der OIV von 12,4 % Natriumgehalt in der Trockenmasse (vgl. Abschnitt 1.2.2). Der mittlere Trockenmassegehalt der festen Proben lag bei  $92 \pm 1$  % und erfüllte nicht die Vorgabe der OIV mit 99,5 %. Laut OIV sollen flüssige Produkte mindestens 3,5 % CMC enthalten. Die Analyse ergab einen mittleren Gehalt von  $7 \pm 1$  % Trockenmasse der flüssigen Produkte. Zur Stabilisierung wurden in zwei von vier flüssigen Produkten 6 g/L Essigsäure

eingesetzt. Die Produkte wurden zusätzlich auf einen möglichen Proteingehalt analysiert, welcher aber nicht nachgewiesen werden konnte.

### 2.6.3.1 Chloridgehalt von CMC-Produkten

Aus der Synthese der CMC mit Chloressigsäure resultiert ein Chloridgehalt in den Zusatzstoffen. Im Mittel enthielt jeder Zusatzstoff (CMC 1–8) 0,1 % Chlorid, wobei der Gehalt mit dem Substitutionsgrad zunimmt. Bei CMC 9 handelte es sich um eine hochsubstituierte CMC, die keine Anwendung im Wein findet und deren Chloridgehalt im Bereich von 0,3 % lag (Abbildung 2-32).

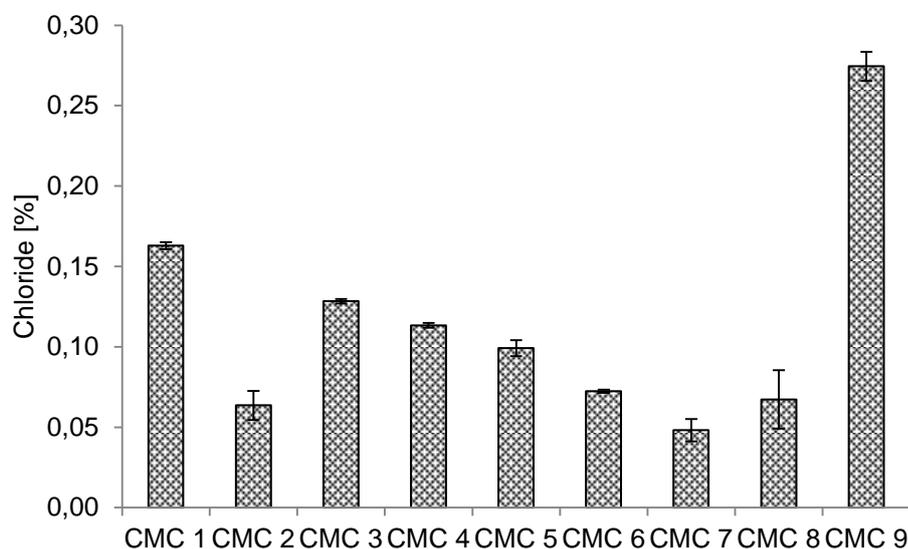


Abbildung 2-32 Bestimmung der Chloridgehalte in kommerziellen CMC-Produkten (CMC 1 – 9) als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (n = 2)

### 2.6.3.2 Glucosegehalt von CMC-Produkten

Der mittlere Glucosegehalt der analysierten CMC-Produkte lag bei 10,9 %  $\pm$  0,3 % (Abbildung 2-33), wobei auch Gehalte um die 15 % (CMC 5 und 6) vertreten waren. Den niedrigsten Glucosegehalt hatte die Probe CMC 4 mit 6,4 %. Der Glucosegehalt kann Rückschlüsse auf den Grad der Funktionalisierung des Polymers mit Essigsäure ( $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ ) liefern und als Grundlage für eine Aussage über die Qualität des Zusatzstoffes dienen, denn durch die Synthese mit Chloressigsäure soll eine gleichmäßige Verteilung der funktionellen Gruppen über das gesamte Polymer erfolgen.

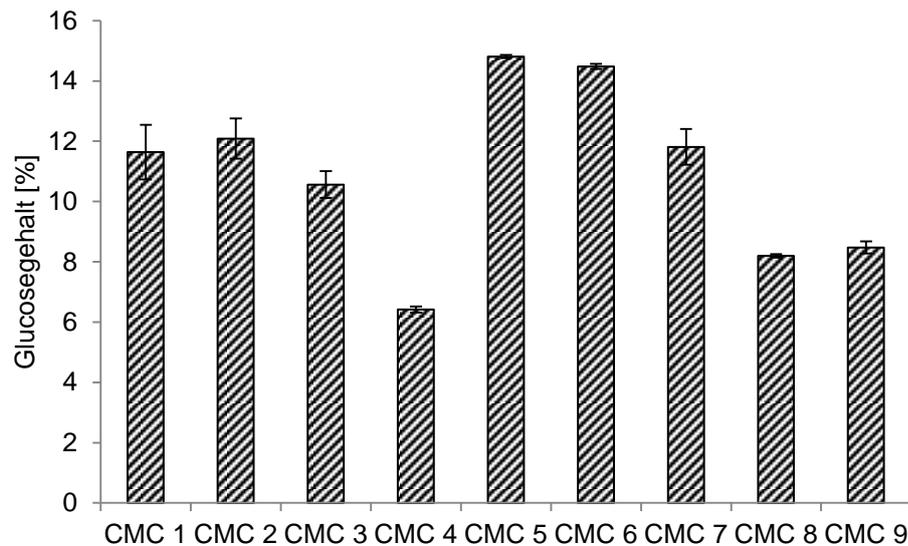


Abbildung 2-33 Glucosegehalte der kommerziellen CMC-Produkte (CMC 1-9) als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ) (Methode: HPAEC-PAD nach Säurehydrolyse mit 80%iger  $H_2SO_4$ )

## 2.7 Sensorik - Ermittlung der Reizschwelle der Zusatzstoffe

In der Weinbereitung gilt zu beachten, dass jegliche Behandlung der Weine zu einer sensorischen Veränderung führen kann. Um die umstrittenen Aspekte der Verbesserung des Mundgefühls und der Texturveränderung durch einen GA-Zusatz zu überprüfen und zur Festlegung der Reizschwellen der Zusatzstoffe, wurden diese in verschiedenen Weinen verkostet. Die Reizschwelle definiert dabei die Konzentration, bei der 50 % der Prüfer einen Geschmacksunterschied erkennen. Zusätzlich wurden die Teilnehmer gebeten diesen Geschmack zu beschreiben (Fragebogen der Datenerhebung vgl. Abbildung I im Anhang).

Das Panel bestand aus 11 Prüfern. Ab sechs Teilnehmern, die einen veränderten Geschmackseindruck feststellen, sind die Ergebnisse als signifikant zu betrachten. Der Konzentrationsbereich in Weißwein lag zwischen 0 und 1000 mg/L für CMC (sechs Konzentrationen) und zwischen 0 und 2000 mg/L für GA und MWS (je acht Konzentrationen). Für CMC wurde eine Reizschwelle bei 500 mg/L (50 g/hL) bestimmt (siehe Abbildung 2-34), da 50 % der Prüfer einen Geschmacksunterschied bei dieser Konzentration feststellten (siehe Abbildung 2-34). Damit konnte die von Will *et al.* 1991 bereits gezeigte Reizschwelle, welche unterhalb von 600 mg/L lag, bestätigt werden (Will *et al.* 1991). Dieser Wert ist 5-mal höher als der erlaubte Grenzwert von 100 mg/L. CMC beeinflusst nach diesen Erkenntnissen die Weinsensorik nicht.

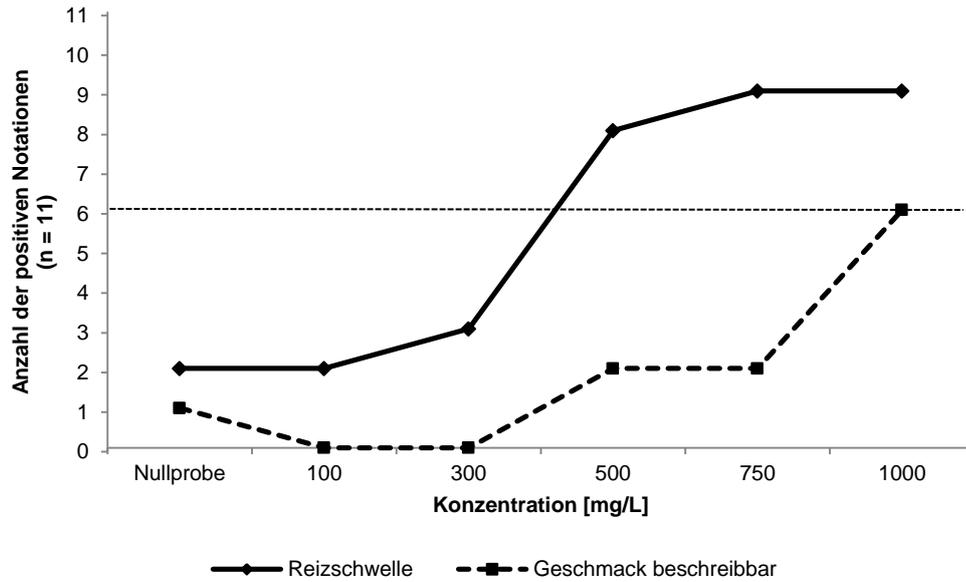


Abbildung 2-34 Schwellenwertprüfung - CMC eines Prüferpanels mit 11 Teilnehmern (n = 6, signifikant erkennbare Geschmacksveränderung)

Für MWS lag die Reizschwelle bei 300 mg/L (Abbildung 2-35) und war damit 3-mal höher als der gesetzliche Grenzwert von 100 mg/L. Für GA wurde die Reizschwelle bei 750 mg/L (75 g/hL) ermittelt (Abbildung 2-36).

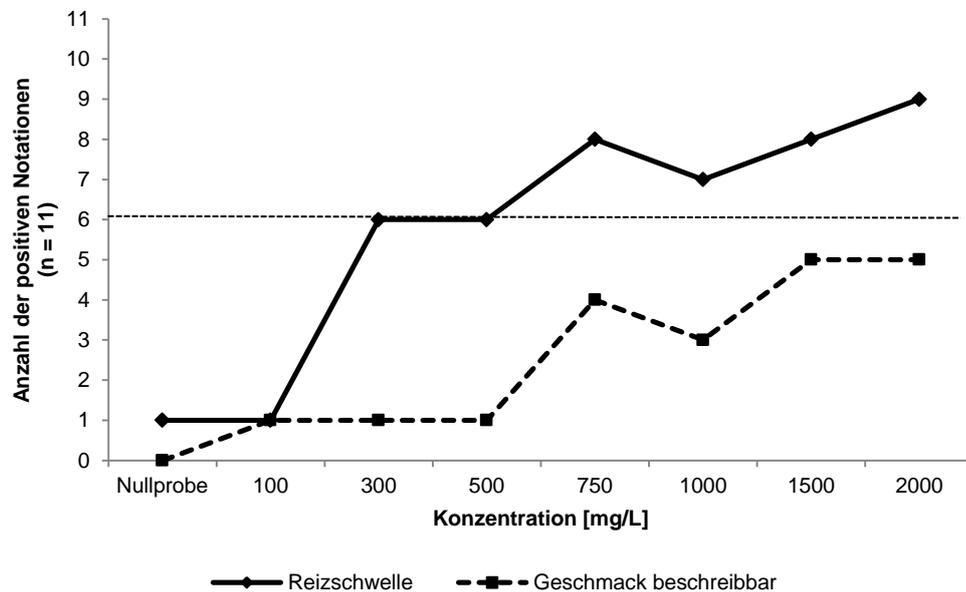


Abbildung 2-35 Schwellenwertprüfung - MWS eines Prüferpanels mit 11 Teilnehmern (n = 6, signifikant erkennbare Geschmacksveränderung)

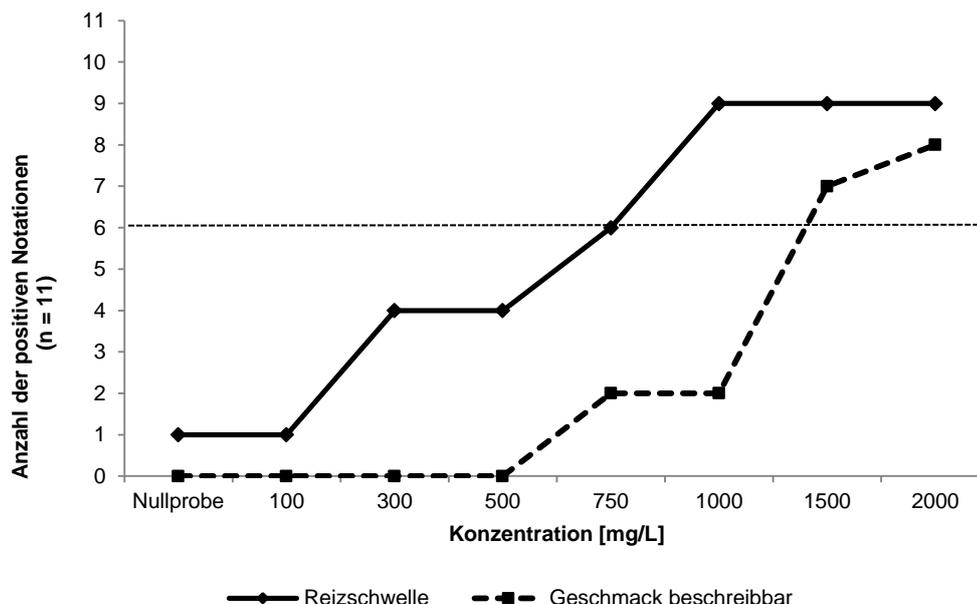


Abbildung 2-36 Schwellenwertprüfung - GA eines Prüferpanels mit 11 Teilnehmern (n = 6, signifikant erkennbare Geschmacksveränderung)

Neben der Bestimmung der Reizschwellen wurden auch andere beschreibbare Geschmackseindrücke erfasst. Für alle Zusatzstoffe wurde vorwiegend die „bittere“ Geschmacksnote benannt. Für GA wurde von zwei Prüfern eine Adstringenz festgestellt. Dieser Geschmackseindruck wird, aufgrund der Reizung der Mundschleimhäute als trigeminale Wahrnehmung, oft mit „Bitterkeit“ verwechselt. Adstringenz liegt neben der Geschmacksrichtung Bitterkeit im Wein häufig gleichzeitig vor und kann selten ausreichend differenziert werden (Busch-Stockfisch 2004).

## 2.8 Bestimmung der Viskosität von Wein mit Zusatzstoffen

Zusätzlich wurden aus den in der Sensorik verwendeten Weinen Viskositätszusammenhänge ermittelt. Im Zusammenhang mit der Bestimmung der Reizschwelle der Zusatzstoffe und der Bestimmung des beschreibbaren Geschmacks, wurden in den mit MWS, GA und CMC behandelten Weinen (Rot- und Weißwein) exemplarisch die Viskositäten bestimmt. Es wurde die dynamische Viskosität mittels Kugelfallviskosimeter (AMVn, Anton Paar) bestimmt. Abbildung 2-37 demonstriert den Viskositätsanstieg eines behandelten Weines (100–1000 mg/L) gegen die Kontrolle ohne CMC-Zusatz. Der Korrelationskoeffizient der Daten betrug 0,9928 und bestätigte einen linearen Zusammenhang zwischen Viskositätserhöhung und steigender CMC-Konzentration. Bei einem gesetzlich

reguliertem Zusatz von maximal 100 mg/L kann jedoch zusammengefasst werden, dass sich die Viskosität nur minimal ändert. Der Ausgangswert (0-Probe) lag bei 1,67 mPa\*s und für die Konzentration 100 mg/L bei 1,66 mPa\*s. Dieser Unterschied wurde auf die Methodenschwankung zurückgeführt und belegt, dass bei einem gesetzlichen erlaubten Zusatz von 100 mg/L keine Veränderung des Mundgefühls durch Viskositätserhöhung zu erwarten ist.

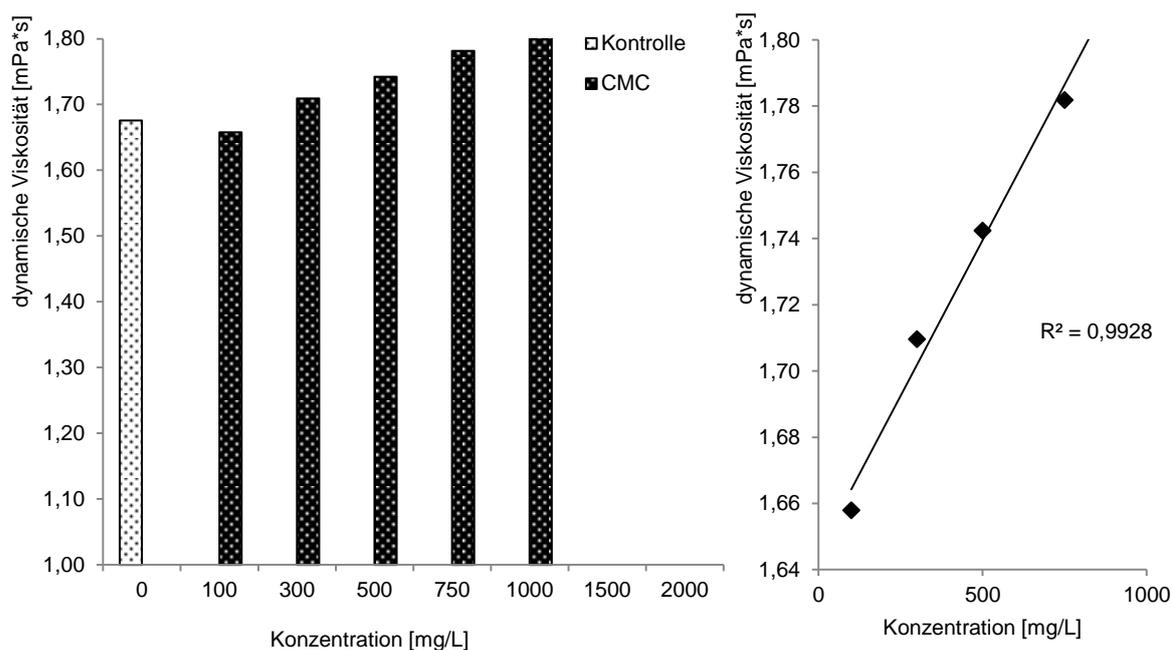


Abbildung 2-37 Viskositätsbestimmung von Wein versetzt mit CMC (0 - 1000 mg/L) (links) sowie der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und dynamischer Viskosität (rechts)

In Abbildung 2-38 zeigt die Viskositätsbestimmungen eines GA-haltiges Weines (100 und 2000 mg/L). Der Korrelationskoeffizient und die visuelle Auswertung lassen auf einen Anstieg der Viskosität bis zu einem bestimmten Punkt schließen, dann knickt die Gerade ab und es ist kein weiterer Anstieg zu verzeichnen. Der Korrelationskoeffizient zwischen 100 und 1000 mg/L betrug 0,994, welcher die Theorie einer Sättigung unterstützt und für einen linearen Zusammenhang lediglich bis 1000 mg/L ( $R^2 = 0,99$ ) spricht. Der Ausgangswert der Viskosität lag bei 1,53 mPa\*s. Für die empfohlene Dosis von 300 mg/L wurde eine Viskosität von 1,53 mPa\*s gemessen. Dieser Wert entspricht dem Null-Wert. Diese Werte bestätigten ebenfalls die in der Reizschwellerermittlung angenommenen Fakten, dass GA keinen Einfluss auf Mundgefühl und Sensorik des Weines hat. Selbst bei

der höchsten Konzentration von 2000 mg/L wurde lediglich ein Viskositätswert von 1,56 mPa\*s gemessen. Bei GA konnte somit ein minimaler Viskositätsanstieg verzeichnet werden.

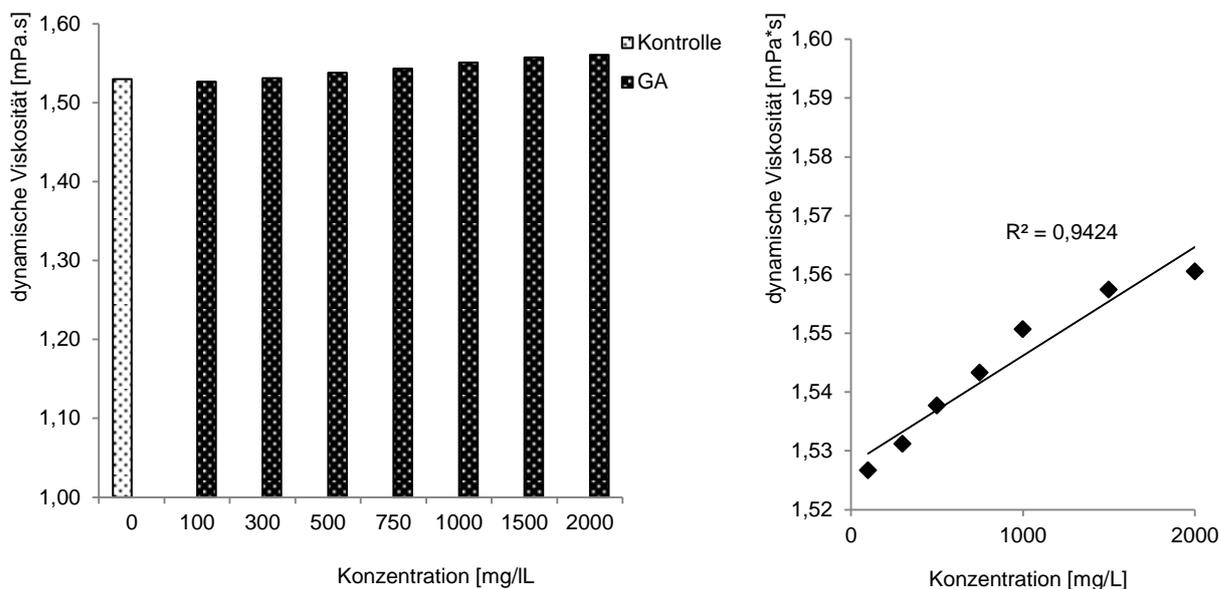


Abbildung 2-38 Viskositätsbestimmung von Wein versetzt mit GA (0 - 2000 mg/L) (links) sowie der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und dynamischer Viskosität (rechts)

Abbildung 2-39 zeigt die Korrelation der Viskositätsbestimmung von metaweinsäurehaltigem Wein in den Konzentrationen 100 – 2000 mg/L. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die MWS-Zusätze keinen Einfluss auf die Viskosität des Weins hatten. Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,54 war kein linearer Zusammenhang festzustellen.

Mit den Versuchen zur Ermittlung der Reiz- und Geschmacksschwelle und der Viskositätsbestimmungen in den Versuchsweinen konnten die ursprünglichen Annahmen, dass keiner der Zusatzstoffe in den gesetzlich erlaubten Zusatzmengen einen sensorischen Einfluss hat, bestätigt werden. Für CMC konnte in den getesteten Konzentrationen der größte Viskositätsanstieg verzeichnet werden. CMC müsste jedoch in weitaus höheren Konzentrationen eingesetzt werden als erlaubt (> 30 g/hL). Für GA können mit diesen Daten die Werbeaussagen der Hersteller widerlegt werden. GA hat keinen Einfluss auf die Fülle des Weines und beeinflusst bei Konzentrationen zwischen 10 und 200 g/hL nicht das Mundgefühl. Die

zugegebenen MWS-Konzentrationen korrelierten am wenigsten mit einer Zunahme der Viskosität.

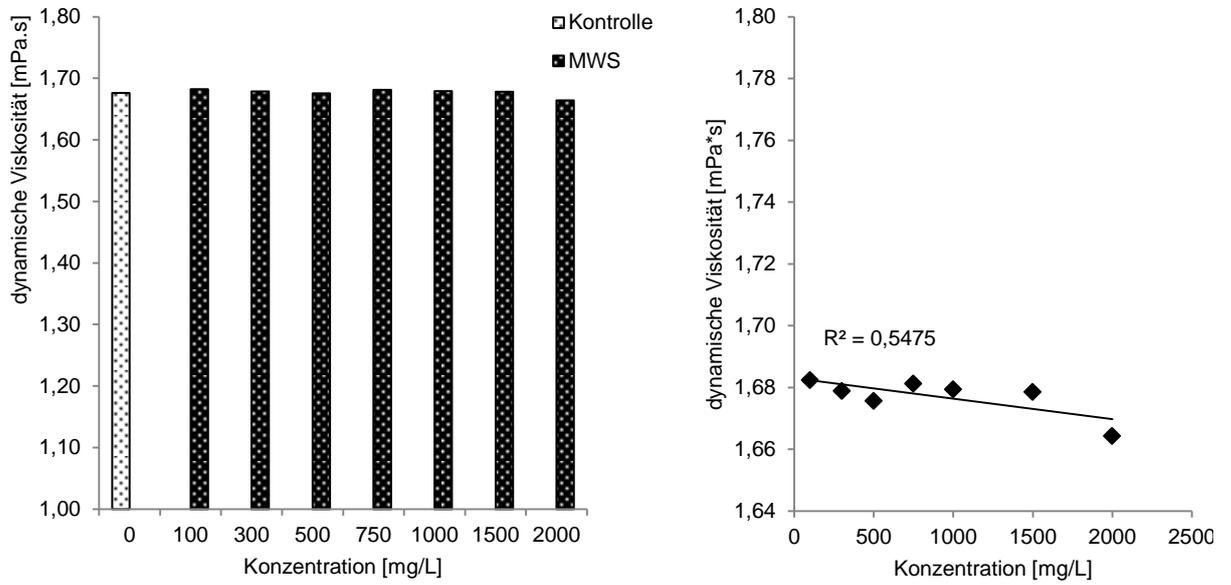


Abbildung 2-39 Viskositätsbestimmung von Wein versetzt mit MWS (0 – 2000 mg/L) (links) sowie der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und dynamischer Viskosität (rechts)

## **2.9 Befragung kleinerer Betriebe zur Verwendung der Zusatzstoffe**

Zur Bewertung der generellen Verwendbarkeit der Zusatzstoffe in kleineren Betrieben wurde ein Fragebogen an 110 Winzer versandt, zusätzlich wurde dieser bei der Betriebsleitertagung 2012 an der Hochschule in Geisenheim ausgelegt (Abbildung H im Anhang). Gefragt wurde anonym nach Kenntnis, Erfahrung und Verwendung sowie Planung der Verwendung der Zusatzstoffe in den jeweiligen Betrieben (Mehrfachnennungen möglich). Zusätzlich sollten Angaben gemacht werden, welche Produkte (flüssig oder fest) bevorzugt eingesetzt werden. Ebenfalls war der Anwendungsgrund von Interesse, da die Zusatzstoffe sowohl bei wesentlich instabilen Weinen als auch vorbeugend eingesetzt werden können.

Zur Auswertung standen nur 34 verwertbare bzw. ausgefüllte Fragebögen zur Verfügung. 20 von 34 Teilnehmern kennen alle drei Zusatzstoffe zur Anwendung in der Weinstabilisierung.

30 von 34 Teilnehmern haben Erfahrung in der Anwendung von Metaweinsäure, 13 in der Anwendung von Gummi Arabikum und zehn bei der Anwendung von Natrium-Carboxymethylcellulose (Mehrfachnennung möglich).

Bei der Frage nach der Verwendung im eigenen Betrieb benannten 18 die Anwendung von MWS, vier von MWS und CMC, jeweils drei Teilnehmer verwendeten GA und MWS oder nur CMC. Vier Teilnehmer verwendeten keine Zusatzstoffe.

Bei der Frage der Bevorzugung von festen oder flüssigen Produkten, stellte sich klar heraus, dass flüssige Produkte bevorzugt angewendet werden (18 von 34).

Vorbeugend würden 15 von 34 Teilnehmern die Zusatzstoffe einsetzen, 18 würden die Stoffe nur einsetzen, wenn der Wein zur Kristallinstabilität neigt (eine Enthaltung).

Abschließend lässt sich aus dieser begrenzten Datengrundlage zusammenfassen, dass Metaweinsäure das bekannteste und bevorzugte Produkt ist. Bei dem Einsatz der Zusatzstoffe scheideten sich die Teilnehmer in zwei Gruppen. Es ist davon auszugehen, dass die Zusatzstoffe sowohl vorbeugend als auch bei Weinen angewendet werden, die zur Instabilität neigen. Nur rund 10 % der Befragten verzichten gänzlich auf die Anwendung der Zusatzstoffe. Flüssige Produkte werden bevorzugt, da deren Handhabung wesentlich einfacher ist.

### **3 Diskussion**

Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC), Metaweinsäure (MWS) und Gummi Arabikum (GA) werden aus Sicht der Winzer aus verschiedenen Gründen als Additive im Wein eingesetzt. Dabei sollen vor allem CMC und MWS vor kristallinen Ablagerungen in Form von Weinstein am Flaschenboden schützen. Mit einer Menge von 100 mg/L sind diese Zusatzstoffe, im Gegensatz zu Gummi Arabikum, höchstmengenreguliert. Ausgehend von Werbeaussagen wird GA eingesetzt, um das Mundgefühl zu verbessern, vor Kupfer- und Eisentrübungen zu schützen und zur Abrundung von hoher Adstringenz. Dabei wird eine Einsatzmenge von 300 mg/L empfohlen. Anders als beispielsweise Allergene im Wein, sind diese Stoffe nach europäischem Weinrecht nicht deklarationspflichtig. Der Zusatz im Wein ist in Europa, Australien und Neuseeland erlaubt, in den USA, Japan und Südafrika generell verboten. Wein und auch Traubenmost gehören in diesen Ländern zu beliebten Exportgütern. Die Anwendung der Zusatzstoffe für Traubenmost erhielt in keinem Land eine Zulassung. Aufgrund von Filtrationsproblemen, beispielsweise der Verblockung von Filterschichten, kann es im Import- bzw. Exportgeschäft zu Differenzen zwischen Händlern kommen, wenn unter Umständen der Zusatz der Stoffe vermutet aber nicht nachgewiesen werden kann. Das Problem der Verblockung von Filterschichten kann zusätzlich zu großen finanziellen Einbußen für Winzer führen. Denn die Filtermaterialien sind teuer und mit dem Phänomen der Verblockung unbrauchbar. Generell können geeignete Nachweismethoden aber auch zur Überprüfung der gesetzlich festgelegten Höchstmengen dienen. Zugleich liefern sie Werte, mit denen die Wirkung oder die Qualität der kommerziellen Produkte eingeschätzt werden könnten.

