



Rheinland-Pfalz

DIENSTLEISTUNGSZENTRUM
LÄNDLICHER RAUM
RHEINPFALZ

KOMPETENZZENTRUM
WEINFORSCHUNG

Kompetenzzentrum Weinforschung

DLR Rheinland-Pfalz, Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße

Abschlussbericht

„Aromaverschleppung“

Förderkennzeichen 2816HS001

*Prof. Dr. Ulrich Fischer, Dr. Jochen Vestner,
Maximilian Mathes, Dr. Hans-Georg Schmarr*

Institut für Weinbau und Oenologie

Dienstleistungszentrum ländlicher Raum - Rheinland-Pfalz

Laufzeit 01.09.2016 – 28.02.2017



Projektträger Bundesanstalt
für Landwirtschaft und Ernährung



Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

1	Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	5
1.1	Planung und Ablauf des Vorhabens	5
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand	6
2	Material und Methoden.....	7
2.1	Weinauswahl.....	7
2.2	Aromenauswahl	8
2.3	Abfüll- und Migrationsversuche	9
2.4	Sensorische Analyse.....	10
2.5	Chemische Analyse.....	13
2.5.1	Aromenanalyse der Spülwässer	13
2.5.2	Aromenanalyse der Weine mittels Triple-Quad-GC/MS.....	14
3	Ergebnisse und Diskussion	19
3.1	Sensorik der Weine und Spülwässer	19
3.2	Aromanalytik der Spülwässer und Weine	20
3.2.1	Aromanalytik der Spülwässer und Weine mittels Twister®-GC/MS	20
3.2.2	Aromanalytik der Spülwässer und Weine mittels HS-SPME-GC/MS	21
3.3	Bestimmung von Schwellenwerten in verschiedenen Matrices	24
3.4	Verknüpfung analytischer und sensorischer Ergebnisse	29
4	Zusammenfassung und Fazit	34
4.1	Hinweise auf weiterführende Fragestellungen	36
5	Kurzfassung	37
6	Abstract.....	38
7	Literaturverzeichnis	39
8	Danksagung	40

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Verwendete Füllkette in der Groß-Winternheimer Sektkellerei am 22.11.2016 ..	9
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des zweidimensionalen GC Set-up mit Cryfokussierung zur Refokussierung der auf die zweite Säule übertragenen Aromastoffe (Schmarr et al. 2016)	16
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Temperaturprogramms (a), Druckprogramms im Dean-Switch zur Übertragung von der ersten auf die zweiten Säule (b) und FID-Chromatogramm der ersten Säue bis zum Übertrag auf die zweite Säule und gleichzeitiger Rückspülung der Säule (c) (Schmarr et al. 2016)	17
Abbildung 4:	Prozentualer Gehalt der zugesetzten Aromastoffe in den Spülwässern in Relation zu den Gehalten in dem aromatisierten Wein.....	20
Abbildung 5:	Prozentualer Gehalt der zugesetzten Aromastoffen in dem unbehandelten Ausgangswein und den mit und ohne Filtergruppe nach der Reinigung abgefüllten Wein	20
Abbildung 6	Schwellenwerte für Gamma- und Delta-Decalacton in den Matrices Wasser, Modellwein und Wein unter Angabe der Konfidenzintervalle	27
Abbildung 7	Schwellenwerte für Gamma-Undecalacton und 2-Methlethylbutanoat in den Matrices Wasser, Modellwein und Wein unter Angabe der Konfidenzintervalle.....	27
Abbildung 8	Schwellenwerte für Zimtaldehyd und Eugenol in den Matrices Wasser, Modellwein und Wein unter Angabe der Konfidenzintervalle	28
Abbildung 9	Schwellenwerte für Alpha-Ionon in den Matrices Wasser, Modellwein und Wein unter Angabe der Konfidenzintervalle	28

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung des 2015er Riesling Sektgrundweines	7
Tabelle 2: Zugesetzte Aromastoffe und flüchtige Substanzen.....	8
Tabelle 3: Geruchsschwellenwerte und zugesetzte Konzentrationen der Aromastoffe.....	8
Tabelle 4: Abfolge der Füll- und Reinigungsschritte in dem Experiment 22.11.2016	9
Tabelle 5: Reinigungsschritte in der Abfüllanlage Sektkellerei Groß-Winternheim	9
Tabelle 6: Reinigungsschritte in der Abfüllanlage bei der Sektkellerei Sartor	10
Tabelle 7: Einstellung für die Single-Ion-Monitoring (SIM) für das Massenspektrometer mit den fettgedruckten Quantifier-Massen.....	15
Tabelle 8: MS-MS Übergänge für die Selected-Reaction-Monitoring (SRM) für das Massenspektrometer mit den fettgedruckten Quantifier-Massen	15
Tabelle 9: Ergebnis der sensorischen Triangel-Tests am 24.11.2016	19
Tabelle 10: Leistungsparameter der angewandten HS-SPME-(e)MDGC-MSMS-(SIM-MS)-Methode zur Bestimmung der zugesetzten Aromastoffe	21
Tabelle 11: Konzentrationen der Aromastoffe in den verschiedenen Fraktionen (experimentell aromatisiertes weinhaltiges Getränk)	22
Tabelle 12: Konzentrationen der Aromastoffe in den verschiedenen Fraktionen (mit Mango aromatisiertes weinhaltiges Getränk)	23
Tabelle 13: Gruppenschwellenwerte in Wasser und deren gepooltes Mittel mit 95% Konfidenzintervalle für drei Verkostungswiederholungen. KI = Grenzen des 95% Konfidenzintervall, n = Anzahl Verkoster. Alle Werte in µg/L	24
Tabelle 14: Gruppenschwellenwerte in Modellwein und deren gepooltes Mittel mit 95% Konfidenzintervalle für drei Verkostungswiederholungen. KI = Grenzen des 95% Konfidenzintervall, n = Anzahl Verkoster.	25
Tabelle 15: Gruppenschwellenwerte in Wein und deren gepooltes Mittel mit 95% Konfidenzintervalle für drei Verkostungswiederholungen. KI = Grenzen des 95% Konfidenzintervall, n = Anzahl Verkoster.	26
Tabelle 16: Analytische Nachweisgrenze, gepoolte Schwellenwerte und Aromawerte der ausgewählten Aromastoffe	30
Tabelle 17: Analytische Nachweisgrenze, unteres Konfidenzintervall der Schwellenwerte und Aromawerte der ausgewählten Aromastoffe	30
Tabelle 18: Gemessene Aromakonzentrationen im Aromamigrationsexperiment bzw. analytische Nachweisgrenzen, gepoolte Schwellenwerte und Aromawerte der Aromastoffe.....	32
Tabelle 19: Gemessene Aromakonzentrationen bei der Abfüllung eines kommerziellen aromatisierten weinhaltigen Getränks bzw. analytische Nachweisgrenzen, gepoolte Schwellenwerte und Aromawerte der Aromastoffe.....	33

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Zielsetzung des Forschungsvorhabens ist die exemplarische Überprüfung in welchem Maße zugesetzte Aromastoffe aus einem aromatisierten weinhaltigen Getränks nach branchenüblicher Reinigung über die Teilprozesse einer Fülllinie in einen danach gefüllten Wein übergehen. Hierzu wird ein kommerzieller Weißwein mit fünf Aromastoffen versetzt, die als analytische Marker für Aromaverfälschungen herangezogen werden sowie drei weiteren Aromastoffen, die bei Glühwein ein Rolle spielen bzw. sehr geruchsaktiv sind.

Dieser aromatisierte Wein wird auf einer kleinen Anlage gefüllt. Nach einer branchenüblichen Reinigung, kommt der gleiche, aber natur-belassene Wein zur Abfüllung. Nach 500 Liter werden Schläuche, Filter und Pumpen ausgetauscht, so dass nur noch aus dem Füller Aromastoffe migrieren können. Erneut werden 500 Liter des Ausgangswein gefüllt.

Es werden Flaschen zu Beginn, Mitte und Ende der jeweiligen Füllung entnommen und der Analyse auf Reste der zugesetzten acht Aromastoffe mittels verschiedener Headspace-Multidimensionalen-GC-MS-Methoden zugeführt. Hierbei kommt die Stabil-Isotopen-Verdünnungs-Analyse zu Anwendung, die eine sehr exakte Quantifizierung erlaubt, da sich die stabilen Isotopen während der Aufarbeitung exakt wie die Zielkomponenten verhalten; im Massenspektrometer jedoch aufgrund ihrer höheren Massen differenzieren lassen.

In einem zweiten Teil der Arbeit werden sieben Aromastoffe, die in der Weinüberwachung zur Identifizierung unerlaubter Aromatisierung von Wein herangezogen werden, in ihrer sensorischen Relevanz charakterisiert. Dies erfolgt durch die Bestimmung ihrer sensorischen Schwellenwerte in den drei Matrices Wasser, Modellwein und Ausgangswein mittels eines trainierten Panels und unter Anwendung eines Triangel-Tests und ihrer Auswertung mit der Best-Estimate-Threshold-(BET)-Methode.

Diese Vorgehensweise ermöglicht eine an der Humansensorik orientierte Beurteilung der tatsächlich stattfindenden Aromamigration. Insbesondere steht die Frage im Vordergrund, ab welchen Konzentrationen gemäß dem Aromawertkonzept eine sensorische Veränderung oder gar Verbesserung eines Weines eintritt.

Durch Kombination beider Projektziele kann ein wichtiger Beitrag zur Beantwortung der durch das BMEL aufgestellten zentralen Frage geleistet werden, in welchem Maße zugesetzte Aromastoffe aus einem aromatisierten weinhaltigen Getränk nach branchenüblicher Reinigung über die Teilprozesse einer Fülllinie in den danach gefüllten Wein übergehen können.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Der als Ausgangswein bezogene Sektgrundwein (Riesling, Sektkellerei Henkell, Wiesbaden) wurde in der Sektkellerei Groß-Winternheim GmbH vor Ort mit dem in Ethanol gelösten Aromen versetzt. Die Abfüllung auf der gereinigten Anlage fand am 22. November 2016 statt und am Anfang und am Ende der Abfüllung von 2.000 L aromatisierten Wein wurden Proben genommen.

Bei der Reinigung der Anlage gemäß der Herstellerangaben wurde zu Beginn und Ende Proben des zur Spülung verwendeten Heißwassers genommen. Bei der nachfolgenden Füllung des nicht aromatisierten Ausgangsweines wurden die ersten 500 L unter Nutzung der gesamten Füllkette abgefüllt. Danach wurde die Filtereinheit eliminiert und nur über Rinser und Füller

gefüllt. Zu Beginn und nach der Füllung der Teilmenge von jeweils 500 Liter wurden Proben genommen, um den Beitrag der Filtereinheit zur möglichen Aromamigration getrennt betrachten zu können.

Die Weine und Spülwässer wurden am 24.11.2016 einer sensorischen Prüfung unterzogen. Die Schwellenwerte in den drei Matrices Wasser, Modellwein und Grundwein wurden von Oktober 2016 bis Februar 2017 durchgeführt. Die Analyse der Aromastoffe erstreckte sich vom Oktober bis April 2017.

Bei einer Abfüllung eines marktüblichen aromatisierten weinhaltigen Getränks mit Mango-Aroma durch die Sektkellerei Hans Sartor GmbH & Co KG in Polch im Auftrag der Rotkäppchen Sektkellerei GmbH wurde nach einer gründlichen Reinigung ein nicht aromatisierter Perlwein gefüllt. Proben wurden aus dem Fülltank vor dem Passieren der Karbonisierungsanlage und Abfülllinie gezogen sowie nach der Füllung von 1.000, 10.000 und 100.000 Flaschen. Diese Proben wurden einer Aromaanalyse zugeführt.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Aromatisierte weinhaltige Getränke und Cocktails wie Glühwein oder „Hugo“ werden in der Weinwirtschaft auf den gleichen Fülllinien gefüllt, die auch für die Abfüllung von Weinen, Perlweinen oder Schaumweinen verwendet werden, bei deren Herstellung eine Aromatisierung strikt verboten ist. Nicht zuletzt aufgrund immer niedrigerer analytischer Nachweisgrenzen gelang erstmals in aromatisierten und nichtaromatisierten Mineralwässern der Nachweis der Migration von Aromen aus dem einen in das folgende Füllgut. Sowohl Dichtungen, Filtermedien, Schläuche, als auch die für die CIP (Clean-in-Place) Reinigung verwendeten Lösungen nahmen die hydrophoben Aromastoffe auf und gaben sie langsam an das nachfolgende Füllgut ab.

Im Rahmen eines am 29. Februar 2016 abgeschlossenen Forschungsprojekts entwickelte das Institut für Weinbau & Oenologie empfindliche enantioselektive Analysenmethoden für den Nachweis der o.a. angegebenen Markersubstanzen. Ferner wurde im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit in Kooperation mit der Technischen Universität Kaiserslautern für die z.T. ebenfalls chiral vorliegenden Gruppe der Methoxy-pyrazine Nachweismethoden im Spurenbereich mit Nachweisgrenzen im unteren ng/L Bereich erarbeitet. Gleichzeitig ist das Institut am DLR Rheinpfalz sowohl in Deutschland als auch weltweit anerkannt für die hohe Expertise in der Weinsensorik, die auch die Ermittlung von sensorischen Schwellenwerten umfasst.

In der Vergangenheit wurde jeder Nachweis eines nicht im Wein beschriebenen oder in unüblich hohen Konzentrationen vorkommenden Aromastoffes als verbotene Aromatisierung bewertet, was strafrechtlichen Konsequenzen nach sich ziehen konnte. Als Markersubstanzen werden das γ -Decalacton und γ -Undecalacton genutzt, welche in Lebensmitteln allgemein zur Erzielung eines ortho- und retronasal wahrgenommenen Pfirsicharomas eingesetzt werden, aber in Wein nur in Spuren vorkommen können. Geeignete Markersubstanzen berücksichtigen zudem die Chiralität der Moleküle. In der Natur gibt es aufgrund unterschiedlicher Enzymaktivitäten in der Regel eine Bevorzugung eines Enantiomers, während konventionell synthetisch hergestellte Aromastoffe in der Regel ein Racemat liefern, in dem die (R)- und (S)-Enantiomere in gleichen Mengen vorkommen. Interessante Aromastoffe dieser Gruppe der chiralen Aromastoffe im Wein sind neben den schon erwähnten Lactonen das α -Ionon, der 2-Methylbuttersäureethylester sowie das aus dem Holz stammende Eichenlacton. Eine andere Gruppe der zum Nachweis von unerlaubten Zusätzen geeigneten Aromastoffe sind Lösungsmittel bzw.

Lösungsmittelvermittler. Obwohl selbst kein Aromastoff, ist hier das 1,2-Propandiol von Interesse, da es im Wein mit einer typischen Enantiomerenverteilung in relativ geringer Konzentration vorkommt. Gelangt es jedoch als Trägerstoff (Lösungsvermittler) von unerlaubt zugesetzten Aromastoffen in den Wein, liegt es als Racemat vor.

Bei der chiralen Analytik wird eine leistungsfähige und automatisierte Headspace-Probenahme mit einer zweidimensionalen Gaschromatographie kombiniert, bei der die zweite Dimension einen chiralen Aromastoff mit einer enantioselektiven Phase in seine beiden Enantiomere auftrennt. Anhand des Vergleichs beider Signale kann ihr Enantiomerenverhältnis bestimmt werden. Ein modernes Triple-Quadrupol-Massenspektrometer kommt zur Detektion der Aromastoffe zum Einsatz. Die Quantifizierung beruht auf deuterierten Isotopen der Zielsubstanzen im Rahmen eines sogenannten Stabilisotopenverdünnungsassays (SIVA). Diese Standards wurden in der Regel im Institut für Weinbau und Oenologie selbst synthetisiert oder kommerziell erworben.

