

Sesquiterpenanalytik in Weinbeeren und Weinen mittels GC×GC–TOF–MS

Kumulative Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Philipp Peter Könen

aus

Wittlich

Bonn 2021

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Promotionskommission:

Erstgutachter:	Prof. Dr. Matthias Wüst
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Andreas Schieber
Fachnahes Mitglied:	Prof. Dr. Gabriele Maria König
Fachfremdes Mitglied:	Prof. Dr. Jürgen Bajorath

Tag der Promotion: 30. November 2021

Erscheinungsjahr: 2022

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 17.10.2017 bis zum 31.12.2020 am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (IEL) der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Matthias Wüst angefertigt.

Meinen Eltern – Margareta und Peter.

Zusammenfassung

Sesquiterpene sind chemische Verbindungen, die aus drei Isopren-Einheiten bestehen und zur größten und strukturell vielfältigsten Klasse von Naturstoffen, den Terpenen, zählen.

In Weinbeeren (*Vitis vinifera* L.) kommen Sesquiterpene sowohl in freier, als auch gebundener Form vor. Die freie Fraktion besteht hauptsächlich aus Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen, die in der epikutikularen Wachsschicht des Weinbeeren-Exokarps akkumuliert sind. Die gebundene Fraktion besteht hingegen aus glykosidisch verknüpften Sesquiterpen-Alkoholen, die enzymatisch oder säurekatalytisch freigesetzt werden können. Ungebunden sind Sesquiterpene potentiell aromaaktive Komponenten der Volatilen-Profile von Weinbeeren und Weinen.

Bisher erfolgte die Analytik von flüchtigen Sesquiterpenen in diesen hochkomplexen Proben fast ausschließlich mittels eindimensionaler Gaschromatographie. In dieser kumulativen Dissertation wurden Sesquiterpene in Weinbeeren und Weinen unter Verwendung der umfassenden zweidimensionalen Gaschromatographie–Flugzeit–Massenspektrometrie analysiert.

In der ersten Studie wurde das komplexe Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff-Profil lesereifer Weinbeeren der terpenreichen Rebsorte Lemberger (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) unter Einsatz der stabilisotopenmarkierten Präkursoren [5,5-²H₂]-1-Desoxy-D-xylulose und [6,6,6-²H₃]-(\pm)-Mevalonolacton untersucht. Es konnten insgesamt 25 verschiedene Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe aus dem Weinbeeren-Exokarp eindeutig identifiziert und für den Großteil dieser Analyten mögliche Bildungsmechanismen via Carbokationen und Germacren-Intermediaten postuliert werden.

Im zweiten Beitrag wurde anhand von Markierungs- und Fermentationsexperimenten gezeigt, dass das Sesquiterpen-Profil während der Weinbereitung durch säurekatalytische Umwandlung der hefestämmigen Sesquiterpen-Alkohole Farnesol und Nerolidol signifikant verändert werden kann. Dennoch konnten mit δ -Selinen, Selina-3,7(11)-dien und Guaiazulen drei Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe als potentielle Markersubstanzen der Rebsorte Lemberger in Modellweinen bestimmt und anschließend in authentischen, sortenreinen Lemberger-Rotweinen verschiedener Jahrgänge nachgewiesen werden.

In der dritten Studie wurden Hydrolysate aus Weinbeeren-Exokarp der Rebsorte Gewürztraminer (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) umfassend analysiert, wobei gezeigt werden konnte, dass Sesquiterpen-Aglykone verglichen mit traubeneigenen Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen oder Monoterpen-Aglykonen strukturell weniger vielfältig sind. Neben 21 Monoterpenolen, die über 96 % aller gefundenen Terpen-Aglykone ausmachten, konnten lediglich die Sesquiterpen-Alkohole Drimenol, Farnesol und (*E*)-Nerolidol nachgewiesen werden. Trotz der wenigen unterschiedlichen Sesquiterpenole ist auch diese Fraktion aufgrund der möglichen säurekatalytischen Umwandlung ein Pool an potentiell aromaaktiven Verbindungen.

Summary

Sesquiterpenes are chemical compounds consisting of three isoprene units and belong to the largest and most structurally diverse class of natural products, the terpenes.

In grapes (*Vitis vinifera* L.), sesquiterpenes occur in both, free and bound forms. The free fraction consists mainly of sesquiterpene hydrocarbons accumulated in the epicuticular wax layer of the grape berry exocarp. The bound fraction, on the other hand, consists of glycosidically linked sesquiterpene alcohols, which can be released by enzymatic or acidic cleavage. Unbound, sesquiterpenes are potentially aroma-active components of the volatile profiles of grapes and wines.

The analysis of volatile sesquiterpenes in these highly complex samples has been carried out almost exclusively by means of one-dimensional gas chromatography. In this cumulative dissertation, sesquiterpenes in grapes and wines were analyzed using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight–mass spectrometry.

In the first study, the complex sesquiterpene hydrocarbon profile of ripe grapes of the terpene-rich grape variety Lemberger (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) was investigated using the stable isotope-labeled precursors [5,5-²H₂]-1-deoxy-D-xylulose and [6,6,6-²H₃]-(\pm)-mevalonolactone. A total of 25 different sesquiterpene hydrocarbons from the grape berry exocarp were unambiguously identified and possible biosynthetic pathways via carbo cations and germacrene intermediates were postulated for the majority of these analytes.

In the second project, labeling and fermentation experiments demonstrated that the sesquiterpene profile can be significantly altered during winemaking by acid-catalyzed conversion of the yeast-derived sesquiterpene alcohols farnesol and nerolidol. Nevertheless, three sesquiterpene hydrocarbons, δ -selinene, selina-3,7(11)-diene, and guaiazulene, were determined as potential marker compounds of the Lemberger variety in model wines and subsequently detected in authentic, monovarietal Lemberger red wines of different vintages.

In the third study, hydrolysates from grape berry exocarp of the Gewürztraminer variety (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) were extensively analyzed, showing that sesquiterpene aglycones are structurally less diverse compared to grape-derived sesquiterpene hydrocarbons or monoterpene aglycones. In addition to 21 monoterpenols, which accounted for more than 96% of all terpene aglycones found, only the sesquiterpene alcohols drimenol, farnesol and (*E*)-nerolidol were detected. Despite the few different sesquiterpenols, this fraction is also a pool of potentially aroma-active compounds due to the possible acid-catalyzed conversions.

Abkürzungsverzeichnis

[M] ⁺	<i>fragment ion</i> (Fragment-Ion, kationisch)
[M] ^{+•}	<i>molecular ion</i> (Molekül-Ion, radikal-kationisch)
¹ D/1D	erste Dimension
¹ t _R	Retentionszeit des Analyten auf der primären Kapillartrennsäule
² D/2D	zweite Dimension
² t _R	Retentionszeit des Analyten auf der sekundären Kapillartrennsäule
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
BL	Basel-Landschaft
BW	Baden-Württemberg
BY	<i>Bavaria</i> (Bayern)
CA	<i>California</i> (Kalifornien)
CAR	carboxen
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CoA	<i>coenzyme A</i> (Coenzym A)
CTP	Cytidintri-phosphat
CYPs	Cytochrome P450
<i>d</i> ² H/D	<i>deuterium</i> (Deuterium)
<i>d</i> ₀	genuiner (unmarkierter) Analyt
dbc	<i>dynamic background compensation</i> (dynamische Hintergrundbereinigung)
<i>d</i> _f	<i>film thickness</i> (Filmdicke)
DFG	<i>German Research Foundation</i> (Deutsche Forschungsgemeinschaft)
DMAPP	<i>dimethylallyl pyrophosphate</i> (Dimethylallylpyrophosphat)
<i>d</i> _{max}	maximal deuteriertes Isotopolog
DOX	<i>1-deoxy-D-xylulose</i> (1-Desoxy-D-xylulose)
DOXP	<i>1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate</i> (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat)

DVB	<i>divinylbenzene</i> (Divinylbenzol)
EI	<i>electron impact ionization</i> (Elektronenstoßionisation)
EIC	<i>extracted ion chromatogram</i> (extrahiertes Ionenchromatogramm)
Fd	Ferredoxin
FPP	<i>farnesyl pyrophosphate</i> (Farnesylpyrophosphat)
G3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GC	<i>gas chromatography</i> (Gaschromatographie)
GC×GC	<i>comprehensive two-dimensional gas chromatography</i> (umfassende zweidimensionale Gaschromatographie)
GC–MS	Gaschromatographie–Massenspektrometrie-Kopplung
GC–MS/O	Gaschromatographie–Massenspektrometrie/Olfaktometrie
GFPP	Geranylfarnesylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPP	Geranylpyrophosphat
GTs	Glykosyltransferasen
HE	<i>Hesse</i> (Hessen)
HMB-PP	(<i>E</i>)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HS	<i>headspace</i> (Kopfraum)
<i>I</i> , <i>ri</i> , <i>RI</i>	<i>retention index</i> (Retentionsindex)
<i>i.d.</i>	<i>internal diameter</i> (Innendurchmesser)
<i>Inc.</i>	<i>Incorporated</i>
INRES	<i>Institute of Crop Science and Resource Conservation</i> (Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz)
IPP	<i>isopentenyl pyrophosphate</i> (Isopentenylpyrophosphat)
IspC	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase
IspE	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase

IspF	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat-Synthase
IspG	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphat-Synthase
IspH	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphat-Reduktase
IT	<i>Italy</i> (Italien)
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
L.	Carl von Linné
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
lit.	<i>literature</i> (Literatur)
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
M	molar
MA	Massachusetts
Malinv.	Louis Jules Ernest Malinvaud
MD	Maryland
ME	2C-Methyl-D-erythritol
MEcPP	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat
MEP	<i>2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate</i> (2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat)
MF	<i>match factor</i>
MI	<i>Metropolitan City of Milan</i> (Mailand) oder Michigan
MO	Missouri
MS	<i>mass spectrometry, mass spectra</i> (Massenspektrometrie; Massenspektren)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MVA	<i>mevalonic acid</i> (Mevalonsäure)
MVL	<i>mevalonolactone</i> (Mevalonolacton)
n.a.	<i>not available</i> (nicht verfügbar)
n.d.	<i>not detected</i> (nicht detektiert)
NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Hydrid
NI	<i>Lower Saxony</i> (Niedersachsen)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Nationales Institut für Standards und Technologie)

NPP	<i>nerolidyl pyrophosphate</i> (Nerolidylpyrophosphat)
NW	<i>North Rhine-Westphalia</i> (Nordrhein-Westfalen)
PA	Pennsylvania
PDMS	<i>polydimethylsiloxane</i> (Polydimethylsiloxan)
P _i	<i>inorganic phosphate</i> (anorganisches Phosphat)
PP _i	<i>inorganic pyrophosphate</i> (anorganisches Pyrophosphat)
PTs	Prenyltransferasen
q	<i>quadrupole</i> (Quadrupol)
RCT	Rhondda Cynon Taf
RMF	<i>reverse match factor</i>
RP	<i>Rhineland-Palatinate</i> (Rheinland-Pfalz)
rt	<i>room temperature</i> (Raumtemperatur)
s.n.c.	<i>società in nome collettivo</i> (offene Handelsgesellschaft)
SIDA	<i>stable isotope dilution assay</i> (Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse)
SPE	<i>solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
SPME	<i>solid phase microextraction</i> (Festphasenmikroextraktion)
std	<i>standard compound</i> (Standardverbindung)
subsp.	<i>subspecies</i> (Unterart)
TCs	Terpencyclasen
TIC	<i>total ion chromatogram</i> (Totalionenchromatogramm)
TOF–MS	<i>time-of-flight–mass spectrometer</i> (Flugzeit–Massenspektrometer)
TPP	Thiaminpyrophosphat
t _R	<i>retention time</i> (Retentionszeit)
TSs	Terpensynthesen
TX	Texas
U.S.A./USA	<i>United States of America</i> (Vereinigte Staaten von Amerika)
UDP	Uridindiphosphat
UHPLC	<i>ultra-high-performance liquid chromatography</i> (Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie)
UK	<i>United Kingdom</i> (Vereinigtes Königreich)

UV *ultraviolet* (Ultraviolett(strahlung))
var. *varietas* (Varietät)

Einheitenverzeichnis

% vol	Volumenprozent
%, v/v	% <i>volume per volume</i>
°Bx	Grad Brix
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
amu	<i>atomic mass unit</i> (atomare Masseneinheit)
cm	Zentimeter
d	Tag(e)
eV	Elektronenvolt
<i>g</i>	<i>g-force</i> (<i>g-Kraft</i>)
g	Gramm
Ga	Gauge
h	Stunde(n)
Hz	Hertz
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
L	Liter
m	Meter
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde(n)
ng	Nanogramm
ppb	parts per billion (µg/kg)
psi	<i>pound-force per square inch</i> (Pfund-Kraft pro Quadratzoll)

rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde(n)
V	Volt

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturvielfalt der Terpene – ausgewählte Beispiele.	14
Abb. 2: Der MVA-Weg zur Bildung der Terpen-Bausteine IPP und DMAPP.	16
Abb. 3: Der DOXP/MEP-Weg zur Bildung der Terpen-Bausteine IPP und DMAPP.	17
Abb. 4: Schema zur Biosynthese von Terpenen aus IPP und DMAPP.	18
Abb. 5: Strukturformeln des Sesquiterpens (-)-Rotundon und Derivate.	20
Abb. 6: Bisher in <i>V. vinifera</i> L. gefundene Sesquiterpene.	23
Abb. 7: Schematische Darstellung eines Kryodüsen-basierten GCxGC-Modulators.	24
Abb. 8: Schematischer Aufbau eines GCxGC–TOF–MS-Systems.	25
Abb. 9: Markierungsexperimente zur Analyse von Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen.	31
Abb. 10: Bildung markierter Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe nach d_3 -MVL-Applikation.	32
Abb. 11: Potentielle Markersubstanzen sortenreiner Lemberger-Weine.	63
Abb. 12: Strukturformeln bedeutender Monoterpen-Aglykone.	94
Abb. 13: Strukturformeln der nachgewiesenen Sesquiterpen-Aglykone.	95

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Einheitenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
1 Einleitung – Theoretische Grundlagen und Stand der Forschung	13
1.1 Naturstoffklasse der Terpene – Strukturvielfalt und Biosynthese	13
1.1.1 Einteilung der Terpene und ausgewählte Beispiele	13
1.1.2 Mevalonat-abhängiger Biosyntheseweg (MVA-Weg).....	15
1.1.3 Mevalonat-unabhängiger Biosyntheseweg (DOXP/MEP-Weg).....	16
1.1.4 Terpenbiosynthese aus IPP und DMAPP	18
1.2 Sesquiterpenanalytik in Weinbeeren und Weinen – Forschungsstand	19
1.3 Umfassende zweidimensionale Gaschromatographie–Flugzeit–Massenspektrometrie (GCxGC–TOF–MS).....	24
1.4 Zielsetzung der Arbeit	26
1.5 Strategie der Arbeit	26
2 Kumulativer Teil der Dissertation	28
2.1 Kapitel I: Identifizierung und Biosynthese strukturell komplexer Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe in Weinbeeren-Exokarp.....	29
2.1.1 Einführung	30
2.1.2 Zusammenfassung	31
2.1.3 Publikation: <i>Beilstein J. Org. Chem.</i> (2019)	33
2.1.4 Supporting Information: <i>Beilstein J. Org. Chem.</i> (2019).....	51
2.2 Kapitel II: Untersuchung des Einflusses der Weinhefe auf das Sesquiterpen-Profil während der Vinifikation und Ermittlung potentieller Markersubstanzen.....	60
2.2.1 Einführung	61
2.2.2 Zusammenfassung	62
2.2.3 Publikation: <i>J. Agric. Food Chem.</i> (2020)	64
2.2.4 Supporting Information: <i>J. Agric. Food Chem.</i> (2020).....	71

2.3 Kapitel III: Analyse hydrolytisch freigesetzter Monoterpen- und Sesquiterpen-Aglykone aus dem Weinbeeren-Exokarp	92
2.3.1 Einführung	93
2.3.2 Zusammenfassung	94
2.3.3 Publikation: <i>Eur. Food Res. Technol.</i> (2021)	96
3 Gesamtfazit und Ausblick	105
Literatur	110
Publikationsliste	125
Danksagung	127

1 Einleitung – Theoretische Grundlagen und Stand der Forschung

In diesem Teil der Dissertation wird zunächst die Naturstoffklasse der Terpene anhand ausgewählter Verbindungen vorgestellt und die Terpenbiosynthese beschrieben. Im Anschluss wird ein Überblick über den aktuellen Forschungsstand zu Sesquiterpenen in Weinbeeren (*Vitis vinifera* L.) und Weinen gegeben sowie die theoretischen Grundlagen der in dieser Arbeit eingesetzten Analysemethoden vermittelt. Abschließend werden die Zielsetzung und die Strategie der vorliegenden Dissertation formuliert.

1.1 Naturstoffklasse der Terpene – Strukturvielfalt und Biosynthese

1.1.1 Einteilung der Terpene und ausgewählte Beispiele

Terpene, auch Terpenoide oder Isoprenoide genannt,¹ repräsentieren mit mehr als 80.000 identifizierten Verbindungen die größte und strukturell vielfältigste Klasse von Naturstoffen.^[2] Ihr Vorkommen umfasst Organismen aus allen Reichen des Lebens,^[3] insbesondere Pflanzen,^[4,5] Bakterien^[6,7] und Pilze.^[8,9]

Bereits vor über 130 Jahren erkannte der deutsche Chemiker Otto Wallach, dass Terpene formal Oligomere des Isoprens (2-Methyl-1,3-butadien, **1**) darstellen und wurde damit zum Pionier der Terpenchemie.^[10] 1953 setzte Leopold Ružička durch die Formulierung der biogenetischen Isoprenregel, die maßgeblich zum Verständnis der Struktur von Terpenen beitrug, einen weiteren Meilenstein in der Terpenforschung.^[11] Nach Anzahl der enthaltenen Isopreneinheiten wird zwischen Hemi- (C₅), Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Sester- (C₂₅), Tri- (C₃₀), Tetra- (C₄₀) und Polyterpenen ((C₅)_n mit n>8) unterschieden.^[12] Die strukturelle Vielfalt dieser Naturstoffe wird in Abbildung 1 anhand ausgewählter Beispiele veranschaulicht.

Hemiterpene, zu denen Alkohole wie Prenol (3-Methyl-2-buten-1-ol, **2**) aber auch kurzkettige Carbonsäuren zählen,^[12] sind in ihrer Strukturvielfalt aufgrund nur einer Isopreneinheit im Vergleich zu anderen Terpenen stark begrenzt und in der Natur häufig in glykosidischer Form vorhanden.^[13] Strukturell vielfältiger sind die acyclischen und cyclischen Monoterpene, die gewöhnlich frei vorkommen, aber auch gebunden vorliegen können.^[14] Zahlreiche dieser Substanzen sind zudem bioaktiv^[15] und wesentliche Bestandteile ätherischer Öle.^[16] Als prominentes Beispiel ist der monocyclische Alkohol (-)-Menthol (**3**) zu nennen, der insbesondere in den ätherischen Ölen der Japanischen Minze (*Mentha arvensis* var. *piperascens* Malinv.) und der Pfefferminze (*Mentha × piperita* L.) zu finden ist.^[17] In Lebensmitteln, Kosmetika und

¹ Die häufig synonym verwendeten Begriffe Terpene, Terpenoide und Isoprenoide sind aus chemischer Sicht voneinander abzugrenzen. Während Terpene im engeren Sinne reine Kohlenwasserstoffe darstellen, enthalten Terpenoide funktionelle Gruppen. Verbindungen, die sich formal von Isopren (2-Methyl-1,3-butadien) ableiten lassen, werden als Isoprenoide bezeichnet.^[1] In dieser Arbeit werden Terpene und Terpenoide zur besseren Leserlichkeit unter dem Begriff Terpene zusammengefasst und je nach Kontext eindeutig als Kohlenwasserstoffe, Alkohole etc. bezeichnet.

pharmazeutischen Produkten wird (-)-Menthol wegen seines typischen Minzgeruchs- und -geschmacks und unter anderem wegen seines kühlend-anästhetischen Effekts eingesetzt.^[18]

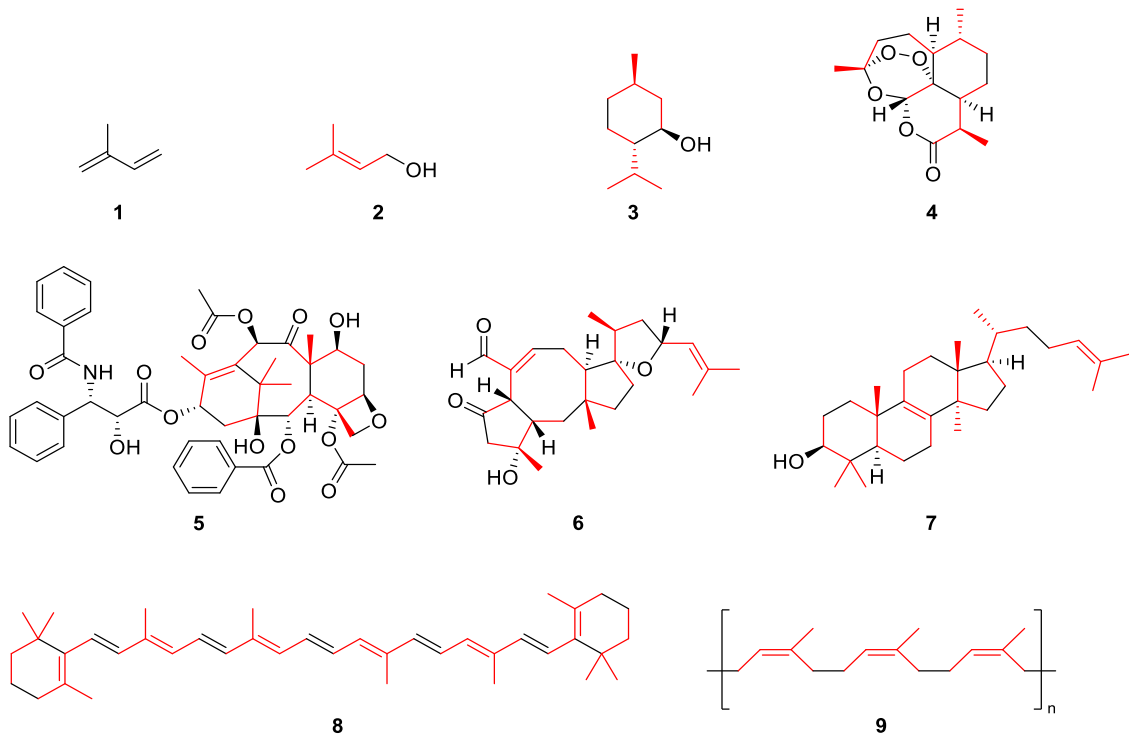


Abb. 1: Strukturvielfalt der Terpene – ausgewählte Beispiele.

Isopren (1), Prenol (2), (-)-Menthol (3), Artemisinin (4), Paclitaxel (5), Ophiobolin A (6), Lanosterol (7), β -Carotin (8), Naturkautschuk (9). Die in den gezeigten Strukturen enthaltenen Isopreneinheiten sind rot hervorgehoben.

Sesquiterpene zeichnen sich durch eine enorme Diversität aus, die sich zum einen in den über 120 bekannten C_{15} -Skelettstrukturen widerspiegelt,^[19] zum anderen aber vor allem auf stereochemischer Ebene sichtbar wird.^[20] Ein aus medizinischer Sicht sehr bedeutsames Sesquiterpen ist das strukturell komplexe Artemisinin (4), das neben sieben Stereozentren eine Peroxidgruppe in einem Trioxanring aufweist. Diese Verbindung, die natürlich im einjährigen Beifuß (*Artemisia annua* L.) vorkommt,^[21,22] ist gegen den von *Anopheles*-Mücken übertragenen Malaria Parasiten *Plasmodium falciparum* hochwirksam und wird deshalb als Anti-Malaria-Medikament eingesetzt.^[23,24] Die meist polycyclischen Diterpene bestehen aus vier Isopreneinheiten und somit aus 20 Kohlenstoffatomen.^[25] Stellvertretend für die Diterpene kann der tricyclische Naturstoff Paclitaxel (5) angeführt werden. 1971 wurde dieses lipophile Molekül erstmals aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert^[26] und findet heute Anwendung als Medikament zur Behandlung verschiedener Krebsarten.^[27] Verglichen mit Mono-, Sesqui- und Diterpenen stellen die aus fünf Isopreneinheiten aufgebauten Sesterterpene eine relativ kleine, wenn auch weit verbreitete Gruppe dar.^[28] Das erste identifizierte Sesterterpen ist das Phytotoxin Ophiobolin A (6), welches erstmals 1957 aus dem Pilz *Helminthosporium oryzae* und

wenig später aus weiteren phytopathogenen Pilzarten isoliert wurde.^[29] Triterpene bestehen aus sechs Isopreneinheiten und sind häufig tetra- oder pentacyclische Moleküle.^[30,31] Ein sehr bekanntes Triterpen ist das Lanosterol (**7**), das sowohl ein zentrales Zwischenprodukt der Cholesterol-, als auch der Ergosterol-Biosynthese darstellt.^[32,33] Verbindungen, denen acht Isopreneinheiten zugrunde liegen, werden als Tetraterpene bezeichnet.^[34] Repräsentativ ist β -Carotin (**8**) anzuführen, das beispielsweise in Karotten (*Daucus carota* subsp. *sativus*) enthalten ist und als Lebensmittelfarbstoff eingesetzt wird.^[35] Terpene die mehr als acht Isopreneinheiten enthalten werden als Polyterpene bezeichnet.^[12] Naturkautschuk (**9**), der hauptsächlich aus dem Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*) gewonnen wird und zu über 90 % aus *cis*-1,4-verknüpften Isopreneinheiten besteht, ist den Polyterpenen zuzuordnen.^[36,37]

1.1.2 Mevalonat-abhängiger Biosyntheseweg (MVA-Weg)

Die Biosynthese der Terpene erfolgt nicht aus Isopren selbst, sondern aus den monomeren C₅-Grundbausteinen Isopentenylpyrophosphat (IPP, **10**) auch als „aktiviertes Isopren“ bezeichnet, sowie dessen Doppelbindungsisomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, **11**).^[38,39] IPP und DMAPP können über zwei Stoffwechselwege gebildet werden, über den im Cytosol lokalisierten, Mevalonat-abhängigen Biosyntheseweg (MVA) und über den in Plastiden lokalisierten, Mevalonat-unabhängigen 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat/2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Weg (DOXP/MEP).^[40]

Der in Abbildung 2 dargestellte MVA-Weg wurde in den späten 1950er und den 1960er Jahren maßgeblich von Lynen und Bloch beschrieben.^[41–44] Im ersten Schritt des cytosolischen MVA-Wegs reagieren zwei Äquivalente Acetyl-CoA (**12**), auch als „aktivierte Essigsäure“ bekannt,^[45] in einer biologischen Claisen-Kondensation, katalysiert durch eine Thiolase (*E1*), zu Acetoacetyl-CoA (**13**).^[46] Die anschließende biologische Aldol-Reaktion mit einem dritten Äquivalent Acetyl-CoA führt unter Beteiligung des Enzyms HMG-CoA-Synthase (*E2*) zur Bildung von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA, **14**).^[47] Die Reduktion des gebildeten Stoffwechselintermediats erfolgt durch die HMG-CoA-Reduktase (*E3*) unter Verbrauch zweier Äquivalente NADPH und resultiert in der Bildung des Intermediats Mevalonat (**15**), das namensgebend für den Stoffwechselweg ist.^[48] Es folgen zwei von Kinasen (*E4*, *E5*) vermittelte Phosphorylierungsreaktionen unter ATP-Verbrauch, wobei erst 5-Phosphomevalonat (**16**) entsteht^[49] und dieses im Anschluss zu 5-Pyrophosphomevalonat (**17**) umgesetzt wird.^[50,51] Unter Verbrauch eines weiteren Äquivalents ATP folgt die Decarboxylierung von **17** mit Hilfe der Mevalonat-5-pyrophosphat-Decarboxylase (*E6*) zu IPP (**10**),^[52] welches durch die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (*E7*) in DMAPP (**11**) überführt werden kann.^[38]

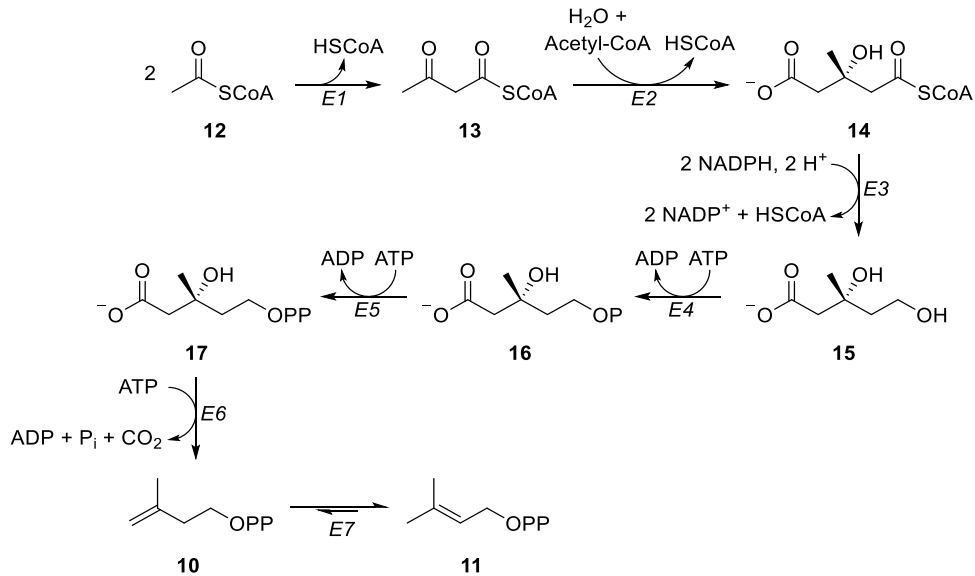


Abb. 2: Der MVA-Weg zur Bildung der Terpen-Bausteine IPP und DMAPP.

Acetyl-CoA (**12**), Acetoacetyl-CoA (**13**), 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA, **14**), Mevalonat (**15**), 5-Phosphomevalonat (**16**), 5-Pyrophosphomevalonat (**17**), Isopentenylpyrophosphat (IPP, **10**), Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, **11**), *E1*: Acetoacetyl-CoA-Thiolase, *E2*: HMG-CoA-Synthase, *E3*: HMG-CoA-Reduktase, *E4*: Mevalonat-Kinase, *E5*: Phosphomevalonat-Kinase, *E6*: Mevalonat-5-pyrophosphat-Decarboxylase, *E7*: Isopentenylpyrophosphat-Isomerase.

1.1.3 Mevalonat-unabhängiger Biosyntheseweg (DOXP/MEP-Weg)

In den 1990er Jahren wurde ein zweiter Biosyntheseweg zur Bildung von IPP (**10**) und DMAPP (**11**) entdeckt, der in Abbildung 3 dargestellt ist.^[53–55] Dieser plastidiäre DOXP/MEP-Weg startet im Gegensatz zum MVA-Weg mit den Molekülen Pyruvat (**18**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P, **19**).^[56] Im ersten Reaktionsschritt, katalysiert vom Enzym DOXP-Synthase (*E8*), wird Pyruvat zunächst durch den Kofaktor Thiaminpyrophosphat (TPP) aktiviert und nach Decarboxylierung mit G3P zum Stoffwechselintermediat 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP, **20**) umgesetzt.^[57,58] DOXP wird anschließend enzymatisch durch die DOXP-Reduktoisomerase (IspC, *E9*) in einen Aldehyden isomerisiert und dieser unter Verbrauch eines Äquivalenten NADPH zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP, **21**) reduziert.^[59–61] Das Enzym CDP-ME-Synthase (IspD, *E10*) katalysiert die darauffolgende Reaktion von MEP mit Cytidintriphosphat (CTP), wobei Pyrophosphat (PP_i) abgespalten und 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME, **22**) gebildet wird.^[62,63] Unter ATP-Verbrauch und Beteiligung der CDP-ME-Kinase (IspE, *E11*) erfolgt die Phosphorylierung zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-MEP, **23**),^[64–66] das anschließend mittels MEcPP-Synthase (IspF, *E12*) unter Eliminierung von Cytidinmonophosphat (CMP) zu 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat (MEcPP, **24**) cyclisiert.^[67–69] MEcPP wird in der nachfolgenden, von der HMB-PP-Synthase (IspG, *E13*) katalysierten, komplexen Reaktion durch Ferredoxin (Fd) re-

duziert und in (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphat (HMB-PP, **25**) unter Wasserabspaltung umgewandelt.^[70] Im finalen Reaktionsschritt des DOXP/MEP-Wegs erfolgt mit Hilfe des Enzyms HMB-PP-Reduktase (IspH, *E14*) und NAD(P)H die Bildung von IPP (**10**) und DMAPP (**11**) im Verhältnis 5:1.^[71–73]

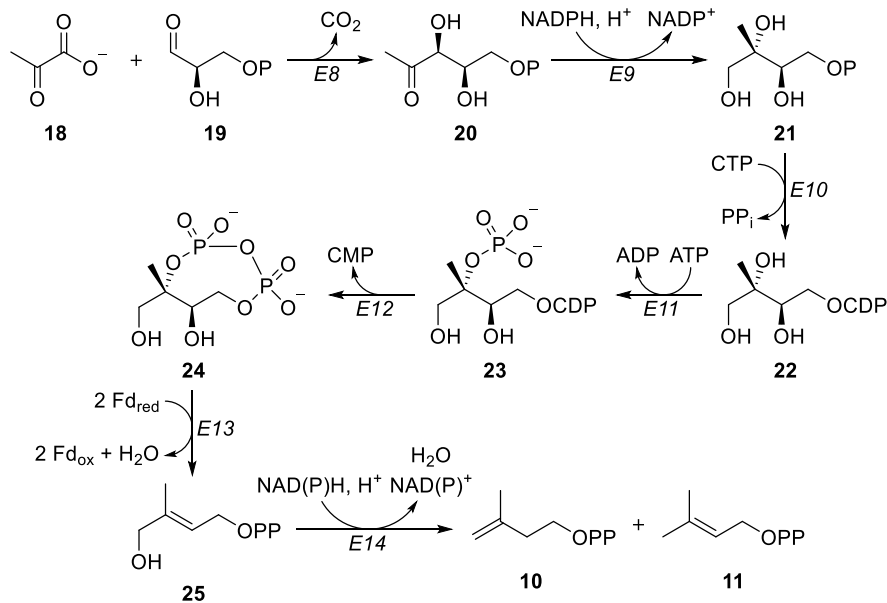


Abb. 3: Der DOXP/MEP-Weg zur Bildung der Terpen-Bausteine IPP und DMAPP.

Pyruvat (**18**), Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P, **19**), 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP, **20**), 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP, **21**), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME, **22**), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-MEP, **23**), 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat (MEcPP, **24**), (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphat (HMB-PP, **25**), Isopentenylpyrophosphat (IPP, **10**), Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, **11**), *E8*: DOXP-Synthase, *E9*: DOXP-Reduktoisomerase (IspC), *E10*: CDP-ME-Synthase (IspD), *E11*: CDP-ME-Kinase (IspE), *E12*: MEcDP-Synthase (IspF), *E13*: HMB-PP-Synthase (IspG), *E14*: HMB-PP-Reduktase (IspH).

In vielen höheren Pflanzen, einschließlich der edlen Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), konnte ein Substrataustausch (metabolischer Crosstalk) zwischen dem cytosolischen MVA-Weg und dem plastidiären DOXP/MEP-Weg nachgewiesen werden, sodass die Trennung beider Stoffwechselwege nicht absolut ist.^[74–76]

1.1.4 Terpenbiosynthese aus IPP und DMAPP

Ausgehend von den beiden aktivierten C₅-Monomeren, IPP (**10**) und DMAPP (**11**), erfolgt die Biosynthese der Terpene nach der biogenetischen Isoprenregel von Ružička.^[11,77] Die sukzessive Anlagerung von IPP-Molekülen an DMAPP durch Prenyltransferasen (PTs) führt zur Bildung strukturell einfacher, acyclischer und achiraler Oligoprenylpyrophosphate mit definierter Kettenlänge, wie in Abbildung 4 veranschaulicht.^[78]

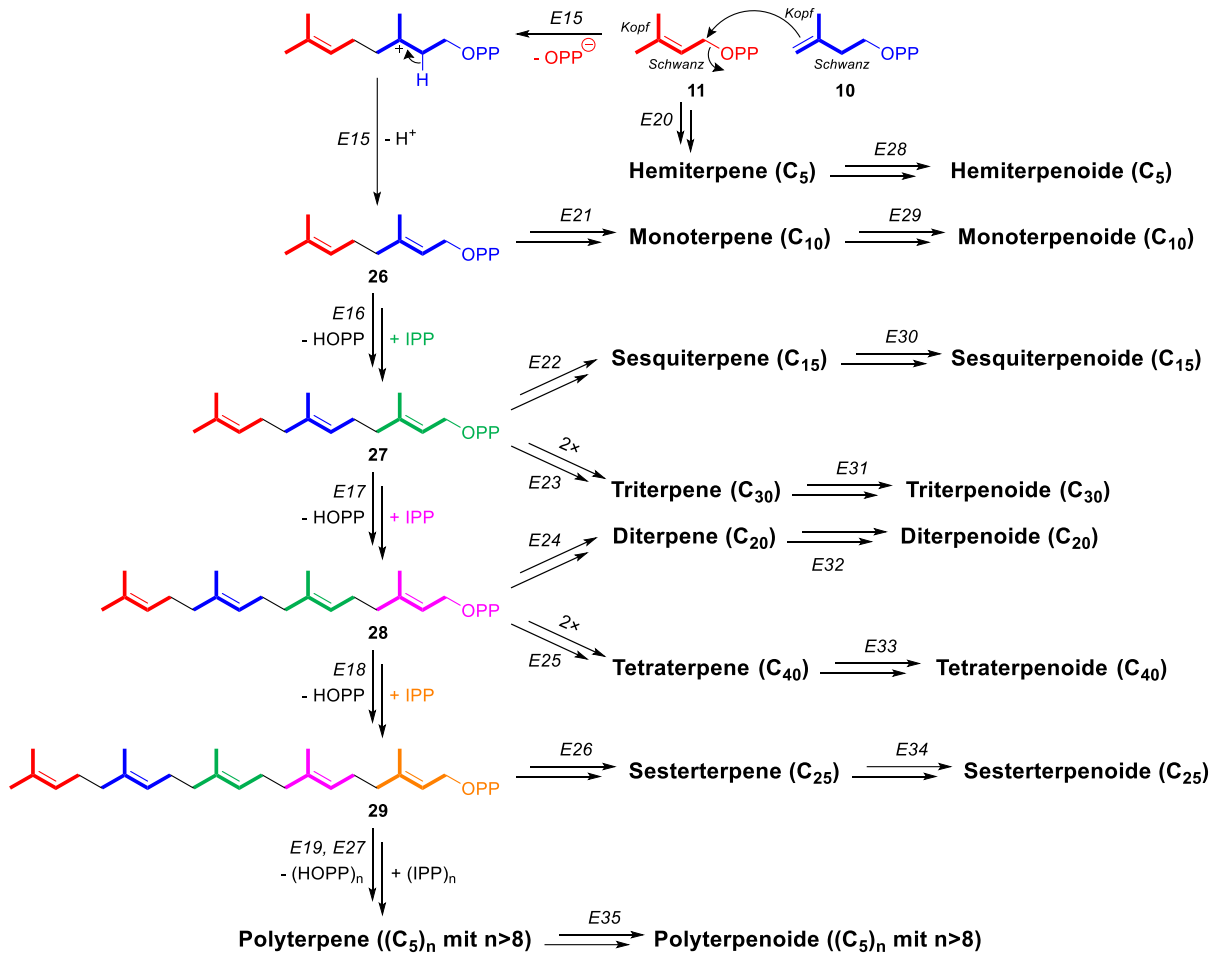


Abb. 4: Schema zur Biosynthese von Terpenen aus IPP und DMAPP.

Isopentenylpyrophosphat (IPP, **10**), Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, **11**), Geranylpyrophosphat (GPP, **26**), Farnesylpyrophosphat (FPP, **27**), Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, **28**), Geranylgeranylgeranylpyrophosphat (GFPP, **29**), E15-E19: Prenyltransferasen (PTs), E20-E27: Terpensynthasen (TSs)/Terpencyclasen (TCs), E28-E35: Modifizierende Enzyme (z.B. Cytochrome P450 (CYPs), Glykosyltransferasen (GTs)).

Der Monoterpenvorläufer Geranylpyrophosphat (GPP, **26**) entsteht durch eine Kopf-zu-Schwanz-Verknüpfung, die aus der Reaktion der nucleophilen Methylen-Gruppe des IPP mit der elektrophilen Allyl-CH₂-Gruppe des DMAPP resultiert. Die Kupplung einer weiteren IPP-Einheit an GPP führt zum Sesquiterpenvorläufer Farnesylpyrophosphat (FPP, **27**). Zwei Äquivalente FPP können durch Schwanz-zu-Schwanz-Verknüpfung zu Squalen, dem einfachsten

Triterpen, umgesetzt werden. Durch Kondensation von IPP und FPP entsteht der Diterpenvorläufer Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, **28**), der analog zur Biosynthese der Triterpene durch Schwanz-zu-Schwanz-Verknüpfung mit einem weiteren Äquivalent GGPP zum einfachsten Tetraterpen Phytoen kondensiert. Eine Kopf-zu-Schwanz-Verknüpfung von IPP mit GGPP führt über Geranylarnesylpyrophosphat (GFPP, **29**) zur Bildung von Sesterterpenen. Polyterpene entstehen durch formale Kondensation von mehr als acht IPP-Einheiten.^[12,79]

Die gebildeten linearen Oligoprenylpyrophosphate (GPP, FPP, GGPP und GFPP) werden anschließend durch Terpensynthasen (TSs) bzw. Terpencyclasen (TCs)² über kationische Intermediate (Carbokationen) zu acyclischen bzw. oft hoch komplexen, (poly)cyclischen und chiralen Terpen-Kohlenwasserstoffen oder -Alkoholen umgesetzt.^[81] Die Bildung der Terpene wird durch Ionisierung der Oligoprenylpyrophosphate eingeleitet, wobei abhängig vom Reaktionsmechanismus zwei Enzymklassen unterschieden werden. Klasse I TCs katalysieren eine metallvermittelte Abspaltung der Pyrophosphatgruppe, wohingegen Klasse II TCs die Protonierung einer olefinischen Doppelbindung oder einer Epoxid-Funktion katalysieren.^[82,2] Das gebildete, hochreaktive Carbokation unterläuft in der anschließenden Reaktionskaskade, je nach Zielverbindung, u.a. Ringschlüsse, Hydrid- oder Protonen-Shifts sowie Wagner-Meerwein-Umlagerungen. Beendet wird die Kaskade häufig durch Deprotonierung, was zu einem Terpen-Kohlenwasserstoff führt oder durch einen nucleophilen Angriff von Wasser, woraus ein Terpen-Alkohol resultiert.^[83] Die gebildeten Terpene können abschließend durch verschiedene Enzyme, wie Cytochrome P450 (CYPs) und Glykosyltransferasen (GTs) modifiziert werden.^[84-87]

1.2 Sesquiterpenanalytik in Weinbeeren und Weinen – Forschungsstand

Das komplexe Aroma von Weinbeeren (*Vitis vinifera* L.) und Weinen wird durch zahlreiche Verbindungen aus unterschiedlichen Stoffklassen, einschließlich den Terpenen beeinflusst.^[88] In Weinen wurden in den letzten 40 Jahren über 1000 flüchtige Verbindungen identifiziert, deren Konzentrationsbereich sich von mehreren hundert mg/L bis hin zu wenigen ng/L erstreckt.^[89] Nicht alle dieser Volatilen tragen maßgeblich zum Aroma eines Weines bei, im Gegenteil – bisher wurden nur etwa 60 flüchtige Verbindungen im Wein als Schlüsselaromen identifiziert, die in Konzentrationen oberhalb ihres Geruchsschwellenwertes vorkommen.^[90,91] Während die zentrale Bedeutung der Monoterpene als Wein-Aromakomponenten in den letzten Jahrzehnten umfassend erforscht wurde,^[92,93] stehen Sesquiterpene seit der Entdeckung des Ketons (–)-Rotundon (**30**) als Schlüsselaromastoff der Rebsorte Syrah³

² Terpenyclasen (TCs) katalysieren die Bildung von (poly)cyclischen Terpenen. Der Begriff Terpensynthasen (TSs) ist umfassender und schließt auch Enzyme mit ein, die Nichtcyclisierungsreaktionen zur Bildung von Terpenen katalysieren.^[2,80]

³ Die Rebsorte Syrah ist auch unter den Bezeichnungen Shiraz oder Hermitage bekannt.^[94]

vermehrt im Interesse der Weinforschung (Abbildung 5). Im Jahr 2008 führten Messungen mittels eindimensionaler Gaschromatographie–Massenspektrometrie/Olfaktometrie (GC–MS/O) zu dem Ergebnis, dass dieses bicyclische Sesquiterpen maßgeblich für das charakteristisch pfeffrige Aroma der Sorte Syrah verantwortlich ist. In einem Sensorikpanel der selben Studie konnte für das aromapotentente (–)-Rotundon ein niedriger Geruchsschwellenwert von 16 ng/L in Rotwein und 8 ng/L in Wasser ermittelt werden, wobei sich etwa 20 % der Panelteilnehmer als geruchsblind erwiesen.^[95] Die Anwendung der Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIDA)–GC–MS mit d_5 -Rotundon (**31**) als internem Standard ermöglichte die Bestimmung der Rotundon-Konzentrationen in Proben der genannten Rebsorte.^[94] In Weinbeeren lag die Konzentration an (–)-Rotundon zwischen 10 – 620 ng/kg und in Weinen im Bereich von 29 – 145 ng/L.^[95] Die Bildung von (–)-Rotundon erfolgt über den Präkursor α -Guaien (**32**) entweder durch Luftoxidation^[96,97] oder biosynthetisch in der Weinbeere mit Hilfe des Enzyms α -Guaien-2-Oxidase (*CYP71BE5*) aus der Cytochrom-P450-Familie.^[98]

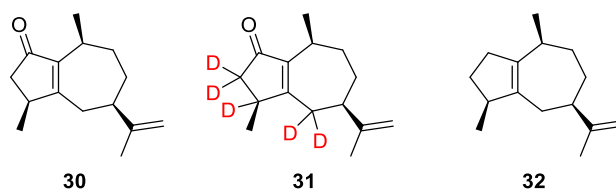


Abb. 5: Strukturformeln des Sesquiterpens (–)-Rotundon und Derivate.

(–)-Rotundon (**30**), d_5 -Rotundon (**31**) und α -Guaien (**32**). Deuteriumatome (D) sind rot hervorgehoben.

Forschung auf dem Gebiet der Sesquiterpene in *V. vinifera* L. wird bereits seit über 50 Jahren betrieben. 1970 wurde erstmals auf die Anwesenheit von Komponenten mit Sesquiterpen-Struktur in der Kohlenwasserstoff-Fraktion des Trauben-Aromas hingewiesen.^[99] Sechs Jahre später erfolgte die erste Identifizierung freier (ungebundener) Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe in Weinbeeren. Schreier, Drawert und Junker konnten mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und GC–MS insgesamt 14 Sesquiterpene in Weinbeeren der weißen Rebsorten Riesling, Traminer, Ruländer, Müller-Thurgau, Scheurebe, Optima und Rieslaner nachweisen, wobei jedoch keine sortenabhängigen Unterschiede festgestellt werden konnten.^[100] Untersuchungen von Versini et al. mittels Festphasenextraktion (SPE) und GC–MS führten zur Identifizierung von Sesquiterpenen in Tresterbränden und Weinbeerenhäuten (Ethanolextrakten) der Rebsorte Gewürztraminer. Neben zwei Isomeren des Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffs α -Farnesen konnten der Sesquiterpen-Alkohol Farnesol sowie der Ester Methylfarnesoat detektiert werden. Die ebenfalls untersuchten Rebsorten Rosenmuskateller, Müller-Thurgau und Gelber Muskateller wiesen dabei deutlich geringere Gehalte der genannten Sesquiterpene auf.^[101]

Die Identifizierung weiterer Sesquiterpene wurde neben der SPE, vor allem durch den Einsatz effizienter und lösungsmittelfreier Mikroextraktionstechniken in non-target Analysen vorangetrieben.^[102,103] Hierzu zählt vor allem die 1990 eingeführte und heute weit verbreitete Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME),^[104] mit deren Hilfe bereits Sesquiterpene aus Weinbeeren,^[105–111] Mosten,^[112,113] Weinen^[114–121] und Likörweinen^[122,113,123] extrahiert werden konnten. Die eindeutige Identifizierung von Sesquiterpenen stellt dabei jedoch ein zentrales Problem dar. Erschwert wird die Substanzidentifizierung aufgrund der oft sehr geringen Konzentrationen, ähnlichen Massenspektren, Peaküberlagerungen (Coelutionen) und begrenzten Verfügbarkeit authentischer Standards.^[124–126] Hinzukommt, dass die in Kapitel 1.1 beschriebenen Stoffwechselwege zur Bildung von IPP und DMAPP sowie die Generierung des Sesquiterpenvorläufers FPP zwar weitgehend erforscht, die eigentlichen mehrstufigen Cyclisierungsmechanismen zur Generierung der Sesquiterpene in *V. vinifera* aber größtenteils unbekannt oder unbestätigt sind. Mangels kommerziell erhältlicher authentischer Standards wird die Identifizierung dieser komplexen Naturstoffe deshalb in der Regel als „vorläufig“ (engl. *tentatively*) beschrieben.^[126,127] Abbildung 6 zeigt die bisher über 100 meist „vorläufig“ identifizierten Sesquiterpene aus Weinbeeren, Trestern, Mosten und Weinen.

Schmarr et al. setzten im Jahr 2010 erstmals die umfassende zweidimensionale Gaschromatographie–Massenspektrometrie (GC×GC–MS) zur Analytik volatiler Verbindungen aus Rotweinen ein. Diese Analysentechnik, deren Vorteile näher in Kapitel 1.3 beschrieben werden, eignet sich aufgrund ihrer hohen Trennleistung besonders zur Identifizierung volatiler Verbindungen aus komplexen Proben, wie Weinbeeren und Weinen.^[118] May et al. demonstrierten im Jahr 2012 durch HS-SPME–GC–MS-Messungen, dass sich die Sesquiterpen-Profile von intakten Weinbeeren im Verlauf der Reife verändern. Während im Allgemeinen der Anteil acyclischer Sesquiterpene mit zunehmender Reife abnimmt, steigt der Anteil cyclischer Sesquiterpene. Abweichend hiervon sind Weinbeeren der Rebsorte Gewürztraminer hervorzuheben, deren Sesquiterpen-Profil zum Zeitpunkt der Reife vor allem durch die acyclischen Sesquiterpene (*E,E*)- α -Farnesen, (3*E*,6*Z*)- α -Farnesen und (*E,E*)-Methylfarnesoat geprägt ist.^[109,125]

In vivo-Markierungsstudien mit Hilfe der deuterierten Präkursoren [5,5-²H₂]-1-Desoxy-D-xylulose und [5,5-²H₂]-Mevalonolacton lieferten 2013 den Nachweis, dass Sesquiterpene sowohl über den cytosolischen MVA-Weg als auch über den plastidiären DOXP/MEP-Weg im Exokarp von Weinbeeren gebildet werden. Die Markierungsdaten wiesen dabei auf einen im Cytosol lokalisierten, homogenen Pool von cytosolischem und plastidiärem IPP/DMAPP für die FPP-Biosynthese hin, der auf die Anwesenheit eines hauptsächlich von den Plastiden zum Cytosol gerichteten Transport von Isoprenoid-Intermediaten schließen lässt.^[110] Die Umwandlung von FPP in Sesquiterpene erfolgt durch die im Cytosol lokalisierten Sesquiterpensynthasen bzw.