#### **3.1 Gummi Arabikum (GA)**

Die strukturelle Ähnlichkeit von GA- und Weinkolloiden stellte eine analytische Herausforderung dar (Abschnitt 1.2.3.1). In der vorliegenden Arbeit wurden aus 25 deutschen Weißweinen, aus sechs Anbaugebieten, jeweils die Kolloidfraktion ohne einen GA-Zusatz (Kontrolle) und mit einem Zusatz von 300 mg/L (Probe) isoliert. Bestimmt wurden der Gesamtkolloidgehalt, die Zuckerbausteinzusammensetzung neutraler und saurer Zucker und die Stabilisotopenverhältnisse der vier Elemente Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoff. Zusätzlich wurden oenologische GA-Zusatzstoffe und ungereinigte bzw. nicht vorbehandelte GA-Proben aus dem

Sudan analysiert. Der statistische Vergleich von isolierten Kolloiden aus unbehandelten ( $\bar{x} = 400$  mg/L) und behandelten ( $\bar{x} = 680$  mg/L) Weinen, verhielt sich höchstsignifikant. Durchschnittlich konnten 280 mg/L GA-Zusatz detektiert bzw. wiedergefunden werden. Dessen ungeachtet stellt der signifikant unterschiedliche Kolloidgehalt aber kein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal von unbehandelten und behandelten Weißweinen dar. So unterliegt der Gesamtkolloidgehalt eines Weines generell natürlichen Schwankungen und anderen Einflussbedingungen, wodurch Gehalte zwischen 150 und 500 mg/L entstehen, was wiederum eine Identifizierung des Zusatzstoffes erschwert. Einfluss auf den natürlichen Kolloidgehalt eines Weines nehmen z. B. die Traubensorte, Alterungs- bzw. Lagerbedingungen, technologische Schritte während der Weinbereitung (Pressen), Nutzung von Enzymen bei der Maischebereitung und Filtrationsschritte. Zusätzlich könnte auch durch andere kolloidale Zusatzstoffe wie beispielsweise CMC oder MWS ein erhöhter Gesamtkolloidgehalt verursacht werden (Sprenger *et al.* 2014).

Die Zuckermomerverteilung lieferte hingegen weitaus aussagekräftigere Ergebnisse. GA-Produkte bestehen im Wesentlichen aus D-Galactose (30 %), L-Arabinose (27 %) und D-Glucuronsäure (4 %). Darüber hinaus ist L-Rhamnose zu ca. 4 % und keine D-Galacturonsäure enthalten (vgl. Tabelle 2-1 im Abschnitt 2.1.3). Die GA-Zusätze verursachten eine erhebliche und statistisch teilweise hochsignifikante Verschiebung der Konzentrationen der Monosaccharide in einem GA-haltigen Weinkolloid. Im Mittel änderte sich die Konzentration von L-Arabinose von 4 % im unbehandelten Weinkolloid (Kontrolle) auf 18 % im behandelten Weinkolloid (Probe). Die Konzentration von D-Galactose erhöht sich von 11 % auf 24 %, D-Glucuronsäure von 0,9 auf 2,7 % und D-Mannose verringert sich von Kontrolle zur Probe von 28 % auf 14 %. Dies sind weitere analytische Merkmale für den Zusatz von GA zu Weißweinen (vgl. Tabelle 2-2 in Abschnitt 2.1.2).

Zur Beurteilung konnte weiterhin das L-Ara/D-Gal-Verhältnis herangezogen werden. Mit 1:0,8 im GA-haltigen Weinkolloid verschiebt es sich zu Gunsten des Verhältnisses von reinem GA, wobei weineigene Kolloide ein Verhältnis von 1:0,3 zeigen. Diese Verschiebung resultiert aus den hohen L-Arabinose und D-Galactosegehalten, deren Verhältnis im reinem GA bei nahezu 1:1 liegt (vgl. Tabelle 2-3 im Abschnitt 2.1.3.1).

Absolute analytische Sicherheit könnte darüber hinaus die Analyse der Stabilisotopenverhältnisse der Elemente, speziell des  $\delta^{18}\text{O}$  Wertes, liefern. Durch

den geografischen Unterschied des Anbaus von Rebe und Akazie reagierte der Sauerstoffisotopenwert der isolierten Kolloide empfindlich auf den Zusatz von GA im Weißwein. Isolierte Weißweinkolloide (Kontrolle) zeigten durchschnittlich einen  $\delta^{18}\text{O}$ -Wert von 23 – 25 ‰. Reine GA-Produkte zeigten im Mittel  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von 32 ‰. Die wesentlich positiveren  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte der Zusatzstoffe hatten zur Folge, dass die isolierten GA-haltigen Weinkolloide (Proben)  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von bis zu 27 ‰ aufwiesen. Dies drückte sich in signifikanten Unterschieden der  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte der Weißweinkolloide mit und ohne Zusatz aus dem Jahr 2012 aus (Sprenger *et al.* 2014) (vgl. Abschnitt 2.1.4).

Die multivariate Betrachtung der Versuchsergebnisse mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) erbrachte zusätzliche Erkenntnisse. Basierend auf Gesamtkolloidgehalt, Gesamtzuckergehalt, Gehalt der einzelnen Monosaccharide und der Isotopenverhältnisse der vier Elemente, wurde eine klare Trennung der Kontrollen (ohne GA-Zusatz) und Proben (mit 300 mg/L GA) erreicht. Maßgeblich für die Gruppentrennung waren hier D-Glucuronsäure, der Gesamtkolloidgehalt, der Gesamtzuckergehalt und die  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte der isolierten Kolloide. Darüber hinaus wurde das System stark von den Gehalten an L-Arabinose und D-Galactose beeinflusst. Weiterhin erbrachte diese Auswertung die Erkenntnis, dass ein hoher Gehalt an L-Arabinose und D-Galactose mit einem geringen Gehalt an D-Mannose direkt korreliert.

Der Interpretation nach, wird die Trennung der Proben am meisten von den Verschiebungen der Zuckerkonzentrationen durch den Zusatz von 300 mg/L GA beeinflusst, was wiederum die Einzelbetrachtungen der Versuchsergebnisse stützte (vgl. Abschnitt 2.1.5).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der hier aufgeführte qualitative Nachweis von GA in deutschen Weißweinen, ausgehend von einer umfangreichen Probenvorbereitung, spezifische analytische Geräte erfordert. Mit der Ultrafiltration (Cutoff 10 kDa) und der sich anschließenden gravimetrischen Analyse des Gesamtkolloidgehaltes (Gravimetrie der getrockneten Kolloide), der sauren Hydrolyse und der anschließenden Analyse der Zuckerbausteinzusammensetzung mittels HPAEC-PAD-Messung sowie der Bestimmung der Isotopenverhältnisse der Elemente am TC- oder EURO/EA-IRMS, bedarf es einer anspruchsvollen instrumentellen Ausstattung. Die richtige Interpretation der Analysendaten erfolgte durch den Einsatz chemometrischer Werkzeuge (Signifikanztests,

Hauptkomponentenanalyse). Den ursprünglichen Anforderungen, dass eine qualitative und/oder quantitative Analysenmethode einfach und spezifisch sein sollte, kann diese Nachweismethode nicht gerecht werden. Allerdings bietet sie gute Anhaltspunkte, welche in Zukunft genutzt werden könnten. Weiterhin sollte der Zusatz zu Traubensaft überprüft werden. Hier könnte sich die chemisch noch größere Ähnlichkeit der Kolloide aus Traubensaft und GA als analytisches Hindernis erweisen. Beispielsweise kommt durch die fehlende Gärung, im Gegensatz zu Weinkolloiden, in den Traubensaftkolloiden keine D-Mannose vor. Deren Konzentrationsverschiebung war in dieser Studie ein eindeutiges Indiz für einen GA-Zusatz. Da es gesetzlich keine Höchstmengenbeschränkung für GA gibt, reicht ein qualitativer analytischer Nachweis aus, um die gesetzlichen Vorgaben überprüfen zu können (Sprenger *et al.* 2014).

Der Zusatz von 300 mg/L GA zu einem Weißwein ist ein von den Herstellern empfohlener Wert, der in der Praxis nicht unbedingt eingehalten wird. Da GA keinem gesetzlichen Grenzwert unterliegt, kann es durchaus sein, dass es in der in weitaus höheren Konzentrationen eingesetzt wird. Demzufolge müssten die hier aufgezeigten Veränderungen in GA-haltigen Kolloiden noch eindeutiger werden.

Zusätzlich würde eine Datenbank mit den genannten Parametern von unterschiedlichen Jahren und größerem Probenvolumen mehr klärende und verlässliche Fakten bringen. Bei einer größeren Datenmenge könnte vielleicht ein statistischer Weg aufgezeigt werden, der es ermöglicht, Konzentrationsaussagen bezüglich des GA-Zusatzes zu treffen. In der Literatur finden sich zudem nur wenige Angaben zum Nachweis von GA neben Weinkolloiden, da die strukturelle Ähnlichkeit analytisch schwierig ist. Die von Gallina (2004) beschriebene Methodik über die Trennung eines GA-haltigen Weinkolloids durch Größenausschlusschromatografie (SEC) stellt einen ähnlichen Versuch dar, GA über die An- bzw. Abwesenheit von Monosacchariden zu identifizieren. Dieser Artikel unterstützt die gewonnenen Erkenntnisse, dass GA keine D-Glucose und D-Mannose enthält. In der Arbeit wird ein GA-haltiges Weinkolloid über SEC getrennt, das Ausschlussvolumen aufgefangen und auf die Anwesenheit von D-Glucose und D-Mannose, als peracetylierte Analyten, mittels GC-MS hin analysiert. Es wird davon ausgegangen, dass das Ausschlussvolumen der verwendeten Sephacryl-Säule, mit einem Trennbereich von  $10^4$  bis  $10^6$  Dalton, frei von Kolloidanteilen des ursprünglichen Weinkolloids ist und nur GA enthält. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass Teile von Weinkolloiden

ebenfalls sehr große Molekulargewichtsanteile aufweisen und das Ergebnis somit beeinflussen. Es wird davon ausgegangen, dass auch diese Methode nicht zweifelsfrei auf alle analytischen Herausforderungen, bei denen GA identifiziert und sogar semiquantifiziert werden soll, angewendet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden Molekulargewichte von Gummi Arabikum bestimmt. Die Analysen ergaben, dass GA größer ist als 500 kDa, aber je nach Herkunft sehr heterogene Molekulargewichte aufweist. Der bedeutendste Anteil von GA ist größer als 500 kDa und bestätigt damit die Annahme, dass ein Großteil des GA-Moleküls im Ausschlussvolumen der bei Gallina *et al.* (2004) verwendeten Säule eluiert (Gallina *et al.* 2004) (vgl. Abschnitt 2.4.5).

Zusätzlich wurde die Fällung von GA mit Lysozym aus Wein untersucht. Die Streulichtintensität der entstandenen Trübung sollte in Zusammenhang mit der Konzentration des Zusatzstoffes in Wein und Traubensaft gebracht werden. Diese Analytik stellt eine einfache Möglichkeit der Identifizierung oder sogar Quantifizierung des Zusatzstoffes dar. Allerdings ist GA kein negativ geladenes Biopolymer, wodurch keine deutliche und messbare Trübung mit dem positiv geladenen Protein Lysozym entstand. Die geringen Trübungen hatten keinen linearen Konzentrationszusammenhang und konnten zur weiteren Identifikation für eine Infrarot-Analyse (ATR) nicht isoliert werden. Somit brachte die Fällung von GA aus Weißwein mittels Lysozym keinen nennenswerten Erfolg (vgl. Abschnitt 2.5).

Mahendran (2008) zeigte neue strukturelle Erkenntnisse der Arabinogalactanproteinfraktion (AGP) von Gummi Arabikum und veröffentlichte Konzentrationen von L-Arabinose (40 %), L-Rhamnose (12 %) und D-Galactose (34 %) (Mahendran *et al.* 2008).

Die in der Analytik dieser Arbeit eingesetzten Methoden gehen auf die bereits 1989 veröffentlichten Ergebnisse von Randall *et al.* (1989) zurück. In dieser Arbeit wurden die Zuckerbausteine, nach saurer Hydrolyse (4%ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und anschließender Neutralisation mit Bariumcarbonat, chromatografisch analysiert. Die Separation gelang an einer stationären Phase bestehend aus kovalent gebundenen Aminogruppen (Säule) und Acetonitril-Wasser-Eluenten sowie RI-Detektion der Analyten. Die Aminogruppen wirken als schwache Ionentauscher. Diese Analytik ist anfällig gegenüber geringer Salzkonzentrationen aus der Neutralisation mit Bariumcarbonat. Randall (1989) veröffentlichten die mit dieser Analytik bestimmten monomeren Zuckerbausteine des Gummi Arabikums. Die untersuchten Gummi

Arabikum Proben enthielten zu 41 % D-Galactose, zu 25 % L- Arabinose und zu 14 % L-Rhamnose (Randall *et al.* 1989).

Im Mittel enthielten die in der vorliegenden Arbeit analysierten kommerziellen GA-Produkte 32 % D-Galactose, 26 % L-Arabinose und 6 % L-Rhamnose. Damit konnten die Konzentrationsverteilungen der neutralen Zucker von Randall (1989) bestätigt werden. Zusätzlich wurde der Gehalt an D-Glucuronsäure bestimmt, dieser betrug durchschnittlich 5 %.

In der Studie von Mahendran (2008) wurden Aminosäuregehalte von 0,71 % für Hydroxyprolin, 0,18 % für Prolin, 0,3 % für Serin und 0,19 % für Threonin beschrieben. Die ermittelten Gesamtproteingehalte der analysierten Produkte lagen bei 2,52 % (Mahendran *et al.* 2008).

Die Identifizierung von Aminosäuren der analysierten Produkte in der vorliegenden Arbeit ergab ebenfalls als häufigste Aminosäuren Hydroxyprolin (2 %), Prolin (0,5 %), Serin (0,2 %) sowie Threonin (0,1 %) sowie einen Gesamtproteinanteil von 2,8 % (vgl. Abschnitt 2.6.2). Die OIV beschreibt in der Monographie für Gummi Arabikum einen Gesamtstickstoffgehalt von  $\leq 0,4$  % (Abschnitt 1.2.2). Dieser Wert ist den postulierten Werten aus der Literatur und den Versuchsergebnissen nach zu gering. Mahendran (2008) zeigte zusätzlich Molekulargewichtsverteilungen von GA, welche mittels SEC-RI-MALS analysiert wurden. Beschrieben wurden die Chromatogramme als Elutionsprofile (RI), die aus zwei Hauptpeaks bestehen (Mahendran *et al.* 2008). Diese Profile konnten bei allen analysierten GA Proben ebenfalls bestätigt werden (vgl. Abschnitt 2.4.5 und Abbildungen D im Anhang).

Zur Analyse des Lichtstreuensignals und der Auswertung des absoluten Molekulargewichtes der GA-Proben, wurde der  $dn/dc$ -Wert bestimmt und mit dem in der Literatur verfügbaren Wert verglichen. Huglin veröffentlichte bereits 1989 einen  $dn/dc$ -Wert für Gummi Arabikum von 0,145, dieser konnte experimentell mit einem Wert von 0,140 bestätigt werden (Huglin 1989) (vgl. Abschnitt 2.4.2).

Die Auswertung des absoluten mittleren Molekulargewichts ( $M_w$ ) der GA-Proben ergab Werte von  $3 \times 10^5$  bis  $1,1 \times 10^6$  g/mol und bestätigte somit die von Mahendran (2008) publizierten mittleren Werte von  $\sim 2 \times 10^6$  g/mol. Zusätzlich ergab die Auswertung der Polydispersität ( $M_z/M_n$ ) einen mittleren Wert von 1,43, welcher für eine geringe Polydispersität der GA-Proben und somit für ein homogenes Polymer spricht (siehe Abschnitt 2.4.5) (Mahendran *et al.* 2008).

Weiterhin wurden der Aschegehalt, die Mineralstoff- und Spurenelemente-Zusammensetzung und die organischen Säuren in flüssigen Handelsprodukten bestimmt. Die OIV beschreibt in der Monographie für Gummi Arabikum einen Aschegehalt von  $\leq 4\%$  (Abschnitt 1.2.2), dieser konnte mit einem mittleren Gehalt von  $2\%$  für die kommerziellen GA-Produkte bestätigt werden. Zusätzlich lieferten die Analysen zu organischen Säuren Erkenntnisse über die Stabilisierung der flüssigen Zusatzstoffe mit Citronensäure und Essigsäure (vgl. Abschnitt 2.6.2 und Tabelle E im Anhang).

Die Analyse des beschreibbaren Geschmacks und der Reizschwelle von GA kam zu dem Ergebnis, dass ab einer Konzentration von  $750\text{ mg/L}$  ( $75\text{ g/hL}$ ) ein sensorischer Unterschied wahrnehmbar ist. Jedoch konnte dieser Geschmack erst ab einer Konzentration von  $1500\text{ mg/L}$  ( $150\text{ g/hL}$ ) als bitter beschrieben werden. Die normale Dosageempfehlung der Hersteller liegt bei  $30\text{ g/hL}$  und ist damit fünffach geringer als die Schwelle des beschreibbaren Geschmacks. Wenn beim Einsatz von GA zur Weinbehandlung die empfohlenen  $30\text{ g/hL}$  eingehalten werden, kann davon ausgegangen werden, dass es in der Praxis zu keiner Beeinflussung des Mundgefühls und der organoleptischen Eigenschaften eines Weines kommt. Diese Annahmen unterstützen ebenfalls die Viskositätsmessungen der Versuchsweine die in aufsteigenden Konzentrationen mit GA behandelt wurden. Der Viskositätsanstieg von Nullprobe (unbehandeltem Wein) zu Wein mit  $30\text{ g/hL}$  lag lediglich bei  $0,0013\text{ mPa}\cdot\text{s}$  und zur höchsten Konzentration ( $200\text{ g/hL}$ ) bei  $0,03\text{ mPa}\cdot\text{s}$ . In Verbindung mit den durchgeführten Viskositätsmessungen kann geschlussfolgert werden, dass ein GA-Zusatz einen minimalen Viskositätsanstieg hervorruft, der keinen nennenswerten Einfluss auf die Weinsensorik hat (siehe Abschnitt 2.7 und 2.8).

Diese Ergebnisse stimmen mit der Arbeit von Constantin 2011 überein. Hier lag der Viskositätsunterschied von GA-Zusätzen von  $0$  zu  $2000\text{ mg/L}$  ( $200\text{ g/hL}$ ) in verschiedenen Weinen bei  $0,04$  bis  $0,05\text{ mPa}\cdot\text{s}$ . Die Arbeit untersuchte sensorisch GA-Zusätze mit einem geschulten Prüferpanel hinsichtlich eines wahrnehmbaren Unterschieds durch GA-Zusätze und den Einfluss der eingesetzten Menge in zehn verschiedenen Weinen. In Dreieckstests musste die abweichende Probe mit einem Zusatz von  $200\text{ mg/L}$  bzw.  $300\text{ mg/L}$  erkannt werden, zusätzlich konnten die Prüfer ihre Entscheidung begründen. In keinem der zehn behandelten Weine konnte der GA-Zusatz signifikant (8 von 10 Teilnehmern) erkannt werden. Darüber hinaus

wurden die Begriffe Adstringenz, Viskosität, Geschmeidigkeit und Süße bei der Wahl der Probe angegeben. Des Öfteren stimmte die Wahl der Begrifflichkeit zur Beschreibung des Geschmackseindrucks des Weines, nicht mit der Entscheidung der Prüfer bezüglich der Probe überein. Es wurden unbehandelte Proben mit diesen Begriffen beschrieben, was kontrovers zu den beschriebenen Wirkungen eines GA-Zusatzes stand. Weiterhin wurde versucht, Erkennungsschwellen zu ermitteln. Weine zwischen 300 mg/L und 2000 mg/L GA-Zusatz wurden aufsteigend verkostet, wobei heraus gearbeitet wurde, dass die Erkennungsschwelle von GA oberhalb von 2000 mg/L liegt. (Constantin *et al.* 2011)

### 3.2 Metaweinsäure (MWS)

Die Diskussion der Ergebnisse mit aktueller Literatur ist aufgrund nicht vorhandener Veröffentlichungen über den Zusatzstoff Metaweinsäure schwierig. Selbst die internationale Organisation für Rebe und Wein (OIV) gibt in der Monographie zu Metaweinsäure keine analytischen Parameter an (Abschnitt 1.2.2).

Erste analytische Anhaltspunkte, MWS massenspektrometrisch zu detektieren, lieferte eine Diplomarbeit der Gesellschaft für Lebensmittelforschung (GfL) in Berlin (Lehner 2010).

Die vollständige Abtrennung (Clean Up) störender Matrixbestandteile in einem mit MWS behandelten Weißwein sowie die Aufkonzentrierung des Zusatzstoffes mittels Festphasenextraktion (SPE) und der anschließenden Analyse mittels LC-MS stellt eine quantitativ anwendbare Analysenmethode dar. Das Metaweinsäure-Oligomer eluierte separiert von dimerer und monomerer Weinsäure (Abbildung 2-7 im Abschnitt 2.2.2). MWS zeigte ein spezifisches Massenspektrum mit dem Hauptfragment der monomeren Weinsäure ( $m/z$  149  $[M-H]^{-1}$ ) gefolgt von Dimer ( $m/z$  281  $[M-H]^{-1}$ ), Tetramer ( $m/z$  545  $[M-H]^{-1}$ ), Pentamer ( $m/z$  677  $[M-H]^{-1}$ ) und Hexamer ( $m/z$  809  $[M-H]^{-1}$ ) mit akzeptablen Intensitäten (Abbildung 2-5 im Abschnitt 2.2.1). Ab dem Hexamer ging die Intensität im Massenspektrum stark zurück. Dies lag vermutlich daran, dass entweder hohermolekulare Strukturen der MWS in den untersuchten Produkten kaum vertreten waren oder das verwendete Massenspektrometer bis zu einem  $m/z$ -Verhältnis von maximal 2000 detektiert und für größere Moleküle auf Geräte für polymere Substanzen mit einer größeren Auflösung zurückgegriffen werden sollte. Hierzu zählt die hochempfindlich und auf große sowie komplex aufgebaute Moleküle anwendbare Analysetechnik MALDI-TOF-MS (**Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-**

Flight Massenspektrometrie). Aufgrund der stark zurückgehenden Intensität, wurde die Methode im SIM-Modus auf die für Metaweinsäure spezifischen Fragmente vom Trimer bis zum Hexamer beschränkt (Abbildung G im Anhang). Die Überprüfung der Methode ergab einen linearen Arbeitsbereich von 50 - 200 mg/L, mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,998 und deckt somit die Bestimmung von Metaweinsäure um den gesetzlichen Grenzwert von 100 mg/L ab. Die Wiederfindung des Zusatzstoffes lag bei 99 %. Zusätzlich wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenze definiert, diese lagen bei 10 bzw. 35 mg/L. Somit konnte ab einer Metaweinsäure-Konzentration von 35 mg/L der Zusatzstoff quantitativ erfasst und ab 10 mg/L qualitativ nachgewiesen werden (Tabelle 2-7 im Abschnitt 2.2.2.) (Sprenger *et al.* 2015).

Durch Fällung von MWS in Traubensaft und Wein mittels Lysozym und der anschließenden IR-Analyse des isolierten und getrockneten Niederschlags, konnte eine effektive und einfache Identifizierung des Zusatzstoffes etabliert werden. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit ein MWS-haltiger Weißwein und Traubensaft mit einer Lysozymstammlösung versetzt und die konzentrationsabhängige Streulichtintensität der entstandenen Trübung gemessen. Die Korrelation zwischen Metaweinsäurekonzentration und der mittels Streulicht erfassten Intensität der entstandenen Trübung war linear ( $R = 0,993$ ) und ermöglichte eine Angabe der Konzentration von Metaweinsäure in Weißwein und Traubensaft zwischen 20 mg/L und 150 mg/L. Über diesen Konzentrationsbereich hinaus, trat eine Sättigung der Trübung auf und der Korrelationskoeffizient verschlechtert sich. (Abschnitt 2.5 und Abbildung B im Anhang). Bei der Messung der Streulichtintensität besteht jedoch die Möglichkeit, die Probe geeignet zu verdünnen. Mit der Analyse der Streulichtintensität und der Bestimmung der Konzentration ließ sich Metaweinsäure allerdings nicht ohne weiteres von anderen Zusatzstoffen unterscheiden, da auch Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC) mit Lysozym gefällt werden konnte. Hier konnte die ATR-Analyse des isolierten Trubs Aufschluss geben. Der Metaweinsäure-Lysozym-Trub zeigt hier bei einer Wellenzahl von  $1330 - 1050 \text{ cm}^{-1}$  die charakteristische Esterbindung des Polymers (-CO-O-), welche bei der ATR-Analyse von CMC-Trub fehlte (Abbildung 2-27 in Abschnitt 2.5.1).

Die Analyse der Zusammensetzung kommerzieller MWS-Produkte bestätigte die eingangs beschriebenen Fakten dieses Zusatzstoffes (Abschnitt 1.2.4). Riberëau-Gayon beschrieb MWS als „dispergierte Polymere“, diese Annahme wurde durch die

Analytik der Zusammensetzung (Weinsäuregehalte mittels LC-MS und IC) und der absoluten Molekulargewichte (SEC-RI-MALS) bestätigt (Riber au-Gayon *et al.* 2000).

Im Mittel enthielten die kommerziellen MWS Produkte 9 – 18 % monomere Weinsäure. In der EU ist der Zusatz von MWS auf 100 mg/L (10 g/hL) gesetzlich begrenzt. Mit diesem niedrigen Grenzwert kommen praxisbezogen etwa 10 – 20 % weniger Stabilisierungsmittel in den Wein, als vorgesehen. Diese 10 – 20 % monomere Weinsäure haben keinen stabilisierenden oder sonstigen Effekt. Hohe Gehalte an monomerer Weinsäure führen außerdem zu inhomogenen und polydispersen Produkten (Abschnitt 2.6.1.1).

Mit der Analytik des relativen und absoluten Molekulargewichtes der sieben verwendeten MWS-Produkte konnte gezeigt werden, dass MWS ein mittleres Molekulargewicht von 10.000 g/mol hat. Die Molekularmasse von 10 kDa würde einer Veresterung von lediglich 75 monomeren Weins ureeinheiten entsprechen. Differenzierter waren die Ergebnisse des absoluten Molekulargewichtes, hier traten mittlere absolute Gr o en von 2 bis 9 kDa auf. Damit zählt Metaweinsäure zu den mittelmolekularen Stoffen. Die Polydispersität lag bei allen Produkten weit über vier und im Mittel bei 30, was für sehr polydisperse und somit heterogene Produkte spricht (siehe Abschnitt 2.4.3). Ein Zusammenhang zwischen Stabilisierungseigenschaft und Polydispersität des Zusatzstoffes kann jedoch nicht getätigt werden. Aus chemischer Sicht ist aber die schnellere Hydrolyse zu monomerer Weinsäure bei Produkten mit heterogener Zusammensetzung, aufgrund von mehr Reaktionsflächen, wahrscheinlicher.

Für Metaweinsäure lag die Reizschwelle bei der sensorischen Überprüfung bereits bei 300 mg/L (30 g/hL), was der dreifachen gesetzlichen Höchstmenge entspricht. Jedoch konnte keine Schwelle des beschreibbaren Geschmacks ermittelt werden. MWS hat bei einer Zusatzmenge von 100 mg/L (10 g/hL), ebenso wenig wie GA oder CMC, einen sensorischen Einfluss auf behandelte Weine. Bis zu einer unüblichen Konzentration von 2000 mg/L (200 g/hL) konnten 50 % der Prüfer (Signifikanzwert) keine Beschreibung des Geschmacks darstellen. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich von durchgeführten Viskosit tsuntersuchungen unterstützt. Ausgehend von den Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass Metaweinsäure zwischen 0 – 2000 mg/L in Weißwein keinen linearen Viskositätsanstieg verursacht und somit

keinen Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften eines Weines nimmt (siehe Abschnitt 2.7 und 2.8).

Die Bestimmung verschiedener Charakterisierungsparameter (Tabelle D im Anhang) von sieben verschiedenen Metaweinsäure Zusatzstoffen ließ den Schluss zu, dass Metaweinsäure ein sehr reines Produkt ist. Es wurden weder Mineral- noch Spurenelemente in nennenswerten Konzentrationen detektiert. Die Trockenmasse lag im mittleren Bereich bei 96 %.

Bei der Befragung der Winzer-Betriebe, die die allgemeinen Verbraucher der Zusatzstoffe darstellten, kristallisierte sich in der Anwendung klar Metaweinsäure als bevorzugter Zusatzstoff heraus. Obwohl es diesen Zusatzstoff nur in fester Form gibt, ist dessen Anwendung durch die sehr gute Wasserlöslichkeit einfach und die Mehrheit der Befragten war von dessen Wirkung im Vergleich zu CMC und GA überzeugter (siehe Abschnitt 2.9).

### **3.3 Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC)**

Die in der Literatur beschriebenen Studien zur Substituentenverteilung lieferten die Grundlage zur Entwicklung einer analytischen Methode zur Identifizierung von CMC in Weißwein. In der vorliegenden Arbeit konnte eine qualitative Analysenmethode mittels HPAEC-PAD und vorangegangener saurer Hydrolyse für CMC entwickelt werden. Neben den weineigenen Monosacchariden, bestehend aus L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Galactose, D-Glucose und D-Mannose, ist es analytisch sinnvoll, die Bausteine der CMC zu erfassen, da diese natürlicherweise nicht in Weinkolloiden vorkommen. Chromatografisch wurden so die einfach substituierten Carboxymethylglucoseeinheiten von den Monosacchariden eines Weinkolloids getrennt (Kragten *et al.* 1992) und (Puls *et al.* 1998) sowie (Heinze *et al.* 1994).