2 Material und Methoden

2.1 Weinauswahl

Als Ausgangswein diente ein 2015er Sektgrundwein der Rebsorte Riesling von der Sektkellerei Henkell-Söhnlein in Wiesbaden (chemische Analytik in Tabelle 1), bestehend aus Grundweinen aus verschiedenen Anbaugebieten in Rheinland-Pfalz. Aufgrund seines moderaten Alkoholgehaltes ist er vergleichbar mit den Alkoholgehalten der für aromatisierte weinhaltige Getränke eingesetzten Grundweine. Seine niedrige freie schwefelige Säure erleichterte ferner die Bestimmung der sensorischen Schwellenwerte.

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung des 2015er Riesling Sektgrundweines

Chemischer Parameter	
Vorhandener Alkohol	11,7 % vol.
Restzucker	1,3 g/L
titrierbare Säure	8,0 g/L
pH-Wert	3,08
Freie schwefelige Säure (SO ₂)	14 mg/L
Gesamte schwefelige Säure (SO ₂)	35 mg/L

In einem zweiten Versuch wurden sechs Proben aus einer Abfüllung eines marktüblichen aromatisierten weinhaltigen Getränks mit Mango-Aroma untersucht. Diese erfolgte bei der Sektkellerei Hans Sartor GmbH & Co KG in Polch im Auftrag der Rotkäppchen Sektkellerei GmbH. Nach der Füllung eines großen Volumens des aromatisierten Mango-Getränks auf Weinbasis erfolgte eine branchenübliche gründliche Reinigung. Von dem anschließend gefüllten nicht aromatisierten Perlwein wurden Proben aus dem Fülltank vor Karbonisierung/Abfüllung und nach erfolgter Füllung gezogen. Die 1.000, 10.000 und 100.000 Flaschen wurden auf ihren Gehalt an migrierten Aromastoffen analysiert. Wie die Aromaanalyse in Tabelle 19 zeigte, bestand die Aromatisierung vornehmlich aus einer sehr hohen Konzentration an γ -Decalacton (2.438,5 $\mu\text{g/L}$) und δ -Decalacton (160,1 $\mu\text{g/L}$).

2.2 Aromenauswahl

Die Aromatisierung des Riesling-Grundweins erfolgte mittels der in Tabelle 2 aufgeführten Aromastoffe. Dabei handelt es sich um die in der Weinüberwachung bereits verwendeten chiralen Lactone, sowie das von Langen et al. (2016) vorgeschlagene chirale α -Ionon sowie den ebenfalls chiralen 2-Methylbuttersäureethylester. Ferner kamen zwei für die Aromatisierung von Glühwein verwendeten nicht chiralen Aromastoffe zur Anwendung und das im Wein in kleinsten Konzentrationen natürlich vorkommende, aber sehr geruchsaktive 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin (IBMP) zur Anwendung. Alle Aromastoffe wurden von der Firma Symrise AG in Holzminden bezogen.

Tabelle 2: Zugesezte Aromastoffe und flüchtige Substanzen

Aromastoffe	Geruchseindruck	Chiralität
γ -Decalacton	pfirsichartig, fruchtig, floral	chiral
δ -Decalacton	pfirsichartig, fruchtig, floral	chiral
γ -Undecalacton	pfirsichartig, fruchtig, floral	chiral
α -Ionon	Himbeerartig, veilchenartig	chiral
2-Methylbuttersäureethylester	apfelartig, fruchtig,	chiral
Isobutyl-Methoxypyrazin (IBMP)	grüner Paprika	achiral
3-Phenyl-2-propenal (Zimtaldehyd)	Zimt, Glühwein	achiral
4-Prop-2-enyl-2-methoxyphenol (Eugenol)	Gewürznelke, Glühwein	achiral

Bei der Wahl der Konzentrationen orientierten sich die Versuchsansteller etwa vierfachen Wert der publizierten Schwellenwerte. Im Falle des IBMP orientierte man sich ferner an den oberen Gehalten, die in Sauvignon Blanc Weinen vorliegen. Die Zugabe der in 100 mL 96%igem nicht vergällten Ethanol (Berkel, Ludwigshafen) gelösten Aromastoffe erfolgte direkt vor der Füllung der Weine in der Sektkellerei Groß-Winternheim.

Tabelle 3: Geruchsschwellenwerte und zugesezte Konzentrationen der Aromastoffe

γ -Decalacton	11 $\mu\text{g/L}$ (3, 9, 12)	44,8 $\mu\text{g/L}$
δ -Decalacton	15-100 $\mu\text{g/L}$ (3, 6, 9, 12, 13, 15)	84,0 $\mu\text{g/L}$
γ -Undecalacton	30 (S) & 100 (R) $\mu\text{g/L}$ (16)	40,6 $\mu\text{g/L}$
α -Ionon	5,1 – 13,7 $\mu\text{g/L}$ (7)	40,8 $\mu\text{g/L}$
2-Methylbuttersäureethylester	0.1-0.3 $\mu\text{g/L}$, Wasser, 23,4 $\mu\text{g/L}$ Wein (2, 5, 4, 14, 15)	90,0 $\mu\text{g/L}$
Isobutyl-Methoxypyrazin (IBMP)	1-2 (WW), 15 ng/L RW (8b)	16,2 ng/L
3-Phenyl-2-propenal (Zimtaldehyd)	50-750 $\mu\text{g/L}$ (1, 14)	198,6 $\mu\text{g/L}$
4-Prop-2-enyl-2-methoxyphenol (Eugenol)	6-30 $\mu\text{g/L}$ (2, 10)	204,8 $\mu\text{g/L}$

2.3 Abfüll- und Migrationsversuche

Die Abfüllung erfolgte in dem auf Sekt- und Perlweinbereitung sowie Lohnabfüllung spezialisierten Sektkellerei Groß-Winternheim GmbH. Die Füllkette bestand aus einem Fülltank mit dem aromatisierten und später unversetzten Wein, einem Schichtenfilter mit einer EK80-Schicht (Eaton, Langenlonsheim), einem Membran-Vorfilter mit 0,65 µm, einem Sterilfilter mit 0,2 µm (beide Eaton, Langenlonsheim), dem mit sterilen Wasser betriebenen Flaschenrinsler, dem isobaren Füller mit elektropneumatisch gesteuerten Füllventil-Funktionen (KOSME, Mantova, Italien) mit 24 Füllstellen und einem Anrollverschluss. Die Füllleistung pro Stunde betrug 2000 Flaschen mit einem Volumen von 0,75 L.

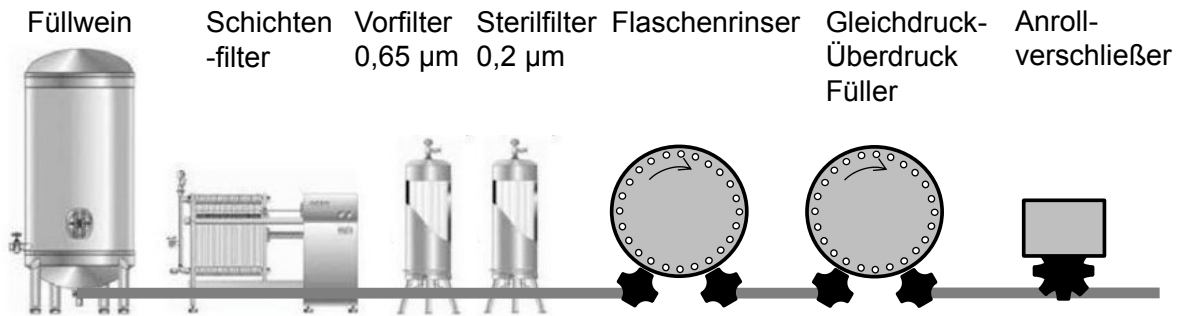


Abbildung 1: Verwendete Füllkette in der Sektkellerei Groß-Winternheim am 22.11.2016

Tabelle 4: Abfolge der Füll- und Reinigungsschritte in dem Experiment 22.11.2016

	Filter	Rinsler und Füller
Dämpfen	X	X
Aromatisierter Wein	2000 L	2000 L
Spülung mit Heißwasser	X	X
CIP Reinigung	X	X
Spülung mit Heißwasser	X	X
Unbehandelter Wein	500 L	500 L
Unbehandelter Wein	-	500 L

Die Reinigung erfolgte gemäß der Angaben in Tabelle 5 unter Befolgung der Angaben des Herstellers der Füllanlage zur CIP-Reinigung.

Tabelle 5: Reinigungsschritte in der Abfüllanlage Sektkellerei Groß-Winternheim

Schichten-, Vor- und Steril-Filter	Dauer	Rinsler und Füller	Dauer
1. Heißwasserspülung bei 85°C	15 min	1. Heißwasserspülung bei 85°C	20 min
0,5%ig NaOH Lauge	20 min	3%ig NaOH Lauge 50°C,	60 min
0,5%ig H ₂ O ₂	10 min	Kaltwasser-Spülung	10 min
Entleeren		1% Salpetersäure-Spülung	45 min
Heißwasser-Spülung bei 85°C	15 min		
Kaltwasser-Spülung	10 min	Kaltwasserspülung	10 min
0,5% Zitronensäure-Spülung	10 min	Dämpfen	20 min
Dämpfen	20 min		
2. Heißwasser-Spülung bei 85°C	20 min	2. Heißwasser-Spülung bei 85°C	20 min

Die Füllung eines marktüblichen aromatisierten weinhaltigen Getränks mit Mango-Aroma durch die Sektkellerei Hans Sartor GmbH & Co KG in Polch erfolgte auf einem Elektro-Pneumatischen Druckfüller mit 72 Füllstellen und einer Füllleistung von 11.000 0,75 L Flaschen pro Stunde. Von dem mit Mango-Aroma aromatisierten weinhaltigen Getränk wurde über mehrere Tage rund 200.000 Flaschen gefüllt, so dass von einer Sättigung der Dichtungen ausgegangen werden konnte. Als Verbindung zwischen Fülltank, Filter und Füller dienten ausschließlich Edelstahlleitungen und in den Reinigungsprozesse integriert waren.

Das Reinigungsschema nach Abschluss der Füllung aromatisierter weinhaltiger Getränke ist Tabelle 6 zu entnehmen. Im Gegensatz zum Reinigungsschema der Sektkellerei Groß-Winternheim kam keine Salpetersäure zum Einsatz.

Tabelle 6: Reinigungsschritte in der Abfüllanlage bei der Sektkellerei Sartor

Membranfilter, 0,45 µm	Dauer	Füller	Dauer
1. Heißwasserspülung bei 90°C	15 min	1. Heißwasserspülung bei 90°C	15 min
Kaltwasser-Spülung		Kaltwasser-Spülung	60 min
Ausbau Filterkerzen aromatisiertes Füllgut		Einbau CIP-Tulpen für Ventile	
Kaltwasser-Spülung (im folgenden nur Leitung, leeres Filtergehäuse)	5 min	Kaltwasser-Spülung	5 min
3% NaOH-Lauge 92°C mit 1% H ₂ O ₂ (15.000 L/h)	20 min	3% NaOH-Lauge 92°C mit 1% H ₂ O ₂ (15.000 L/h)	20 min
Kaltwasserspülung	15 min	Kaltwasserspülung	15 min
		Ausbau CIP-Tulpen	20 min
Nachspülen Heißwasser bei 85°C	5 min	Nachspülen Heißwasser bei 85°C	5 min
Kaltwasserspülung bis abgekühlt		Kaltwasserspülung bis abgekühlt	
Einbau Filterkerzen nicht-aromatisiertes Füllgut			
Spülung Heißwasser bei 90°C	10 min		

2.4 Sensorische Analyse

Bei der sensorischen Überprüfung der Unterscheidbarkeit des Wassers der direkt nach der Abfüllung des aromatisierten Weines erhaltenen 1. Heißwasserspülung (siehe Tabelle 5) mit Wasser aus dem Leitungsnetz der Sektkellerei Groß-Winternheim verglichen, das nicht in Kontakt mit der Fülllinie war. Hierzu kam ein Triangel-Test zu Anwendung, in dem die abweichende Probe erkannt werden musste. Hierbei wurde sowohl das Spülwasser (B) als auch das Leitungswasser (A) ein- oder zweimal in den drei präsentierten Proben eingesetzt, so dass sich sechs Kombinationen (AAB, ABA, BAA, ABB, BBA, BAB) ergaben. Diese wurden voll randomisiert den 26 Prüfern in zweifacher Wiederholung präsentiert. Gleichmaßen wurde das Wasser aus der zweiten Heißwasserspülung (siehe Tabelle 5) nach erfolgter CIP Reinigung mit dem Leitungswasser verglichen. Ebenso erfolgte der Vergleich zwischen dem unbehandelten Originalwein und dem nach der CIP-Reinigung die gesamte Füllkette durchlaufenen Wein. Die sensorische Prüfung fand am 24. November 2016 im Sensoriklabor des Instituts für

Weinbau und Oenologie am DLR Rheinpfalz statt. Es wurden jeweils 20 mL Probe in transparenten INAO-Gläsern (Institut national de l'origine et de la qualité) bei Raumtemperatur von 20°C präsentiert.

Die Bestimmung der Wahrnehmungsschwellen für die Verbindungen γ -Decalacton, δ -Decalacton, γ -Undecalacton, α -Ionon, Ethyl-2-methylbutanoat, Zimtaldehyd und Eugenol erfolgte in Wasser (vollentsalzt), Modellweinlösung und Weißwein. Diese Vorgehensweise berücksichtigt den Einfluss verschiedener Matrices auf die jeweiligen Wahrnehmungsschwellen. Der Modellwein bestand aus Wasser mit 12 % (v/v) Ethanol und 6 g/L Weinsäure, der durch Titration mit 5 N Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) auf pH 3.2 eingestellt wurde. Beim Weißwein handelte es sich um den gleichen 2015 Riesling Sektgrundwein, der bereits zur Herstellung des aromatisierten Weines Verwendung fand (siehe Tabelle 1). Alle sensorischen Tests fanden in einem Temperatur-kontrollierten Raum bei 20°C in individuellen Verkostungskabinen statt. Die Prüfer erhielten jeweils 20 mL der zu verkostenden Probe, die in transparenten INAO-Gläsern (Institut national de l'origine et de la qualité) präsentiert wurden.

Die Wahrnehmungsschwellen für jeden Aromastoff wurden gemäß den Normen ASTM E 1432-04 und ISO 13301:2002 ermittelt, wobei anstelle des „three-alternative forced-choice“ (3-AFC) Test ein Triangel-Test Anwendung fand. Ein 3-AFC-Test ist die Methode der Wahl, wenn die Wahrnehmungsschwelle eines Fehlaramas bestimmt werden soll. Dabei enthält immer nur eine der drei gereichten Proben die abweichende Probe, die mit dem Fehl aroma versetzt wurde. Das Fehl aroma vermittelt sich dem Verkoster nur negativ und es ist eine Ja-Nein-Entscheidung, ob die Person das Fehl aroma wahrnehmen kann oder nicht.