-cyclasen, bei denen es sich häufig um Multiproduktenzyme handelt.^[128,129] Die freien, unpolaren Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe werden in der epikutikularen Wachsschicht des Exokarps akkumuliert.^[130] Die polaren Sesquiterpen-Alkohole können hingegen auch glykosidisch gebunden in Weinbeeren vorliegen, wie Botscher et al. erstmals durch den eindeutigen Nachweis von Sesquiterpenglykosiden mittels *in vivo*-Stabilisotopenmarkierung und Flüssigchromatographie–Tandem-Massenspektrometrie (LC–MS/MS) demonstrierten.^[131] Die Freisetzung (Hydrolyse) der gebundenen Alkohole als Aglykone kann sowohl enzymatisch als auch säurekatalytisch während der Weinbereitung erfolgen.^[132] Bisher wurde jedoch weder die strukturelle Vielfalt der Sesquiterpen-Aglykone untersucht, noch wurden anhand der Aglykon-Strukturen mögliche Einflüsse auf das Sesquiterpen-Profil von Weinen abgeleitet.

May gelang der Nachweis, dass lesereife Weinbeeren verschiedener Rebsorten anhand ihrer Sesquiterpen-Profile differenziert werden können. Insbesondere die Rebsorten Cabernet Sauvignon und Gewürztraminer konnten deutlich von anderen untersuchten Sorten abgegrenzt werden, wobei der Gewürztraminer lediglich Überschneidungen mit dem Profil der Siegerrebe, einer Kreuzung aus Gewürztraminer und Madeleine Angevine, aufwies.^[125] Die Möglichkeit reife Weinbeeren anhand ihrer Sesquiterpene unterscheiden zu können führte zu neuen Fragestellungen in der Weinforschung. Ungeklärt ist zum einen, ob das Sesquiterpen-Profil von Weinbeeren während der Weinherstellung (Vinifikation) durch den Stoffwechsel von Weinhefen (*Saccharomyces cerevisiae*) signifikant verändert wird. Bekannt ist bisher, dass die acyclischen Sesquiterpen-Alkohole Nerolidol und Farnesol durch Hefen gebildet werden können.^[133] Die enzymatische Generierung cyclischer Sesquiterpene durch den Hefe-Stoffwechsel ist aufgrund fehlender Terpenocyclasen, wie sie in *V. vinifera* vorkommen,^[134,129] nicht bekannt. Gutsche et al. konnten jedoch durch *in vitro*-Versuche zeigen, dass Farnesol und Nerolidol säurekatalytisch über Carbokationen in Sesquiterpene umgewandelt werden können, weshalb eine mögliche Beeinflussung des Hefe-Stoffwechsels auf das Sesquiterpen-Profil während der Weinbereitung zu untersuchen ist.^[135] Zum anderen ist nicht erforscht, ob im Wein Sesquiterpene nachweisbar sind, die eindeutig dem Stoffwechsel der Weinbeeren entstammen und damit als potentielle Rebsortenmarker die Grundlage für eine sesquiterpenbasierte Rebsortenauthentifizierung von Weinen bilden. Aufgrund der Tatsache, dass bei Weinen das Risiko eines Betrugs (*Food Fraud*) erhöht ist,^[136,137] bedarf es analytischer Methoden, die eine Echtheitsüberprüfung von Weinen anhand sortencharakteristischer Verbindungen ermöglichen.

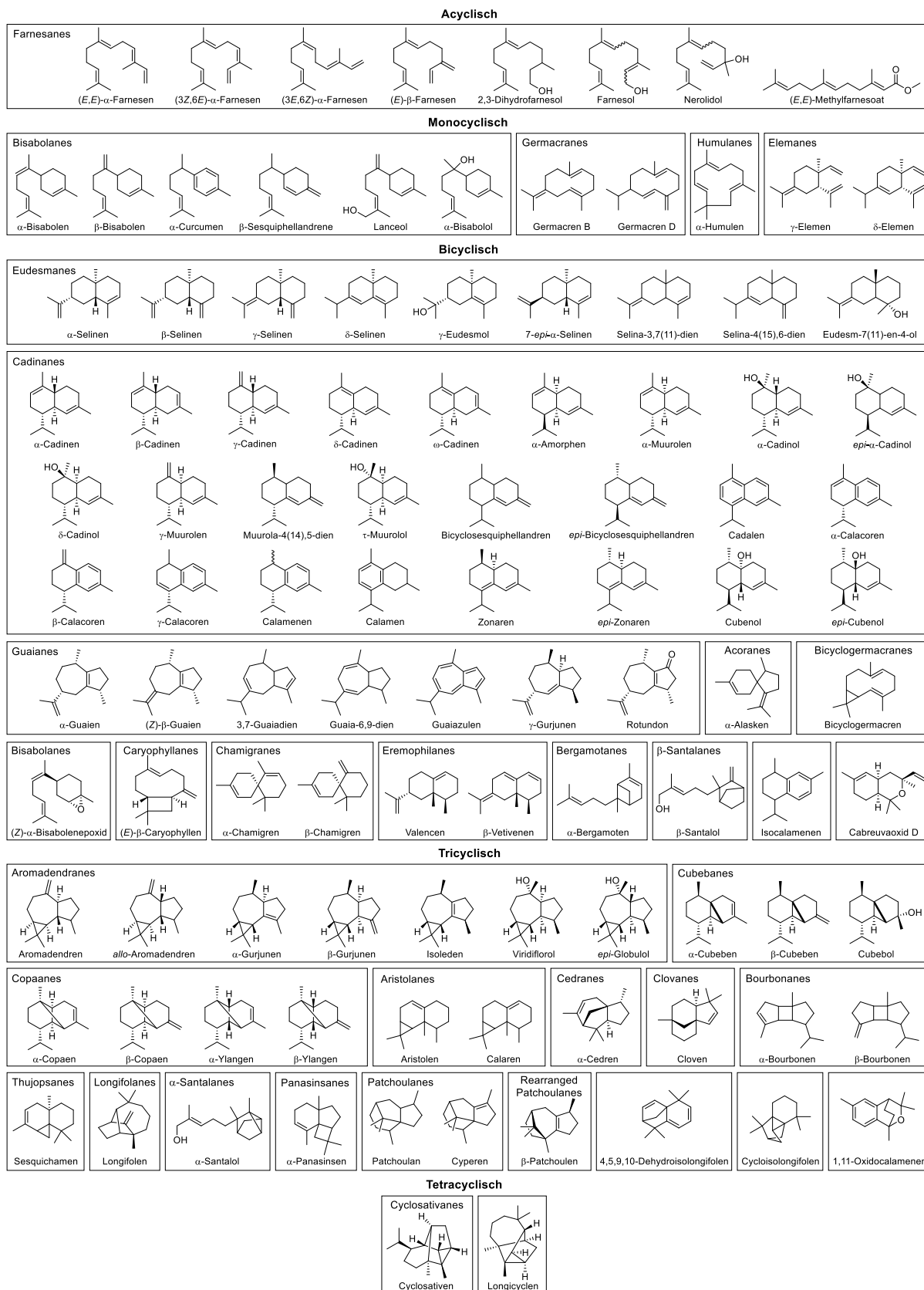


Abb. 6: Bisher in *V. vinifera* L. gefundene Sesquiterpene.^[138,101,125,119,120]

Die Verbindungen sind in a-, mono-, bi-, tri- und tetracyclisch eingeteilt und abhängig von ihrem Skelettstrukturtyp angeordnet.

1.3 Umfassende zweidimensionale Gaschromatographie–Flugzeit–Massenspektrometrie (GC×GC–TOF–MS)

Zur Identifizierung von Naturstoffen aus hochkomplexen Proben wie Weinbeeren (*V. vinifera* L.) und Weinen ist die Trennleistung der konventionellen, eindimensionalen (1D-)GC–MS oft nicht ausreichend. Im Jahr 1984 publizierte Giddings ein Konzept zu potentiellen mehrdimensionalen Trenntechniken, wonach diese aufgrund ihrer hohen Auflösung vielversprechende Methoden zur Analyse hochkomplexer Substanzgemische darstellen.^[139] Sieben Jahre später führten Liu und Phillips die umfassende zweidimensionale Gaschromatographie (GC×GC) als leistungsvolle Trennmethode ein.^[140]

Im Unterschied zur klassischen (1D-)GC werden bei der GC×GC zwei Kapillartrennsäulen komplementärer Selektivität miteinander gekoppelt und die gesamte Probe überläuft zwei stationäre Phasen. Als primäre Kapillartrennsäule (erste Dimension, ¹D) wird in der Regel eine konventionelle Säule (Säulenlänge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm) eingesetzt, die eine klassische 1D-Elution der injizierten Probe ermöglicht. Am Ende der primären Kapillartrennsäule erfolgt anschließend ein Modulationsprozess, der von zentraler Bedeutung für die GC×GC-Technik ist. Die aus der ¹D-Kapillartrennsäule eluierenden Analytbanden werden durch einen Modulator kontinuierlich fraktioniert, fokussiert und anschließend einzeln auf die sekundäre Kapillartrennsäule (zweite Dimension, ²D) weitergeleitet. Diese Modulator-gesteuerte Fokussierung führt zu einer deutlichen Verkleinerung der Signalbreiten woraus schärfere, höhere Signale und damit eine verbesserte Empfindlichkeit resultieren. Die Zeit, die für einen Modulationszyklus erforderlich ist, wird als Modulationsperiode bezeichnet und liegt typischerweise zwischen 2 – 8 s.^[141,142] In der Praxis kann der Modulationsprozess durch verschiedene Typen von pneumatischen (ventilbasierten) und thermischen GC×GC-Modulatoren erreicht werden.^[143] Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Kryodüsen-basierter Modulator, bestehend aus Kühljet und Heißjet, eingesetzt. Der Kühljet nutzt flüssigen Stickstoff zum Akkumulieren bzw. Kryofokussieren der Analyten die aus der ersten Dimension eluieren (Abbildung 7A), während der Heißjet die akkumulierten Fraktionen wenige Sekunden später durch einen heißen Luftpuls auf die zweite Dimension transferiert (Abbildung 7B).

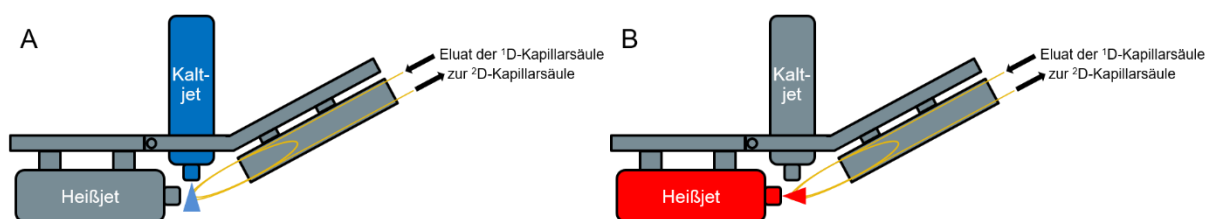


Abb. 7: Schematische Darstellung eines Kryodüsen-basierten GC×GC-Modulators.^[144]

A: Kryofokussierung der Analyten durch den Kühljet. B: Reinjektion der akkumulierten Fraktionen durch den Heißjet.

Die sekundäre Kapillartrennsäule (zweite Dimension, 2D) ist mit 1 – 2 m wesentlich kürzer und weist einen kleineren Innendurchmesser von ca. 0,1 mm, sowie eine geringere Filmdicke von ca. 0,1 μm auf. Diese Maße sind erforderlich, damit der chromatographische Prozess auf der 2D -Kapillartrennsäule möglichst schnell erfolgt und die Signale sehr schmal bleiben. Die zahlreichen Verbindungen, die bei der Analyse hochkomplexer Proben von der zweiten Dimension eluiert werden und die kurzen Signalbreiten erfordern schnell scannende Detektoren mit hoher Datenerfassungsrate. Bewährt haben sich hierbei Flugzeit–Massenspektrometer (TOF–MS) die Akquisitionsraten von 50 Hz und mehr ermöglichen.^[142,141] Die gasförmigen, aus der 2D -Kapillartrennsäule eluierenden Analyten gelangen über eine Transferline in die Ionenquelle des TOF–MS, werden dort ionisiert und durch einen kurzen Spannungsstoß auf eine feldfreie Drift-Stecke beschleunigt. Die Ionen werden durch ihre massenabhängige Flugzeit aufgetrennt.^[145] Unterschiede in der kinetischen Energie zwischen Ionen mit gleichem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) können durch den Einbau eines Reflektors kompensiert werden. Dabei dringen Ionen höherer kinetischer Energie im Vergleich zu langsameren Ionen gleicher Masse tiefer in ein elektrisches Feld ein, wodurch sich der Flugweg dieser Ionen vergrößert und die Geschwindigkeitsunterschiede so ausgeglichen werden können. Im Feldbereich des Reflektors werden die Ionen abgebremst, in ihrer Flugrichtung umgekehrt und schließlich auf einen Detektor reflektiert. Durch den Einsatz des Reflektors und der daraus resultierenden Verdopplung der Flugstrecke wird die Massenauflösung des TOF–MS wesentlich verbessert.^[146–148] Die erhaltenen Messdaten können mittels geeigneter Software unter Berücksichtigung der Modulationsperiode in eine zweidimensionale Darstellung, dem Konturplot, konvertiert werden (Abbildung 8). Dieser gibt die Retentionszeiten der Analyten auf der ersten (1t_R) und zweiten (2t_R) Dimension an.^[142]

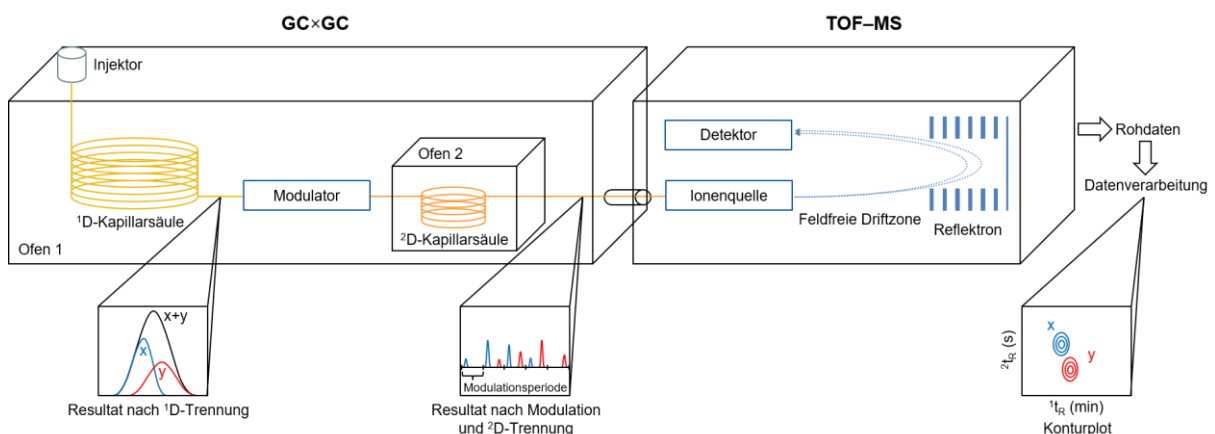


Abb. 8: Schematischer Aufbau eines GCxGC–TOF–MS-Systems.^[149,150]

Verglichen mit der konventionellen (1D-)GC–MS ermöglicht die GCxGC–TOF–MS eine höhere Auflösung der Analyten. Coelutionen (Signalüberlagerungen) werden minimiert, die Selektivität erhöht und die Substanzidentifizierung durch die Gruppierung strukturell ähnlicher

Verbindungen im Konturplot erleichtert. Aufgrund der hohen Trennleistung eignet sich die GC×GC–TOF–MS zur Analytik hochkomplexer Proben und in Kombination mit geeigneten Extraktionstechniken besonders zur Detektion von Verbindungen im Spurenbereich.^[141]

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation ist die umfassende Analytik von Sesquiterpenen in Weinbeeren (*Vitis vinifera* L.) und Weinen mittels mehrdimensionaler Gaschromatographie–Flugzeit–Massenspektrometrie.

Zunächst soll die Bestimmung des Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff-Profiles reifer Weinbeeren am Beispiel der terpenreichen Rebsorte Lemberger (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) erfolgen. Die Bildungsmechanismen der detektierbaren freien Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe sind dabei zu untersuchen und die Substanzen anhand von Markierungsstudien zu verifizieren.

Anschließend soll anhand von Lemberger-Modellweinen erforscht werden, ob Weinhefen (*Saccharomyces cerevisiae*) durch ihren Stoffwechsel das Sesquiterpen-Profil während der Vinifikation signifikant beeinflussen. Sesquiterpene, die sowohl in der reifen Beere als auch im Modellwein nachweisbar und als potentielle rebsortenspezifische Marker geeignet sind, sollen ermittelt werden. Im Anschluss sind authentische, sortenreine Lemberger-Rotweine verschiedener Jahrgänge zu analysieren und die Anwesenheit der traubeneigenen, potentiellen Marker zu überprüfen.

Danach soll durch umfassende Analyse von Weinbeeren-Hydrolysaten der aromatischen Weißweinsorte Gewürztraminer (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) untersucht werden, ob glykosidisch gebundene Sesquiterpene in Weinbeeren vorkommen, die das Sesquiterpen-Profil während der Weinbereitung beeinflussen können. Hierbei ist die strukturelle Diversität glykosylierter Sesquiterpen-Alkohole im Vergleich zur Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff-Fraktion in der Kutikula zu beschreiben und zu prüfen, ob von den nachgewiesenen freien Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen eine verwandte hydroxylierte Struktur in Trauben detektierbar ist. Darüber hinaus soll die Fraktion glykosylierter Sesquiterpenole mit der von Monoterpenolen verglichen werden.

1.5 Strategie der Arbeit

Das Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff-Profil der reifen Weinbeeren wird durch Markierungsexperimente unter Verwendung der stabilisotopenmarkierten Präkursoren [5,5-²H₂]-1-Desoxy-D-xylulose (*d*₂-DOX) und [6,6,6-²H₃]-(\pm)-Mevalonolacton (*d*₃-MVL) eindeutig bestimmt. Als Versuchsmaterial wird isoliertes Weinbeeren-Exokarp verwendet, da ungebundene Sesquiterpene in der epikutikularen Wachsschicht akkumuliert werden^[130] und Mesokarp hinsichtlich Sesquiterpenen keine biosynthetische Aktivität aufweist.^[125] Die Analytik im Spurenbereich

und die Minimierung von Coelutionen wird durch Kombination von HS-SPME und umfassender zweidimensionaler Gaschromatographie–Flugzeit–Massenspektrometrie (GC×GC–TOF–MS) ermöglicht. Basierend auf den aufgenommenen Massenspektren der genuinen (d_0) und maximal deuterierten (d_{max}) Sesquiterpen-Isotopologe werden Mechanismen zur Bildung von Sesquiterpenen in *V. vinifera* vorgeschlagen und bereits bestehende Stoffwechselwege bestätigt oder widerlegt.

Die Erforschung des Einflusses der Hefe auf das Sesquiterpen-Profil eines Weines erfolgt durch Fermentationsversuche im Milliliter-Maßstab (Mikrovinifikation). Die Herstellung von Lemberger-Modellweinen aus d_3 -MVL-inkubiertem Exokarp reifer Weinbeeren soll dabei die Bestimmung potentieller, traubeneigener Marker ermöglichen. Während deuterierte Sesquiterpene dem Weinbeeren-Stoffwechsel entstammen, können unmarkierte Sesquiterpene grundsätzlich sowohl aus der Weinbeere als auch aus dem Hefe-Stoffwechsel stammen. Durch Ermittlung des Peakhöhenverhältnisses d_0/d_{max} vor und nach der Mikrovinifikation für jeden Analyten, kann ermittelt werden ob es während der Fermentation durch den Hefe-Stoffwechsel zu einem signifikanten Zuwachs an genuinen Sesquiterpenen gekommen ist. Sesquiterpene bei denen sich das Verhältnis von unmarkiertem zu maximal deuteriertem Isotopolog nach der Mikrovinifikation nicht signifikant ändert, können als potentielle Marker der Rebsorte Lemberger angenommen werden.

Die anschließende Analyse authentischer, rebsortenreiner Lemberger-Weine verschiedener Jahrgänge dient zur Überprüfung, ob die Ergebnisse aus den Mikrovinifikationsversuchen mit Modellweinen auf die großtechnische Produktion von Rotweinen übertragbar sind und die potentiellen, traubeneigenen Marker wiedergefunden werden können. Zur Anreicherung der Sesquiterpene aus den Weinproben wird der HS-SPME–GC×GC–TOF–MS-Analyse eine SPE mit anschließender Destillation über eine Vigreux-Kolonnen vorgeschaltet. Die Verwendung eines internen Standards ermöglicht die Ermittlung des Konzentrationsbereichs der Analyten. Abschließend soll mittels GC×GC–TOF–MS untersucht werden, ob neben den freien auch glykosidisch gebundene Sesquiterpene im Weinbeeren-Exokarp nachweisbar sind, die das Sesquiterpen-Profil während der Weinherstellung beeinflussen können. Der Nachweis zuckergebundener Sesquiterpen-Alkohole erfolgt dabei indirekt durch die Analyse der freigesetzten Aglyka nach enzymatischer Hydrolyse. Die Untersuchungen der Hydrolysate soll die Beschreibung der strukturellen Vielfalt von glykosylierten Sesquiterpen-Alkoholen im Vergleich zu freien Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen ermöglichen. Dabei kann insbesondere erforscht werden, ob von den nachgewiesenen freien Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen eine verwandte hydroxylierte Struktur in Trauben detektierbar ist. Des Weiteren kann über die Summe der Peakflächen das Verhältnis von glykosidisch gebundenen Monoterpen-Alkoholen zu Sesquiterpen-Alkoholen in Weinbeeren bestimmt werden.

2 Kumulativer Teil der Dissertation

Der folgende kumulative Teil der Dissertation enthält drei Beiträge aus Zeitschriften mit Fachbegutachtung (*peer-reviewed journals*). Jede Veröffentlichung stellt dabei ein Kapitel dar, wobei bei der jeweiligen Originalpublikation eine kurze Einführung und Zusammenfassung vorangestellt sind.

2.1 Kapitel I: Identifizierung und Biosynthese strukturell komplexer Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe in Weinbeeren-Exokarp

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Könen, P. P.; Wüst, M. Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS). *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 1945–1961.
[doi:10.3762/bjoc.15.190](https://doi.org/10.3762/bjoc.15.190)

2.1.1 Einführung

Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe sind strukturell vielfältige Naturstoffe isoprenoiden Ursprungs, die das Volatilen-Profil von lesereifen Weinbeeren (*Vitis vinifera* L.) maßgeblich beeinflussen.^[125] In Weinbeeren konnten bisher über 50 meist polycyclische Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe gefunden werden.^[138]

Die Identifizierung dieser strukturell komplexen Sekundärmetabolite, die in der epikutikulären Wachsschicht des Weinbeeren-Exokarps akkumuliert werden,^[130] ist jedoch in den seltensten Fällen eindeutig. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die meisten Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe nicht als authentische Standardsubstanzen erhältlich sind.^[105] Problematisch sind zudem weitere Faktoren. Zum einen stören häufig Coelutionen, die mittels (1D-)GC-MS oft nicht ausreichend minimiert werden können.^[100] Zum anderen sind die Massenspektren der Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe teils sehr ähnlich.^[151] Darüber hinaus liegen die Konzentrationen der Analyten im Spurenbereich ($\mu\text{g}/\text{kg}$), was entsprechende Anreicherungs- bzw. Extraktionsmethoden und empfindliche Messsysteme erfordert.^[152]

Zur Biosynthese von Sesquiterpenen sind die aktivierten C_5 -Monomeren IPP und DMAPP erforderlich, welche sowohl über den cytosolischen MVA- als auch über den plastidiären DOXP/MEP-Weg im Exokarp der Weinbeere gebildet werden.^[110] Die anschließende enzymatische Generierung des acyclischen Oligoprenylpyrophosphats FPP, das als Sesquiterpen-vorläufer fungiert, erfolgt im Cytosol.^[153] Das Enzym FPP-Synthase, eine Prenyltransferase, katalysiert die Bildung dieses C_{15} -Kohlenwasserstoffs, der aus zwei Äquivalenten IPP sowie einem Äquivalent DMAPP aufgebaut ist.^[154] In Weinbeeren stehen im Cytosol sowohl cytosolische als auch plastidiäre IPP/DMAPP-Moleküle zur Biosynthese von FPP zur Verfügung, was auf die Existenz eines entsprechend von den Plastiden zum Cytosol gerichteten Transports deutet.^[110] Die Umwandlung von FPP in Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe erfolgt mittels Sesquiterpensynthasen bzw. -cyclasen über Carbokation-Intermediate in komplexen Reaktionskaskaden.^[155] Häufig katalysiert dabei ein einziges Enzym die Bildung mehrerer Sesquiterpene.^[129]

Während die Bildungswege bis hin zum FPP weitgehend erforscht sind, ist die Aufklärung dieser mehrstufigen Reaktionsmechanismen zur Generierung der Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe in *V. vinifera* L. bisher sehr lückenhaft. In vielen Fällen sind die vorgeschlagenen Mechanismen nicht durch Stabilisotopen-Markierungsstudien bestätigt worden oder die Reaktionswege gänzlich unbekannt.

Ziel der nachfolgenden Studie war es deshalb durch Markierungsexperimente und HS-SPME-GC \times GC-TOF-MS Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe des Weinbeeren-Stoffwechsels eindeutig zu identifizieren und die Mechanismen zur Bildung dieser Analyten in *V. vinifera* zu untersuchen.

2.1.2 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden Markierungsversuche am Exokarp reifer Weinbeeren zur Analyse strukturell komplexer Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe durchgeführt. Die Messung der Proben mittels HS-SPME–GCxGC–TOF–MS ermöglichte dabei sowohl eine eindeutige Identifizierung der Analyten, als auch die Untersuchung der beteiligten Reaktionsmechanismen. Durchgeführt wurden die Analysen exemplarisch an lesereifen Weinbeeren der terpenreichen Rebsorte Lemberger⁴ (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*).

Zur Umsetzung der Markierungsexperimente wurde das isolierte Exokarp der Weinbeeren mit einer wässrigen Lösung eines stabilisotopenmarkierten Präkursors inkubiert. Verabreicht wurde den Beerenhäuten [6,6,6-²H₃]-(\pm)-Mevalonolacton (*d*₃-MVL, **33**) oder [5,5-²H₂]-1-Desoxy-D-xylulose (*d*₂-DOX, **34**). Die Vorläuferverbindung *d*₃-MVL wurde nach Umwandlung zu [6,6,6-²H₃]-Mevalonsäure (*d*₃-MVA, **35**) über den cytosolischen MVA-Weg verstoffwechselt. Bei maximalem Deuteriumeinbau entstanden dreifach deuterierte IPP/DMAPP-Moleküle (**36,37**), aus denen im Anschluss *d*₉-FPP (**38**) als Sesquiterpenvorläufer biosynthetisiert wurde (Abbildung 9A). Im Gegensatz dazu wurde **34** nach Phosphorylierung zu [5,5-²H₂]-1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (*d*₂-DOXP, **39**) über den plastidiären DOXP/MEP-Weg metabolisiert. Auf diese Weise wurden maximal zweifach deuterierte IPP/DMAPP-Moleküle generiert (**40,41**), die in der Folge zu *d*₆-FPP (**42**) umgewandelt wurden (Abbildung 9B). Die Verstoffwechslung der deuterierten FPP-Moleküle durch die traubeneigenen Synthasen bzw. Cyclasen führte, abhängig von den Reaktionsmechanismen, zu entsprechend markierten Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen.

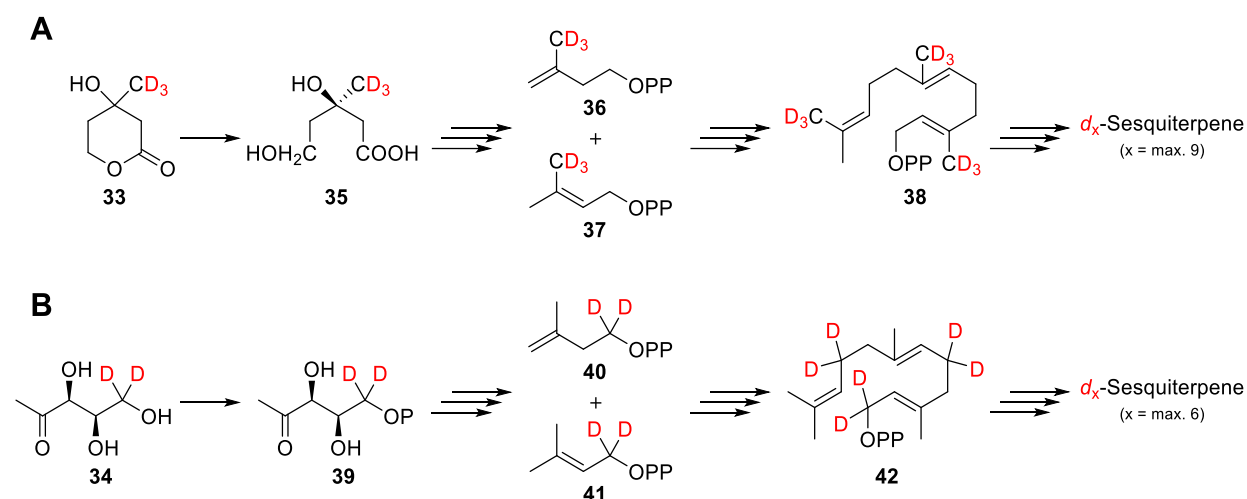


Abb. 9: Markierungsexperimente zur Analyse von Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen.

*d*₃-MVL (**33**), *d*₂-DOX (**34**), *d*₃-MVA (**35**), *d*₃-IPP (**36**), *d*₃-DMAPP (**37**), *d*₉-FPP (**38**), *d*₂-DOXP (**39**), *d*₂-IPP (**40**), *d*₂-DMAPP (**41**), *d*₆-FPP (**42**).

⁴ Die Rebsorte Lemberger wird auch Blauer Limberger oder Blaufränkisch genannt.

Die Anreicherung, Extraktion und Analyse der gebildeten Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe erfolgte anschließend durch HS-SPME–GC×GC–TOF–MS, wodurch Messungen im Spurenbereich ermöglicht und Coelutionen minimiert werden konnten. Die Biosynthese der nachgewiesenen Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe erfolgte via Carbokationen und Germacren-Intermediaten, wie Abbildung 10 ausgehend von d_3 -MVL (**33**) zeigt.

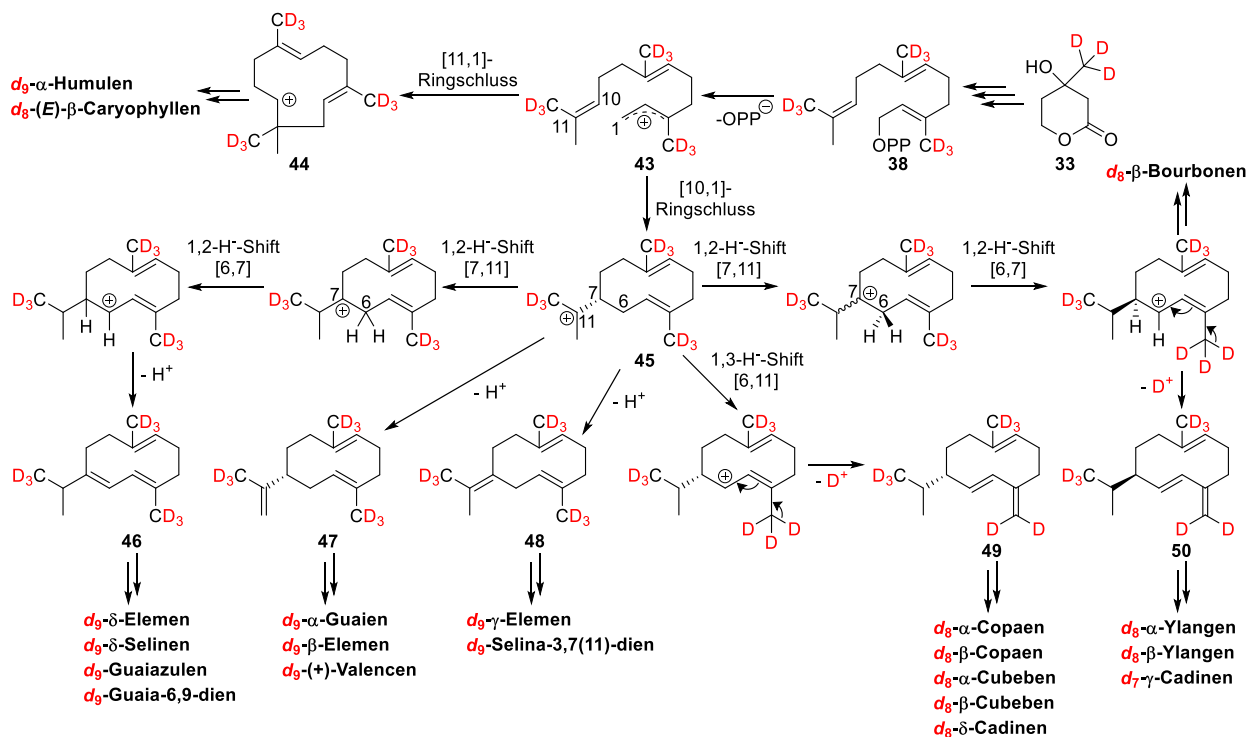


Abb. 10: Bildung markierter Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe nach d_3 -MVL-Applikation.

d_3 -MVL (**33**), d_9 -FPP (**38**), d_9 -Farnesyl-Kation (**43**), d_9 -*trans*-Humulyl-Kation (**44**), d_9 -(*S*)-Germacradienyl-Kation (**45**), d_9 -Germacren C (**46**), d_9 -Germacren A (**47**), d_9 -(*E,E*)-Germacren B (**48**), d_8 -(*S*)-(*-*)-Germacren D (**49**), d_8 -(*R*)-(*+*)-Germacren D (**50**).

Anhand der aufgenommenen Massenspektren der genuinen (unmarkierten) Analyten und ihrer maximal deuterierten Isotopologen konnten mögliche Reaktionsmechanismen vorgeschlagen und die Substanzen eindeutig identifiziert werden. Basierend auf den Markierungsmustern konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Bildung der tricyclischen Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe α -Copaen und β -Copaen in *V. vinifera* über das Intermediat (*S*)-(*-*)-Germacren D (**49**) verläuft, wohingegen ihre Stereoisomere α -Ylangen und β -Ylangen über (*R*)-(*+*)-Germacren D (**50**) generiert werden. Die Bestätigung der vorgeschlagenen Syntheserouten, erfolgte durch analoge Markierungsversuche mittels d_2 -DOX.

Insgesamt konnten 25 Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe aus dem Exokarp reifer Lemberger-Weinbeeren eindeutig identifiziert und für 20 dieser Verbindungen Reaktionsmechanismen postuliert werden.

2.1.3 Publikation: *Beilstein J. Org. Chem.* (2019)

Es folgt die Originalpublikation:

Könen, P. P.; Wüst, M. Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS). *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 1945–1961.
[doi:10.3762/bjoc.15.190](https://doi.org/10.3762/bjoc.15.190)



Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS)

Philipp P. Könen and Matthias Wüst*

Full Research Paper

Open Access

Address:

Institute of Nutritional and Food Sciences, Chair of Food Chemistry, University of Bonn, Endenicher Allee 19C, 53115 Bonn, Germany

Email:

Matthias Wüst* - matthias.wuest@uni-bonn.de

* Corresponding author

Keywords:

biosynthesis; deuterium labeling; germacrene; HS-SPME; terpenes; TOF-MS

Beilstein J. Org. Chem. **2019**, *15*, 1945–1961.

doi:10.3762/bjoc.15.190

Received: 28 May 2019

Accepted: 02 August 2019

Published: 14 August 2019

This article is part of the thematic issue "Terpenes".

Guest Editor: J. S. Dickschat

© 2019 Könen and Wüst; licensee Beilstein-Institut.

License and terms: see end of document.

Abstract

Sesquiterpenes are structurally diverse, potent flavoring substances that significantly influence the aroma profile of grapes (*Vitis vinifera* L.) at the time of physiological ripening. To investigate these natural compounds, freshly harvested, ripe berries of the red wine variety Lemberger (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera* L.) were analyzed using comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) coupled to a time-of-flight mass spectrometer (TOF-MS) after headspace-solid phase microextraction (HS-SPME). The identification of structurally complex natural compounds, such as sesquiterpenes from fruits and vegetables, is often reported as “tentative”, as authentic standards are not commercially available for most of the analytes. For this reason, feeding experiments (in vivo labeling) were carried out using the stable isotope-labeled precursors [5,5-²H₂]-1-deoxy-D-xylulose (*d*₂-DOX) and [6,6,6-²H₃]-(\pm)-mevalonolactone (*d*₃-MVL) to clearly identify the volatiles. Based on the recorded mass spectra of the unlabeled and deuterated compounds, mechanisms for sesquiterpene formation in *V. vinifera* could be proposed and already known pathways could be confirmed or disproved. For example, the HS-SPME-GC×GC-TOF-MS measurements of fed sample material showed that the tricyclic sesquiterpene hydrocarbons α -copaene, β -copaene, α -cubebene, β -cubebene and the bicyclic δ -cadinene were biosynthesized via (*S*)-(-)-germacrene D rather than via (*R*)-(+)-germacrene D as intermediate.

Introduction

The aroma profile of grape berries at the time of physiological ripening is very complex and significantly influenced by potent flavoring substances of isoprenoid origin like mono- and

sesquiterpenes [1,2]. Sesquiterpenes form a structurally diverse subgroup of terpenes consisting of three isoprene units [3]. Since the bicyclic sesquiterpene ketone rotundone was

identified for the first time in 2008 as a key aromatic substance for the peppery aroma of the red wine variety Shiraz, sesquiterpenes have increasingly been in the focus of wine research [4].

It is known that these natural products are synthesized in *Vitis vinifera* L. via the mevalonate-dependent biosynthesis pathway (MVA) localized in the cytoplasm as well as via the mevalonate-independent 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate metabolic pathway (DOXP/MEP) localized in plastids [5]. In the MVA pathway, which was first described in yeast and animals, mevalonic acid (MVA) is formed from acetyl-CoA and converted into the products isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP), which can further react to farnesyl pyrophosphate (FPP, C₁₅) [6]. It was not until the end of the 1980s that the alternative DOXP/MEP pathway, which also leads to the formation of DMAPP and IPP, was discovered in a study focused on hopanoids [7]. Today it is known that the sesquiterpenes in *Vitis vinifera* are formed from FPP whose biosynthesis relies on both, the DOXP/MEP and the MVA pathway, and that they specifically accumulate in the wax layer of the berry exocarp [8]. The biosynthesis of the diverse sesquiterpene structures in *V. vinifera* is, however, still largely unexplored, especially with respect to the cyclization mechanisms. Studies by Steele et al., Bülow et al., Martin et al. and theoretical studies by Tantillo show the complexity of the various cyclization reactions [9–12].

In order to analyze the biosynthetic pathways of sesquiterpene hydrocarbons in grape berries, a method was developed by us using comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) coupled to a time-of-flight mass spectrometer (TOF–MS) after headspace-solid phase microextraction (HS-SPME).

The comprehensive two-dimensional gas chromatography first demonstrated on an oil sample in 1991 is suitable for the analysis of highly complex samples [13]. Using GC×GC, all analytes of a sample can be separated on two different capillary separation columns of different selectivity, resulting in optimized resolution. Increased resolution makes coelutions less likely and minimizes chromatographic noise. In addition, modulator-controlled focusing effects favor the detection of analytes in the trace range. Furthermore, GC×GC is used to obtain structured chromatograms, i.e., compounds of common structure classes are grouped. The coupling of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry as the “third dimension” also provides important information for substance identification. The combination of these advantages makes the GC×GC one of the most powerful separation methods for the

chemical analysis of organic compounds in complex matrices [14]. The efficiency of this modern analysis technology has recently been demonstrated using different types of wine in nontarget screenings [15–17].

In our work, we have combined the advantages of multidimensional gas chromatography with those of in vivo labeling. In vivo labeling makes it possible to identify compounds for which authentic standards are not commercially available, which applies to the majority of compounds found in plant foods [18]. We performed feeding experiments on isolated exocarp of freshly harvested grapes (*Vitis vinifera* L.) using the stable isotope-labeled precursors [5,5-²H₂]-1-deoxy-D-xylulose (*d*₂-DOX) and [6,6,6-²H₃](±)-mevalonolactone (*d*₃-MVL) to unambiguously identify sesquiterpene hydrocarbons. Based on the obtained mass spectra of the genuine and deuterated compounds, multistage cyclisation reactions in the course of sesquiterpene biosynthesis could be substantiated for the first time for several structural classes in *V. vinifera*.

Results and Discussion

The HS-SPME–GC×GC–TOF–MS analysis of the grape variety Lemberger (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*, clone 1Gm, isolated exocarp) showed the presence of several hundred components. Twenty-five of these compounds were unequivocally identified as sesquiterpene hydrocarbons (Figure 1).

Deuterium-labeled compounds eluted earlier than the unlabeled analogues (Figure 3). This is due to the inverse isotope effect described by Matucha et al. which results in the gas chromatographic separation of isotopologic substances [28]. In the following, the fully deuterium-labeled compounds are examined and their possible biosynthesis pathways described. However, it was also possible to detect the peaks of the partially labeled sesquiterpenes, as Supporting Information File 2 shows using compound **10** as an example.

Sesquiterpene biosynthesis Biosynthesis of sesquiterpene hydrocarbons via (*S*)-(–)-germacrene D

The biosynthetic pathways for the formation of δ-cadinene, α-copaene, β-copaene, α-cubebene and β-cubebene via germacrene D in the legume *Medicago truncatula* have been previously reported by Boland and Garms [29].

The formation of the mentioned sesquiterpenes could a priori take place via farnesyl pyrophosphate (FPP) as well as via (*S*)- and (*R*)-nerolidyl pyrophosphate (NPP) (Scheme 1).

Both enantiomers of NPP are possible as intermediates of terpene biosynthesis, since the absolute configurations of their

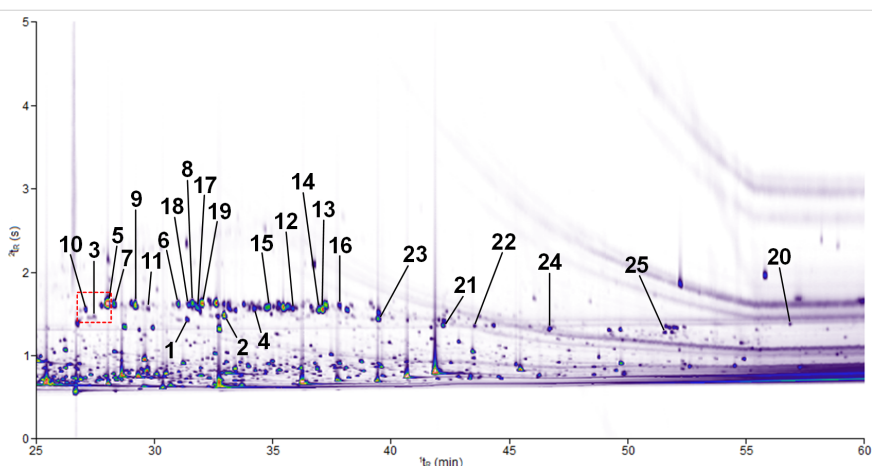
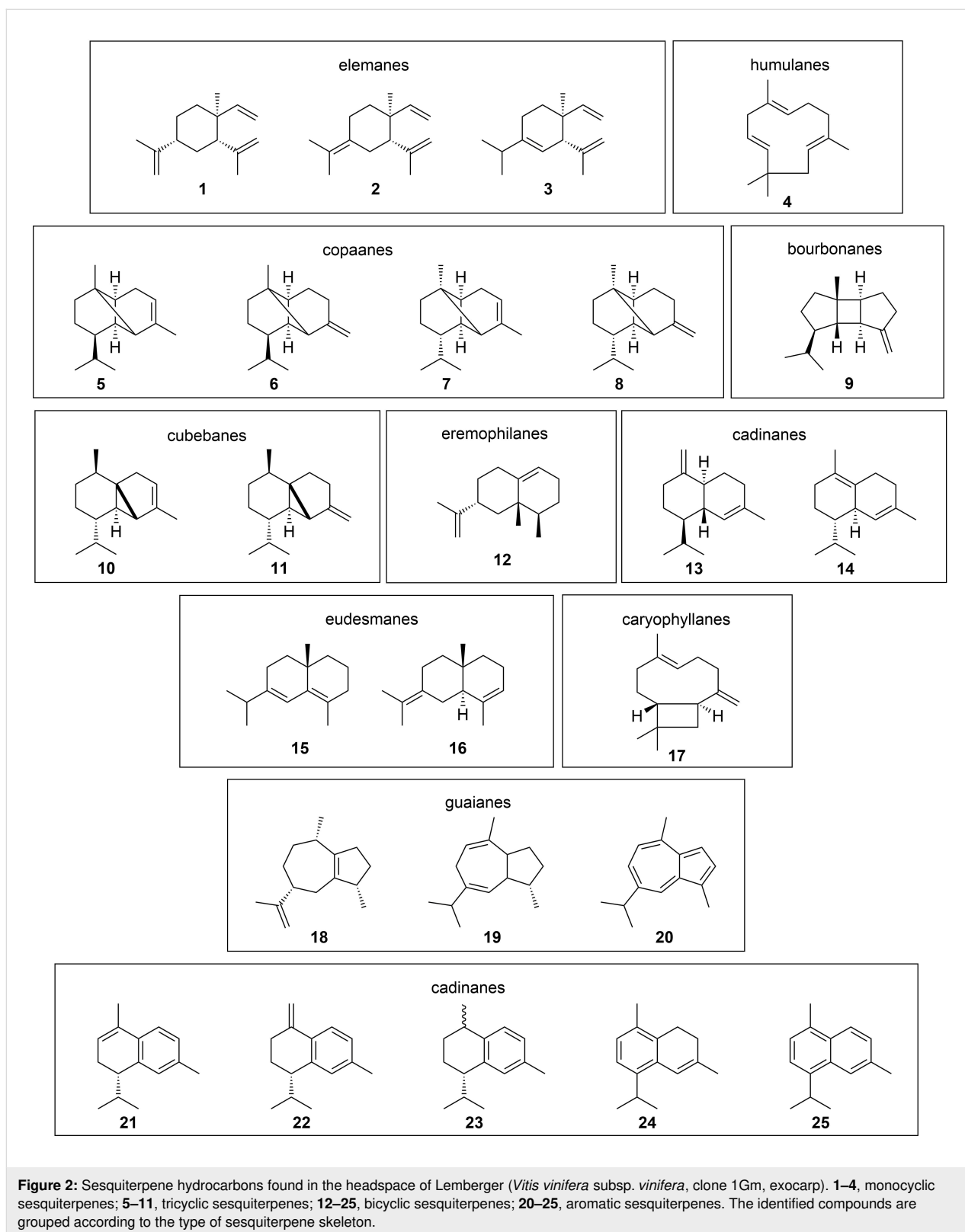


Figure 1: Contour plot of a HS-SPME-GC×GC-TOF-MS chromatogram (TIC) demonstrating the separation of volatile compounds isolated from the headspace of grape berries of the red wine variety Lemberger (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*, clone 1Gm, exocarp). 1t_R (X-axis) corresponds to the retention time on the primary column and 2t_R (Y-axis) to the retention time on the secondary column. The color gradient reflects the intensity of the TOF-MS signal on a white background from low (violet) to high (red). Numbers at peaks refer to compound numbers as defined in Figure 2 and Table 1. The area framed in red including the volatile compounds numbered 10, 3 and 5 is enlarged in Figure 3.

Table 1: Sesquiterpene hydrocarbons identified in headspace of Lemberger (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*, clone 1Gm, exocarp).

compound ^a	β ^b	I (lit.) ^c	identification ^d /verification ^e
α -cubebene (10)	1467	1460 [19]	ms (874, 882), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
δ -elemene (3)	1478	1479 [20]	ms (859, 864), ri, n.d. ^f , d_3 -MVL
α -ylangene (5)	1497	1483 [21]	ms (860, 877), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
α -copaene (7)	1505	1496 [19]	ms (865, 872), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
β -bourbonene (9)	1532	1519 [19]	ms (853, 863), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
β -cubebene (11)	1549	1537 [19]	ms (869, 883), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
β -ylangene (6)	1588	1568 [19]	ms (852, 856), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
β -elemene (1)	1598	1592 [22]	ms (903, 906), ri, n.d. ^f , d_3 -MVL
α -guaiene (18)	1600	1591 [23]	ms (871, 892), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
β -copaene (8)	1605	1598 [24]	ms (847, 856), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
(<i>E</i>)- β -caryophyllene (17)	1612	1604 [25]	ms (928, 939), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
guaia-6,9-diene (19)	1618	n.a. ^g	ms (824, 833), d_2 -DOX, d_3 -MVL
γ -elemene (2)	1646	1650 [20]	ms (864, 882), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
α -humulene (4)	1685	1690 [20]	ms (888, 906), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
δ -selinene (15)	1705	n.a. ^g	ms (841, 887), n.d. ^f , d_3 -MVL
(+)-valencene (12)	1736	1731 [26]	ms (884, 904), ri, d_2 -DOX, std, n.d. ^h
δ -cadinene (14)	1769	1770 [20]	ms (858, 900), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
γ -cadinene (13)	1774	1760 [23]	ms (852, 881), ri, d_2 -DOX, d_3 -MVL
selina-3,7(11)-diene (16)	1796	1778 [27]	ms (872, 881), ri, n.d. ^f , d_3 -MVL
calamenene (isomer) (23)	1845	1837 [27]	ms (786, 814), ri, n.d. ^f , d_3 -MVL
α -calacorene (21)	1929	1919 [27]	ms (746, 854), ri, n.d. ^f , d_3 -MVL
β -calacorene (22)	1971	1939 [25]	ms (836, 898), ri, n.d. ^f , d_3 -MVL
α -corocalene (24)	2073	n.a. ^g	ms (864, 882), n.d. ^f , d_3 -MVL
cadalene (25)	2237	2231 [21]	ms (869, 880), ri, n.d. ^f , d_3 -MVL
guaiazulene (20)	2417	n.a. ^g	ms (872, 880), n.d. ^f , std, d_3 -MVL

^aUnidentified compounds are not listed. ^bRetention index I on a DB-WAX Ultra Inert column. ^cRetention index data from literature. ^dCompound identification is based on matching mass spectrum to a library spectrum (ms, match factor and reverse match factor given in brackets, identical mass spectra would produce a match factor of 1000), identical or closely matching retention index (ri) and comparison to a commercially available standard compound (std). ^eVerification of the found sesquiterpene hydrocarbons was carried out by in vivo labeling with [5,5- 2 H $_2$]-1-deoxy-D-xylulose (d_2 -DOX) and [6,6,6- 2 H $_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) as stable isotope-labeled precursors. ^fThe compound could not be detected in d_2 -DOX feeding experiments or the mass spectra could not be evaluated. ^gRetention index data on a WAX column were not available. ^hThe compound could not be detected in d_3 -MVL feeding experiments or the mass spectra could not be evaluated.



products from *Vitis vinifera* L. are unknown and the subsequent cyclisation reactions can be explained by the enantiomers of germacrene D [30,31].