Gezeigt werden konnte, das charakteristische Peakmuster der 6-O-CMG (6-O-Carboxymethylglucose), 2-O-CMG (2-O-Carboxymethylglucose) und der 3-O-CMG (3-O-Carboxymethylglucose). Aufgrund fehlender Standards, konnten die Analyten (monosubstituierte Carboxymethylglucosen) nur durch den Vergleich der Retentionszeit und dem Verhältnis der Peaks zueinander identifiziert werden. Mengenmäßig am häufigsten trat Glucose auf, gefolgt von den einfach substituierten Carboxymethylglucosen. In einer Mischprobe konnte die eindeutige Separierung der Monosaccharide aus einem Weinkolloid zu den monosubstituierten Carboxymethylglucosen gezeigt werden. Das typische Peakmuster zwischen 12,5 und 15 min der drei monosubstituieren Carboxymethylglucosen stellt ein eindeutiges

Unterscheidungsmerkmal von CMC und Monosacchariden der Weinkolloide dar (vgl. Abbildung 2-10 bis Abbildung 2-12 in Abschnitt 2.3). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich die Peakflächen der einfach-substituierten Carboxymethylglucosen linear verhalten. Hierzu wurde ein CMC-Hydrolysat ( $c = 1 \text{ g/L}$ ) eines festen CMC-Pulvers zwischen 50 und 500 mg/L verdünnt und mittels HPAEC-PAD analysiert. Aufgetragen wurden die gemessenen Peakflächen der einfach-substituierten Carboxymethylglucosen in Verbindung mit der jeweiligen Konzentration. Eine semiquantitative Bestimmung ist somit ebenfalls denkbar (Abbildung 2-13 und Abbildung 2-14 im Abschnitt 2.3).

Als chemisch stabilstes untersuchtes Polymer verursachte CMC dennoch große Probleme bei der Analyse. Die saure Hydrolyse mit 80%iger Schwefelsäure ist zeitaufwendig und führt zu stark gefärbten Reaktionsprodukten. Die anschließende Neutralisation mit Calciumcarbonat und die Fällung von Calciumsulfat sowie dessen Abtrennung durch Rotationsverdampfung sind vom analytischen Aufwand her nicht zeitgemäß.

Beschrieben wurde ebenfalls der Abbau des Polymers mit Perchlorsäure, welcher sich als nicht praktikabel herausstellte, da die anschließende Gefriertrocknung zur vollständigen Zersetzung der CMC-Proben führte (Adden 2009).

Einen ähnlichen Ansatz beschrieb Saake (2001), wobei neben Perchlorsäure auch Schwefelsäure für die saure Hydrolyse eingesetzt wurde (Saake *et al.* 2001).

Dabei ergab die Hydrolyse von CMC mit einem Substitutionsgrad von 0,9 mittels Perchlorsäure eine Ausbeute an Carboxymethylglucosen von 87,1 % und mit Schwefelsäure von 69,7 %. Da Perchlorsäure im Labor das größere Gefahrenpotenzial aufweist, ist die Verwendung von Schwefelsäure die bessere Alternative. Die saure Hydrolyse mit 80%iger Schwefelsäure entspricht in etwa der bei Weinpolysacchariden üblichen Hydrolyse mit 72%iger Schwefelsäure. Die Verdünnung der 72%igen Schwefelsäure mit Wasser führt zu einer Säurekonzentration von 1,1 mol/L in der Probenlösung. Die Verdünnung der 80%igen Schwefelsäure mit Wasser führt zu einer Säurekonzentration von 1,4 mol/L (vgl. Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2). Da bei der Hydrolyse von Weinpolysacchariden auf die Neutralisation des Hydrolysates verzichtet wird und direkt die Analyse an der HPAC-PAD erfolgt, kann bei ähnlichen Säurekonzentrationen in Zukunft getestet werden, ob die hier beschriebene saure Hydrolyse für die CMC-Methode, ohne

Neutralisation mit Calciumcarbonat, die gleichen Resultate erbringt. Dies wäre ein sinnvoller Ansatz, die aufwendige Analyse zu optimieren.

Die Identifizierung und Kalibrierung und somit die abschließende Absicherung der Methode kann nur erreicht werden, wenn die Standardsubstanzen der monosubstituierten Carboxymethylglucosen entweder quantitativ aus Hydrolysaten gewonnen werden oder präparativ organisch hergestellt werden. Hierzu sind zwei Wege denkbar. Saake *et al.* (2001) hydrolysierten, wie bereits erwähnt, CMC mittels Schwefel- oder Perchlorsäure. Anschließend erfolgte eine Entsalzung des Hydrolysates an einer präparativen Säule des Typs Sephadex-G-15 (Fa. Pharmacia). Die niedermolekularen Substanzen wurden mit einer einfachen Farbreaktion (Orcinol-Methode; Vasseur 1948) identifiziert und abgetrennt (Saake *et al.* 2001). Anschließend erfolgt eine Aufkonzentrierung durch Gefriertrocknung. Die eigentliche Separierung aller acht Bausteine (D-Glucose, 6-O-CMG, 2-O-CMG, 3-O-CMG; 2,6-O-CMG; 3,6-O-CMG; 2,3-O-CMG und 2,3,6-O-CMG) erfolgt an einer präparativen Anionentauschersäule des Typs MonoQ-HR (Fa. Pharmacia) mittels steigenden Ammoniumacetat-Gradienten. Die Detektion wurde mittels Chiralitätsdetektor durchgeführt, der wiederum nötig ist, weil durch einen steigenden Salzgradienten eine Detektion über RI nicht möglich ist. Die Verwendung des flüchtigen Ammoniumacetats ermöglichte jedoch eine einfache Vorbereitung der Fraktionen für die weitere Analytik. Die relative Zusammensetzung der Fraktionen wurde über <sup>13</sup>C-NMR Analysen charakterisiert und bestimmt. Durch diese Methodik kann ein Standard erhalten werden, der die drei mono-substituierten Carboxymethylglucosen enthält, die wiederum am häufigsten in CMC vorkommen und das typische Peakmuster der hier etablierten Methode für Wein lieferten (Abbildung 2-10 im Abschnitt 2.3). Anhand der NMR-Daten und der Analyse eines solchen Standards an der HPAEC-PAD wäre eine Identifizierung und vollständige Kalibrierung der Methode möglich. Die analytischen Geräte für diese Methodik, insbesondere die Detektion mittels Chiralitätsdetektor, stellen eine anspruchsvolle analytische Ausstattung dar.

Eine weitere Möglichkeit ist die organische Synthese der monosubstituierten Bausteine. 3-O-Carboxymethylglucose könnte sich leicht aus Diaceton-Glucose (1,2:5,6-di-isopropylidenglucose bzw. Diaceton-D-Glucose) herstellen lassen. Diese ist an Position 1,2 und 5,6 des Glucosemoleküls geschützt und kann an der freien Position 3 der Glucose mit Bromessigsäureethylester, unter reduktiven Bedingungen (NaH), nach Verseifung sowie nach Abspaltung der Schutzgruppen in Position 1,2

und 5,6 mittels milder Säure, zu 3-O-Carboxymethylglucose führen (Rouquayrol *et al.* 2001).

6-O-Carboxymethylglucose könnte aus 1-Methylglucose hervorgehen. Denkbar wäre in einem ersten Schritt die primären und sekundären OH-Gruppen der 1-Methylglucose durch Acetylierung zu schützen und in einem weiteren Schritt selektiv die OH-Gruppe an Position 6 freizusetzen. Darauf könnte eine Carboxymethylierung unter reduktiven Bedingungen mittels Chloressigsäure an dieser Stelle folgen.

2-O-Carboxymethylglucose könnte aus Cyclodextrin hergestellt werden, das den Vorteil hat, an Position C-4 und C-1 keine freien Hydroxylgruppen zu haben. Die Silyl-Schutzgruppenchemie ermöglicht selektiv den Schutz der OH-Gruppen an Position C-2 und -6, wodurch eine anschließende Veretherung möglich würde. Bei dieser Reaktion lagert die Silylgruppe der Schutzfunktion aus Position C2 in alpha-1,4-Glucanen quantitativ in Position C-3 um und es entsteht das 2-O-Carboxymethylglucose-Derivat. Die organische Synthese ist aufwendig und die Chemie der Schutzgruppen erfordert einige zusätzliche Reinigungsschritte, da die meisten Reaktionen nicht quantitativ ablaufen und meist Ausgangsstoffe und andere Reaktionsprodukte im Produkt verbleiben. Die anschließende Charakterisierung kann mittels moderner IR-, MS- und NMR-Techniken erfolgen.

Eine einfache analytische Möglichkeit, CMC in Wein und Traubensaft zu identifizieren und quantitativ nachzuweisen, ist die Fällung des Zusatzstoffes mit dem Protein Lysozym. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit ein CMC-haltiger Weißwein und Traubensaft mit einer Lysozymstammlösung versetzt und die konzentrationsabhängige Streulichtintensität der entstandenen Trübung gemessen. Abbildung 2-22 im Abschnitt 2.5 zeigt den linearen Zusammenhang ( $R = 0,999$ ) zwischen Streulichtintensität der Trübung und dem CMC-Gehalt des Weißweins. Die anschließende Charakterisierung des getrockneten Trubs durch Infrarot-Analyse (ATR) ermöglicht anhand der charakteristischen Etherbindungen des Polysaccharids (-C-O-C-), die eindeutige Unterscheidung zwischen Metaweinsäure (MWS) und Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC) (vgl. Abbildung 2-28 im Abschnitt 2.5). Gleichermaßen funktioniert diese einfache Analytik in Traubensaft mit einem CMC Zusatz (Tabelle G und Abbildung B im Anhang).

Die sensorische Reizschwelle konnte für CMC bei 500 mg/L festgestellt werden. Der analysierte Konzentrationsbereich in Weißwein lag zwischen 0 und 1000 mg/L für CMC (sechs Konzentrationen). Damit konnte die von Will *et al.* 1991 bereits gezeigte

Reizschwelle, welche unterhalb von 600 mg/L lag, bestätigt werden (Will *et al.* 1991). Die Viskositätsmessungen zeigten zudem folgende Ergebnisse. Bei einem Konzentrationsanstieg von 100 bis 1000 mg/L CMC-Zusatz, konnte ein linearer Viskositätsanstieg verzeichnet werden. Der Korrelationskoeffizient der Daten betrug 0,9928 und bestätigte einen linearen Zusammenhang zwischen Viskositätserhöhung und steigender CMC-Konzentration. Bei einem gesetzlich reguliertem Zusatz von maximal 100 mg/L kann jedoch zusammengefasst werden, dass sich die Viskosität nur minimal ändert. Der Ausgangswert (0-Probe) lag bei 1,67 mPa\*s und für die Konzentration 100 mg/L bei 1,66 mPa\*s. Dieser Unterschied kann auf die Methodenschwankung zurückzuführen werden und belegt, dass bei einem gesetzlichen erlaubten Zusatz von 100 mg/L keine Veränderung des Mundgefühls durch Viskositätserhöhung zu erwarten ist (vgl. Abschnitt 2.7. und 2.8).

Viskosität wird überwiegend von den Bewegungsrezeptoren im Mund und auf der Zunge wahrgenommen. Smith *et al.* beschrieben eine lineare Viskositätserhöhung ( $R^2 = 0,978$ ) für CMC-Konzentrationen von 0 bis 8 g/L sowie einer sensorischen Beeinflussung der Adstringenz, welche durch eine Viskositätserhöhung vermindert wurde. So wurde die taktile Wahrnehmung der Adstringenz durch eine Viskositätserhöhung reduziert, die Bitterkeit blieb jedoch unbeeinflusst. Getestet wurden Lösungen mit CMC-Konzentrationen im g/L Bereich, die den gesetzlichen Rahmen um ein Vielfaches überstiegen (Smith *et al.* 1996).

Zur weiteren Charakterisierung der Handelsprodukte wurden Spurenelemente- und Mineralstoffgehalt bestimmt. Nach Vorgaben der OIV (vgl. Tabelle 1-2 im Abschnitt 1.2.2) sollten CMC-Produkte eine Trockenmassesubstanz von 99,5 % aufweisen und flüssige Produkte mindestens 3,5 % CMC enthalten. Im Mittel hatten die trockenen Produkte einen Trockenmassegehalt von 92 % und die flüssigen Produkte von 7 %. Da die bestimmte Trockenmasse erheblich von den Vorgaben abwich, kann gegebenenfalls an unterschiedlichen Analysemethoden liegen. Die hier angewandte Trockenmassebestimmung über die Ofenmethode (Trocknungsverlust), erfasst dabei den durch Trocknung erhaltenen Rückstand durch Wägung, wohingegen die Restfeuchte eines Produktes beispielsweise durch Karl-Fischer Titration direkt bestimmt werden kann. Die Vorgaben der OIV legen weiterhin einen Natriumgehalt von max. 12 % fest. Bei den untersuchten Produkten wurde ein mittlerer Natriumgehalt von 8 % festgestellt. Der Natrium-Gehalt stammt aus der organischen

Synthese mit Natronlauge und Chloressigsäure. Dabei stellt Natrium das Gegenion des negativ geladenen Polymers dar. (vgl. Abschnitt 2.6.3).

### 3.4 Bedeutung der Ergebnisse für die Önologie

**Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC)** gilt als zuverlässiges Behandlungsmittel gegen Weinsteinausfall. Dieser Zusatzstoff unterliegt keiner thermischen Anfälligkeit und die Wirkung sowie der Mechanismus der Tartratstabilisierung ist hinreichend belegt (Crachereau *et al.* 2001), (Bosso *et al.* 2010), (Gerbaud *et al.* 2010) und (Salagoity *et al.* 2011).

Die Arbeit von Claus *et al.* (2014) untersuchte die Stabilität von Rotweinen hinsichtlich des Einflusses von CMC auf die Tartratstabilität, der Proteintrübung und der Farbe. Die Kristallstabilität wurde mittels Minikontaktverfahren in allen zehn Rotweinen vor und nach Zugabe von 65 mg/L (6,5 g/hL) CMC nach 7 und 14 Tagen analysiert. In drei von zehn Rotweinen kam es zur Trübung und die trübungsrelevanten Proteine wurden nach der Lagerung der Weine bei 4 °C über vier Tage mittels Elektrophorese und LC-MS/MS charakterisiert. Die Daten gaben Aufschluss über die Bedingungen, unter denen es zu Proteintrübungen und Farbverlusten nach einem Zusatz von CMC kommen kann. Die Farbveränderungen wurden mittels VIS-Spektroskopie untersucht. Alle behandelten Weine waren stabil gegen Weinsteinbildung, drei Weinproben entwickelten signifikante Proteintrübungen, in diesen konnten thaumatinähnliche Proteine, Lipidtransferproteine aus *V. vinifera* identifiziert werden, welche per se in Rotwein als trübungsrelevant gelten. Fazit dieser Arbeit ist, CMC kann zur Tartratstabilisierung für Rotwein genutzt werden, führt aber gelegentlich zu Proteintrübungen und Farbverlusten, was den Einsatz dieses Zusatzstoffes wiederum limitiert. Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass CMC nützlich bei der Proteinentfernung sein könnte (Claus *et al.* 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Verbindung mit den Ergebnissen bezüglich der Fällung von CMC mit Lysozym der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt 2.5.2), ergibt eine neue Blickrichtung auf den Einsatz von Lysozym in Rot- und Weißweinen. Lysozym (E 1105) wird zur Verhinderung von ungewünschtem, spontanem biologischem Säureabbau in Rot- und Weißweinen eingesetzt und kann somit in CMC-haltigen Weiß- und Rotweinen die Bildung von proteinbedingten Trübungen verstärken. Das Enzym ist seit 2001 für die Anwendung in allen Stadien der

Weinbereitung (Maische, Most, Jungwein, Wein, Versektung) zugelassen und darf bis zu einer Menge von 500 mg/L (50 g/hL) zugesetzt werden. Dies entspricht der fünffachen gesetzlich zugelassenen Menge der Zusatzstoffe CMC und MWS (Sigler 2004); (Gerbaux *et al.* 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lysozym in Verbindung mit MWS- bzw. CMC-haltigen Wein und Traubensaft Trübungen verursacht.

Die Arbeiten von Guise *et al.* (2014) untersuchten verschiedenste CMC Polymere (Substitutionsgrad und Polymerisierung) hinsichtlich der Tartratstabilisierung, Mineralstoffkonzentration, phenolische Substanzen und sensorische Aspekte im Weißwein. Verglichen wurden die Ergebnisse mit anderen oenologischen Zusatzstoffen, wie Metaweinsäure und Gummi Arabikum. Die Studie kommt zu dem Schluss, dass CMC weder einen Effekt auf die Weinsäurekonzentration hat, noch die Konzentrationen an Kalium oder Calcium verändert oder sensorische Eindrücke beeinflusst. Die weinsteinstabilisierende Wirkung von CMC wird hier auf die Konzentration des Polymers, auf die Beschaffenheit der Weinmatrix und auf die anfängliche Konzentration des Kaliums im Wein zurückgeführt. Demnach beeinflussten alle CMC-Produkte die Tartratstabilisierung positiv. Dies ist unabhängig vom Grad der Substitution des Polymers, aber je höher die Konzentration von CMC war, desto stabiler war der Weißwein. Zusätzlich beschreibt die Arbeit, dass GA keinen Einfluss auf die Tartratstabilisierung hat. Ein sensorischer Einfluss von CMC in Weißwein konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die sensorische Reizschwelle für das Polymer konnte bei 500 mg/L (50 g/hL) festgelegt werden und lag damit bei der fünffachen Menge des gesetzlichen Grenzwertes (vgl. Abschnitt 2.7). Zusätzlich konnte mit den Untersuchungen zum absoluten Molekulargewicht gezeigt werden, dass die Molekulargrößen der untersuchten Zusatzstoffe zwischen 101 kDa und 650 kDa schwankten. Die Polydispersität zeigte Werte zwischen zwei und vier, was auf eine mittlere Polydispersität der Produkte schließen lässt. Die Arbeit von Guise *et al.* (2014) postuliert Molekulargrößen der CMC-Produkte von 334 bis 512 kDa. Die Arbeit kommt zu dem Schluss, dass keine Beziehung zwischen der Molekulargrößen des Polymers und der Weinstabilisierung hergestellt werden kann, jedoch ist es ratsam, bei einer hohen Instabilität des Weißweines CMC-Polymere mit höherem Substitutionsgrad einzusetzen (Guise *et al.* 2014).

Der Nachweis von CMC in Traubensaft und Wein stand im Fokus der vorliegenden Arbeit und kann qualitativ über die monomeren Bausteine der CMC erfolgen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine chromatografische Trennung der Zuckerbausteine der Weinkolloide und der Carboxymethylglucosen, als monomere Bausteine der CMC, analytisch durchgeführt werden kann. Aufgrund einer fehlenden Kalibrierung ist dieser Nachweis bisher nur qualitativ möglich. Es konnte aber gezeigt werden, dass sich die Konzentrationen der monomeren Bausteine der CMC mittels gezielter Analytik linear verhalten. Dies könnte für eine semiquantitative Bestimmung von CMC in Wein herangezogen werden.

Die Arbeiten von (Bosso *et al.* 2015) beschrieben die Weinbehandlungsmittel (MWS, CMC und Mannoprotein) als Stoffe, die ihre Grenzen haben. MWS gilt als effektiv jedoch als sehr instabil, kann aber bedenkenlos in Rot- und Weißwein eingesetzt werden. CMC gilt hier ebenfalls als stabil aber nur effektiv in Weißweinen, da es zu negativen Einflüssen auf die Farbstabilität bzw. auf die Phenole in Rotweinen kommen kann. Die aufgeführten Publikationen und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kommen zum gleichen Schluss. CMC ist ein effektives und lang wirkendes Weinbehandlungsmittel gegen Weinsteinbildung, jedoch nur zur Anwendung in Weißwein bestimmt. Der Zusatz im gesetzlichen Rahmen (100 mg/L) hat keinen Einfluss auf die Sensorik und beeinflusst nicht das Mundgefühl. Weine werden durch einen Zusatz von CMC nicht fülliger oder weicher..

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Zusammensetzung von **Metaweinsäure**-Produkten (MWS-Produkte) (vgl. Abschnitt 2.6.1) können die Aussagen zur Instabilität des Zusatzstoffes bekräftigt werden. Ein erheblicher Teil (9 – 18 %) der zugesetzten Metaweinsäure liegt als unveresterte Weinsäure vor. Bei einer Einsatzmenge von höchstens 10 g/hL bedeutet das, dass ca. 0,9 – 1,8 g Weinsäure in 100 L Wein gelangen können. Gleichermaßen gelangt ca. 20 % weniger Stabilisierungsmittel in den Wein. Bei einem durchschnittlichen Weinsäuregehalt von 200 – 600 g/hl (2 – 6 g/L je nach Weinanbaugebiet und Lage siehe Abschnitt 1.2.1) fällt die zugesetzte Menge an Weinsäure nicht ins Gewicht. Weiterhin konnten die mittleren Molekulargewichte der MWS-Präparate ermittelt werden. Im Vergleich zu CMC und GA ist MWS mittelmolekular und hoch-polydispers (ca. 10 kDa siehe Abschnitt 2.4.3) (Sprenger *et al.* 2015).

Derzeitig können keine Aussagen getroffen werden, inwieweit die Molekulargröße eines Polymers mitverantwortlich für dessen Wirkung gegen Weinsteinbildung ist. Es

kann aber daraus geschlossen werden, dass die Polydispersität von MWS zu schnellerer Zersetzung aufgrund von mehr Reaktionsflächen im Polymer führen könnte. Die Hydrolyse des Zusatzstoffes im Endprodukt ist temperaturabhängig. Beschrieben wurde eine Lagerstabilität von drei Monaten bei 20 °C und nur wenigen Stunden ab 35 °C (Riberřau-Gayon *et al.* 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine zuverlässige und spezifische quantitative Analysenmethode für MWS etabliert werden. MWS kann nach heutigem Kenntnisstand zweifelsfrei anhand der oligomeren Fragmente mittels massenspektrometrischer Detektion in Wein und Traubensaft analysiert werden.

Die durchgeführten Filtrationsversuche belegen, dass mit der Bildung einer Deckschicht zu Beginn einer Filtration, MWS zurückgehalten wird und Wein ohne Zusatzstoff in die Flasche gelangen kann (vgl. Abschnitt 2.6.1.2).

Weiterhin besteht bei mit MWS und Lysozym behandelten Weinen, ebenfalls die Gefahr der Trubbildung durch Fällung von MWS.

**Gummi Arabikum** (GA) wird beworben mit Aussagen wie: „(...) GA unterstützt die Kolloidstabilität (...)“; „(...) verstärkt die Wirkung von Metaweinsäure“, „(...) schützt vor Kupfer und leichten Eisentrübungen und Ablagerungen bei niedrigen Temperaturen(...)“, „(...) beeinflusst positiv die Wahrnehmung von Säure und Bitterkeit sowie der Adstringenz von Tanninen (...)“ und „(...) schützt junge Rotweine vor Pigmentablagerungen“. Selbst die Internationale Organisation für Rebe und Wein (OIV) nennt als Wirkung in der Monographie für GA den Schutz vor Ausfällung von Anthocyanen in Rotwein und die vorbeugende Wirkung gegen Kupfer und Eisentrübungen (vgl. Abschnitt 1.2.3). Die sensorischen Einflüsse eines GA-Zusatzes wurden hinreichend widerlegt. In den sensorischen Studien der vorliegenden Arbeit, konnte gezeigt werden, dass GA in hohen Dosagen (bis 200 g/hL) keinen sensorischen Geschmackseindruck hervorruft und auch keinen nennenswerten Viskositätsanstieg verursacht, der merklich das Mundgefühl bzw. die Fülle eines Weines beeinflussen würde. Anders als bei CMC, welches bereits bei einer Konzentration von 1000 mg/L (10-facher Grenzwert) einen Viskositätsanstieg von 0,15 mPa\*s verursachte, lag der Viskositätsanstieg bei einer GA-Konzentration von 2000 mg/L gegenüber zur Nullprobe lediglich bei 0,04 mPa\*s bis 0,05 mPa\*s. Zusätzlich ist nicht von einem Einfluss auf Adstringenz und Bitterkeit auszugehen, da die sensorischen Prüfungen von GA-haltigen Weinen zu keinem signifikanten

Ergebnis in der Beschreibung der Geschmacksunterschiede führten (siehe Abschnitt 2.7 und 2.8).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein GA-Zusatz von 300 mg/L (30 g/hL) zu Weißwein die Zusammensetzung und den Gehalt an Gesamtkolloiden signifikant verändert. Diese Ergebnisse können für eine geeignete Nachweismethode von Nutzen sein (siehe Abschnitt 2.1 ff.).

GA bildet keinen Niederschlag mit dem Protein Lysozym, somit ist bei der Anwendung von Lysozym zur Vermeidung des biologischen Säureabbau und der anschließenden Stabilisierung durch eine GA-Zugabe mit keiner Trübung durch Fällung des Lysozyms zu rechnen (siehe Abschnitt 2.5.).

### 3.4.1 Ausblick

Als weitere Zusatzstoffe für Wein sind derzeit die Polyasparaginsäuren (PASP's) in der Diskussion. Diese synthetischen Biopolymere gehören zu den Polyamiden und bilden eine Subspezies der Proteine, die die Biomineralisierung positiv beeinflussen können. Die Arbeit von Bosso *et al.* (2015) beschäftigt sich mit dem Einsatz von Polyaspartat als Weinsteinstabilisierungsmittel. Natrium oder Kaliumpolyaspartate gehören zur Gruppe der Polyasparaginsäureester, sind Biopolymere und zählen zu den Polyaminosäuren. Den Biopolymeren wird als Eigenschaft eine langandauernde Stabilisierung von Wein gegen Tartratkristallisation zugeschrieben. Sie gelten als nicht giftig und sollen keine negativen Einflüsse auf die Weinsensorik haben. Die Wirkung beruht auf der Modifizierung der morphologischen Eigenschaften von entstehendem Weinstein. Produziert wird das Biopolymer biotechnologisch aus L-Asparaginsäure in einer Polymerisationsreaktion, mit der, je nach Synthesemethode, Polymere in der Größe von ca. 10 bis 64 kDa entstehen. Derzeit befindet sich dieser Stoff für Wein im Zulassungsverfahren. In der Arbeit von Bosso *et al.* wurden der Stabilisierungseffekt von 100 mg/L Polyaspartat und Polyglutamat in Rot- und Weißweinen über 5 und 12 Monate im Labormaßstab untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss auf die Farbstabilität und der Phenole in Rotweinen getestet. Als Methoden kamen die Leitfähigkeitsmessung und das Kältekontaktverfahren zum Einsatz, zusätzlich wurden die Polyaspartate und auch Polyglutamate charakterisiert. Ziel der Arbeit war es, ein Weinbehandlungsmittel zu finden, das ohne Einschränkungen im Rot- und Weißwein eingesetzt werden kann. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass PASP's eine ähnlich gute stabilisierende Wirkung haben, wie Metaweinsäure zugleich aber länger stabil sind. PASP's können sowohl in Rot- als auch in Weißweinen eingesetzt werden. Der Einfluss auf die Kolloidstabilität, Phenolveränderungen oder auf Farbreaktionen wird zukünftig noch analysiert (Bosso *et al.* 2015).

Eine weitere Arbeit beschäftigte sich mit dem Einsatz von Pektin und Karrageen als alternative Adsorbensmaterialien zu Bentonit hinsichtlich der Entfernung von hitzeinstabilen Traubenzellwandproteinen aus Weißweinen. Demnach hat das traditionelle Verfahren mit Bentonit einige Nachteile seitens Effizienz, Kosten und Auswirkungen auf die Umwelt. Weiterhin führt der Einsatz von Bentonit zu erheblichen Weinverlusten, es ist nicht wiederverwendbar und es wird kontrovers über den negativen Einfluss auf das Aromaprofil im Wein diskutiert. Diese Arbeit

diskutiert den Ansatz der Anwendung von anionischen Polysacchariden, wie beispielsweise CMC, hinsichtlich der stabilisierenden Proteinentfernung in Weinen (Marangon *et al.* 2012). Dies unterstützt die Theorie, dass CMC eine sehr wirksame Alternative der Weinstabilisierung darstellt. Als Nebeneffekt kann die Proteinstabilisierung gesehen werden. Werden diese Fakten jedoch bei der Weinherstellung nicht beachtet, kann der Zusatz von CMC zu Proteintrübungen in Weißweinen und Rotweinen in der Flasche führen.

## 4 Experimenteller Teil

Alle verwendeten Chemikalien, wenn nicht anders vermerkt, waren vom Reinheitsgrad *pro analysis*. Zudem wurde für die Methoden, wenn nicht anders angegeben, vollentsalztes Wasser (mit einem spezifischem Widerstand  $\rho > 18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ , Purelab Ultra, Fa. Elga) eingesetzt.

Tabelle 4-1 gibt einen Überblick über die verwendeten Standardgeräte.

Tabelle 4-1 Verwendete Standardgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
pH-Meter	Microprozessor pH 537	WTW
Thermoschrank	ED 52, FD 53	Binder
Analysenwaage	LE4202S (max. 4200 g, 0,1 g)	Sartorius
Analysenwaage	LE225D (max. 220 g, 0,01 g)	Sartorius
Analysenwaage	CP224S (max. 220 g, 0,1 g)	Sartorius
Gefriertrocknung mit Methanolbad	P20-B	Piatkowski
Zentrifuge (groß)	Rotanta 460 RS (rpm max 15000)	Hettich
Zentrifuge (klein)	Rotina 35 (rpm max. 15000)	Hettich

### 4.1 Proben und Probenaufarbeitung

Zur Verfügung gestellt wurden die Handelsprodukte von CMC, MWS und GA von Erbslöh (Deutschland), Eaton Begerow (Deutschland), Laffort Oenologie (Frankreich) und Sulfometa (Österreich).