Die eingesetzten positiven Aromastoffe unterliegen einer komplexen Wechselwirkung mit einer Reihe nativer Aromastoffe und anderer Weininhaltsstoffe. Daher kam der Triangel-Test zur Anwendung, bei dem die zu erkennende abweichende Probe entweder der mit dem Aromastoff dotierte Wein (B), oder aber der Originalwein (A) ist. Die Prüfer werden mit sechs möglichen Kombinationen in randomisierter Reihenfolge konfrontiert: AAB, ABA, BAA, ABB, BBA, BAB. Der höhere Schwierigkeitsgrad gegenüber dem 3-AFC-Test liegt darin, dass die Prüfer nie wissen, ob der Aromastoff in einem oder zwei Gläsern des Triangel-Tests präsentiert wird. Dies führt zwangsläufig zu höheren Schwellenwerten als im 3-AFC-Test.

Zur sensorischen Bestimmung der Wahrnehmungsschwellen wurden für jeden Aromastoff und jede Matrix (Wasser, Modellwein und Wein) je fünf Proben mit aufsteigender Konzentration hergestellt, in dem eine Verdünnung des zu bestimmenden Aromastoffes am Vortag der Verkostung in die jeweilige Matrix pipettiert wurde. Die fünf Proben wurden in aufsteigender Reihenfolge ihrer Konzentrationen in je einem Dreieckstest gegen die nicht dotierte Matrix (Wasser, Wein oder Modellwein) von jedem Prüfer verkostet. Die Verkoster wurden angewiesen, die abweichende Probe zu benennen. Der zugrunde liegende Dreieckstest sieht vor, dass ein Prüfer in jedem Falle eine Probe als abweichend benennt, auch wenn kein Unterschied feststellbar war. Die Verkostungen fanden zweimal wöchentlich statt. Jeder Verkostungstermin sah die Durchführung von dreimal fünf Dreieckstest vor, so dass pro Termin 45 Proben geruchlich beurteilt wurden. Die Schwellenwertbestimmung wurde für jeden Aromastoff und Matrix dreimal wiederholt. Das Prüfpanel bestand aus geschulten externen Verkostern und Angestellten verschiedener Institute des DLR Rheinpfalz.

Die Datenauswertung erfolgte nach Lawless und Heymann (2010) und ist detailliert im Folgenden beschrieben. Zuerst wird ein Individualschwellenwert („best-estimate-threshold“) für jeden

Prüfer bestimmt. Dieser Individualschwellenwert ist definiert als das geometrische Mittel zwischen zwei Werten, der mittels der Quadratwurzel der Produkte aus beiden Werten berechnet wird. Der erste Wert ist die Konzentration, bei welcher der Prüfer den ersten Dreieckstest und mindestens einen nachfolgenden, höher konzentrierten, Test richtig bewertet hat. Der zweite Wert ist die Konzentration direkt unter dem ersten Wert, also die letzte Konzentration in der Reihenfolge der aufsteigenden Konzentrationen, die noch zu einer falschen Bewertung führte. Wenn ein Prüfer alle oder keine der Konzentrationen richtig bewerten konnte, wird der nächst höhere oder nächst niedrigere Wert außerhalb der verkosteten Serien als korrekt erkannt herangezogen. Auch wenn dieses Vorgehen etwas arbiträr ist, so ist es nicht unangemessen. Nun wird der Gruppenschwellenwert aus dem geometrischen Mittel aller Individualschwellenwerte berechnet. Hierfür werden die Individualschwellenwerte logarithmiert, der Mittelwert der logarithmierten Individualschwellenwerte bestimmt, und dieser folglich wieder de-logarithmiert. Der Gruppenschwellenwert ist somit das Äquivalent zur der n-ten Wurzel der Produkte aller N Individualschwellenwerte.

Abschließend wurden für jeden Aromastoff in jeder Matrix (Wasser, Modellwein und Wein) für die logarithmierten Gruppenschwellenwerte der drei Wiederholungen die Mittelwerte und gemittelten Standardabweichungen und Konfidenzintervalle berechnet.

Der Mittelwert (x_{pooled}) berechnet sich aus den logarithmierten Gruppenschwellenwerte (Mittelwerten) x für k Wiederholungen und deren Stichprobenumfängen n :

$$x_{pooled} = \frac{n_1 * x_1 + n_2 * x_2 + \dots + n_k * x_k}{n_1 + n_2 + \dots + n_k}$$

Die gemittelte Standardabweichung (s_{pooled}) wird wie folgt aus den einzelnen Standardabweichungen s für k Wiederholungen berechnet:

$$s_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \dots + (n_k - 1)s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k}}$$

Die Konfidenzintervalle KI werde aus dem T-Wert ($\alpha = 5\%$, zweiseitig); t für $(n_1 + n_2 + \dots + n_k) - k$ Freiheitsgrade und der gemittelten Standardabweichung (s_{pooled}) wie folgt berechnet:

$$KI_{95\%} = t * \sqrt{\frac{s_{pooled}}{n_1} + \frac{s_{pooled}}{n_2} + \dots + \frac{s_{pooled}}{n_k}}$$

Das obere bzw. untere Konfidenzintervall erhält man durch Addition bzw. Subtraktion des $KI_{95\%}$ Wertes vom Mittelwert x_{pooled} . Der Mittelwert x_{pooled} als auch das obere und untere Konfidenzintervall werden zuletzt noch de-logarithmiert.

2.5 Chemische Analyse

Die weinchemischen Werte des Grundweines wurden in dem nach ISO 17025 zertifizierten Wein- und Analyselabor des DLR Rheinpfalz analysiert.

2.5.1 Aromenanalyse der Spülwässer

In den Spülwässern erfolgte die Bestimmung der Aromastoffe mittels Stir Bar Sorptive Extraktion (SBSE) und anschließender Gaschromatographische mittels GC-MS.

Material:

100 mL Erlenmeyerkolben mit Schliff und Glasstopfen
Magnetrührer für Twister® [Fa. Gerstel]
20 mL Pipette
Twister® Phasenmaterial Polydimethylsiloxan [Fa. Gerstel]
Länge 1 cm, Schichtdicke 0,5 µm (55 µL Phasenvolumen)

Gaschromatograph mit Probenaufgabe und Massenspektrometer:

TDU (Thermo- Desorptions-Unit) mit Glaslinern für TDU und Gummikappe
KAS4 (Kaltaufgabesystem mit Stickstoffkühlung)

GC-MS (6890 N Network GC Systems Fa. Agilent Technologies, Mass Selective Detektor, 5975C) Fa. [Agilent Technologies]

Säule [Fa. Phenomenex Zebron ZB-WAX (30,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm)]

Autosampler MPS 2 Multi-Purpose-Sampler [Fa. Gerstel]

Pneumatik GC 6890N und Pneumatik TDU/CIS4

Magnetische Pinzette

EtOH, p.A. [Fa. Roth]

Trägergas Helium, 5.0

Flüssiger Stickstoff

dest. Wasser

Magnetstab

Vorgehensweise

20 mL Probe werden in einen 100 mL Erlenmeyerkolben mit Schliff pipettiert, anschließend wird ein thermisch regenerierter Twister® zugefügt. Das Glasgefäß wird mit einem Glasstopfen verschlossen und bei Raumtemperatur und 1000 rpm 60 min gerührt. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen Aromastoffe in der Probe und dem Twister® ist abhängig von Temperatur, Rührgeschwindigkeit, Rührzeit, Volumen und Matrix der Probe. Nach 60 min wird der Erlenmeyerkolben geöffnet und der Twister® mit einem Magnetstab entnommen und Matrixbestandteile durch Spülen mit H₂O vom Twister® entfernt. Die getrockneten Twister® werden mit Hilfe einer Pinzette in die Glas-Liner des Autosamplers überführt. Die Desorption der Aromastoffe erfolgt in einem Thermo-Desorptionssystem (TDU, Fa. Gerstel) bei 100°C mit anschließender Kryofokussierung an einem Kaltaufgabesystem (CAS, Fa. Gerstel) bei -120 °C. Die gaschromatographische Trennung (GC 6890 N, Fa. Agilent) mit massenselektiver Detektion (MSD 5975 C, Fa. Agilent) findet unter folgenden Bedingungen statt:

Bedingungen Chromatographie-Twister®: (Programm: Aroma_ZBWax_20160921)

Mode: Const. Flow; 1,2 mL/min

Split: Vent Flow: 50 mL/min

Purge Flow: 30 mL/min at 2.01 min

Gas saver: 20 mL/min at 20 min

Trärgas: Helium

Inlet: Front

Temperaturprogramm: 40 °C / 2 min // 5 °C/ min / 60 °C// 5 min // 10 °C/ min / 165 °C// 0 min // 20 °C/ min / 240 °C //5 min

Detektor:

MS Source: 230 °C

MS Quad: 150 °C

Messmodus: Scan 29 – 400 amu, 3,84 scan/sec

Kaltaufgabesystem:

Equilibrium Time: 0,2 min

Initial Time: 0,01 min

Temperaturprogramm: -120 °C / 12,0 °C / s // 280 °C / 3 min

Thermodesorptionssystem:

Transferline: 280 °C

Temperaturprogramm: 20 °C / 1 min // 720 °C / min // 250 °C / 10 min

2.5.2 Aromenanalyse der Weine mittels Triple-Quad-GC/MS

Autosampler: TriPlus RSH

- SPME: Supelco (gray) fiber assembly Divinylbenzene/ Carboxen/ Polydimethylsiloxane 50/30µm(DVB/CAR/PDMS) 24ga,
- Inkubationszeit: 2 min
- Inkubations-/Extraktionstemperatur: 40°C
- Agitator On/Off: 5s/2s
- Extraktionszeit: 30 min
- Sampling Vial Depth: 20 mm
- Desorptionszeit im Injektor: 2 min
- Konditionierung der Faser vor und nach jeder Messung: 10 min bei 270°C (mit Stickstoff-Umspülung)

GC: Trace GC Ultra Thermo Fisher [heart-cut (H/C) multidimensional gas chromatography (MDGC)-MS-MS]

- Temperaturprogram: 50°C / 2min // 15°C/min // 140°C / 0.5 min // 5°C/min // 190°C / 8.7 min // 30°C/min // 120°C/ 2 min // 4°C/min // 150°C / 1min // 25°C/min // 190°C / 5 min
- PTV Injektor: 250°C; konstante Temperatur, Splitless Modus
- Splitless Zeit: 2 min (20 mL/min)

Eingangsdruck (PTV): first dimension (1D) Säule mit Rückflutung durch das Deans' switch Gerät mit dem Fluss-Modus: Programmierter Druckverlauf: (siehe Abbildung 3)

- 197 kPa // 30,30 min // 100 kPa/min // 15 kPa He // 16 min
- Mitteldruck: 121 kPa He konstanter Druck über das sekundäre SSL (Deans switch)

- Trennsäule 1D: StabilWaxMS (Restek, Bad Homburg, Germany) 30 m × 0,25 mm, Schichtdicke 0,25 µm (max. Temp. 250°C)
- Trennsäule 2. Dimension (2D): LipodexG → Fused Silica Kapillare belegt mit Octakis (2,3-di-O-pentyl-6-O-methyl)-Cyclodextrin (Macherey-Nagel, Düren, Germany), 25 m × 0,25 mm, Schichtdicke 0,2 µm (max. Temp. 200°C)
- Auswertung mit XCalibur 2.1 SP1.48 Software

Detektoren:

- Detektor 1D: Flammenionisationsdetektor (FID): 250°C, 35 ml/min H₂, 340 ml/min O₂, Make-Up-Gas 30 ml/min N₂
- Detektor 2D: MS TSQ Quantum XLS Ultra Thermo Fisher: Transferline 190°C, Ionenquelle 230°C

MS-MS Parameter:

- Massenspektrometrische Detektion im positive Elektronen-Ionisations-Modus bei 70 eV
- Die Temperaturen für die Transferleitung und die Ionenquelle waren 190°C und 230°C
- Zyklisierungsperiode 0,3 s; Kollisionsgas (Argon 99,999% Reinheit); Druck 1,1 mTorr; Scanbreite von 0,002 m/z; Q1 FWHM 0,7; Q3 FWHM 0,7

Tabelle 7: Einstellung für die Single-Ion-Monitoring (SIM) für das Massenspektrometer mit den fettgedruckten Quantifizier-Massen

Komponente	Center Mass	collision energy [V]
Zimtaldehyd	135 103	10
Zimtaldehyd-d5	137 108	10
Eugenol	164	10
Eugenol-d3	167	10

Tabelle 8: MS-MS Übergänge für die Selected-Reaction-Monitoring (SRM) für das Massenspektrometer mit den fettgedruckten Quantifizier-Massen

	parent ion [m/z]	product mass [m/z]	collision energy [V]
γ-Decalacton	128	95	8
	128	71	8
	85	57	8
γ-Decalacton-d7	135	99	8
	90	62	8
	90	90	8
γ-Undecalacton	128	95	8
	128	71	8
	85	57	8
δ-Decalacton	99	71	8
	71	71	8
	114	67	12
	124	95	12

Deans Switch (microfluidic device von SGE (now Trajan Scientific), Ringwood, Australia)

- Die Gaszufuhr wird durch den Carrier-Gaseingang des SSL-Injektors mit Gas versorgt. Zwischen Deans Switch und FID ist eine Restriktionskapillare von ca. 0,6 m × 0,1 mm (Phenylmethyl-deaktiviert) eingebaut.
- Der Deans Switch ist am GC als „Valve # 1 Switching“ konfiguriert.
- Folgende Parameter werden in der GC-Methode als „external event“ festgelegt:
- Valve Switching Events: 1D → 2D
 - 20,42 min ON; 20,74 min OFF (Zimtaldehyd/ Zimtaldehyd-d5)
 - 22,86 min ON; 23,30 min OFF (Eugenol/ Eugenol-d3)
 - 23,32 min ON; 23,80 min OFF (γ-Decalacton/ γ-Decalacton-d7)
 - 24,30 min ON; 24,81 min OFF (γ-Undecalacton)
 - 26,42 min ON; 27,01 min OFF (δ-Decalacton)

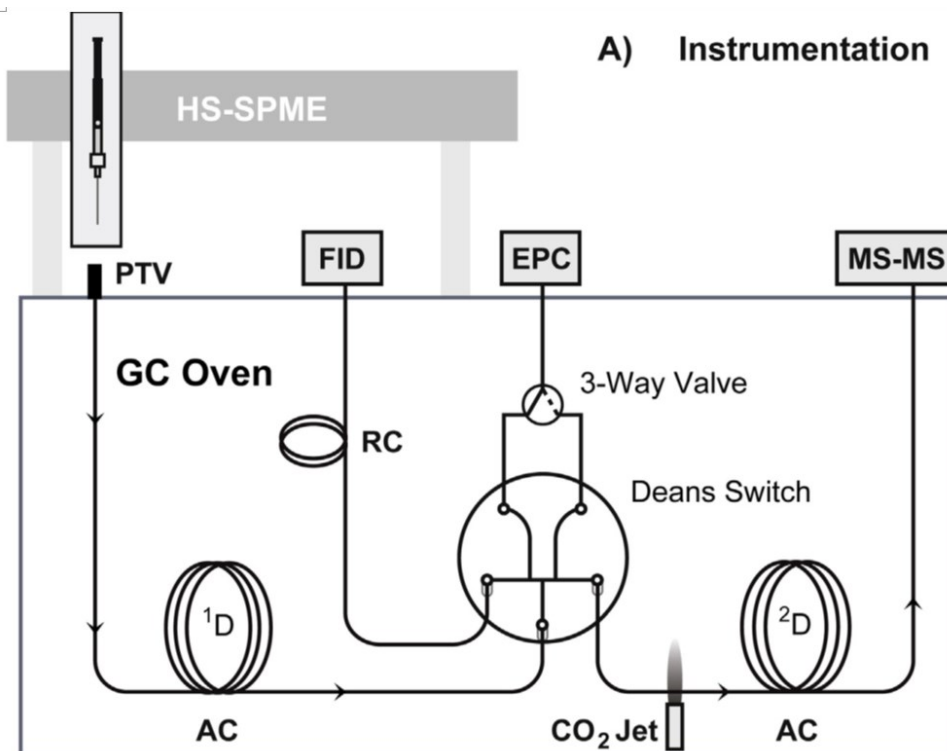


Abbildung 2: Schematische Darstellung des zweidimensionalen GC Set-up mit Cryo-Fokussierung zur Refokussierung der auf die zweite Säule übertragenen Aromastoffe (Schmarr et al. 2016)