In order to investigate whether the formation of δ -cadinene, α -copaene, β -copaene, α -cubebene and β -cubebene occurs via the intermediate farnesyl pyrophosphate (FPP) or via nerolidyl

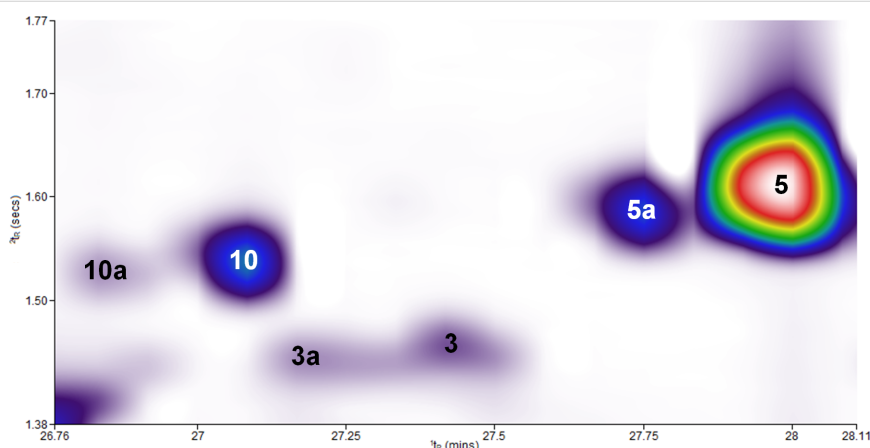
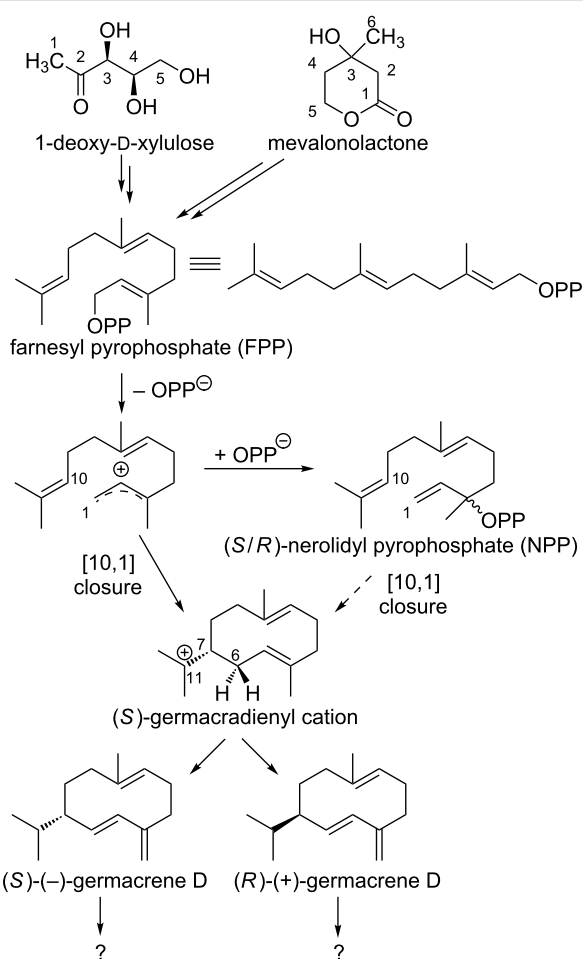


Figure 3: Detailed part of the two-dimensional contour plot (Figure 1) to demonstrate the result of a successful feeding experiment after administration of the stable isotope-labeled precursor [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries (Lemberger cultivar). The regions labeled with the numbers **10**, **3** and **5** correspond to the genuine sesquiterpene hydrocarbons as defined in Table 1. **10a** (d_8), **3a** (d_9) and **5a** (d_8) are the isotopologues with the highest, possible incorporation of deuterium when d_3 -MVL is used as precursor (the maximum possible number of deuterium atoms incorporated is given in brackets). The 3D view of the chromatogram section shown can be found in Supporting Information File 1.



Scheme 1: First steps towards the formation of sesquiterpenes. The (*S*)-germacradienyl cation can be formed from FPP or NPP. The subsequent formation of sesquiterpene hydrocarbons via (*S*)- and (*R*)-germacrene D has not yet been clarified.

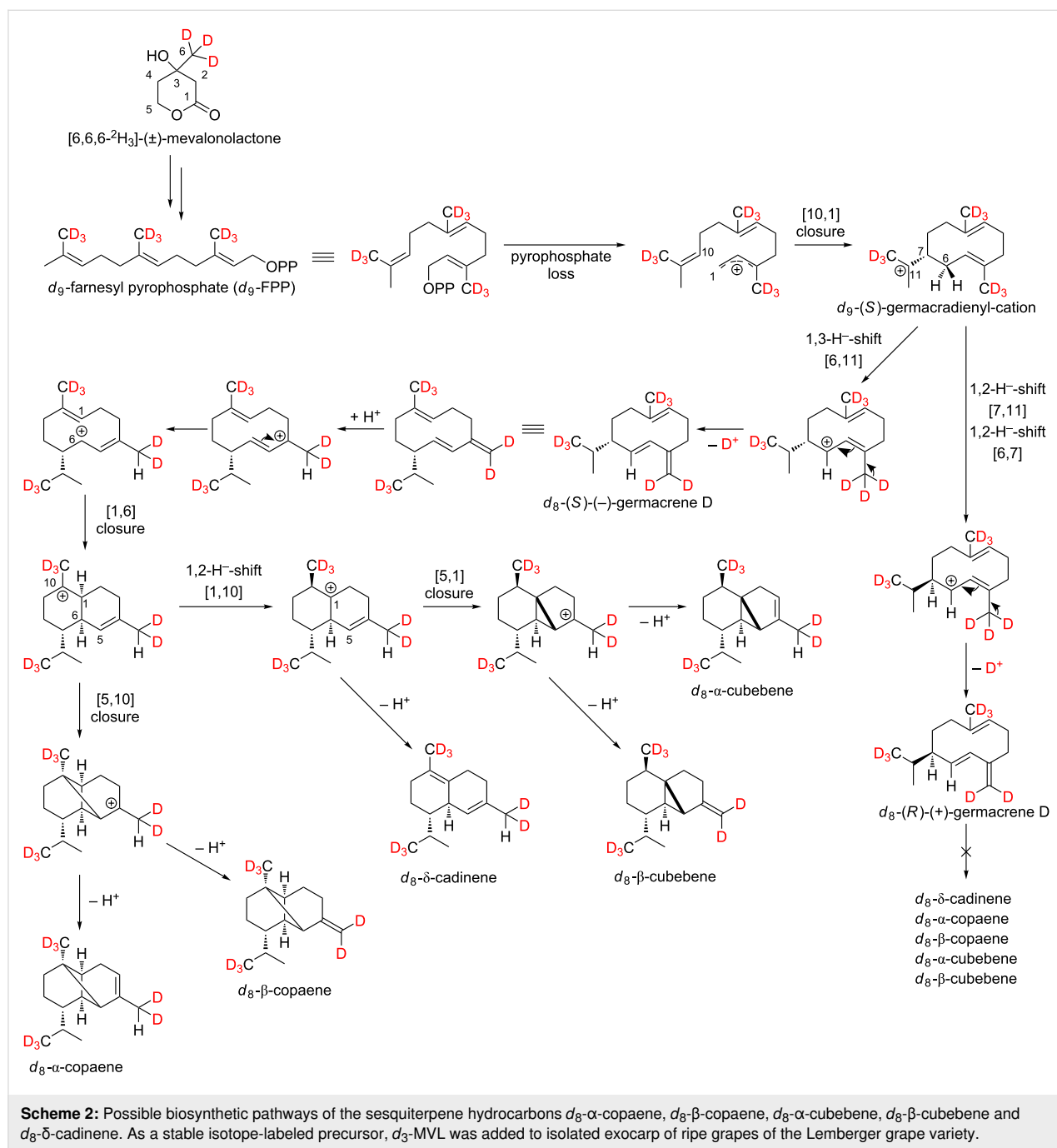
pyrophosphate (NPP), feeding experiments were carried out using the stable isotope-labeled precursor [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL, Scheme 2).

As shown in Scheme 2, a maximum incorporation of 8 deuterium atoms was found for the sesquiterpene hydrocarbons, which excludes formation via NPP. Furthermore, these results support the formation of germacrene D, in which the ninth deuterium atom is already missing.

Whether the above-mentioned sesquiterpenes are formed via (*S*)-(-)-germacrene D or (*R*)-(+)-germacrene D was investigated by feeding experiments using the precursor [5,5- $^2\text{H}_2$]-1-deoxy-D-xylulose (d_2 -DOX, Scheme 3).

Indeed, in Lemberger (*R*)-(+)-germacrene D and (*S*)-(-)-germacrene D are detectable in grape berry exocarp as shown by enantioselective analysis [5,32]. In 1999 Schmidt et al. were able to show that the enantiomers of germacrene D are formed via two different H-transfer pathways in *Solidago canadensis*. (*S*)-(-)-Germacrene D is generated by a cyclization reaction, that includes a 1,3-hydride shift as opposed to the cyclization reaction of (*R*)-(+)-germacrene D, that includes two consecutive 1,2-hydride shifts [33].

In all terpenes in Scheme 3, TOF-EIMS measurements showed that a deuterium atom is located in the isopropyl group. This can be explained by the assumption that in *Vitis vinifera* L. all sesquiterpenes are formed via the (*S*)-germacradienyl cation, which has already been shown for *Solidago canadensis*. The subsequent reactions of the (*S*)-germacradienyl cation to (*S*)-(-)-germacrene D and (*R*)-(+)-germacrene D have already been



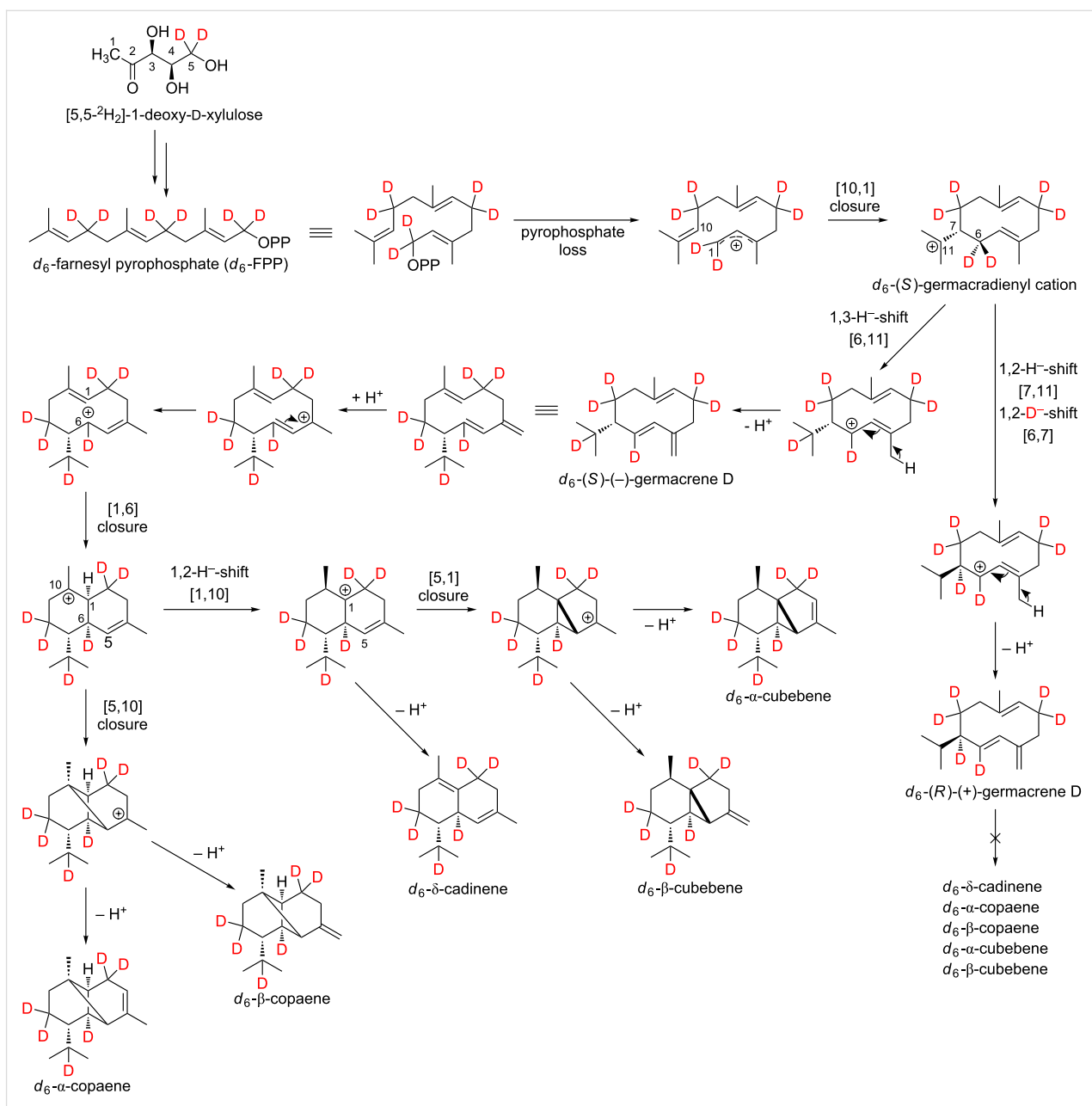
described above. In the case of the formation of δ -cadinene, α -copaene, β -copaene, α -cubebene and β -cubebene, further cyclization takes place only from (*S*)-(-)-germacrene D, from which the absolute configuration of these substances can be derived.

While the detected labeling patterns in our feeding experiments are in full agreement with the 1,3-hydride shift pathway, the cloning and functional characterization of the corresponding synthase as a final proof is yet missing. In the following, the

sesquiterpene hydrocarbon α -cubebene is used as an example to illustrate our interpretations in more detail (Figure 4).

Genuine (d_0) α -cubebene has a molecular ion peak $[M]^{+\bullet}$ at $m/z = 204$ (Figure 4, upper mass spectrum, marked red). The signal with $m/z = 161$ $[M]^+$ corresponds to the fragment after abstraction of the isopropyl group (marked blue).

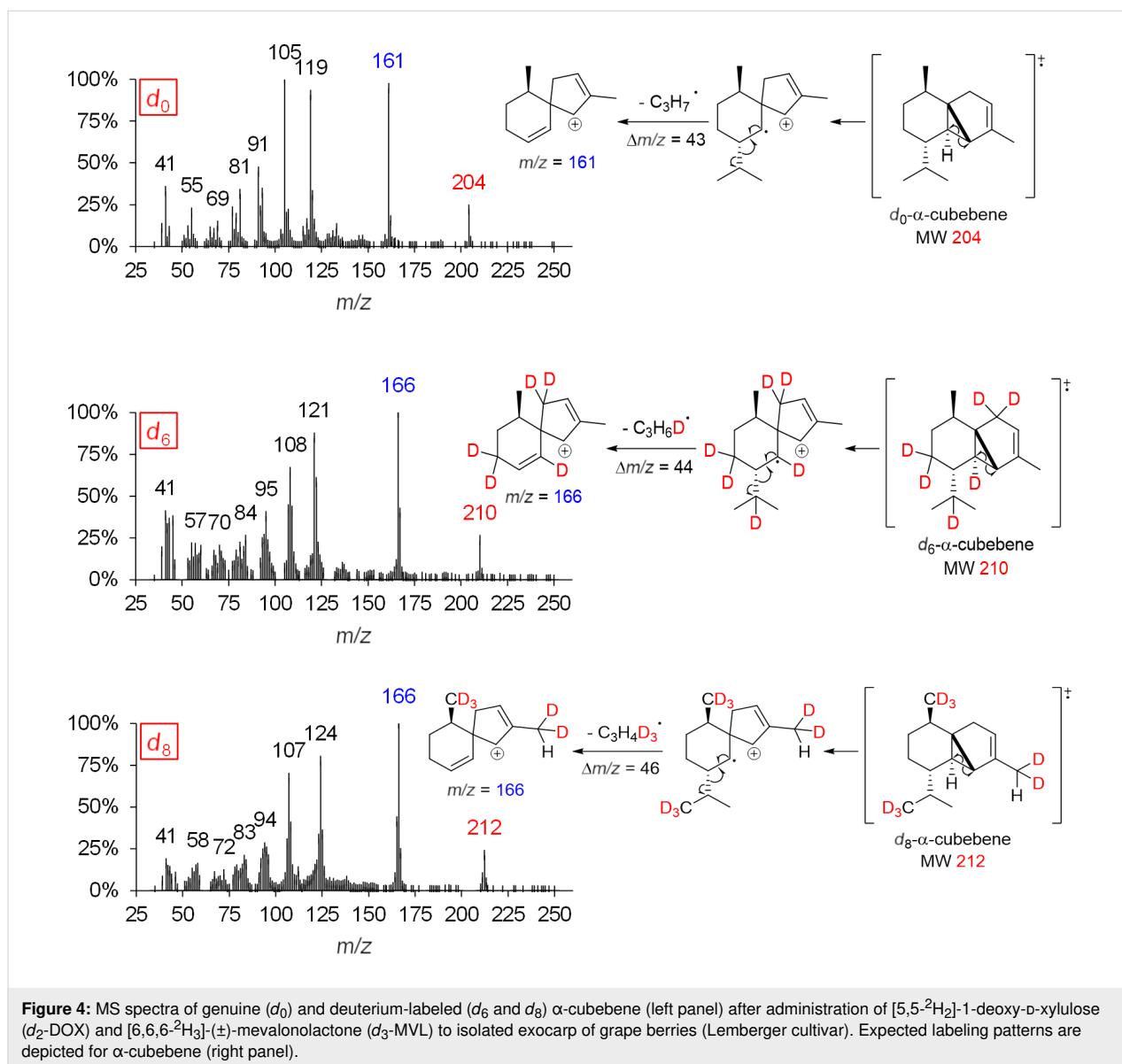
Feeding experiments using d_2 -DOX showed that according to the biosynthesis pathway demonstrated in Scheme 3, a



maximum of 6 deuterium atoms are incorporated into α -cubebene. The presence of d_6 - α -cubebene could be confirmed by mass spectrometry as the isotopologue with the highest, possible incorporation of deuterium when d_2 -DOX was used as a precursor. The molecular ion peak $[M]^{+\bullet}$ of d_6 - α -cubebene therefore has a mass-to-charge ratio of 210. The abstraction of a single deuterated isopropyl group leads to the fragment with $m/z = 166$. At this point it becomes obvious why it can be assumed that the tricyclic sesquiterpene hydrocarbon α -cubebene is synthesized via (*S*)-(-)-germacrene D and not

via (*R*)-(+)-germacrene D. Assuming the biosynthesis of α -cubebene takes place via (*R*)-(+)-germacrene D, the isopropyl group of the molecule would not be deuterated and, therefore, after abstraction of the isopropyl group, the signal with $m/z = 167$ would dominate, which is not the case.

In the course of the biosynthesis of α -cubebene after feeding with d_3 -MVL as precursor, a deuterium atom is abstracted, resulting in d_8 - α -cubebene $[M]^{+\bullet}$ with $m/z = 212$ as highly labeled isotopologue (Figure 4, lower mass spectrum).



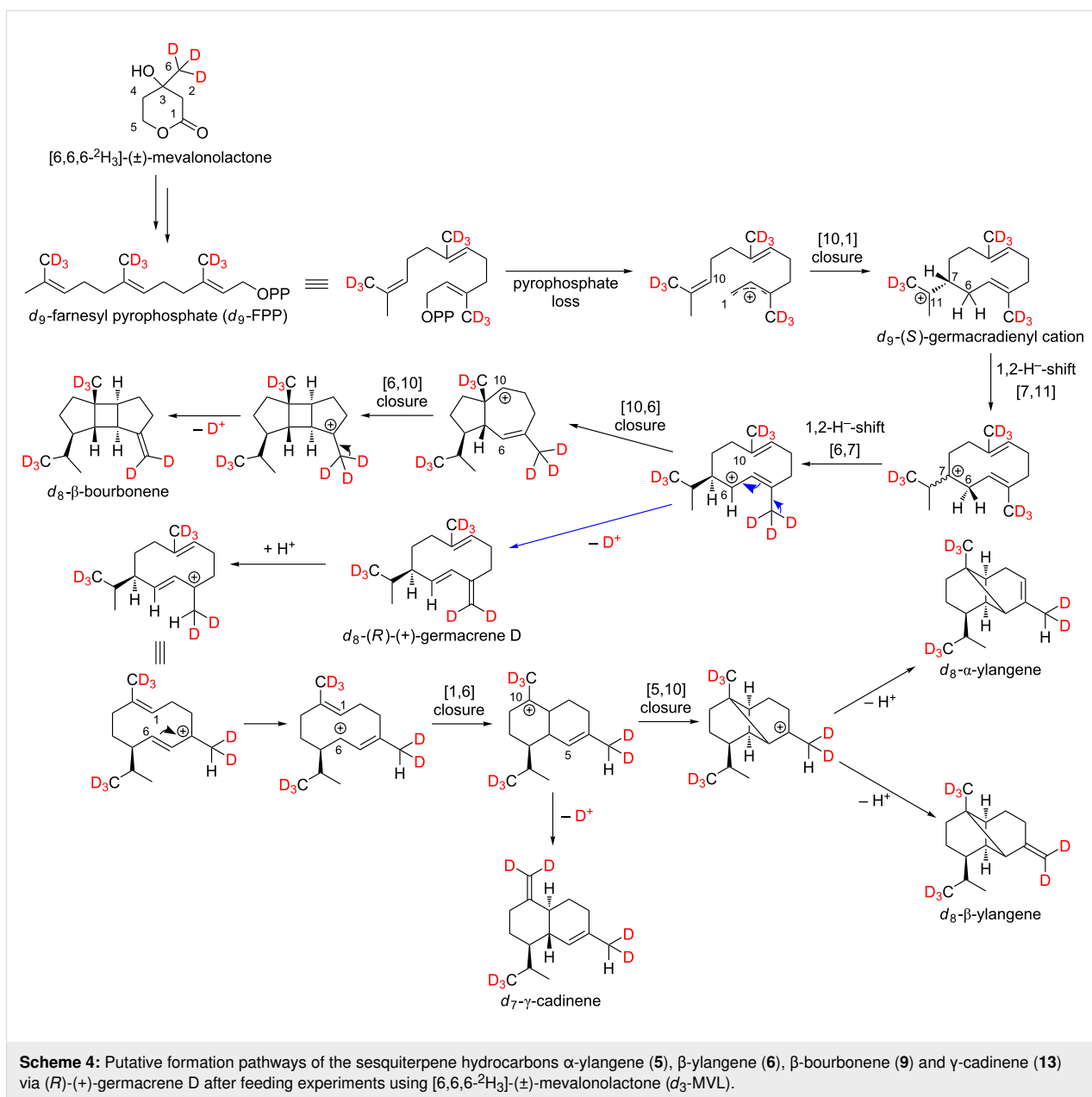
Biosynthesis of sesquiterpene hydrocarbons via (*R*)-(+)-germacrene D

Lodewyk, Gutta and Tantillo postulated an α -ylangene-forming carbocation cascade based on computer calculations [34]. Tantillo and co-workers showed that germacrene D does not have to be involved in the formation of α -ylangene due to carbocation energetics. However, according to our results the formation of this tricyclic sesquiterpene hydrocarbon and its isomer β -ylangene occurs via the intermediate (*R*)-(+)-germacrene D (Scheme 4), which can, indeed, be detected by enantioselective GC in ripening Lemberger berries [5].

The MS spectra and the expected labeling patterns of genuine (A) and deuterium-labeled d_6 - α -ylangene (C) after feeding experiments with d_2 -DOX are shown in Figure 5.

Figure 5B shows that after feeding experiments with d_3 -MVL a maximum of 8 deuterium atoms are incorporated into α -ylangene, so that a molecular ion peak $[M]^{+\bullet}$ with $m/z = 212$ is detected. After abstraction of the triple deuterated isopropyl group, the fragment ion is formed with $m/z = 166$. According to the computer simulation of Lodewyk, Gutta and Tantillo, d_9 - α -ylangene with $m/z = 213$ should have been detected after *in vivo* labeling using [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) as precursor. At this point it should be mentioned that biosynthetic pathways in organisms can differ and computational studies only bear on the intrinsic energetics of possible carbocations.

Furthermore, it is possible that γ -cadinene is formed via (*R*)-(+)-germacrene D. Yoshihara et al. showed that isolated germa-



crene D reacts to β -bourbonene by irradiation with intense UV light (Hg lamp) [35]. However, the formation of β -bourbonene in plant cells by this photoinduced [2 + 2]-cycloaddition is very unlikely. The biosynthesis of β -bourbonene can be performed by cationic cyclization, as shown in Scheme 4.

A total of 5 bicyclic, aromatic sesquiterpene hydrocarbons (21–25) with a cadinane skeleton were found in exocarp of the grape variety Lemberger, whose identity were confirmed by feeding experiments (Figure 6).

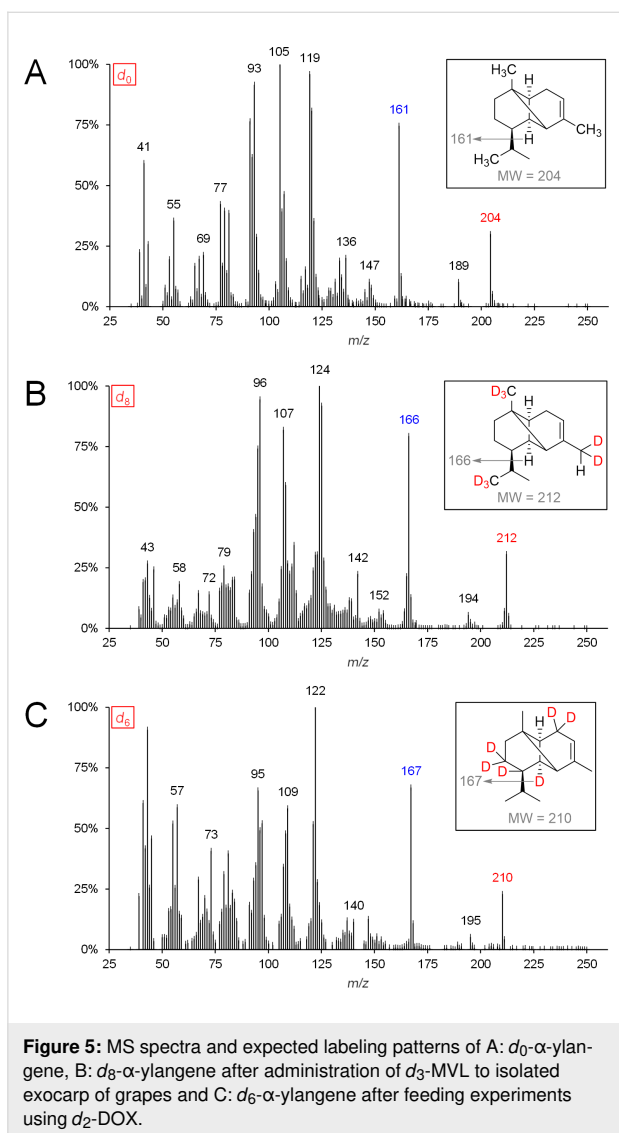
The biosynthesis of the five aromatic sesquiterpene hydrocarbons mentioned is still unknown, but we were able to deter-

mine the isotopologues with the highest, possible incorporation of deuterium when d_3 -MVL is used as precursor.

Figure 7 shows the mass spectrum of genuine (d_0) and deuterium-labeled (d_8) calamenene (isomer) as well as α -calacorene.

Biosynthesis of sesquiterpene hydrocarbons via germacrene A

Faraldos et al. showed that β -elemene is formed by Cope rearrangement when a solution of germacrene A in toluene is heated at reflux [36]. The formation of elemenes requires temperatures >100 °C, so that this reaction cannot take place in the



cell, but it must be assumed that these are artifacts of the GC analysis [37]. Nevertheless, elemenes indicate the presence of the corresponding germacrene, as shown by the example of β -elemene and germacrene A (Figure 8 and Scheme 5).

The biosynthesis pathway postulated by Steele et al. for the formation of α -guaiene could also be confirmed [9]. The 2D separation of the sesquiterpene hydrocarbons β -elemene and α -guaiene can be found in Supporting Information File 3. Tantillo suggested the synthesis of (+)-valencene from germacrene A [11]. This biosynthetic pathway could also be confirmed by feeding experiments.

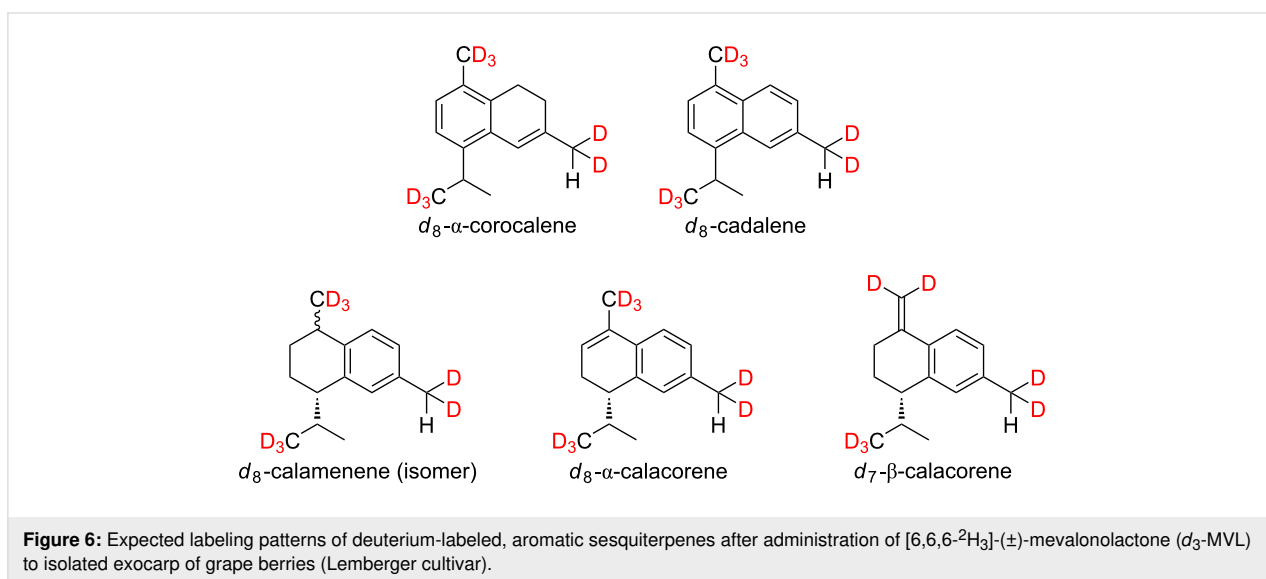
The formation of the three aforementioned sesquiterpene hydrocarbons takes place without deuterium loss, so that with the use of d_3 -MVL as precursor (Scheme 5) nine deuterium atoms and with the use of d_2 -DOX six deuterium atoms were incorporated at most. This data indicates that the biosynthesis of β -elemene, (+)-valencene and α -guaiene is achieved via germacrene A.

Biosynthesis of sesquiterpene hydrocarbons via (*E,E*)-germacrene B

The mechanisms proposed by Steele et al. for the formation of selina-3,7(11)-diene and γ -elemene via (*E,E*)-germacrene B are consistent with our results (Scheme 6) [9]. In Figure 9 the recorded mass spectra of d_0 - γ -elemene and d_9 - γ -elemene are shown as examples.

Biosynthesis of guaiazulene, δ -elemene, guaia-6,9-diene and δ -selinene

The formation of the aromatic sesquiterpene guaiazulene is still unknown. Our feeding experiments with the precursor d_3 -MVL



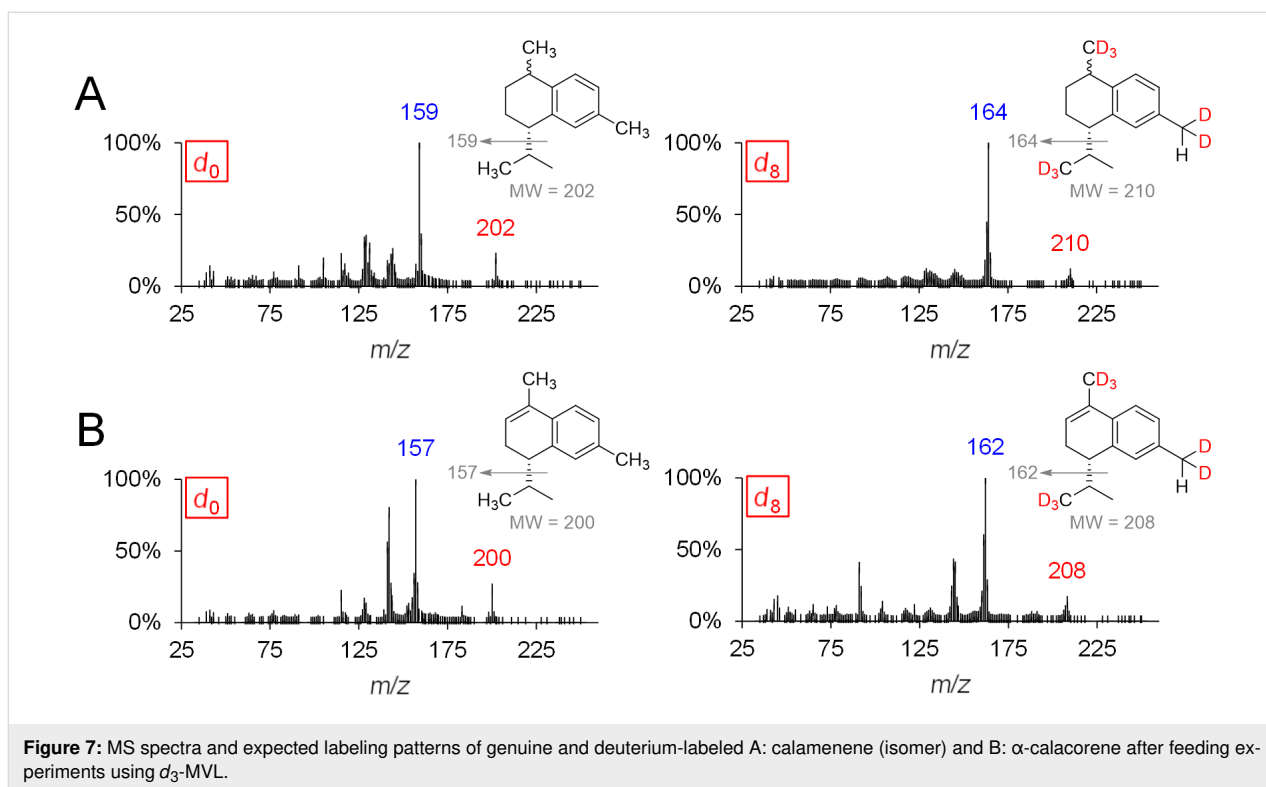


Figure 7: MS spectra and expected labeling patterns of genuine and deuterium-labeled A: calamenene (isomer) and B: α -calacorene after feeding experiments using d_3 -MVL.

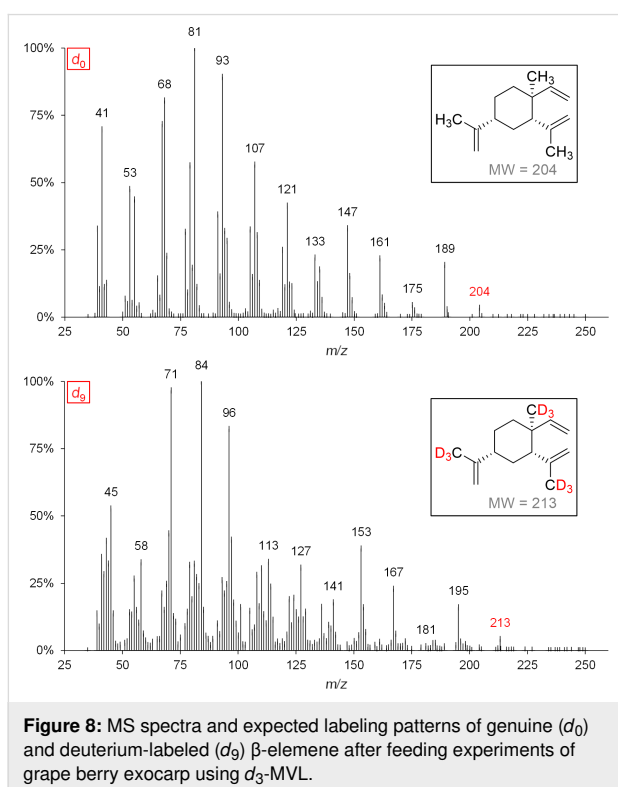


Figure 8: MS spectra and expected labeling patterns of genuine (d_0) and deuterium-labeled (d_9) β -elemene after feeding experiments of grape berry exocarp using d_3 -MVL.

show that no deuterium loss is to be expected during the biosynthesis of guaiazulene in grapes, and that a maximum of 9 deuterium atoms are incorporated into guaiazulene (Figure 10).

The biosynthesis of guaiazulene could be performed via germacrene C (Scheme 7).

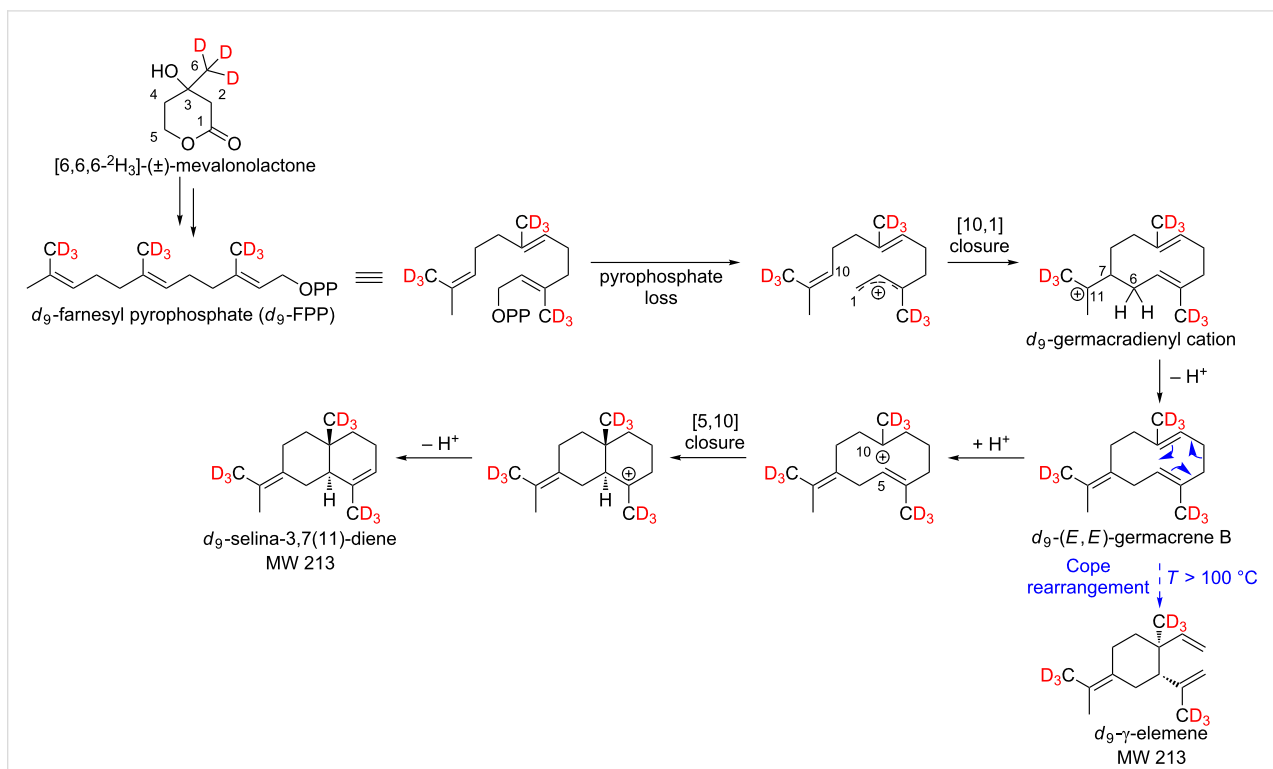
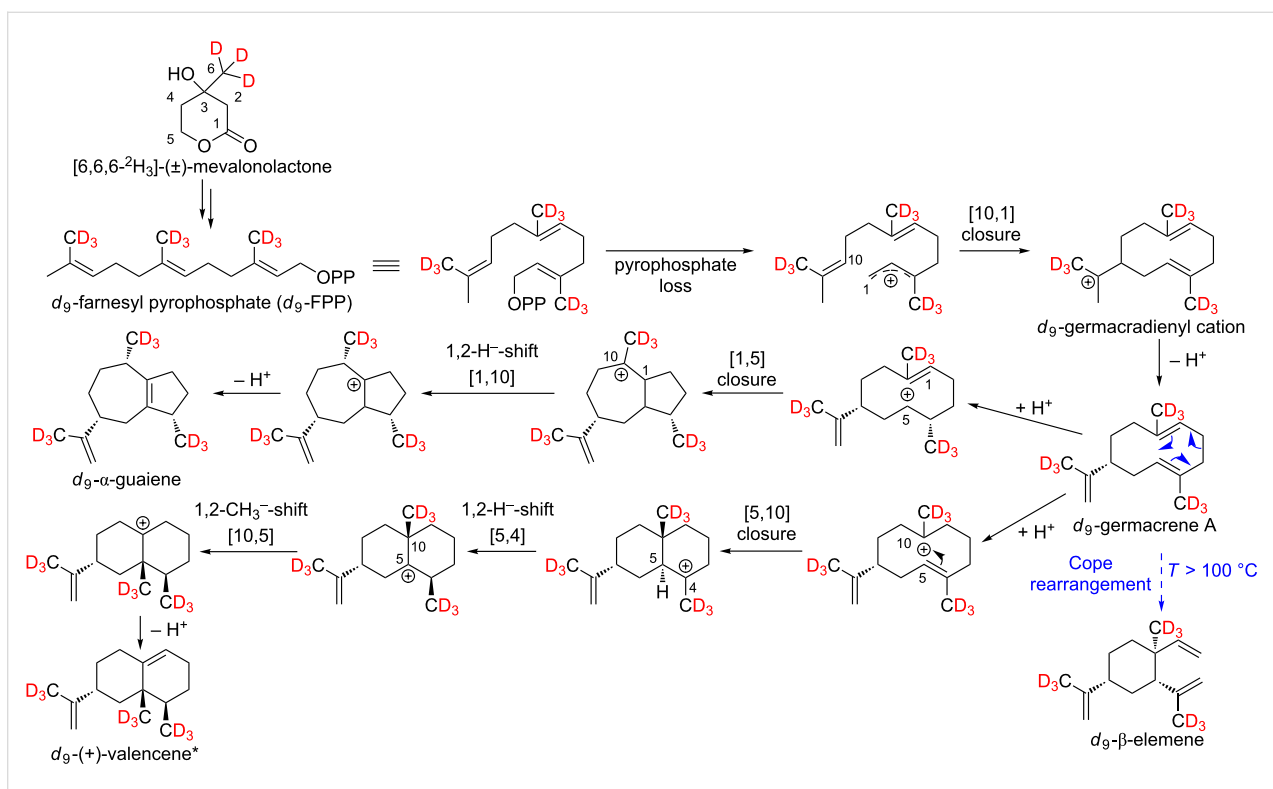
It is conceivable that double bonds are introduced by desaturases in multistage reactions to form the aromatic compound guaiazulene. The participation of desaturases in the formation of aromatic terpenes was already described in 1978 by Poulou et al. explaining the conversion of γ -terpinene to *p*-cymene [38].

May described the formation of δ -elemene from germacrene C via Cope rearrangement [32]. Considering that high temperatures are required for this reaction, our results also indicate that δ -elemene may be formed from germacrene C. The mechanisms described by Steele et al. for the formation of guaia-6,9-diene and δ -selinene via germacrene C could also be confirmed by feeding experiments (Scheme 7) [9].

Biosynthesis of (*E*)- β -caryophyllene and α -humulene

The biosynthetic pathway postulated by Boland and Garms for the formation of (*E*)- β -caryophyllene from farnesyl pyrophosphate (FPP) is consistent with our feeding experiments (Scheme 8) [29].

The incorporation of deuterium atoms into (*E*)- β -caryophyllene during biosynthesis is shown by the following mass spectra (Figure 11).



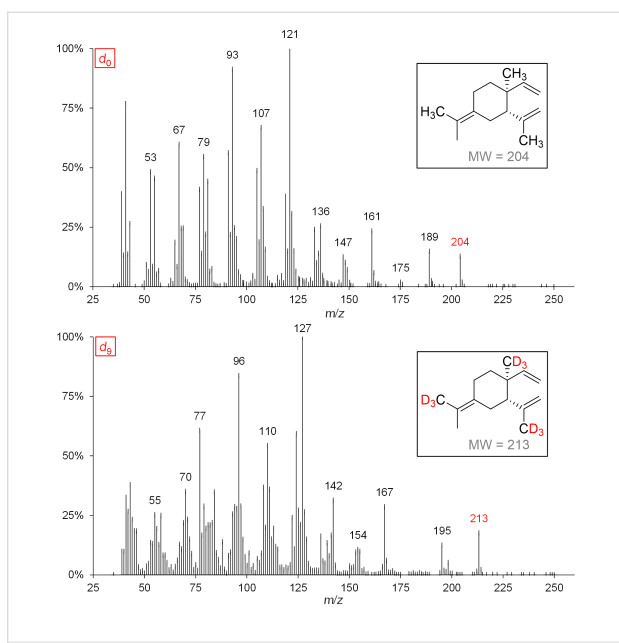


Figure 9: Mass spectra and associated structural formulas of d_0 - γ -elemene and d_9 - γ -elemene after administration of [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries (Lemberger cultivar).

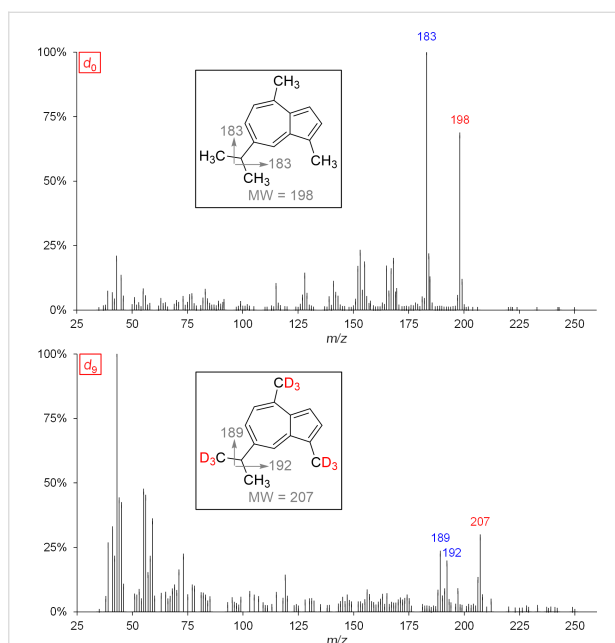
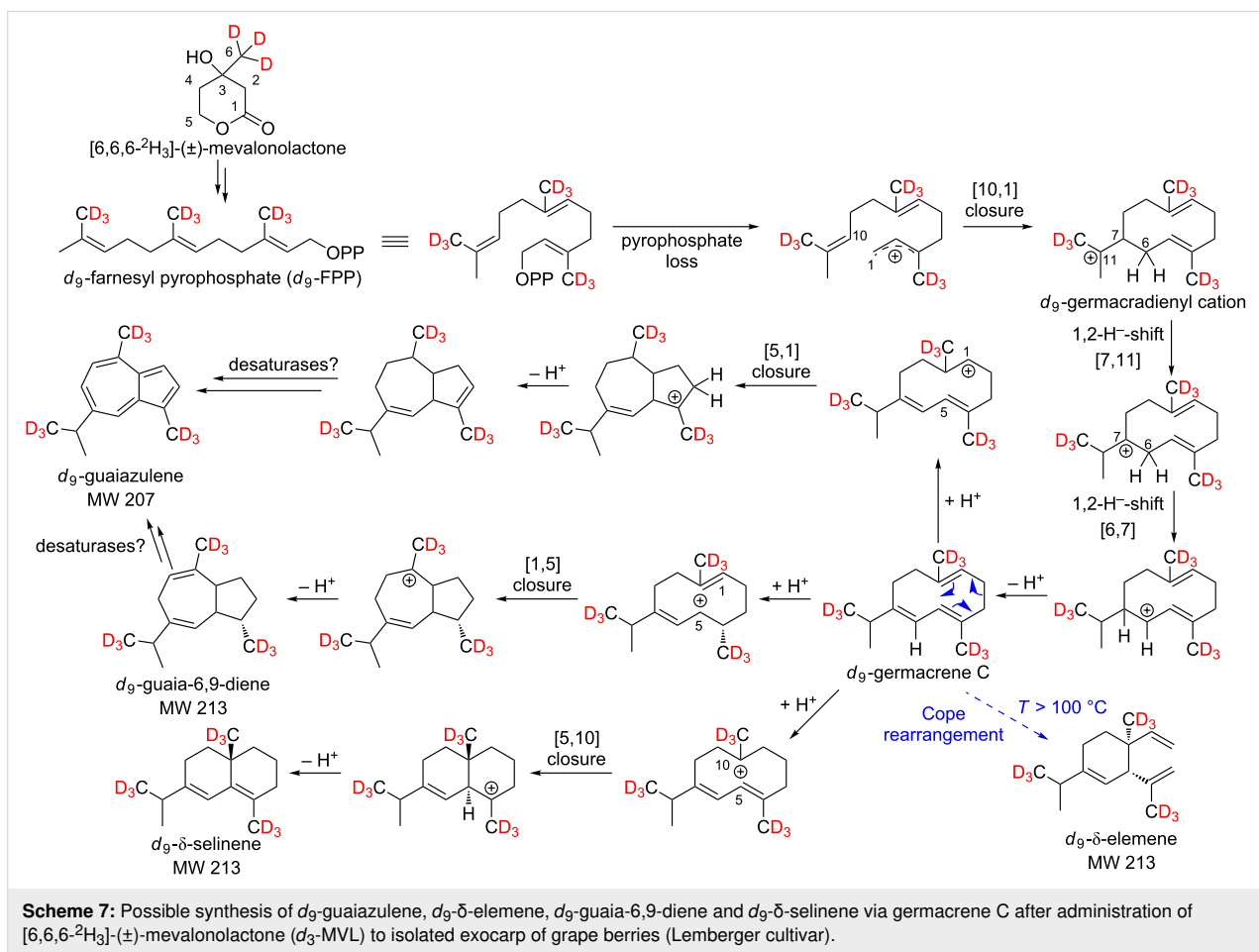
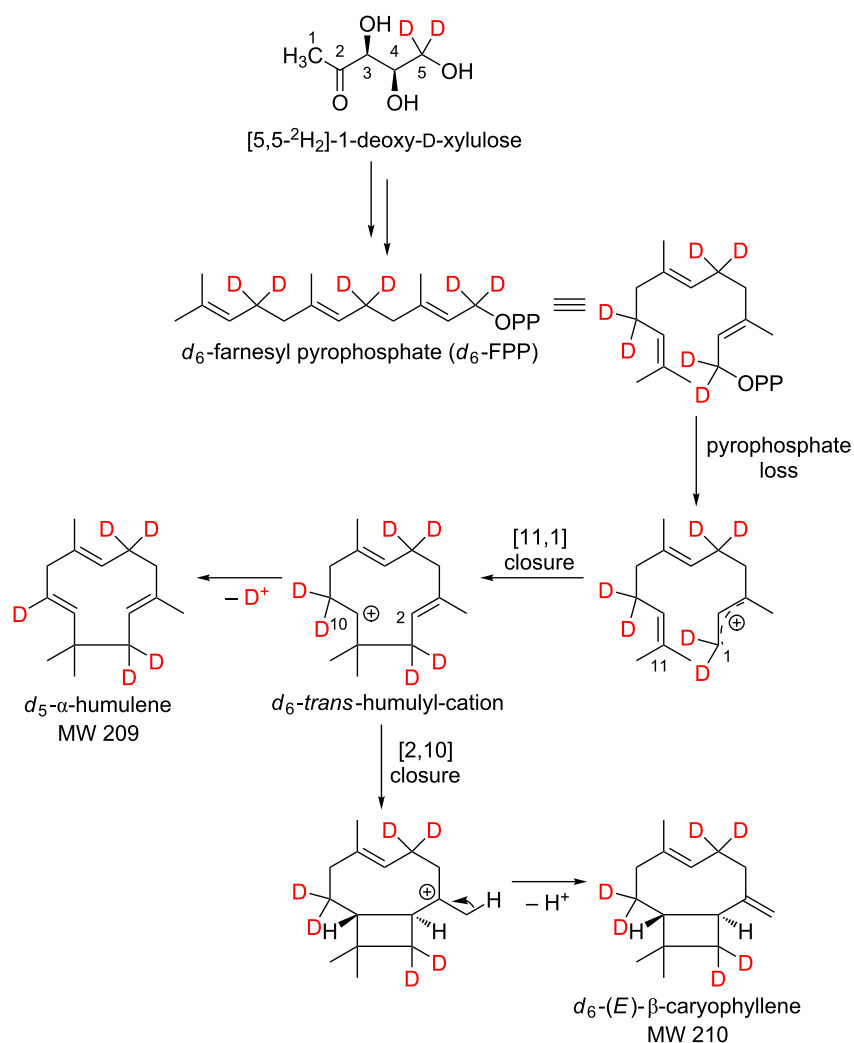


Figure 10: MS spectra and expected labeling patterns of genuine (d_0) and deuterium-labeled (d_9) guaiazulene after feeding experiments of grape berry exocarp using [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone.