#### 4.1.1 Gummi Arabikum (GA)

Gummi Arabikum haltige oenologische Zusatzstoffe sind wegen der einfacheren Handhabung häufig als flüssige Präparate im Handel erhältlich. Für die vorliegende Arbeit wurden vier flüssige GA-Produkte (GA1-4) verschiedener Hersteller verwendet. Darüber hinaus wurden noch acht authentische Gummi Arabikum-Produkte (AA1 - AA8) aus dem Sudan für ausgewählte Analysen verwendet. Zu diesen Produkten waren der genaue Herkunftsort und die etwaige Aufarbeitung angegeben (Tabelle 2-1 im Abschnitt 2.1.3). Diese wurden von der Firma Erbslöh (Deutschland) zur Verfügung gestellt.

#### **4.1.2 Metaweinsäure (MWS)**

Aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften von Metaweinsäure erhält der Anwender diesen Zusatzstoff in trockener und verschieden gemahlener Form. In der vorliegenden Arbeit wurden sieben trockene und vakuumverpackte oenologische Produkte verschiedener Hersteller verwendet (MWS A - G).

#### **4.1.3 Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC)**

Zur Analyse von CMC standen vier flüssige und fünf feste Produkte zur Verfügung. Bei den flüssigen Präparaten handelte es sich um oenologische Zusatzstoffe von spezifischen Herstellern (CMC 1 – 4). Bei den fünf festen und pulverisierten Produkten handelte es sich um Lebensmittelzusatzstoffe allgemein, die ebenso zur Kristallstabilisierung im Wein eingesetzt werden können (CMC 5 – 8). Um Vergleiche zwischen den verschiedenen CMC-Produkten besser bewerten zu können, wurde mit Produkt Nummer 9 ein hochsubstituiertes CMC verwendet, welches beispielsweise Anwendung in Zahnpasta findet.

#### **4.1.4 Verwendete Weine und Moste**

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Weinen und Moste handelte es sich um Rheingauer Weißweinsorten, welche keine Behandlung mit oenologischen Stoffen erfahren haben und vom Institut für Rebenzüchtung, des Weingutes oder dem Getränketechnologischen Zentrums der Hochschule Geisenheim zur Verfügung gestellt wurden. Diese Versuchsweine und Moste kamen insbesondere bei der Entwicklung der Nachweismethode für MWS und CMC zum Einsatz.

Bei der Analyse der Stabilisotopenverhältnisse von Gummi Arabikum in Weißweinen wurden Weine von sechs unterschiedlichen deutschen Weinanbaugebieten verwendet, welche von verschiedenen Herstellern der jeweiligen Region zur Verfügung gestellt wurden. Als wichtigstes Lieferkriterium galt, dass die Weine aus den Jahren 2011 und 2012 stammen und nicht mit GA, CMC oder MWS behandelt wurden.

#### **4.1.5 Isolierung von Kolloiden mittels Ultrafiltration**

Die Isolierung von Kolloiden erfolgte aus Wein oder Most über das Ultrafiltrationsverfahren mittels geeigneter Membran (Cutoff 10 kDa). Handelte es sich um besonders trübe Proben, musste vor der eigentlichen Filtration zentrifugiert und über einen Faltenfilter (VWR, Deutschland) filtriert werden. Anschließend wurden die Proben über ein Sartocoon Slice System (Fa. Sartorius) mit Flachmembranen (Ausschlussgrenze 10 kDa, Fa. Sartorius) filtriert. Die Membran wird dabei von der Probe überströmt. Kolloidale Substanzen werden retentatseitig aufkonzentriert und von der Membran nicht zurückgehaltene Probenbestandteile fließen permeatseitig ab. Die Umwälzung der Probe erfolgt durch eine produkt schonende Taumelkolbenpumpe, zudem wird das Retentat im Dreihalskolben im Wasserbad auf 20 °C gekühlt. Das Konzentrat wird anschließend erst mit Citronensäure (5 g/L; pH 4 eingestellt mit 50%iger NaOH) und anschließend mit Wasser diafiltriert, um niedermolekulare Getränkeinhaltsstoffe auszuwaschen. Die Proben werden auf ein minimal pumpbares Volumen (200 mL) eingeengt und anschließend gefriergetrocknet (P20 B, Fa. Piatkowski, Deutschland). Die Auswaage der gefriergetrockneten Proben liefert gravimetrisch den Gesamtkolloidgehalt der Probe. Zur Filtration wurden 1,5 – 5 L Probe eingesetzt. Die Vorgehensweise entsprach der SOP-057-4 des Institutes für Weinanalytik und Getränkeforschung der Hochschule Geisenheim.

#### **4.2 Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung und des absoluten Molekulargewichtes (SEC-UV-MALS-RI)**

Die über Größenausschlusschromatografie (SEC) nach Größe getrennte Probe wurde mittels UV-Detektor, Dreiwinkel-Lichtstreuendetektor (MALS) und Brechungsindex-Detektor (RI) detektiert. Unter dem Synonym der molmassensensitiven Detektoren finden Lichtstreuendetektoren Verwendung. Dieser Detektortyp ist nur in Kombination mit Konzentrationsdetektoren (RI bzw. UV) verwendbar, weil zur Molmassenberechnung in jedem Fall die Konzentration benötigt wird. Insbesondere die Lichtstreuung kann unabhängig von Polymerstandards die Molekularmassenmittelwerte ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_z$ ) und den Gyrationradius direkt bestimmen. Hierbei werden Mehrwinkel- (MALS) und Kleinwinkel- (LALS) Detektoren unterschieden. Mit dem Dreiwinkelsystem wird bei 45°, 90° und 135° die Streulichtintensität der Probe gemessen. Als Lichtquelle dient ein Gallium-Arsenit-Laser mit einer Wellenlänge von 658 nm. Es handelt sich dabei um das physikalische

Prinzip der Rayleigh-Streuung mit der die Größe von Partikeln, die wesentlich kleiner sind als die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes, bestimmt werden kann. Die Rayleigh Streuung ist abhängig vom Einstrahlwinkel und proportional zur Masse der Probe (Wittgren u. Wahlund 1997).

Mittels externe Kalibrierung geeigneter Größenstandards (vgl. Tabelle 4-2) kann die Molekulargewichtsverteilung aus dem UV bzw. RI Signal ermittelt werden. Das absolute Molekulargewicht wird, bei bekanntem  $dn/dc$ -Wert der Probe, in jedem Messpunkt über die Auswertung des Lichtstreuensignals in Kombination mit einem Konzentrationsdetektor (UV oder RI) ausgewertet.

### *Probenvorbereitung*

Die trockenen Kolloide werden im Messkolben eingewogen (2 mg/mL für GA und CMC; bei MWS 4 – 6 mg/mL) und mit Laufmittel bis zur Marke aufgefüllt. Anschließend werden die Proben mittels 0,2 µm Membranfilter filtriert und injiziert.

### *Geräte und Chemikalien*

SEC-Anlage:	Äkta Purifier (Fa. GE Healthcare) Pump P 900, Monitor UPC-900, UV-Detektor (UPC 900), Valve INV-900, Frac 950, Mixer M-925, Flow Cell und Conductivity Cell RI-Detektor 8120 differenzieller Brechungszahldetektor (analytisches Modell, Fa. Metrohm/Bischoff)
Probenschleife	500µL Software Unicorn 5.11 miniDawn-Treos 591-TS (Fa. Wyatt) Kalibrierkonstante in Toluol: $4,964438 \times 10^{-5}$ Software Astra 6.0.5.3
Trennsäule:	Superose 12 10/300 mm GL (Fa. GE Healthcare) Ausschlussgrenze $M_r = 280.000$ Da Ausschlussgrenze $M_r = 5000$ Da Superose 6 FPLC 10/300 mm (Fa. Pharmacia) Ausschlussgrenze $M_r = 500.000$ Da Membranfilter 0,2 µm (Fa. Watman-Schleicher & Schuell) Einwegspritzen Injekt 5 mL (Fa. Braun) NaCl (Fa. Merck)

Laufmittelfilter 0,1 µm Corning PES Filter  
(Fa. Sigma Aldrich)

HPLC-Bedingungen

Fließmittel: 0,1 M NaCl Lösung (isokratisch)  
 Flussrate: 0,5 mL/min  
 Injektionsvolumen: 500 µL

Die Auswertung der Molekulargewichtsverteilung erfolgte mit der Unicorn-Software (Version 5.11 von GE Healthcare) und einer externen Kalibrierung mit Dextran- sowie Protein Standards (vgl. Tabelle 4-2) bekannter Molekulargröße. Die Auswertung der absoluten Molekulargewichte erfolgte über die Astra Software des miniDawn-Treos der Firma Wyatt mit RI Detektion als Konzentrationsquelle. Die Auswertung erfolgte über den Zimm-Formalismus. Der Zimm-Formalismus stellt die Grundgleichung zur Berechnung absoluter Molekülmassen über die Streulichtintensität dar. Dieser beruht auf der Annahme, dass bei der Messung von Streulicht von großen Molekülen, bei unterschiedlichen Konzentrationen in unterschiedlichen Winkeln, die Extrapolation der Daten die Bestimmung des absoluten Molekulargewichtes aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse im Zimm-Plot möglich ist. In diesem Punkt des Zimm-Plots sind die Konzentrationen und die Winkel gleich Null und das absolute Molekulargewicht kann als reziproker Wert abgelesen werden (Chu 1991).

Tabelle 4-2 Dextran- und Protein Standardsubstanzen (Kalibrierung des RI- oder UV-Signals)

Standard	Molekularmasse in kDalton	Retentionszeit $t_R$ in Minuten	Firma
Dextran T 200	2000	16.00	
Dextran T 500 (Fa. Pharmacia)	500	16.72	
Dextran T 70 (Fa. Pharmacia)	70	20.88	GE Healthcare
Dextran T 40 (Fa. Pharmacia)	40	23.53	(Pharmacia)
Dextran T 10 (Fa. Pharmacia)	10	30.22	
Stachyose	0.738	36.58	
Alc. Dehydrogenase	150	24.00	
Coalbumin	75	26.15	
Carbonic Anhydrase	29	28.85	
Ribonuclease A	13.7	32.60	Sigma Aldrich
BSA	6.5	35,50	
Aprotinin	0.65	37.40	

### 4.3 Bestimmung des $dn/dc$ -Wertes von Kolloiden

Zur Bestimmung des absoluten Molekulargewichtes mittels Lichtstreuung (MALS) ist bei unbekanntem Proben das Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ -Wert) erforderlich. Der  $dn/dc$ -Wert ist für jede Probe im jeweiligen Lösungsmittel spezifisch und kann experimentell bestimmt werden. Es wird eine Konzentrationsreihe der Probe angesetzt, die den Konzentrationsbereich des RI-Detektors voll ausnutzt. Bei 100 mV Analogausgang liegt der Messbereich zwischen 0 und 90 mV (bei 1 V Detektorausgang zwischen 0 und 0,9 V). Hierzu werden Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 1 mg/L (100 mV Analogausgang) und zwischen 1 und 10 mg/mL (1 V Analogausgang) angesetzt und im Batch-Modus, durch direktes Injizieren der filtrierten Probe über eine Spritze in den RI Detektor, gemessen. Die Auswertung erfolgt mittels der Astra-Software des miniDawn-Treos (Fa. Wyatt).

#### *Probenvorbereitung*

Vom isolierten und trockenen Kolloid werden im Bereich zwischen 0,1 und 1 mg/mL 6 Konzentrationen in 0,1 M NaCl angesetzt und in Einwegspritzen gefüllt. Zusätzlich wird eine Einwegspritze mit 0,1 M NaCl Lösung befüllt.

#### *Geräte und Chemikalien*

Membranfilter 0,45  $\mu$ m (Fa. VWR)

Einwegspritzen Injekt 5 mL (Fa. Braun)

NaCl (Fa. Merck)

Konzentrationsdetektor: RI-Detektor 8120 differenzieller Brechungsindexdetektor (analytisches Modell, Fa. Metrohm/Bischoff)

miniDawn-Treos 591-TS (Fa. Wyatt) (Software Astra 6.1.2.84)

#### *Messung*

Die Bestimmung des  $dn/dc$ -Wertes wird in der Astra-Software im Batch-Modus ausgeführt, die Zelle des RI-Detektors wird mit 0,1 M NaCl Lösung gefüllt bis die Basislinie konstant ist. Anschließend wird die Zelle des RI-Detektors aufsteigend nach Konzentration mit der Probe befüllt. Im Chromatogramm zeigt sich nach Signalkonstanz ein Plateau, dieses wird abgewartet bis wiederum Laufmittel und anschließend die nächst höhere Konzentration injiziert wird. Die Auswertung der  $dn/dc$ -Werte erfolgte über die Astra-Software des miniDawn-Treos der Firma Wyatt

mit RI-Detektion ( $RI_{\text{konstante}}=1,7297 \cdot 10^{-3}$  bei 950 nm) als Konzentrationsdetektor. Jedes Plateau jeder Konzentration wird markiert und daraus der lineare Zusammenhang zwischen Konzentrationsänderung der Lösung und der Änderung des Brechungsindex berechnet. Der Anstieg der resultierenden Geraden zeigt das Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ ) des Stoffes im spezifischen Lösungsmittel (vgl. Abbildung 4-1).

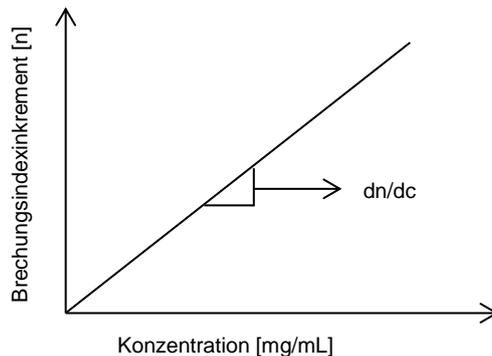


Abbildung 4-1 Bestimmung des Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ ) - Änderung des Brechungsindex ( $n$ ) gegen die Änderung der Konzentration ( $c$ ) in der verwendeten Lösung (NaCl)

#### 4.4 Bestimmung der monomeren Zuckerbausteine (saure Hydrolyse)

Nach saurer Hydrolyse der polymeren Kolloide erfolgt die Analyse der neutralen Zucker (L-Fucose, L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Galactose, D-Glucose und D-Mannose) sowie der sauren Zucker (D-Galacturonsäure und D-Glucuronsäure) mittels **High-Performance-Anion-Exchange-Chromatography with Pulsed-Amerometric-Detection (HPAEC-PAD)**. Zur Quantifizierung erfolgte eine externe Kalibrierung mit Zuckerstandards.

##### 4.4.1 Saure Hydrolyse von Kolloiden allgemein

Die getrockneten Kolloide wurden durch eine schwefelsaure Hydrolyse (Seaman Hydrolyse mit 72%iger  $H_2SO_4$ ) in ihre Zuckerbausteine zerlegt. Hierzu wurden 10–15 mg Kolloid in ein druckstabiles Hydrolyseröhrchen eingewogen, mit 125  $\mu\text{L}$  72%iger Schwefelsäure 45 min im Ultraschallbad vorhydrolysiert und anschließend mit 1,35 mL Reinstwasser auf 1 M verdünnt. Es folgte die Haupthydrolyse für 60 min bei 120 °C im Thermoblock. Bei der Hydrolyse wurden die neutralen monomeren Zucker und die Uronsäuren freigesetzt. Das Hydrolysat wurde quantitativ in 50 mL Messkolben überführt und gegebenenfalls verdünnt (Seaman *et al.* 1945).

### *Geräte und Chemikalien*

Druckstabile Hydrolyseröhrchen mit Drehverschluss (16 x 100 mm, Fa. Duran Group)

Thermoblock mit TempController TR-L 288 (Fa. Gebrüder Liebisch)

Schwefelsäure 72 % (Fa. Merck)

#### **4.4.2 Saure Hydrolyse von Natrium-Carboxymethylcellulose**

Die isolierten Kolloide wurden in druckstabile Hydrolyseröhrchen eingewogen (ca. 50 mg) und mit 500 µL 80%iger Schwefelsäure überschichtet und für 12 h bei Raumtemperatur vorhydrolysiert. Anschließend wurde mit der 10fachen Menge Reinstwasser verdünnt und 5 h bei 100 – 110 °C im Thermoblock hydrolysiert. Die abgekühlten Proben wurden mit festem Calciumcarbonat (ca. 0,6 g) neutralisiert und das entstandene Calciumsulfat über einen Blaubandfilter abfiltriert. Die Probenlösung wurde dabei in einem 50 mL Rundkolben aufgefangen und am Rotationsverdampfer (20 - 30 mbar) fast bis zur Trockene einrotiert. Der weiße Rückstand wurde mit 10 mL Reinstwasser aufgenommen und in ein Sarstedtröhrchen überführt. Danach wurde 5 Minuten bei 12.800 rpm scharf zentrifugiert. Die Probenlösung wurde quantitativ in einen Messkolben überführt und mit Reinstwasser auf 50 mL aufgefüllt.

#### **4.4.3 HPAEC-PAD Analyse**

Die in Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2 erhaltenen wässrigen Lösungen wurden direkt zur Analyse der Monosaccharid-Zusammensetzung in die HPAEC-PAD (High Performance Liquid Chromatography with Pulsed Amperometric Detection) injiziert. Das Prinzip der Trennung beruht hierbei auf Anionenaustausch bei hohen pH-Werten mittels basischen Eluenten (NaOH mit pH-Wert ~13). Durch die gepulste amperometrische Detektion (PAD) wird eine Änderung des Stromes, nach Oxidation der Analyten an einer Goldelektrode, in der Messzelle bestimmt. Durch „Pulsing“ (vgl. Tabelle 4-3) des angelegten Potentials kommt es zu einer höheren Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Messung. Zudem wird eine elektrochemische Verschmutzung der Elektrode vermieden.

### *Probenvorbereitung*

Die sauer hydrolysierten Proben (Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2) wurden auf 50 mL aufgefüllt, gegebenenfalls verdünnt und über 0,2 µm Membranspritzenvorfilter filtriert und injiziert.

### *Geräte und Chemikalien*

Druckstabile Hydrolyseröhrchen mit Drehverschluss (16x100 mm, Fa. Duran Group)

Thermoblock mit TempController TR-L 288 (Fa. Gebrüder Liebsch)

Rotationsverdampfer Rotavapor R-134 und R-210 (Fa. Büchi)

Schwefelsäure 80 % (Fa. Merck)

Calciumcarbonat Pulver (Fa. Merck)

Blaubandfilter (Fa. Machery-Nagel)

Sarstedtröhrchen 15 mL (Fa. Sarstedt)

Zentrifuge Rotina 35 (Fa. Hettich)

Membranfilter 0,2 µm PES (Fa. VWR)

Vials 1,5 mL Gewindeflaschen mit 8 mm Schraubkappe und Septen (Fa. Wicom)

NaOH 50%ige Lösung (Fa. Fluka)

Einmalpipetten Polycarbonat 25 mL (Fa. VWR)

Laufmittelfilter                      0,2 µm Syring PES Filter (25 mm) (Fa. VWR)

HPAEC-PAD-Anlage:                      Dionex Bio-LC System (Fa. Dionex/ Thermo)

Gradientenpumpe ICS 3000 SP

Autosampler AS-AP, temperiert auf 20 °C

Thermal Compartment ICS 5000+, temperiert auf 20°C/

Säule 15°C

Detektor                                      Elektrochemischer Detektor mit Goldelektrode (Zelle ECD  
KS 5000+), gepulst amperometrisch, mit Ag/AgCl  
Referenzelektrode, temperiert auf 20 °C

Tabelle 4-3 Programmierung des Detektors (Carbohydrates Standard Quad. Potential)

	<u>Time (sec)</u>	<u>Potential(V)</u>	<u>Integration</u>
1	0	0,1	
2	0,2	0,1	Begin
3	0,4	0,1	End
4	0,41	-2	
5	0,42	-2	
6	0,43	0,6	
7	0,44	-0,1	
8	0,5	-0,1	

Probenschleife	25 µL (Injektionsvolumen 10 µL)
Eluentensystem:	Polycarbonatflaschen zur ICS 3000 mit Druckbeaufschlagung (N <sub>2</sub> -Überschichtung) und EO Gasregulator
Software:	Chromeleon 6.8 (SR 13) Build 3967 (Fa. Dionex)
Trennsäule:	Carbopac PA 100 (4 x 250 mm) mit Vorsäule (4 x 50 mm) (Fa. Dionex)

HPLC Bedingungen:

Neutrale Zucker (NZ): Fluss 0,6 mL/min Gradient: 0 – 36,0 min 12 mM NaOH, 36,5 min – 55,0 min 0,5 M NaOH, 55,5 – 85 min 12 mM NaOH Saure Zucker: 500 mM NaOH

Saure Zucker (SZ): Fluss 0,5 mL/min isokratische Elution mit 500 mM NaOH über 26 min

CMC Methode: Fluss 0,6 mL/min Gradient: 0 – 8 min 0,1 M NaOH mit 5% 0,1 M NaOH/0,5 M NaOAc, 8 – 38 min 0,1 M NaOH mit 40 % 0,1 M NaOH/0,5 M NaOAc, 38,5 – 48 min 0,1 M NaOH mit 5 % 0,1M NaOH/0,5 M NaOAc

#### *Auswertung/ Qualitätssicherung*

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels der Integrationssoftware Chromeleon (6.8 (SR 13) Build 3967, Fa. Dionex), die Quantifizierung erfolgte über die externe Kalibrierung mit den in Tabelle 4-4 aufgeführten Standardsubstanzen. Der Kalibrationsbereich lag zwischen 0,25 mg/L – 25 mg/L für NZ und SZ. Alle Ergebnisse wurden mittels Anhydrofaktor (AH) auf polymere Substanzen bezogen.

Der Anhydrofaktor dient dabei zur Rückrechnung von freiem bestimmten Zucker auf das Polymer unter Berücksichtigung der Anlagerung von Wasser (McCleary 1991). Die Ergebnisse wurden in g/100g gefriergetrocknetes Kolloid angegeben.

Tabelle 4-4 Standardsubstanzen für die HPAEC-PAD (NG-Nachweisgrenze; BG-Bestimmungsgrenze; AH-Anhydrofaktor)

<b>Standard</b>	<b>Retentionszeit <math>t_R</math> in Minuten</b>	<b>NG mg/L</b>	<b>BG mg/L</b>	<b>AH</b>
L-Fucose	8,1	0,05	0,1	0,89
L-Rhamnose	13,9	0,05	0,1	0,89
L-Arabinose	16,8	0,05	0,1	0,88
D-Galactose	22,8	0,05	0,1	0,89
D-Glucose	24,1	0,05	0,1	0,90
D-Mannose	25,5	0,05	0,1	0,88
D-Galacturonsäure	13,0	0,05	0,25	0,89
D-Glucuronsäure	17,5	0,05	0,25	0,89

In Tabelle 4-4 sind die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Zuckerbausteine aufgeführt, welche über das Signal-Rauschverhältnis der kleinsten bestimmbarsten Verdünnung (0,01 mg/L) in drei Wiederholungen ermittelt wurden (Kromidas 2000).

## 4.5 Massenspektrometrische Detektion von Metaweinsäure nach SPE

### 4.5.1 Identifizierung von Metaweinsäure mittels Massenspektrometer

Zur Identifizierung von Metaweinsäure mittels Massenspektrometer wurde ein Metaweinsäurestandard (500 mg/L MWS in Reinstwasser) direkt auf das Massenspektrometer aufgegeben. Hierfür wurde der Standard mittels einer Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 200 µL/min direkt in die Ionenquelle des Massenspektrometers gepumpt. Beim Tuning des Massenspektrometers wurde darauf geachtet, möglichst hohe Intensitäten zu detektieren. Hierbei erfolgte auch die Festlegung auf den negativen Ionisierungsmodus.

#### *Geräte und Chemikalien*

LC-MS/MS bzw. HPLC-UV System

Detektion:

Massenspektrometer: Thermo Scientific Accela™ LXQ™ Mass Spectrometric System

UV UV-Kanal A (210 nm)

HPLC: Thermo Scientific Accela™ High Speed Pump  
Jasco® Säulenthermostat  
Thermo Scientific Accela™ Autosampler  
Thermo Scientific Accela™ PDA Detector

Software: Xcalibur® 2.0.7 SP1 Thermo Fisher Scientific Inc.

Säulen: Varian Hi-Plex H 300 x 7,7 mm 8µm  
(Fa. Agilent Technologies)  
Rezex Fast Fruit, 8 % H, 100 x 7,8mm (Fa. Phenomenex)  
Luna C18 (2) 250 x 4,6mm 5µm (Fa. Phenomenex)  
Injektionsvolumen 10 µL  
Fluss 400 µL/ min  
Eluent 0,05 M Ameisensäure (isokratisch)  
Ofentemperatur 50 °C

#### 4.5.2 Bestimmung von Metaweinsäure in Wein und Traubensaft

##### *Probenvorbereitung*

Weine und Traubensäfte, mit und ohne MWS, wurden zunächst mittels einer SPE (solid phase extraction) aufgereinigt bzw. aufkonzentriert. Bei den SPE Kartuschen handelte es sich um einen starken Anionentauscher. Die SPE Kartuschen wurden mit 3 mL 1 M NaOH konditioniert und anschließend mit der dreifachen Menge Reinstwasser neutral gewaschen. Danach wurden 5 mL Probe auf die SPE Kartusche aufgegeben. Störende Substanzen, speziell bei Fruchtsaft, wie beispielsweise Zucker oder organische Säuren, wurden mit 9 mL Reinstwasser entfernt. Anschließend wurde die SPE-Kartusche trocken gesaugt und die auf dem Anionentauscher-Material anhaftenden Substanzen mit 5 mL einer 6 M Ameisensäure eluiert. Die filtrierte Probe wurde direkt zur LC-MS-Analyse eingesetzt. Die Proben wurden mittels Anionenaustauscher-Chromatografie (AEX) kombiniert mit einem ESI-MS im negativen Modus detektiert. Eine externe Kalibrierkurve wurde anhand der Intensität der vier authentischen Molekülfragmente/-ionen ( $[M-H]^-$  413, 545, 677,809) erstellt.

##### **Festphasenextraktion (SPE-Solid Phase Extraktion)**

##### *Geräte und Chemikalien*

SPE:	Vakuum-Box Supelco <sup>®</sup> Visiprep
Festphasen	Phenomenex <sup>®</sup> ; Strata-X-A 33 µm Polymeric Strong Anion; 60 mg/3 mL
Filter:	Schleicher u. Schuell Zap Cap <sup>®</sup> 0,45 µm Nylon
Duratec	gebrauchsfertige Filtereinheiten 0,45 µm regenerierte Cellulose
Vials:	Thermo Scientific MS, CRT 2 mL I-D
Kappen:	Thermo Scientific Blue BND CAP T/S

##### *Durchführung*

##### Konditionierung

(ø Flussrate: 0,3 mL/min): 3 mL (1 N NaOH)

##### Equilibrieren/neutral Waschen

(ø Flussrate: 3,0 mL/min): 9 mL (bidest. H<sub>2</sub>O)

##### Probe

(ø Flussrate: 0,5 mL/min):	5 mL (Wein/Saft)
Waschen	
(ø Flussrate: 3,0 mL/min):	9 mL (bideest. H <sub>2</sub> O)
Trockenziehen im Vakuum:	5 min
Elution	
(ø Flussrate: 0,5 mL/min):	5 mL (6N HCOOH)

Metaweinsäure zur Synthese (Fa. VWR)

Ameisensäure 99 % (für LC/MS: ULC/MS Optigrade; Fa. Promochem)

NaOH 50 % (Fa. Fluka)

Methanol 99,9 % (Fa. Roth)

HCl 6 % (Fa. Roth)

L-Weinsäure (Fa. Roth)

L-Äpfelsäure (Fa. AppliChem)

Ethanol 96 % vergällt (Fa. VWR)

HPLC-UV-MS Bedingungen:

HPLC-UV-MS	Accela LXQ System (Fa. Thermo Scientific)
Säule	Varian Hi-Plex H 300 x 7,7 mm 8 µm (Fa. Agilent Technologies)
Ofentemperatur	50 °C
Detektor	UV Kanal A (210 nm)
Eluent	0,05 % HCOOH (isokratisch)
Fluss	400 µL/min
Injektion	10 µL

*Optimierte Ionisierungsparameter*

ESI-Quelle im negativen Modus

Capillary Temp. (°C):	275
Capillary Voltage (V):	-5
Sheat Gas Flow (arb.-unit):	20
Aux Gas Flow (arb.-unit):	7
Source Voltage (kV):	2,75
Source Current (µA):	100

#### **4.6 Analyse der Stabilisotopenverhältnisse von Gummi Arabikum und Weinkolloiden mittels IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry)**

Die Analytik der Isotopenverhältnisse der vier Elemente Kohlenstoff, Stickstoff sowie Sauerstoff und Wasserstoff der isolierten Kolloide erfolgte mittels Eurovector Element Analyzer Euro/EA bzw. mit dem Element Analyzer TC/EA (Temperature Conversion/Element Analyzer) der Firma Thermo Finnigan. Beide Geräte waren gekoppelt mit einem Isotopenverhältnismassenspektrometer (IRMS).

##### **4.6.1 Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes und des $\delta^{15}\text{N}$ -Wertes (Euro/EA/IRMS)**

Bei der vollständigen und kontrollierten Verbrennung der hergestellten Probenfraktion entsteht neben Kohlendioxid auch Stickstoff im Elementanalysator. Im  $\text{CO}_2$  der verbrannten Probe wird der  $\delta^{13}\text{C}$  Wert mit Hilfe eines Isotopenmassenspektrometers (IRMS) bestimmt. Der  $\delta^{15}\text{N}$  Wert wird im Stickstoffgas der verbrannten Probe, nach Reduktion der Stickoxide im Reduktionsreaktor, im IRMS bestimmt. Anschließend gelangen die Messgase über ein open split Interface (Conflo IV) in das Isotopenmassenspektrometer.