Cryo-Focussing

- Das Ventil zur Ansteuerung des CO₂-Cryo-Jets ist am GC als „external event #3“ konfiguriert. Folgende Parameter werden in der GC-Methode als external event festgelegt:
- External Event #3: 19,58 min ON; 29,50 min OFF

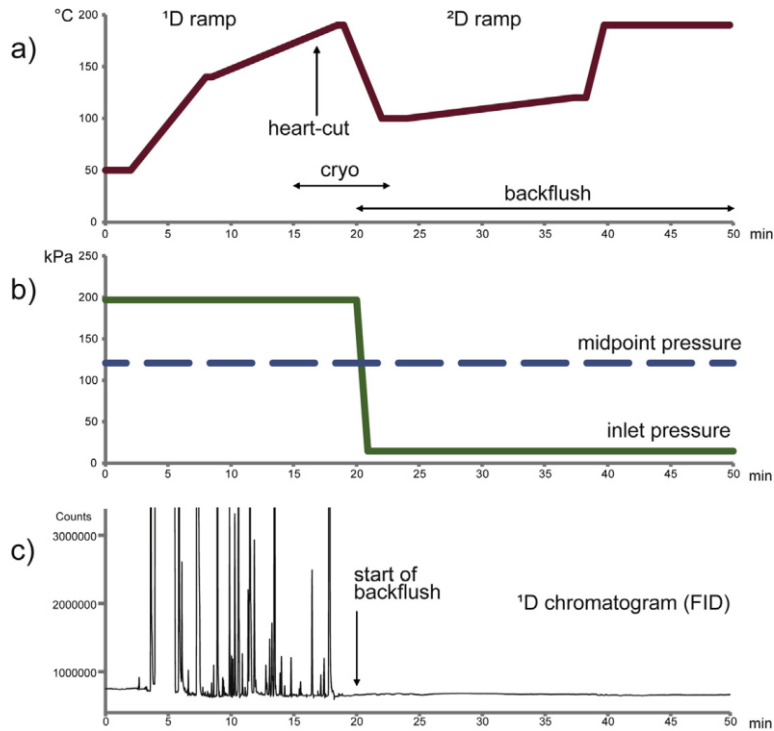


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Temperaturprogramms (a), Druckprogramms im Dean-Switch zur Übertragung von der ersten auf die zweiten Säule (b) und FID-Chromatogramm der ersten Säule bis zum Übertrag auf die zweite Säule und gleichzeitiger Rückspülung der Säule (c) (Schmarr et al. 2016)

Chemikalien:

- Ethanol, HPLC grade $\geq 99,7\%$ Roth; Karlsruhe [64-17-5]
- Natriumchlorid p.a. ACS $\geq 99,5\%$ Roth; Karlsruhe [7647-14-5]
- Zimtaldehyd [104-55-2] (Symrise) $>95,0\%$
- Zimtaldehyd-d5 [1304632-52-7] (aromaLAB) $>95,0\%$
- Eugenol [97-53-0] (Symrise) $>95,0\%$
- Eugenol-d3 [1335401-17-6] (aromaLAB) $>95,0\%$
- γ -Decalacton [706-14-9] (Symrise) $>95,0\%$
- γ -Decalacton-d7 (DLR-Rheinpfalz) $>95,0\%$
- γ -Undecalacton [104-67-6] (Symrise) $>95,0\%$
- δ -Decalacton [705-86-2] (Symrise) $>95,0\%$
- Modellwein n. LUA-Mainz
 - L(+)-Weinsäure (AppliChem) [87-69-4] 1,5 g/L
 - DL-Äpfelsäure (Merck) [6915-15-7] 1,5 g/L
 - L(+)-Milchsäure, 85-90% (Riedel de Haën) [79-33-4] 1,7 g/L
 - D(+)-Glucose (AppliChem) [50-99-7] 15,0 g/L
 - D(-)-Fuctose (AppliChem) [57-48-7] 15,0 g/L
 - Glycerin, wasserfrei (Sigma-Aldrich) [56-81-5] 6,0 g/L
 - 2,3-Butandiol (Max F. Keller) [--] 1,0 g/L
 - 2-Phenylethanol (Sigma-Aldrich) [60-12-8] 40,0 mg/L
 - Ethanol, 96%vol. (Berkel AHK) [64-17-5] 120 mL/L
 - K⁺, Zugabe durch pH-Einstellung (Scharlau) [1310-58-3] 1,4 g/L
 - Stabilisiert mit NaN₃ [26628-22-8] 100 mg/L (2.5 mL einer 40 g/L Lösung/L)

Sonstige Geräte:

- GC-Spritzen von 10 µL; 20 µL; 50 µL (Fa. Hamilton)
- 2 ml Glasfläschchen mit Gewinde, 32 x 12 mm (Fa. BGB-Analytik)
- 20 ml Headspace Glasfläschchen (weiß, Größe: 75,5 x 22,5 mm Schraubverschluss 18 mm) (Fa. Klaus Trott)
- Septum Sil/PTFE blau-transparent (1,3 mm), (Fa. Klaus Trott)
- Analysenwaage (Fa. Sartorius)

Probenvorbereitung

- 5 mL Probe wird in 20 mL Headspace-Schraubfläschchen (Sil/PTFE Septum (1,3 mm)) gefüllt in der bereits 5 ml gesättigte wässrige Kochsalzsole vorlegt ist.
- Zugabe des internen Standard-Mix: gamma-Deccalacton-d7 // Zimaldehyd-d5 // Eugenol-d3 (15 µL (Verwendung einer 25 µL Spritze) in einer ethanolischen Lösung mit den Konzentrationen 50 // 200 // 200 ng / 5 mL), so dass in der Probe eine Endkonzentration von 10 // 40 // 40 µg/L vorliegt.

Rohdatenerfassung und Auswertung

- Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der TraceFinder Version 2.1 .
- Limits of detection (LOD) und limits of quantification (LOQ) wurden berechnet gemäß der DIN 32645 via der DINTTEST Software, Version 2005 DE (Georg Schmidt, Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg, Germany).

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungen erfolgten auf drei Ebenen: Der analytischen, der direkten sensorischen Ebene beim Vergleich aromatisierter und unbehandelter Weine und Spülwässer, sowie indirekt über den Vergleich analytisch bestimmter Konzentrationen mit den Schwellenwerten des Stoffes in der passenden Matrix.

3.1 Sensorik der Weine und Spülwässer

Zwei Tage nach der Durchführung des Versuchs wurde das Wasser der ersten Heißwasserspülung vor der Reinigung (siehe Tabelle 5) und das Wasser der zweiten Heißwasserspülung nach der Reinigung jeweils gegen Leitungswasser verglichen. In beiden Fällen konnten die Spülwässer gegen das frische Leitungswasser signifikant unterschieden werden (Tabelle 9). Offensichtlich migrierten in ausreichendem Maße Aromastoffe oder Reste des Weines in die Spülwässer. Hierbei spielen die sehr niedrigen Geruchsschwellenwerte für Aromastoffe in Wasser eine entscheidende Rolle (siehe Tabelle 13).

Der native Sektgrundwein hingegen, der nach der vollständigen Reinigung die komplette Anlage passiert hat und abgefüllt wurde, konnte nicht von dem gleichen Wein unterschieden werden, die nie in Kontakt mit der Fülllinie getreten ist. Somit liegt ein erster Beleg vor, dass nach der Reinigung der Füllanlage keine sensorisch feststellbare Migration vorlag:

Tabelle 9: Ergebnis der sensorischen Triangel-Tests am 24.11.2016

Proben im Triangel-Test	Wasser – Heißspülung Wasser vor Reinigung	Wasser – Heißspülung Wasser nach Reinigung	Ausgangswein - Wein nach Reinigung
Anzahl Prüfer (26 x 2 Wdhg)	52	52	52
Anzahl richtiger Antworten	51	40	23
Signifikanz	***	***	n.s.

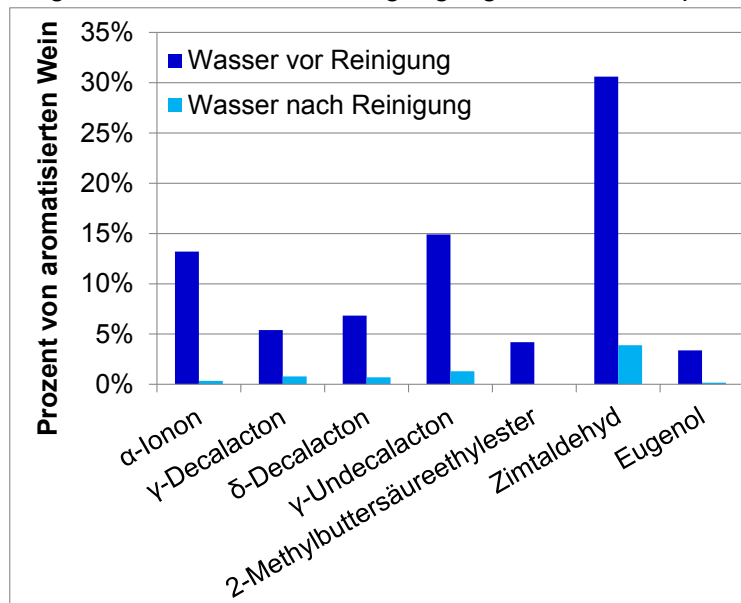
n.s. nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.2 Aromaanalytik der Spülwässer und Weine

3.2.1 Aromaanalytik der Spülwässer und Weine mittels Twister®-GC/MS

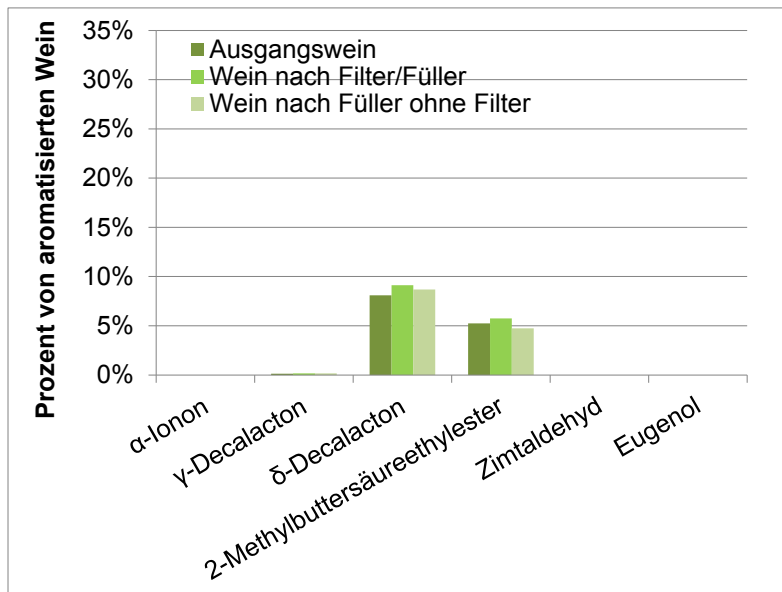
Die erste Aromaanalytik extrahierte die Aromastoffe mittels eines beschichteten Rührstabes (Twister®, Gerstel) aus den flüssigen Proben (Wein, Spülwasser). Die Quantifizierung erfolgte anhand zugesetzter deuterierter Standards.

Das erste Spülwasser vor der Reinigung in Abbildung 4 enthält je nach Aromastoff zwischen 3 bis 30% der ursprünglich im aromatisierten Wein vorliegenden Konzentration. Dieser Sachverhalt erklärt die hochsignifikante Differenzierung des ersten Spülwassers von frischem Leitungswasser. Nach der Reinigung lagen nur noch Spuren von unter 2% der Ausgangsmenge



des aromatisierten Weines in dem 2. Spülwasser vor, mit Ausnahme des Zimtaldehyds, wo 4% der Ausgangsmenge gefunden wurde. Aufgrund seines hohen Schwellenwertes (siehe Tabelle 3) spielte der Zimtaldehyd aber nur eine untergeordnete Rolle. Die in einer geruchsfreien Wassermatrix stark abgesenkten Schwellenwerte reichten aber aus, dass auch dieses Spülwasser noch hochsignifikant sensorisch von frischem Leitungswasser unterschieden werden konnte.

Abbildung 4: Prozentualer Gehalt der zugesetzten Aromastoffe in den Spülwässern in Relation zu den Gehalten in dem aromatisierten Wein



Mit dieser weniger empfindlichen Analysemethode konnte in dem unbehandelten Ausgangswein sowie den mit und ohne Filtergruppe abgefüllten Weinen nach der Reinigung keine signifikante Anreicherung der Aromastoffe δ -Decalacton sowie 2-Methyl-buttersäureethylester festgestellt werden (siehe Abbildung 5). Die anderen Aromastoffe lagen jeweils unter ihrer Bestimmungsgrenze.

Abbildung 5: Prozentualer Gehalt der zugesetzten Aromastoffen in dem unbehandelten Ausgangswein und den mit und ohne Filtergruppe nach der Reinigung abgefüllten Wein

3.2.2 Aromaanalytik der Spülwässer und Weine mittels HS-SPME-GC/MS

Genauere Messungen wurden mit einer Headspace (HS) Solid-Phase-Micro-Extraction (SPME) enantiomeren Multidimensionalen Gaschromatographie ((e)MDGC) und einer Massenspektrometer-Massenspektrometer (MS/MS) Detektion im Single-Ion-Monitoring Modus (SIM-MS) bestimmt. Der Kalibrierbereich, die Linearität und Güte der Kalibriergerade (R^2) die Nachweisgrenze (Limit of Detection; LOD) sowie die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification; LOQ) ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Leistungsparameter der angewandten HS-SPME-(e)MDGC-MSMS-(SIM-MS)-Methode zur Bestimmung der zugesetzten Aromastoffe

Aromastoff	Kalibrierbereich ^(a) [µg/L]	Linearität ^(b)	R^2	χ_{XG} (LOD) [µg/L]	χ_{EG} [µg/L]	χ_{BG} (LOQ) [µg/L]
Zimtaldehyd	2,1 - 275,5	$y = 0,058x + 0,072$	0,9998	2,91	5,81	10,42
Eugenol	2,8 - 210,9	$y = 0,036x - 0,007$	0,9999	1,75	3,51	6,35
γ -Decalacton	0,16 – 63,8	$y = 0,241x + 0,057$	0,9995	1,21	2,43	4,32
γ -Undecalacton	0,28 - 110,9	$y = 0,298x + 0,025$	0,9995	1,71	3,42	6,29
δ -Decalacton	0,19 – 78,3	$y = 0,203x + 0,219$	0,9991	1,99	3,99	7,07
R- α -Ionon	0,101 – 6,079	$y=0,407x-0,001$ ^(d)	0,9958	0,72	--	2,59
S- α -Ionon	0,137 – 8,192	$y=0,709x+0,048$ ^(d)	0,9945	0,71	--	2,53

(a) Kalibrierung erfolgte in einem Modellwein (ca. 12% Vol., pH 3,5) (siehe 2.5.2: Chemikalien)

(b) Lineare Regression

(c) χ_{NG} (LOD), χ_{EG} , χ_{NG} (LOQ) wurden nach DIN 32645 bestimmt.