Scheme 7: Possible synthesis of d_9 -guaiazulene, d_9 - δ -elemene, d_9 -guaia-6,9-diene and d_9 - δ -selinene via germacrene C after administration of [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries (Lemberger cultivar).



Scheme 8: Possible biosynthesis of d_6 -(*E*)- β -caryophyllene and d_5 - α -humulene starting from farnesyl pyrophosphate (FPP) after administration of [5,5- $^2\text{H}_2$]-1-deoxy-D-xylulose (d_2 -DOX) to isolated exocarp of grape berries (Lemberger cultivar).

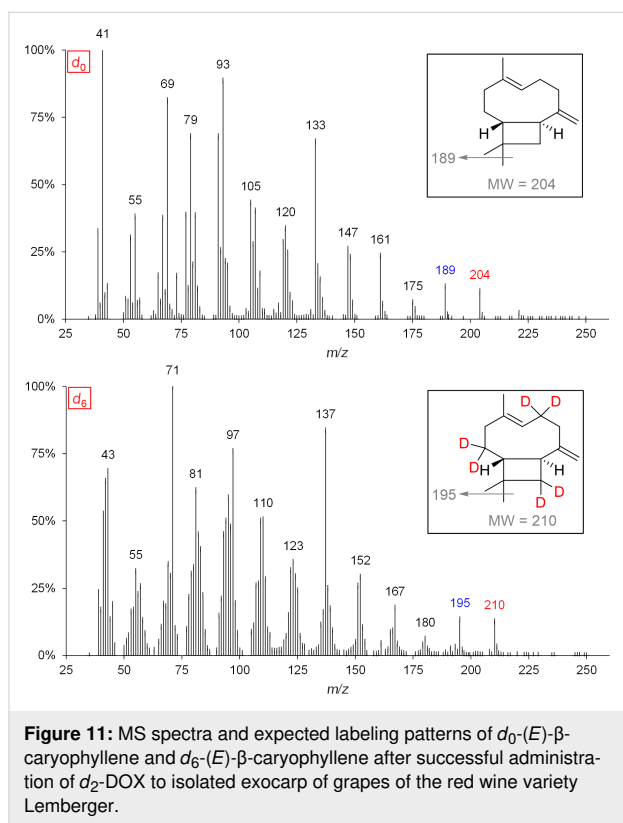
The assumed biosynthetic pathway for the formation of (*E*)- β -caryophyllene after administration of the precursor [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) can be found in Supporting Information File 4.

Steele et al. described the formation of α -humulene via a *trans*-humulyl cation [9]. This metabolic pathway could also be confirmed by feeding experiments.

Conclusion

In summary, 25 sesquiterpene hydrocarbons were found in the exocarp of ripe grapes (*Vitis vinifera* L.) of the red wine variety Lemberger. The unequivocal identification of these structurally complex natural compounds was performed by combining multidimensional gas chromatography with in vivo labeling

using the stable isotope-labeled precursors [5,5- $^2\text{H}_2$]-1-deoxy-D-xylulose (d_2 -DOX) and [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL). Based on the recorded mass spectra of genuine sesquiterpene hydrocarbons and their deuterated analogs, the respective labeling patterns were deduced. Subsequently, it was examined whether the multistage cyclization reactions for the formation of sesquiterpene hydrocarbons postulated so far are consistent with our data. Contrary to previous assumptions, it could be shown that the tricyclic compounds α -copaene and β -copaene may be biosynthesized via (*S*)-(-)-germacrene D, whereas their stereoisomers α -ylangene and β -ylangene are formed via (*R*)-(+)-germacrene D. Furthermore, our results showed that the isomeric compounds α -cubebene and β -cubebene are also formed via (*S*)-(-)-germacrene D. In addition, 6 aromatic sesquiterpene hydrocarbons from the head-



space of grape berry exocarp of the red wine variety Lemberger were confirmed by *in vivo* labeling.

Experimental

Plant material

Ripe grape berries of the red wine variety Lemberger also called Blauer Limberger (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*, clone 1Gm) from the Hochschule Geisenheim University (Geisenheim, HE, Germany), harvested at the beginning of September 2018, were analyzed. The grapes were transported directly after the harvest to the University of Bonn (Bonn, NW, Germany) for sample preparation.

Chemicals

The sesquiterpene biosynthesis precursor [5,5- $^2\text{H}_2$]-1-deoxy-D-xylulose (d_2 -DOX) was synthesized according to Meyer et al. [39], while [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) was purchased from C/D/N Isotopes Inc. (Pointe-Claire, Quebec, Canada). Retention indices were calculated using a C_7 – C_{30} saturated alkanes standard solution obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.).

The analytical standard (+)-valencene (purity: 80.0%) was also acquired by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). Guaiazulene (purity: 99.8%) was purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, U.S.A.). Water for dilutions was purified using a

Milli-Q water purification system (Merck Millipore, Billerica, MA, U.S.A.). Parafilm[®] M was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) to seal the sample vials to prevent the possible evaporation of volatile analytes.

SPME-Fiber

A divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm) SPME fiber from Supelco (Bellefonte, PA, U.S.A.) was used.

Sample preparation

Sample preparation was based on a slightly modified method described by May, Lange and Wüst [5]. The exocarp of freshly harvested grapes was isolated with a scalpel. One hundred μL of a 0.1% d_3 -MVL solution were pipetted into a 10 mL headspace vial and the isolated exocarp was inserted into the solution using tweezers. Similarly, the isolated exocarps of wineberries were placed in 100 μL of a 0.1% d_2 -DOX solution. The filled 10 mL headspace vials were closed with screw cap, septum and parafilm. The fed sample material was incubated at room temperature for exactly 48 hours. Subsequently, the samples were stored at -20°C until measurement. The SPME extraction conditions were based on a slightly modified method described by Welke et al. [17]. Prior to SPME extraction, the samples were held at an incubation temperature of 45°C for 10 min without stirring. The extraction was carried out at 45°C for 30 min. After sampling the headspace using a mixed fiber, the volatile and semi-volatile compounds were desorbed in the GC inlet at 250°C for 5 min. In order to avoid carryover, the fiber was reconditioned for 15 min at 250°C prior to each analysis. No sample carryover was observed.

GC \times GC–TOF–MS analysis

All chromatographic separations were performed by using an Agilent 7890B gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.) equipped with a liquid nitrogen cryogenic modulator (Consumable-Free ZX2 thermal modulator) coupled to a time-of-flight mass spectrometer (Markes International Ltd, Llantrisant, RCT, UK). Liquid nitrogen was used for cryofocusing of the analytes eluting from the first dimension (1D) column, whereas heated air was used for releasing and reinjecting these compounds onto the second dimension (2D) column. A modulation period of 5 s and a hot jet duration of 0.35 s were used. The column set consisted of a 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm d_f DB-WAX Ultra Inert (Agilent Technologies, Bellefonte, PA, U.S.A.) as a high polar primary column with poly(ethylene glycol) as stationary phase coupled to a 1.7 m \times 0.10 mm i.d. \times 0.10 μm d_f MEGA-17 MS FAST (MEGA s.n.c., Legnano, MI, IT) moderately polar second dimension with poly(50%-phenyl-50%-methylsiloxane) as stationary phase. The separation was performed using the

following temperature program: 1D oven ramp: 35 °C (5 min), 5 °C min⁻¹ to 120 °C (0 min), 3 °C min⁻¹ to 220 °C (5 min); 2D oven ramp: 60 °C (5 min), 5 °C min⁻¹ to 145 °C (0 min), 3 °C min⁻¹ to 245 °C (5 min). The injector was operated at 250 °C in the splitless mode. Helium was used as carrier gas at a constant flow of 1.0 mL min⁻¹ and an initial inlet pressure of 166 kPa. The transfer line was maintained at 250 °C and the analytes were ionized by operating in electron impact (EI) mode at -70 eV. The ion source temperature was 250 °C and the detector voltage was set to -2236.8 V. Ions in the mass range 35–250 amu were acquired at a rate of 100 spectra s⁻¹. All samples were analyzed in triplicate.

Data analysis

Data processing was performed using the software ChromSpace (Markes International Ltd, Llantrisant, RCT, UK; version 1.2). First, a dynamic background compensation (dbc) was performed with a peak width of 2 s. The genuine sesquiterpene hydrocarbons were identified using the NIST Mass Spectral Search Program (NIST, Gaithersburg, MD, U.S.A.; version 2.2) by comparing the recorded mass spectra with those of the NIST database (when available), taking into account the match factors and reverse match factors. A series of *n*-alkanes (C₇–C₃₀) were analyzed. The retention times of the measured *n*-alkanes on the first GC column were used to calculate the retention indices *I* according to the method of Van Den Dool and Kratz for temperature-programmed gas chromatography [40]. Subsequently, the calculated retention indices of the identified sesquiterpenes were compared with literature values *I* (lit.). The confirmation of the found sesquiterpenes was done via the corresponding deuterium-labeled compounds starting from the precursors *d*₃-MVL and *d*₂-DOX after incubation.

Supporting Information

Supporting Information File 1

3D view of signals from genuine and deuterated α -cubebene, α -ylangene and δ -elemene after feeding experiments using *d*₃-MVL.

[<https://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-15-190-S1.pdf>]

Supporting Information File 2

Extracted ion chromatograms (EIC) of genuine (*d*₀), partially labeled (*d*₄, *d*₆) and fully deuterium-labeled (*d*₈) α -cubebene after administration of [6,6,6-²H₃]-(\pm)-mevalonolactone (*d*₃-MVL) to isolated exocarp of grape berries (Lemberger cultivar).

[<https://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-15-190-S2.pdf>]

Supporting Information File 3

Enlarged 2D chromatogram showing the separation of β -elemene, α -guaiene and β -ylangene.

[<https://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-15-190-S3.pdf>]

Supporting Information File 4

Putative formation pathway of *d*₈-(*E*)- β -caryophyllene and *d*₉- α -humulene starting from *d*₉-farnesyl pyrophosphate.

[<https://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-15-190-S4.pdf>]

Acknowledgements

The sample material was collected at the Department of Grapevine Breeding, Hochschule Geisenheim University. We would like to particularly thank E.-H. Rühl and B. May for their support. We also thank the DFG for financial support (INST 217/783-1 FUGG).

ORCID® IDs

Philipp P. Könen - <https://orcid.org/0000-0002-4847-7807>

Matthias Wüst - <https://orcid.org/0000-0001-6808-5555>

References

- Coelho, E.; Rocha, S. M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 204–214. doi:10.1016/j.aca.2005.11.018
- Schreier, P.; Drawert, F.; Junker, A. Z. *Lebensm.-Unters. Forsch.* **1976**, *160*, 271–274. doi:10.1007/bf01132291
- Breitmaier, E. *Terpenes. Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2006. doi:10.1002/9783527609949
- Wood, C.; Siebert, T. E.; Parker, M.; Capone, D. L.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vössing, T.; Widder, S.; Krammer, G.; Sefton, M. A.; Herderich, M. J. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3738–3744. doi:10.1021/jf800183k
- May, B.; Lange, B. M.; Wüst, M. *Phytochemistry* **2013**, *95*, 135–144. doi:10.1016/j.phytochem.2013.07.021
- Bloch, K. *Science* **1965**, *150*, 19–28. doi:10.1126/science.150.3692.19
- Flesch, G.; Rohmer, M. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *175*, 405–411. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14210.x
- May, B.; Wüst, M. Sesquiterpene profiles of different grape varieties. In *Advances and Challenges in Flavor Chemistry & Biology*; Hofmann, T.; Meyerhof, W.; Schieberle, P., Eds.; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie: Freising, Germany, 2011; pp 323–327.
- Steele, C. L.; Crock, J.; Bohlmann, J.; Croteau, R. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2078–2089. doi:10.1074/jbc.273.4.2078
- Martin, D. M.; Aubourg, S.; Schouwey, M. B.; Daviet, L.; Schalk, M.; Toub, O.; Lund, S. T.; Bohlmann, J. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 226. doi:10.1186/1471-2229-10-226
- Tantillo, D. J. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1035–1053. doi:10.1039/c1np00006c
- Bülow, N.; König, W. A. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 141–168. doi:10.1016/s0031-9422(00)00266-1

13. Liu, Z.; Phillips, J. B. *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, *29*, 227–231. doi:10.1093/chromsci/29.6.227
14. Meinert, C.; Meierhenrich, U. J. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10610–10621. doi:10.1002/ange.201200842
15. Robinson, A. L.; Boss, P. K.; Heymann, H.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 504–517. doi:10.1016/j.chroma.2010.11.008
16. Weldegergis, B. T.; Crouch, A. M.; Górecki, T.; de Villiers, A. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *701*, 98–111. doi:10.1016/j.aca.2011.06.006
17. Welke, J. E.; Manfroi, V.; Zanus, M.; Lazarotto, M.; Alcaraz Zini, C. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1226*, 124–139. doi:10.1016/j.chroma.2012.01.002
18. Birkemeyer, C.; Luedemann, A.; Wagner, C.; Erban, A.; Kopka, J. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 28–33. doi:10.1016/j.tibtech.2004.12.001
19. Paolini, J.; Costa, J.; Bernardini, A.-F. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1076*, 170–178. doi:10.1016/j.chroma.2005.03.131
20. Gränicher, F.; Christen, P.; Kapetanidis, I. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1421–1424. doi:10.1016/0031-9422(95)00492-p
21. Blanc, M.-C.; Bradesi, P.; Gonçalves, M. J.; Salueiro, L.; Casanova, J. *Flavour Fragrance J.* **2006**, *21*, 324–332. doi:10.1002/ffj.1605
22. Duquesnoy, E.; Dinh, N. H.; Castola, V.; Casanova, J. *Flavour Fragrance J.* **2006**, *21*, 453–457. doi:10.1002/ffj.1676
23. Cavalli, J.-F.; Tomi, F.; Bernardini, A.-F.; Casanova, J. *Flavour Fragrance J.* **2006**, *21*, 111–114. doi:10.1002/ffj.1531
24. Shimizu, Y.; Imayoshi, Y.; Kato, M.; Maeda, K.; Iwabuchi, H.; Shimomura, K. *Flavour Fragrance J.* **2009**, *24*, 251–258. doi:10.1002/ffj.1938
25. Cavalli, J.-F.; Tomi, F.; Bernardini, A.-F.; Casanova, J. *Flavour Fragrance J.* **2003**, *18*, 532–538. doi:10.1002/ffj.1263
26. Brat, P.; Rega, B.; Alter, P.; Reynes, M.; Brillouet, J.-M. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3442–3447. doi:10.1021/jf026226y
27. Gonny, M.; Cavaleiro, C.; Salueiro, L.; Casanova, J. *Flavour Fragrance J.* **2006**, *21*, 99–106. doi:10.1002/ffj.1527
28. Matucha, M.; Jockisch, W.; Verner, P.; Anders, G. *J. Chromatogr.* **1991**, *588*, 251–258. doi:10.1016/0021-9673(91)85030-j
29. Boland, W.; Garms, S. *Flavour Fragrance J.* **2010**, *25*, 114–116. doi:10.1002/ffj.1979
30. Rinkel, J.; Rabe, P.; Garbeva, P.; Dickschat, J. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 13593–13596. doi:10.1002/anie.201608042
31. Arigoni, D. *Pure Appl. Chem.* **1975**, *41*, 219–245. doi:10.1351/pac197541010219
32. May, B. Biosynthese und Analytik von Sesquiterpenen in Weinbeeren (*Vitis vinifera*). Ph.D. Thesis, University of Bonn, Bonn, Germany, 2015. <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2016/4356/4356.pdf>
33. Schmidt, C. O.; Bouwmeester, H. J.; Franke, S.; König, W. A. *Chirality* **1999**, *11*, 353–362. doi:10.1002/(sici)1520-636x(1999)11:5/6<353::aid-chir2>3.0.co;2-l
34. Lodewyk, M. W.; Gutta, P.; Tantillo, D. J. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6570–6579. doi:10.1021/jo800868r
35. Yoshihara, K.; Ohta, Y.; Sakai, T.; Hirose, Y. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 2263–2264. doi:10.1016/s0040-4039(01)88136-3
36. Faraldos, J. A.; Wu, S.; Chappell, J.; Coates, R. M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7733–7742. doi:10.1016/j.tet.2007.04.037
37. Dickschat, J. S.; Celik, E.; Brock, N. L. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 900–910. doi:10.3762/bjoc.14.77
38. Poulouse, A. J.; Croteau, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *187*, 307–314. doi:10.1016/0003-9861(78)90039-5
39. Meyer, O.; Hoeffler, J.-F.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 12153–12162. doi:10.1016/j.tet.2004.10.016
40. van Den Dool, H.; Dec. Kratz, P. *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463–471. doi:10.1016/s0021-9673(01)80947-x

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). Please note that the reuse, redistribution and reproduction in particular requires that the authors and source are credited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (<https://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at: doi:10.3762/bjoc.15.190

2.1.4 Supporting Information: *Beilstein J. Org. Chem.* (2019)

Es folgt die Supporting Information zu:

Könen, P. P.; Wüst, M. Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS). *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 1945–1961.
[doi:10.3762/bjoc.15.190](https://doi.org/10.3762/bjoc.15.190)



Supporting Information

for

Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS)

Philipp P. Könen and Matthias Wüst

Beilstein J. Org. Chem. **2019**, *15*, 1945–1961. [doi:10.3762/bjoc.15.190](https://doi.org/10.3762/bjoc.15.190)

3D view of signals from genuine and deuterated α -cubebene, α -ylangene and δ -elemene after feeding experiments using d_3 -MVL

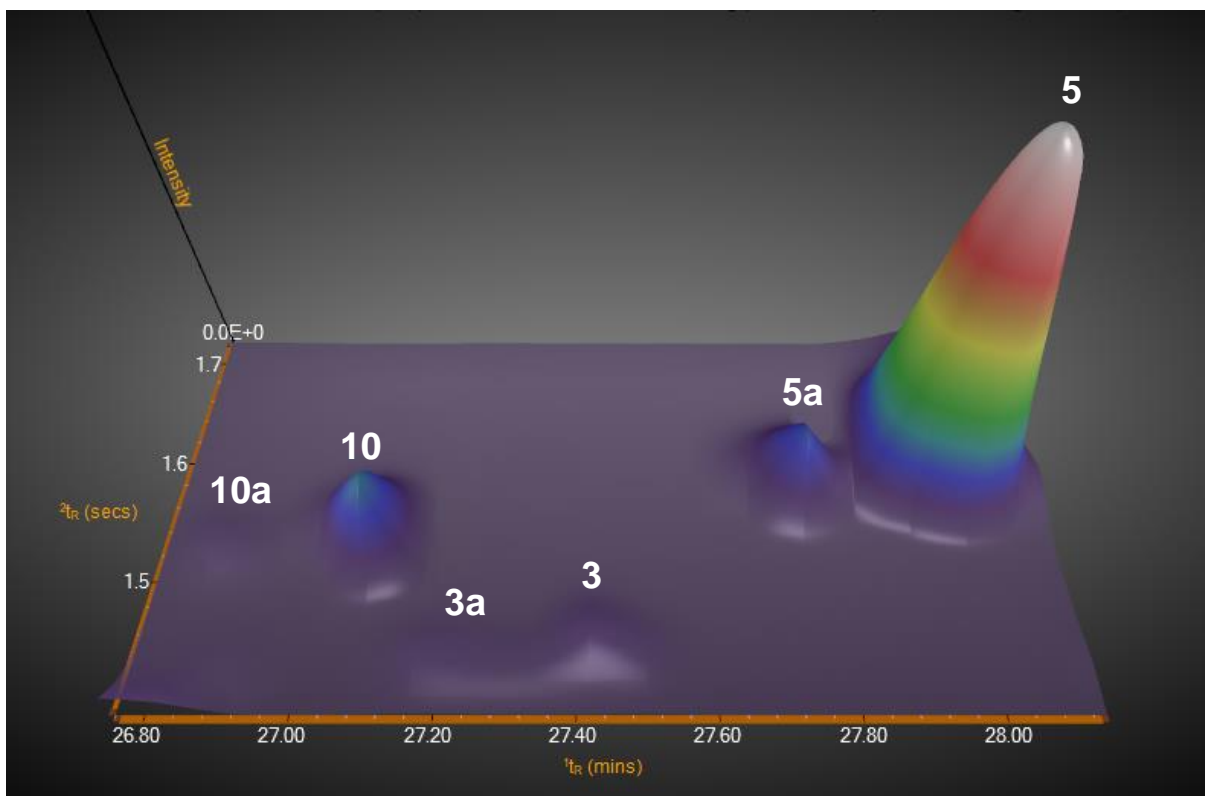


Figure S1: Section of a surface chart (TIC) of a HS-SPME–GC×GC–TOF–MS measurement of genuine sesquiterpene hydrocarbons and their deuterated isotopologues after feeding grape berry exocarp of the grape variety Lemberger with d_3 -MVL. The data is displayed in 3D format, so that the signal intensities are represented in the form of conical signals. Shown are the signals of the two tricyclic sesquiterpene hydrocarbons α -cubebene (d_0 , **10**; d_8 , **10a**) and α -ylangene (d_0 , **5**; d_8 , **5a**) as well as the monocyclic compound δ -elemene (d_0 , **3**; d_9 , **3a**).

Supporting Information

for

Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS)

Philipp P. Könen and Matthias Wüst

Beilstein J. Org. Chem. **2019**, *15*, 1945–1961. doi:10.3762/bjoc.15.190

Extracted ion chromatograms (EIC) of genuine (d_0), partially labeled (d_4 , d_6) and fully deuterium-labeled (d_8) α -cubebene after administration of [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries (Lemberger cultivar)

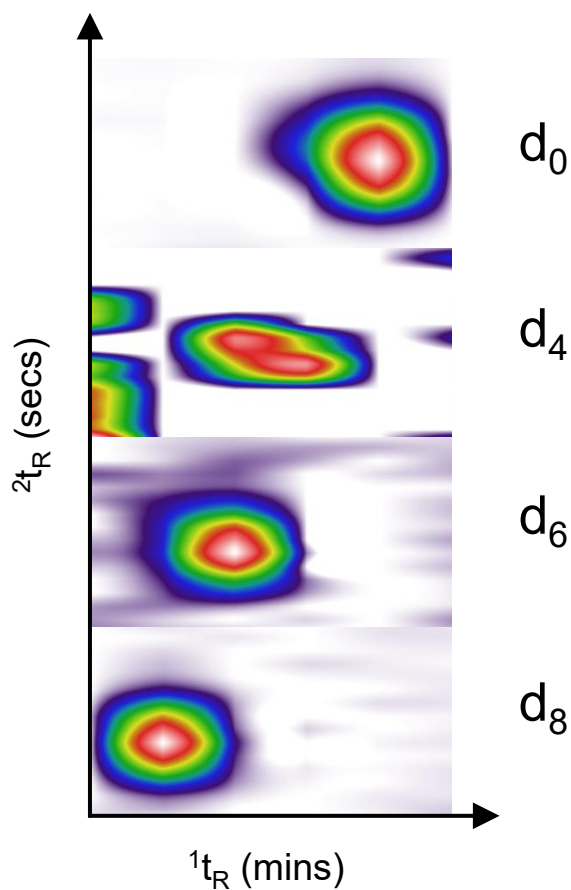


Figure S2: Enlarged sections of a GC×GC chromatogram showing the detected peaks (blobs) of genuine (d_0), partially labeled (d_4 , d_6) and fully deuterium-labeled (d_8) α -cubebene after feeding experiments using d_3 -MVL. The individual contour plots were obtained by selecting the corresponding mass-to-charge ratios: $m/z = 204$ (d_0), $m/z = 208$ (d_4), $m/z = 210$ (d_6) and $m/z = 212$ (d_8). The gas chromatographic separation of the shown isotopologues is due to the inverse isotope effect, whereby compounds with higher deuterium incorporation elute earlier.



Supporting Information

for

Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS)

Philipp P. Könen and Matthias Wüst

Beilstein J. Org. Chem. **2019**, *15*, 1945–1961. [doi:10.3762/bjoc.15.190](https://doi.org/10.3762/bjoc.15.190)

Enlarged 2D chromatogram showing the separation of β -elemene, α -guaiene and β -ylangene

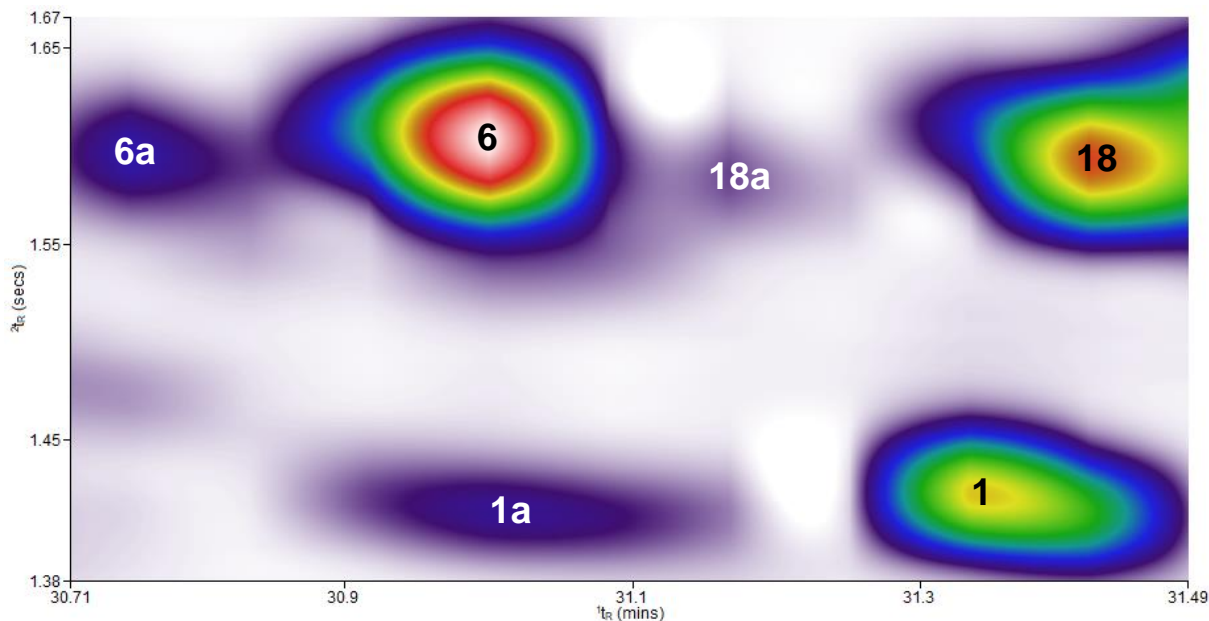


Figure S3: Enlarged, two-dimensional contour plot after successful administration of d_3 -MVL to isolated exocarp of grapes of the red wine variety Lemberger. The regions labeled with the numbers **6**, **18** and **1** correspond to the genuine sesquiterpenes β -ylangene, α -guaiene and β -elemene. **6a** (d_8), **18a** (d_9) and **1a** (d_9) are the isotopologues with the highest, possible incorporation of deuterium when d_3 -MVL is used as precursor (the maximum possible number of deuterium atoms incorporated is given in brackets).



Supporting Information

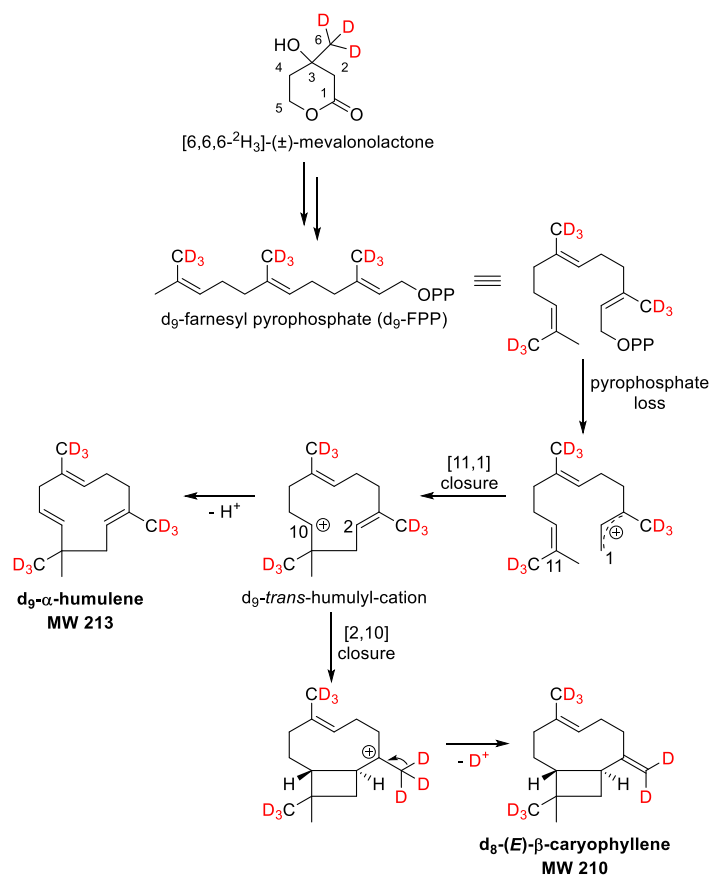
for

Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS)

Philipp P. Könen and Matthias Wüst

Beilstein J. Org. Chem. **2019**, *15*, 1945–1961. [doi:10.3762/bjoc.15.190](https://doi.org/10.3762/bjoc.15.190)

Putative formation pathway of d_8 -(*E*)- β -caryophyllene and d_9 - α -humulene starting from d_9 -farnesyl pyrophosphate



Scheme S1: Possible formation of the sesquiterpene hydrocarbons *d*₈-(*E*)-β-caryophyllene and *d*₉-α-humulene in grapes from *d*₉-farnesyl pyrophosphate (*d*₉-FPP). The assumed structural formulas of *d*₈-(*E*)-β-caryophyllene and *d*₉-α-humulene are based on feeding experiments of isolated exocarp of the grape variety Lemberger using *d*₃-MVL.

2.2 Kapitel II: Untersuchung des Einflusses der Weinhefe auf das Sesquiterpen-Profil während der Vinifikation und Ermittlung potentieller Markersubstanzen

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Könen, P. P.; Wüst, M. Dissecting Sesquiterpene Profiles of Lemberger Red Wines Using Ex Vivo Tissue Deuterium-Labeling and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–Time-of-Flight–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, 68, 8936–8941. [doi:10.1021/acs.jafc.0c03273](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03273)

2.2.1 Einführung

Weinbetrug ist seit langer Zeit ein weit verbreitetes Problem. Der Betrug reicht von verbotenen Zusätzen bis hin zu irreführender Kennzeichnung.^[156] Getäuscht wird der Verbraucher nicht selten durch falsche Rebsortenangaben auf dem Etikett einer Weinflasche. Es bedarf daher Methoden, die eine Rebsortenbestimmung von Weinen anhand sortentypischer Verbindungen (Marker) ermöglichen.

Sesquiterpene sind vielversprechende Analyten für diese Aufgabe. Zum einen sind die Sesquiterpen-Profile reifer Weinbeeren rebsortenspezifisch,^[125] zum anderen sind Sesquiterpene nicht nur in Weinbeeren, sondern auch in Weinen vorhanden und mittels moderner Analyseverfahren im Spurenbereich nachweisbar.^[119,127,120] Zu berücksichtigen ist aber, dass Sesquiterpene in Weinen nicht ausschließlich dem Weinbeeren-Stoffwechsel entstammen. Auch Hefezellen, die die Umwandlung von Maische bzw. Most in Rot- bzw. Weißwein durch alkoholische Gärung erst ermöglichen, sind in der Lage Sesquiterpene zu produzieren. Bereits vor 40 Jahren konnte die Bildung von (*Z*)- und (*E*)-Nerolidol, sowie (*E,E*)-Farnesol durch Hefen in einem simulierten Weinkulturmedium bestehend aus Ethanol, Kaliumhydrogentartrat, Hefe-Stickstoffbasis, Hefe-Autolysat und Salzsäure nachgewiesen werden.^[133]

Sesquiterpencyclasen, die wie im Weinbeeren-Stoffwechsel mehrstufige Cyclisierungskaskaden katalysieren, kommen im Weinhefen-Stoffwechsel nicht vor. Weinhefen können damit keine komplexen, cyclischen Sesquiterpene auf enzymatischem Wege generieren. Die Fähigkeit der Hefezellen zur Bildung einfacher, acyclischer Sesquiterpen-Alkohole könnte dennoch Einfluss auf das Sesquiterpen-Profil eines Weines haben. Wie *in vitro*-Experimente zeigten, können Farnesol und Nerolidol ohne Beteiligung von Enzymen säurekatalytisch via Carbokationen in zahlreiche Sesquiterpene umgewandelt werden.^[135]

Unbekannt ist bisher, ob das Sesquiterpen-Profil während der Vinifikation durch Nerolidol und Farnesol, die dem Stoffwechsel der Weinhefen entstammen und anschließend säurekatalytisch umgesetzt werden, signifikant verändert wird. Zudem ist nicht erforscht, ob im Wein Sesquiterpene nachweisbar sind, die eindeutig dem Weinbeeren-Stoffwechsel zugeordnet werden können und somit als potentielle Rebsortenmarker in Frage kommen. Die Beantwortung dieser Fragen ist essentiell, um den Weg hin zu einer Rebsortenbestimmung von Weinen anhand sortentypischer, traubeneigener Sesquiterpene zu ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher mittels Markierungs- und Fermentationsexperimenten den Einfluss des Weinhefe-Stoffwechsels auf das Sesquiterpen-Profil eines Weins zu untersuchen und traubeneigene Sesquiterpene als potentielle Marker der analysierten Rebsorte zu ermitteln.

2.2.2 Zusammenfassung

In diesem Projekt wurde anhand von Markierungsexperimenten und Modellweinen untersucht, ob der Stoffwechsel von Weinhefen (*S. cerevisiae*) das Sesquiterpen-Profil während der Weinbereitung durch die Generierung der Sesquiterpen-Präkursoren Farnesol und Nerolidol signifikant verändern kann. In Modellweinen der Rebsorte Lemberger (*V. vinifera* subsp. *vinifera*) nachweisbare Sesquiterpene wurden dabei hinsichtlich ihres Ursprungs analysiert und ihre Eignung als potentielle Rebsortenmarker geprüft. Abschließend wurden authentische, sortenreine Lemberger-Weine unterschiedlicher Jahrgänge auf die Anwesenheit dieser potentiellen Marker hin untersucht.

Zunächst konnte durch Messungen mittels HS-SPME–GC×GC–TOF–MS bestätigt werden, dass in angesäuerten, wässrigen Lösungen von Farnesol oder Nerolidol zahlreiche säurekatalytisch gebildete Sesquiterpene vorhanden sind. Bestätigt werden konnte ebenfalls, dass Hefen Sesquiterpen-Alkohole generieren. Nach Vergärung eines Ansatzes bestehend aus einem kommerziell erhältlichen *S. cerevisiae* Hefestamm, Hefenährstoffen, D(+)-Glucose, D(–)-Fructose und Wasser, konnten Farnesol und Nerolidol identifiziert werden. Darüber hinaus waren a-, mono- und polycyclische Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe nachweisbar, deren säurekatalytische Bildung aufgrund des durch die Gärung entstandenen sauren Milieus (pH 3,4) ermöglicht wurde.

Zur Untersuchung, ob diese dem Hefe-Stoffwechsel entstammenden Sesquiterpene das traubeneigene Sesquiterpen-Profil während der Weinherstellung signifikant verändern und zur Ermittlung potentieller Rebsortenmarker, wurden Mikrovinifikationsexperimente unter Verwendung von d_3 -MVL-inkubiertem Weinbeeren-Exokarp durchgeführt. Der Lemberger-Modellwein wurde aus diesen Beerenhäuten, einem kommerziell erhältlichen, im Weinbau eingesetzten *S. cerevisiae* Hefestamm, Hefenährstoffen, D(+)-Glucose, D(–)-Fructose und Wasser hergestellt und anschließend mittels HS-SPME–GC×GC–TOF–MS analysiert.

Im Modellwein konnten neben Farnesol und Nerolidol sowie den aus diesen Alkoholen säurekatalytisch gebildeten Produkten auch Sesquiterpene nachgewiesen werden, die bereits im Exokarp der lesereifen Lemberger-Weinbeeren eindeutig identifiziert wurden. Der Einsatz von d_3 -MVL ermöglichte die Rückverfolgbarkeit zur ursprünglichen Sesquiterpenquelle. Während unmarkierte Sesquiterpene sowohl dem Weinbeeren-Stoffwechsel als auch dem Hefe-Stoffwechsel entstammen konnten, mussten markierte Sesquiterpene dem Weinbeeren-Stoffwechsel entstammen. Über die Ermittlung des Peakhöhenverhältnisses eines genuinen Sesquiterpens (d_0) zum entsprechend maximal deuterierten Isotopologen (d_{max}) vor und nach der Mikrovinifikation konnte festgestellt werden, ob es während der Weinbereitung zu einem signifikanten Anstieg an genuinem Sesquiterpen gekommen war. Tatsächlich konnte für die Sesquiterpene δ -Cadinen, Calamenen, α -Calacoren, α -Corocalen und Cadalen nach der Mikrovinifikation ein Zuwachs der unmarkierten Komponente verzeichnet werden, der das Verhältnis

d_0/d_{\max} signifikant veränderte. Folgerichtig muss es zur säurekatalytischen Bildung dieser Sesquiterpene durch Umwandlung der Sesquiterpen-Präkursoren Farnesol und Nerolidol des Hefe-Stoffwechsels gekommen sein. Das rebsortentypische Sesquiterpen-Profil kann somit durch den Hefe-Stoffwechsel signifikant verändert werden.

Es konnten jedoch auch Sesquiterpene ermittelt werden, bei denen sich das Verhältnis d_0/d_{\max} nach der Mikrovinifikation nicht signifikant änderte und die damit als potentielle Rebsortenmarker für Lemberger-Weine in Frage kommen. Dabei handelte es sich um Guaia-6,9-dien, Guaiazulen, δ -Selinen, Selina-3,7(11)-dien und α -Ylängen.

Im Anschluss wurde überprüft, ob die potentiellen Marker in authentischen, sortenreinen Lemberger-Weinen nachweisbar sind. Dazu wurden Weine aus den Jahrgängen 2009, 2010, 2011, 2012, 2013 und 2018 untersucht. Zur Anreicherung der Sesquiterpene aus 100 mL Proben wurde der HS-SPME–GC \times GC–TOF–MS-Analyse eine SPE mit anschließender Destillation über eine Vigreux-Kolonnen vorgeschaltet. Die Verwendung von 1-Bromdecan als interner Standard ermöglichte zudem die Ermittlung des Konzentrationsbereichs der Analyten. In den Lemberger-Weinen konnten drei der potentiellen Marker, δ -Selinen (**51**), Selina-3,7(11)-dien (**52**) und Guaiazulen (**53**) im unteren $\mu\text{g/L}$ -Bereich bestimmt werden (Abbildung 11).

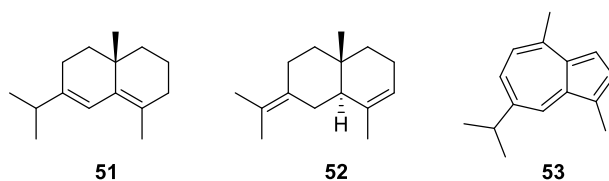


Abb. 11: Potentielle Markersubstanzen sortenreiner Lemberger-Weine.

δ -Selinen (**51**), Selina-3,7(11)-dien (**52**), Guaiazulen (**53**).

Zusammenfassend konnte durch Markierungs- und Mikrovinifikationsexperimente sowie durch den Einsatz der GC \times GC–TOF–MS gezeigt werden, dass Weinhefen das Sesquiterpen-Profil eines Weines signifikant beeinflussen können. Die dem Weinhefen-Stoffwechsel entstammenden Sesquiterpen-Alkohole Farnesol und Nerolidol werden dabei durch Säurekatalyse in eine Vielzahl von Sesquiterpenen umgewandelt. In Modellweinen der Rebsorte Lemberger konnten dennoch traubeneigene Sesquiterpene als potentielle Marker der analysierten Rebsorte ermittelt und drei dieser Verbindungen anschließend in authentischen, sortenreinen Lemberger-Weinen nachgewiesen werden. Die eingesetzte Methode ebnet damit den Weg für eine Rebsortenbestimmung von Weinen anhand ihrer Sesquiterpen-Profile.

2.2.3 Publikation: *J. Agric. Food Chem.* (2020)

Es folgt die Originalpublikation:

Könen, P. P.; Wüst, M. Dissecting Sesquiterpene Profiles of Lemberger Red Wines Using Ex Vivo Tissue Deuterium-Labeling and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–Time-of-Flight–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 8936–8941.
[doi:10.1021/acs.jafc.0c03273](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03273)

Dissecting Sesquiterpene Profiles of Lemberger Red Wines Using Ex Vivo Tissue Deuterium-Labeling and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–Time-of-Flight–Mass Spectrometry

Philipp P. Könen and Matthias Wüst*

Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 8936–8941

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: By means of ex vivo tissue deuterium-labeling using the stable isotope-labeled precursor [6,6-²H₃]-(\pm)-mevalonolactone and microvinification experiments, we were able to show for the first time that the three sesquiterpene hydrocarbons, guaiazulene, δ -selinene, and selina-3,7(11)-diene, in Lemberger red wines do not originate from acid-catalyzed cyclization of yeast-derived farnesol and nerolidol. The three aforementioned sesquiterpene hydrocarbons could be unambiguously identified as grape-derived secondary metabolites and can therefore be considered as variety-specific marker compounds. The analysis of sesquiterpene hydrocarbons in red wine samples was performed by solid-phase extraction–headspace solid-phase microextraction–comprehensive two-dimensional gas chromatography–time of flight–mass spectrometry. The developed methodology paves the way for an analytical verification of grape variety labeling in wine authenticity control.

KEYWORDS: wine, yeast, sesquiterpenes, microvinification, GC \times GC, isotope labeling

INTRODUCTION

Wine is one of the most widely counterfeited products in the world.^{1,2} It is therefore of economic interest to develop analytical methods for the varietal authentication of wines based on compound characteristics of the grape variety. Because each variety is characterized by its distinct aroma, which is composed of several hundred different volatile compounds in the ng/L to mg/L range, profiling of volatiles is frequently used for an analytical differentiation.³ One group of these compounds is sesquiterpenes, which have a C₁₅ skeleton and have been little studied when compared to monoterpenes in wine because of their relatively low concentration in the ppb range.⁴ The best-known example so far is the bicyclic ketone rotundone (1), which is responsible for the peppery aroma of the red wine variety Syrah (Figure 1).⁵

The fact that sesquiterpenes are present in grapes,^{6,7} as well as in the final product, the wine,^{8–10} makes them an interesting target for grape variety authentication. May was able to show that grape variety differentiation is possible on the basis of sesquiterpene profile analysis of ripe grapes.¹¹ Especially, Cabernet Sauvignon and Gewürztraminer were well separated

from Lemberger, Riesling, and Syrah, showing a rather similar sesquiterpene composition. However, it is not yet possible to establish a direct correlation between the sesquiterpene profiles of grapes and their corresponding monovarietal wines, as berries are not the only possible source of sesquiterpenes. For example, Fagan et al. showed that yeasts are able to produce the acyclic sesquiterpene precursors nerolidol (2) and farnesol (3) (Figure 1), which were detected in a simulated wine culture medium consisting of ethanol, potassium acid tartrate, yeast nitrogen base, yeast autolysate, and hydrochloric acid.¹²

Metabolic enzymes capable of subsequent formation of sesquiterpene hydrocarbons, ketones, and alcohols from 2 and 3 or their corresponding diphosphates have not yet been identified in yeast. However, the precursors can be converted in the model experiment in vitro into structurally diverse sesquiterpenes by acid catalysis, as shown for the formation of β -farnesene (4), α -farnesene (5), α -curcumene (6), and β -bisabolene (7) (Figure 2).¹³

It has not yet been clearly shown if, and to what extent, sesquiterpenes are formed through acid catalysis during the vinification from yeast-derived 2 and 3. Thus, the central question we have addressed in this study was whether yeast metabolism is capable of significantly altering the sesquiterpene profile of the corresponding wine by biosynthesis of

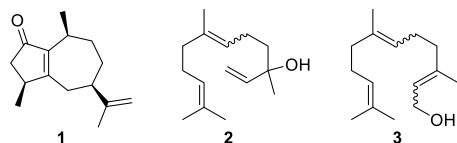


Figure 1. Structures of frequently occurring sesquiterpenes in wines: (–)-rotundone (1), nerolidol (2), and farnesol (3).

Received: May 26, 2020

Revised: July 24, 2020

Accepted: July 27, 2020

Published: July 27, 2020



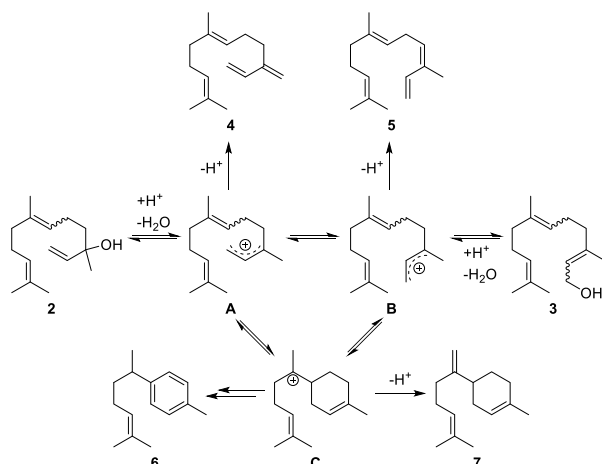


Figure 2. Acid-catalyzed conversion of nerolidol (2) and farnesol (3) via the nerolidyl cation (A), farnesyl cation (B), and bisabolyl cation (C). A 2D chromatogram of the purely acid-catalyzed, nonenzymatic reaction of nerolidol to further sesquiterpenes is shown in Figure S1.

farnesol and nerolidol, which can give rise to numerous other sesquiterpenes by nonenzymatic acid-catalyzed reactions during the vinification process.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Farnesol (mixture of isomers, purity: 98.0%), nerolidol (*cis* + *trans*, purity: 97.5%), guaiazulene (purity: 99.8%), and 1-bromodecane (purity: 98.3%) were obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). The monosaccharides D(+)-glucose and D(-)-fructose were acquired from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, BW, Germany). L(-)-malic acid was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, HE, Germany). The compounds (-)- α -cedrene (sum of enantiomers, purity: 96.4%), farnesene (mixture of isomers), (-)- α -bisabolol (analytical standard, purity: $\geq 93.0\%$), ethanol (purity: $>99.9\%$), and a C₇-C₃₀ saturated alkane standard solution (certified reference material) were acquired from Sigma-Aldrich (Steinheim, BW, Germany). Parafilm® M was also purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, BW, Germany). Methanol (purity: $>99.99\%$) was purchased from Honeywell (Muskegon, MI, USA) and dichloromethane (purity: 99.99%) from Fisher Scientific U.K. Limited (Loughborough, Leicestershire, UK). Water (for HPLC LC-MS grade) was acquired from VWR International S.A.S. (Fontenay-sous-Bois, Ile-de-France, France). The stable isotope-labeled sesquiterpene precursor [6,6,6-³H₃]-(\pm)-mevalonolactone (*d*₃-MVL) was obtained from C/D/N Isotopes Inc. (Pointe-Claire, Quebec, Canada). The pure yeast ECOFERM Basic (*Saccharomyces cerevisiae*) used for microvinification and the yeast nutrients Lallemand GO-FERM were purchased from ZEFÜG GmbH & Co. KG (Bingen, RP, Germany).

Sample Material. Grapes of the variety Lemberger, also called Blauer Limberger or Blaufränkisch, were collected at the Institute of Crop Science and Resource Conservation (INRES), University of Bonn. The refractometrically determined soluble solids at the time of harvest (September 28, 2019) were 17.9 °Bx, equivalent of a potential alcohol of 10% vol. The berries were processed immediately after harvest. Authentic Lemberger wines were provided by the Department of Grapevine Breeding, Hochschule Geisenheim University (Table S1). The wine bottles were stored away from light at a dry and cool place and sealed with parafilm after each sampling.

Ex Vivo Tissue Deuterium-Labeling Procedure. The freshly harvested grapes were carefully skinned with a scalpel at room temperature. A 0.1% *d*₃-MVL solution (100 μ L) was pipetted into a 10 mL headspace vial, and the isolated exocarp was placed into the solution with tweezers so that the bottom of the vial was completely covered. The vial was closed and sealed with parafilm. This

preparation was left to stand at room temperature for 48 h. After the incubation period, the labeled pericarp tissue was stored at -20 °C until analysis. To obtain four biological replicates, the ex vivo tissue deuterium-labeling procedure was carried out four times.