##### **4.6.2 Bestimmung des $\delta^2\text{H}$ -Wertes und des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes (TC/EA/IRMS)**

Die eingewogene und equilibrierte Probe wurde durch Pyrolyse (bei 1400 °C unter Sauerstoffausschluss) in die Messgase Kohlenmonoxid und Wasserstoff im Reaktorrohr überführt, welche dann isotherm bei 60 °C an einer GC-Säule getrennt werden. Anschließend gelangen die Messgase über ein open slit Interface (Conflo IV) in das Isotopenmassenspektrometer. Der Autosampler sowie die Reaktorrohre werden permanent mit Helium gespült, um die Adsorption von Wasser als auch Austauschreaktionen mit der Atmosphäre zu vermeiden.

##### *Geräte und Chemikalien*

Kugelmühle MM 301 (Fa. Retsch)

Edelstahlbecher 25 mL (Fa. Retsch)

Analysenwaage MC 5 (d = 1 µg) (Fa. Sartorius)

Zinnkapseln 3,2 x 4 mm (Fa. Hekatech)

Zinnkapseln 4 x 6 mm (Fa. Hekatech)

Silberkapseln 3,2 x 4 mm (Fa. Hekatech)

## Experimenteller Teil

---

Isotopenverhältnis-Massenspektrometer	Delta <sup>Plus</sup> XP Massenspektrometer (Fa. Thermo Finnigan)
Elementanalysator	TC/EA (Fa. (Thermo Finnigan)
Software	Isodat NT (Version 3.0) (Fa. Thermo Scientific)
Autosampler	MAS 200R 32 Positionen (Thermo Finnigan)
GC Säule	Molecular Sieve 5A (Chrompack) (0,6 m x 1/4 x 4,0 mm SS; 300 °C) (isotherm 60 °C)
Reaktor	1400 °C
Gaszuführsystem	Conflo IV (Fa. Thermo Scientific)
Helium 4.6	ca. 1 bar
Kohlenmonoxid 4.7	ca. 2,2 bar
Wasserstoff 6.0	ca. 3,8 bar
Elementanalysator	Eurovector Element Analyzer
Euro/EA 3000 (Fa. Hekatech)	
Software	Isodat NT (Version 3.0) (Fa. Thermo Scientific) Callidus (Fa. Hekatech)
Autosampler	Zero Blank Vector SAS01
(Fa. Hekatech)	
Front Reaktor	1000 °C
Rear Reaktor	850 °C
Gaszuführsystem	Conflo IV (Fa. Thermo Scientific)
Helium 4.6 Trägergas	1,3 bar
Stickstoff Referenzgas	ca. 2 bar
Kohlendioxid 4.5 Referenzgas	ca. 2 bar

*Probenvorbereitung*

Die gefriergetrockneten Kolloide wurden mit einer Kugelmühle homogenisiert und anschließend auf 1 µg genau in Zinn- bzw. Silberkapseln eingewogen. Die Einwaage lag dabei für den Euro/EA zwischen 300 – 500 µg (Zinnkapseln), für den TC/EA zwischen 500 – 800 µg (Silberkapseln). Zur Messung der Stabilisotope Wasserstoff und Sauerstoff wurden die Silberkapseln nicht verschlossen, sondern erst 24 Stunden im offenen und anschließend 24 Stunden im geschlossenen Exsikkator aufbewahrt. Dies diente der Equilibrierung des austauschbaren Wasserstoffs bzw. des Sauerstoffs. Die Zinnkapseln konnten direkt verschlossen werden, hierbei wurde darauf geachtet, dass die Kapseln auf ein möglichst kleines Format gefaltet wurden.

*Auswertung/ Qualitätssicherung*

Die Systemkontrolle, die Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit der Gerätesoftware Isodat NT 3.0 der Fa. Thermo Scientific. Zur Steuerung des Eurovector Element Analyzer Euro/EA diente zusätzlich die Software Callidus. Tabelle 4-5 gibt einen Überblick über die verwendeten Standardsubstanzen.

Tabelle 4-5 Kalibrier- und Qualitätsstandards der IRMS-Analysen

<b>Gerät</b>	<b>Analyt</b>	<b>Kalibrierung</b>	<b>QKK Standard</b>
Euro/EA	$\delta^{13}\text{C}$	Sucrose (IAEA-CH-6) Lithium-Carbonat (LSVEC)	Glucose BCR
	$\delta^{15}\text{N}$	Ammoniumsulfat (USG 25 und USG 26)	Glutaminsäure (USG-40)
TC/EA	$\delta^2\text{H}$	Polyethylen (IAEA-CH-7) Benzoin	Roßmann-Casein
	$\delta^{18}\text{O}$	Benzoessäure (IAEA-602) Coffein (IAEA-600)	Roßmann-Casein

#### **4.7 Bestimmung von Spurenelementen mittels TRFA**

Für die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalytik (TRFA) wird die Probe nicht verascht, sondern lediglich in Wasser gelöst und mit einem internen Standard versetzt (Selen). Mit der TRFA können simultan Eisen, Kupfer, Zink, Mangan, Nickel und Cobalt nebeneinander bestimmt werden. Das gleichzeitige Messen der Mengenelemente ist problematisch, da diese Elemente mit sehr viel höherer Intensität gemessen werden, große Peaks verursachen und somit die Bestimmung der Spurenelemente beeinträchtigen können.

##### *Probenvorbereitung*

Die festen bzw. flüssigen Proben wurden in Reinstwasser gelöst (10 – 15 mg bzw. 500 µL in 1 mL Reinstwasser), mit 100 µL internem Standard (Selen 0,01 g/L) versetzt und direkt zur Messung eingesetzt. Ein Tropfen der angesetzten Lösung wurde auf einem Probenträger getrocknet und direkt zur Messung in das Gerät eingebracht.

##### *Geräte und Chemikalien*

TRFA S2 Picofox mit Software Spectra Version 7 (Fa. Bruker)

Quarzglasprobenträger mit Rack (Fa. Bruker)

Heizplatte mit Ceranfeld (Fa. Schott Instruments)

Reaktionsgefäße 2 mL (Fa. Eppendorf)

Selen (ICP Qualität, 0,05 mol/L, Fa. Roth)

Gallium Einzelelement Standard ICP Qualität 1 g/L (Gain Correction; Fa. Merck)

Single Standards (1 g/L in 2%iger Salpetersäure Fa. Roth)

##### *Auswertung*

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Spectra Version 7, die Quantifizierung erfolgt über den internen Selen Standard. Die Nachweisgrenze für Spurenelemente liegt im ppm-Bereich (µg/g).

## **4.8 Bestimmung von Trockenmasse, Asche und Mineralstoffen (AAS)**

### **4.8.1 Bestimmung der Trockenmasse**

Die Trockenmasse der Zusatzstoffe wurde gravimetrisch bestimmt. Flüssige Präparate wurden in der Aluschale mit einer definierten Menge Seesand verrieben (Matissek *et al.* 2009).

#### *Geräte und Chemikalien*

Aluminiumschalen (75 mL, Fa. Roth)

Glasstäbe (5 cm)

Seesand (Fa. Roth)

#### *Auswertung*

Aus den bis zur Gewichtskonstanz gewogenen Aluminiumschalen wurden die Trockenmassegehalte (g/100 g Zusatzstoff) abzüglich des Seesandes berechnet.

### **4.8.2 Bestimmung des Aschegehaltes**

Der Aschegehalt wurde gravimetrisch nach der Veraschung der Proben bestimmt und in g/100 g Zusatzstoff angegeben (Matissek *et al.* 2009).

#### *Geräte und Chemikalien*

Muffelofen Modell L/15/11B180 mit max. Temperatur 1100°C (Fa. Nabertherm)

Oberflächenverdampfer

Platinschalen (Fa. VWR)

Wasserstoffperoxid-Lösung 30 % (Fa. VWR)

## **4.9 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)**

Die Bestimmung der Mineralstoffe Calcium, Magnesium, Kalium sowie Kupfer, Eisen, Zink und Natrium erfolgte analog der SOP-084-0 des Institutes für Weinanalytik und Getränkeforschung der Hochschule Geisenheim.

#### *Geräte und Chemikalien*

Atomabsorptionsspektrometer (HR-CS AAS Typ contra AA 300, Fa. Jena Analytik)

Dilutoren (Fa. Hamilton)

Lanthanoxid-/Caesiumchloridpufferlösung (Fa. Roth)

Salzsäure 39 % (Fa. Roth)

#### **4.10 Bestimmung von Chlorid in CMC-Zusatzstoffen**

Die zuvor gefriergetrockneten Zusatzstoffe (0,25 g) wurden in 50 mL bidestilliertem Wasser gelöst, anschließend wurde der Chloridgehalt potentiometrisch an der Ag/AgCl Elektrode bestimmt (IFU Methode Nr. 37, 2005 umgesetzt in der SOP-L-014 des Institutes für Weinanalytik und Getränkforschung der Hochschule Geisenheim).

##### *Geräte und Chemikalien*

Titroline Alpha plus - Titrator, Schott Instruments

0,1 M HCl Standardlösung (Fa. Bernd Kraft)

0,1 M Silbernitratlösung (Fa. Merck)

#### **4.11 Enzymatische Bestimmung organischer Säuren**

Die flüssigen Zusatzstoffe wurden 1:10 verdünnt und enzymatisch nach IFU Methoden analysiert (IFU-Internationale Fruchtsaft Union; IFU Methode Nr. 54 (1984); Nr. 53 (1996) und Nr. 66 (1995)). Die benötigten Chemikalien wurden von der Firma R-Biopharm bezogen, die Analyse erfolgte mittels Analyseautomat (Konelab 20 XTi, Fa. Thermo Fisher).

#### **4.12 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR)**

Für die Grundanalytik der verwendeten Weine und Traubenmoste wurden mittels FTIR die Dichte, der Alkoholgehalt, reduzierende Zucker, Glukose, Fruktose, der pH-Wert, die Gesamtsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Milchsäure, flüchtige Säure und der Glyceringehalt bestimmt. Das Prinzip der FTIR-Analyse basiert auf dem Scannen von Most- oder Weinproben mit Infrarot. Basierend auf mathematischen Modellen, wird innerhalb von 60 Sekunden die Konzentration der Weinhaltstoffe ermittelt.

##### *Geräte und Chemikalien*

Winescan FT 2 (Foss Electric)

Autosampler ASX 260 CETAC

50 mL Sarstedt Röhrchen selbst stehend

Reagenzglasgestell (B246mm\*H104mm\*T64mm)

### *Durchführung*

Es werden ca. 50 mL Probe in ein Sarstedt-Röhrchen gefüllt und auf das Reagenzglasgestell gestellt und analysiert.

### **4.13 Bestimmung von Weinsäure in MWS-Zusatzstoffes (HPLC-UV)**

Die Bestimmung mittels HPLC erfolgte an einer RP-18-Phase in Verbindung mit einer Ionenaustauschersäule. Die Metaweinsäure-Zusatzstoffe wurden in Reinstwasser gelöst (400 mg/L) und im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die verdünnten Proben wurden membranfiltriert und direkt zur Bestimmung eingesetzt. Die Auswertung erfolgt unter Verwendung der Software Chromeleon (6.8 (SR 13) Build 3967, Fa. Dionex) sowie einer externen Kalibriergeraden.

### *Geräte und Chemikalien*

HPLC-Pumpe:	P 680 (Fa. Dionex)
Probengeber:	ASI 100 (Fa. Dionex)
UV Detektor:	PDA 100 (Fa. Dionex)
Trennsäulenofen:	TCC 100 (Fa. Dionex)
Säulen:	Luna 5 µm C18, 250 x 4,6 mm; Rezex Fast Fruit, 8 % H, 100 x 7,8 mm (Fa. Phenomenex)
Probenschleife	20 µL
HPLC-Bedingungen:	
Elution	isokratisch
Elutionsmittel	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> in bidest Wasser (10 g H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%ig./L Wasser) Phosphorsäure 85 % (Fa. VWR) Methanol 99,9 % (Fa. Roth) Fluss 0,7 mL / min
Standardsubstanzen:	
L-Weinsäure (Fa. VWR)	
Membranfilter regenerierte Cellulose 0,45 µm (Fa. Whatman)	

#### **4.14 Schichtenfiltration von Metaweinsäure in verschiedenen Medien**

Durch Anlegen eines konstanten Drucks wurde ein entsprechendes Probenvolumen von der Unfiltrat- zur Filtratseite einer Filterschicht geführt. Im Anschluss erfolgte eine gravimetrische oder volumetrische Filtratmengenbestimmung.

##### *Durchführung*

- Konditionierung der Filterschichten:
- Vorquellen für 10 Minuten in 500 mL Wasser
- Einlegen in Schichtenhalterung
- Überströmen der Tiefenfilterschicht von der Unfiltratseite aus mit 500 mL Wasser bei max. 1,5 bar Druck
- Vorsichtiges Trockenblasen mit max. 0,2 bar Druck zur Entfernung von Restwasser

##### Filtration:

- Einfüllen der Probe in den Vorratsbehälter der restentleerten und trockengeblasenen Kleinmengenfiltrationsanlage (Eigenbau vgl. Abbildung 4-2)
- Entlüftung der Anlage vom Vorratsbehälter bis zur Unfiltratseite der Tiefenfilterschicht unter Zuhilfenahme des statischen Drucks
- Nach Beginn der Filtration gegebenenfalls Nachjustierung des voreingestellten Filtrationsdrucks

##### *Geräte und Chemikalien*

Filtrationsstand zur Kleinmengenfiltration (Eigenbau)

Filterschicht (Fa. Eaton Steril S 80, 60 mm; rund; Fa. Begerow)

Druckluft (gereinigt)

Metaweinsäure zur Synthese (Fa. VWR)



Abbildung 4-2 Kleinmengenfiltrationsstand zur Schichtenfiltration

### **4.15 Identifizierung von Aminosäuren im Proteinteil bei Gummi Arabikum**

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Kolloiden erfolgte nach salzsaurer Hydrolyse. In der Probe enthaltene Proteine wurden dabei in einzelnen Aminosäuren zerlegt. Es wurde 40 – 100 mg Analysenmaterial in ein Hydrolysegefäß eingewogen, mit 2 mL Hydrolyselösung versetzt, mit Stickstoff (N<sub>2</sub> 5.0) überschichtet und im Trockenschrank bei 110 °C über exakt 24 h hydrolysiert. Die hydrolysierte Lösung wurde über einen Schwarzbandfilter filtriert. 200 µL des Filtrats wurden anschließend bei 135 °C für 1 h bei geöffneten Gefäßen im Thermoblock bis zur absoluten Trockene abgedampft (Abdampfen der Säure aus der Probe).

In jedes Hydrolysegefäß wurden 1 mL Probenverdünnungspuffer zugegeben und der Hydrolyserückstand durch Behandlung im Ultraschallbad für ca. 60 min im Puffer gelöst. Der gelöste Hydrolyserückstand wurde über einen 0,45 µm Spritzenfilter in ein Vial filtriert und im Aminosäureanalysator vermessen. Die Summe der einzelnen Aminosäuren ergibt den Gesamtproteinanteil.

### *Geräte und Chemikalien*

Aminosäureanalysator mit Lithiumpuffersystem zur Trennung mit Ninhydrinreagenz zur Nachsäulenderivatisierung, (Aminosäureanalysator Sykam S433 mit Analytischer- und Micropumpe, S 7130 Reagent Organizer, S 4300 Amino Acid Reaction Module, S 2100 Solvent Delivery System, S 5200 Autosampler)

Bedingungen: Lithium-Citratpuffer

Fließmittel A: 0,12 N, pH 2,9

Fließmittel B: 0,30 N, pH 4,2

Fließmittel C: 0,30 N, pH 8,0

Fließmittel D: 0,45 N

UV-Detektor für 570 und 440 nm

Fließmittel: Lithiumgradient für die Ionenaustauschchromatographie, Nachsäulenderivatisierungsreagenz Ninhydrin zur Anfärbung der Aminogruppen

Flussrate: 0,45 mL/min analytische Pumpe, 0,25 mL/min Micropumpe

Trennsäule: Harzbett 4,6 x 150 mm

Injektionsvolumen 100 µL

Software Clarity Amino

Standard-Lösung Hydrolyse, Fa. Sykam

Schwarzbandfilter, Fa. Whatman

Hydrolyselösung 6 mol/L HCl, p.a. incl. 0,1 % Phenol (37%ige HCl, Fa. J.T. Baker; Phenol kristallin, Fa. AppliChem)

Hydrolysegefäße aus Glas, druckfest mit Deckel

Probenverdünnungspuffer (Li-citrat, Fa. Sykam, pH 2,2) beinhalten 100 nMol/mL

Norleucin als internen Standard

Membranfilter aus Celluloseacetat 0,45 µm, Fa. Duratec

#### **4.16 Trübungsphotometrie und ATR Analysen**

Zur Messung der objektiven Trübung von Getränken wurden Proben im 90°-Streulichtprinzip im Nephla-Trübungsphotometer analysiert. Bei besonders trüben Proben wurde erst die Gesamttrübung und anschließend nach scharfer Zentrifugation die stabile Trübung bestimmt. Die Vorgehensweise ist in der Standardarbeitsanweisung SOP\_052\_03\_Nephla des Instituts Weinanalytik und Getränketechnologie erläutert.

##### *Geräte und Chemikalien*

Reagenzgläser (20 mL)

Nephla Trübungsphotometer LPG239 (90°-Streulichtphotometrie bei 860 nm) (Fa. Dr. Lange)

Messküvetten (Fa. Dr. Lange)

Zentrifuge ROTANTA 460RS (Fa. Hettich)

100 mL Zentrifugengläser

Lysozym BactiCare (Fa. Erbslöh)

SIHA Metaweinsäure (Fa. Begerow)

Na-Carboxymethylcellulose (Fa. Dow Wolf Cellulosics)

ATR-Spektrometer Tensor 27 (Fa. Bruker)

##### **4.16.1 Fällung und Nachweis von CMC und MWS mittels Lysozym**

Die unterschiedlichen Ladungen (+/-) der Zusatzstoffe und des Proteins Lysozym führt zum Agglomerieren der Stoffe, wobei eine messbare Trübung entsteht.

##### *Kalibrierung*

Zur Herstellung einer Lysozymstammlösung wurde das Präparat BactiCare (Fa. Erbslöh) nach Einwaage von 0,2 g mit Reinstwasser auf 200 ml aufgefüllt ( $c = 1 \text{ g/L}$ ). Weiter wurden Stammlösungen mit CMC und MWS in der Konzentration 100 mg/L angesetzt und anschließend in 20iger-Stufen verdünnt. Bei GA wurde eine Stammkonzentration von 400 mg/L hergestellt und in 80iger-Stufen verdünnt. Von den Stammlösungen wurden jeweils 10 mL in ein Reagenzglas pipettiert und anschließend mit 10 mL Lysozymlösung versetzt. Die Lösungen wurden anschließend mittels Messküvette am Trübungsphotometer gemessen. Ebenso

wurden die Blindwerte der reinen zusatzstoffhaltigen Stammlösungen ermittelt. Anhand der Werte wurden Kalibriergeraden erstellt.

### *Probenvorbereitung*

Von der Probe wurden 10 mL in ein Reagenzglas pipettiert und mit 10 mL Lysozymlösung versetzt. Anschließend erfolgte die Messung in einer Messküvette am Nephla Trübungsphotometer.

Die entstandene Trübung konnte anschließend, nach Zentrifugation und Dekantierung sowie ggf. Trocknung, isoliert und mittels IR analysiert werden. Bei hitzestabilen Proben kann die Trocknung im Trockenschrank erfolgen.

## **4.17 Sensorische Beurteilung der Zusatzstoffe**

### **4.17.1 Ermittlung des Schwellenwertes**

Zur Ermittlung der minimalen Konzentration eines Zusatzstoffes, welcher einen sensorischen Unterschied zur unbehandelten Probe (Nullprobe) bewirkt, wird die Schwellenwertprüfung genutzt. Für die Überprüfung wurden einzelne Konzentrationen des jeweiligen Zusatzstoffes in Weißwein gegen die Nullprobe von einem geschulten Panel ( $n = 11$ ) verkostet. Eine Rückverkostung war nicht zulässig. Für den Test wurde Weißwein mit den Zusatzstoffen in aufsteigender Reihenfolge in den Konzentrationen 100, 300, 500, 750 und 1000 mg/L für CMC und für MWS und GA zusätzlich in den Stufen 1500 und 200 mg/L versetzt und gegen den gleichen unbehandelten Wein verkostet. Die Verkostung erfolgt in dunklen Gläsern, mit deren Hilfe eine Beeinflussung durch Farbe bzw. Konsistenz vermieden wurde. Zur Neutralisation nachhaltiger Geschmackseindrücke (belegender Charakter der Zusatzstoffe) wurden Wasser und Teigwaren (Brötchen) zur Verfügung gestellt. Zur Bewertung standen die Kriterien 0 = kein Unterschied, x = Unterschied erkennbar und xx = Unterschied erkennbar und Geschmackseindruck benennbar zur Auswahl (Abb. I im Anhang). Als Reizschwelle wird definitionsgemäß die Konzentration bezeichnet, bei der 50 % der Prüflinge einen Unterschied feststellen können (Busch-Stockfisch 2004).

#### **4.17.2 Bestimmung der dynamischen Viskosität**

Die Zähflüssigkeit von Getränken kann dichteabhängig im automatischen Mikroviskosimeter AMVn (Anton Paar) sowohl als kinetische als auch dynamische Viskosität objektiv bestimmt werden.

##### *Geräte und Chemikalien*

Biegeschwinger (Fa. Anton Paar Typ DMA 48 Density Meter)

Automatisches Mikroviskosimeter AMVn (Fa. Anton Paar)

Kapillare - Durchmesser 1,6 mm mit spezifischer Konstante (Fa. Anton Paar)

Software Visiolab for AMVn Version 1.6 (Fa. Anton Paar)

##### *Probenvorbereitung und Messung*

Für die Messung der dynamischen Viskosität [mPa\*s] wird die Dichte der zu messenden Flüssigkeit benötigt. Diese wurde mittels Biegeschwinger bestimmt.

Das Mikroviskosimeter arbeitet nach dem Kugelrollprinzip. Dabei wird die Rollzeit einer Stahlkugel in einer mit Probe gefüllten, schräg gestellten Glaskapillare gemessen. Ein eingebautes Thermometer dient der präzisen Temperaturmessung und -regelung. Mit der Visiolab-Software können die gemessenen Werte gespeichert und ausgewertet werden.

Es werden sowohl die Werte der kinematischen, wie auch die dynamische Viskosität angegeben.

#### **4.18 Statistische Datenauswertung**

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit der Statistiksoftware Statistika (Version 7.1, Fa. StatSoft). Die analytischen Ergebnisse wurden jeweils auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test,  $p > 0,05$ ) und Varianzhomogenität (Levene-Test,  $p > 0,05$ ) mit einem kontrollierten Alpha-Fehler von 0,05 der Mittelwerte hin untersucht.

Um signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben mit GA festzustellen, wurde ein t-Test ( $p \leq 0,05$ ) für Gruppen angewendet, wenn die Bedingungen für Normalverteilung und Varianzhomogenität gegeben waren. Waren die Daten Varianz heterogen, aber normalverteilt, wurden die signifikanten Unterschiede mittels Welch-t-Test ermittelt. Waren Normalverteilung und Varianzhomogenität nicht gegeben, wurden die Daten mittels eines nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet.

Für die Auswertung der Stabilstoppenanalytik wurden der Median, der Maximum- und Minimum-Wert für jede Anbauregion in 2011 und 2012 berechnet. Das Signifikanzniveau wurde über den Tukey-HSD-Test ( $p \leq 0,05$ ) ermittelt. Waren die Daten nicht-varianzhomogen und/oder nicht-normalverteilt, wurde eine nicht-parametrische Kruskal-Wallis ANOVA berechnet.

Für den strukturierten Gesamtüberblick der Daten und der Beurteilung der Faktoren die die Ergebnisse am meisten beeinflussen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse mittels Statistika (PCA *Principal Component Analysis*) durchgeführt. Die Daten wurden autoskaliert, um die Wichtung über die Einheiten zu vermeiden. Dargestellt ist der *loading plot* und der *score plot*. Der *loading plot* zeigt die Wichtung und den Zusammenhang der Variablen im Hinblick auf die Gruppierung im *score plot*.

### **4.19 Verwendete Software**

- Citavi als Literaturverwaltungsprogramm (Version 4; Swiss Academic Software)
- Statistika für die statistische Datenauswertung (Version 7.1, Statsoft)

## 5 Literatur

**Abdel-Maksoud**, G.; El-Amin, A. R. (2011): A review on the materials used during the mummification processes in ancient Egypt. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 11(2), 129-50.

**Adden**, A. (2009): Substitution patterns in and over polymer chains – new approaches for carboxymethyl cellulose. *Dissertation TU Braunschweig*, 210 Seiten.

**Anderson**, D. M. W.; Karamalla, K. A. (1966): Studies on uronic acid materials. Part XII. The composition of Acacia gum exudates. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 762-764.

**Apolinar-Valiente**, R.; Williams, P.; Romero-Cascales, I.; Gómez-Plaza, E.; López-Roca, J. M.; Ros-García, J. M.; Doco, T. (2013): Polysaccharide composition of Monastrell red wines from four different Spanish terroirs: Effect of wine-making techniques. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(10), 2538-2547.

**Belleville**, M.-P.; Brillouet, J.-M.; Tarodo de la Fuente, B.; Moutounet, M. (1999): Polysaccharide effects on cross-flow microfiltration of two red wines with a microporous alumina membrane. *Journal of Food Science*, 55 (6), 1598–1602.

**Bigeleisen**, J. (1965): Chemistry of isotopes: Isotope chemistry has opened new areas of chemical physics, geochemistry, and molecular biology. *Science*, 147(3657)463–471.

**Bories**, A.; Sire, Y.; Bouissou, D.; Goulesque, S.; Moutounet, M.; Bonneaud, D.; Lutin, F. (2011): Environmental impacts of tartrate stabilization processes for wines using electrodialysis and cold treatment. *South African Society for Enology and Viticulture*, 32, 174–182.

**Bosso**, A.; Panero, L.; Petrozziello, M.; Sollazzo, M.; Asproudi, A.; Motta, S.; Guaita, M. (2015): Use of polyaspartate as inhibitor of tartaric precipitations in wines. *Food Chemistry*, 185, 1–6.

**Bosso**, A.; Salmado, D.; Faveri, E. de; Guaita, M.; Franceschi, D. (2010): The use of carboxymethylcellulose for the tartaric stabilization of white wines, in comparison with other oenological additives. *Vitis*, 49, 95–99.

**Bott**, E. (1988): A new tartrate stabilization technology successfully in operation. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 266, 22–24.

**Boulton**, R. B.; Singleton, V. L.; Bisson, L. F.; Kunkel, R. E. (1999): The physical and chemical stability of wine. In *Principles and Practices of Winemaking* Springer US, 320-351.

- Brillouet, J.** (1987): A study of pectic polysaccharides in musts from various mature grapes grown in the pech rouge experimental vineyards. *Biochimie*, 69(6-7), 713–721.
- Busch-Stockfisch, M.** (2002): Sensorische Grundlagen. *Praxishandbuch Sensorik in der Produktentwicklung und Qualitätssicherung*, Hamburg: Behrs Verlag (Stand: März 2006, 12. Lfg.).
- Carter, J. F.; Barwick, V. J.** (2011): *Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry, FIRMS*. ISBN 978-0-948926-31-0.
- Cayotte, D.; Batlle, J. L.; Roset, M.** (2003): Fachthemen - Nachweis von Meta-Weinsaure-Zusatz in Traubensaft. *Flüssiges Obst*, 70(9), 531-536.
- Chu, B.** (1991): *Laser light scattering: Basic principles and practice*. Elsevier Science. New York, 352 Seiten.
- Claus, H.; Tenzer, S.; Sobe, M.; Schlander, M.; König, H.; Fröhlich, J.** (2014): Effect of carboxymethyl cellulose on tartrate salt, protein and colour stability of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(2), 186-193.
- Constantin, C.; Patz, C.-D.; Dietrich, H.** (2011): Die Wirkung von Gummi Arabicum im Wein. *Der Deutsche Weinbau*, 30–36
- Coppen, J. J. W.** (1995): Gums, resins and latexes of plant origin. Non-wood forest products 6. *Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations x*, S. 142 ISBN 9789251037577.
- Coto, B.; Escola, J. M.; Suárez, I.; Caballero, M. J.** (2007): Determination of dn/dc values for ethylene–propylene copolymers. *Polymer testing*, 26(5), 568-575.
- Crachereau, J. C.; Gabas, N.; Blouin, J.; Hébrard, B.; Maujean, A.** (2001): Stabilisation tartrique des vins par la carboxyméthylcellulose (CMC). *Bulletin de l'OIV*, 74(841-42), 151-159.
- Crespy, A.** (2004): La gomme arabique: effets de l'addition de gomme sur vins blancs et vins rouges, avant entonnage en barriques neuves de chêne français. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle*, 31(113), 47-49.
- Criss, R. E.** (1999): *Principles of stable isotope distribution*. Oxford University Press.
- Cui, S. W.; Phillips, G. O.; Blackwell, B.; Nikiforuk, J.** (2007): Characterisation and properties of Acacia senegal (L.) Willd. var. senegal with enhanced properties (Acacia (sen) SUPERGUM™): Part 4. Spectroscopic characterisation of Acacia senegal var. senegal and Acacia (sen) SUPERGUM™ arabic. *Food hydrocolloids*, 21(3), 347-352.
- Defaye, J.; Wong, E.** (1986): Structural studies of gum arabic, the exudate polysaccharide from Acacia senegal. *Carbohydrate Research*, 150(1), 221-231.