(d) Wichtung 1/X

Somit bewegten sich die Nachweisgrenzen für die verschiedenen Aromastoffe zwischen 0,7 und 2,91 µg/L.

Den Ergebnissen aus Tabelle 11 zu Folge konnte in der ersten abgefüllten Flaschen Wiederfindungen von 57% bis 89% realisiert werden: γ -Decalacton (86%), δ -Decalacton (57%), γ -Undecalacton (89%), R und S α -Ionon (80%), Zimtaldehyd (85%) und Eugenol (80%). Offensichtlich kam es bereits bei dem ersten Kontakt zwischen den Filtermaterialien und Dichtungen zu einer nennenswerten Abreicherung der Aromastoffe. Ferner gelingt es nicht immer, bei der Probenaufarbeitung zu 100% die enthaltenden Aromastoffe zu extrahieren und der Analyse zuzuführen.

Vergleicht man die Gehalte der Aromastoffe in der erstgefüllten Flasche 1 mit der zuletzt gefüllten Flasche 2673, so nimmt der Gehalt der Aromastoffe um 8 bis 31% ab: γ -Decalacton (19%), δ -Decalacton (17%), γ -Undecalacton (31%), R und S α -Ionon (25%), Zimtaldehyd (20%) und Eugenol (8%). Dies ist ein Beleg für die zunehmende Aromamigration aus dem Wein in die Filter- und Dichtungsmaterialien.

Geht man von einer 100%-igen Extraktion der Aromastoffe aus dem analysierten Wein aus, so variierte die absolute Aufnahme der Aromastoffe durch die kontaktierten Filter-, Schlauch- und Dichtungsmaterialien zwischen 6,9 und 31,8 mg: γ -Decalacton (6,9 mg), δ -Decalacton (22,2 mg), γ -Undecalacton (8,0 mg), R und S α -Ionon (8,1 mg), Zimtaldehyd (31,8 mg) und Eugenol (26,7 mg).

Tabelle 11: Konzentrationen der Aromastoffe in den verschiedenen Fraktionen (experimentell aromatisiertes weinhaltiges Getränk)

Probe (n=2)	Zimtaldehyd [$\mu\text{g/L}$]	Eugenol [$\mu\text{g/L}$]	γ -Decalacton [$\mu\text{g/L}$]	γ -Undecalacton [$\mu\text{g/L}$]	δ -Decalacton [$\mu\text{g/L}$]	R- α -Ionon [$\mu\text{g/L}$]	S- α -Ionon [$\mu\text{g/L}$]
Aromatisierter Wein Flasche 1	168,8	164,3	38,5	36,0	47,9	16,6	16,2
Aromatisierter Wein Flasche 2673	135,0	151,4	31,0	24,7	39,7	12,5	12,2
1. Reinigungsschritt heißes Spülwasser	<LOD ^(a) < 2,9 $\mu\text{g/L}$	1,9	<LOD < 1,2 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 2,0 $\mu\text{g/L}$	1,6	1,5
2. Reinigungsschritt heißes Spülwasser nach $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}/\text{Zitronensäure}$	<LOD < 2,9 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,8 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,2 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 2,0 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$
Wein ohne Aroma nach Schichtenfilter	<LOD < 2,9 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,8 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,2 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 2,0 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$
Wein ohne Aroma nach Membranfilter	<LOD < 2,9 $\mu\text{g/L}$	<LO < 1,8 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,2 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 2,0 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$
Wein ohne Aroma nach Vorkerze (0,65)	<LOD < 2,9 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,8 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,2 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 2,0 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$
Wein ohne Aroma Flasche 56	<LOD < 2,9 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,8 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,2 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 2,0 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$
Wein ohne Aroma Flasche 715	<LOD < 2,9 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,8 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,2 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 2,0 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$
Wein ohne Aroma ohne Filter Flasche 763	<LOD < 2,9 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,8 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,2 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 2,0 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$
Wein ohne Aroma ohne Filter Flasche 1263	<LOD < 2,9 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,8 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,2 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 1,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 2,0 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$	<LOD < 0,7 $\mu\text{g/L}$

^(a)LOD = Limit of Detection, Nachweisgrenze

Lediglich für das Eugenol (1,9 $\mu\text{g/L}$) sowie die beiden α -Ionon Enantiomere (R 1,6 $\mu\text{g/L}$, S 1,5 $\mu\text{g/L}$) konnten in dem ersten Spülwasser Aromastoffe oberhalb der Nachweisgrenze (LOD) analysiert werden. Da sich diese Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) bewegen

(siehe Tabelle 10), geben diese Konzentrationen nur ungefähre Anhaltspunkte für die tatsächlichen Gehalte an. Alle anderen zugesetzten Aromastoffe bewegten sich bereits unterhalb der analytischen Nachweisgrenze.

Bei allen weiteren Proben, sei es das Spülwasser nach der Reinigung oder alle Proben des nativen Weines, der nach den verschiedenen Filtern und unter Ausschluss aller Filter gezogen wurden, lagen die migrierten Aromastoffe unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze. Dies unterstützt das sensorische Ergebnisse aus Tabelle 9, in dem kein signifikanter sensorischer Unterschied zwischen dem Wein vor der Füllung und dem nach der Reinigung abgefüllten Wein verzeichnet werden konnte.

Gemäß dem Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft, erweiterte sich der Untersuchungsumfang um die Proben aus der Abfüllung eines mit Mango aromatisierten weinhaltigen Getränks und dem nach der betriebsüblichen Reinigung abgefüllten nicht aromatisierten Perlweins. Obwohl Tabelle 12 eine sehr starke Aromatisierung mit 2.439 µg/L γ-Decalacton und 160 µg/L δ-Decalacton ausweist, welches dem 12-fachen und 0,2-fachen des Schwellenwertes in Wein entspricht, konnte nach der Reinigung in dem nachfolgend gefüllten Weine keine Aromastoffe oberhalb der Nachweisgrenzen bestimmt werden. Lediglich für das δ-Decalacton wurde ein konstanter Gehalt von 5,6 bis 5,4 µg/L sowohl im nativen, als auch im karbonisierten und abgefüllten Weine gefunden werden. Dies legt den Schluss nahe, dass dies die native Konzentration von δ-Decalacton im verwendeten Wein darstellt.

Tabelle 12: Konzentrationen der Aromastoffe in den verschiedenen Fraktionen (mit Mango aromatisiertes weinhaltiges Getränk)

Probe (n=2)	Zimtaldehyd [µg/L]	Eugenol [µg/L]	γ-Decalacton [µg/L]	γ-Undecalacton [µg/L]	δ-Decalacton [µg/L]	R-α-Ionon [µg/L]	S-α-Ionon [µg/L]
Aromatisiertes (Mango) weinhaltiges Getränk	<LOD < 2,9 µg/L	<LOD < 1,8 µg/L	2.438,5	<LOD < 1,7 µg/L	160,1	<LOD < 0,7 µg/L	<LOD < 0,7 µg/L
Neuer Wein vor Füllung	<LOD < 2,9 µg/L	<LOD < 1,8 µg/L	<LOD < 1,2 µg/L	<LOD < 1,7 µg/L	5,6 (<LOQ)	<LOD < 0,7 µg/L	<LOD < 0,7 µg/L
Neuer Wein nach Füllung 1.000 Flaschen	<LOD < 2,9 µg/L	<LOD < 1,8 µg/L	<LOD < 1,2 µg/L	<LOD < 1,7 µg/L	5,6 (<LOQ)	<LOD < 0,7 µg/L	<LOD < 0,7 µg/L
Neuer Wein nach Füllung 10.000 Flaschen	<LOD < 2,9 µg/L	<LOD < 1,8 µg/L	<LOD < 1,2 µg/L	<LOD < 1,7 µg/L	5,5 (<LOQ)	<LOD < 0,7 µg/L	<LOD < 0,7 µg/L
Neuer Wein vor Füllung aus zweiten Fülltank	<LOD < 2,9 µg/L	<LOD < 1,8 µg/L	<LOD < 1,2 µg/L	<LOD < 1,7 µg/L	5,4 (<LOQ)	<LOD < 0,7 µg/L	<LOD < 0,7 µg/L
Neuer Wein nach Füllung 100.000 Flaschen	<LOD < 2,9 µg/L	<LOD < 1,8 µg/L	<LOD < 1,2 µg/L	<LOD < 1,7 µg/L	5,4 (<LOQ)	<LOD < 0,7 µg/L	<LOD < 0,7 µg/L

Somit konnte auch in einem stark aromatisierten Wein bei einer ordnungsgemäßen Füllung keinerlei Aromamigration festgestellt werden.

Da der chirale Aromastoff 2-Methylbuttersäureethylester und das sehr geruchsaktive Isobutyl-Methoxypyrazin (IBMP) in kommerziellen Aromapräparaten und bei der Verfälschung von Wein durch unerlaubte Aromatisierung keine Rolle spielt, wurde aufgrund krankheitsbedingter personeller Engpässe die Auswertung dieser beiden Substanzen zurückgestellt.

3.3 Bestimmung von Schwellenwerten in verschiedenen Matrices

Für die Verbindungen γ -Decalacton, δ -Decalacton, γ -Undecalacton, Ethyl-2-methylbutanoat, Zimtaldehyd und Eugenol wurden in vollentsalztem Wasser, Modellweidlösung und Weißwein Geruchsschwellenwerte ermittelt. Über einen Zeitraum von drei Monaten wurden jede Woche in zwei Terminen je drei Gruppenschwellenwerte ermittelt. Jede Verkostung wurde in dreifacher Wiederholung durchgeführt. Auf Grund des langen zeitlichen Umfangs der Untersuchungen war es nicht möglich, alle Verkostungen mit einem konstanten Panel durchzuführen. Somit variierte die Besetzung des Verkostungspanels und dessen Teilnehmerzahl. Die Ergebnisse der Verkostungswiederholungen zeigen jedoch, dass trotz des variierenden Panels die Einzelwiederholungen vergleichbar sind.

Tabelle 13: Gruppenschwellenwerte in Wasser und deren gepooltes Mittel mit 95% Konfidenzintervalle für drei Verkostungswiederholungen. KI = Grenzen des 95% Konfidenzintervall, n = Anzahl Verkoster. Alle Werte in $\mu\text{g/L}$

	Wiederholung	Gruppenschwellenwerte	unteres KI	oberes KI	N Prüfer
γ-Decalacton	1	5,8	2,2	15,4	20
	2	6,2	2,6	14,7	19
	3	4,0	2,0	8,3	19
	gepoolt:	5,3	3,3	8,4	
δ-Decalacton	1	25,9	15,3	37,6	20
	2	15,6	7,0	34,8	22
	3	38,0	20,9	69,0	22
	gepoolt:	24,8	16,2	38,0	
γ-Undecalacton	1	7,0	2,6	18,4	19
	2	4,4	2,5	7,8	22
	3	2,9	1,6	5,4	22
	gepoolt:	4,4	3,0	6,5	
Ethyl-2- methyl- buttersäureester	1	0,26	0,11	0,63	20
	2	0,06	0,03	0,15	19
	3	0,08	0,03	0,22	19
	gepoolt:	0,11	0,07	0,18	
Zimtaldehyd	1	153,4	67,2	350,1	19
	2	135,4	51,2	83,2	22
	3	57,7	33,8	98,4	22
	gepoolt:	88,1	62,8	123,6	
Eugenol	1	1,1	0,5	2,5	19
	2	0,4	0,2	0,8	19
	3	0,8	0,3	2,0	18
	gepoolt:	0,7	0,4	1,1	
α-Ionon	1	10,8	5,1	22,9	23
	2	7,3	3,6	15,1	20
	gepoolt:	8,7	5,3	14,5	

Für jede Verbindung sind die Gruppenschwellenwerte der drei Wiederholungen und deren gepooltes Mittel mit 95% Konfidenzintervallen in Tabelle 13 für Wasser, in Tabelle 14 für Modellwein und in Tabelle 15 für Wein zusammengefasst. Die gepoolten Mittelwerte mit ihren 95% Konfidenzintervallen sind wie folgt zu interpretieren: Für die bestimmte Verbindung liegt der Wahrnehmungsschwellenwert in der jeweiligen Matrix (Wasser, Modellwein oder Wein) nach dem hier zugrunde liegenden Testbedingungen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% zwischen der unteren und der oberen Grenze der Konfidenzintervalle.

Tabelle 14: Gruppenschwellenwerte in **Modellwein** und deren gepooltes Mittel mit 95% Konfidenzintervalle für drei Verkostungswiederholungen. KI = Grenzen des 95% Konfidenzintervall, n = Anzahl Verkoster.

	Wiederholung	Gruppenschwellenwert	unteres KI	oberes KI	N Prüfer
γ-Decalacton	1	49,1	20,8	115,9	21
	2	92,0	32,5	260,5	20
	3	43,5	16,0	118,2	15
	gepoolt:	59,5	34,8	101,5	
δ-Decalacton	1	308,0	127,4	744,6	20
	2	80,4	44,6	144,9	18
	3	153,4	97,9	240,4	19
	gepoolt:	159,8	109,9	232,2	
γ-Undecalacton	1	13,0	6,0	28,3	20
	2	9,4	4,0	22,2	19
	3	20,8	10,3	41,8	19
	gepoolt:	13,6	8,9	21,0	
Ethyl-2-methylbuttersäureester	1	9,7	4,5	21,1	20
	2	6,8	2,8	16,5	20
	3	11,5	4,5	29,0	14
	gepoolt:	8,9	5,5	14,3	
Zimtaldehyd	1	868,1	427,7	1762,1	20
	2	1534,4	645,7	3646,0	19
	3	944,9	418,7	2132,7	19
	gepoolt:	1075,6	693,7	1668,0	
Eugenol	1	22,5	9,6	52,5	22
	2	17,3	7,5	40,1	20
	3	10,9	4,0	30,2	15
	gepoolt:	17,0	10,4	27,7	
α-Ionon	1	11,4	4,8	27,2	24
	2	10,2	4,4	23,6	19
	gepoolt:	10,9	6,0	19,7	

Tabelle 15: Gruppenschwellenwerte **in Wein** und deren gepooltes Mittel mit 95% Konfidenzintervalle für drei Verkostungswiederholungen. KI = Grenzen des 95% Konfidenzintervall, n = Anzahl Verkoster.