Microvinification. To produce the Lemberger model wine, 300 mg each of D(+)-glucose and D(-)-fructose were added to the labeled exocarp as an energy source for the wine yeast.¹⁴ Subsequently, 15 mg of yeast nutrients (Lallemand GO-FERM) were weighed into a 25 mL volumetric flask. The flask was filled with drinking water up to the calibration mark, and the solution was heated to 43 °C with continuous stirring. After the homogenized solution had cooled down, 2.5 mL of this solution was pipetted into the 10 mL headspace vial already filled with the labeled exocarp, D(+)-glucose, and D(-)-fructose. To complete the fermentation approach, 25 mg of commercial yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*; product: ECO-FERM Basic; producer: Lallemand Inc.) was also weighed into a 25 mL volumetric flask, mixed with drinking water, and heated while stirring. After reaching the target temperature of 38 °C, the homogeneous solution was allowed to rehydrate and propagate. Then, a 2.5 mL aliquot was added to the headspace vial. The vial was closed, sealed with parafilm, and vortexed for homogenization. The fermentation sample was then shaken at room temperature (rt) for 7 d at 175 rpm using a combi-shaker KL 2 from Edmund Bühler GmbH (Hechingen, BW, Germany). The vial was briefly opened once a day to release the CO₂ pressure (Figure S2).

Solid-Phase Extraction (SPE). The SPE procedure was based on a method described by Piñeiro et al.¹⁵ LiChrolut EN (40–120 μ m) polypropylene tubes with 200 mg of solid phase (nonpolar) and 6 mL of total volume from Merck KGaA (Darmstadt, HE, Germany) were used for extraction. The conditioning of the tubes was carried out with 4 mL of dichloromethane, 4 mL of methanol, and 4 mL of ethanol (12%, v/v). Subsequently, 100 μ L of internal standard (1-bromodecane; concentration 1 mg/L) was added to 100 mL of monovarietal authentic Lemberger red wine, and the sample was homogenized and percolated through the tube. After a cleaning step with 10 mL of water (for HPLC LC-MS grade), the tube was dried for 10 min using a vacuum pump. Sesquiterpenes were eluted with 2 mL of dichloromethane. The eluent was then almost completely evaporated using a Vigreux column at 45 °C. The remaining residue was immediately mixed with 1 mL of an aqueous solution of 12% ethanol. The resulting solution was transferred into a 10 mL headspace vial and analyzed using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)-comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC \times GC)-time of flight (TOF)-mass spectrometry (MS).

Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME). Analyte extraction from headspace was performed using a Combi PAL-xt autosampler with a heatable agitator and fiber conditioning station from CTC Analytics (Zwingen, BL, Switzerland). The selected extraction conditions were based on Welke et al.¹⁰ First, a preincubation of the sample was carried out at 45 °C for 10 min without stirring. A 2 cm DVB/CAR/PDMS fiber (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane; 50/30 μ m, Stableflex, 24Ga) from Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used for adsorption of the sesquiterpenes. To extract the analytes, the SPME fiber was exposed for 30 min at 45 °C in the headspace of the sample. The adsorbed analytes were subsequently desorbed in the GC injector for 5 min at 250 °C. The fiber was reconditioned after each desorption in the conditioning station for 15 min at 250 °C to avoid carryover. In addition, an empty headspace vial was measured as a control after each measurement, whereby no sample carryover was detected. In contrast to all other samples, the sesquiterpene standards and the C₇-C₃₀ saturated alkane standard solution were injected with a syringe in split mode (1 μ L sample volume).

GC \times GC-TOF-MS Analysis. The comprehensive two-dimensional gas chromatographic-mass spectrometric separation of the sesquiterpenes was performed using a 7890B gas chromatograph from Agilent Technologies (Bellefonte, PA, USA) coupled with a BenchTOF-Select time-of-flight-mass spectrometer from Markes International Limited (Llantrisant, Wales, UK). A Zoex ZX2 GC \times

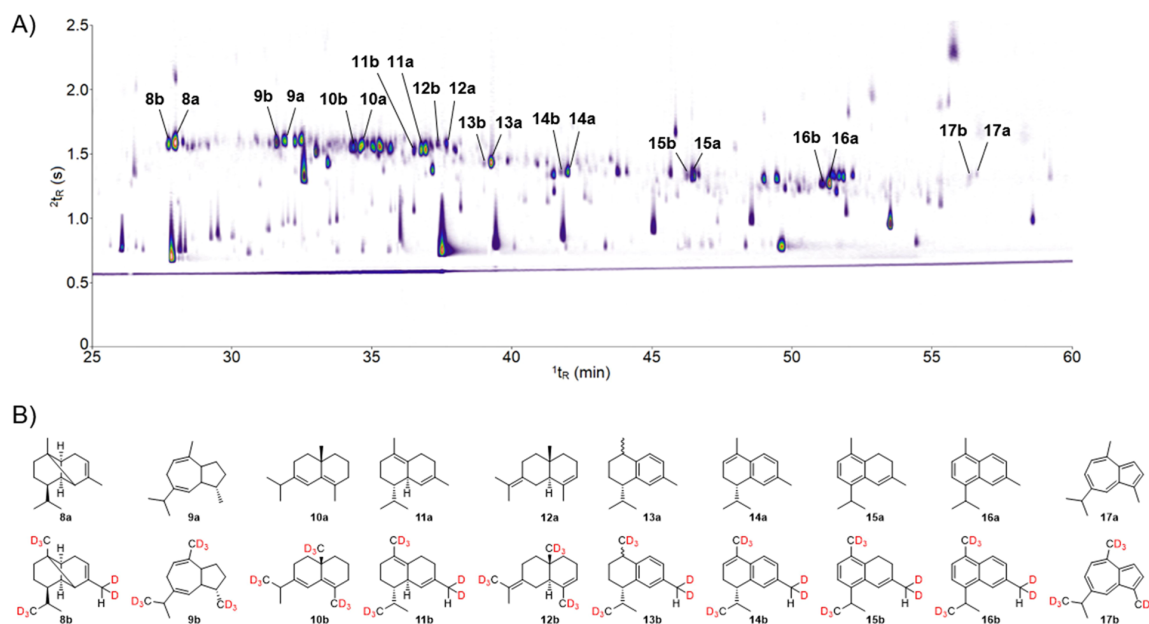


Figure 3. HS-SPME-GC \times GC-TOF-MS analysis of the Lemberger model wine obtained by fermentation after ex vivo tissue deuterium-labeling using d_3 -MVL as the precursor. (A) Section of a 2D chromatogram (EIC 198, 200, 202, 204, 206, 207, 208, 210, 212, and 213). The x axis shows the retention time (t_R) of the analytes on the first GC column (1D), and the y axis shows that on the second dimension (2D). The peak intensity is represented by a color coding on a white background from low (violet) to high (red). Emphasized are 10 pairs of sesquiterpene hydrocarbons, which were detected both before microvinification in the exocarp of ripe Lemberger berries and after microvinification in Lemberger model wine. (B) Structures of the genuine (unlabeled) sesquiterpenes d_0 - α -ylangene (8a), d_0 -guaia-6,9-diene (9a), d_0 - δ -selinene (10a), d_0 - δ -cadinene (11a), d_0 -selina-3,7(11)-diene (12a), d_0 -calamenene (13a), d_0 - α -calacorene (14a), d_0 - α -corocalene (15a), d_0 -cadalene (16a), and d_0 -guaiazulene (17a) and their maximum deuterated isotopologues d_8 - α -ylangene (8b), d_8 -guaia-6,9-diene (9b), d_8 - δ -selinene (10b), d_8 - δ -cadinene (11b), d_8 -selina-3,7(11)-diene (12b), d_8 -calamenene (13b), d_8 - α -calacorene (14b), d_8 - α -corocalene (15b), d_8 -cadalene (16b), and d_8 -guaiazulene (17b), which elute earlier due to the inverse isotope effect.²² The recorded mass spectra of the compounds shown are given in Figures S4–S13.

GC cryogenic modulator from Zoex Corp (Houston, TX, USA) served as the interface between the first (1D) and second (2D) GC columns. In all experiments, the first dimension was a highly polar DB-WAX Ultra Inert column (poly(ethylene glycol); 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m (length \times internal diameter \times film thickness)) from Agilent Technologies (Bellefonte, PA, USA) and the second dimension was a medium polar MEGA-17 MS FAST column (poly(50%-phenyl-50%-methylsiloxane); 1.7 m \times 0.10 mm \times 0.10 μ m) from MEGA s.n.c. (Legnano, MI, Italy). Helium was used as the carrier gas with a constant flow rate of 1 mL/min. The separation was performed using the following temperature program: 35 $^{\circ}$ C (5 min), 5 $^{\circ}$ C min $^{-1}$ to 120 $^{\circ}$ C (0 min), and 3 $^{\circ}$ C min $^{-1}$ to 220 $^{\circ}$ C (5 min). The modulator temperature offset was 25 $^{\circ}$ C, whereby a modulation period of 5 s with a pulse length of 350 ms was selected. Transfer line and ion source temperatures were set to 250 $^{\circ}$ C. Ionization was performed in electron impact (EI) mode at -70 eV. Ions were collected in the mass range of 35–250 m/z at a scan rate of 100 Hz. Both the labeled grape berry exocarp and the model wine (four biological replicates each) were analyzed in triplicate (three technical replicates each), so that a total of 24 2D chromatograms were obtained for evaluation.

Data Analysis. Data from the GC \times GC-TOF-MS analysis were collected in ProtoToF (version 2.0) and processed with ChromSpace (version 1.5.1), both programs of Markes International Limited (Llantrisant, Wales, UK). A dynamic background compensation (dbc) with a peak width of 0.1 s was performed for each 2D chromatogram. The relevant sesquiterpene peaks were only integrated at selected m/z values in the extracted-ion chromatogram (EIC) to eliminate counts of possibly coeluting compounds of other molecular masses. Sesquiterpenes were primarily identified by comparing the recorded mass spectra with library spectra (if available), taking into account match factors and reverse match factors. The comparison was performed using the National Institute of Standards and Technology

(NIST) mass spectral search program (NIST, Gaithersburg, MD, USA; version 2.2). Analytical identification was also based on the comparison of calculated retention indices I with literature values I (lit.). The indices were calculated according to the method of van Den Dool and Kratz for temperature-programmed gas chromatography after measuring an n -alkane standard solution (C_7 – C_{30}).¹⁶ The sesquiterpenes nerolidol, farnesol, α -bisabolol, α -farnesene, β -farnesene, α -cedrene, and guaiazulene were additionally identified by liquid injection of commercially available, authentic standard compounds (std). Verification of found sesquiterpenes was carried out on the labeled exocarp and produced model wines via the corresponding deuterium-labeled compounds starting from the precursor d_3 -MVL, provided that the sesquiterpenes originate at least in part from the grape berry metabolism.

RESULTS AND DISCUSSION

Fermentation was conducted with a commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain, yeast nutrients, D-glucose, and D-fructose followed by headspace solid-phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry (HS-SPME-GC \times GC-TOF-MS) analysis (Figure S3). The formation of 2 and 3 in the ppb range during the fermentation process could be confirmed. The slightly acidic pH of the medium after fermentation (pH 3.4) leads to the acid-catalyzed formation of numerous sesquiterpenes. The sesquiterpenes α -bisabolol, α -farnesene, β -farnesene, farnesol, and nerolidol found by Weldegergis et al.⁹ in the red wine Pinotage and the compounds β -bisabolene, α -bisabolol, δ -cadinene, (*E*)-calamenene, α -cedrene, α -curcumene, α -farnesene, β -farnesene, farnesol, nerolidol, and β -sesquiphellandrene identified by Robinson et al.⁸ in the red

wine variety Cabernet Sauvignon were found in our grape berry-free yeast approach. Our results confirm these earlier findings that many of the sesquiterpenes found in wines are at least partly derived from acid-catalyzed reactions of yeast-derived farnesol and nerolidol during the vinification. These sesquiterpenes are not of grape metabolism origin and thus make it difficult to determine unequivocally the grape variety that is used for wine production. The decisive factor in determining the grape variety based on sesquiterpene profiles is therefore not only whether the sesquiterpenes found in the ripe grapes can also be found in the wine, but also to what extent a contribution is made to the respective sesquiterpene profile by the yeast metabolism. The determination of potential sesquiterpene marker compounds for a wine variety is therefore only possible if their origin can be traced back to yeast or grape. For this reason, microvinification experiments were carried out on the red wine variety Lemberger using the stable isotope-labeled precursor [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL), which allows an unequivocal substance identification and traceability to the original sesquiterpene source. We placed isolated exocarp of ripe grapes in an aqueous solution of d_3 -MVL for 48 h. The deuterated precursor was thereby metabolized via the mevalonate-dependent biosynthetic pathway (MVA) localized in the cytoplasm to farnesyl and nerolidyl diphosphate,¹⁷ which in turn were converted by existing enzymes^{18,19} into numerous sesquiterpenes and finally accumulated in the wax layer of the berry exocarp.²⁰ Ripe grapes of the Lemberger variety were used as the experimental material, as we have already unambiguously characterized the sesquiterpene profile of these terpene-rich berries by isotope-labeling experiments.²¹ To produce a model Lemberger wine, the labeled exocarp was fermented with a commercial yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast nutrients, D-glucose, D-fructose, and water. The model wine had a pH between 5 and 5.5 before fermentation and a pH of 3.8 after fermentation. The subsequent analysis of the model wine was carried out using HS-SPME-GC \times GC-TOF-MS (Figure 3).

In addition to farnesol and nerolidol and the compounds formed by acid catalysis from these alcohols during fermentation, numerous sesquiterpenes were found in the model wine, which we had already identified in the exocarp of ripe grapes. The unlabeled (genuine) d_0 -sesquiterpenes can originate from the grape, yeast, and acid catalysis due to grape processing. Deuterated compounds, however, must originate from the metabolic activity of the grape exocarp. Traceability to the corresponding sesquiterpene source was therefore established by determining the peak height ratio of genuine sesquiterpene (d_0) to the respective maximum deuterated sesquiterpene (d_{max}) before and after microvinification (Figure 4).

In the sesquiterpenes already identified in the exocarp, d_0/d_8 - δ -cadinene (11a, 11b), d_0/d_8 -calamenene (13a, 13b), d_0/d_8 - α -calacorene (14a, 14b), d_0/d_8 - α -corocalene (15a, 15b), and d_0/d_8 -cadalene (16a, 16b), the ratio was significantly altered after microvinification by increased peak areas of nonlabeled compounds (d_0). It can therefore be concluded that there must have been additional acid-catalyzed formation of the unlabeled sesquiterpenes from nerolidol and farnesol during fermentation. The sesquiterpenes guaia-6,9-diene (9a), guaiazulene (17a), δ -selinene (10a), selina-3,7(11)-diene (12a), and α -ylangene (8a), for which the ratio of nonlabeled to maximum deuterated isotopologues did not change significantly after

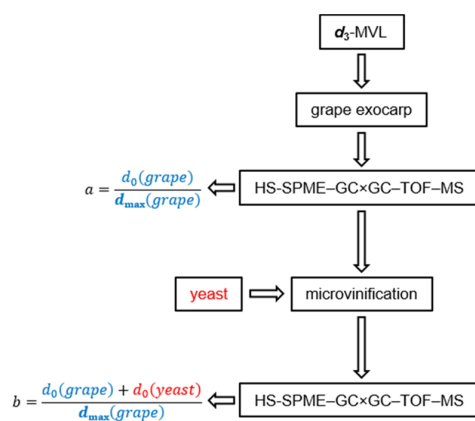


Figure 4. Procedure for the identification of potential sesquiterpene marker compounds of a grape variety. The isolated grape exocarp is incubated with a stable isotope-labeled precursor (d_3 -MVL). In addition to the genuine sesquiterpenes (d_0 (grape)), isotopologues with maximum possible deuterium incorporation (d_{max} (grape)) are biosynthesized via the MVA pathway. Extraction and separation of the formed isotopologues are carried out by HS-SPME-GC \times GC-TOF-MS analysis, whereby deuterated isotopologues elute earlier than the unlabeled analogs due to the inverse isotope effect. The peak height ratio (a) is calculated before microvinification. The isotope-labeled exocarp is then microvinified by adding yeast, glucose, fructose, and yeast nutrients, and the resulting model wine is analyzed after 7 days. Yeasts alter the sesquiterpene profile during winemaking, as they are able to form farnesol and nerolidol, and these can be converted into numerous sesquiterpenes by acid-catalysis. However, since no stable isotope-labeled precursor is administered to the yeast, only genuine sesquiterpenes (d_0 (yeast)) can be formed additionally. After microvinification, the ratio (b) is calculated and compared with (a), revealing whether there has been a significant formation of genuine sesquiterpenes by the winemaking process. If there is no significant difference between the ratios, the corresponding sesquiterpene can be considered as a potential marker compound.

microvinification, are potential marker compounds for the Lemberger variety (Figure 5).

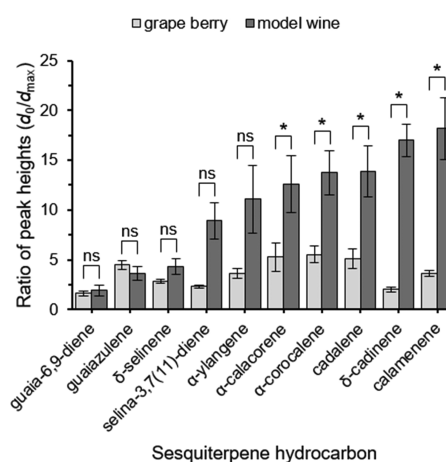


Figure 5. Ratio d_0/d_{max} before and after microvinification of 10 sesquiterpenes, which could be clearly identified in both the grape and the model wine. Data were statistically analyzed using the t-test (*, $p \leq 0.05$ (significant difference); ns, $p \geq 0.05$ (no significant difference)).

It is noteworthy that **9a**, **17a**, **10a**, and **12a** are generated via [1,5]-, [5,1]-, or [5,10]-ring closure reactions of protonated germacrene C or (*E,E*)-germacrene B, respectively.²¹ Obviously, the transition states for the corresponding cyclization reactions are too high in relative free energy to be overcome at room temperature under acidic reaction conditions in the absence of a catalyzing enzyme.

In order to check whether our results of microvinification experiments with model wines are transferable to the large-scale production of red wines, authentic monovarietal Lemberger wines of different vintages were analyzed. To enrich the sesquiterpenes from 100 mL of samples, a solid-phase extraction (SPE) with subsequent gentle distillation via a Vigreux column was performed prior to the HS-SPME-GC × GC-TOF-MS analysis. In addition, 1-bromodecane was used as an internal standard to estimate the concentration range of the analytes. Three of the potential marker compounds, selina-3,7(11)-diene (**12a**), guaiazulene (**17a**), and δ -selinene (**10a**), could be detected in Lemberger wines in the lower $\mu\text{g/L}$ range (Figure 6).

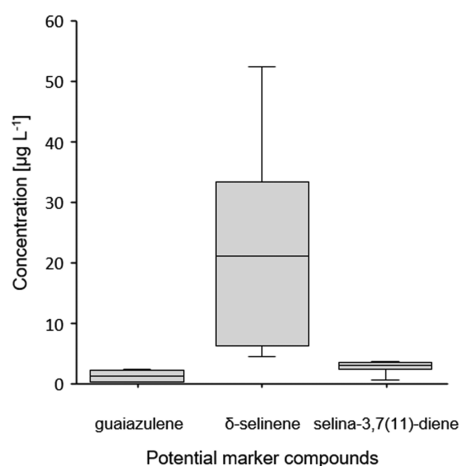


Figure 6. Boxplots for the concentration of guaiazulene, δ -selinene, and selina-3,7(11)-diene in monovarietal Lemberger wines of the vintages 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, and 2018. The concentration was determined using 1-bromodecane as the internal standard and SPE-HS-SPME-GC × GC-TOF-MS.

In summary, we were able to show for the first time by means of isotope labeling and microvinification experiments that three sesquiterpenes detectable in wine originate only from the grape and not from yeast metabolism or acid catalysis during winemaking and are therefore suitable as grape variety-specific marker compounds for the Lemberger variety. The approach presented here allows the dissection of sesquiterpene profiles of wines aiming at an authenticity control of variety labeling. However, further follow-up studies will be required to confirm whether sesquiterpene profiles can be used to identify other important varieties.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c03273>.

Authentic Lemberger red wines from the Hochschule Geisenheim University, which were analyzed in this

study (Table S1); sesquiterpenes identified in headspace of an acidified, aqueous nerolidol solution (Table S2); sesquiterpenes identified in headspace of a fermented aqueous approach consisting of a commercial yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast nutrients, D(+)-glucose, and D(-)-fructose (Table S3); pairs of genuine and deuterated sesquiterpene hydrocarbons after ex vivo tissue deuterium-labeling using d_3 -MVL as the precursor, which were detected both before microvinification in the exocarp of Lemberger berries and after microvinification in Lemberger model wine (Table S4); HS-SPME-GC × GC-TOF-MS analysis of an acidified, aqueous nerolidol solution (sample volume 1 mL; concentration 1 mg/L; acidified to pH 3.3 using L(-)-malic acid; preincubation temperature 30 °C) to investigate the acid-catalyzed formation of sesquiterpenes (Figure S1); microvinification (Figure S2); headspace analysis of a fermented aqueous approach consisting of a commercial yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast nutrients, D(+)-glucose, and D(-)-fructose (Figure S3); MS spectra and expected labeling patterns (Figures S4–S13) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Matthias Wüst – Chair of Food Chemistry, Institute of Nutritional and Food Sciences, University of Bonn, Bonn 53115, Germany; orcid.org/0000-0001-6808-5555; Phone: +49-228-73-2964; Email: matthias.wuest@uni-bonn.de; Fax: +49-228-73-3499

Author

Philipp P. Könen – Chair of Food Chemistry, Institute of Nutritional and Food Sciences, University of Bonn, Bonn 53115, Germany; orcid.org/0000-0002-4847-7807

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.0c03273>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the DFG (INST 217/783-1 FUGG). Ripe grapes (Lemberger cultivar) were collected at the Institute of Crop Science and Resource Conservation (INRES), University of Bonn. We thank C. Lankes for providing the sample material and F. Es-Saddiki for support in ex vivo tissue deuterium-labeling procedure. The monovarietal authentic Lemberger wines were obtained from the Department of Grapevine Breeding, Hochschule Geisenheim University. We would like to especially thank J. Schmid for providing Lemberger wine bottles of different vintages.

■ REFERENCES

- (1) European Parliament 2013. Procedure: 2013/2091(INI). Report 4 Dec 2013, on the food crisis, fraud in the food chain and the control thereof. <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+REPORT+A7-2013-0434+0+DOC+XML+V0//EN>. Accessed 7 May 2020.
- (2) Moore, J. C.; Spink, J.; Lipp, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, R118–R126.

- (3) Rapp, A. Natural flavours of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1990**, *337*, 777–785.
- (4) Black, C. A.; Parker, M.; Siebert, T. E.; Capone, D. L.; Francis, I. L. Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*, 582–600.
- (5) Siebert, T. E.; Wood, C.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P. Determination of Rotundone, the Pepper Aroma Impact Compound, in Grapes and Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3745–3748.
- (6) Coelho, E.; Rocha, S. M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'Baga' ripening. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 204–214.
- (7) Parker, M.; Pollnitz, A. P.; Cozzolino, D.; Francis, I. L.; Herderich, M. J. Identification and Quantification of a Marker Compound for 'Pepper' Aroma and Flavor in Shiraz Grape Berries by Combination of Chemometrics and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5948–5955.
- (8) Robinson, A. L.; Boss, P. K.; Heymann, H.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D. Development of a sensitive non-targeted method for characterizing the wine volatile profile using headspace solid-phase microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 504–517.
- (9) Weldegergis, B. T.; Crouch, A. M.; Górecki, T.; de Villiers, A. Solid phase extraction in combination with comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the detailed investigation of volatiles in South African red wines. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *701*, 98–111.
- (10) Welke, J. E.; Manfroi, V.; Zanus, M.; Lazarotto, M.; Alcaraz Zini, C. Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1226*, 124–139.
- (11) May, B. **2015**. Biosynthese und Analytik von Sesquiterpenen in Weinbeeren *Vitis vinifera*. Ph.D. Thesis, University of Bonn, Bonn, Germany. <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2016/4356/4356.pdf>.
- (12) Fagan, G. L.; Kepner, R. E.; Webb, A. D. Production of linalool, cis- and trans-nerolidol, and trans,trans-farnesol by *Saccharomyces fermentati* growing as a film on-simulated wine. *Vitis* **1981**, *20*, 36–42.
- (13) Gutsche, C. D.; Maycock, J. R.; Chang, C. T. Acid-catalyzed cyclization of farnesol and nerolidol. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 859–876.
- (14) Carrau, F. M.; Medina, K.; Boido, E.; Farina, L.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Versini, G.; Henschke, P. A. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *243*, 107–115.
- (15) Piñeiro, Z.; Palma, M.; Barroso, C. G. Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 209–214.
- (16) Van Den Dool, H.; Kratz, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463–471.
- (17) Lichtenthaler, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **1999**, *50*, 47–65.
- (18) Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, G.; Croteau, R. Plant terpenoid syntheses: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 4126–4133.
- (19) Davis, E. M.; Croteau, R. *Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes*. In *Biosynthesis*, 209 Eds.: Leeper, F. J.; Vederas, J. C., Springer, Berlin Heidelberg, 2000, pp. 53–95.
- (20) May, B.; Wüst, M. Sesquiterpene profiles of different grape varieties. In *Advances and Challenges in Flavor Chemistry & Biology*, Eds.: Hofmann, T.; Meyerhof, W.; Schieberle, P., Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising, 2011, pp. 323–327.
- (21) Könen, P. P.; Wüst, M. Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS). *Beilstein. J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 1945–1961.
- (22) Matucha, M.; Jockisch, W.; Verner, P.; Anders, G. Isotope effect in gas–liquid chromatography of labelled compounds. *J. Chromatogr.* **1991**, *588*, 251–258.

2.2.4 Supporting Information: *J. Agric. Food Chem.* (2020)

Es folgt die Supporting Information zu:

Könen, P. P.; Wüst, M. Dissecting Sesquiterpene Profiles of Lemberger Red Wines Using Ex Vivo Tissue Deuterium-Labeling and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–Time-of-Flight–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 8936–8941.
[doi:10.1021/acs.jafc.0c03273](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03273)

Supporting Information

Dissecting Sesquiterpene Profiles of Lemberger Red Wines Using Ex Vivo Tissue Deuterium-Labeling and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–Time-of-Flight–Mass Spectrometry

Philipp P. Könen, Matthias Wüst*

Chair of Food Chemistry, Institute of Nutritional and Food Sciences, University of Bonn, Endenicher Allee 19C, 53115 Bonn

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +49-228-73-2964. Fax: +49-228-73-3499. E-mail: matthias.wuest@uni-bonn.de.

ORCID

Philipp P. Könen: 0000-0002-4847-7807

Matthias Wüst: 0000-0001-6808-5555

TABLE OF CONTENTS

1. TABLES	S3
Table S1. Authentic Lemberger red wines from the Hochschule Geisenheim University, which were analyzed in this study.	S3
Table S2. Sesquiterpenes identified in headspace of an acidified, aqueous nerolidol solution.....	S4
Table S3. Sesquiterpenes identified in headspace of a fermented aqueous approach consisting of a commercial yeast strain (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), yeast nutrients, D(+)-glucose and D(-)-fructose.	S5
Table S4. Pairs of genuine and deuterated sesquiterpene hydrocarbons after <i>ex vivo</i> tissue deuterium-labeling using d_3 -MVL as the precursor, which were detected both before microvinification in the exocarp of Lemberger berries and after microvinification in Lemberger model wine.	S6
2. FIGURES	S7
Figure S1. HS-SPME-GC×GC-TOF-MS analysis of an acidified, aqueous nerolidol solution (sample volume 1 mL; concentration 1 mg/L; acidified to pH 3.3 using L(-)-malic acid; preincubation temperature 30 °C) to investigate the acid-catalyzed formation of sesquiterpenes.	S7
Figure S2. Microvinification.	S8
Figure S3. Headspace analysis of a fermented aqueous approach consisting of a commercial yeast strain (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), yeast nutrients, D(+)-glucose and D(-)-fructose.	S9
Figure S4. MS spectra and expected labeling patterns of 8a: d_0 - α -ylangene and 8b: d_8 - α -ylangene.	S10
Figure S5. MS spectra and expected labeling patterns of 9a: d_0 -guaia-6,9-diene and 9b: d_9 -guaia-6,9-diene.	S11
Figure S6. MS spectra and expected labeling patterns of 10a: d_0 - δ -selinene and 10b: d_9 - δ -selinene.	S12
Figure S7. MS spectra and expected labeling patterns of 11a: d_0 - δ -cadinene and 11b: d_8 - δ -cadinene.	S13
Figure S8. MS spectra and expected labeling patterns of 12a: d_0 -selina-3,7(11)-diene and 12b: d_9 -selina-3,7(11)-diene.	S14
Figure S9. MS spectra and expected labeling patterns of 13a: d_0 -calamenene (isomer) and 13b: d_8 -calamenene (isomer).	S15
Figure S10. MS spectra and expected labeling patterns of 14a: d_0 - α -calacorene and 14b: d_8 - α -calacorene.	S16
Figure S11. MS spectra and expected labeling patterns of 15a: d_0 - α -corocalene and 15b: d_8 - α -corocalene.	S17
Figure S12. MS spectra and expected labeling patterns of 16a: d_0 -cadalene and 16b: d_8 -cadalene.	S18
Figure S13. MS spectra and expected labeling patterns of 17a: d_0 -guaiazulene and 17b: d_9 -guaiazulene.	S19
3. REFERENCES	S20

1. TABLES**Table S1.** Authentic Lemberger red wines from the Hochschule Geisenheim University, which were analyzed in this study.

Vintage	Harvest Day	Soluble Solids	pH-Value (Wine)	Alcohol Content
2009	October 15, 2009	21.2 °Bx	3.40	106.0 g/L
2010	October 15, 2010	19.1 °Bx	3.50	108.7 g/L
2011	September 30, 2011	20.2 °Bx	3.50	101.7 g/L
2012	October 18, 2012	19.5 °Bx	3.30	111.1 g/L
2013	October 22, 2013	19.3 °Bx	3.40	101.4 g/L
2018	September 14, 2018	18.6 °Bx	3.40	109.1 g/L

Table S2. Sesquiterpenes identified in headspace of an acidified, aqueous nerolidol solution.

Sesquiterpene ^[a]	Molecular formula	<i>I</i> ^[b]	<i>I</i> (lit.) ^[c]	Identification ^[d]
α -cedrene (18)	C ₁₅ H ₂₄	1590	1600 ¹	ms (945, 956), ri, std
β -cedrene (19)	C ₁₅ H ₂₄	1621	1630 ²	ms (892, 905), ri
(<i>E</i>)- β -farnesene (20)	C ₁₅ H ₂₄	1668	1668 ³	ms (852, 882), ri, std
α -zingiberene (21)	C ₁₅ H ₂₄	1728	1721 ⁴	ms (835, 845), ri
β -bisabolene (22)	C ₁₅ H ₂₄	1735	1729 ⁵	ms (890, 895), ri
α -farnesene (23)	C ₁₅ H ₂₄	1749	1749 ⁶	ms (900, 922), ri, std
β -curcumene (24)	C ₁₅ H ₂₄	1750	1740 ⁷	ms (815, 836), ri
δ -cadinene (25)	C ₁₅ H ₂₄	1771	1770 ⁸	ms (807, 853), ri
β -sesquiphellandrene (26)	C ₁₅ H ₂₄	1779	1783 ⁹	ms (862, 870), ri
(<i>E</i>)- α -bisabolene (27)	C ₁₅ H ₂₄	1781	1767 ¹⁰	ms (860, 890), ri
α -curcumene (28)	C ₁₅ H ₂₂	1783	1784 ¹¹	ms (845, 891), ri
calamenene (isomer) (29)	C ₁₅ H ₂₂	1846	1837 ¹²	ms (821, 834), ri
α -calacorene (30)	C ₁₅ H ₂₀	1930	1920 ¹³	ms (748, 872), ri
(<i>Z</i>)-nerolidol (31)	C ₁₅ H ₂₆ O	2001	1993 ⁶	ms (877, 885), ri, std
(<i>E</i>)-nerolidol (32)	C ₁₅ H ₂₆ O	2041	2041 ¹⁴	ms (837, 869), ri, std
α -corocalene (33)	C ₁₅ H ₂₀	2072	n.a. ^[e]	ms (650, 754)
α -bisabolol (34)	C ₁₅ H ₂₆ O	2222	2217 ¹⁵	ms (846, 917), ri, std
cadalene (35)	C ₁₅ H ₁₈	2233	2231 ¹⁶	ms (743, 832), ri

[a] Unidentified compounds are not listed. [b] Retention index *I* on a DB-WAX Ultra Inert column. [c] Retention index data from literature. [d] Compound identification is based on matching mass spectrum to a library spectrum (ms, match factor and reverse match factor given in brackets), identical or closely matching retention index (ri) and comparison to a commercially available standard compound (std). [e] Retention index data on a WAX column were not available.

Table S3. Sesquiterpenes identified in headspace of a fermented aqueous approach consisting of a commercial yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast nutrients, D(+)-glucose and D(-)-fructose.

Sesquiterpene ^[a]	Molecular formula	<i>I</i> ^[b]	<i>I</i> (lit.) ^[c]	Identification ^[d]
α -cedrene (18)	C ₁₅ H ₂₄	1589	1600 ¹	ms (851, 869), ri, std
(<i>E</i>)- β -farnesene (20)	C ₁₅ H ₂₄	1667	1668 ³	ms (900, 910), ri, std
α -zingiberene (21)	C ₁₅ H ₂₄	1725	1721 ⁴	ms (816, 891), ri
β -bisabolene (22)	C ₁₅ H ₂₄	1734	1729 ⁵	ms (885, 892), ri
β -curcumene (24)	C ₁₅ H ₂₄	1746	1740 ⁷	ms (751, 771), ri
α -farnesene (23)	C ₁₅ H ₂₄	1750	1749 ⁶	ms (929, 949), ri, std
δ -cadinene (25)	C ₁₅ H ₂₄	1770	1770 ⁸	ms (757, 773), ri
β -sesquiphellandrene (26)	C ₁₅ H ₂₄	1777	1783 ⁹	ms (855, 899), ri
(<i>E</i>)- α -bisabolene (27)	C ₁₅ H ₂₄	1779	1767 ¹⁰	ms (841, 871), ri
α -curcumene (28)	C ₁₅ H ₂₂	1780	1784 ¹¹	ms (871, 900), ri
calamenene (isomer) (29)	C ₁₅ H ₂₂	1844	1837 ¹²	ms (792, 807), ri
(<i>E</i>)-nerolidol (32)	C ₁₅ H ₂₆ O	2038	2041 ¹⁴	ms (876, 886), ri, std
α -bisabolol (34)	C ₁₅ H ₂₆ O	2217	2217 ¹⁵	ms (725, 784), ri, std
farnesol (36)	C ₁₅ H ₂₆ O	2354	2354 ¹⁷	ms (904, 904), ri, std

[a] Unidentified compounds are not listed. [b] Retention index *I* on a DB-WAX Ultra Inert column. [c] Retention index data from literature. [d] Compound identification is based on matching mass spectrum to a library spectrum (ms, match factor and reverse match factor given in brackets), identical or closely matching retention index (ri) and comparison to a commercially available standard compound (std).

Table S4. Pairs of genuine and deuterated sesquiterpene hydrocarbons after *ex vivo* tissue deuterium-labeling using *d*₃-MVL as the precursor, which were detected both before microvinification in the exocarp of Lemberger berries and after microvinification in Lemberger model wine.

Sesquiterpene ^[a]	Molecular formula	<i>I</i> ^[b]	<i>I</i> (lit.) ^[c]	Identification ^[d] /Verification ^[e]
<i>d</i> ₀ - α -ylangene (8a)	C ₁₅ H ₂₄	1502	1502 ¹⁸	ms (874, 883), ri, <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₈ - α -ylangene (8b)	C ₁₅ H ₁₆ D ₈	1494	n.a. ^[f]	ms
<i>d</i> ₀ -guaia-6,9-diene (9a)	C ₁₅ H ₂₄	1619	n.a. ^[f]	ms (846, 853), <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₉ -guaia-6,9-diene (9b)	C ₁₅ H ₁₅ D ₉	1610	n.a. ^[f]	ms
<i>d</i> ₀ - δ -selinene (10a)	C ₁₅ H ₂₄	1705	n.a. ^[f]	ms (838, 881), <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₉ - δ -selinene (10b)	C ₁₅ H ₁₅ D ₉	1697	n.a. ^[f]	ms
<i>d</i> ₀ - δ -cadinene (11a)	C ₁₅ H ₂₄	1769	1770 ⁸	ms (831, 894), ri, <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₈ - δ -cadinene (11b)	C ₁₅ H ₁₆ D ₈	1762	n.a. ^[f]	ms
<i>d</i> ₀ -selina-3,7(11)-diene (12a)	C ₁₅ H ₂₄	1797	1783 ¹⁹	ms (848, 871), ri, <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₉ -selina-3,7(11)-diene (12b)	C ₁₅ H ₁₅ D ₉	1787	n.a. ^[f]	ms
<i>d</i> ₀ -calamenene (isomer) (13a)	C ₁₅ H ₂₂	1847	1837 ¹²	ms (806, 820), ri, <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₈ -calamenene (isomer) (13b)	C ₁₅ H ₁₄ D ₈	1838	n.a. ^[f]	ms
<i>d</i> ₀ - α -calacorene (14a)	C ₁₅ H ₂₀	1930	1920 ¹³	ms (799, 890), ri, <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₈ - α -calacorene (14b)	C ₁₅ H ₁₂ D ₈	1922	n.a. ^[f]	ms
<i>d</i> ₀ - α -corocalene (15a)	C ₁₅ H ₂₀	2072	n.a. ^[f]	ms (710, 815), <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₈ - α -corocalene (15b)	C ₁₅ H ₁₂ D ₈	2065	n.a. ^[f]	ms
<i>d</i> ₀ -cadalene (16a)	C ₁₅ H ₁₈	2233	2231 ¹⁶	ms (867, 877), ri, <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₈ -cadalene (16b)	C ₁₅ H ₁₀ D ₈	2224	n.a. ^[f]	ms
<i>d</i> ₀ -guaiazulene (17a)	C ₁₅ H ₁₈	2415	n.a. ^[f]	ms (770, 793), std, <i>d</i> ₃ -MVL
<i>d</i> ₉ -guaiazulene (17b)	C ₁₅ H ₉ D ₉	2405	n.a. ^[f]	ms

[a] Unidentified compounds are not listed. [b] Retention index *I* on a DB-WAX Ultra Inert column. [c] Retention index data from literature. [d] Compound identification is based on matching mass spectrum to a library spectrum (ms, match factor and reverse match factor given in brackets), identical or closely matching retention index (ri) and comparison to a commercially available standard compound (std). [e] Verification of the found sesquiterpenes was carried out by *ex vivo* tissue deuterium-labeling with [6,6,6-²H₃]-(\pm)-mevalonolactone (*d*₃-MVL) as stable isotope-labeled precursor. [f] Retention index data on a WAX column were not available.

2. FIGURES

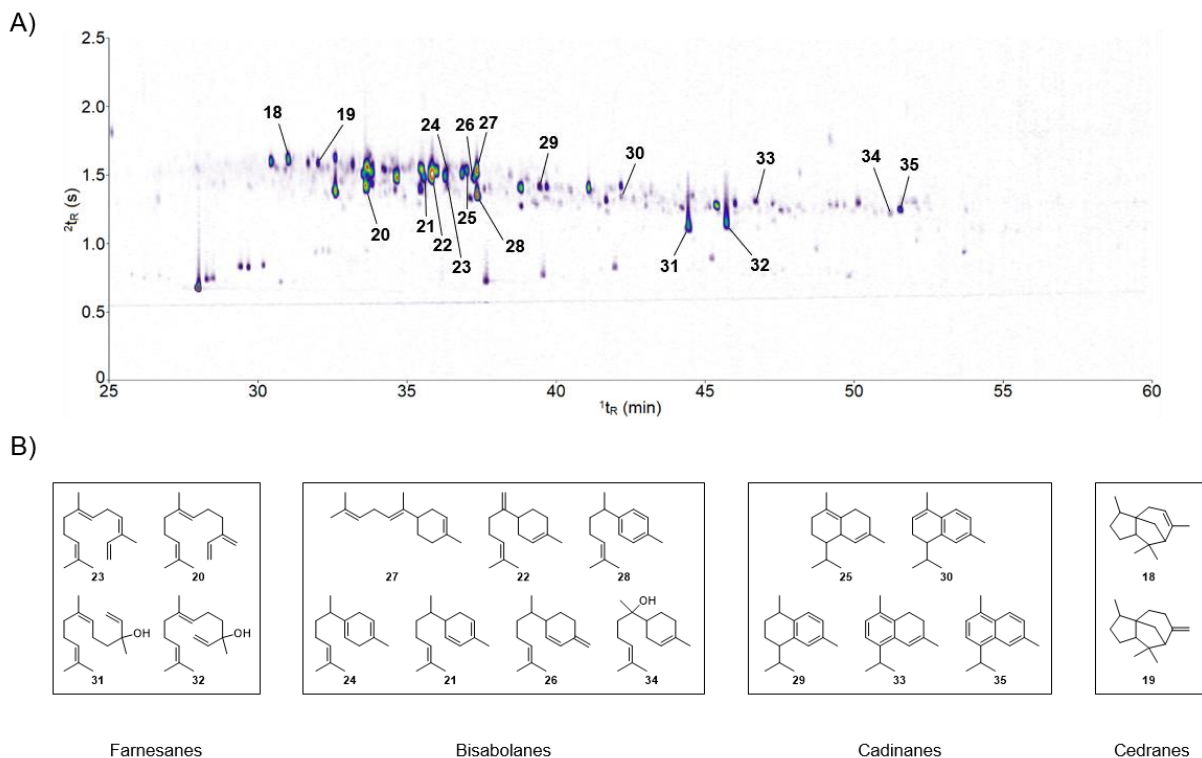


Figure S1. HS-SPME-GC×GC-TOF-MS analysis of an acidified, aqueous nerolidol solution (sample volume 1 mL; concentration 1 mg/L; acidified to pH 3.3 using L(-)-malic acid; preincubation temperature 30 °C) to investigate the acid-catalyzed formation of sesquiterpenes. A) Section of a 2D chromatogram (EIC 198, 200, 202, 204). The 1t_R (X-axis) corresponds to the retention time on the first dimension (1D) column and 2t_R (Y-axis) to the retention time on the secondary (2D) column. The color gradient reflects the intensity of the TOF-MS signal on a white background from low (violet) to high (red). Numbers at peaks refer to compound numbers as defined in Table S2. B) Structural formulas of the identified sesquiterpenes, grouped according to the type of their sesquiterpene skeleton.

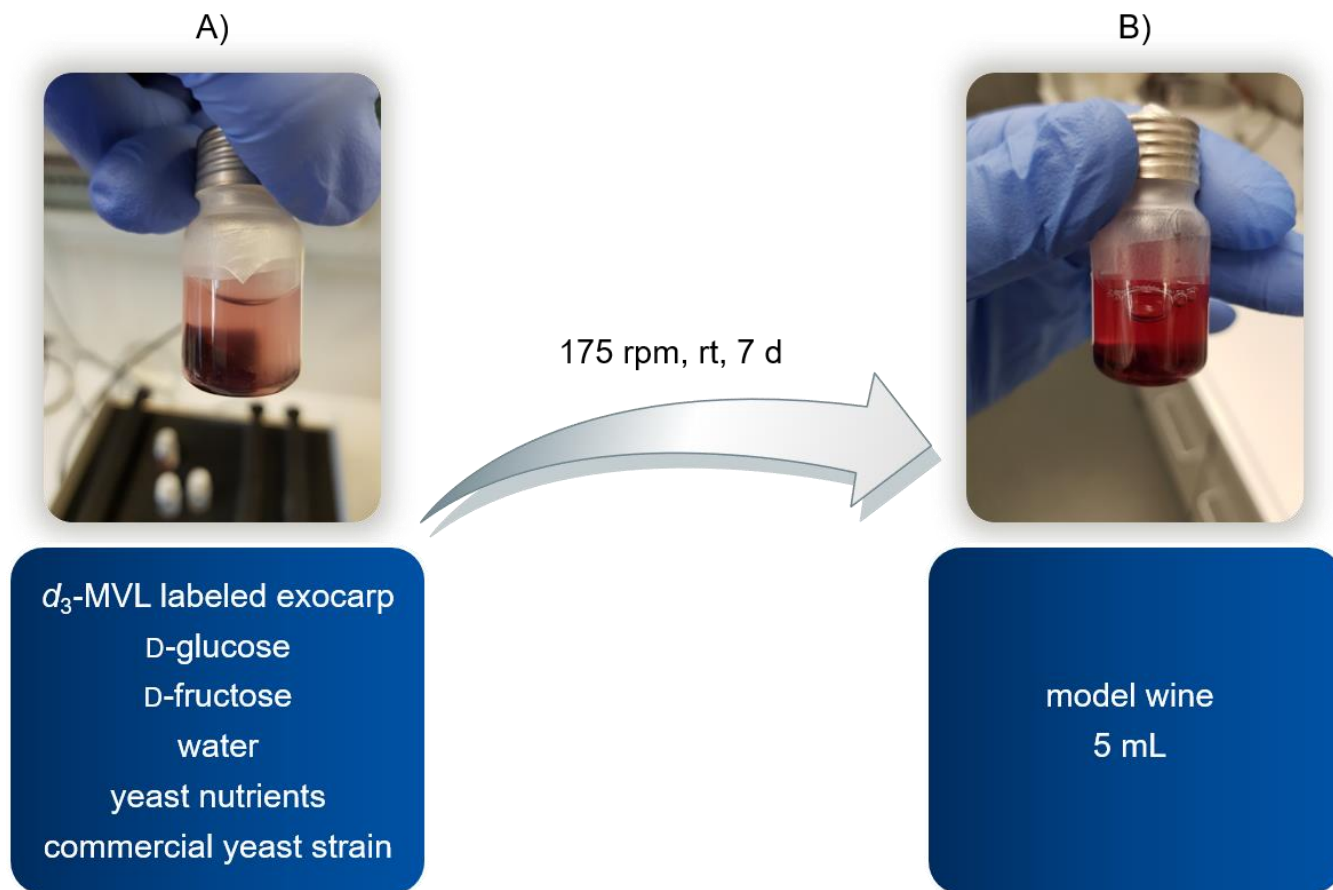


Figure S2. Microvinification. A) Aqueous approach consisting of labeled exocarp, D(+)-glucose, D(-)-fructose, yeast nutrients and yeast in a 10 mL headspace vial at the beginning of fermentation. B) Model wine after 7 days microvinification at room temperature. In addition to the intensive red coloration, gas formation is clearly visible.

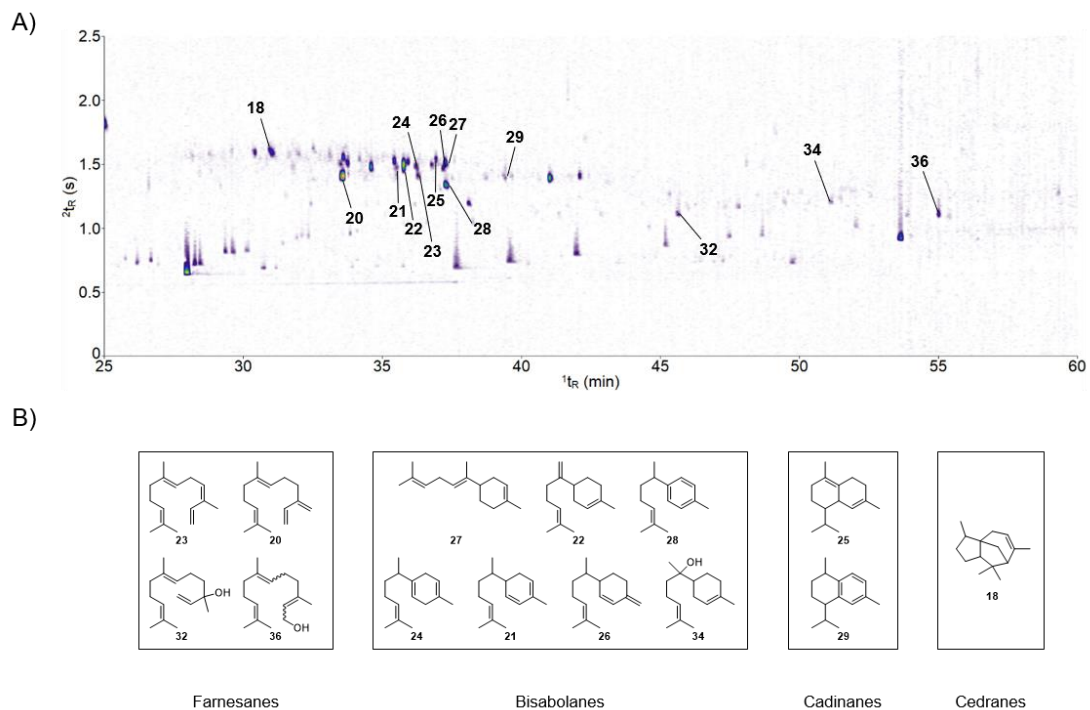


Figure S3. Headspace analysis of a fermented aqueous approach consisting of a commercial yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast nutrients, D(+)-glucose and D(-)-fructose. A) Contour plot of a HS-SPME-GC×GC-TOF-MS chromatogram (EIC 198, 202, 204). 1t_R corresponds to the retention time on the highly polar first GC column and 2t_R on the mid-polar second column. Peak intensities are reproduced by changing color from violet (low TOF-MS signal) to red (high TOF-MS signal) on a white background. B) Structural formulas of the identified sesquiterpenes, grouped according to the type of their sesquiterpene skeleton. The numbering of peaks and structures is identical to the numbering in Table S3.