**Dietrich**, H. (2009): Kolloide als Zusatzstoffe für Wein (1). *Der Deutsche Weinbau*, 15, 16-19.

**Dror**, Y.; Cohen, Y.; Yerushalmi-Rozen, R. (2006): Structure of gum arabic in aqueous solution. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 44(22), 3265-3271.

**Dubourdieu**, D.; Villettaz, J. C.; Desplanques, C.; Pascal, R. G. (1981): Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisins pourris. *Oeno One*, 15(3), 161-177.

**Dupin**, I. V.; Stockdale, V. J.; Williams, P. J.; Jones, G. P.; Markides, A. J.; Waters, E. J. (2000): Saccharomyces cerevisiae mannoproteins that protect wine from protein haze: Evaluation of extraction methods and immunolocalization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(4), 1086-1095.

**Gallina**, A.; Fiorese, E.; Pastore, P.; Magno, F. (2004): Identification and Semi-Quantitative Determination of Gum Arabic in Wines by GC-MS and Size Exclusion Chromatography. *Annali di chimica*, 94(3), 177-184.

**Gebrekirstos**, A.; van Noordwijk, M.; Neufeldt, H.; Mitlöhner, R. (2011): Relationships of stable carbon isotopes, plant water potential and growth: an approach to assess water use efficiency and growth strategies of dry land agroforestry species. *Trees*, 25(1), 95-102.

**Gerbaud**, V.; Gabas, N.; Blouin, J.; Crachereau, J. C. (2010): Study of wine tartaric acid salt stabilization by addition of carboxymethylcellulose (CMC): comparison with the "protective colloids" effect. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 44(4), 231-242.

**Gerbaux**, V.; Villa, A.; Monamy, C.; Bertrand, A. (1997): Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(1), 49-54.

**Guise**, R.; Filipe-Ribeiro, L.; Nascimento, D.; Bessa, O.; Nunes, F. M.; Cosme, F. (2014): Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization. *Food chemistry*, 156, 250-257.

**Heinze**, T.; Erler, U.; Nehls, I.; Klemm, D. (1994): Determination of the substituent pattern of heterogeneously and homogeneously synthesized carboxymethyl cellulose by using high-performance liquid chromatography. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 215(1), 93-106.

**Heinze**, T.; Koschella, A. (2005): Carboxymethyl Ethers of Cellulose and Starch - A Review. *Химия растительного сырья*, 3, 13-29.

**Hirn**, S. (2013): Charakterisierung und Nachweis von Metaweinsäureprodukten zur Weinsteinstabilisierung. *Masterarbeit, Hochschule Geisenheim University*, 82 Seiten

- Hoefs, J.** (2008): Stable isotope geochemistry. *Springer, Berlin - Heidelberg*, ISBN 978-3-540-70708-0.
- Horner, S.; Puls, J.; Saake, B.; Klohr, E. A.; Thielking, H.** (1999): Enzyme-aided characterisation of carboxymethylcellulose. *Carbohydrate polymers*, 40(1), 1-7.
- Huglin, M. B.** (1965): Specific refractive index increments of polymer solutions. Part I. Literature values. *Journal of Applied Polymer Science*, 9(12), 3963-4001.
- Islam, A. M.; Phillips, G. O.; Slijivo, A.; Snowden, M. J.; Williams, P. A.** (1997): A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 11(4), 493-505.
- Jurasek, P.; Kosik, M.; Phillips, G. O.** (1993): A chemometric study of the Acacia (gum arabic) and related natural gums. *Food hydrocolloids*, 7(1), 73-85.
- Karlsson, J.; Momcilovic, D.; Wittgren, B.; Schülein, M.; Tjerneld, F.; Brinkmalm, G.** (2002): Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei*. *Biopolymers*, 63(1), 32-40.
- Kennedy, J. F.; Phillips, G. O.; Williams, P. A.** (2011): *Gum arabic* (Vol. 333). *Royal Society of Chemistry*, ISBN 978-1-84973-193-5.
- Köhler, H. J.; Geßner, M.** (2011): Weinsteinstabilisierung durch Zusatz von Inhibitoren (Abteilung Oenologie und Analytik). *Forschungsring des Deutschen Weinbaus bei der DLG eV*, S. 94.
- Koller, M.; Lichtenhahn, M.; van den Berge, P.** (2000): Gründungen: Schlüssel zum erfolgreichen Biogemüsebau. *Merksblatt des Forschungsinstitutes für biologischen Landbau (FiBL)*, 8 Seiten.
- Kragten, E. A.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F.** (1992): Composition analysis of carboxymethylcellulose by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 623(1), 49-53.
- Kromidas, S.** (2000): Handbuch Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 978-3527298112.
- Lehner, M.** (2010): Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Metaweinsäure in Traubensäften. Diplomarbeit in Kooperation mit der GfL (Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung), TU Berlin.
- Llaubères, R. M.; Dubourdieu, D.; Villettaz, J. C.** (1987): Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41(3), 277-286.

**Mahendran**, T.; Williams, P. A.; Phillips, G. O.; Al-Assaf, S.; Baldwin, T. C. (2008): New Insights into the Structural Characteristics of the Arabinogalactan– Protein (AGP) Fraction of Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9269-9276.

**Marangon**, M.; Lucchetta, M.; Duan, D.; Stockdale, V. J.; Hart, A.; Rogers, P. J.; Waters, E. J. (2012): Protein removal from a Chardonnay juice by addition of carrageenan and pectin. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(2), 194-202.

**Marchal**, R.; Jeandet, P. (2009): Use of enological additives for colloid and tartrate salt stabilization in white wines and for improvement of sparkling wine foaming properties. *Wine chemistry and biochemistry*, Springer New York, 127-158.

**Marsh**, R.; Mills, S. (2013): Assessment of CMC-induced tartrate stability over 12 months. *Wine & Viticulture Journal*, 28(4), 36.

**Matissek**, R.; Steiner, G.; Fischer, M. (2010): Lebensmittelanalytik. Springer-Verlag, ISBN 978-3-540-92205-6.

**McCleary**, B. V.; Codd, R. (1991): Measurement of (1→ 3),(1→ 4)-β-D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55(2), 303-312.

**Nie**, S. P.; Wang, C.; Cui, S. W.; Wang, Q.; Xie, M. Y.; Phillips, G. O. (2013): A further amendment to the classical core structure of gum arabic (*Acacia senegal*). *Food Hydrocolloids*, 31(1), 42-48.

**O'Leary**, M. H. (1988): Carbon isotopes in photosynthesis. *Bioscience*, 38(5), 328-336.

**Pellerin**, P.; Cabanis, J. C. (1998): Les glucides et l'œnologie. *Œnologie. Fondements Scientifiques et Technologiques*, 41-92.

**Picton**, L.; Merle, L.; Muller, G. (1996): Solution behavior of hydrophobically associating cellulosic derivatives. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 2(2), 103-113.

**Pilone**, B. F.; Berg, H. W. (1965): Some factors affecting tartrate stability in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(4), 195-211.

**Puls**, J.; Horner, S.; Kruse, T.; Saake, B.; Heinze, T. (1998): Enzymunterstützte Charakterisierung von Carboxymethylcellulosen mit herkömmlicher und neuartiger Verteilung der funktionellen Gruppen. *Das Papier*, 52(12), 743-748.

**Raddad**, El A. Y.; Salih, A.; Fadl, M. A. El; Kaarakka, V.; Luukkanen, O. (2005): Symbiotic nitrogen fixation in eight *Acacia senegal* provenances in dryland clays of the Blue Nile Sudan estimated by the <sup>15</sup>N natural abundance method. *Plant and Soil*, 275(1-2), 261–269.

- Randall, R. C.;** Phillips, G. O.; Williams, P. A. (1989): Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food hydrocolloids*, 3(1), 65-75.
- Renard, D.;** Vernhet, A.; Sanchez, C. (2009): La gomme arabique commence à nous dévoiler ses secrets. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle*, 36(132), 31-34.
- Rhein, O.;** Neradt, F. (1979): Tartrate stabilization by the contact process. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(4), 265-271.
- Riber au-Gayon, P.;** Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. (2000): Handbook of enology: The chemistry of wine: Stabilization and treatments. *John Wiley & Sons LTD, New York*, 451 Seiten.
- Rosch, A.;** Friedrich, G. (2007): Neue M glichkeiten der Weinsteinstabilisierung. *Die Winzer-Zeitschrift*, 53–55 .
- Rossmann, A.** (2001): Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food reviews international*, 17(3), 347-381.
- Rouquayrol, M.;** Gaucher, B.; Greiner, J.; Aubertin, A. M.; Vierling, P.; Guedj, R. (2001): Synthesis and anti-HIV activity of glucose-containing prodrugs derived from saquinavir, indinavir and nelfinavir. *Carbohydrate research*, 336(3), 161-180.
- Saake, B.;** Horner, S.; Puls, J.; Heinze, T.; Koch, W. (2001): A new approach in the analysis of the substituent distribution of carboxymethyl celluloses. *Cellulose*, 8(1), 59-67.
- Salagoity, M. H.;** Guyon, F.; René, L.; Gaillard, L.; Lagr ze, C.; Domec, A.; Medina, B. (2011): Quantification method and organoleptic impact of added carboxymethyl cellulose to dry white wine. *Analytical Methods*, 3(2), 380-384.
- Santesteban, L. G.;** Miranda, C.; Barbarin, I.; Royo, J. B. (2015): Application of the measurement of the natural abundance of stable isotopes in viticulture: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(2), 157-167.
- Saulnier, L.;** Brillouet, J. M.; Joseleau, J. P. (1988): Structural studies of pectic substances from the pulp of grape berries. *Carbohydrate Research*, 182(1), 63-78.
- Saulnier, L.;** Thibault, J. F. (1987): Enzymic degradation of isolated pectic substances and cell wall from pulp of grape berries. *Carbohydrate polymers*, 7(5), 345-360.
- Scholten, G.;** Müller, T.; Friedrich, G. (2003): Weinsteinstabilisierung durch Metaweinsäure. *Der Deutsche Weinbau*, 30–33.
- Saeman, J. F.;** Bubl, J. L.; Harris, E. E. (1945): Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 17(1), 35-37.

- Sigler, J.;** (2004). Der Einsatz von Lysozym in der Weinbereitung. (Freiburg) *Der Badische Winzer*, 7, 31-33.
- Smith, A. K.;** June, H.; Noble, A. C. (1996): Effects of viscosity on the bitterness and astringency of grape seed tannin. *Food Quality and Preference*, 7(3), 161-166.
- Soares, P. A.;** Geraldés, V.; Fernandes, C.; Dos Santos, P. C.; de Pinho, M. N. (2009): Wine tartaric stabilization by electro dialysis: prediction of required deionization degree. *American journal of enology and viticulture*, 60(2), 183-188.
- Sprenger, S.;** Hirn, S.; Dietrich, H.; Will, F. (2015): Metatartaric acid: physicochemical characterization and analytical detection in wines and grape juices. *European Food Research and Technology*, 241(6), 785-791.
- Sprenger, S.;** Meylahn, K.; Zaar, A.; Dietrich, H.; Will, F. (2015): Identification of gum Arabic in white wine based on colloid content, colloid composition and multi-element stable isotope analysis. *European Food Research and Technology*, 240(5), 909-921.
- Steinberg, B.** (2005): Begrünungssysteme/ Management/ Bodenmikrobiologische Aspekte. Begrünungsmanagement im badischen Weinbau. *LVG-Heidelberg*, 1-3
- Stella, C.;** Sabatelli, M. (1971): Thin layer chromatographic investigation of metatartaric acid in wine. *Rivista di Viticoltura e di Enologia (Conegliano)*, 312–316
- Svedberg, T.** (1921): Ein kurzer Überblick über die Physik und Chemie der Kolloide. *Colloid & Polymer Science*, 28(5), 193–194
- Tanner, H.;** Brunner, R. (1987): Getränke Analytik. Untersuchungsmethoden für die Labor- und Betriebspraxis. Heller Chemie, Schwäbisch Hall, ISBN 978-3980049818.
- Uitslag, H.;** Skurray, G.; Nguyen, M. (1996): Tartrate removal from wine. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 390, 12–18.
- Vandeveld, M. C.;** Fenyo, J. C. (1985): Macromolecular distribution of Acacia senegal gum (gum arabic) by size-exclusion chromatography. *Carbohydrate polymers*, 5(4), 251-273.
- Vasseur, E.** (1948). A spectrophotometric study on the orcinol reaction with carbohydrates. *Acta chem. scand*, 2(8), 693-701.
- Vernhet, A.;** Dupre, K.; Boulange-Petermann, L.; Cheynier, V.; Pellerin, P.; Moutounet, M. (1999): Composition of tartrate precipitates deposited on stainless steel tanks during the cold stabilization of wines. Part I. White wines. *American journal of enology and viticulture*, 50(4), 391-397.
- Vidal, S.;** Williams, P.; Doco, T.; Moutounet, M.; Pellerin, P. (2003): The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439-447.

**Vollhardt**, K. P. C.; Schore, N. E. (2011): *Organische chemie*. John Wiley & Sons., ISBN 978-3527313808.

**Will**, F.; Pfeifer, W.; Dietrich, H. (1991): Die Bedeutung der Kolloide für die Qualität des Weines. *Wein-Wissenschaft*, 46(4), 78-84.

**Wittgren**, B.; Wahlund, K. G. (1997): Fast molecular mass and size characterization of polysaccharides using asymmetrical flow field-flow fractionation-multiangle light scattering. *Journal of Chromatography A*, 760(2), 205-218.

**Wörner**, K.; Weinand, R.; Dietrich, H. (1994). Untersuchungen zur Deckschichtbildung bei der Cross Flow Filtration von Weinen. *Wein-Wissenschaft*, 49(5), 170-179.

**Wucherpennig**, K.; Bretthauer, G. (1962): Über die Störung einer Weinsäurebestimmungsmethode bei Anwesenheit von Metaweinsäure. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 116(3), 219-224.

**Wucherpennig**, K.; Dietrich, H.; Götz, W.; Rötz, S. (1984): Einfluss von Kolloiden auf die Weinsteinkristallisation unter besonderer Berücksichtigung der Weinstein stabilisierung. *Weinwirtschaft Technik*, 13–23.

**Wucherpennig**, K.; Dietrich, H.; Weik, B. (1987): Rückhaltevermögen von Filterschichten für Makromoleküle. *Weinwirtschaft Technik*, 21–24.

**Würdig**, G.; Woller, R. (1989): Handbuch der Lebensmitteltechnologie-Chemie des Weines. *Ulmer, Stuttgart*, 561, 925 Seiten.

**Wyatt** Technology Europe-Customer Support (Schneider, M.) (2012): Polydispersität von Metaweinsäure. Dernbach.

**Zoecklein**, B. W.; Fugelsang, K. C.; Gump, B. H.; Nury, F. S. (1995): Wine analysis and production, *Wine analysis and production*. Springer US, ISBN 978-1-4757-6967-8.

## 6 Anhang

### Abbildungsverzeichnis des Anhangs

**Abbildung A** Loading (A) und Score Plot (B) der PCA Analyse

**Abbildung B** Linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Streulichtintensität der Trübung von MWS und CMC gefällt mit Lysozym

**Abbildung C** Chromatogramme SEC-RI (Superose 12 10/300 GL) der Zusatzstoffe MWS A–G

**Abbildung D** Chromatogramme SEC-RI (Superose 12 10/300 GL) der Zusatzstoffe (GA1–GA4) und der authentischen Zusatzstoffe (AA1–AA8)

**Abbildung E** Chromatogramme SEC-UV (Superose 12 10/300 GL) der Zusatzstoffe (GA1–GA4) und der authentischen Zusatzstoffe (AA1–AA8)

**Abbildung F** Chromatogramme SEC-UV (Superose 6 10/300 GL) der Zusatzstoffe (CMC 2,3,5,6–9)

**Abbildung G** Massenspektren der Metaweinsäure Zusatzstoffe (MWS A–G) (SIM-Modus)

**Abbildung H** Fragebogen statistische Datenerhebung

**Abbildung I** Auswertungsbogen Schwellenwertprüfung

### Tabellenverzeichnis des Anhangs

**Tabelle A** Einzel Kolloidgehalte von unbehandelten (K) und behandelten Proben (P)

**Tabelle B** Rebsorte und Monosacharid Zusammensetzung sowie die Summe der Einzelzucker der Weißwein Kolloide aus dem Rheingau, Rheinhessen, der Nahe, Württemberg, Mosel und aus Franken

**Tabelle C** Median, Mittelwert, Minimum und Maximum Werte  $\delta^1\text{H}$ ,  $\delta^{16}\text{O}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  der isolierten Kolloide aus 25 deutschen Weißweinen

**Tabelle D** Mittelwert (Mw) und Standardabweichung ( $\pm\text{SD}$ ) der verschiedenen Charakterisierungsparameter von Metaweinsäure-Produkten

**Tabelle E** Mittelwert (Mw) und Standardabweichung ( $\pm\text{SD}$ ) der verschiedenen Charakterisierungsparameter von Gummi Arabikum-Produkten

**Tabelle F** Mittelwert (Mw) und Standardabweichung ( $\pm\text{SD}$ ) der verschiedenen Charakterisierungsparameter von Natrium-Carboxymethylcellulose-Produkten

**Tabelle G** Trübungswerte von Wein und Traubensaft, versetzt mit Zusatzstoffen, gefällt mittels Lysozym

## Anhang

Tabelle A Einzel-Kolloidgehalte von unbehandelten (K) und behandelten Proben (P; 300 mg/L GA Zusatz), sowie der Mittelwert (Mw) mit Standardabweichung (SD) der Kontrollen und Proben

Region	Rebsorte	K	P
Rheingau, Rheinhessen, Nahe	Riesling	930	1173
	Grauburgunder	323	631
	Müller-Thurgau	158	408
	Weißburgunder	267	538
	Riesling	732	1003
	Silvaner	269	580
	Riesling	371	669
	Weißburgunder	229	498
Württemberg	Riesling	345	803
	Silvaner	241	556
	Riesling	124	639
	Riesling	329	593
	n.s.	362	630
	Riesling	765	1101
	n.s.	494	679
Mosel	Müller-Thurgau	307	621
	Riesling	374	642
	Riesling	423	624
	Riesling	312	615
Franken	n.s.	498	724
	n.s.	493	681
	Müller-Thurgau	213	452
Saale-Unstrut	n.s	591	891
	n.s	349	603
	n.s	429	634
<b>Mw/SD</b>		<b>397 ± 191</b>	<b>679 ± 185</b>

# Anhang

Tabelle B Rebsorte und Monosaccharid-Zusammensetzung sowie die Summe der Einzelzucker der Weißwein-Kolloide aus dem Rheingau, Rheinhessen, der Nahe, Württemberg, Mosel und aus Franken

Behandlung	Rebsorte	L-Rhamnose (g 100g <sup>-1</sup> )	L-Arabinose (g 100g <sup>-1</sup> )	D-Galactose (g 100g <sup>-1</sup> )	D-Glucose (g 100g <sup>-1</sup> )	D-Mannose (g 100g <sup>-1</sup> )	D-Glucuronsäure (g 100g <sup>-1</sup> )	D-Galacturonsäure (g 100g <sup>-1</sup> )	Gesamt Zucker Gehalt (g 100g <sup>-1</sup> )
K 1	Riesling	8,41±0,34	23,78±0,34	17,97±0,07	1,90±0,03	14,19±0,60	1,09±0,01	6,84±0,05	74,17
K 2	Grauburgunder	2,93±0,06	13,45±0,76	20,16±0,97	2,30±0,09	24,26±2,37	1,05±0,06	2,35±0,04	66,51
K 3	Müller Thurgau	2,11±0,14	3,01±0,14	15,65±0,31	1,11±0,25	33,07±0,54	1,14±0,02	3,18±0,04	49,38
K 4	Weißburgunder	1,79±0,14	2,77±0,10	16,01±0,10	1,30±0,47	33,07±0,54	1,14±0,02	3,18±0,04	58,84
K 5	Riesling	4,51±0,04	17,35±0,43	15,88±0,38	1,23±0,04	20,67±0,62	0,64±0,02	3,99±0,13	64,27
K 6	Silvaner	2,25±0,01	1,56±0,01	10,98±0,01	0,63±0,01	32,54±0,37	0,89±0,03	3,19±0,04	52,05
K 7	Riesling	3,28±0,32	2,28±0,32	13,85±0,62	1,03±0,28	30,26±0,82	0,97±0,01	4,14±0,31	55,81
K 8	Weißburgunder	1,08±0,08	1,48±0,02	12,22±0,08	1,57±0,65	37,61±5,16	0,58±0,02	0,02±0,04	54,57
<b>Mittelwert</b>		<b>3,29 a</b>	<b>8,21 b</b>	<b>15,34 b</b>	<b>1,39 a</b>	<b>26,97 a</b>	<b>0,94 b</b>	<b>3,31 a</b>	<b>59,45 b</b>
P 1	Riesling	7,07±1,00	30,62±2,13	25,99±2,63	1,78±0,01	4,80±0,27	1,80±0,16	4,49±0,16	75,49
P 2	Grauburgunder	2,86±0,80	30,43±1,81	37,89±2,91	1,78±0,06	8,12±0,35	2,85±0,15	1,65±0,15	85,59
P 3	Müller Thurgau	2,86±1,10	30,70±2,43	41,29±2,92	<NWG	5,90±0,25	3,76±0,16	1,48±0,15	86,00
P 4	Weißburgunder	2,68±0,82	24,68±2,07	37,13±1,57	<NWG	11,01±1,52	3,42±0,14	1,23±0,14	80,15
P 5	Riesling	3,98±0,18	20,57±0,47	20,30±0,31	0,86±0,01	15,77±0,05	1,96±0,11	3,96±0,12	67,41
P 6	Silvaner	1,81±0,04	16,97±0,13	22,46±0,10	0,29±0,08	16,29±0,10	2,79±0,26	2,89±0,37	63,50
P 7	Riesling	3,36±0,09	15,93±0,57	21,43±0,44	0,77±0,12	16,82±0,99	3,43±0,07	3,70±0,13	65,45
P 8	Weißburgunder	1,02±0,20	18,66±0,34	25,28±0,42	0,81±0,01	18,87±0,44	3,03±0,04	1,42±0,01	69,08
<b>Mittelwert</b>		<b>3,21 a</b>	<b>23,57 a</b>	<b>28,97 a</b>	<b>0,87 a</b>	<b>12,20 b</b>	<b>2,88 a</b>	<b>2,60 a</b>	<b>74,08 a</b>
K 9	Riesling	4,98±1,19	3,49±0,51	14,93±1,90	1,36±0,57	13,80±0,99	n.n.n.n.	10,15±0,00	48,70
K 10	Silvaner	3,01±0,16	2,66±1,01	17,13±1,50	1,24±0,24	20,40±1,51	1,26±0,09	4,43±0,49	50,13
K 11	Riesling	3,91±0,68	4,31±0,56	16,22±4,68	0,82±0,48	17,04±5,47	1,56±0,05	5,94±0,07	49,79
K 12	Riesling	3,59±0,18	5,33±0,19	18,18±0,74	1,18±0,01	11,97±0,35	2,08±0,04	5,27±0,19	47,59
K 13	n.s.	0,48±0,05	1,03±0,05	5,67±0,11	0,72±0,34	36,15±0,36	0,76±0,02	1,63±0,00	46,44
K 14	Riesling	2,84±0,14	2,27±0,24	6,88±0,37	1,34±0,11	47,20±5,05	0,87±0,03	2,26±0,02	63,66
K 15	n.s.	5,26±0,00	7,23±0,20	12,97±0,27	2,91±0,09	24,94±0,98	1,37±0,00	3,95±0,18	58,63
<b>Mittelwert</b>		<b>3,44 a</b>	<b>13,14 b</b>	<b>13,14 b</b>	<b>1,37 a</b>	<b>24,50 a</b>	<b>1,32 b</b>	<b>4,80 a</b>	<b>52,14 b</b>
P 9	Riesling	3,02±0,23	12,50±1,17	19,94±1,44	1,30±0,24	7,01±1,52	2,27±0,07	3,44±0,24	49,48
P 10	Silvaner	1,93±0,06	18,09±0,61	26,01±0,48	0,75±0,00	11,61±0,21	2,97±0,04	2,40±0,14	63,77
P 11	Riesling	3,32±0,10	17,39±0,16	26,13±0,01	0,26±0,03	12,53±0,10	2,78±0,04	3,94±0,07	66,35
P 12	Riesling	3,15±0,15	19,02±0,22	28,74±0,28	0,95±0,03	10,86±0,12	2,95±0,08	2,84±0,12	68,51
P 13	n.s.	1,49±0,09	15,07±0,16	16,54±0,25	0,49±0,13	19,42±0,62	3,21±0,16	2,17±0,05	58,40
P 14	Riesling	2,48±0,70	13,94±1,33	19,54±1,42	1,04±0,02	21,44±2,05	2,17±0,14	1,86±0,14	62,47
P 15	n.s.	1,86±0,10	15,89±0,38	18,78±0,43	0,46±0,01	13,79±0,94	3,24±0,02	2,22±0,05	56,26
<b>Mittelwert</b>		<b>2,47 a</b>	<b>15,99 a</b>	<b>22,24 a</b>	<b>0,75 a</b>	<b>13,81 b</b>	<b>2,80 a</b>	<b>2,70 a</b>	<b>60,75 a</b>
K 16	Müller Thurgau	1,61±0,12	1,34±0,13	3,69±1,13	0,49±0,22	28,95±2,50	0,45±0,03	1,84±0,01	38,37
K 17	Riesling	1,43±0,02	1,33±0,02	5,00±0,02	0,76±0,01	30,29±2,14	0,52±0,01	4,00±0,04	43,33
K 18	Riesling	7,27±0,00	4,08±0,15	18,18±0,33	2,57±0,03	27,71±0,38	1,29±0,02	5,53±0,15	66,63
K 19	Riesling	6,43±0,07	6,14±0,002	19,80±0,00	1,89±0,00	24,93±0,35	1,21±0,13	4,97±0,14	65,37
<b>Mittelwert</b>		<b>4,19 a</b>	<b>3,22 b</b>	<b>11,67 a</b>	<b>1,43 a</b>	<b>27,97 a</b>	<b>0,87 b</b>	<b>4,08 a</b>	<b>53,42 a</b>
P 16	Müller Thurgau	1,33±0,11	15,13±0,76	17,49±0,48	0,38±0,04	16,82±0,57	2,40±0,06	1,97±0,10	55,53
P 17	Riesling	1,36±0,36	14,31±1,11	17,13±0,82	0,30±0,07	19,97±1,22	2,31±0,09	2,43±0,26	57,82
P 18	Riesling	5,53±0,99	23,08±1,99	37,20±2,54	0,35±0,05	8,43±0,08	3,24±0,16	3,58±0,16	81,42
P 19	Riesling	4,63±1,01	24,15±2,15	35,78±2,93	0,88±0,06	6,68±0,36	3,24±0,16	2,63±0,16	77,78
<b>Mittelwert</b>		<b>3,21 a</b>	<b>19,17 a</b>	<b>26,90 a</b>	<b>0,43 a</b>	<b>12,97 b</b>	<b>2,80 a</b>	<b>2,65 a</b>	<b>68,13 a</b>
K 20	n.s.	0,33±0,06	0,43±0,06	3,74±0,01	0,71±0,04	33,07±0,97	0,29±0,01	2,32±0,08	40,89
K 21	n.s.	0,35±0,02	0,44±0,02	3,36±0,01	0,51±0,05	31,74±0,35	0,18±0,10	0,74±0,04	37,33
K 22	Müller Thurgau	1,02±0,23	1,37±0,23	7,72±0,09	1,78±0,00	34,08±0,65	0,46±0,00	1,74±0,09	48,16
<b>Mittelwert</b>		<b>0,57 a</b>	<b>0,75 b</b>	<b>4,94 b</b>	<b>1,00 a</b>	<b>32,96 a</b>	<b>0,31 b</b>	<b>1,60 a</b>	<b>42,13 a</b>
P 20	n.s.	0,06±0,00	11,42±0,56	14,01±0,13	0,86±0,69	21,43±0,57	1,84±0,15	1,53±0,11	51,16
P 21	n.s.	0,19±0,07	13,03±0,30	14,86±0,24	0,19±0,04	19,49±0,50	2,13±0,02	1,74±0,01	51,65
P 22	Müller Thurgau	1,34±0,17	19,71±0,18	23,57±0,08	0,67±0,07	14,20±0,28	3,03±0,16	1,47±0,08	64,01
<b>Mittelwert</b>		<b>0,53 a</b>	<b>14,72 a</b>	<b>17,49 a</b>	<b>0,58 a</b>	<b>18,37 b</b>	<b>2,34 a</b>	<b>1,58 a</b>	<b>55,61 a</b>

\*Daten werden als Mittelwert (n = 2) ± Standardabweichung angegeben, Signifikant unterschiedliche Ergebnisse sind pro Spalte mit verschiedenen kleinen Buchstaben gekennzeichnet (p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,005; \*\*\* p ≤ 0,0005)

Rheingau; Rheinhessen; Nahe

Württemberg

Mosel

Franken

## Anhang

Tabelle C Median, Mittelwert, Minimum und Maximum  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  der isolierten Kolloide aus 25 deutschen Weißweinen ohne GA Zusatz (K) und mit 300 mg/L GA Zusatz (P) sowie kommerziell erhältlicher Zusatzstoffe (CA) und authentische Zusatzstoffe (AA) aus dem Senegal und dem Sudan