	Wiederholung	Gruppenschwellenwert	Unteres KI	oberes KI	N Prüfer
γ-Decalacton	1	254,2	131,9	490,1	27
	2	235,4	100,5	551,3	15
	3	125,8	54,9	288,1	18
	gepoolt:	201,9	132,4	307,9	
δ-Decalacton	1	220,2	100,8	480,8	24
	2	357,6	171,9	744,0	27
	3	207,7	78,7	548,0	19
	gepoolt:	261,3	172,1	396,7	
γ-Undecalacton	1	43,5	22,2	85,2	25
	2	30,0	12,6	71,5	26
	3	25,0	11,6	54,0	26
	gepoolt:	31,8	20,9	48,2	
Ethyl-2-methylbuttersäureester	1	1.657,0	716,7	3.831,0	26
	2	1.732,1	628,9	4.770,4	19
	3	1.092,9	362,2	3.297,2	15
	gepoolt:	1.514,4	907,7	2.526,4	
Zimtaldehyd	1	1.215,4	563,0	2.623,5	25
	2	1.270,4	547,0	2.950,6	24
	3	773,7	322,2	1.857,5	20
	gepoolt:	1.082,8	683,7	1.714,9	
Eugenol	1	90,4	34,7	235,1	23
	2	100,4	37,5	268,9	19
	3	82,2	26,1	258,7	18
	gepoolt:	90,8	52,9	155,8	
α-Ionon	1	25,1	12,2	51,7	23
	2	17,9	8,1	39,4	20
	gepoolt:	21,1	12,5	35,5	

Bei der grafischen Darstellung aller drei Matrices für jeden einzelnen Aromastoff zeigt sich in Abbildung 6 und Abbildung 7 für alle drei Lactone ein ähnliches Bild: Im Wasser konnten mit Abstand die niedrigsten Schwellenwerte bestimmt werden, was durch die hohe Verflüchtigungsrate in dem sehr polaren Lösungsmittel Wasser erklärt wird. Die biologische Empfindlichkeit für das γ -Undecalacton (4,4 $\mu\text{g/L}$) ist etwas ausgeprägter als für das γ -Decalacton (5,3 $\mu\text{g/L}$) und deutlich höher als für das δ -Decalacton (24,8 $\mu\text{g/L}$). Mit der Anhebung des Alkoholgehaltes von 0 auf 12 % vol. im Modellwein erhöht sich die Löslichkeit der hydrophoben Aromastoffe und damit verringert sich ihre Verflüchtigung und ihr Schwellenwert steigt um das Vier- bis Zehnfache (γ -Undecalacton (13,6 $\mu\text{g/L}$) und γ -Decalacton 59,5 $\mu\text{g/L}$). Mit der zusätzlichen Hereinnahme anderer Aromastoffe in die Matrix durch die Verwendung des nativen Weins, kommt es zu einem weiteren Anstieg der Schwellenwerte, die nun zwischen 31,8 $\mu\text{g/L}$ (γ -Undecalacton), 201,9 $\mu\text{g/L}$ (γ -Decalacton) und 261,3 $\mu\text{g/L}$ (δ -Decalacton) schwanken.

In der Literatur werden mit 11 – 100 µg/L ähnliche bis dreifach geringere Werte berichtet (siehe Tabelle 3). Dies kann an der Verwendung des Dreieckstests in dieser Studie statt des 3-AFC-Tests zur Bestimmung der Schwellenwerte in der Literatur liegen, aber auch an einer abweichenden Zusammensetzung der Modellweine oder nativen Weine.

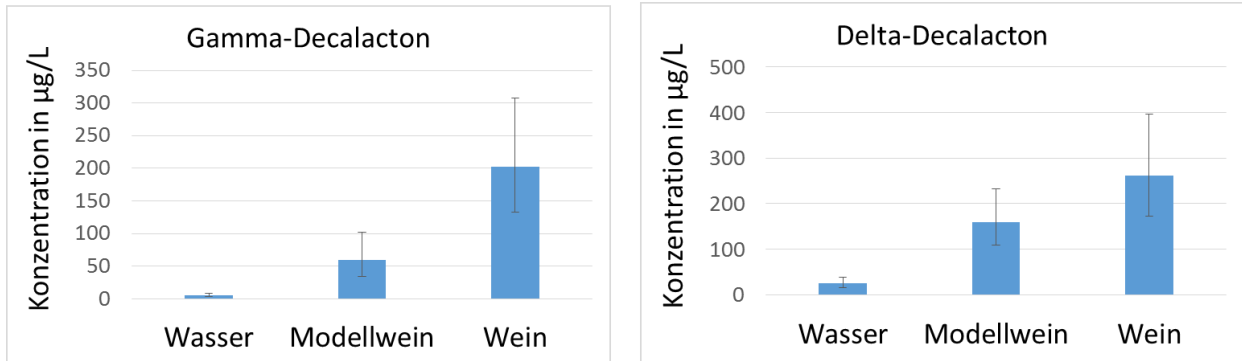


Abbildung 6: Schwellenwerte für γ - und δ -Decalacton in den Matrices Wasser, Modellwein und Wein unter Angabe der Konfidenzintervalle

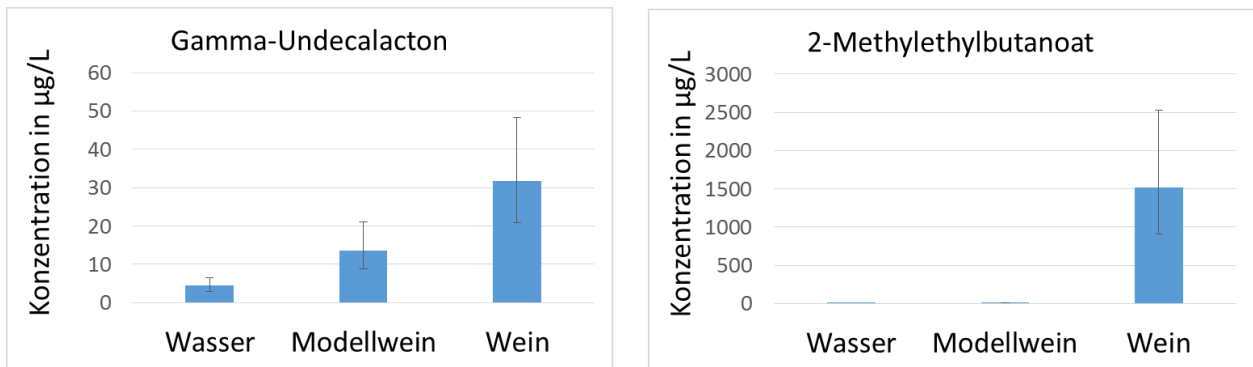


Abbildung 7: Schwellenwerte für γ -Undecalacton und 2-Methylethylbuttersäureester in den Matrices Wasser, Modellwein und Wein unter Angabe der Konfidenzintervalle

Der mit einem fruchtigen Geruch nach Apfel und Birne aufwartende Ester 2-Methylethylbuttersäureester (2-Methylethyl-butanoat) weist sowohl im Wasser als auch im Modellwein niedrige Schwellenwerte von nur 0,11 µg/L und 8,9 µg/L auf. Dies ist mit dem charakteristischen Geruch und der hohen Flüchtigkeit zu erklären. In der Weinmatrix hingegen verbindet sich der fruchtige Geruch derart stark mit den Fruchtnoten des Grundweines, dass fast die zweihundertfache Konzentration von 1514 µg/L benötigt wird, um als abweichend erkannt zu werden. Der im Wasser bestimmte Schwellenwert stimmt gut mit den publizierten Daten überein (0,1 bis 0,3 µg/L). Jedoch zeigt gerade dieser Ester sehr gut die Abhängigkeit der verwendeten Matrices für Schwellenwerte auf.

Der Zimtaldehyd zeigt ein vergleichbares Muster wie das δ -Decalacton. Die Anwesenheit des Alkohols in der Matrix ist der entscheidende Faktor, der die Schwellenwerte zwischen Wasser einerseits und Modellwein bzw. Wein andererseits um das Zwölfwache von 88 µg/L auf 1076 und 1086 µg/L ansteigen lässt. Diese Werte stimmen gut mit den in der Literatur je nach Matrix mit 50 – 750 µg/L angegebenen Schwellenwerten für Zimtaldehyd überein.

Im Eugenol hingegen sehen wir die gleichen Abstufungen wie im γ -Decalacton und γ -Undecalacton. Der charakteristische würzige, scharfe Geruch nach Gewürznelken führt zu

einer guten Erkennbarkeit, was eine rund zehn Mal niedrigere Geruchsschwelle als im Zimtaldehyd zur Folge hat. Die ermittelten Schwellenwerte zwischen 1, 17 und 91 µg/L beschreiben eine ähnliche Bandbreite wie die in der Literatur aufgeführten Wertebereich von 6 bis 30 µg/L je nach Matrix.

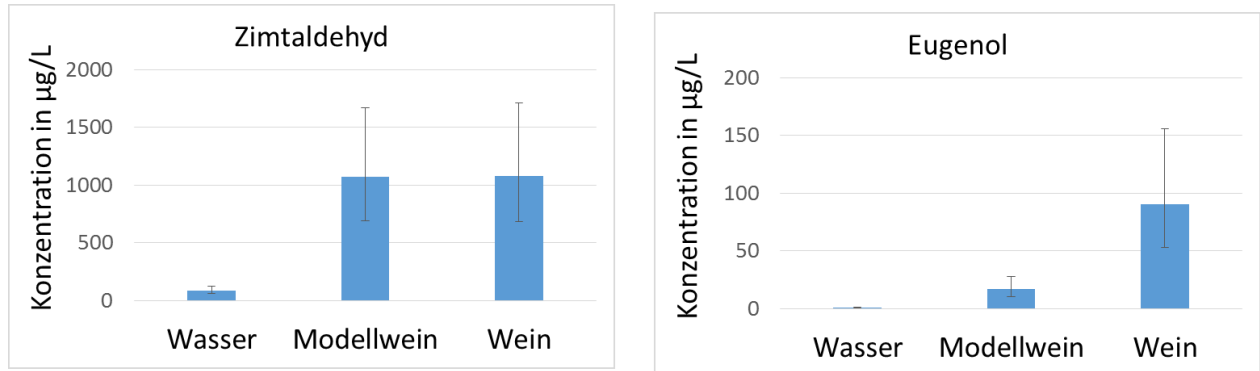
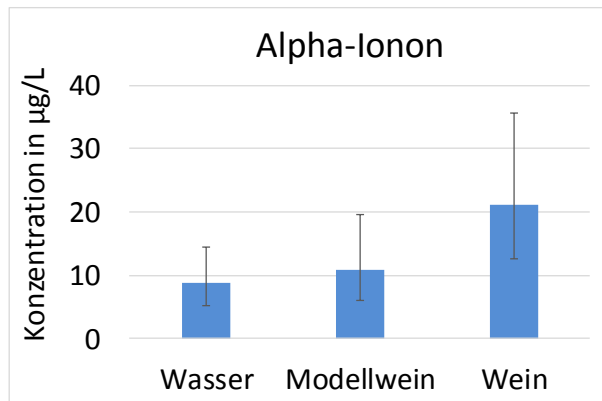


Abbildung 8: Schwellenwerte für Zimtaldehyd und Eugenol in den Matrices Wasser, Modellwein und Wein unter Angabe der Konfidenzintervalle



Abschließend wurde auch das C₁₃-Norisoprenoid α -Ionon untersucht und es belegte mit Schwellenwerten zwischen 9 und 21 µg/L seine hohe biologische Aktivität. Diese Werte stimmen gut mit den bei verschiedenen Temperaturen ermittelten Schwellenwerten von 5,1 bis 13,7 µg/L überein (7).

Abbildung 9: Schwellenwerte für α -Ionon in den Matrices Wasser, Modellwein und Wein unter Angabe der Konfidenzintervalle

3.4 Verknüpfung analytischer und sensorischer Ergebnisse

Angesichts der sich immer weiter entwickelnden Leistungsfähigkeit der Massenspektrometrie werden sich die analytischen Nachweisgrenzen für Aromastoffe weiter nach unten bewegen. Gleichzeitig führt die Nutzung der zweidimensionalen Gaschromatographie, die eine weitaus höhere chromatographische Auflösung ermöglicht und eine sicherere, da weniger durch Co-Elution verfälschende, Bestimmung der Aromastoffe erlaubt, zu einer Korrektur der publizierten Konzentrationsangaben für Aromastoffe im Wein nach unten. Zwangsläufig werden damit ehemals als weinfremd angesehene Aromastoffe als natürliche Weinbestandteile eingestuft werden müssen. Im Falle chiraler Aromastoffe stellt die Gegenüberstellung des natürlich bedingten Enantiomerenverhältnis gegenüber der racemischen Verteilung zugesetzter Aromastoffe einen sicheren Indikator für den unerlaubten Zusatz Aromastoffen dar. Gleichzeitig darf man nicht aus den Augen lassen, dass unter sauren Bedingungen Ester wie die Lactone hydrolytisch gespalten werden können. Zyklisieren sie ohne Einfluss von Enzymen im Wein erneut, so kann sich dabei ein racemisches Enantiomerenverhältnis bilden. Somit kann auch auf natürlichem Weg ein von der enzymatischen Bildung durch die Rebe oder Hefen abweichendes Enantiomerenverhältnis auftreten.

Als Konsequenz für diese technologische Entwicklung ist es zwingend notwendig, die sensorische Relevanz der analysierten Aromastoffkonzentrationen in Betracht zu ziehen. Dies findet seinen Niederschlag in der Formulierung von Aromawerten, die sich aus der Division der vorgefundenen Aromastoffkonzentrationen mit dem passenden Schwellenwert für den betreffenden Aromastoff ergibt. Aromawerte von eins und größer belegen eine eindeutige sensorische Bedeutung. Aromawerte bis zu 0,1 werden als noch relevant eingestuft. Hintergrund für die unscharfe Interpretation sind die stark ausgeprägten individuellen Abweichungen in den persönlichen Schwellenwerten, die ihren Ausdruck in den oberen und unteren Konfidenzintervallen in Tabelle 13, Tabelle 14 und Tabelle 15 finden und je nach Aromastoff und Matrix um das Zwei- bis Dreifache abweichen können. Betrachtet man sogar die individuellen Schwellenwerte einzelner Personen können Unterschiede bis zum Hundertfachen auftreten. Somit gibt es besonders empfindsame Menschen, die mit ihrem scharfen Geruchssinn einzelne Aromastoffe in hundertmal niedrigeren Konzentrationen wahrnehmen können als andere. Ihr individueller Aromawert könnte somit bis zu hundertmal niedriger liegen, als der Durchschnitt. Hinzu kommen bei der unreflektierten Übernahme von Schwellenwerten aus der Literatur, dass in vielen Fällen die Randbedingungen der Schwellenwertbestimmungen unzureichend angegeben wurden und weder die Methodik, die Matrix noch Anzahl und Trainingsgrad der Probanden bekannt ist. Auch die Art der Extraktion der Aromastoffe aus einer Probe spielt eine große Rolle, da die Extraktion mit einem potenten Lösungsmittel über eine bis zu 24 Stunden andauernde Zeitraum zu höheren Aromastoffkonzentrationen führt, als die Extraktion aus dem Kopfraum (engl. Headspace), die sich stark an die orthonasale Aromastoffwahrnehmung durch die menschliche Nase angleicht. Abweichungen zur menschlichen Geruchswahrnehmung ergeben sich durch die Zugabe von Salzen in den zu analysierenden Wein, die Verdünnung des Weines, die Anwendung höherer Temperaturen als beim Weingenuss, die Anreicherung im Kopfraum durch den Verschluss des Probengefäßes und schließlich aus der Extraktion der im Kopfraum vorliegenden Aromastoffe durch eine speziell beschichtete SPME-Faser. Trotzdem stellt die in dieser Studie angewandte Headspace-SPME-Extraktion unter Anwendung deuterierter Stabilisotopen der analysierten Aromastoffe die beste Annäherung an die Humansensorik dar.