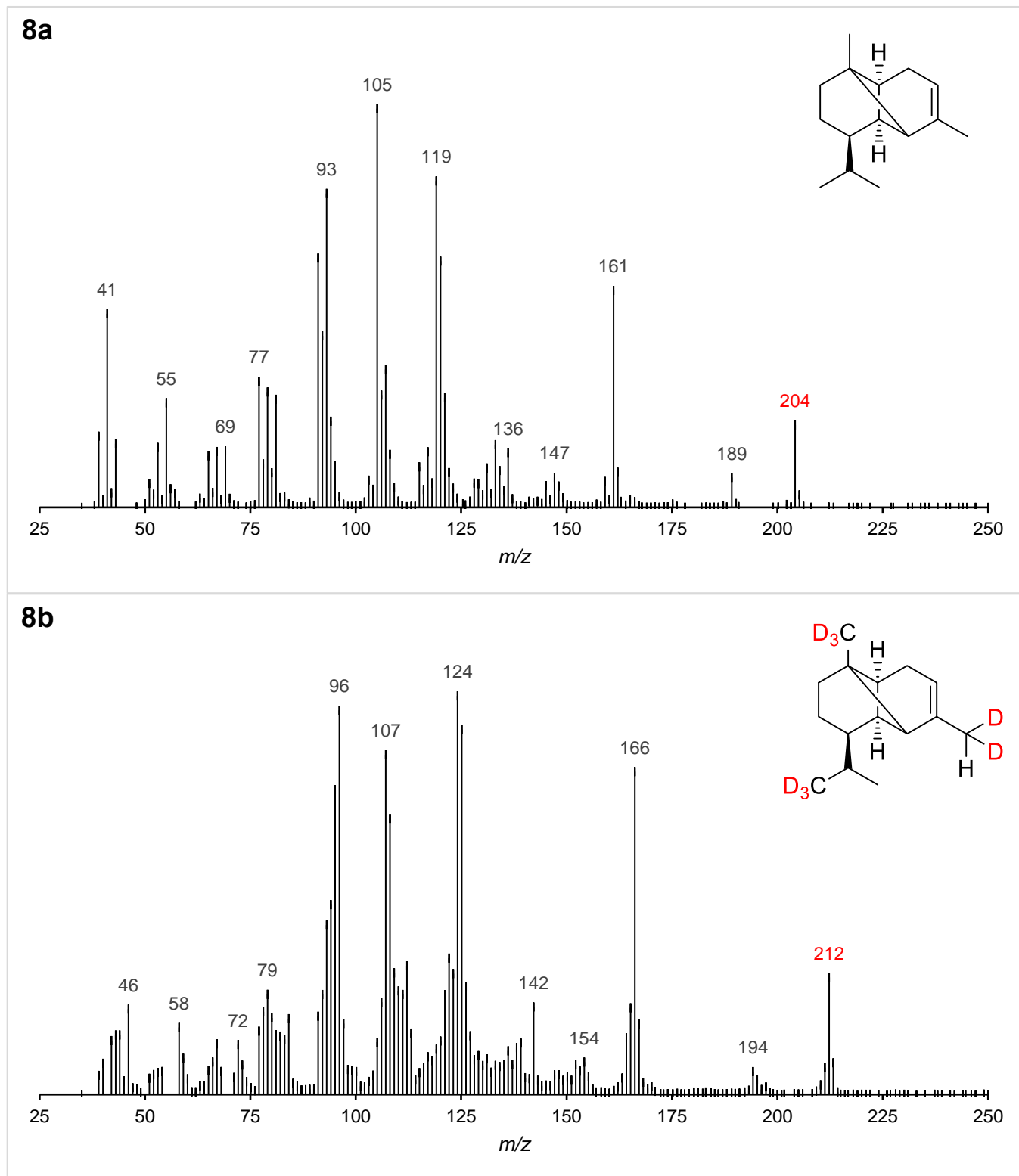


Figure S4. MS spectra and expected labeling patterns of 8a: *d*₀- α -ylangene and 8b: *d*₈- α -ylangene in Lemberger model wine after administration of [6,6,6-²H₃]-(\pm)-mevalonolactone (*d*₃-MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

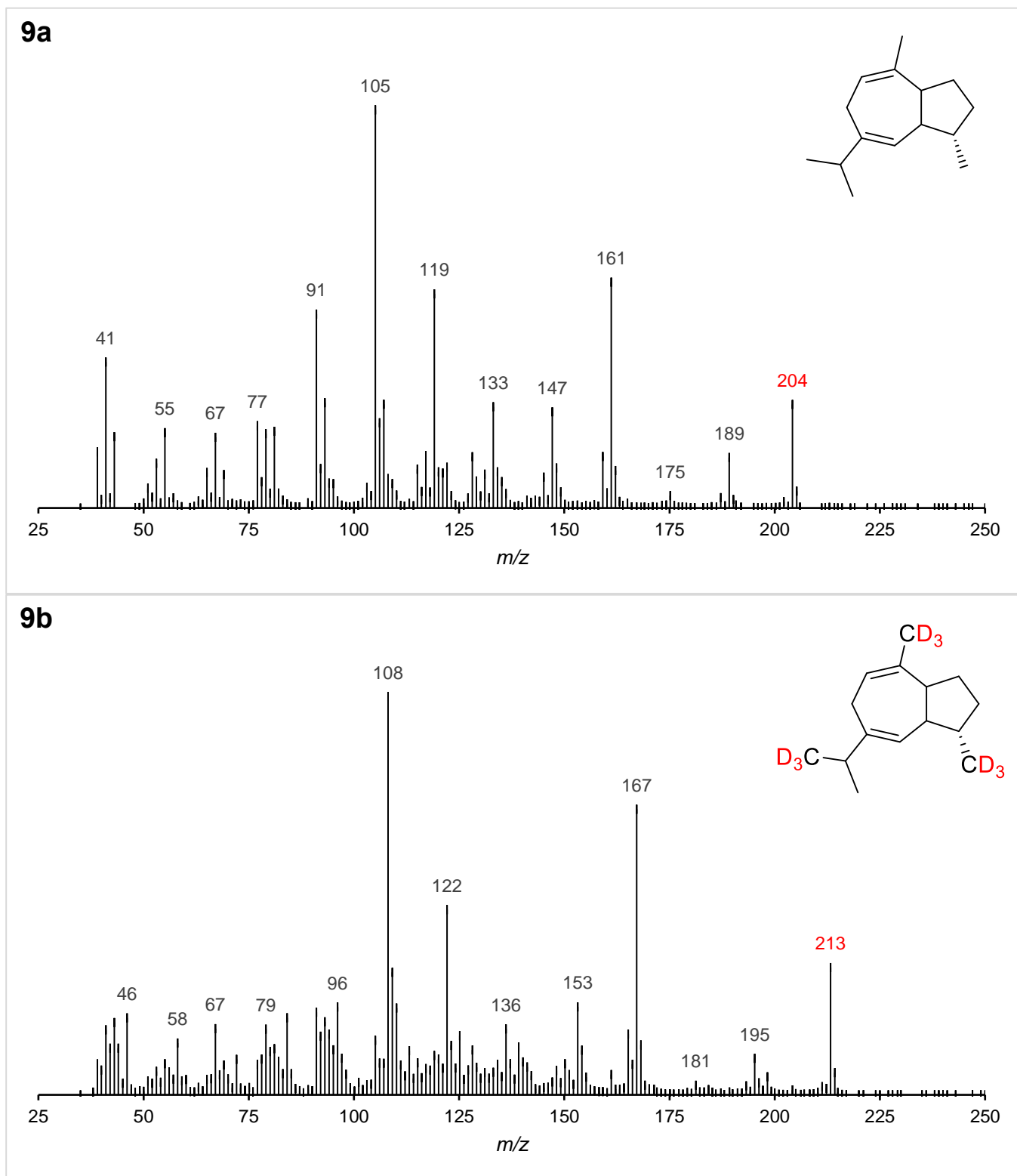


Figure S5. MS spectra and expected labeling patterns of 9a: d_0 -guaia-6,9-diene and 9b: d_9 -guaia-6,9-diene in Lemberger model wine after administration of $[6,6,6-^2H_3]$ -mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

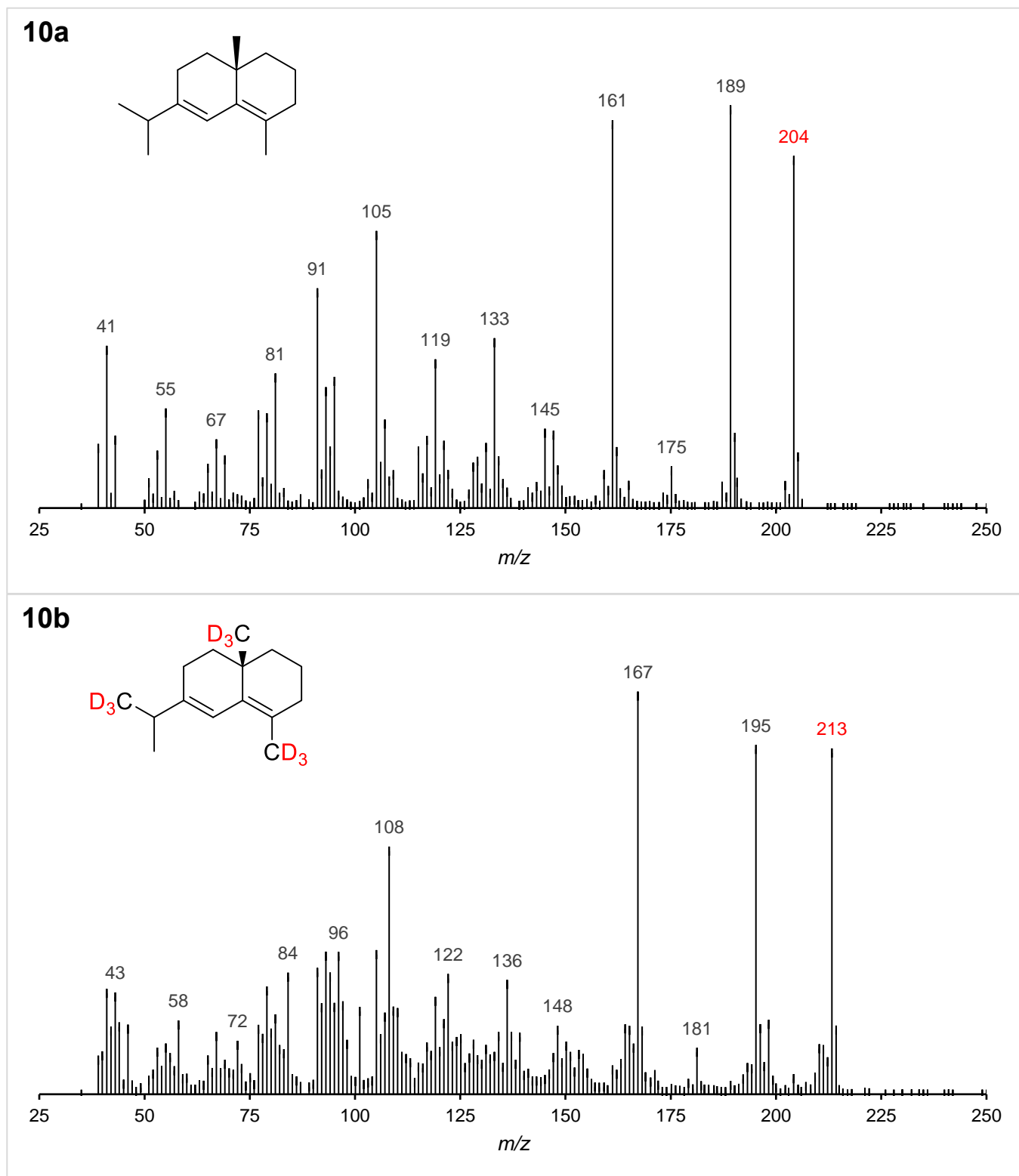


Figure S6. MS spectra and expected labeling patterns of 10a: d_0 - δ -selinene and 10b: d_9 - δ -selinene in Lemberger model wine after administration of [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

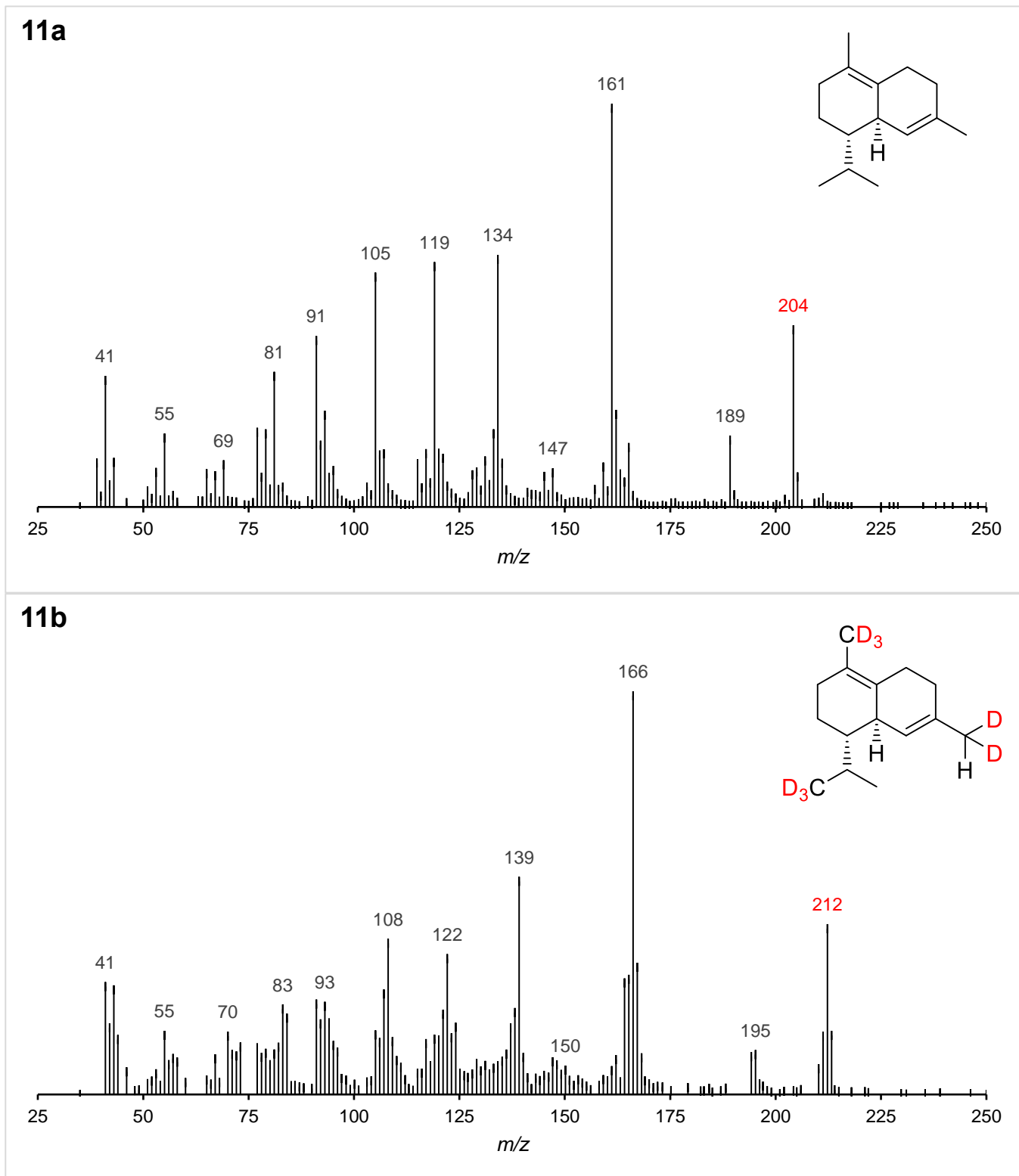


Figure S7. MS spectra and expected labeling patterns of **11a**: d_0 - δ -cadinene and **11b**: d_8 - δ -cadinene in Lemberger model wine after administration of [6,6,6- 2H_3]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

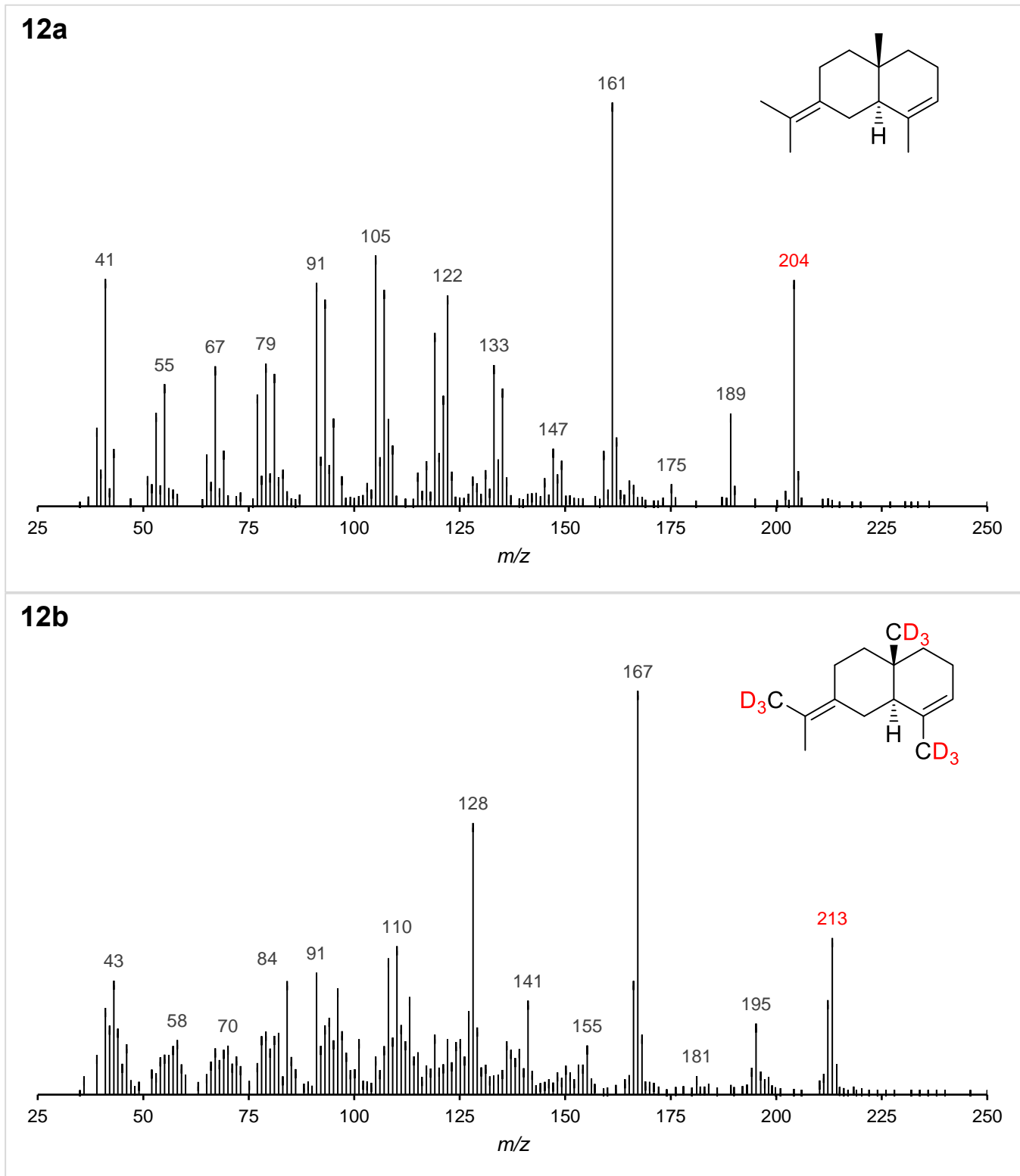


Figure S8. MS spectra and expected labeling patterns of 12a: d_0 -selina-3,7(11)-diene and 12b: d_9 -selina-3,7(11)-diene in Lemberger model wine after administration of $[6,6,6-^2H_3]$ -(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

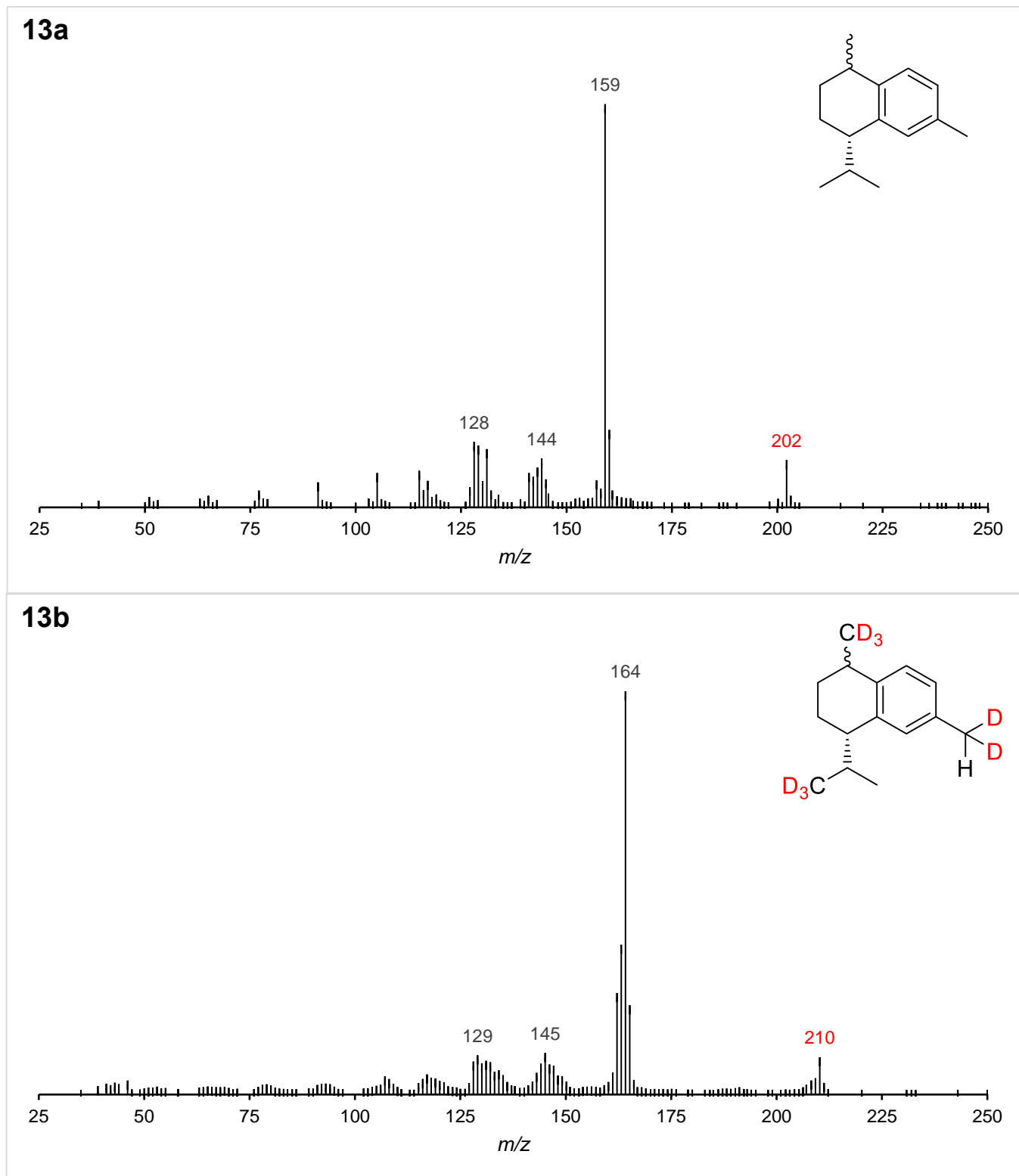
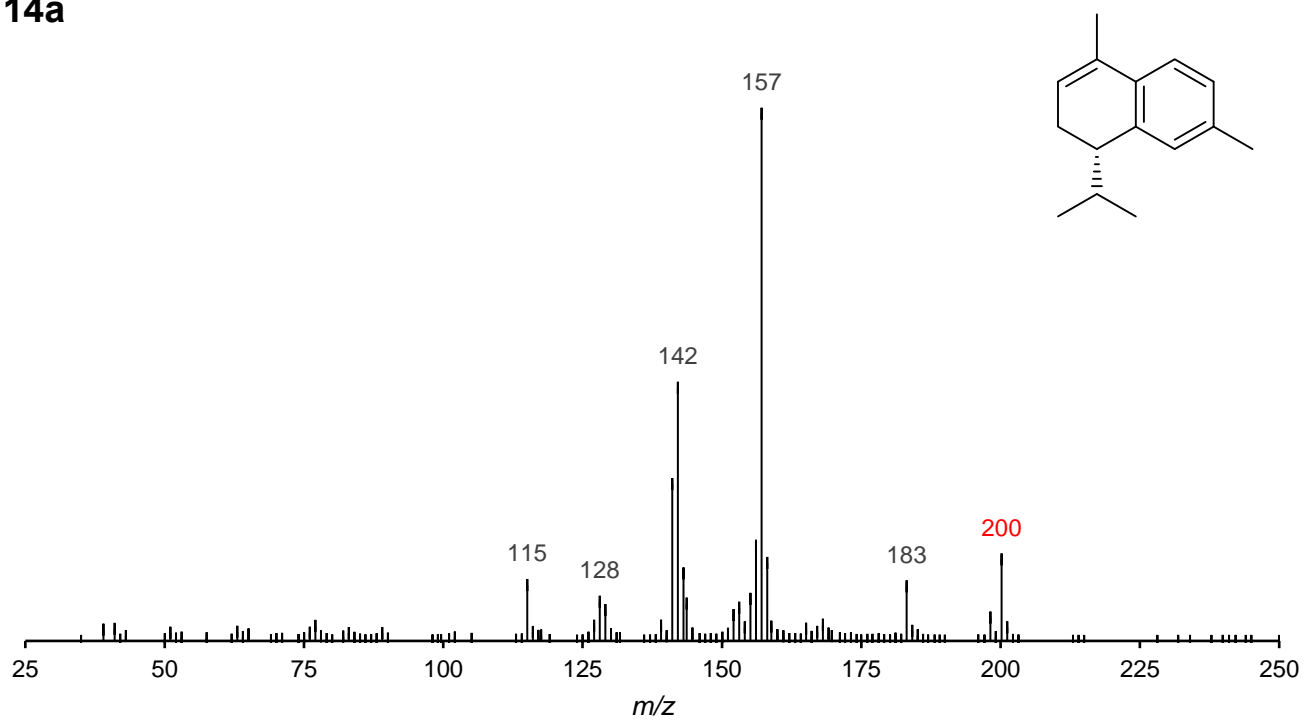


Figure S9. MS spectra and expected labeling patterns of 13a: d_0 -calamenene (isomer) and 13b: d_8 -calamenene (isomer) in Lemberger model wine after administration of $[6,6,6-^2H_3]$ -(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

14a



14b

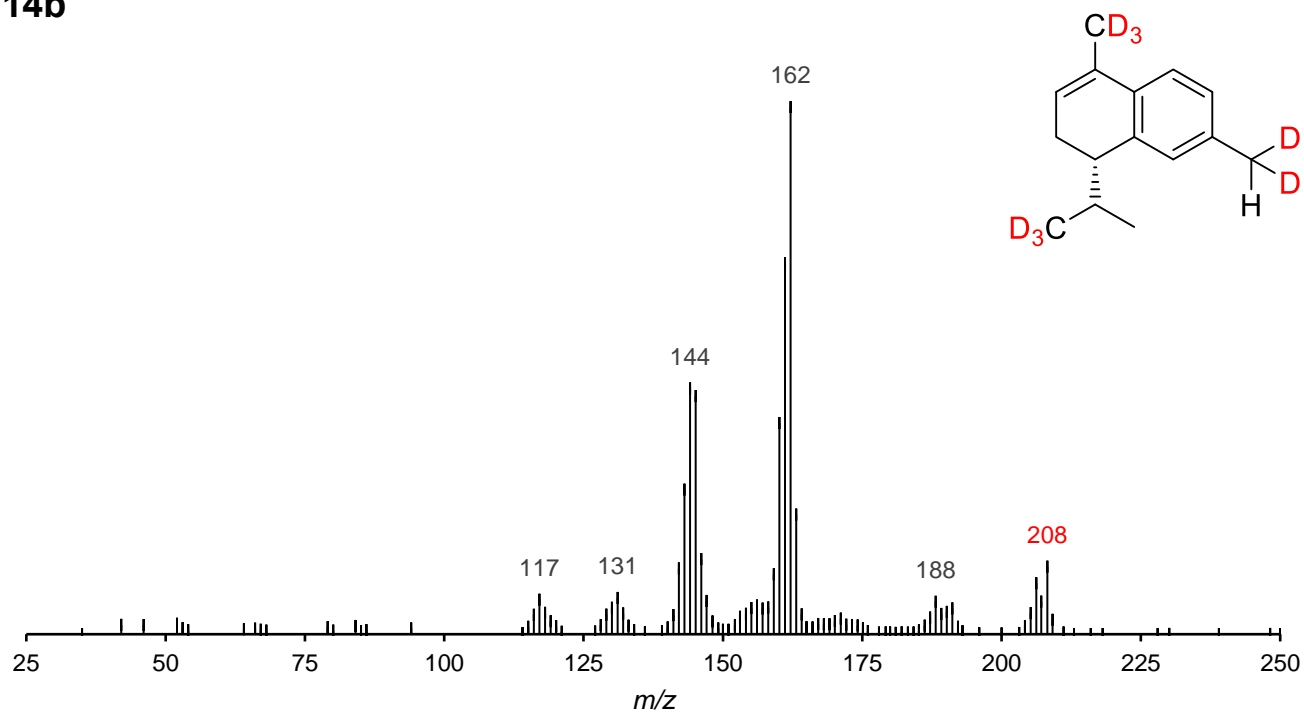
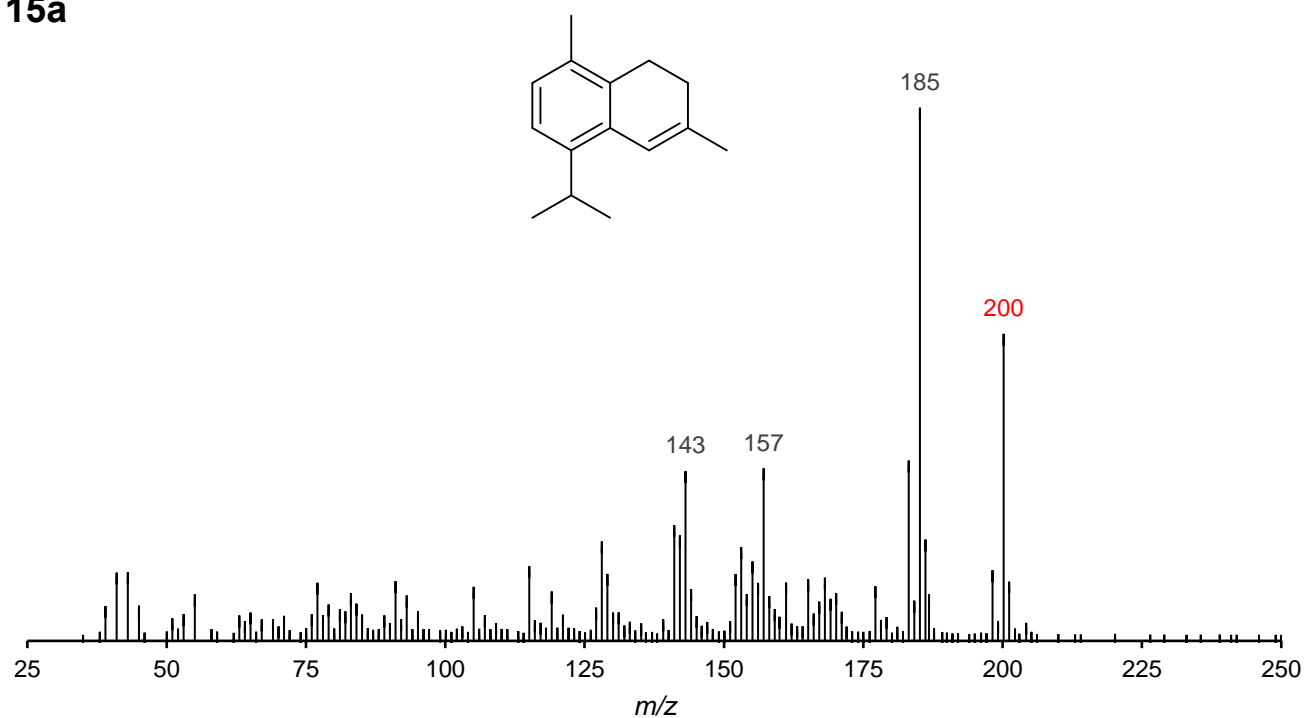


Figure S10. MS spectra and expected labeling patterns of 14a: d_0 - α -calacorene and 14b: d_8 - α -calacorene in Lemberger model wine after administration of [6,6,6- 2H_3]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

15a



15b

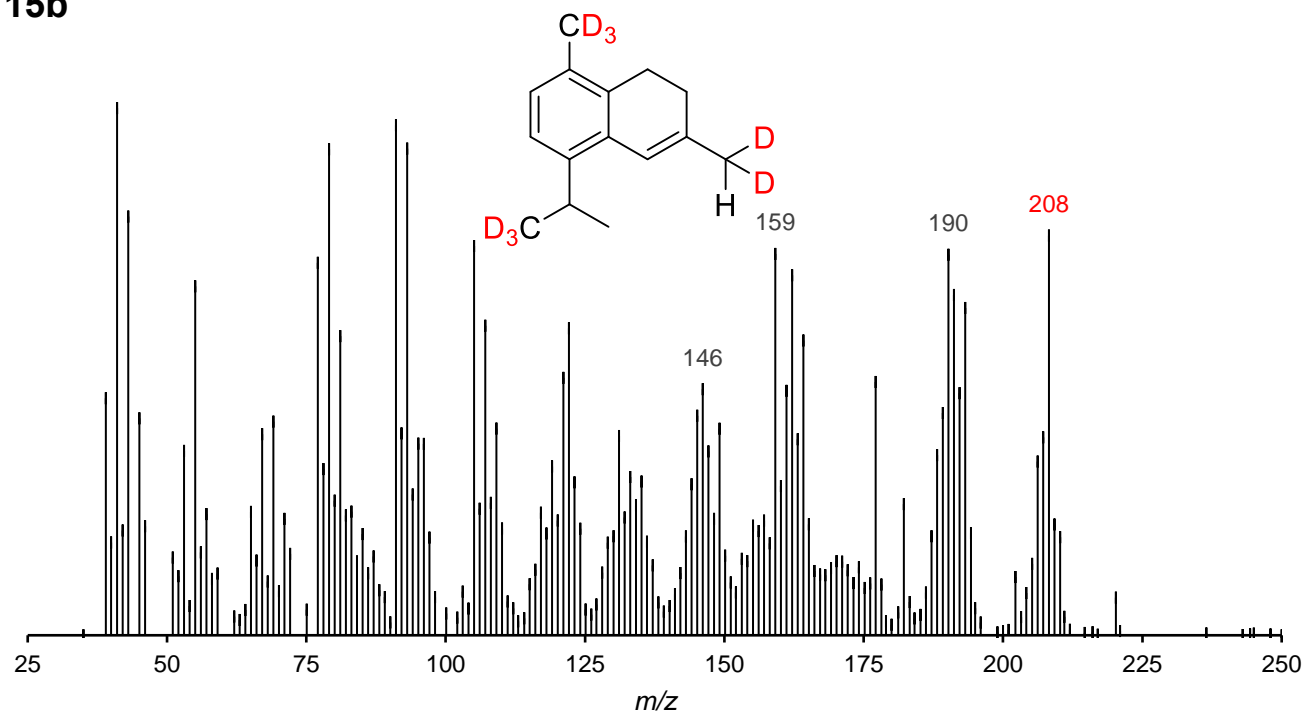


Figure S11. MS spectra and expected labeling patterns of 15a: *d*₀- α -corocalene and 15b: *d*₈- α -corocalene in Lemberger model wine after administration of [6,6,6-²H₃]-(\pm)-mevalonolactone (*d*₃-MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

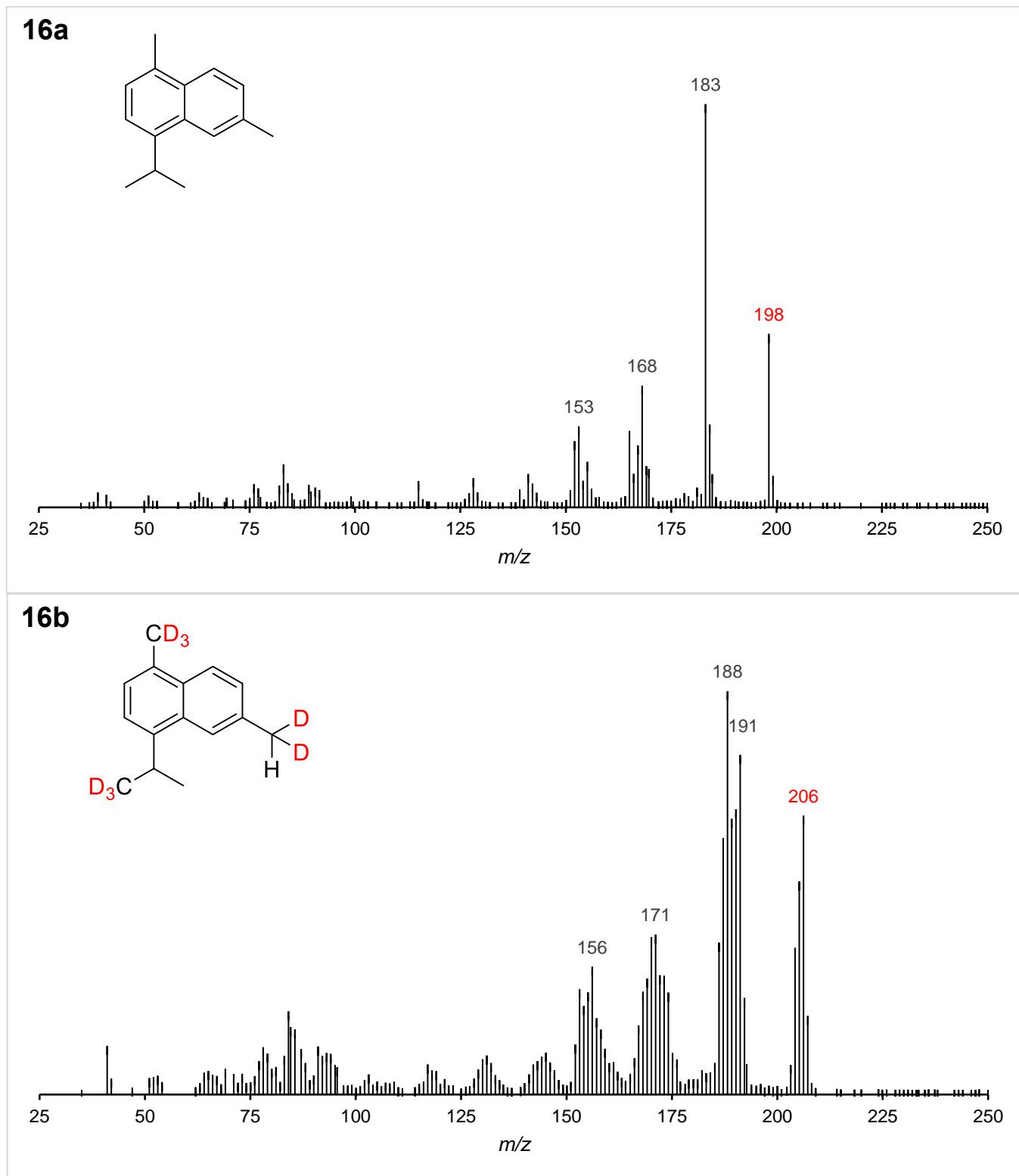


Figure S12. MS spectra and expected labeling patterns of 16a: d_0 -cadalene and 16b: d_8 -cadalene in Lemberger model wine after administration of [6,6,6- $^2\text{H}_3$]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

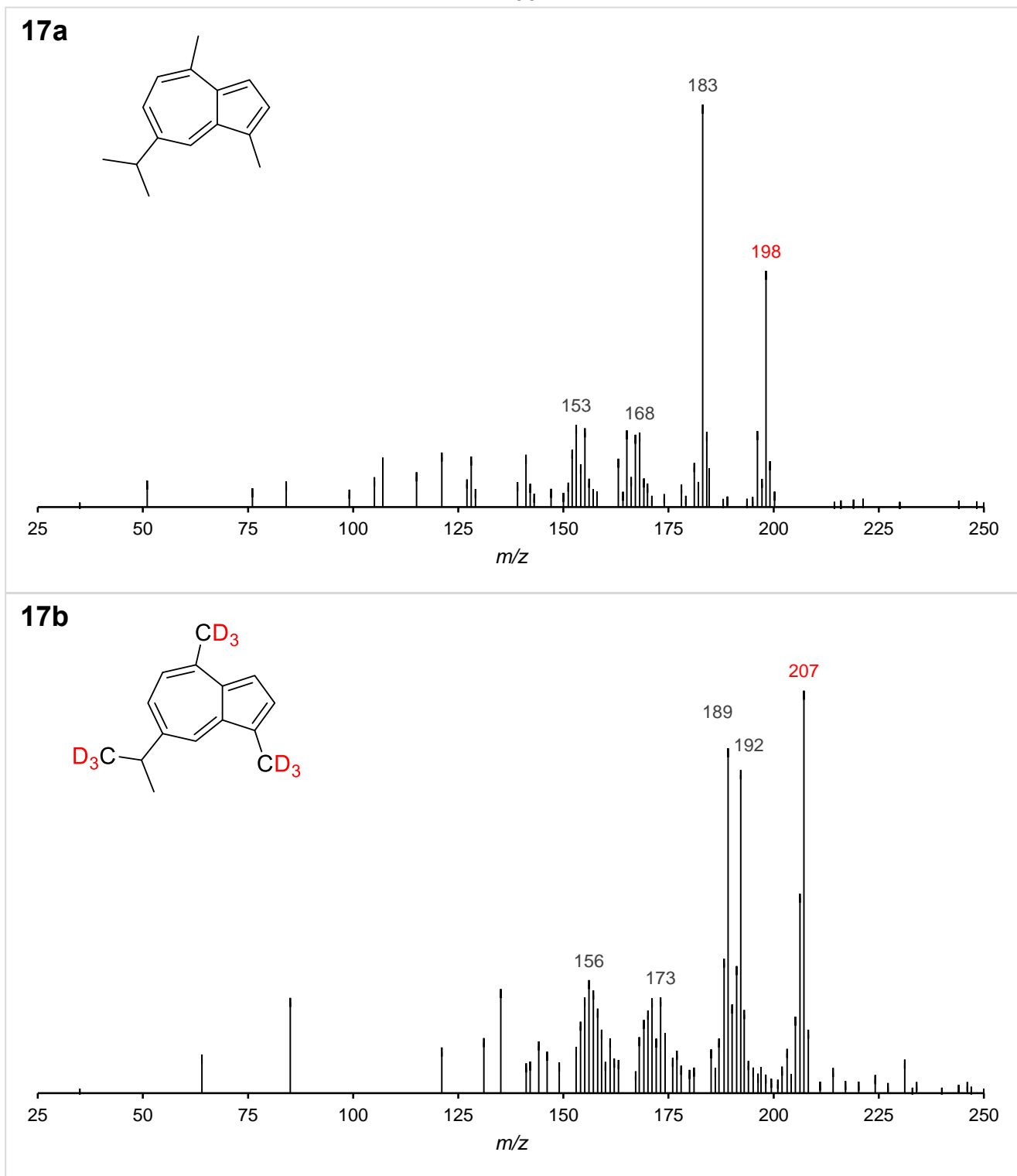


Figure S13. MS spectra and expected labeling patterns of 17a: d_0 -guaiazulene and 17b: d_9 -guaiazulene in Lemberger model wine after administration of [6,6,6-²H₃]-(\pm)-mevalonolactone (d_3 -MVL) to isolated exocarp of grape berries and microvinification.

3. REFERENCES

- (1) Chanegriha, N.; Baaliouamer, A.; Rolando, C. Polarity changes during capillary gas chromatographic and gas chromatographic–mass spectrometric analysis using serially coupled columns of different natures and temperature programming Application to the identification of constituents of essential oils. *J. Chromatogr. A* **1998**, *819*, 61–65.
- (2) Bertoli, A.; Pistelli, L.; Morelli, I.; Fraternali, D.; Giamperi, L.; Ricci, D. Volatile constituents of different parts (roots, stems and leaves) of *Smyrniololus atrum* L.† *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 522–525.
- (3) Lazari, D. M.; Skaltsa, H. D.; Constantinidis, T. Volatile constituents of *Cerastium candidissimum*, a Greek endemic species. *Flavour Fragr. J.* **2000**, *15*, 174–176.
- (4) Bortolomeazzi, R.; Berno, P.; Pizzale, L.; Conte, L. S. Sesquiterpene, Alkene, and Alkane Hydrocarbons in Virgin Olive Oils of Different Varieties and Geographical Origins. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3278–3283.
- (5) Kundakovic, T.; Fokialakis, N.; Kovacevic, N.; Chinou, I. Essential oil composition of *Achillea lingulata* and *A. umbellata*. *Flavour Fragr. J.* **2007**, *22*, 184–187.
- (6) Romeo, V.; Ziino, M.; Giuffrida, D.; Conurso, C.; Verzera, A. Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC–MS. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1272–1278.
- (7) Boti, J. B.; Koukoua, G.; N'Guessan, T. Y.; Muselli, A.; Bernardini, A.-F.; Casanova, J. Composition of the leaf, stem bark and root bark oils of *Isolona cooperi* investigated by GC (retention index), GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 357–363.
- (8) Gränicher, F.; Christen, P.; Kapetanidis, I. Essential oils from normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1421–1424.
- (9) Flamini, G.; Tebano, M.; Cioni, P. L.; Bagci, Y.; Dural, H.; Ertugrul, K.; Uysal, T.; Savran, A. A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey. *Pl. Syst. Evol.* **2006**, *261*, 217–228.
- (10) Pinto, E.; Pina-Vaz, C.; Salgueiro, L.; Gonçalves, M. J.; Costa-de-Oliveira, S.; Cavaleiro, C.; Palmeira, A.; Rodrigues, A.; Martinez-de-Oliveira, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 1367–1373.
- (11) Couladis, M.; Tzakou, O.; Stojanovic, D.; Mimica-Dukic, N.; Jancic, R. The essential oil composition of *Salvia argentea* L. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 227–229.
- (12) Gonny, M.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L.; Casanova, J. Analysis of *Juniperus communis* subsp. *alpina* needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and ¹³C-NMR. *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*, 99–106.
- (13) Couladis, M.; Baziou, P.; Petrakis, P. V.; Harvala, C. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 204–206.
- (14) Boti, J. B.; Koukoua, G.; N'Guessan, T. Y.; Casanova, J. Chemical variability of *Conyza sumatrensis* and *Microglossa pyrifolia* from Côte d'Ivoire. *Flavour Fragr. J.* **2007**, *22*, 27–31.
- (15) Lota, M.-L.; de Rocca Serra, D.; Tomi, F.; Bessiere, J.-M.; Casanova, J. Chemical composition of peel and leaf essential oils of *Citrus medica* L. and *C. limonimeditica* Lush. *Flavour Fragr. J.* **1999**, *14*, 161–166.
- (16) Blanc, M.-C.; Bradesi, P.; Gonçalves, M. J.; Salgueiro, L.; Casanova, J. Essential oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa*: analysis by ¹³C-NMR and antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*, 324–332.
- (17) Ledauphin, J.; Saint-Clair, J.-F.; Lablanquie, O.; Guichard, H.; Founier, N.; Guichard, E.; Barillier, D. Identification of Trace Volatile Compounds in Freshly Distilled Calvados and Cognac Using Preparative Separations Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5124–5134.
- (18) Bader, A.; Caponi, C.; Cioni, P. L.; Flamini, G.; Morelli, I. Composition of the essential oil of *Ballota undulata*, *B. nigra* ssp. *foetida* and *B. saxatilis*. *Flavour Fragr. J.* **2003**, *18*, 502–504.
- (19) Babushok, V. I.; Linstrom, P. J.; Zenkevich, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2011**, *40*, 043101-1–043101-47.

2.3 Kapitel III: Analyse hydrolytisch freigesetzter Monoterpen- und Sesquiterpen-Aglykone aus dem Weinbeeren-Exokarp

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Könen, P. P.; Stötzel, I.; Schwab, W.; Wüst, M. Qualitative profiling of mono- and sesquiterpenols in aglycon libraries from *Vitis vinifera* L. Gewürztraminer using multidimensional gas chromatography–mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* **2021**, *247*, 1117–1124. [doi:10.1007/s00217-021-03692-3](https://doi.org/10.1007/s00217-021-03692-3)

Bemerkung:

Die in diesem Kapitel untersuchten Hydrolysate wurden von Frau Ines Stötzel hergestellt.

2.3.1 Einführung

Freie (ungebundene), volatile Terpene des Weinbeeren-Stoffwechsels können einen direkten Beitrag zum Weinaroma leisten. Glykosidisch gebundene Terpene, die ebenfalls in *V. vinifera* vorkommen, sind nicht flüchtig und somit aromainaktiv.^[157] Diese zuckergebundenen Terpen-Alkohole können jedoch während der Herstellung und Lagerung von Weinen als Aglykone freigesetzt werden und so das Weinaroma ebenfalls beeinflussen.^[158]

Die Bildung von Terpenglykosiden erfolgt durch Übertragung aktivierter Zucker, wie Uridindiphosphat (UDP)-Glucose, auf Terpen-Alkohole. Katalysiert werden diese Reaktionen durch traubeneigene Glykosyltransferasen.^[159,160] Die Hydrolyse der Terpenglykoside, die zur Freisetzung der Aglykone führt, kann sowohl durch Enzyme (Glykosidasen) als auch durch Säurekatalyse erfolgen.^[161,132,162]

Zuckergebundene Monoterpen-Alkohole in *V. vinifera* sind bereits seit Jahrzehnten Gegenstand der Weinforschung. Neben zahlreichen geruchsaktiven Monoterpen-Aglykonen wie Nerol, Linalool und α -Terpineol konnten unterschiedliche Saccharide, vornehmlich Disaccharide, als Zuckerkomponenten der Monoterpenglykoside identifiziert werden.^[93] Zudem ergaben Untersuchungen, dass die Fraktion der glykosidisch gebundenen Monoterpen-Alkohole verglichen mit der Fraktion freier Monoterpene in der Regel die weitaus größere ist.^[163,164] Monoterpenglykoside stellen daher einen bedeutenden Pool an potentiellen Weinaromakomponenten dar.

Zuckergebundene Sesquiterpen-Alkohole waren bis vor kurzem in *V. vinifera* nicht bekannt. Im Jahr 2019 konnten erstmals Sesquiterpenglykoside in Weintrauben der Rebsorte Gewürztraminer durch Messungen mittels LC-MS/MS unter Verwendung stabilisotopenmarkierter Präkursoren nachgewiesen werden.^[131] Ein Jahr später wurden Sesquiterpenglykoside in Weinbeeren der Weißweinsorte Muscat d'Alexandrie durch Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie-Kopplung (UHPLC-qTOF-MS) vorläufig identifiziert.^[165]

Umfassende Analysen zur Charakterisierung freigesetzter Sesquiterpen-Aglykone aus Weinbeeren wurden bisher nicht durchgeführt. So ist weder die strukturelle Diversität der Sesquiterpen-Aglykone im Vergleich zu anderen Terpen-Fractionen untersucht, noch der Anteil zuckergebundener Sesquiterpenole verglichen mit glykosylierten Monoterpenolen der Weinbeere beschrieben. Mögliche Einflüsse auf das Weinaroma durch die Sesquiterpen-Aglykone wurden bisher ebenfalls nicht näher dokumentiert.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher Weinbeeren-Hydrolysate auf die Anwesenheit von Sesquiterpen- sowie Monoterpen-Aglykonen zu prüfen und diese hinsichtlich ihrer Strukturvielfalt zu untersuchen. Darüber hinaus war der prozentuale Anteil der Monoterpen-Aglykone gegenüber den Sesquiterpen-Aglykonen zu bestimmen und anhand der nachgewiesenen Aglykon-Strukturen mögliche Einflüsse auf das Sesquiterpen-Profil von Weinen abzuleiten.