Region	Behandlung	Jahr	Parameter	Median [‰]	Mittelwert [‰]	Min, [‰]	Max, [‰]	n	
Rheingau; Rheinhessen; Nahe	K	2011	$\delta^2\text{H}$	-31,42	-30,81	-39,81	-20,59	4	
	K	2011	$\delta^{18}\text{O}$	24,29	24,44	22,85	26,35		
	K	2011	$\delta^{15}\text{N}$	5,33	5,25	3,72	6,59		
	K	2011	$\delta^{13}\text{C}$	-25,86	-26,05	-27,23	-25,27		
	P	2011	$\delta^2\text{H}$	-33,63	-34,88	-40,12	-32,13		
	P	2011	$\delta^{18}\text{O}$	25,58	25,76	23,78	28,09		
	P	2011	$\delta^{15}\text{N}$	5,27	5,22	3,11	7,24		
	P	2011	$\delta^{13}\text{C}$	-25,90	-26,00	-26,51	-25,70		
	Rheingau; Rheinhessen; Nahe	K	2012	$\delta^2\text{H}$	-31,79	-30,93	-38,95	-21,19	4
		K	2012	$\delta^{18}\text{O}$	24,52	24,57	24,03	25,20	
		K	2012	$\delta^{15}\text{N}$	3,51	3,33	1,29	5,02	
		K	2012	$\delta^{13}\text{C}$	-25,50	-25,36	-26,13	-24,29	
		P	2012	$\delta^2\text{H}$	-34,56	-33,96	-38,96	-27,74	
		P	2012	$\delta^{18}\text{O}$	27,09	26,56	23,37	28,67	
P		2012	$\delta^{15}\text{N}$	3,89	3,86	2,71	4,94		
P		2012	$\delta^{13}\text{C}$	-25,53	-25,55	-25,69	-25,48		
Württemberg	K	2012	$\delta^2\text{H}$	-32,79	-33,03	-39,60	-25,17	7	
	K	2012	$\delta^{18}\text{O}$	25,52	25,30	24,38	26,25		
	K	2012	$\delta^{15}\text{N}$	2,51	2,50	1,62	3,48		
	K	2012	$\delta^{13}\text{C}$	-25,71	-25,67	-26,07	-25,14		
	P	2012	$\delta^2\text{H}$	-32,60	-34,29	-42,63	-29,16		
	P	2012	$\delta^{18}\text{O}$	27,67	27,06	23,22	28,90		
	P	2012	$\delta^{15}\text{N}$	3,03	2,90	1,74	3,79		
	P	2012	$\delta^{13}\text{C}$	-25,63	-25,52	-25,90	-24,61		
Mosel	K	2011	$\delta^2\text{H}$	-37,96	-36,40	-43,84	-27,40	3	
	K	2011	$\delta^{18}\text{O}$	23,58	23,42	21,59	25,10		
	K	2011	$\delta^{15}\text{N}$	4,34	4,00	3,14	4,54		
	K	2011	$\delta^{13}\text{C}$	-25,99	-25,98	-26,39	-25,58		
	P	2011	$\delta^2\text{H}$	-34,94	-36,41	-39,37	-34,92		
	P	2011	$\delta^{18}\text{O}$	24,19	24,77	23,73	26,40		
	P	2011	$\delta^{15}\text{N}$	4,78	5,02	3,06	7,22		
	P	2011	$\delta^{13}\text{C}$	-25,94	-25,96	-26,15	-25,80		
Franken	K	2011	$\delta^2\text{H}$	-37,52	-37,73	-38,43	-37,25	3	
	K	2011	$\delta^{18}\text{O}$	22,24	22,27	22,19	22,38		
	K	2011	$\delta^{15}\text{N}$	2,83	2,33	0,98	3,19		
	K	2011	$\delta^{13}\text{C}$	-25,28	-25,40	-25,88	-25,03		
	P	2011	$\delta^2\text{H}$	-44,10	-42,89	-45,12	-39,46		
	P	2011	$\delta^{18}\text{O}$	23,95	24,95	22,02	28,87		
	P	2011	$\delta^{15}\text{N}$	2,84	2,64	1,37	3,69		
	P	2011	$\delta^{13}\text{C}$	-25,82	-25,77	-25,90	-25,60		
Kommerziell erhältliche Zusatzstoffe (CA) und authentische Zusatzstoffe (AA)	CA	n,s,	$\delta^2\text{H}$	-44,82	-46,00	-59,89	-34,46	4	
	CA	n,s,	$\delta^{18}\text{O}$	32,45	32,86	31,54	35,00		
	CA	n,s,	$\delta^{15}\text{N}$	8,02	6,50	0,61	9,34		
	CA	n,s,	$\delta^{13}\text{C}$	-24,79	-24,53	-25,37	-23,14		
	AA	n,s,	$\delta^2\text{H}$	-56,74	-52,60	-63,30	-37,52	8	
	AA	n,s,	$\delta^{18}\text{O}$	32,28	32,24	30,97	33,81		
	AA	n,s,	$\delta^{15}\text{N}$	13,64	12,63	8,19	14,81		
	AA	n,s,	$\delta^{13}\text{C}$	-24,48	-24,57	-25,82	-22,98		

n.s. not specified

n = Anzahl der Proben

# Anhang

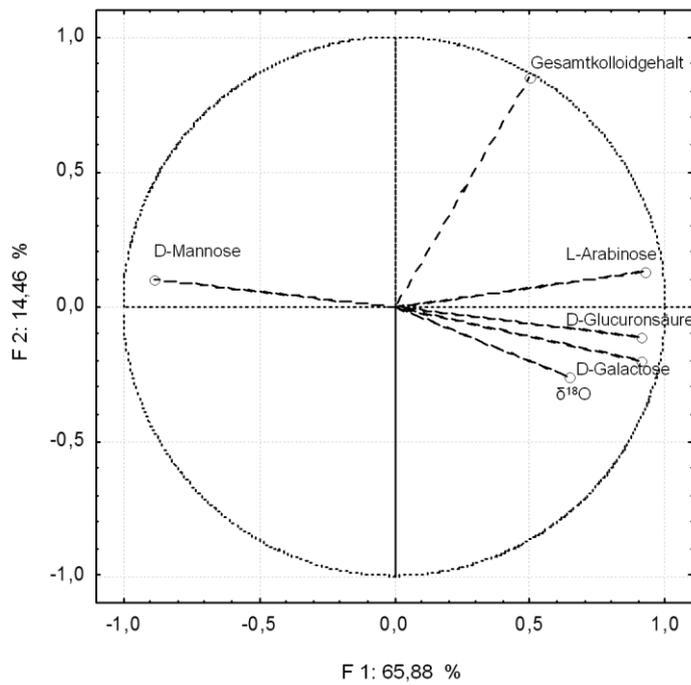
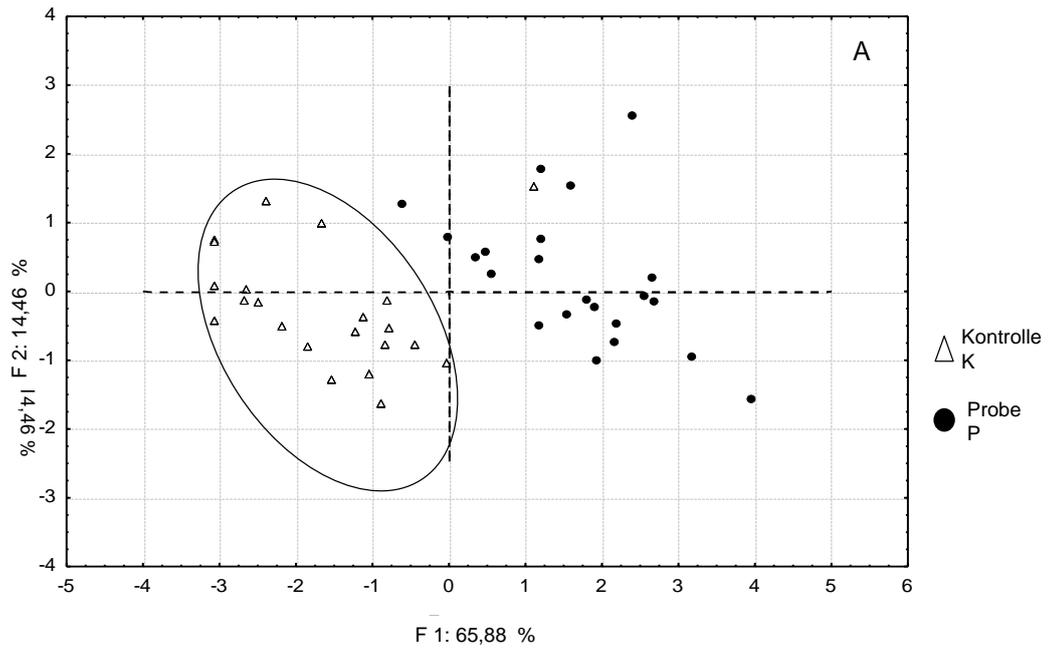


Abbildung A Loading (A) und Score Plot (B) der PCA Analyse bestehend aus Gesamtkolloidgehalt, L-Arabinose, D-Glucuronsäure, D-Galactose,  $\delta^{18}\text{O}$  und D-Mannose

# Anhang

Tabelle D Mittelwert (Mw) und Standardabweichung ( $\pm$ SD) der verschiedenen Charakterisierungsparameter von Metaweinsäure-Produkten (A–G)

Produkt	MWS A		MWS B		MWS C		MWS D		MWS E		MWS F		MWS G		
	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	
<b>anorganische Elemente*</b>															
Cr	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	4,63	1,04	0,79	0,07	5,19	0,12	0,92	0,29	
Fe	3,43	0,10	2,82	0,83	2,59	0,49	10,62	2,22	4,27	0,35	10,42	0,66	5,77	0,14	
Mn	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	
Ni	0,41	0,02	n,n	n,n	n,n	n,n	0,85	0,33	0,77	0,00	0,30	0,04	0,79	0,16	
Cu	0,25	0,00	0,34	0,00	0,33	0,06	0,35	0,09	0,40	0,03	0,39	0,00	0,33	0,00	
Zn	0,22	0,00	0,29	0,03	0,24	0,00	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	
Rb	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	n,n	
Sr	0,57	0,03	n,n	n,n	0,48	0,04	0,55	0,28	0,30	0,07	0,58	0,16	1,05	0,00	
<b>Trockenmasse</b>															
	%	98,75	0,09	94,31	5,5	97,04	0,03	96,36	0,06	97,37	0,09	93,24	0,08	97,96	0,31
<b>Asche</b>															
	%	n,b,	n,b,	n,b,	n,b,	n,b,	n,b,	n,b,	0,01	0,00	n,b,	n,b,	0,05	0,02	
<b>Organische Säuren</b>															
Weinsäure	g/100g	11,67	0,13	14,86	0,38	12,81	0,77	18,98	0,29	11,87	0,07	18,87	0,07	15,61	0,36

\* bestimmt aus der Festsubstanz

# Anhang

Tabelle E Mittelwert (Mw) und Standardabweichung ( $\pm$ SD) der verschiedenen Charakterisierungsparameter von Gummi Arabikum-Produkten

Produkt	GA1**		GA2*		GA3**		GA4**	
	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD
<b>anorganische Elemente<sup>a</sup></b>								
Fe	6,91	0,31	5,21	0,04	0,47	0,12	13,62	0,31
Mn	0,88	0,00	2,69	0,10	n,n	n,n	3,65	0,09
Cu	0,45	0,02	2,00	0,28	n,n	n,n	2,84	0,01
Zn	0,12	0,01	0,47	0,06	n,n	n,n	0,23	0,01
Rb	1,35	0,01	3,91	0,19	n,n	n,n	3,13	0,04
Sr	13,75	0,41	103,84	2,92	0,21	0,00	9,30	0,01
<b>anorganische Elemente<sup>b</sup></b>								
Ca	2,73	0,13	9,89	0,57	2,48	0,08	5,04	0,40
K	2,18	0,12	2,42	0,00	5,61	0,72	29,95	0,72
Mg	1,15	0,07	1,05	0,01	1,76	0,00	0,62	0,04
Na	14,24	0,62	4,36	0,62	0,25	0,02	0,50	0,02
Cu	0,002	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,001	0,000
Fe	0,024	0,007	0,004	0,000	0,01	0,001	0,01	0,003
Zn	0,002	0,000	0,003	0,000	0,002	0,000	0,0002	0,000
<b>Trockenmasse</b>								
	%	24,22	0,03	90,98	0,07	23,19	0,02	22,94
<b>Asche</b>								
	%	1,48	0,07	3,22	0,04	1,47	0,02	1,81
<b>Organische Säuren</b>								
Citronensäure	n,n	n,n	-	-	53,35	0,05	0,28	0,00
Essigsäure	2,78	0,04	-	-	4,09	0,02	0,32	0,01
Milchsäure	0,39	0,00	-	-	1,67	0,01	0,41	0,00
<b>Gesamt Protein</b>								
	mg/g	0,96	0,05	0,32	0,02	0,51	0,01	0,05
<b>Gesamt Zucker<sup>c</sup></b>								
	mg/g	66,2	0,26	68,8	1,57	73,1	0,85	67,8

\*Festsbstanz

a bestimmt mittels TRFA aus der Flüssigkeit oder Festsbstanz

b bestimmt aus der Asche (AAS)

c bestimmt aus der Trockenmasse

\*\*flüssiger Zusatzstoff

# Anhang

Tabelle F Mittelwert (Mw) und Standardabweichung ( $\pm$ SD) der verschiedenen Charakterisierungsparameter von Natrium-Carboxymethylcellulose-Produkten

Produkt	CMC 1**		CMC 2**		CMC 3**		CMC 4**		CMC 5*		CMC 6*		CMC 7*		CMC 8*		CMC 9*	
	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD	Mw	$\pm$ SD
<b>anorganische Elemente<sup>a</sup></b>																		
	<b><math>\mu\text{g/g}^*</math></b>																	
	<b><math>\mu\text{g/L}^{**}</math></b>																	
Fe	0,20	0,00	0,17	0,02	0,28	0,01	0,28	0,00	5,46	0,59	4,31	0,80	3,41	0,27	2,07	0,21	32,60	8,23
Mh	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Cu	0,39	0,00	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zn	0,07	0,00	n.n.	n.n.	0,07	0,00	0,04	0,00	0,29	0,01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,39	0,09	0,67	0,10
Ni	0,02	0,01	0,02	0,00	0,04	0,00	0,07	0,00	0,92	0,05	0,99	0,07	0,62	0,14	0,40	0,180,40	0,05	n.n.
<b>anorganische Elemente<sup>b</sup></b>																		
Ca	0,030	0,003	0,065	0,008	1,054	0,269	0,034	0,002	0,027	0,001	0,020	0,000	0,007	0,004	0,022	0,000	0,118	0,013
K	n.n.	n.n.	44,477	2,732	0,036	0,011	0,024	0,004	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,024	0,013	n.n.	n.n.	0,018	0,017
Mg	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Na	64,090	8,697	56,900	0,836	71,181	15,167	67,438	2,359	92,627	9,654	91,967	2,363	77,466	0,968	91,437	1,967	74,725	0,554
Cu	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Fe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zn	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Trockenmasse</b>																		
	<b>%</b>																	
	<b>%</b>																	
5,88	0,38	5,40	0,01	8,41	1,82	7,15	0,01	92,95	0,05	93,16	0,01	89,33	2,21	91,14	0,13	92,42	0,01	
<b>Asche</b>																		
	<b>%</b>																	
1,04	0,02	2,17	0,25	1,65	0,09	1,39	0,02	18,52	0,17	18,05	0,13	17,20	0,02	17,34	0,10	17,28	0,08	
<b>Organische Säuren</b>																		
	<b>g/L</b>																	
Citronensäure	n.n.	n.n.	6,07	0,06	6,91	0,01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Essigsäure	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Milchsäure	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Gesamt Protein</b>																		
	<b>mg/g</b>																	
n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Gesamt Zucker<sup>c</sup></b>																		
	<b>mg/g</b>																	
11,64	0,91	12,09	0,67	10,56	0,44	6,42	0,01	8,20	0,01	14,81	0,05	14,48	0,08	11,81	0,60	8,48	0,20	

\*\*flüssiger Zusatzstoff

\*Festsubstanz

<sup>a</sup> bestimmt mittels TRFA aus der Flüssigkeit oder Festsubstanz

<sup>b</sup> bestimmt aus der Asche (AAS)

<sup>c</sup> bestimmt aus der Trockenmasse

n.n. nicht nachweisbar

# Anhang

Tabelle G Trübungswerte von Wein und Traubensaft, versetzt mit Zusatzstoffen und gefällt mittels Lysozym

Proben Konzentration [mg/L]	Trübungsintensität [FNU]	
	Wein	Traubensaft
<b>Metaweinsäure (MWS)</b>		
0 (Blindwert)	2,22	8,85
20	59,6	14,88
40	76,4	26,7
60	99,6	36,9
80	131,2	49,1
100	164,9	62
150	227	87
200	365	130,4
250	460	163,6
300	570	193
400	718	207,4
<b>Carboxymethylcellulose (CMC)</b>		
0 (Blindwert)	0,36	0,57
20	29,29	34,9
40	54,49	66,7
60	76,99	96,6
80	102,59	126,5
100	130,29	158,4
150	190,99	293
200	293,99	399
250	375,99	548
300	401,99	727
400	-	-
<b>Gummi Arabikum (GA)</b>		
0	-	-
20	-	-
40	-	-
60	-	-
80	2,24	-
100	-	-
160	3,4	-
240	4,12	-
320	4,46	-
400	3,12	-

## Anhang

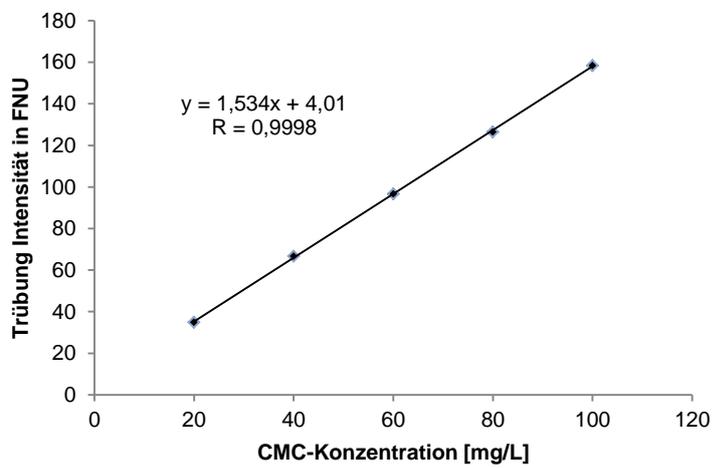
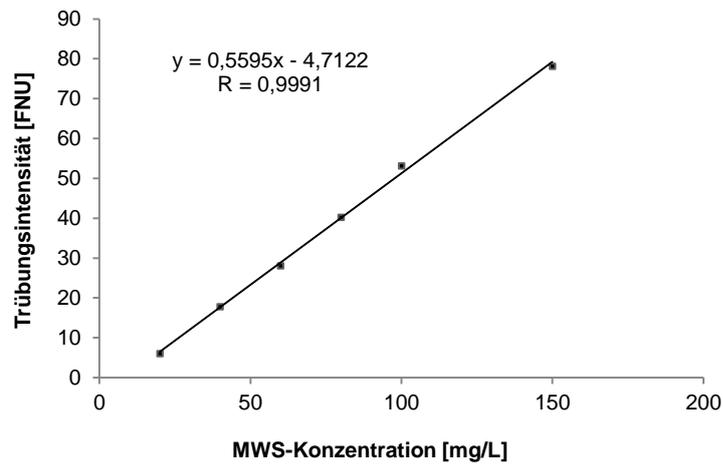


Abbildung B Linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Streulichtintensität der Trübung von Metaweinsäure und Natrium-Carboxymethylcellulose gefällt mit Lysozym in Traubensaft

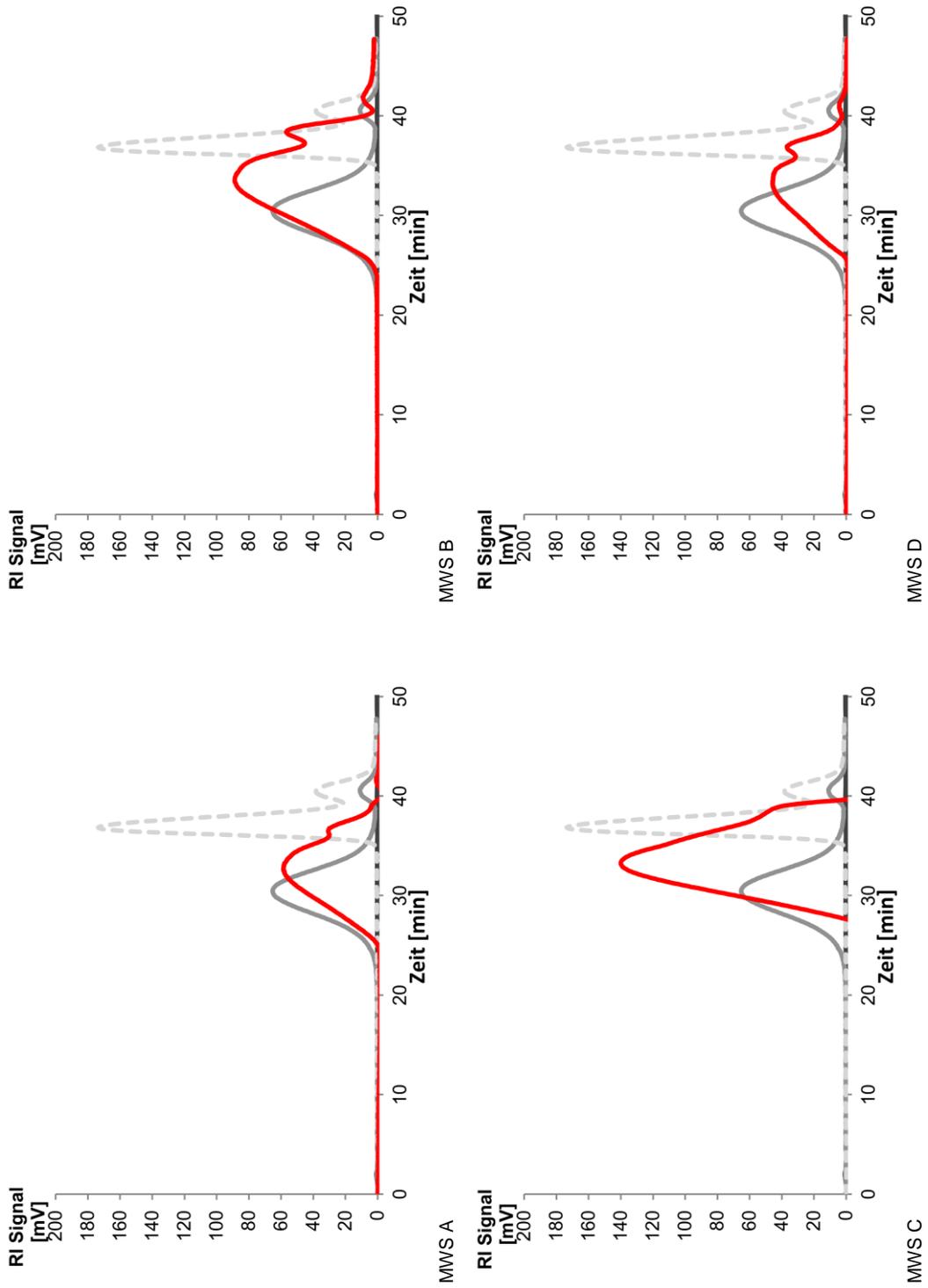


Abbildung C Chromatogramme SEC-RI (Superose 12 10/300 GL) der Zusatzstoffe MWS A–G

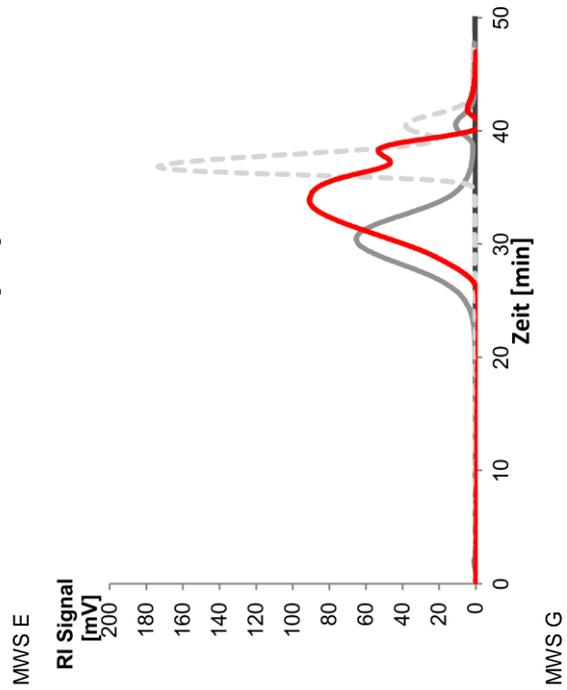
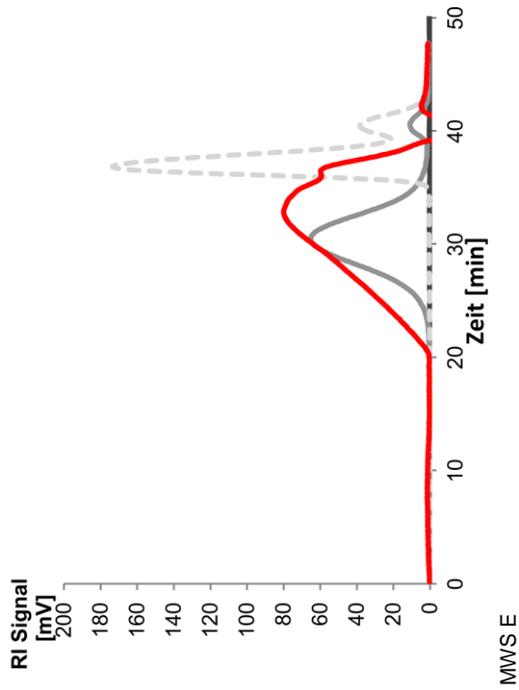
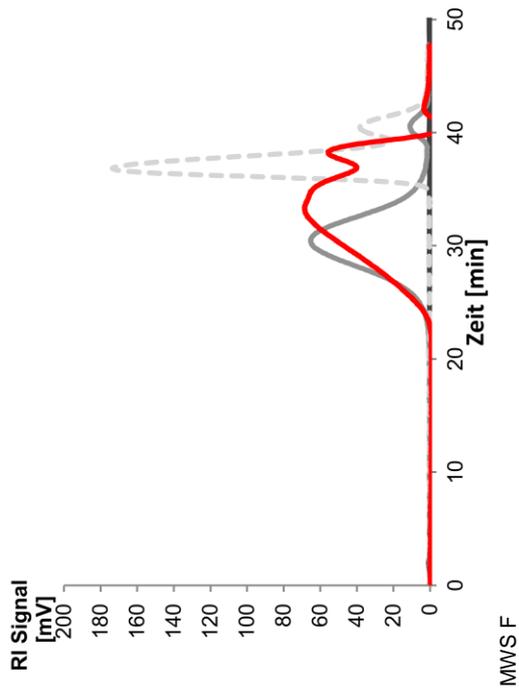
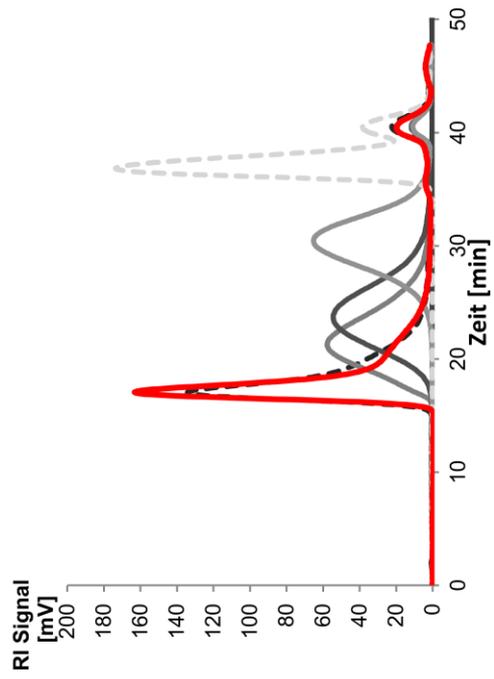
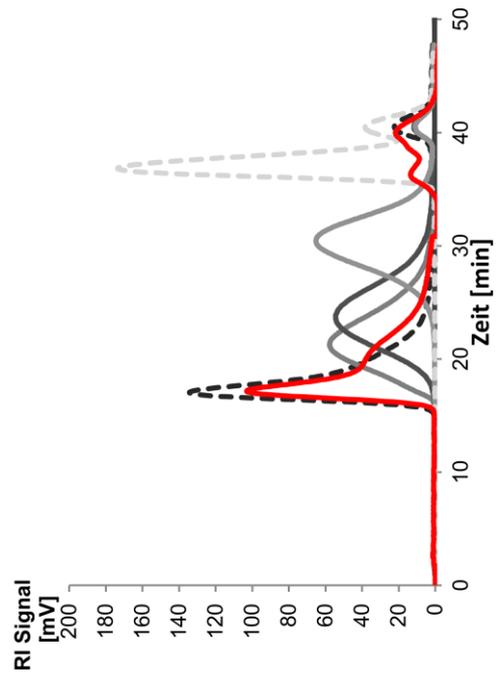


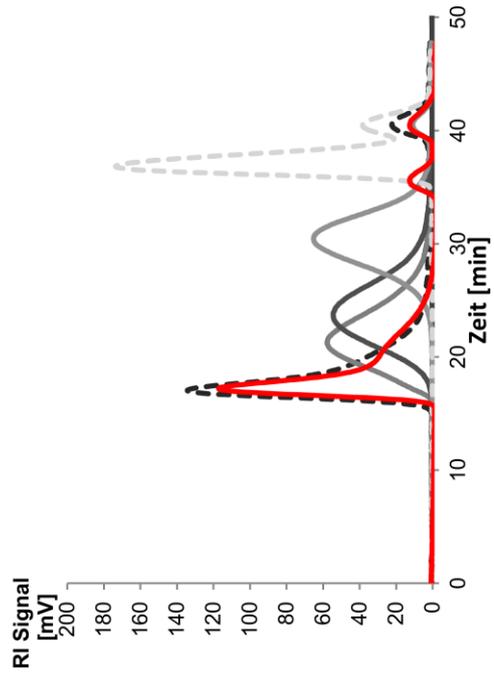
Abbildung C Chromatogramme SEC-RI (Superose 12 10/300 GL) der Zusatzstoffe MWS A–G