Eine erste Umsetzung des Aromawert-Konzeptes in Tabelle 16 verbindet die analytische Nachweisgrenze in Form des Limit-of-Detection mit den Schwellenwerten in den drei Matrices Wasser, Modellwein und Wein. Mit den vorliegenden analytischen und sensorischen Nachweisgrenzen konnte nur für Eugenol in der wässrigen Matrix ein Aromawert über eins erreicht werden. Für die Aromastoffe γ -Decalacton und γ -Undecalacton konnten Aromawerte von über 0,1 im Wasser erzielt werden. Im Modellwein lagen bei Eugenol und γ -Undecalacton Aromawerte über 0,1 vor. Im gleichen Grundwein hingegen, der auch für die Migrationsversuche Verwendung fand, lagen die Aromawerte unterhalb von 0,1.

Tabelle 16: Analytische Nachweisgrenze, gepoolte Schwellenwerte und Aromawerte der ausgewählten Aromastoffe

Gehalte in $\mu\text{g/L}$	Zimtaldehyd	Eugenol	γ -Decalacton	γ -Undecalacton	δ -Decalacton	R/S- α -Ionon
Analytische Nachweisgrenze	2,9	1,8	1,2	1,7	2,0	0,7
Schwellenwerte						
Wasser	88,1	0,7	5,3	4,4	24,8	8,7
Modellwein	1075,6	17,0	59,5	13,6	159,8	10,9
Wein	1082,8	90,8	201,9	31,8	261,3	21,1
Aromawert						
Wasser	0,033	2,536	0,228	0,389	0,080	0,083
Modellwein	0,003	0,103	0,020	0,126	0,012	0,066
Wein	0,003	0,019	0,006	0,054	0,008	0,034

Gemäß der Diskussion um die individuelle Schwankungsbreite der Prüfer wurden die Aromawerte in Tabelle 17 anhand des unteren, die empfindlicheren Prüfer repräsentierenden, Konfidenzintervalls berechnet. Zu den Aromastoffen mit einem Aromawert über 0,1 im Wasser kam neu das δ -Decalacton und R/S- α -Ionon hinzu und für den Modellwein das R/S- α -Ionon. Für den Grundwein hingegen, blieben die Aromawerte aller Aromastoffe unter 0,1.

Tabelle 17: Analytische Nachweisgrenze, unteres Konfidenzintervall der Schwellenwerte und Aromawerte der ausgewählten Aromastoffe

Gehalte in $\mu\text{g/L}$	Zimtaldehyd	Eugenol	γ -Decalacton	γ -Undecalacton	δ -Decalacton	R/S- α -Ionon
Analytische Nachweisgrenze	2,9	1,8	1,2	1,7	2,0	0,7
Schwellenwerte						
Wasser	62,8	0,4	3,3	3,0	16,2	5,3
Modellwein	693,7	10,4	34,8	8,9	109,9	6,0
Wein	683,7	52,9	132,4	20,9	172,1	12,5
Aromawert						
Wasser	0,046	4,375	0,367	0,570	0,123	0,136
Modellwein	0,004	0,168	0,035	0,192	0,018	0,120
Wein	0,004	0,033	0,009	0,082	0,012	0,058

Betrachtet man nun die in den experimentell aromatisierten Wein gemessenen Aromakonzentrationen nach der Passage durch die Filter und Fülllinie in Tabelle 18 so variieren die Aromawerte aller zugesetzter Aromastoffe zwischen 1,8 und 0,16.

Tabelle 18: Gemessene Aromakonzentrationen im Aromamigrationsexperiment bzw. analytische Nachweisgrenzen, gepoolte Schwellenwerte und Aromawerte der Aromastoffe

Gehalte in µg/L	Zimtaldehyd	Eugenol	γ-Decalacton	γ-Undecalacton	δ-Decalacton	R/S-α-Ionon
Aromatisierter Wein Flasche 1	168,8	164,3	38,5	36,0	47,9	32,8
Aromatisierter Wein Flasche 2673	135,0	151,4	31,0	24,7	39,7	24,7
Spülwasser 1. Reinigungsschritt	2,9	1,9	1,2	1,7	2,0	3,1
Schwellenwerte in µg/L						
Wasser	88,1	0,7	5,3	4,4	24,8	8,7
Wein	1082,8	90,8	201,9	31,8	261,3	21,1
Aromawert						
Aromatisierter Wein Flasche 1	0,156	1,809	0,191	1,132	0,183	1,555
Aromatisierter Wein Flasche 2673	0,125	1,667	0,154	0,777	0,152	1,171
Spülwasser 1. Reinigungsschritt	0,033	2,754	0,226	0,386	0,081	0,356

Im Spülwasser vor der CIP-Reinigung variierten die Aromawerte unter Verwendung des Schwellenwertes für die wässrige Matrix zwischen 2,8 und 0,2. Für das Zimtaldehyd und δ-Decalacton hingegen lagen Aromawerte unterhalb von 0,1 vor. Alle anderen in Tabelle 11 aufgeführten Fraktionen wurden nicht aufgelistet, da sie Gehalte unterhalb der Nachweisgrenzen aufwiesen und damit die Aromawerte aus der Tabelle 16 Gültigkeit haben.

Für die Abfüllung des kommerziellen mit Mango aromatisierten weinhaltigen Getränks sind die Aromawerte in Tabelle 19 berechnet und aufgelistet. Für das aromatisierte weinhaltige Getränk mit Mango-Geschmack ergaben sich Aromawerte von 12 für γ-Decalacton sowie 0,2 für δ-Decalacton. Der native Gehalt an δ-Decalacton im verwendeten Wein von 5,6 µg/L spielte sensorisch mit einem Aromawert von 0,02 keine Rolle.

Tabelle 19: Gemessene Aromakonzentrationen bei der Abfüllung eines kommerziellen aromatisierten weinhaltigen Getränks bzw. analytische Nachweisgrenzen, gepoolte Schwellenwerte und Aromawerte der Aromastoffe

Gehalte in µg/L	Zimtaldehyd	Eugenol	γ-Decalacton	γ-Undecalacton	δ-Decalacton	R/S-α-Ionon
Aromatisiertes (Mango) weinhaltiges Getränk	2,9	1,8	2.438,5	1,7	47,9	0,7
Neuer Wein vor Füllung	2,9	1,8	1,2	1,7	5,6	0,7
Neuer Wein nach Füllung 1.000 Fl.	2,9	1,8	1,2	1,7	5,6	0,7
Neuer Wein nach Füllung 10.000 Fl.	2,9	1,8	1,2	1,7	5,5	0,7
Neuer Wein vor Füllung 2. Fülltank	2,9	1,8	1,2	1,7	5,4	0,7
Neuer Wein nach Füllung 100.000 Fl.	2,9	1,8	1,2	1,7	5,4	0,7
Schwellenwerte µg/L						
Wein	1082,8	90,8	201,9	31,8	261,3	21,1
Aromawert						
Aromatisiertes (Mango) weinhaltiges Getränk	0,003	0,020	12,078	0,053	0,183	0,033
Neuer Wein vor Füllung	0,003	0,020	0,006	0,053	0,021	0,033
Neuer Wein nach Füllung 1.000 Fl.	0,003	0,020	0,006	0,053	0,021	0,033
Neuer Wein nach Füllung 10.000 Fl.	0,003	0,020	0,006	0,053	0,021	0,033
Neuer Wein vor Füllung 2. Fülltank	0,003	0,020	0,006	0,053	0,021	0,033
Neuer Wein nach Füllung 100.000 Fl.	0,003	0,020	0,006	0,053	0,021	0,033

4 Zusammenfassung und Fazit

Bei der Herstellung aromatisierter weinhaltige Getränke wie Glühwein oder karbonisierte Perlweine ist der Zusatz weinfremder Aromastoffe erlaubt und gängige Praxis. Ihre Abfüllung erfolgt in der Weinwirtschaft meist auf den gleichen Fülllinien, die zur Abfüllung von Weinen, Perlweinen oder Schaumweinen eingesetzt werden, für die eine Aromatisierung strikt verboten ist. Nicht zuletzt aufgrund immer niedriger analytischer Nachweisgrenzen von Aromastoffen, stellt die Aromamigration ein gleichermaßen aktuelles und ernstes Rückstandsproblem mit strafrechtlicher Dimension in der Weinwirtschaft dar.

Ziel dieser Studie war die exemplarische Überprüfung ob zugesetzte Aromastoffe eines aromatisierten weinhaltigen Getränks nach branchenüblicher Reinigung über die Teilprozesse einer Fülllinie in einen danach gefüllten Wein übergehen. Hierzu wurde einem Grundwein exakte Konzentrationen der chiralen Aromastoffe γ -Decalacton, γ -Undecalacton, δ -Decalacton, α -Ionon, 2-Methylbuttersäureethylester sowie der nicht chiralen Aromastoffe 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin, Zimtaldehyd und Eugenol zugesetzt. Nach Schichtenfiltration und zweistufiger Membranfiltration erfolgte die Füllung von 2000 0,75 Liter Flaschen auf einer Fülllinie eines Abfüllbetriebes. Nach betriebsüblicher Reinigung der Prozesslinie wurde der gleiche, aber nicht aromatisierte Grundwein, auf der gleichen Fülllinie filtriert und abgefüllt. Nach 750 gefüllten 0,75 Liter Flaschen wurde die Fülllinie um die Filtergruppe reduziert und erneut wurden 750 0,75 Liter Flaschen gefüllt. Ferner wurden das Spülwasser (85°C) vor der Reinigung und direkt nach abgeschlossener Reinigung beprobt.

Die Beurteilung der Aromamigration erfolgte auf drei Ebenen: Direkter sensorischer Vergleich des nativen Ausgangswein mit dem auf der gereinigten Abfülllinie gefüllten nativen Ausgangswein sowie Vergleich der beiden Spülwässer mit dem frischen Leitungswasser. Die zweite Ebene stellt die Aromaanalytik dar und als dritte Ebene wurden für die zugesetzten Aromastoffe in den Matrices Wasser, Modellwein und Wein die Schwellenwerte bestimmt, um die analysierten Konzentrationen hinsichtlich ihrer sensorischen Relevanz einschätzen zu können.

Die sensorischen Tests auf der ersten Ebene zeigten eine sichere Unterscheidbarkeit beider Spülwässer von dem frischen Leitungswasser. Aufgrund der Abwesenheit von jeglichen Geruchsstoffen in dem Wasser ist dies ein sehr empfindliches System und zeigt sehr rasch auch geringste Kontaminationen mit Aromastoffen an. Somit steht den Betrieben ein gutes Warnsystem zur Verfügung, um auch geringste Aromastoffmigrationen anhand der Spülwässer zu überprüfen. Hierzu reicht eine Gruppe von zehn Prüfern aus, die sich aus verschiedenen Mitarbeitern eines Unternehmens rekrutieren können. Der nach der gründlichen Reinigung gefüllte, native Wein konnte im Gegensatz zu den Wässern sensorisch nicht von dem gleichen Wein unterschieden werden, der nie in Kontakt mit den Filtern und dem Füller getreten war. Damit liegt für den verwendeten Grundwein, die eingesetzte Aromatisierung und das angewendete Reinigungsschema eine Aromamigration unterhalb der sensorischen Wahrnehmungsschwelle vor.

Bei der Analyse der Probenfraktionen konnte über die Füllung des aromatisierten Weines zwischen der 1. und 2673. Flasche ein Rückgang aller zugesetzter Aromastoffe um etwa 10% ermittelt werden. Dies belegt die Extraktion von Aromastoffen durch Filter- und Dichtungsmaterialien in der Fülllinie. Nach der Füllung konnte in dem heißen Spülwasser nur die Aromastoffe Eugenol und die beiden R- und S-Enantiomere des α -Ionons in der Nähe der Nach-

weisgrenze gefunden werden. Alle anderen Aromastoffe lagen bereits unterhalb ihrer analytischen Nachweisgrenze vor. Dies gilt auch für alle Untersuchungen der später gefüllten Weine auf der gereinigten Fülllinie.

Zur sensorischen Validierung der analytischen Ergebnisse wurden mit hohem Aufwand die Geruchsschwellenwerte der zugesetzten Aromastoffe bestimmt. Hierbei fand der gleiche Wein als Basis für die Schwellenwertbestimmung Verwendung, der auch für das Aromamigrationsexperiment eingesetzt wurde. Bei allen Aromastoffen lagen die Schwellenwerte in Wein deutlich über der analytischen Nachweisgrenze (LOD).

Dem Konzept des Aromawertes folgend, der sich aus der Division der analysierten Konzentration durch den jeweiligen Schwellenwert ergibt, muss bei Aromawerten kleiner als 1 von einer marginalen sensorischen Relevanz und bei Aromawerten unterhalb von 0,1 von einer nicht vorliegenden sensorischen Relevanz ausgegangen werden. Wie aus Tabelle 16 hervorgeht, lag nur für den Aromastoff Eugenol in der Matrix Wasser ein Aromawert über 1 vor. Alle anderen Aromawerte mit Bezug auf die analytische Nachweisgrenze lagen unter 1. Für die relevante Matrix Wein variierten die Aromawerte bei der analytischen Nachweisgrenze sogar zwischen 0,003 und 0,054.

Da in keinem Wein nach der Reinigung der Fülllinie Aromakonzentrationen über der Nachweisgrenze festgestellt werden konnten und gleichzeitig bei der Nachweisgrenze die Aromawerte weit unterhalb der sensorischen Relevanz lagen, konnte auch der analytische Beleg erbracht werden, dass die stattgefunden Aromamigration ohne sensorische Bedeutung war. Diese Aussage gilt einschränkend für die speziellen Versuchsbedingungen der vorgenommenen Aromatisierung, des verwendeten Grundweins, des angewandten Reinigungsschema und der genutzten Fülllinie.

Für das Spülwasser hingegen konnte im Einklang mit den sensorischen Ergebnissen (siehe Tabelle 9) Aromawerte zwischen 0,2 und 2,8 ermittelt werden. Dies belegt hinreichend, warum das Prüferpanel die Spülwässer gegenüber direkt der Wasserleitung entnommenem Wasser signifikant unterscheiden konnte.

Als Proof-of-Concept wurden ein kommerzielles mit Mango-Geschmack aromatisiertes weinhaltiges Getränk und ein nach Reinigung der Anlage gefüllter, nicht aromatisierter, Perlwein analysiert. Trotz einer starken Aromatisierung in Höhe des Zwölffachen des Schwellenwertes konnten nach der betriebsüblichen Reinigung in dem nachfolgenden Perlwein weder bei der 1.000-sten, 10.000-sten noch 100.000-sten Flasche ein Gehalt der zugesetzten Major Komponente γ -Decalacton über der Nachweisgrenze analysiert werden. Eine Ausnahme bildete das nativ im Grundwein vorkommende δ -Decalacton, das aber auch schon im Wein aus dem Vorlagetank gemessen wurde, der nie Kontakt mit der Fülllinie stand.