2.3.2 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden Terpen-Aglykone aus *V. vinifera* L. mittels HS-SPME–GC×GC–TOF–MS umfassend analysiert. Als Probenmaterial standen Hydrolysate aus Weinbeeren-Exokarp der Rebsorte Gewürztraminer (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) zur Verfügung. Die Messung der Hydrolysate ermöglichte zum einen die Beschreibung der strukturellen Vielfalt traubeneigener Mono- und Sesquiterpen-Aglykone. Zum anderen konnte über die Summe der Peakflächen aller gefundenen Terpen-Aglykone der prozentuale Anteil der Monoterpen-Aglykon- sowie der Sesquiterpen-Aglykon-Fraktion ermittelt werden. Ferner konnten Aussagen zur Strukturvielfalt der Sesquiterpen-Aglykone im Vergleich zur Fraktion der Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe des Exokarps gemacht werden. Anhand der Strukturen der freigesetzten Sesquiterpen-Alkohole wurden zudem mögliche Einflüsse auf das Volatilen-Profil von Weinen abgeleitet.

Die umfassende Analyse von Terpen-Aglykonen aus *V. vinifera* L. setzte eine entsprechende Probenvorbereitung voraus. Zunächst wurde aus den Beerenhäuten ein wässriger Ethanol-Extrakt erzeugt, dieser mittels Carrez-Reagenzien geklärt und zentrifugiert. Die Entfernung freier Terpene sowie die Isolierung der zu untersuchenden Terpenglykosid-Fraktion erfolgte anschließend mittels SPE. Die Fraktion zuckergebundener Terpen-Alkohole wurde danach bei vermindertem Druck konzentriert, der Rückstand mit einer Pufferlösung (pH 4) versetzt und nach Zugabe eines Enzympräparats hydrolysiert.

Insgesamt konnten 24 Terpen-Aglykone in den Hydrolysaten der Weinbeerenhäute mittels HS-SPME–GC×GC–TOF–MS gefunden werden, wovon 21 Monoterpen-Aglykone waren. Die große Anzahl an nachgewiesenen Monoterpen-Aglykonen steht damit im Einklang mit bereits veröffentlichten Untersuchungen^[163,164] nach denen Monoterpene in Weinbeeren überwiegend glykosidisch gebunden vorliegen. Die Monoterpen-Aglykone zeigten zudem eine große strukturelle Vielfalt. Neben acht acyclischen Monoterpenolen konnten zwölf monocyclische und ein bicyclisches Monoterpen-Aglykon nachgewiesen werden. Die acyclischen Monoterpen-Aglykone beinhalteten bis zu drei Doppelbindungen und die monocyclischen, teils aromatischen Analyten leiteten sich von *p*-Menthan ab oder enthielten sauerstoffhaltige Heterocyclen.

Trotz der Vielzahl an Monoterpen-Aglykonen war über 80 % der Peakfläche aller nachgewiesenen Terpen-Aglykone auf nur sechs Analyten zurückzuführen (Abbildung 12).

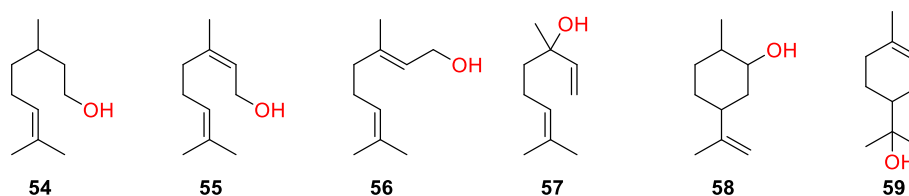


Abb. 12: Strukturformeln bedeutender Monoterpen-Aglykone.

β -Citronellol (54), Nerol (55), Geraniol (56), Linalool (57), Dihydrocarveol (58) und α -Terpineol (59).

Lediglich drei der 24 Terpen-Aglykone waren Sesquiterpen-Aglykone. Neben den beiden acyclischen Sesquiterpen-Alkoholen Farnesol (**60**) und (*E*)-Nerolidol (**61**) war der bicyclische Alkohol Drimenol (**62**) nachweisbar, der damit erstmals in *V. vinifera* vorläufig identifiziert wurde (Abbildung 13).

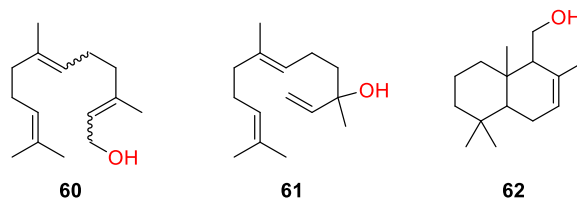


Abb. 13: Strukturformeln der nachgewiesenen Sesquiterpen-Aglykone.

Farnesol (**60**), (*E*)-Nerolidol (**61**) und Drimenol (**62**).

Die geringe Anzahl unterschiedlicher Sesquiterpen-Aglykone in den untersuchten Hydrolysaten ließ den Rückschluss zu, dass von den zahlreichen freien Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen der terpenreichen Rebsorte Gewürztraminer^[125] keine entsprechend hydroxylierten Sesquiterpen-Alkohol-Analoga im Exokarp vorkommen. Einzige Ausnahme bilden Farnesen-Isomere und ihr hydroxyliertes Analogon Farnesol. Die Strukturvielfalt der Sesquiterpen-Aglykon-Fraktion unterscheidet sich damit deutlich von der strukturell vielfältigen Fraktion freier Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe. Der geringe prozentuale Anteil der Sesquiterpen-Aglykon-Fraktion im Vergleich zur Fraktion der Monoterpen-Aglykone deutet zudem darauf hin, dass Sesquiterpenglykoside in *V. vinifera* im Gegensatz zu Monoterpenglykosiden lediglich Nebenprodukte der Terpenbiosynthese darstellen.

Trotz des geringeren Anteils der Sesquiterpen-Aglykone ist insbesondere der Nachweis der freigesetzten Alkohole Farnesol (**60**) und (*E*)-Nerolidol (**61**) von Bedeutung. Wie in Kapitel 2.2 beschrieben können diese Verbindungen säurekatalytisch ohne die Anwesenheit von Sesquiterpensynthasen bzw. Sesquiterpencyclasen in eine Vielzahl acyclischer aber auch cyclischer Sesquiterpene umgewandelt werden. Farnesol- und Nerolidol-Moleküle des Stoffwechsels von Weinhefen (*S. cerevisiae*) können auf diese Weise sogar zu einer signifikanten Veränderung des traubeneigenen Sesquiterpen-Profiles während der Weinbereitung führen.

Die Freisetzung der traubeneigenen Aglykone **60** und **61** während der Weinbereitung durch Glykosidasen und die anschließende säurekatalytische Umwandlung dieser Sesquiterpen-Alkohole könnte ebenfalls Einfluss auf das Sesquiterpen-Profil von Weinen haben. Sesquiterpenglykoside stellen daher ungeachtet der begrenzten strukturellen Vielfalt der Sesquiterpen-Aglykone neben freien Monoterpenen, zuckergebundenen Monoterpen-Alkoholen sowie freien Sesquiterpenen einen weiteren Pool an potentiellen Weinaromakomponenten dar.

2.3.3 Publikation: *Eur. Food Res. Technol.* (2021)

Es folgt die Originalpublikation:

Könen, P. P.; Stötzel, I.; Schwab, W.; Wüst, M. Qualitative profiling of mono- and sesquiterpenols in aglycon libraries from *Vitis vinifera* L. Gewürztraminer using multidimensional gas chromatography–mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* **2021**, *247*, 1117–1124.
[doi:10.1007/s00217-021-03692-3](https://doi.org/10.1007/s00217-021-03692-3)



Qualitative profiling of mono- and sesquiterpenols in aglycon libraries from *Vitis vinifera* L. Gewürztraminer using multidimensional gas chromatography–mass spectrometry

Philipp P. Könen¹ · Ines Stötzel¹ · Wilfried Schwab² · Matthias Wüst¹

Received: 9 November 2020 / Revised: 7 January 2021 / Accepted: 9 January 2021 / Published online: 10 February 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

In grape berries (*Vitis vinifera* L.), sesquiterpenes are mainly accumulated as hydrocarbons in the epicuticular wax layer of grapes, whereas monoterpenes, which are predominantly present as alcohols, are glycosylated and are stored as glycosides in the vacuoles of grape berry cells. In this study, extensive analysis of grape berry hydrolysates by means of comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight–mass spectrometry demonstrated that glycosylated sesquiterpene alcohols show very little structural diversity when compared to the sesquiterpene hydrocarbon fraction in the cuticle and are glycosylated to a rather low extent when compared to monoterpenols. Twenty-four enzymatically released terpenols were found in hydrolysates of the aromatic white wine variety Gewürztraminer (*V. vinifera* subsp. *vinifera*) after previous solid-phase extraction and headspace solid-phase microextraction. The detection of only three sesquiterpene alcohols, namely farnesol, nerolidol and drimenol, shows that most sesquiterpene hydrocarbons do not have a related hydroxylated structure in grapes. Nevertheless, the presence of the acyclic aglycone farnesol and nerolidol may be of importance for the wine aroma, since these structural isomers can be converted into numerous sesquiterpenes by nonenzymatic acid-catalyzed reactions during wine production. Grape-derived glycosidically bound sesquiterpene alcohols, therefore, represent, in addition to free sesquiterpene hydrocarbons, another pool of compounds that may influence the aroma profile of wines.

Keywords Terpenes · Glycosides · Aglycones · Sesquiterpene alcohols · GC×GC · Wine aroma

Introduction

Terpenes play a key role as plant secondary metabolites for the aroma of grapes (*Vitis vinifera* L.) and wines [1]. Both mono- (C_{10}) and sesquiterpenes (C_{15}), which are formed

via the cytosolic mevalonate-dependent metabolic pathway (MVA) and the mevalonate-independent 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate biosynthesis pathway (DOXP/MEP) occurring in plastids [2, 3], are of central importance for the aroma [4, 5]. According to current knowledge, monoterpenes are stored predominantly as sugar bound alcohols in the vacuole whereas sesquiterpenes are accumulated as hydrocarbons in the nonpolar epicuticular wax layer of grape berries [6]. While free and volatile terpenes contribute directly to the aroma, a much larger fraction of glycosidically bound, non-volatile and thus aroma-inactive terpenoids is referred to as “hidden aromatic potential” in ripe grapes [7–9]. In 1974, the first evidence of glycosidically bound terpenes in grape berries was published by Cordonnier and Bayonove [10]. In the following decade, Williams et al. confirmed the presence of monoterpene glycosides by hydrolytic cleavage of the glycosidic bond, identifying both acyclic monoterpene alcohols such as linalool, nerol and geraniol as well as monocyclic terpenols such as α -terpineol as released aglycones

✉ Matthias Wüst
matthias.wuest@uni-bonn.de

Philipp P. Könen
koenen@uni-bonn.de

Ines Stötzel
ines.stoetzel@uni-bonn.de

Wilfried Schwab
wilfried.schwab@tum.de

¹ Chair of Food Chemistry, Institute of Nutritional and Food Sciences, University of Bonn, Endenicher Allee 19C, 53115 Bonn, Germany

² Biotechnology of Natural Products, TUM School of Life Sciences, Technical University of Munich, Liesel-Beckmann-Str. 1, 85354 Freising, Germany

[11–13]. 6-*O*- α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranosides, 6-*O*- α -L-arabinofuranosyl- β -D-glucopyranosides, 6-*O*- β -D-apiofuranosyl- β -D-glucopyranosides and β -D-glucopyranosides could be determined as sugar residues of monoterpene glycosides [11, 14]. While monoterpene glycosides in grapes have been extensively investigated in recent years [15–18], glycosidically bound sesquiterpenes in *V. vinifera* are still largely unknown. The first sesquiterpene glycosides in grapes were recently tentatively identified using ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) quadrupole time-of-flight (qTOF) mass spectrometry (MS), but without further characterization of the aglycones [19]. Since glycosidically bound terpene alcohols are partly released both enzymatically and acid catalytically during winemaking [20, 21], grape-derived sesquiterpene glycosides represent an unexplored aroma potential, in addition to monoterpene glycosides. The potential importance of sesquiterpene alcohols for the wine aroma has recently been demonstrated by microvinification experiments. The yeast-derived, acyclic sesquiterpene alcohols nerolidol and farnesol can be converted into numerous other sesquiterpenes by acid-catalyzed reactions during the vinification process, thus significantly altering the sesquiterpene profile of wines [22]. In the presented study, the terpene alcohols released from grape-derived terpene glycosides were analyzed using the Gewürztraminer variety. The glycosidically bound terpenes from isolated exocarp of grapes were separated and concentrated using solid-phase extraction (SPE) and subsequently hydrolyzed enzymatically. The hydrolysates were analyzed by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight–mass spectrometry (GC \times GC–TOF–MS) after previous headspace solid-phase microextraction (HS–SPME).

Materials and methods

Chemicals

Milli-Q water, ethanol (purity: $\geq 99.8\%$) and zinc sulfate (purity: 99.9%) were purchased from VWR International (Darmstadt, HE, Germany). The solvents dichloromethane (purity: 99.99%) and methanol (purity: $\geq 99.9\%$) were acquired from Fisher Scientific UK Limited (Loughborough, Leicestershire, UK) and Honeywell (Seelze, NI, Germany). Di-sodium hydrogen phosphate (purity: $\geq 99\%$) and sodium dihydrogen phosphate monohydrate (purity: $\geq 99\%$) were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BY, Germany). Potassium ferrocyanide trihydrate (purity: $\geq 99\%$) was acquired from Acros Organics (Geel, Antwerp Province, Belgium). Citric acid monohydrate (purity: $\geq 99.5\%$) and geraniol (purity: $\geq 90\%$) were purchased from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe,

BW, Germany) and the enzyme preparation (β -glucosidase, polygalacturonase) from Oenobrand SAS (Montpellier, Occitanie, France). The compounds citronellol (purity: $\geq 95\%$), nerol (purity: 98.7%), carvacrol (purity: 99.4%), thymol (purity: $> 99.9\%$), menthol (purity: 99.3%), dihydrocitronellol (purity: 98.3%) and a C₇–C₃₀ saturated alkane standard solution (certified reference material) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, BW, Germany). Nerolidol (*cis* + *trans*, purity: 97.5%), farnesol (mixture of isomers, purity: 98.0%), α -terpineol (purity: 96%) and linalool (purity: 98.5%) were purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA).

Sample material

The grape berries were sampled on two dates, September 15, 2016 and October 4, 2016 from two aromatic clones (11 Gm and FR 46-106) of Gewürztraminer at the Hochschule Geisenheim University (Geisenheim, HE, Germany; GPS coordinates: 49.98505, 7.94582; altitude: 96 m a.s.l.). The stage of maturation of the grapes was described on the basis of refractometrically determined soluble solids (September 15, 2016: 11 Gm, 19.0°Bx; FR 46-106, 19.5°Bx and October 4, 2016: 11 Gm, 21.0°Bx; FR 46-106, 23.0°Bx).

Sample preparation

Tissue extraction

The isolation of the terpene glycosides from the skin of grape berries was carried out based on a previous paper [23]. As described, the skin of the grapes was peeled off and adherent pulp was removed. For the terpene analysis, 20 g (fresh weight) of the grape berry skin was grounded in liquid nitrogen. The material was extracted under nitrogen and exclusion of light in a phosphate buffer (0.1 M; Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 7) and 13% (v/v) ethanol for 24 h. The extracts were clarified with Carrez reagents and then centrifuged at 24,000 $\times g$, 5 °C for 20 min. The supernatant was purified and concentrated by solid-phase extraction.

Solid-phase extraction (SPE)

To separate the free terpenes from the glycosidically bound terpenes a 500 mg Lichrolut EN column from Merck KGaA (Darmstadt, HE, Germany) was conditioned as stated previously [24]. The free terpenes were eluted with dichloromethane and the glycosidically bound terpenes with methanol. The fraction containing the separated glycosidically bound terpenes was concentrated under reduced pressure until dryness.

Hydrolysis

The residue was dissolved in 20 mL citrate-HCl-buffer (0.1 M; pH 4) and 100 mg of the enzyme preparation was added. All samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Sample preparation was performed three times, resulting in three biological replicates.

Analysis of the hydrolysates

The hydrolysates of the grape berries were thawed and homogenized before analysis. A Combi PAL-xt autosampler with a heatable agitator and fiber conditioning station from CTC Analytics (Zwingen, BL, Switzerland) was used. The terpene alcohols were extracted from headspace using a mixed SPME fiber for volatile and semivolatile compounds ($\text{C}_3\text{--C}_{20}$) from Supelco (Bellefonte, PA, USA), based on a method described by Welke et al. [25]. After each analysis, the SPME fiber was baked-out to avoid

sample carryover. In addition, empty vials were measured as control. The injection was carried out into a 7890B gas chromatograph from Agilent Technologies (Bellefonte, PA, USA) equipped with a ZX2 GC \times GC cryogenic modulator from Zoex Corp (Houston, TX, USA). Gas chromatographic separation was performed by combining a highly polar capillary column from Agilent Technologies (Bellefonte, PA, USA) with a medium polar GC column from MEGA s.n.c. (Legnano, MI, Italy), a combination that was used in a previous work for the analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp [26]. The GC \times GC separation was followed by a mass spectrometric analysis using a BenchTOF-Select time-of-flight-mass spectrometer from Markes International Limited (Llantrisant, Wales, UK). The method parameters are listed in Table 1. Available mono- and sesquiterpene standards were diluted in ethanol and the resulting 1 mg/kg solutions were injected with a liquid syringe (1 μL injection volume, split mode).

Table 1 HS-SPME-GC \times GC-TOF-MS conditions used for the analysis of hydrolysates from grape berries (Gewürztraminer cultivar)

	Conditions
HS-SPME	
HS vial	10 mL headspace vial (screw cap)
Sample volume	1 mL hydrolysate
SPME fiber	DVB/CAR/PDMS ^a ; 50/30 μm ; 2 cm; Stableflex; 24 Ga
Incubation conditions	45 $^{\circ}\text{C}$ /0 rpm/10 min
Extraction conditions	45 $^{\circ}\text{C}$ /0 rpm/30 min
Desorption conditions	250 $^{\circ}\text{C}$ /5 min
Fiber bake-out conditions	250 $^{\circ}\text{C}$ /15 min
GC \times GC	
Injector mode	Splitless
Injector temperature	250 $^{\circ}\text{C}$
1D GC column	DB-WAX Ultra Inert (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm^{b})
2D GC column	MEGA-17 MS FAST (1.7 m \times 0.10 mm \times 0.10 μm^{b})
Carrier gas	Helium
Gas flow	Constant flow, 1.0 mL min ⁻¹
Initial inlet pressure	24 psi
GC oven program	35 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)/5 $^{\circ}\text{C}$ min ⁻¹ to 120 $^{\circ}\text{C}$ (0 min)/3 $^{\circ}\text{C}$ min ⁻¹ to 220 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)
Modulator temperature offset	+25 $^{\circ}\text{C}$
Modulation period	5 s
Pulse length	350 ms
TOF-MS	
MS transfer line temperature	250 $^{\circ}\text{C}$
Ion source temperature	250 $^{\circ}\text{C}$
Ionization mode	Electron impact (EI), -70 eV
Detector voltage	-2214 V
Mass range	35–250 m/z
Scan rate	100 Hz

^aDivinylbenzene (DVB)/carboxen (CAR)/polydimethylsiloxane (PDMS)

^bLength \times internal diameter \times film thickness

Data analysis

Data were collected in ProtoToF (version 2.0) as *.LSC files and processed using the software platform ChromSpace (version 1.5.1). Both programs are from Markes International Limited (Llantrisant, Wales, UK). The data files were subjected to a dynamic background compensation (dbc) with a peak width of 100 ms. Data analysis was carried out using filtering methods (extracted-ion chromatogram, parametric filtering settings) and integration algorithms (persistence, deconvolution). Compound identification was performed using mass spectra (MS), retention indices (RI) and authentic standards (STD). Recorded mass spectra were compared with library spectra from the National Institute of Standards and Technology (NIST) database of the mass spectral search program (NIST, Gaithersburg, MD, USA; version 2.2). The similarity of the mass spectra was indicated by match factors (MF) and reverse match factors (RMF). After liquid injection of a saturated *n*-alkane standard solution (C₇–C₃₀), the retention indices (RI_{exp}) were calculated using the method of van Den Dool and Kratz for temperature-programmed gas chromatography [27]. The mono- and sesquiterpene alcohols were subsequently identified by comparing the experimentally determined retention indices with literature values (RI_{lit}). The sesquiterpene alcohols (*E*)-nerolidol and farnesol as well as the monoterpene alcohols linalool, menthol, dihydrocitronellol, α -terpineol, β -citronellol, nerol, geraniol, thymol and carvacrol were additionally identified by commercially available standard compounds. To determine the ratio of sesquiterpene aglycones to monoterpene aglycones, the mean values of the peak areas of all terpenes were summed and the percentage of each analyte calculated.

Results and discussion

The gas chromatographic separation of terpene aglycones from grapes (*V. vinifera* L.) requires prior cleavage of the glycosidic bond by means of enzymes or acids. By combining suitable extraction methods (SPE–HS–SPME) with comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight–mass spectrometry (GC \times GC–TOF–MS), a total of 24 terpene aglycones were found in hydrolysates of grape berry exocarp. Figure 1 shows the two-dimensional separation of the released terpene alcohols.

Twenty-one monoterpene alcohols were identified in the hydrolysates of grape berries of the terpene-rich white wine variety Gewürztraminer (*V. vinifera* subsp. *vinifera*, clones 11 Gm and FR 46-106). Among these, the structural diversity of the *p*-menthane-related monoterpenols is remarkable. The detection of menthol is particularly interesting because its precursor piperitone contributes to the positive mint aroma of red Bordeaux wines, as described by Picard et al. [28]. The large number of monoterpenols found in the hydrolysates is in marked contrast to the few free monoterpene alcohols found in the volatile profile of ripe grape berries (Gewürztraminer cultivar) identified by May [29]. The GC \times GC–TOF–MS measurements thus confirm the assumption that monoterpenols are predominantly glycosidically bound in grapes [6].

Although more than 80% of the peak area of all terpene aglycones detected can be attributed to only six monoterpenols, nerol, α -terpineol, linalool, geraniol, β -citronellol and dihydrocarveol, the first detection of grape-derived sesquiterpene aglycones in the Gewürztraminer variety, especially (*E*)-nerolidol and farnesol [30, 31], is noteworthy. While previous studies showed that free mono- and sesquiterpene hydrocarbons as well as monoterpene alcohols mainly characterize the wine aroma, the detection of grape-derived

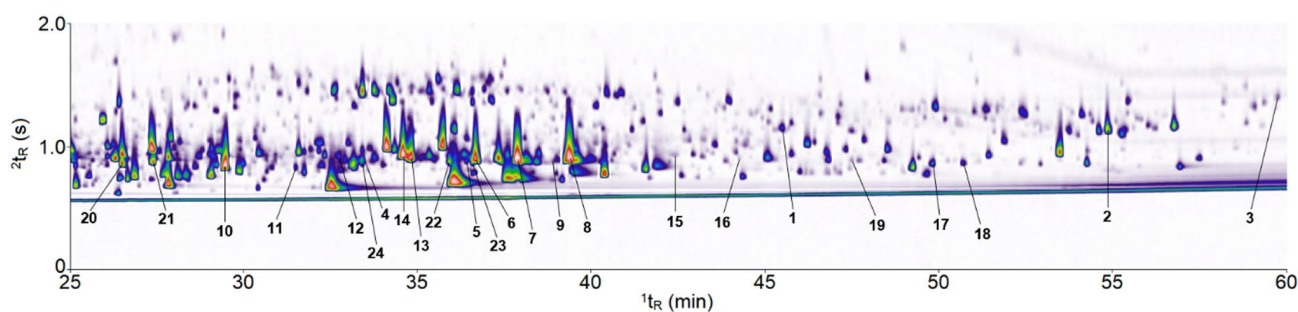
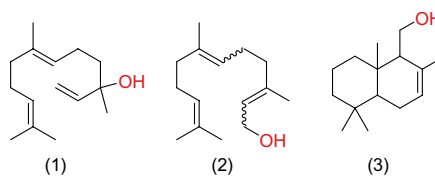


Fig. 1 GC \times GC–TOF–MS total ion chromatogram (TIC) of a hydrolysate from grape berries of the white wine variety Gewürztraminer (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*). The *x* axis represents the primary column retention time (1t_R) and the *y* axis corresponds to the retention time on the secondary column (2t_R). The peak intensity, which is proportional to analyte concentration, is represented by color-coding

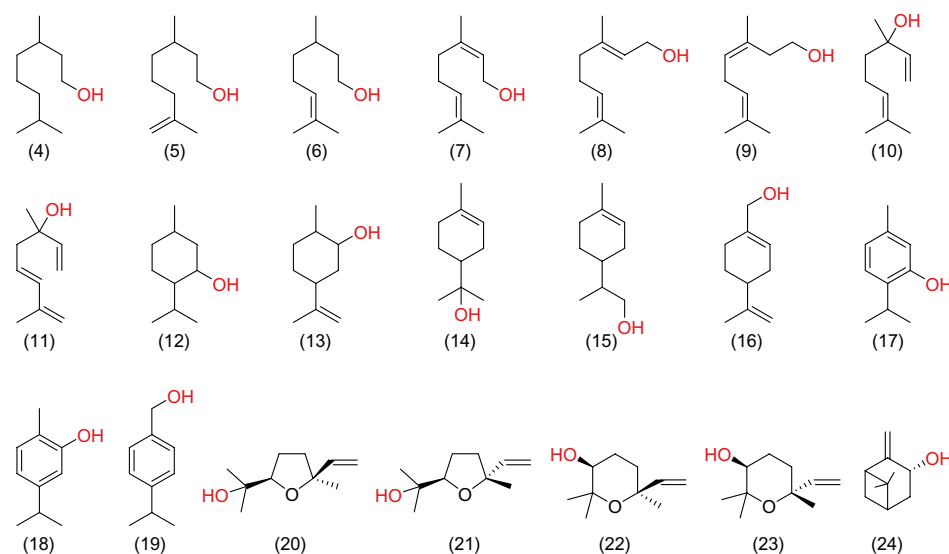
from low (violet) to high (red) on a white background. Note that a logarithmic color gradient has been selected, as numerous trace volatile compounds would otherwise not be visible in a single contour plot due to some very dominant peaks. Peak numbers of mono- and sesquiterpene aglycones released by enzymatic hydrolysis refer to those of Fig. 2 and Table 2

Fig. 2 Structural formulas of the enzymatically released terpene alcohols from grape-derived terpene glycosides, grouped by sesquiterpene and monoterpene aglycones. 1–2 acyclic sesquiterpene alcohols, 3 bicyclic sesquiterpene alcohol, 4–11 acyclic monoterpene alcohols, 12–23 monocyclic monoterpene alcohols, 24 bicyclic monoterpene alcohol

Sesquiterpene aglycones



Monoterpene aglycones



sesquiterpene aglycones reveals an undiscovered pool of potential aroma components in the Gewürztraminer variety.

It is known that wine yeasts are able to form the sesquiterpene alcohols farnesol and nerolidol [32]. Recently, deuterium-labeling experiments showed that yeast-derived farnesol and nerolidol significantly alter the terpene profile of wines during the fermentation process [22]. The sesquiterpene alcohols act as precursors for the formation of numerous other sesquiterpenes. Due to the slightly acidic pH during vinification, many sesquiterpenes can already be formed by acid catalysis from nerolidol and farnesol without the presence of corresponding sesquiterpene cyclases [33].

In addition to the acyclic sesquiterpene alcohols nerolidol and farnesol, the first tentative and indirect detection of glycosidically bound drimenol in grape berry exocarp was obtained by GC×GC–TOF–MS analysis. The bicyclic drimenol has a drimane skeleton that has not been found in *V. vinifera* L. so far. The detection of drimenol is particularly interesting due to the antifungal activity against *Botrytis cinerea* [34], a pathogen that affects numerous plants including grapes [35]. At this point, it should be mentioned

that drimenol can also be formed by rearrangement from farnesol [36].

The fact that only three sesquiterpene alcohols were found in the hydrolysates after extensive GC×GC analysis shows that sesquiterpene alcohols are rather by-products of sesquiterpene hydrocarbon synthases that are responsible for the biosynthesis of structurally diverse carbon skeletons. Glycosylated sesquiterpene alcohols are probably stored in the vacuole of the grape berry cell as water-soluble flavor precursors, similar to glycosylated monoterpene alcohols [37].

It should also be noted that both, numerous monoterpene hydrocarbons and numerous monoterpene alcohols are present in grape berries. In the case of sesquiterpenes, hydrocarbons dominate the volatile profile without the corresponding sesquiterpene alcohol analogues. However, these grape-derived glycosidically bound sesquiterpene alcohols, in particular farnesol and nerolidol, represent another important source of aroma precursors that may influence the wine aroma.

Table 2 Identified terpene aglycones enzymatically hydrolyzed from terpene glycosides in Gewürztraminer grapes (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) using SPE–HS–SPME–GC×GC–TOF–MS

No.	Terpene aglycone	Molecular formula	Percentage ^c	Identification criteria			
				RI _{exp} ^d	RI _{lit} ^e	MS (MF, RMF) ^f	STD ^g
Sesquiterpene aglycones							
1	(<i>E</i>)-Nerolidol ^a	C ₁₅ H ₂₆ O	0.47 ± 0.31%	2040	2040 [38]	805, 852	a. ⁱ
2	Farnesol ^a	C ₁₅ H ₂₆ O	2.68 ± 1.71%	2357	2354 [39]	832, 835	a. ⁱ
3	Drimenol ^b	C ₁₅ H ₂₆ O	0.19 ± 0.03%	2505 ^h	2494 [40]	800, 816	n.a. ^j
Monoterpene aglycones							
20	(<i>Z</i>)-Furan linalool oxide ^b	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	3.05 ± 0.72%	1454	1454 [41]	842, 850	n.a. ^j
21	(<i>E</i>)-Furan linalool oxide ^b	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	3.39 ± 1.02%	1483	1483 [42]	804, 814	n.a. ^j
10	Linalool ^a	C ₁₀ H ₁₈ O	13.84 ± 0.84%	1547	1547 [43]	797, 808	a. ⁱ
11	Hotrienol ^b	C ₁₀ H ₁₆ O	0.13 ± 0.04%	1608	1613 [44]	729, 763	n.a. ^j
12	Menthol ^a	C ₁₀ H ₂₀ O	0.86 ± 0.13%	1645	1644 [45]	856, 874	a. ⁱ
24	(<i>E</i>)-Pinocarveol ^b	C ₁₀ H ₁₆ O	1.19 ± 0.19%	1666	1659 [46]	815, 831	n.a. ^j
4	Dihydrocitronellol ^a	C ₁₀ H ₂₂ O	0.17 ± 0.02%	1669	1666 [47]	732, 748	a. ⁱ
14	α-Terpineol ^a	C ₁₀ H ₁₈ O	15.70 ± 1.58%	1703	1703 [48]	848, 889	a. ⁱ
13	Dihydrocarveol ^b	C ₁₀ H ₁₈ O	10.43 ± 0.64%	1709	1702 [49]	724, 757	n.a. ^j
22	(<i>Z</i>)-Pyran linalool oxide ^b	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	2.05 ± 0.45%	1744	1744 [50]	774, 801	n.a. ^j
5	α-Citronellol ^b	C ₁₀ H ₂₀ O	0.25 ± 0.03%	1759	1767 [47]	883, 924	n.a. ^j
23	(<i>E</i>)-Pyran linalool oxide ^b	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.52 ± 0.51%	1764	1763 [51]	828, 839	n.a. ^j
6	β-Citronellol ^a	C ₁₀ H ₂₀ O	11.33 ± 2.02%	1767	1767 [52]	846, 859	a. ⁱ
7	Nerol ^a	C ₁₀ H ₁₈ O	20.45 ± 3.91%	1805	1803 [53]	813, 821	a. ⁱ
9	(<i>Z</i>)-Iso-geraniol ^b	C ₁₀ H ₁₈ O	0.17 ± 0.04%	1835	1849 [54]	767, 789	n.a. ^j
8	Geraniol ^a	C ₁₀ H ₁₈ O	11.50 ± 0.44%	1848	1848 [55]	804, 809	a. ⁱ
15	<i>p</i> -Mentha-1-en-9-ol ^b	C ₁₀ H ₁₈ O	0.17 ± 0.03%	1943	1948 [56]	814, 868	n.a. ^j
16	Perillyl alcohol ^b	C ₁₀ H ₁₆ O	0.03 ± 0.01%	2000	2004 [57]	693, 762	n.a. ^j
19	Cuminol ^b	C ₁₀ H ₁₄ O	0.08 ± 0.01%	2106	2101 [58]	763, 804	n.a. ^j
17	Thymol ^a	C ₁₀ H ₁₄ O	0.84 ± 0.19%	2182	2183 [59]	876, 898	a. ⁱ
18	Carvacrol ^a	C ₁₀ H ₁₄ O	0.54 ± 0.17%	2213	2212 [60]	905, 916	a. ⁱ

^aIdentified by retention index, mass spectrum and authentic standard

^bTentatively identified by retention index and mass spectral data

^cPercentage of aglycone determined by the sum of peak areas. The mean value and the standard deviation resulting from the integration of three biological replicates are given

^dExperimental retention indices on a polar DB-WAX Ultra Inert column calculated according to the method of van Den Dool and Kratz for temperature-programmed gas chromatography

^eRetention indices reported in the literature for equivalent capillary GC columns

^fMean mass spectral match quality. The mean values of the match factors (MF) and reverse match factors (RMF) for the respective terpene aglycones are listed

^gLiquid injection of an authentic standard for compound identification

^hRI_{exp} value has been extrapolated

ⁱAn authentic standard was commercially available (a.) and was measured using GC×GC–TOF–MS. The purity of this reference material was documented in the “[Materials and methods](#)”

^jAn authentic standard material was not available (n.a.)

Acknowledgements We thank the DFG for financial support (WU 322/6-1 and INST 217/783-1 FUGG). The grapes of the white wine variety Gewürztraminer were harvested at the Hochschule Geisenheim University. We would like to thank the Department of Grapevine Breeding for providing the sample material.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by the German Research Foundation (DFG, WU 322/6-1 and INST 217/783-1 FUGG).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Compliance with ethics requirements This article does not contain any studies with human or animal subjects.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Mele MA, Kang H-M, Lee Y-T, Islam MZ (2020) Grape terpenoids: flavor importance, genetic regulation, and future potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1–19
- Luan F, Wüst M (2002) Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. *Phytochemistry* 60:451–459
- May B, Lange BM, Wüst M (2013) Biosynthesis of sesquiterpenes in grape berry exocarp of *Vitis vinifera* L.: evidence for a transport of farnesyl diphosphate precursors from plastids to the cytosol. *Phytochemistry* 95:135–144
- Li Z, Howell K, Fang Z, Zhang P (2020) Sesquiterpenes in grapes and wines: occurrence, biosynthesis, functionality, and influence of winemaking processes. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19:247–281
- Mateo JJ, Jiménez M (2000) Monoterpenes in grape juice and wines. *J Chromatogr A* 881:557–567
- Schwab W, Wüst M (2015) Understanding the constitutive and induced biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in grapes (*Vitis vinifera*): a key to unlocking the biochemical secrets of unique grape aroma profiles. *J Agric Food Chem* 63:10591–10603
- Günata YZ, Bayonove CL, Baumes RL, Cordonnier RE (1985) The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J Chromatogr A* 331:83–90
- Stahl-Biskup E, Intert F, Holthuijzen J, Stengele M, Schulz G (1993) Glycosidically bound volatiles—a review 1986–1991. *Flavour Fragr J* 8:61–80
- Lamorte SA, Gambuti A, Genovese A, Selicato S, Moio L (2008) Free and glycoconjugated volatiles of *V. vinifera* grape 'Falanghina.' *Vitis* 47:241–243
- Cordonnier R, Bayonove C (1974) Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpenes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *CR Acad Sci Paris* 278:3387–3390
- Williams PJ, Strauss CR, Wilson B, Massy-Westropp RA (1982) Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* 21:2013–2020
- Williams PJ, Strauss CR, Wilson B, Massy-Westropp RA (1982) Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene β -D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J Agric Food Chem* 30:1219–1223
- Williams PJ, Strauss CR, Wilson B, Massy-Westropp RA (1982) Use of C₁₈ reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines. *J Chromatogr A* 235:471–480
- Günata YZ, Dugelay I, Sapis J-C, Baumes R, Bayonove C (1994) Role of Enzymes in the Use of the Flavour Potential from Grape Glycosides in Winemaking. In: Schreier P, Winterhalter P (eds) *Progress in flavour precursor studies*. Proceedings of the international conference. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, pp 219–245
- Flamini R, De Rosso M, Panighel A, Dalla Vedova A, De Marchi F, Bavaresco L (2014) Profiling of grape monoterpene glycosides (aroma precursors) by ultra-high performance-liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC/QTOF). *J Mass Spectrom* 49:1214–1222
- Stanitzek S (2014) Monoterpenylglucosyltransferasen aus *Vitis vinifera*: Funktionelle Charakterisierung und Analytik der Produkte mittels LC-MS/MS. Ph.D. thesis, University of Bonn
- Hjelmeland AK, Ebeler SE (2015) Glycosidically bound volatile aroma compounds in grapes and wine: a review. *Am J Enol Vitic* 66:1–11
- Wang X-j, Song H-c, Yang Y, Tao Y-s (2020) Chemical profile of terpene glycosides from Meili grape detected by GC–MS and UPLC–Q-TOF-MS. *Eur Food Res Technol* 246:2323–2333
- Caffrey AJ, Lerno LA, Zweigenbaum J, Ebeler SE (2020) Direct analysis of glycosidic aroma precursors containing multiple aglycone classes in *Vitis vinifera* berries. *J Agric Food Chem* 68:3817–3833
- Carrau FM, Boido E, Dellacassa E (2008) Terpenoids in grapes and wines: origin and micrometabolism during the vinification process. *Nat Prod Commun* 3:577–592
- Sarry J-E, Günata YZ (2004) Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem* 87:509–521
- Könen PP, Wüst M (2020) Dissecting sesquiterpene profiles of Lemberger red wines using ex vivo tissue deuterium-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight–mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 68:8936–8941
- Bönisch F, Frotscher J, Stanitzek S, Rühl E, Wüst M, Bitz O, Schwab W (2014) A UDP-glucose: monoterpene glucosyltransferase adds to the chemical diversity of the grapevine metabolome. *Plant Physiol* 165:561–581
- Pifeiro Z, Palma M, Barroso CG (2004) Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. *Anal Chim Acta* 513:209–214
- Welke JE, Manfroi V, Zanusi M, Lazarotto M, Alcaraz Zini C (2012) Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1226:124–139

26. Könen PP, Wüst M (2019) Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC × GC–MS). *Beilstein J Org Chem* 15:1945–1961
27. Van Den Dool H, Kratz PD (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. *J Chromatogr A* 11:463–471
28. Picard M, Lytra G, Tempere S, Barbe J-C, De Revel G, Marchand S (2016) Identification of piperitone as an aroma compound contributing to the positive mint nuances perceived in aged Red Bordeaux wines. *J Agric Food Chem* 64:451–460
29. May B (2015) Biosynthese und Analytik von Sesquiterpenen in Weinbeeren (*Vitis vinifera*). Ph.D. thesis, University of Bonn
30. López R, Ezpeleta E, Sánchez I, Cacho J, Ferreira V (2004) Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography–olfactometry. *Food Chem* 88:95–103
31. Pedroza MA, Zalacain A, Lara JF, Rosario Salinas M (2010) Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE–GC–MS. *Food Res Int* 43:1003–1008
32. Fagan GL, Kepner RE, Webb AD (1981) Production of linalool, *cis*- and *trans*-nerolidol, and *trans*, *trans*-farnesol by *Saccharomyces fermentati* growing as a film on simulated wine. *Vitis* 20:36–42
33. Gutsche CD, Maycock JR, Chang CT (1968) Acid-catalyzed cyclization of farnesol and nerolidol. *Tetrahedron* 24:859–876
34. Robles-Kelly C, Rubio J, Thomas M, Sedán C, Martínez R, Olea AF, Carrasco H, Taborga L, Silva-Moreno E (2017) Effect of drimenol and synthetic derivatives on growth and germination of *Botrytis cinerea*: evaluation of possible mechanism of action. *Pestic Biochem Physiol* 141:50–56
35. Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol* 8:561–580
36. Kwon M, Cochrane SA, Vederas JC, Ro D-K (2014) Molecular cloning and characterization of drimenol synthase from valerian plant (*Valeriana officinalis*). *FEBS Lett* 588:4597–4603
37. Fontes N, Gerós H, Delrot S (2011) Grape berry vacuole: a complex and heterogeneous membrane system specialized in the accumulation of solutes. *Am J Enol Vitic* 62:270–278
38. Brophy JJ, Forster PI, Goldsack RJ (1998) Essential oils of some Australian monimiaceae. *Flavour Fragr J* 13:273–276
39. Ledauphin J, Saint-Clair J-F, Lablanquie O, Guichard H, Founier N, Guichard E, Barillier D (2004) Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac using preparative separations coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 52:5124–5134
40. Pannequin A, Tintaru A, Desjobert J-M, Costa J, Muselli A (2017) New advances in the volatile metabolites of *Fruillania tamarisci*. *Flavour Fragr J* 32:409–418
41. Pino JA, Almora K, Marbot R (2003) Volatile components of papaya (*Carica papaya* L., Maradol variety) fruit. *Flavour Fragr J* 18:492–496
42. Cho IH, Choi H-K, Kim Y-S (2006) Difference in the volatile composition of pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.) according to their grades. *J Agric Food Chem* 54:4820–4825
43. Paolini J, Costa J, Bernardini A-F (2005) Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1076:170–178
44. Shimoda M, Wu Y, Osajima Y (1996) Aroma compounds from aqueous solution of haze (*Rhus succedanea*) honey determined by adsorptive column chromatography. *J Agric Food Chem* 44:3913–3918
45. Chung HY, Cadwallader KR (1993) Volatile components in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) meat and processing by-product. *J Food Sci* 58:1203–1207
46. Brophy JJ, Goldsack RJ, O’Sullivan W (2004) Chemistry of the Australian gymnosperms Part VII. The leaf oils of the genus *Actinostrobus*. *Biochem Syst Ecol* 32:867–873
47. Chang LP, Sheng LS, Yang MZ, An DK (1989) Retention index of essential oil in temperature-programmed capillary column gas chromatography. *Acta Pharm Sin* 24:847–852
48. Castilho P, Liu K, Rodrigues AI, Feio S, Tomi F, Casanova J (2007) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio from Madeira. *Flavour Fragr J* 22:139–144
49. Verzera A, Trozzi A, Zappalà M, Conurso C, Cotroneo A (2005) Essential oil composition of *Citrus meyerii* Y. Tan. and *Citrus medica* L. cv. diamante and their lemon hybrids. *J Agric Food Chem* 53:4890–4894
50. Choi H-S, Lee Kim M-S, Sawamura M (2002) Constituents of the essential oil of *cnidium officinale* Makino, a Korean medicinal plant. *Flavour Fragr J* 17:49–53
51. Sing ASC, Smadja J, Brevard H, Maignial L, Chaintreau A, Marion J-P (1992) Volatile constituents of Faham (*Jumellea fragrans* (Thou.) Schltr.). *J Agric Food Chem* 40:642–646
52. Howard KL, Mike JH, Riesen R (2005) Validation of a solid-phase microextraction method for headspace analysis of wine aroma components. *Am J Enol Vitic* 56:37–45
53. Verzera A, Campisi S, Zappalà M, Bonaccorsi I (2001) SPME–GC–MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin. *Am Lab* 33:18–21
54. Chung TY, Eiserich JP, Shibamoto T (1993) Volatile compounds isolated from edible Korean Chamchwi (*Aster scaber* Thunb.). *J Agric Food Chem* 41:1693–1697
55. Riu-Aumatell M, López-Tamames E, Buxaderas S (2005) Assessment of the volatile composition of juices of apricot, peach, and pear according to two pectolytic treatments. *J Agric Food Chem* 53:7837–7843
56. Njoroge SM, Koaze H, Karanja PN, Sawamura M (2005) Volatile constituents of Redblush grapefruit (*Citrus paradisi*) and Pummelo (*Citrus grandis*) peel essential oils from Kenya. *J Agric Food Chem* 53:9790–9794
57. Bousmaha L, Boti JB, Bekkara FA, Castola V, Casanova J (2006) Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria. *Flavour Fragr J* 21:368–372
58. Babushok VI, Linstrom PJ, Zenkevich IG (2011) Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *J Phys Chem Ref Data* 40:043101–1-043101–47
59. Boti JB, Koukoua G, N’Guessan TY, Muselli A, Bernardini A-F, Casanova J (2005) Composition of the leaf, stem bark and root bark oils of *Isolona cooperi* investigated by GC (retention index), GC–MS and ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochem Anal* 16:357–363
60. Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J (2006) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol* 55:1367–1373

Publisher’s Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3 Gesamtfazit und Ausblick

In diesem letzten Teil der Dissertation werden die Resultate und gewonnenen Erkenntnisse publikationsübergreifend zusammengefasst und ein Ausblick über mögliche zukünftige Untersuchungen gegeben.

Alle drei dieser Arbeit zugrunde liegenden, bereits vollständig veröffentlichten Beiträge aus Zeitschriften mit Fachbegutachtung (*peer-reviewed journals*) befassen sich mit der Sesquiterpenanalytik in *V. vinifera* unter Verwendung der GC×GC–TOF–MS.

In der ersten Studie wurde die Biosynthese von freien Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen im Exokarp reifer Weinbeeren am Beispiel der terpenreichen Rebsorte Lemberger (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) untersucht und die gebildeten Produkte durch Kombination von Markierungsexperimenten und HS-SPME–GC×GC–TOF–MS eindeutig identifiziert.

Der gezielte Einsatz zweier stabilisotopenmarkierter Präkursoren, d_3 -MVL und d_2 -DOX, führte dabei zur Bildung deuterierter Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe mit unterschiedlichen Markierungsmustern. Nach Anreicherung und Extraktion der gebildeten Analyten mittels HS-SPME erfolgte die chromatographische Trennung der markierten Isotopologen von ihren unmarkierten, natürlich vorkommenden Analoga durch GC×GC. Anhand der mittels TOF–MS generierten, charakteristischen Massenspektren konnten 25 Analyten eindeutig identifiziert werden. Das Sesquiterpen-Profil der untersuchten Rebsorte war sowohl von komplexen mono-, bi- und tricyclischen, als auch aromatischen Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen geprägt. Anhand der Markierungsmuster konnten für 20 dieser Terpene mögliche Reaktionsmechanismen via Carbokationen und Germacren-Intermediaten postuliert werden.

Die Bildungsmechanismen der fünf aromatischen Sesquiterpene α -Calacoren, β -Calacoren, Calamenen (Isomer), α -Corocalen und Cadalen mit Cadinan-Kohlenstoffskelettstruktur blieben hingegen unbekannt. Es konnte weder beantwortet werden über welches Intermediat die Biosynthese dieser aromatischen Verbindungen erfolgt, noch wie die zahlreichen Doppelbindungen in die Moleküle eingeführt werden. Möglich ist sowohl eine enzymatische Umwandlung von Intermediaten durch traubeneigene Desaturasen, als auch eine rein säurekatalytische Deprotonierung entsprechender Vorläuferverbindungen. Weitere Untersuchungen sind daher nötig, um die Bildungsmechanismen aromatischer Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe in *V. vinifera* zu beschreiben.

Im Verlauf der Methodenentwicklung wurden verschiedene SPME-Fasern und Kapillarsäulen getestet sowie zahlreiche Methodenparameter zur Analytik von Sesquiterpenen optimiert. Dazu zählte u.a. die entsprechende Anpassung der Inkubations-/Extraktionsbedingungen, des

Temperaturprogramms, des Modulationsprozesses sowie der Detektoreinstellungen. In Zukunft könnte die Methode weiter optimiert und eine umfangreiche Validierung mit authentischen Standards durchgeführt werden.

Die Kombination von Markierungsexperimenten und HS-SPME–GC×GC–TOF–MS könnte zukünftig auf Weinbeeren weiterer bedeutender Rotweinsorten wie Spätburgunder, Cabernet Sauvignon und Merlot, aber auch auf Weißweinsorten wie Riesling, Chardonnay und Gewürztraminer angewendet und das charakteristische Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff-Profil dieser Sorten bestimmt werden. Die Biosynthesewege anderer Sesquiterpene, die in der Lemberger-Sorte nicht vorkommen, könnten dabei ebenfalls untersucht werden.

Trotz des Mangels an kommerziell erhältlichen, authentischen Standardsubstanzen ermöglichte die eingesetzte Methode die eindeutige Identifizierung der Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe von Weinbeeren der Rotweinsorte Lemberger. Das eindeutig identifizierte Sesquiterpen-Profil lesereifer Lemberger-Weinbeeren bildete die Grundlage für die zweite Studie.

In der zweiten Studie wurde untersucht, ob das traubeneigene Sesquiterpen-Profil der Rebsorte Lemberger während der Vinifikation durch die hefestämmigen Sesquiterpen-Alkohole Farnesol und Nerolidol signifikant beeinflusst wird und Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe als potentielle Markersubstanzen in Frage kommen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden Fermentationsversuche durchgeführt und die Sesquiterpene mittels GC×GC–TOF–MS analysiert. So konnten in einem fermentierten, wässrigen Ansatz aus *S. cerevisiae*, Hefenährstoffen und Zuckern neben Farnesol und (*E*)-Nerolidol zahlreiche aus diesen Alkoholen säurekatalytisch gebildete Sesquiterpene, wie α -Cedren, δ -Cadinen, β -Sesquiphellandren und (*E*)- β -Farnesen, nachgewiesen werden. Anhand von Lemberger-Modellweinen aus d_3 -MVL-inkubierten Weinbeerenhäuten konnte gezeigt werden, dass diese indirekt durch Weinhefen generierten Sesquiterpene das traubeneigene Sesquiterpen-Profil signifikant verändern können. Während das Weinbeeren-Exokarp eindeutig die Quelle deuterierter Sesquiterpene im Modellwein darstellte, konnten unmarkierte Verbindungen sowohl aus der Weinbeere, als auch aus der Weinhefe entstammen. Aus diesem Grund wurde für jedes Sesquiterpen, dass sowohl in der Weinbeere als auch im Modellwein eindeutig nachweisbar war, das Peakhöhenverhältnis des jeweils genuinen (d_0) zum maximal deuterierten Isotopologen (d_{max}) vor und nach der Mikrovinifikation ermittelt. Ein signifikanter Zuwachs von d_0 nach der Weinbereitung, wie er bei den bicyclischen Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen Calamenen, δ -Cadinen, Cadalen, α -Corocalen und α -Calacoren festgestellt wurde, war entsprechend auf die säurekatalytische Umwandlung der hefestämmigen, unmarkierten Sesquiterpen-Alkohole Farnesol und Nerolidol zurückzuführen. Im Gegensatz dazu konnte bei den Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen Guaia-6,9-dien, Guaiazulen, δ -Selinen, Selina-3,7(11)-dien und α -Ylängen keine signifikante Veränderung von d_0/d_{max} nach der

Weinbereitung festgestellt werden, sodass diese Analyten als potentielle Markersubstanzen der untersuchten Rebsorte in Frage kamen. Drei der potentiellen Marker, Guaiazulen, δ -Selinen und Selina-3,7(11)-dien konnten anschließend in sortenreinen Weinen der Rebsorte Lemberger wiedergefunden werden.