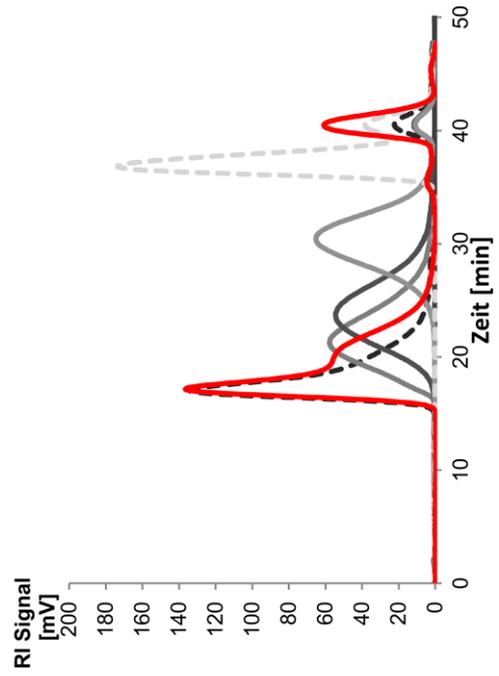
GA 2



GA 4

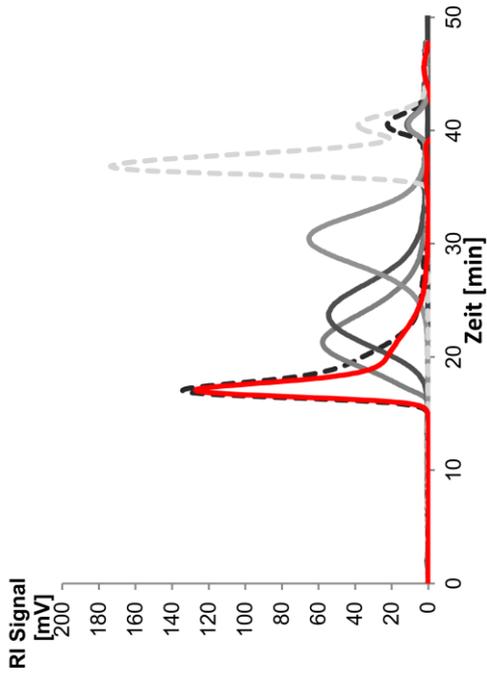


GA 1

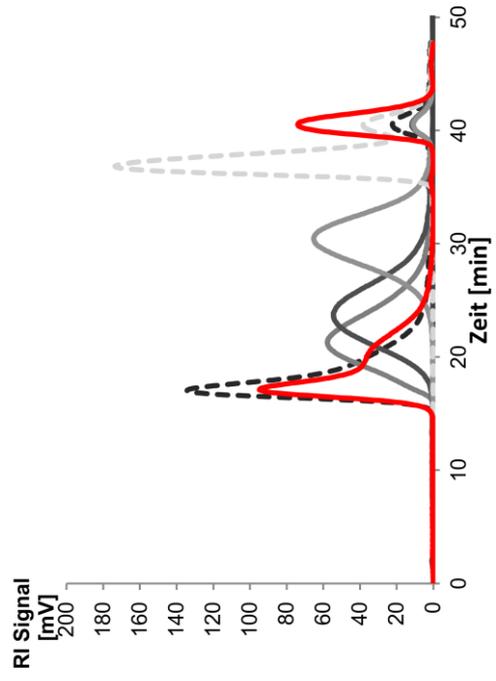


GA 3

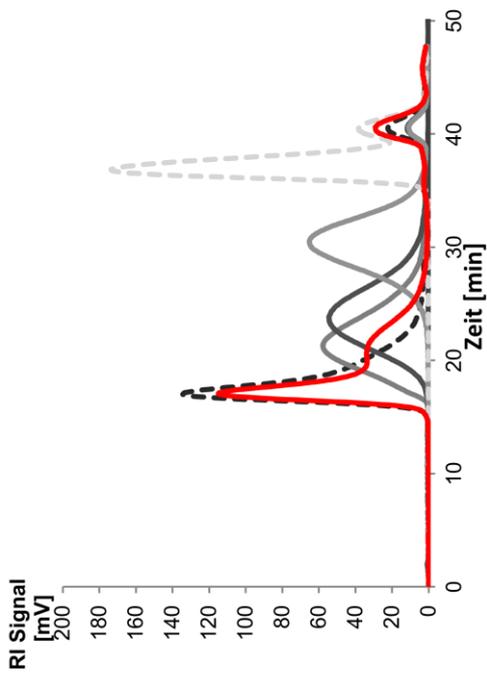
Abbildung D Chromatogramme SEC-RI (Superoose 12 10/300 GL) der Zusatzstoffe (GA1–GA4) und der authentischen Zusatzstoffe (AA1–AA8)



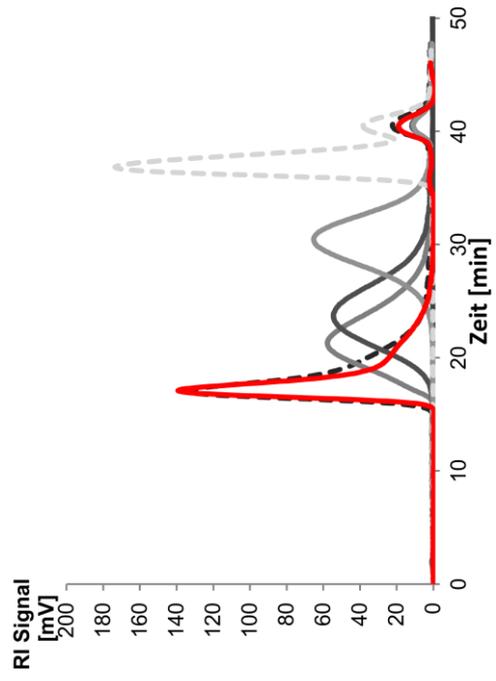
AA2



AA4



AA1



AA3

Abbildung D Chromatogramme SEC-RI (Superoose 12 10/300 GL) der Zusatzstoffe (GA1–GA4) und der authentischen Zusatzstoffe (AA1–AA8)

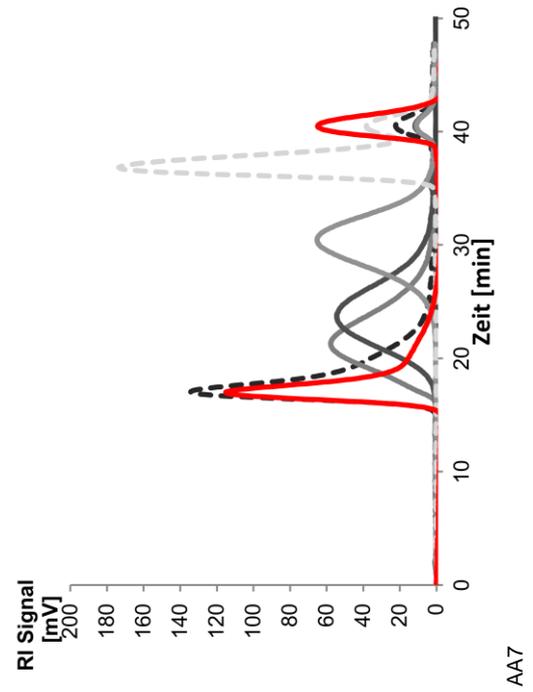
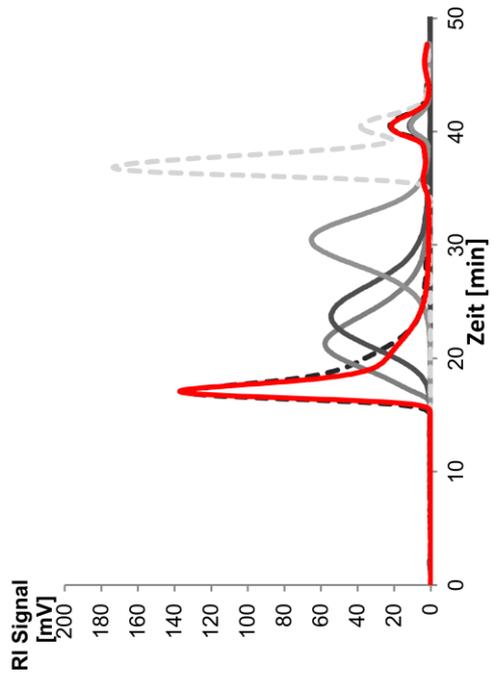
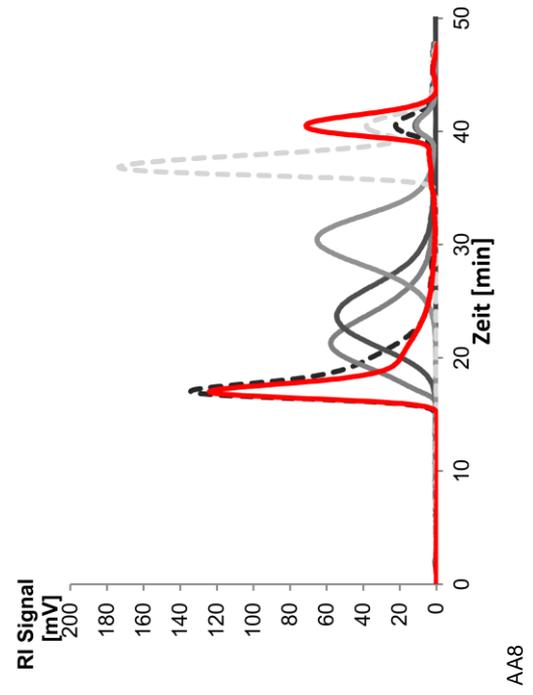
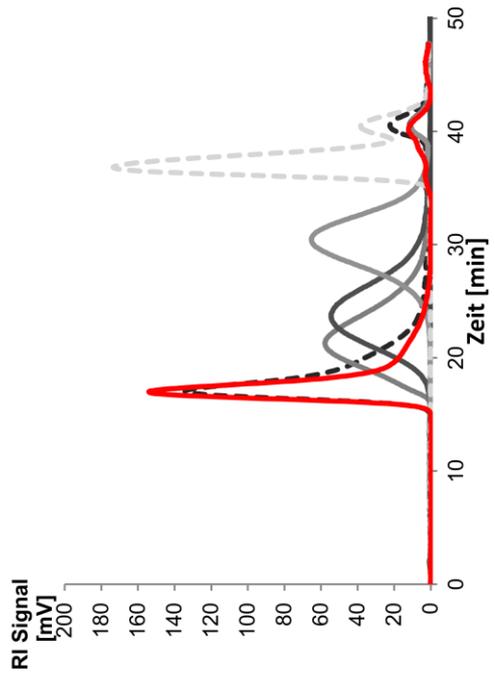


Abbildung D Chromatogramme SEC-RI (Superose 12 10/300 GL) der Zusatzstoffe (GA1–GA4) und der authentischen Zusatzstoffe (AA1–AA8)

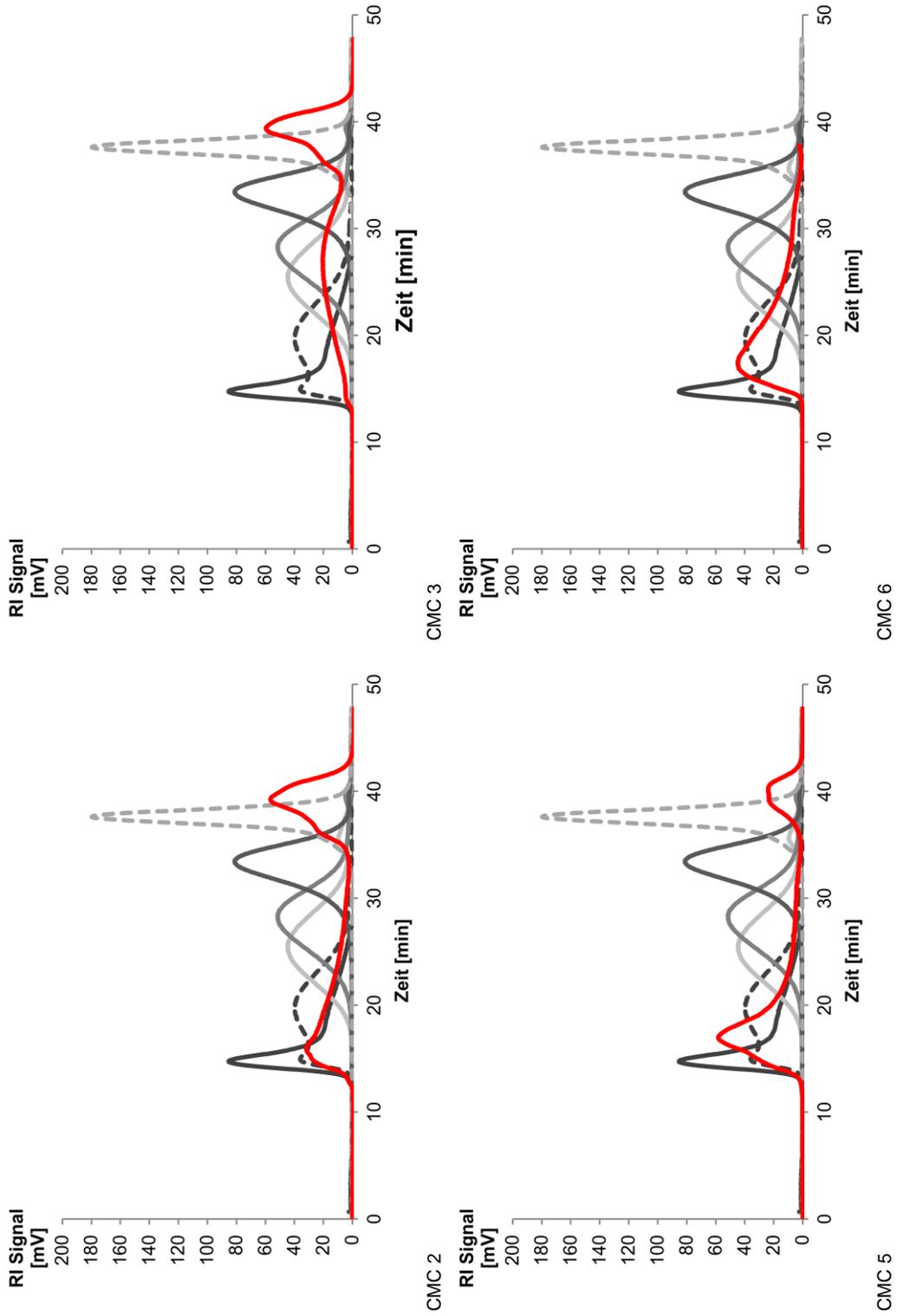


Abbildung F Chromatogramme SEC-UV (Superose 6 10/300 GL) der Zusatzstoffe (CMC 2,3,5,6-9)

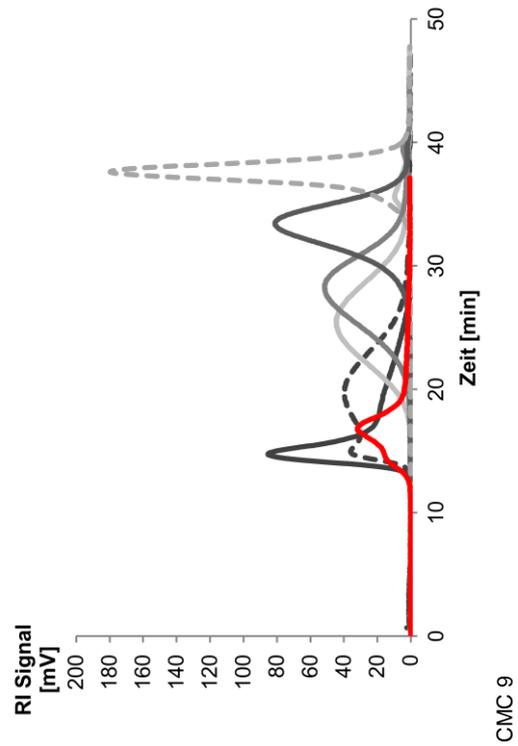
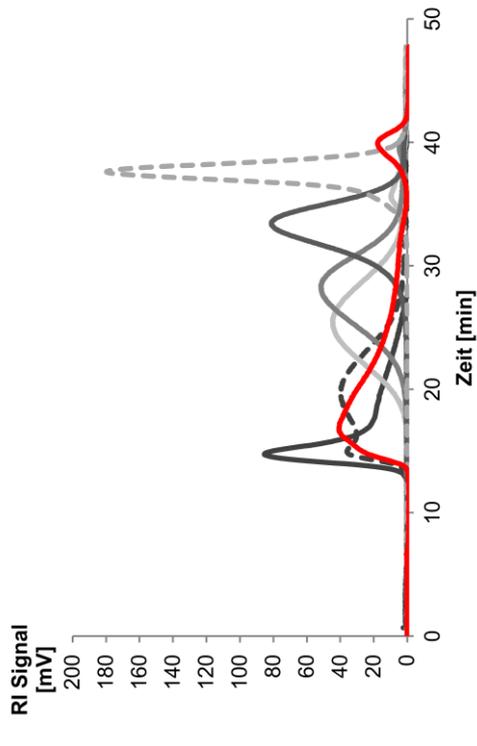
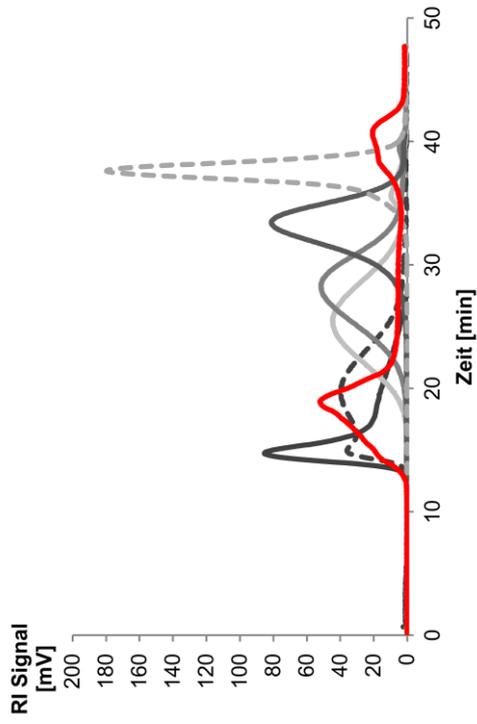
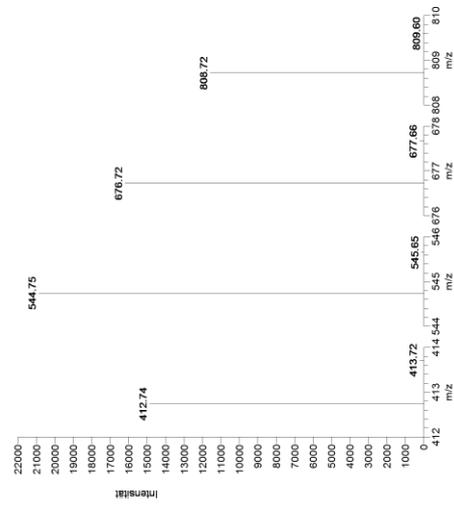
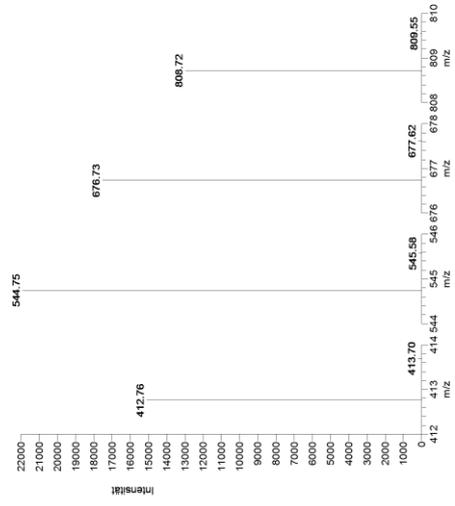


Abbildung F Chromatogramme SEC-UV (Superose 6 10/300 GL) der Zusatzstoffe (CMC 2,3,5,6–9)

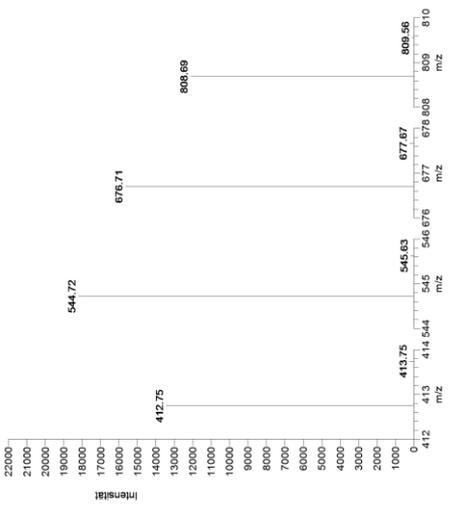
# Anhang



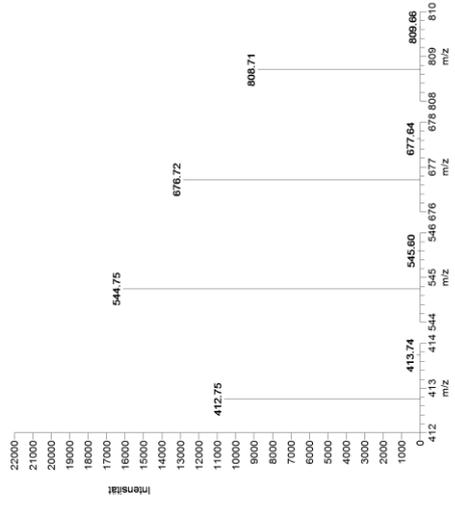
MWS B



MWS D

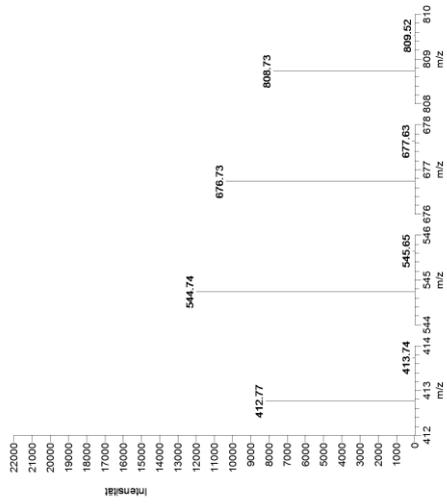


MWS A

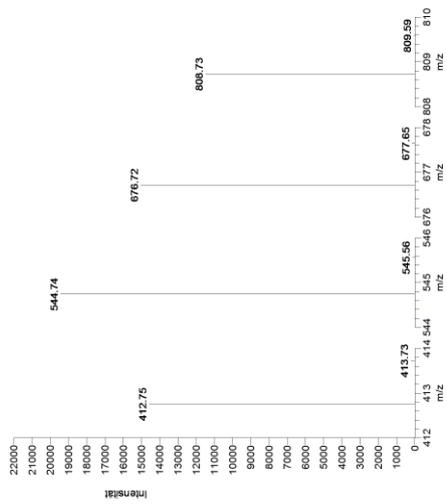


MWS C

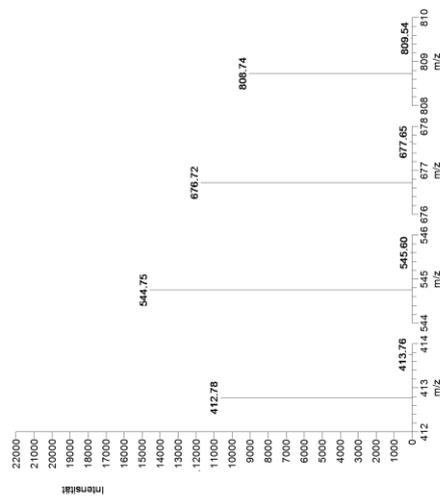
Abbildung G Massenspektren der Metaweinsäure-Zusatzstoffe (MWS A–G) (SIM-Modus)



MWS F



MWS E



MWS G

Abbildung G Massenspektren der Metaweinsäure-Zusatzstoffe (MWS A–G) (SIM-Modus)



## Fragebogen zur statistischen Datenerhebung

Die nachfolgenden Fragen dienen ausschließlich zu statistischen Zwecken im Rahmen meiner Bachelorthesis und werden absolut **anonym** verwendet. Bitte zutreffendes ankreuzen.

### **Einsatz von Carboxymethylcellulose (CMC), Metaweinsäure (MWS) und Gummi arabicum (GA) zur Weinstabilisierung.**

Haben Sie Kenntnis von der Verwendung folgender Stoffe zur Weinstabilisierung?

- CMC
- MWS
- GA

Haben Sie Erfahrung in der Verwendung der folgenden Stoffe zur Weinstabilisierung?

- CMC
- MWS
- GA

Verwenden Sie selbst in Ihrem Betrieb einen oder mehrere der folgenden Stoffe zur Weinstabilisierung?

- CMC
- MWS
- GA

Planen Sie in Zukunft die Verwendung eines oder mehrerer der folgenden Stoffe zur Weinstabilisierung?

- CMC
- MWS
- GA

Falls ja, würden Sie die Stoffe eher in fester oder flüssiger Handelsform einsetzen?

- fest
- flüssig

Würden Sie die Stoffe vorbeugend oder nur bei kristallinstabilen Weinen einsetzen?

- vorbeugend
- nur bei kristallinstabilen Weinen

**Vielen Dank für Ihre Bemühungen**



## Schwellenwertprüfung

### Teil III

Vielen Dank, dass Sie an dieser Verkostung teilnehmen.

Sie erhalten eine Probenreihe von jeweils neun Proben in vorgegebener Reihenfolge. In der Probenreihe steht die Null-Probe (0) an erster Stelle. Sie besteht ausschließlich aus reinem Wein ohne Zugabe des zu erkennenden Stoffes.

Prüfen Sie die Probenreihe durch Schmecken unter Verwendung der Notationssymbole.

#### **- Zurückkosten ist nicht zugelassen -**

Verwenden Sie folgende Notationssymbole:

- 0 = kein Geschmacksunterschied zur Nullprobe feststellbar
- X = Geschmacksunterschied feststellbar (Reizschwelle)
- XX = Geschmack beschreibbar

Reihenfolge der Proben	Nullprobe 0	1	2	3	4	5	6	7	8
Notations- symbol									

Abbildung I Auswertungsbogen Schwellenwertprüfung

## **Bereits veröffentlichte Teile der Arbeit**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Artikel:**

Sabrina Sprenger, Stefan Hirn, Helmut Dietrich, und Frank Will: Die Tränen der Akazie: Gummi arabicum – Analytischer Nachweis in Weißwein; Das deutsche Weinmagazin, (19); 2015; S. 28–30

Sabrina Sprenger, Stefan Hirn, Helmut Dietrich, and Frank Will; Metatartaric Acid: physico-chemical characterization and analytical detection in wines and grape juices; European Food Research and Technology; (241); Nr. 6; 2015; S. 785–791 (DOI: 10.1007/s00217-015-2503-1)

Sprenger, S.; Will, F.; Meylahn, K.; Zaar, A. und Dietrich, H.; Identification of gum arabic in white wine based on colloid content, colloid composition and multi-element stable isotope analysis; European Food Research and Technology; (240); 2014; S. 909–921 (DOI: 10.1007/s00217-014-2395-5)

### **Poster:**

Sprenger S., Meylahn, K.; Dietrich, H.; Will, F. Gummi arabicum – Isolation der Kolloidfraktion aus Weißwein und die Analytik der Stabilisotopenverhältnisse (C, N, H und O); 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2013 (Braunschweig)

Sprenger, S.; Dietrich, H.; Will, F. und Patz, C.D. Ausgewählte Aspekte der Charakterisierung von Natrium-Carboxymethylcellulose (CMC), Metaweinsäure (MWS) und Gummi arabicum (GA) als Zusatzstoffe für Wein; 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2012 (Münster)

Sprenger, S.; Dietrich, H.; Will, F. und Patz, C.D. Charakterisierung von kolloidal löslichen Zusatzstoffen für Wein sowie Entwicklung von Nachweisverfahren; 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2011 (Halle/Saale)

### **Vorträge:**

Sprenger, S., Meylahn, K.; Will, F., und Dietrich, H.; Der Zusatzstoff Gummi Arabicum (E 414) in Weißwein – Nachweis des Zusatzes anhand von Kolloidgehalt, Verteilung der Monosaccharide und der Stabilisotopenanalytik der Bioelemente (H und O bzw. N und C); 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2014 (Gießen)

Molekulargewichtsverteilung und Bestimmung des absoluten Molekulargewichtes von Kolloiden mittels Lichtstreuung (GPC-RI-MALS) Forschungsring Deutscher Weinbau (FDW Jahrestagung) 12. – 13. März 2013/ Veitshöchheim

Sprenger, S.; Dietrich, H.; Will, F. und Patz, C.D. Charakterisierung von kolloidal löslichen Zusatzstoffen für Wein sowie Entwicklung von Nachweisverfahren Forschungsring Deutscher Weinbau (FDW Jahrestagung) 27. – 28. März 2012/ Bernkastel Kues

Sprenger, S.; Will, F.; Patz, C.D. und Dietrich, H.; Weinstein - Bedeutung und Eigenschaften natürlicher und zugesetzter Hydrokolloide; Betriebsleitertagung 2012 (Geisenheim)

### **Master und Bachelor Thesen**

Hirn, S.; Charakterisierung und Nachweis von Metaweinsäureprodukten zur Weinsteinstabilisierung; Masterthese; JLU Gießen/ Hochschule Geisenheim University; 2013

Tarkel, P.; Einfluss kolloidaler löslicher Stoffe auf die Sensorik von verschiedenen Rot- und Weißweinen; Bachelorthese; Hochschule Geisenheim University; 2012

Hirn, S.; Isolierung und Charakterisierung von Metaweinsäure aus Wein; Bachelorthese; Hochschule Rhein Main University of Applied Sciences, Fachbereich Geisenheim; 2011