Zusammenfassend gelang es die drei zentralen Fragestellungen des BMEL wie folgt zu beantworten: Auf der Ebene des genau kontrollierten Abfülleperiments und der großvolumigen Abfüllung in der Praxis war die unbeabsichtigte und technisch unvermeidbare Übergang der Aromen nach gründlicher Reinigung im Wein sensorisch weder geschmacklich noch geruchlich wahrnehmbar. Die im Wein wahrnehmbaren Konzentrationen von sieben in der Aromatisierung von weinhaltigen Getränken häufig verwendeten Aromastoffe lagen in der Matrix Wein um den Faktor 20 bis 300 unterhalb ihrer extra bestimmten Geruchsschwellenwerte. Dies im-

pliziert, dass in den beiden untersuchten Abfüll- und Reinigungsprozesse die für die sensorische Wahrnehmung erforderlichen Konzentrationen um ein Vielfaches unterschritten werden und keine relevante Aromamigration vorlag.

4.1 Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Das in diesem Forschungsprojekt erstmalig getestet und als praxistauglich und aussagekräftig erwiesene Konzept der Verknüpfung von Spurenanalytik mit sensorischen Schwellenwerten könnte wie folgt weitere Anwendung finden:

Das Ausmaß der Migration von Aromastoffen aus aromatisierten weinhaltigen Getränken in Kunststoffe und Filtermaterialien ist abhängig von den chemischen Eigenschaften und Mengen der jeweiligen Aromastoffe, der verwendeten Kunststoffe in den Dichtungen, ihrer Kontaktfläche zum Füllgut sowie der Kontaktzeit. Mit Untersuchungen zur Aufnahmekinetik verschiedener Kunststoffe und Aromastoffe, kann in Zukunft über die Menge an verbautem Kunststoff auf den potentiellen Eintrag geschlossen werden. Auf der Basis dieses Forschungsberichts können noch keine allgemeingültigen und damit abschließenden Aussagen getroffen werden. Daher ist es notwendig, sich der Frage der sensorischen Veränderung im Einzelfall zu nähern und dazu die Aussagen über die Geruchsschwellenwerte zu Hilfe zu ziehen. Diese Vorgehensweise hat sich in zwei sehr unterschiedlichen Versuchsanstellungen bewährt und klare und belastbare Aussagen geliefert.

Es bedarf einer Ausweitung der untersuchten Aromatisierungen auf weitere, in der Praxis zur Aromatisierung weinhaltiger Getränke eingesetzte Präparate. Die Frage der Aromatisierung konnte und sollte bei der vorliegenden Untersuchung nicht vollständig abgedeckt werden. Insbesondere der eingesetzte Konzentrationsbereich der Aromastoffe als auch ihre Zusammensetzung deckt nicht die komplette Bandbreite ab. Untersucht wurden zwei mögliche Konzentrationsbereiche, wobei die erste eine gezielt ausgewählte Gruppe von vorrangig chiralen Aromastoffen umfasste, die zweite eine branchenübliche Aromatisierung darstellte.

Sollten diese Einträge nur analytisch, nicht aber sensorisch wahrnehmbar sein, prüft das BMEL im Rahmen der nächsten Änderung des Weingesetzes, wie über eine Anpassung der einschlägigen Rechtsvorschriften und unter Wahrung des Verbraucherschutzes, bundesweit einheitliche Beanstandungen von solchen Weinen vermieden werden können.

Ein weiterer Aspekt betrifft die systematische Variation der Reinigungsschritte in enger Zusammenarbeit mit der Praxis (Verband Deutscher Sektkellereien, Verband Deutscher Weinkellereien, Deutscher Weinbauverband, Deutscher Raiffeisenverband), um sichere, gleichzeitig aber kurze und hinsichtlich Einsatz von Chemikalien und Energie optimierte Reinigungszyklen zu entwickeln. Diese müssen gerätetechnische Abweichungen bei der Verwendung verschiedener Filter- und Füllventilsysteme berücksichtigen.

Bei der gewählten Aromatisierung im Abfüllexperiment, konnte aufgrund der unterhalb der Nachweisgrenze stattfindenden Aromamigration der Beitrag einzelner Filter (Schichten- und Kerzenfilter) und der sie verbindenden Schläuche nicht abschließend beurteilt werden. Auch hier bedarf es weiterer Arbeiten, die von einem sehr viel höheren Aromatisierungsgrad ausgehen müssen. Gleiches gilt für den Vergleich verschiedener Füllventilsysteme und einer Variation der Dichtungsmaterialien.

Die Verknüpfung der etablierten Analytik mit den aufwendig bestimmten sensorischen Schwellenwerten in verschiedenen Matrices, erlaubt eine weitere Modifizierung von Dichtungsmaterialien. Ziel weiterer Entwicklungen könnte es sein, die Aromamigration in und aus den Dichtungen so stark zu minimieren, dass diese stets unterhalb der sensorischen Schwellenwerte verbleibt, ohne dass die geforderten mechanischen und anti-mikrobiellen Eigenschaften verloren gehen.

Vorliegende und zukünftige Ergebnisse münden in die Aufstellung eines „Best-practice“-Leitfadens für die Abfüllbetriebe. Er soll auf Basis neuer Forschungsergebnisse kontinuierlich weiterentwickelt werden. Die branchenweite Befolgung dieses Leitfadens könnte dazu beitragen, dass eine möglicherweise analytisch nachweisbare Migration der Aromen im Spurenbereich, die aber weit unterhalb ihrer sensorischen Wahrnehmungsschwellen liegen, bei der rechtlichen Beurteilung zu keiner Beanstandung führen.

5 Kurzfassung

Bei der Herstellung aromatisierter weinhaltige Getränke wie Glühwein oder Perlweine ist der Zusatz weinfremder Aromastoffe erlaubt und gängige Praxis. Ihre Abfüllung erfolgt in der Weinwirtschaft meist auf den gleichen Fülllinien, die zur Abfüllung von Weinen, Perlweinen oder Schaumweinen verwendet werden, für deren Herstellung eine Aromatisierung aber strikt verboten ist. Nicht zuletzt aufgrund immer niedriger analytischer Nachweisgrenzen von Aromastoffen, stellt die Aromamigration ein sehr aktuelles Rückstandsproblem in der Weinwirtschaft dar.

Ziel dieser Studie war die exemplarische Überprüfung, ob zugesetzte Aromastoffe eines aromatisierten weinhaltigen Getränks nach branchenüblicher Reinigung über die Teilprozesse einer Fülllinie in einen nachfolgend gefüllten Wein übergehen. Hierzu wurde einem Grundwein exakte Konzentrationen der chiralen Aromastoffe γ -Decalacton, γ -Undecalacton, δ -Decalacton, α -Ionon, 2-Methylbuttersäureethylester sowie der nicht chiralen Aromastoffe 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin, Zimtaldehyd und Eugenol zugesetzt. Nach betriebsüblicher Reinigung der Prozesslinie wurde der gleiche Grundwein erneut filtriert und abgefüllt.

Nach der analytischen Bestimmung der Aromamigration erfolgte ihre sensorische Beurteilung mit Hilfe der getrennt bestimmten Geruchsschwellenwerte der zugesetzten Aromastoffe.

Alle untersuchten Aromastoffe lagen nach der gründlichen Reinigung unterhalb der analytischen Nachweisgrenzen. Je nach Aromastoff unterschritten die analytischen Nachweisgrenzen die sensorischen Schwellenwerte um den Faktor 20 bis 300. Somit war der unbeabsichtigte und technisch unvermeidbare Übergang der Aromen in den Wein in beiden Abfüllungen geruchlich nicht wahrnehmbar. Die analytischen Ergebnisse wurden sensorisch auf Basis geruchlicher und geschmacklicher Beurteilung bestätigt.

Bei der großvolumigen Abfüllung bestätigten sich die Ergebnisse, da die Migration der zugesetzten Aromastoffe in den nachfolgend gefüllten Wein die jeweiligen Schwellenwerte um den Faktor 50 und 160 unterschritten und daher jeglicher sensorischer Relevanz entbehrten.

Zusammenfassend gelang es die drei zentralen Fragestellungen des BMEL wie folgt zu beantworten: Auf der Ebene des genau kontrollierten Abfüllexperiments und der großvolumigen Abfüllung in der Praxis war die unbeabsichtigte und technisch unvermeidbare Übergang der

Aromen nach gründlicher Reinigung im Wein sensorisch weder geschmacklich noch geruchlich wahrnehmbar. Die im Wein wahrnehmbaren Konzentrationen von sieben in der Aromatisierung von weinhaltigen Getränken häufig verwendeten Aromastoffe lagen in der Matrix Wein um den Faktor 20 bis 300 unterhalb der bestimmten Geruchsschwellenwerte. Dies impliziert, dass in den beiden untersuchten Abfüll- und Reinigungsprozesse die für die sensorische Wahrnehmung erforderlichen Konzentrationen um ein Vielfaches unterschritten wurden.

6 Abstract

Production of flavored wine-based drinks such as spiced wine (Glühwein) or carbonated wine, the aromatization with added aroma compounds is allowed and common practice. However, these wine-based drinks are usually bottled on the same bottling lines, which are used for bottling common still wines, sparkling wines or carbonated wines, for which aromatization is strictly prohibited. Due to constantly declining analytical detection limits of aroma compounds, aroma migration poses a very current residue problem in the wine industry.

The objective of this study was to investigate the migration of added aroma compounds from a flavoured wine-based drink into a subsequently filled wine in context of the application of state of the art cleaning of the whole bottling line. A base wine was flavoured by adding known amounts of the chiral flavours γ -decalactone, γ undecalactone, δ -decalactone, α -ionone, 2-methylbutyrate, and the non-chiral compounds 3-isobutyl-2-methoxypyrazine, cinnamonaldehyde and eugenol. During the bottling process, the wine passed three filters and the filler itself. After cleaning the bottling line, the identical but not flavored base wine was filtered and bottled on the same bottling line. Samples were taken after each process step in order to assess their relative contribution to the overall aroma migration. For validation, a commercial mango-flavored wine-based drink was bottled in a much larger facility. After cleaning, the same bottling line was used for bottling a non-flavoured still wine and samples were taken to investigate aroma migration.

Analytical determination of aroma migration was achieved by using a HS-SPME-enantio-MDGC-MS / MS analysis. Additionally, odour thresholds of the added aroma compounds were obtained. Comparing the detected contamination due to aroma migration with the odor thresholds allows an assessment, whether this migration may yield a sensory change or even improvement in the second wine.

After cleaning the bottling line, all analyzed aroma compounds in the subsequently filled wine fell way below the analytical detection limits. Depending on the compound, the analytical detection limits were 20 to 300 times lower than the respective odor thresholds determined in this study. Thus, the unintended and technically unavoidable migration of aroma compounds into the wine revealed no sensory relevance in both bottling experiments. The analytical results were confirmed by a direct sensory test employing an evaluation by smell and taste.

These results were confirmed for the large-volume filling as well, since the migration of the added aroma compounds into the subsequently filled wine were 50 to 160 times lower than their respective threshold values and thus without any sensory relevance.

In summary, the following answers can be given to the three central questions raised by the BMEL: In a precisely controlled filling experiment and the large-volume filling at industrial scale,

the unintended and technically unavoidable migration of aroma compounds into a subsequently filled wine was so low after a thorough cleaning, that they could not be perceived, neither by smell nor taste. Odor-threshold concentrations of seven frequently employed aroma compounds for flavored wine-based drinks were 20 to 300 times higher in the wine matrix, than their analytical detection limits. This implies that in the two investigated filling and cleaning processes, the analyzed concentrations were one to two order of magnitude below the required sensory threshold and thus of no sensory relevance.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Burdock, G.A. (ed.). Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. 4th ed. Boca Raton, FL 2002, p. 293
- (2) Buttery, R. G., R. Teranishi, L. C. Ling and J. G. Turnbaugh, J. Agric. Food Chem., 38, 336-340 (1990)
- (3) Engel, K.-H., R. A. Flath R. G. Buttery, T.R. Mon, D. W. Ramming and R. Teranishi, J. Agric. Food Chem., 36, 549-553 (1988)
- (4) Fazzalari, F A., editor, Compilation of Odor and Taste Threshold Data, ASTM Data Series DS 48A (1978)
- (5) Flath, R. A., D. R. Black, D. G. Guadagni, W. H.McFadden and T. H. Schultz, J. Agric. Food Chem., 15, 2935 (1967)
- (6) Kieth, E. and J. Powers, J. Food Sci., 33, 213-218 (1968)
- (7) Langen, J., Wegmann-Herr, P. and Schmarr, H.-G. Quantitative determination of α -ionone, β -ionon, and β -damascenone and enantiomer differentiation of α -ionone in wine for authenticity control using multidimensional gas chromatography with tandem mass spectrometric detection, Anal. Bioanal. Chem. 408:6483-6496 (2016)
- (8) Lawless H.T. and Heymann H.: Sensory Evaluation of Food - Principles and Practice, Second Edition, Springer New York Dordrecht Heidelberg London, (2010)
- (8b) Legrum, C., Gracia-Moreno, E., Lopez, R., Potouridis, T., Langen, J., Slabitzki, P, Weiland, J. and H.-G. Schmarr, Quantitative analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in German Sauvignon blanc wines by MDGC-MS or MDGC-MS/MS for viticultural and enological studies. Eur. Food Res. Technol., 239, 549-558 (2014)
- (9) Ohloff ' G., "Recent Developments in the Field of Naturally Occurring Aroma Components", Prog. Chem. Org. Nat. Prod., 35, 431-527 (1978)
- (10) Ohloff, G., Perfumer and Flavorist, 1(3), 11-22 (1978)
- (11) Schmarr, H.-G., Keiser, J. and Krautwald, S. An improved method for the analysis of 2-aminoacetophenone in wine based on headspace solid-phase microextraction and heart-cut multidimensional gas chromatography with selective detection by tandem mass spectrometry Journal of Chromatography A, Volume 1477, 64-69 (2016)
- (12) Sick, T. J., J. A. Albin, L. A. Sather and R. C. Lindsey J. Dairy Sci., 54, 1 (1971)
- (13) Siek, T. J., I.A. Albin, L. A. Sather and R. C. Lindsay, J. Food Sci., 34, 265 (1969)
- (14) Takeoka, G. R., R. A. Flath, T. R. Mon, R. Teranishi and M. Guentert, J. Agric. Food Chem., 38, 471-477 (1990)

- (15) Takeoka, G., R. G. Buttery, R. A. Flath, R. Teranishi, E. L. Wheeler, R. L. Wieczorek & M. Guentert, "Volatile Constituents of Pineapple" in Flavor Chemistry: Trends and Developments, ACS Symp. Series 388, R. Teranishi R. G. Buttery and F. Shahidi editors , ACS, Washington DC, pp. 221 237 (1989)
- (16) Takeshi Yamamoto, Miharuru Ogura, Akira Amano, Kenichiro Adachi, Toshimitsu Hagiwara and Tsuneyoshi Kanisawa, Synthesis and odor of optically active 2-n-hexyl- and 2-n-heptylcyclopentanone and the corresponding delta-lactones, Tetrahedron Letters 43, 9081–9084. (2002)

8 Danksagung

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Forschungsarbeit sei folgenden Personen und Firmen gedankt: Sandra Klink, Anette Schormann und allen Mitgliedern des Prüferpanels bei der Durchführung der Sensorik, Joachim Schwab für diverse Transportdienste, den Firmen Sektkellerei Groß-Winternheim GmbH, Henkell & Co Sektkellereien KG, Sektkellerei Hans Sartor GmbH & Co KG, Rotkäppchen Sektkellerei GmbH und Symrise AG sowie dem Verband der Deutschen Sektkellereien.

Besonderer Dank gilt dem BMEL und der BLE für die Finanzierung des vorliegenden Forschungsprojektes und die stets verständnisvolle und fachliche Begleitung.