Da eine säurekatalytische Generierung dieser Verbindungen aus hefestämmigen Sesquiterpen-Alkoholen nicht erfolgte, ist anzunehmen, dass traubeneigene Enzyme zur Katalyse der komplexen Cyclisierungsreaktionen benötigt werden. Quantenmechanische Berechnungen könnten Hinweise liefern, ob zur Bildung der drei bicyclischen Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe Enzyme notwendig sind. Darüber hinaus ist zu prüfen, ob in *V. vinifera* auch entsprechende Enzyme vorkommen. Bereits bekannt ist, dass das Multiproduktenzym *VvPNSelnt* in *V. vinifera* die Generierung von δ -Selinen katalysiert.^[129] Traubeneigene Enzyme zur Biosynthese von Selina-3,7(11)-dien und Guaiazulen sind hingegen noch nicht beschrieben.

In zukünftigen Untersuchungen ist die Kombination aus Markierungs- und Mikrovinifikationsexperimenten auf weitere Rebsorten anzuwenden, um potentielle Markersubstanzen dieser Sorten zu ermitteln. So kann zum einen festgestellt werden, ob die drei Verbindungen Guaiazulen, δ -Selinen und Selina-3,7(11)-dien sortencharakteristisch für Lemberger-Weine sind und zum anderen ob eine Rebsortenbestimmung von Weinen anhand von traubeneigenen Sesquiterpenen tatsächlich möglich ist.

Auch wenn die angewandte Methode zur Ermittlung von Sesquiterpenen als potentielle Marker grundsätzlich geeignet ist, sollten die Modellwein-Versuche zukünftig erweitert werden. Zum Beispiel sollten komplette Weinbeeren vergoren werden, wie es bei der Maischegärung zur Gewinnung von Rotweinen üblich ist, und nicht nur markiertes Exokarp. Zudem sollte der Maßstab der Vinifikationsexperimente deutlich vergrößert werden. Darüber hinaus könnte eine Schwefelung durchgeführt werden, wie sie typischerweise zur Haltbarmachung von Weinen erfolgt. Durch solche Anpassungen des Versuchsaufbaus, hin zu realeren Bedingungen der Weinherstellung, könnten mögliche Einflüsse auf das Sesquiterpen-Profil berücksichtigt werden, die in den bisherigen Modellversuchen nicht auftraten.

Die Erkenntnis, dass hefestämmige Sesquiterpen-Alkohole das Sesquiterpen-Profil von Weinen signifikant beeinflussen können, indem sie säurekatalytisch in zahlreiche Sesquiterpene umgewandelt werden und die Tatsache, dass zuckergebundene Sesquiterpen-Alkohole in *Vitis vinifera* im Jahr 2019 erstmals nachgewiesen werden konnten, führte zur dritten Studie.

In der dritten Studie wurden hydrolytisch freigesetzte, traubeneigene Sesquiterpen- und Monoterpen-Alkohole hinsichtlich ihrer Strukturvielfalt untersucht, ihre prozentualen Anteile unter allen identifizierten Terpen-Aglykonen bestimmt und anhand der nachgewiesenen Sesquiterpen-Aglykone mögliche Einflüsse auf das Sesquiterpen-Profil von Weinen abgeleitet.

Die Analysen wurden exemplarisch an Hydrolysaten von Weinbeerenhäuten der Rebsorte Gewürztraminer (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) durchgeführt. Die Kombination von SPE–HS–SPME–GC×GC–TOF–MS ermöglichte den Nachweis von 24 Terpen-Aglykonen, unter denen mit Farnesol, (*E*)-Nerolidol und Drimenol drei Sesquiterpen-Aglykone waren. Der Nachweis von nur drei verschiedenen, hydrolytisch freigesetzten Sesquiterpen-Alkoholen trotz umfassender Analyse zeigte, dass die strukturelle Diversität dieser Fraktion im Vergleich zur Fraktion freier Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe deutlich begrenzt ist.

Die 21 Monoterpen-Aglykone zeigten im Gegensatz zur Fraktion der Sesquiterpen-Aglykone eine große Strukturvielfalt, wobei neben acyclischen, überwiegend mehrfach ungesättigten Monoterpen-Alkoholen wie (*Z*)-Iso-Geraniol und Hotrienol, hauptsächlich monocyclische Verbindungen nachweisbar waren unter denen sich mit Thymol, Carvacrol und Cuminol aromatische aber auch sauerstoffhaltige Heterocyclen wie (*Z*)-Furanlinalooloxid und (*E*)-Pyranlinalooloxid befanden. Die Vielzahl an Monoterpen-Aglykonen in den Hydrolysaten deckte sich mit der Annahme, dass Monoterpene in der Weinbeere hauptsächlich als Monoterpenglykoside vorliegen. Die Fraktion der Monoterpen-Aglykone machte insgesamt über 96 % der Peakfläche aller gefundenen Terpen-Aglykone aus, wobei über 80 % auf die Alkohole Linalool, α -Terpineol, Dihydrocarveol, β -Citronellol, Nerol und Geraniol zurückzuführen war. Aus diesen Zahlen wurde entsprechend abgeleitet, dass zuckergebundene Sesquiterpen-Alkohole in Weinbeeren im Unterschied zu glykosylierten Monoterpenolen nur Nebenprodukte des Terpen-Stoffwechsels sind.

Dennoch ist unter Berücksichtigung der Resultate der zweiten Studie anzunehmen, dass auch Sesquiterpenglykoside einen bedeutenden Beitrag zum Sesquiterpen-Profil von Weinen leisten können. Grund für diese Annahme ist der Nachweis der Sesquiterpen-Aglykone (*E*)-Nerolidol und Farnesol. Wie bereits gezeigt, können diese Alkohole im sauren Milieu als Sesquiterpen-Präkursoren fungieren und durch Säurekatalyse in zahlreiche Sesquiterpene umgewandelt werden. Im Zuge der Weinherstellung durch Glykosidasen hydrolytisch freigesetzte Sesquiterpen-Alkohole könnten somit analog zu hefestämmigem Nerolidol und Farnesol zu einer Veränderung des Volatilen-Profiles führen.

Zukünftig sollten quantitative Messungen zur Konzentrationsbestimmung der freigesetzten Sesquiterpen-Aglykone durchgeführt werden. So könnte festgestellt werden, ob die Konzentration der Aglykone im Wein hoch genug ist, um das Sesquiterpen-Profil maßgeblich zu beeinflussen.

Von den 24 gefundenen Terpen-Aglykonen wurden 13 Verbindungen vorläufig anhand ihres Retentionsindex sowie ihres Massenspektrums identifiziert. Durch den Einsatz von stabilisotopenmarkierten Präkursoren, wie in den ersten beiden Studien, könnten auch diese Terpene in weiteren Experimenten eindeutig identifiziert werden.

Zusammenfassend gelang es in dieser Dissertation mittels GC×GC–TOF–MS zum einen freie Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe des Weinbeeren-Exokarps eindeutig zu identifizieren und Bildungsmechanismen dieser Analyten zu formulieren. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass das Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff-Profil lesereifer Beeren während der Weinherstellung durch den Hefestoffwechsel signifikant verändert wird und zugleich einige Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe als potentielle Marker der untersuchten Rebsorte Lemberger in Frage kommen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass traubeneigene Sesquiterpen-Aglykone verglichen mit anderen Terpen-Fractionen des Weinbeeren-Stoffwechsels strukturell zwar weniger divers, aufgrund einer möglichen säurekatalytischen Umwandlung aber dennoch zu berücksichtigen sind. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bilden damit die Grundlage für weitere Analysen auf dem Gebiet der Sesquiterpenanalytik in Weinbeeren und Weinen.

Literatur

- [1] Moss, G. P.; Smith, P. A. S.; Tavernier, D. Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995). *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1307–1375. [doi:10.1351/pac199567081307](https://doi.org/10.1351/pac199567081307)
- [2] Christianson, D. W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11570–11648. [doi:10.1021/acs.chemrev.7b00287](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287)
- [3] Rabe, P.; Rinkel, J.; Klapschinski, T. A.; Barra, L.; Dickschat, J. S. A method for investigating the stereochemical course of terpene cyclisations. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 158–164. [doi:10.1039/C5OB01998B](https://doi.org/10.1039/C5OB01998B)
- [4] Degenhardt, J.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1621–1637. [doi:10.1016/j.phytochem.2009.07.030](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030)
- [5] Chen, F.; Tholl, D.; Bohlmann, J.; Pichersky, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* **2011**, *66*, 212–229. [doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04520.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04520.x)
- [6] Yamada, Y.; Kuzuyama, T.; Komatsu, M.; Shin-ya, K.; Omura, S.; Cane, D. E.; Ikeda, H. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 857–862. [doi:10.1073/pnas.1422108112](https://doi.org/10.1073/pnas.1422108112)
- [7] Dickschat, J. S. Bacterial terpene cyclases. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 87–110. [doi:10.1039/C5NP00102A](https://doi.org/10.1039/C5NP00102A)
- [8] Schmidt-Dannert, C. Biosynthesis of Terpenoid Natural Products in Fungi. In *Biotechnology of Isoprenoids. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., Vol. 148*; Eds.: Schrader, J.; Bohlmann, J.; Springer, Cham **2015**, pp. 19–61. [ISBN:978-3-319-20106-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20106-1)
- [9] Quin, M. B.; Flynn, C. M.; Schmidt-Dannert, C. Traversing the fungal terpenome. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1449–1473. [doi:10.1039/C4NP00075G](https://doi.org/10.1039/C4NP00075G)
- [10] Wallach, O. Zur Kenntniss der Terpene und der ätherischen Oele; Fünfte Abhandlung. *Liebigs Ann. Chem.* **1887**, *239*, 1–54. [doi:10.1002/jlac.18872390102](https://doi.org/10.1002/jlac.18872390102)
- [11] Ružička, L. The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds. *Experientia* **1953**, *9*, 357–367. [doi:10.1007/BF02167631](https://doi.org/10.1007/BF02167631)
- [12] Breitmaier, E. Terpenes. Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones. 1st ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2006**. [ISBN:978-3-527-31786-8](https://doi.org/10.1002/978-3-527-31786-8)
- [13] Dembitsky, V. M. Astonishing Diversity of Natural Surfactants: 7. Biologically Active Hemi- and Monoterpenoid Glycosides. *Lipids* **2006**, *41*, 1–27. [doi:10.1007/s11745-006-5065-y](https://doi.org/10.1007/s11745-006-5065-y)
- [14] Seigler, D. S. Monoterpenes. In *Plant Secondary Metabolism, Vol. 1*; Ed.: Seigler, D. S.; Springer, Boston **1998**, pp. 324–352. [doi:10.1007/978-1-4615-4913-0_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4913-0_19)

- [15] Zielińska-Błajet, M.; Feder-Kubis, J. Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7078. [doi:10.3390/ijms21197078](https://doi.org/10.3390/ijms21197078)
- [16] Lingan, K. A Review on Major Constituents of Various Essential Oils and its Application. *Transl. Med. (Sunnyvale)* **2018**, *8*, 201. [doi:10.4172/2161-1025.1000201](https://doi.org/10.4172/2161-1025.1000201)
- [17] Surburg, H.; Panten, J. Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses. 6th ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2016**. ISBN:978-3-527-33160-4
- [18] Clark, G. S. A Profile: An Aroma Chemical. Menthol. *Perfum. Flavor.* **1988**, *13*, 37–46. <http://media.allured.com/documents/8843.pdf>. Zuletzt geprüft am: 31.01.2021.
- [19] Klapschinski, T. A.; Rabe, P.; Dickschat, J. S. Pristinol, a Sesquiterpene Alcohol with an Unusual Skeleton from *Streptomyces pristinaespiralis*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10141–10144. [doi:10.1002/anie.201605425](https://doi.org/10.1002/anie.201605425)
- [20] Chappell, J.; Coates, R. M. Sesquiterpenes. In *Comprehensive Natural Products II*, Vol. 1; Eds.: Liu, H.-w.; Mander, L. N.; Elsevier **2010**, pp. 609–641. [doi:10.1016/B978-008045382-8.00005-8](https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00005-8)
- [21] Liu, J.-M.; Ni, M.-Y.; Fan, J.-F.; Tu, Y.-Y.; Wu, Z.-H.; Wu, Y.-L.; Chou, W.-S. Structure and Reaction of Arteannuin. *Acta Chim. Sin.* **1979**, *37*, 129–143. http://sioc-journal.cn/Jwk_hxxb/EN/Y1979/V37/I2/129. Zuletzt geprüft am: 05.02.2021.
- [22] Klayman, D. L. *Qinghaosu* (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China. *Science* **1985**, *228*, 1049–1055. [doi:10.1126/science.3887571](https://doi.org/10.1126/science.3887571)
- [23] Van Agtmael, M. A.; Eggelte, T. A.; van Boxtel, C. J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *TIPS* **1999**, *20*, 199–205. [doi:10.1016/S0165-6147\(99\)01302-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01302-4)
- [24] Liu, C.-x. Discovery and Development of Artemisinin and Related Compounds. *Chin. Herb. Med.* **2017**, *9*, 101–114. [doi:10.1016/S1674-6384\(17\)60084-4](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(17)60084-4)
- [25] Dickschat, J. S. Bacterial Diterpene Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 15964–15976. [doi:10.1002/anie.201905312](https://doi.org/10.1002/anie.201905312)
- [26] Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325–2327. [doi:10.1021/ja00738a045](https://doi.org/10.1021/ja00738a045)
- [27] Barbuti, A. M.; Chen, Z.-S. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy. *Cancers* **2015**, *7*, 2360–2371. [doi:10.3390/cancers7040897](https://doi.org/10.3390/cancers7040897)

- [28] Li, K.; Gustafson, K. R. Sesterterpenoids: chemistry, biology, and biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2020**. [doi:10.1039/D0NP00070A](https://doi.org/10.1039/D0NP00070A)
- [29] Cordell, G. A. The occurrence, structure elucidation and biosynthesis of the sesterterpenes. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 2343–2364. [doi:10.1016/S0031-9422\(00\)86907-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86907-1)
- [30] Sticher, O. Triterpene einschließlich Steroide. In *Pharmakognosie — Phytopharmazie*, Vol. 9; Eds.: Hänsel, R.; Sticher, O.; Springer, Berlin, Heidelberg **2010**, pp. 833–938. [doi:10.1007/978-3-642-00963-1_24](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00963-1_24)
- [31] Hill, R. A.; Connolly, J. D. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 90–122. [doi:10.1039/C6NP00094K](https://doi.org/10.1039/C6NP00094K)
- [32] Bloch, K. The Biological Synthesis of Cholesterol. *Science* **1965**, *150*, 19–28. [doi:10.1126/science.150.3692.19](https://doi.org/10.1126/science.150.3692.19)
- [33] Mercer, E. I. The Biosynthesis of Ergosterol. *Pestic. Sci.* **1984**, *15*, 133–155. [doi:10.1002/ps.2780150206](https://doi.org/10.1002/ps.2780150206)
- [34] Connolly, J. D.; Hill, R. A. Dictionary of Terpenoids. 1st ed.; Chapman & Hall, London **1991**. [ISBN:978-0-412-25770-4](https://doi.org/10.1002/ps.2780150206)
- [35] Jacobsen, I. H.; Ledesma-Amaro, R.; Martinez, J. L. Recombinant β -Carotene Production by *Yarrowia lipolytica* – Assessing the Potential of Micro-Scale Fermentation Analysis in Cell Factory Design and Bioreaction Optimization. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 29. [doi:10.3389/fbioe.2020.00029](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00029)
- [36] Yikmis, M.; Steinbüchel, A. Historical and Recent Achievements in the Field of Microbial Degradation of Natural and Synthetic Rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 4543–4551. [doi:10.1128/AEM.00001-12](https://doi.org/10.1128/AEM.00001-12)
- [37] Zhang, H.; Zhang, L.; Chen, X.; Wang, Y.; Zhao, F.; Luo, M.; Liao, S. The Role of Non-Rubber Components on Molecular Network of Natural Rubber during Accelerated Storage. *Polymers* **2020**, *12*, 2880. [doi:10.3390/polym12122880](https://doi.org/10.3390/polym12122880)
- [38] Lynen, F.; Eggerer, H.; Henning, U.; Kessel, I. Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl- Δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene, III. *Angew. Chem.* **1958**, *70*, 738–742. [doi:10.1002/ange.19580702403](https://doi.org/10.1002/ange.19580702403)
- [39] Vickers, C. E.; Sabri, S. Isoprene. In *Biotechnology of Isoprenoids*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, Vol. 148; Eds.: Schrader, J.; Bohlmann, J.; Springer, Cham **2015**, pp. 289–317. [ISBN:978-3-319-20106-1](https://doi.org/10.1002/ps.2780150206)
- [40] Kuzuyama, T.; Seto, H. Two distinct pathways for essential metabolic precursors for isoprenoid biosynthesis. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2012**, *88*, 41–52. [doi:10.2183/pjab.88.41](https://doi.org/10.2183/pjab.88.41)

- [41] Qureshi, N.; Porter, J. W. Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. In *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, Vol. 1; Eds.: Porter, J. W.; Spurgeon, S. L.; John Wiley & Sons, New York **1981**, pp. 47–94.
- [42] Bloch, K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* **1992**, *57*, 378–383. [doi:10.1016/0039-128X\(92\)90081-J](https://doi.org/10.1016/0039-128X(92)90081-J)
- [43] Bach, T. J. Some New Aspects of Isoprenoid Biosynthesis in Plants—A Review. *Lipids* **1995**, *30*, 191–202. [doi:10.1007/BF02537822](https://doi.org/10.1007/BF02537822)
- [44] Bochar, D. A.; Friesen, J. A.; Stauffacher, C. V.; Rodwell, V. W. Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. In *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Vol. 2; Ed.: Cane, D.; Pergamon, Oxford **1999**, pp. 15–44.
- [45] Lynen, F.; Reichert, E.; Rueff, L. Zum biologischen Abbau der Essigsäure VI. „Aktivierte Essigsäure“, ihre Isolierung aus Hefe und ihre chemische Natur. *Liebigs Ann. Chem.* **1951**, *574*, 1–32. [doi:10.1002/jlac.19515740102](https://doi.org/10.1002/jlac.19515740102)
- [46] Miziorko, H. M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *505*, 131–143. [doi:10.1016/j.abb.2010.09.028](https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028)
- [47] Rudney, H.; Ferguson Jr., J. J. The biosynthesis of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5580–5581. [doi:10.1021/ja01577a070](https://doi.org/10.1021/ja01577a070)
- [48] Durr, I. F.; Rudney, H. The Reduction of β -Hydroxy- β -methylglutaryl Coenzyme A to Mevalonic Acid. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2572–2578. [PMID:13818862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13818862/)
- [49] Tchen, T. T. Mevalonic Kinase: Purification and Properties. *J. Biol. Chem.* **1958**, *233*, 1100–1103. [PMID:13598740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13598740/)
- [50] Chaykin, S.; Law, J.; Phillips, A. H.; Tchen, T. T.; Bloch, K. Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 998–1004. [doi:10.1073/pnas.44.10.998](https://doi.org/10.1073/pnas.44.10.998)
- [51] Henning, U.; Möslein, E. M.; Lynen, F. Biosynthesis of Terpenes. V. Formation of 5-Pyrophosphomevalonic Acid by Phosphomevalonic Kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *83*, 259–267. [doi:10.1016/0003-9861\(59\)90031-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90031-1)
- [52] Bloch, K.; Chaykin, S.; Phillips, A. H.; de Waard, A. Mevalonic Acid Pyrophosphate and Isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2595–2604. [PMID:13801508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13801508/)
- [53] Lichtenthaler, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 47–65. [doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.47](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.47)
- [54] Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D.; Rohdich, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1401–1426. [doi:10.1007/s00018-004-3381-z](https://doi.org/10.1007/s00018-004-3381-z)

- [55] Rohmer, M. Diversity in isoprene unit biosynthesis: The methylerythritol phosphate pathway in bacteria and plastids. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 739–751. [doi:10.1351/pac200779040739](https://doi.org/10.1351/pac200779040739)
- [56] Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2564–2566. [doi:10.1021/ja9538344](https://doi.org/10.1021/ja9538344)
- [57] Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Wiegert, T.; Grolle, S.; de Graaf, A. A.; Taylor, S. V.; Begley, T. P.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12857–12862. [doi:10.1073/pnas.94.24.12857](https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12857)
- [58] Lange, B. M.; Wildung, M. R.; McCaskill, D.; Croteau, R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2100–2104. [doi:10.1073/pnas.95.5.2100](https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2100)
- [59] Kuzuyama, T.; Takahashi, S.; Watanabe, H.; Seto, H. Direct Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate from 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate by 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, a New Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway to Isopentenyl Diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4509–4512. [doi:10.1016/S0040-4039\(98\)00802-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)00802-8)
- [60] Takahashi, S.; Kuzuyama, T.; Watanabe, H.; Seto, H. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9879–9884. [doi:10.1073/pnas.95.17.9879](https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9879)
- [61] Lange, B. M.; Croteau, R. Isoprenoid Biosynthesis via a Mevalonate-Independent Pathway in Plants: Cloning and Heterologous Expression of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase from Peppermint. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 170–174. [doi:10.1006/abbi.1999.1168](https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1168)
- [62] Rohdich, F.; Wungsintaweekul, J.; Fellermeier, M.; Sagner, S.; Herz, S.; Kis, K.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H. Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11758–11763. [doi:10.1073/pnas.96.21.11758](https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.11758)

- [63] Kuzuyama, T.; Takagi, M.; Kaneda, K.; Dairi, T.; Seto, H. Formation of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 703–706. [doi:10.1016/S0040-4039\(99\)02143-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)02143-7)
- [64] Lüttgen, H.; Rohdich, F.; Herz, S.; Wungsintaweekul, J.; Hecht, S.; Schuhr, C. A.; Fellermeier, M.; Sagner, S.; Zenk, M. H.; Bacher, A.; Eisenreich, W. Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1062–1067. [doi:10.1073/pnas.97.3.1062](https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1062)
- [65] Kuzuyama, T.; Takagi, M.; Kaneda, K.; Watanabe, H.; Dairi, T.; Seto, H. Studies on the nonmevalonate pathway: conversion of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol to its 2-phospho derivative by 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2925–2928. [doi:10.1016/S0040-4039\(00\)00295-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00295-1)
- [66] Miallau, L.; Alpey, M. S.; Kemp, L. E.; Leonard, G. A.; McSweeney, S. M.; Hecht, S.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Hunter, W. N. Biosynthesis of isoprenoids: Crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9173–9178. [doi:10.1073/pnas.1533425100](https://doi.org/10.1073/pnas.1533425100)
- [67] Herz, S.; Wungsintaweekul, J.; Schuhr, C. A.; Hecht, S.; Lüttgen, H.; Sagner, S.; Fellermeier, M.; Eisenreich, W.; Zenk, M. H.; Bacher, A.; Rohdich, F. Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2486–2490. [doi:10.1073/pnas.040554697](https://doi.org/10.1073/pnas.040554697)
- [68] Takagi, M.; Kuzuyama, T.; Kaneda, K.; Watanabe, H.; Dairi, T.; Seto, H. Studies on the nonmevalonate pathway: formation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate from 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3395–3398. [doi:10.1016/S0040-4039\(00\)00375-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00375-0)
- [69] Kemp, L. E.; Bond, C. S.; Hunter, W. N. Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase: An essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6591–6596. [doi:10.1073/pnas.102679799](https://doi.org/10.1073/pnas.102679799)
- [70] Seemann, M.; Bui, B. T. S.; Wolff, M.; Tritsch, D.; Campos, N.; Boronat, A.; Marquet, A.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis through the Methylerythritol Phosphate Pathway: The (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl Diphosphate Synthase (GcpE) is a [4Fe–4S] Protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4337–4339. [doi:10.1002/1521-3773\(20021115\)41:22<4337::AID-ANIE4337>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20021115)41:22<4337::AID-ANIE4337>3.0.CO;2-K)

- [71] Rohdich, F.; Hecht, S.; Gärtner, K.; Adam, P.; Krieger, C.; Amslinger, S.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1158–1163. [doi:10.1073/pnas.0326589999](https://doi.org/10.1073/pnas.0326589999)
- [72] Rohdich, F.; Zepeck, F.; Adam, P.; Hecht, S.; Kaiser, J.; Laupitz, R.; Gräwert, T.; Amslinger, S.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D. The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1586–1591. [doi:10.1073/pnas.0337742100](https://doi.org/10.1073/pnas.0337742100)
- [73] Citron, C. A.; Brock, N. L.; Rabe, P.; Dickschat, J. S. The Stereochemical Course and Mechanism of the IspH Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4053–4057. [doi:10.1002/anie.201201110](https://doi.org/10.1002/anie.201201110)
- [74] Hemmerlin, A.; Hoeffler, J.-F.; Meyer, O.; Tritsch, D.; Kagan, I. A.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M.; Bach, T. J. Cross-talk between the Cytosolic Mevalonate and the Plastidial Methylerythritol Phosphate Pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 26666–26676. [doi:10.1074/jbc.M302526200](https://doi.org/10.1074/jbc.M302526200)
- [75] Hampel, D.; Mosandl, A.; Wüst, M. Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 305–311. [doi:10.1016/j.phytochem.2004.12.010](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.12.010)
- [76] Schwab, W.; Wüst, M. Understanding the Constitutive and Induced Biosynthesis of Mono- and Sesquiterpenes in Grapes (*Vitis vinifera*): A Key to Unlocking the Biochemical Secrets of Unique Grape Aroma Profiles. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10591–10603. [doi:10.1021/acs.jafc.5b04398](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04398)
- [77] Ružička, L. History of the Isoprene Rule. *Proc. Chem. Soc.* **1959**, 341–376. [doi:10.1039/PS9590000341](https://doi.org/10.1039/PS9590000341)
- [78] Kellogg, B. A.; Poulter, C. D. Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 570–578. [doi:10.1016/S1367-5931\(97\)80054-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(97)80054-3)
- [79] Ružička, L. Perspektiven der Biogenese und der Chemie der Terpene. *Pure Appl. Chem.* **1963**, *6*, 493–524. [doi:10.1351/pac196306040493](https://doi.org/10.1351/pac196306040493)
- [80] Rudolf, J. D.; Chang, C.-Y. Terpene synthases in disguise: enzymology, structure, and opportunities of non-canonical terpene synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 425–463. [doi:10.1039/C9NP00051H](https://doi.org/10.1039/C9NP00051H)
- [81] Xu, H.; Rinkel, J.; Chen, X.; Köllner, T. G.; Chen, F.; Dickschat, J. S. Mechanistic divergence between (4*S*,7*R*)-germacra-(1(10)*E*,5*E*)-dien-11-ol synthases from *Dictyostelium*

- purpureum* and *Streptomyces coelicolor*. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 370–374. [doi:10.1039/D0OB02361B](https://doi.org/10.1039/D0OB02361B)
- [82] Wendt, K. U.; Schulz, G. E. Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure* **1998**, *6*, 127–133. [doi:10.1016/S0969-2126\(98\)00015-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00015-X)
- [83] Dickschat, J. S.; Pahirulzaman, K. A. K.; Rabe, P.; Klapschinski, T. A. An Improved Technique for the Rapid Chemical Characterisation of Bacterial Terpene Cyclases. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 810–814. [doi:10.1002/cbic.201300763](https://doi.org/10.1002/cbic.201300763)
- [84] Boutanaev, A. M.; Moses, T.; Zi, J.; Nelson, D. R.; Mugford, S. T.; Peters, R. J.; Osbourn, A. Investigation of terpene diversification across multiple sequenced plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E81–E88. [doi:10.1073/pnas.1419547112](https://doi.org/10.1073/pnas.1419547112)
- [85] Pateraki, I.; Heskes, A. M.; Hamberger, B. Cytochromes P450 for Terpene Functionalisation and Metabolic Engineering. In *Biotechnology of Isoprenoids. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., Vol. 148*; Eds.: Schrader, J.; Bohlmann, J.; Springer, Cham **2015**, pp. 107–139. [ISBN:978-3-319-20106-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20106-1)
- [86] Achnine, L.; Huhman, D. V.; Farag, M. A.; Sumner, L. W.; Blount, J. W.; Dixon, R. A. Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **2005**, *41*, 875–887. [doi:10.1111/j.1365-3113X.2005.02344.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02344.x)
- [87] Lairson, L. L.; Henrissat, B.; Davies, G. J.; Withers, S. G. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521–555. [doi:10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322)
- [88] Robinson, A. L.; Boss, P. K.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *65*, 1–24. [doi:10.5344/ajev.2013.12070](https://doi.org/10.5344/ajev.2013.12070)
- [89] Polášková, P.; Herszage, J.; Ebeler, S. E. Wine flavor: chemistry in a glass. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2478–2489. [doi:10.1039/B714455P](https://doi.org/10.1039/B714455P)
- [90] Francis, I. L.; Newton, J. L. Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 114–126. [doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00283.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00283.x)
- [91] Ilc, T.; Werck-Reichhart, D.; Navrot, N. Meta-Analysis of the Core Aroma Components of Grape and Wine Aroma. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1472. [doi:10.3389/fpls.2016.01472](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01472)
- [92] Strauss, C. R.; Wilson, B.; Gooley, P. R.; Williams, P. J. Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor. In *Biogenesis of Aromas. ACS Symposium Series, Vol. 317*; Eds.: Parliment, T. H.; Croteau, R.; American Chemical Society, Washington DC **1986**, pp. 222–242. [ISBN:0-8412-0987-1](https://doi.org/10.1021/bk-1986-0211)
- [93] Mateo, J. J.; Jiménez, M. Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 557–567. [doi:10.1016/S0021-9673\(99\)01342-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01342-4)

- [94] Siebert, T. E.; Wood, C.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P. Determination of Rotundone, the Pepper Aroma Impact Compound, in Grapes and Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3745–3748. [doi:10.1021/jf800184t](https://doi.org/10.1021/jf800184t)
- [95] Wood, C.; Siebert, T. E.; Parker, M.; Capone, D. L.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vössing, T.; Widder, S.; Krammer, G.; Sefton, M. A.; Herderich, M. J. From Wine to Pepper: Rotundone, an Obscure Sesquiterpene, Is a Potent Spicy Aroma Compound. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3738–3744. [doi:10.1021/jf800183k](https://doi.org/10.1021/jf800183k)
- [96] Huang, A.-C.; Burrett, S.; Sefton, M. A.; Taylor, D. K. Production of the Pepper Aroma Compound, (–)-Rotundone, by Aerial Oxidation of α -Guaiene. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10809–10815. [doi:10.1021/jf504693e](https://doi.org/10.1021/jf504693e)
- [97] Huang, A.-C.; Sefton, M. A.; Taylor, D. K. Comparison of the Formation of Peppery and Woody Sesquiterpenes Derived from α -Guaiene and α -Bulnesene under Aerial Oxidative Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1932–1938. [doi:10.1021/jf505537s](https://doi.org/10.1021/jf505537s)
- [98] Takase, H.; Sasaki, K.; Shinmori, H.; Shinohara, A.; Mochizuki, C.; Kobayashi, H.; Ikoma, G.; Saito, H.; Matsuo, H.; Suzuki, S.; Takata, R. Cytochrome P450 CYP71BE5 in grapevine (*Vitis vinifera*) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (–)-rotundone. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 787–798. [doi:10.1093/jxb/erv496](https://doi.org/10.1093/jxb/erv496)
- [99] Drawert, F. Moderne physikalisch-chemische Methoden in der Erforschung der Aromastoffe des Weines. *Chemie landwirtsch. Prod.*, Landwirtschaftlich-Chemische Bundesversuchsanstalt, Wien, **1970**, 189–199.
- [100] Schreier, P.; Drawert, F.; Junker, A. Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe in Trauben. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1976**, *160*, 271–274. [doi:10.1007/BF01132291](https://doi.org/10.1007/BF01132291)
- [101] Versini, G.; Rapp, A.; Dalla Serra, A.; Pichler, U.; Ramponi, M. Methyl *trans* geranate and farnesoate as markers for Gewürztraminer grape skins and related distillates. *Vitis* **1994**, *33*, 139–142. [doi:10.5073/vitis.1994.33.139-142](https://doi.org/10.5073/vitis.1994.33.139-142)
- [102] Petronilho, S.; Coimbra, M. A.; Rocha, S. M. A critical review on extraction techniques and gas chromatography based determination of grapevine derived sesquiterpenes. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *846*, 8–35. [doi:10.1016/j.aca.2014.05.049](https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.049)
- [103] Marín-San Román, S.; Rubio-Bretón, P.; Pérez-Álvarez, E. P.; Garde-Cerdán, T. Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109712. [doi:10.1016/j.foodres.2020.109712](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712)
- [104] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145–2148. [doi:10.1021/ac00218a019](https://doi.org/10.1021/ac00218a019)

- [105] Coelho, E.; Rocha, S. M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'Baga' ripening. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 204–214. [doi:10.1016/j.aca.2005.11.018](https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.018)
- [106] Kalua, C. M.; Boss, P. K. Evolution of Volatile Compounds during the Development of Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3818–3830. [doi:10.1021/jf803471n](https://doi.org/10.1021/jf803471n)
- [107] Kalua, C. M.; Boss, P. K. Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 337–348. [doi:10.1111/j.1755-0238.2010.00096.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2010.00096.x)
- [108] Perestrelo, R.; Barros, A. S.; Rocha, S. M.; Câmara, J. S. Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties. *Talanta* **2011**, *85*, 1483–1493. [doi:10.1016/j.talanta.2011.06.025](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.025)
- [109] May, B.; Wüst, M. Temporal development of sesquiterpene hydrocarbon profiles of different grape varieties during ripening. *Flavour Fragr. J.* **2012**, *27*, 280–285. [doi:10.1002/ffj.3096](https://doi.org/10.1002/ffj.3096)
- [110] May, B.; Lange, B. M.; Wüst, M. Biosynthesis of sesquiterpenes in grape berry exocarp of *Vitis vinifera* L.: Evidence for a transport of farnesyl diphosphate precursors from plastids to the cytosol. *Phytochemistry* **2013**, *95*, 135–144. [doi:10.1016/j.phytochem.2013.07.021](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.021)
- [111] Zhang, P.; Fuentes, S.; Siebert, T.; Krstic, M.; Herderich, M.; Barlow, E. W. R.; Howell, K. Terpene evolution during the development of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grapes. *Food Chem.* **2016**, *204*, 463–474. [doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.125](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.125)
- [112] Câmara, J. S.; Herbert, P.; Marques, J. C.; Alves, M. A. Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 203–207. [doi:10.1016/j.aca.2004.01.024](https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.024)
- [113] Câmara, J. S.; Alves, M. A.; Marques, J. C. Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *555*, 191–200. [doi:10.1016/j.aca.2005.09.001](https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.001)
- [114] Rocha, S. M.; Coutinho, P.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1114*, 188–197. [doi:10.1016/j.chroma.2006.03.107](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.107)
- [115] Rocha, S. M.; Coelho, E.; Vinholes, J.; Coimbra, M. A. Grapes and Wine from *Vitis vinifera* L. as a Potential Source of Sesquiterpenoids. In *Natural Products, Series Recent*

- Progress in Medicinal Plants, Vol. 15*; Eds.: Singh, V. K.; Govil, J. N.; Ahmad, K.; Sharma, R. K.; Studium Press LLC, Houston **2007**, pp. 253–272. [ISBN:9780976184973](#)
- [116] Tao, Y.; Li, H.; Wang, H.; Zhang, L. Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China). *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 689–694. [doi:10.1016/j.jfca.2008.05.007](#)
- [117] Keyzers, R. A.; Boss, P. K. Changes in the Volatile Compound Production of Fermentations Made from Musts with Increasing Grape Content. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1153–1164. [doi:10.1021/jf9023646](#)
- [118] Schmarr, H.-G.; Bernhardt, J.; Fischer, U.; Stephan, A.; Müller, P.; Durner, D. Two-dimensional gas chromatographic profiling as a tool for a rapid screening of the changes in volatile composition occurring due to microoxygenation of red wines. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *672*, 114–123. [doi:10.1016/j.aca.2010.05.002](#)
- [119] Robinson, A. L.; Boss, P. K.; Heymann, H.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D. Development of a sensitive non-targeted method for characterizing the wine volatile profile using head-space solid-phase microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 504–517. [doi:10.1016/j.chroma.2010.11.008](#)
- [120] Welke, J. E.; Manfroi, V.; Zanus, M.; Lazarotto, M.; Zini, C. A. Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1226*, 124–139. [doi:10.1016/j.chroma.2012.01.002](#)
- [121] Cincotta, F.; Verzera, A.; Tripodi, G.; Concurso, C. Determination of Sesquiterpenes in Wines by HS-SPME Coupled with GC-MS. *Chromatography* **2015**, *2*, 410–421. [doi:10.3390/chromatography2030410](#)
- [122] Câmara, J. S.; Alves, M. A.; Marques, J. C. Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta* **2006**, *68*, 1512–1521. [doi:10.1016/j.talanta.2005.08.012](#)
- [123] Câmara, J. S.; Alves, M. A.; Marques, J. C. Classification of Boal, Malvazia, Sercial and Verdelho wines based on terpenoid patterns. *Food Chem.* **2007**, *101*, 475–484. [doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.004](#)
- [124] Slaghenaufi, D.; Ugliano, M. Norisoprenoids, Sesquiterpenes and Terpenoids Content of Valpolicella Wines During Aging: Investigating Aroma Potential in Relationship to Evolution of Tobacco and Balsamic Aroma in Aged Wine. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 66. [doi:10.3389/fchem.2018.00066](#)

- [125] May, B. Biosynthese und Analytik von Sesquiterpenen in Weinbeeren (*Vitis vinifera*). Ph.D. Thesis, University of Bonn, Bonn, Germany **2015**. <http://bonndoc.ulb.uni-bonn.de/xmlui/handle/20.500.11811/6764>. Zuletzt geprüft am: 17.07.2021.
- [126] Duhamel, N.; Slaghenaufi, D.; Pilkington, L. I.; Herbst-Johnstone, M.; Larcher, R.; Barker, D.; Fedrizzi, B. Facile gas chromatography–tandem mass spectrometry stable isotope dilution method for the quantification of sesquiterpenes in grape. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1537*, 91–98. [doi:10.1016/j.chroma.2017.12.065](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.065)
- [127] Weldegergis, B. T.; Crouch, A. M.; Górecki, T.; de Villiers, A. Solid phase extraction in combination with comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the detailed investigation of volatiles in South African red wines. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *701*, 98–111. [doi:10.1016/j.aca.2011.06.006](https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.06.006)
- [128] Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, G.; Croteau, R. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4126–4133. [doi:10.1073/pnas.95.8.4126](https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4126)
- [129] Martin, D. M.; Aubourg, S.; Schouwey, M. B.; Daviet, L.; Schalk, M.; Toub, O.; Lund, S. T.; Bohlmann, J. Functional Annotation, Genome Organization and Phylogeny of the Grapevine (*Vitis vinifera*) Terpene Synthase Gene Family Based on Genome Assembly, FLcDNA Cloning, and Enzyme Assays. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 226. [doi:10.1186/1471-2229-10-226](https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-226)
- [130] May, B.; Wüst, M. Sesquiterpene profiles of different grape varieties. In *Advances and Challenges in Flavor Chemistry & Biology*; Eds.: Hofmann, T.; Meyerhof, W.; Schieberle, P.; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising, Germany **2011**, pp. 323–327. [ISBN:978-3-938896-38-9](https://doi.org/10.1007/978-3-938896-38-9)
- [131] Botscher, I.; Wüst, M. Analytik von Mono- und Sesquiterpenglykosiden in Weintrauben (*Vitis vinifera*) mittels *in-vivo*-Stabilisotopenmarkierung und LC-MS/MS. *Lebensmittelchemie* **2019**, *73*, 130. [doi:10.1002/lemi.201970506](https://doi.org/10.1002/lemi.201970506)
- [132] Carrau, F. M.; Boido, E.; Dellacassa, E. Terpenoids in Grapes and Wines: Origin and Micrometabolism during the Vinification Process. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 577–592. [doi:10.1177/1934578X0800300419](https://doi.org/10.1177/1934578X0800300419)
- [133] Fagan, G. L.; Kepner, R. E.; Webb, A. D. Production of linalool, cis- and trans-nerolidol, and trans,trans-farnesol by *Saccharomyces fermentati* growing as a film on simulated wine. *Vitis* **1981**, *20*, 36–42. [doi:10.5073/vitis.1981.20.36-42](https://doi.org/10.5073/vitis.1981.20.36-42)
- [134] Lücker, J.; Bowen, P.; Bohlmann, J. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (–)-

- germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2649–2659. [doi:10.1016/j.phytochem.2004.08.017](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.017)
- [135] Gutsche, C. D.; Maycock, J. R.; Chang, C. T. Acid-catalyzed cyclization of farnesol and nerolidol. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 859–876. [doi:10.1016/0040-4020\(68\)88035-4](https://doi.org/10.1016/0040-4020(68)88035-4)
- [136] Moore, J. C.; Spink, J.; Lipp, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, R118–R126. [doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x)
- [137] European Parliament **2013**. Procedure: 2013/2091(INI). Report 4 Dec 2013, on the food crisis, fraud in the food chain and the control thereof. http://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-7-2013-0434_EN.pdf. Zuletzt geprüft am: 10.07.2021.
- [138] Li, Z.; Howell, K.; Fang, Z.; Zhang, P. Sesquiterpenes in grapes and wines: Occurrence, biosynthesis, functionality, and influence of winemaking processes. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 247–281. [doi:10.1111/1541-4337.12516](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12516)
- [139] Giddings, J. C. Two-dimensional separations: concept and promise. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1258A–1270A. [doi:10.1021/ac00276a003](https://doi.org/10.1021/ac00276a003)
- [140] Liu, Z.; Phillips, J. B. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography using an On-Column Thermal Modulator Interface. *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, *29*, 227–231. [doi:10.1093/chromsci/29.6.227](https://doi.org/10.1093/chromsci/29.6.227)
- [141] Meinert, C.; Meierhenrich, U. J. Die umfassende zweidimensionale Gaschromatographie – eine neue Dimension für analytische Trennwissenschaften. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10610–10621. [doi:10.1002/ange.201200842](https://doi.org/10.1002/ange.201200842)
- [142] Schnapka, J. Kopplung – GCxGC und Massenspektrometrie. In *Angewandte instrumentelle Lebensmittelanalytik, Vol. 4*; Eds.: Kroh, L. W.; Matissek, R.; Drusch, S.; Behr's Verlag, Hamburg **2020**, pp. 131–147. [ISBN:978-3-95468-651-3](https://doi.org/10.1007/978-3-95468-651-3)
- [143] Tranchida, P. Q.; Purcaro, G.; Dugo, P.; Mondello, L. Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 1437–1461. [doi:10.1016/j.trac.2011.06.010](https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.010)
- [144] Deese, R. D.; Morris, R. E.; Metz, A. E.; Myers, K. M.; Johnson, K.; Loegel, T. N. Characterization of Organic Nitrogen Compounds and Their Impact on the Stability of Marginally Stable Diesel Fuels. *Energy Fuels* **2019**, *33*, 6659–6669. [doi:10.1021/acs.energyfuels.9b00932](https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.9b00932)
- [145] Güssregen, B. Massenspektrometrie. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*; Eds.: Gressner, A. M.; Arndt, T.; Springer, Berlin, Heidelberg **2017**, pp. 1–5. [doi:10.1007/978-3-662-49054-9_2035-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49054-9_2035-1)

- [146] Mamyryn, B. A. Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *131*, 1–19. [doi:10.1016/0168-1176\(93\)03891-O](https://doi.org/10.1016/0168-1176(93)03891-O)
- [147] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 8th ed.; Thieme, Stuttgart **2012**. [ISBN:978-3-13-576108-4](https://www.thieme.com/ISBN/978-3-13-576108-4)
- [148] Humboldt-Universität zu Berlin, *Reflektron mit alternierenden Elektrodendicken sowie Flugzeitmassenspektrometer mit einem erfindungsgemäßen Reflektron* (DE 10 2010 039 030 A1). Deutsches Patent- und Markenamt, **2012**. <http://register.dpma.de/DPMA-register/pat/register?AKZ=1020100390305>. Zuletzt geprüft am: 12.07.2021.
- [149] Murray, J. A. Qualitative and quantitative approaches in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1261*, 58–68. [doi:10.1016/j.chroma.2012.05.012](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.012)
- [150] Lottspeich, F.; Zorbas, H. *Bioanalytik*. 1st ed.; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin **1998**. [ISBN:3-8274-0041-4](https://www.spektrum.de/ISBN/3-8274-0041-4)
- [151] Joulain, D.; König, W. A. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. 1st ed.; E. B. Verlag, Hamburg **1998**. [ISBN:3-930826-48-8](https://www.ebverlag.de/ISBN/3-930826-48-8)
- [152] Parker, M.; Pollnitz, A. P.; Cozzolino, D.; Francis, I. L.; Herderich, M. J. Identification and Quantification of a Marker Compound for ‘Pepper’ Aroma and Flavor in Shiraz Grape Berries by Combination of Chemometrics and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5948–5955. [doi:10.1021/jf0705320](https://doi.org/10.1021/jf0705320)
- [153] Pichersky, E.; Noel, J. P.; Dudareva, N. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science* **2006**, *311*, 808–811. [doi:10.1126/science.1118510](https://doi.org/10.1126/science.1118510)
- [154] McGarvey, D. J.; Croteau, R. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1015–1026. [doi:10.1105/tpc.7.7.1015](https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1015)
- [155] Wedler, H. B.; Pemberton, R. P.; Tantillo, D. J. Carbocations and the Complex Flavor and Bouquet of Wine: Mechanistic Aspects of Terpene Biosynthesis in Wine Grapes. *Molecules* **2015**, *20*, 10781–10792. [doi:10.3390/molecules200610781](https://doi.org/10.3390/molecules200610781)
- [156] Holmberg, L. Wine fraud. *Int. J. Wine Res.* **2010**, *2*, 105–113. [doi:10.2147/IJWR.S14102](https://doi.org/10.2147/IJWR.S14102)
- [157] D'Onofrio, C.; Matarese, F.; Cuzzola, A. Study of the terpene profile at harvest and during berry development of *Vitis vinifera* L. aromatic varieties Aleatico, Brachetto, Malvasia di Candia aromatica and Moscato bianco. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 2898–2907. [doi:10.1002/jsfa.8126](https://doi.org/10.1002/jsfa.8126)
- [158] Lin, J.; Massonnet, M.; Cantu, D. The genetic basis of grape and wine aroma. *Hortic. Res.* **2019**, *6*, 81. [doi:10.1038/s41438-019-0163-1](https://doi.org/10.1038/s41438-019-0163-1)

- [159] Bönisch, F.; Frotscher, J.; Stanitzek, S.; Rühl, E.; Wüst, M.; Bitz, O.; Schwab, W. A UDP-Glucose:Monoterpenol Glucosyltransferase Adds to the Chemical Diversity of the Grapevine Metabolome. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 561–581. [doi:10.1104/pp.113.232470](https://doi.org/10.1104/pp.113.232470)
- [160] Bönisch, F.; Frotscher, J.; Stanitzek, S.; Rühl, E.; Wüst, M.; Bitz, O.; Schwab, W. Activity-Based Profiling of a Physiologic Aglycone Library Reveals Sugar Acceptor Promiscuity of Family 1 UDP-Glucosyltransferases from Grape. *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 23–39. [doi:10.1104/pp.114.242578](https://doi.org/10.1104/pp.114.242578)
- [161] Sarry, J.-E.; Günata, Y. Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.* **2004**, *87*, 509–521. [doi:10.1016/j.foodchem.2004.01.003](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.003)
- [162] Liu, J.; Zhu, X.-L.; Ullah, N.; Tao, Y.-S. Aroma Glycosides in Grapes and Wine. *J. Food Sci.* **2017**, *82*, 248–259. [doi:10.1111/1750-3841.13598](https://doi.org/10.1111/1750-3841.13598)
- [163] Günata, Y. Z.; Bayonove, C. L.; Baumes, R. L.; Cordonnier, R. E. The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr. A* **1985**, *331*, 83–90. [doi:10.1016/0021-9673\(85\)80009-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(85)80009-1)
- [164] Park, S. K.; Morrison, J. C.; Adams, D. O.; Noble, A. C. Distribution of Free and Glycosidically Bound Monoterpenes in the Skin and Mesocarp of Muscat of Alexandria Grapes during Development. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 514–518. [doi:10.1021/jf00003a017](https://doi.org/10.1021/jf00003a017)
- [165] Caffrey, A. J.; Lerno, L. A.; Zweigenbaum, J.; Ebeler, S. E. Direct Analysis of Glycosidic Aroma Precursors Containing Multiple Aglycone Classes in *Vitis vinifera* Berries. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 3817–3833. [doi:10.1021/acs.jafc.9b08323](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08323)

Publikationsliste

Beiträge in Zeitschriften mit Fachbegutachtung (*peer-reviewed journals*)

Könen, P. P.; Stötzel, I.; Schwab, W.; Wüst, M. Qualitative profiling of mono- and sesquiterpenols in aglycon libraries from *Vitis vinifera* L. Gewürztraminer using multidimensional gas chromatography–mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* **2021**, *247*, 1117–1124. [doi:10.1007/s00217-021-03692-3](https://doi.org/10.1007/s00217-021-03692-3)

Habash, S. S.; **Könen, P. P.**; Loeschcke, A.; Wüst, M.; Jaeger, K.-E.; Drepper, T.; Grundler, F. M. W.; Schleker, A. S. S. The Plant Sesquiterpene Nootkatone Efficiently Reduces *Heterodera schachtii* Parasitism by Activating Plant Defense. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9627. [doi:10.3390/ijms21249627](https://doi.org/10.3390/ijms21249627)

Könen, P. P.; Wüst, M. Dissecting Sesquiterpene Profiles of Lemberger Red Wines Using Ex Vivo Tissue Deuterium-Labeling and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–Time-of-Flight–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 8936–8941. [doi:10.1021/acs.jafc.0c03273](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03273)

Könen, P. P.; Wüst, M. Analysis of sesquiterpene hydrocarbons in grape berry exocarp (*Vitis vinifera* L.) using in vivo-labeling and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry (GC×GC–MS). *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 1945–1961. [doi:10.3762/bjoc.15.190](https://doi.org/10.3762/bjoc.15.190)

Buchbeiträge mit Fachbegutachtung (*peer-reviewed book chapters*)

Könen, P. P.; Wüst, M.; Passon, M. Crop Metabolome Analysis – In Vivo-Labeling With Stable Isotopes for Specific Metabolite Profiling. In *Comprehensive Foodomics*, Vol. 1; Ed.: Cifuentes, A.; Elsevier, Amsterdam **2021**, pp. 105–115. [ISBN:978-0-12-816395-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816395-5)

Abstracts in Zeitschriften mit Fachbegutachtung

Könen, P. P.; Wüst, M. Untersuchung der Sesquiterpen-Profile von Lemberger-Rotweinen mittels ex vivo Deuterium-Markierung und umfassender zweidimensionaler Gaschromatographie–Flugzeit–Massenspektrometrie zur Ermittlung von Markersubstanzen. *Lebensmittelchemie* **2020**, *74*, S2-002. [doi:10.1002/lemi.202052003](https://doi.org/10.1002/lemi.202052003)

Könen, P. P.; Wüst, M., Analytik von Sesquiterpenen in Weinbeeren mittels HS-SPME-GC x GC-TOFMS und *in-vivo*-labeling. *Lebensmittelchemie* **2019**, 73, 149. [doi:10.1002/lemi.201970604](https://doi.org/10.1002/lemi.201970604)

Könen, P. P.; Wüst, M. Sesquiterpenanalytik mittels mehrdimensionaler Gaschromatographie in Weinbeeren und Wein (*Vitis vinifera*). *Lebensmittelchemie* **2019**, 73, 8. [doi:10.1002/lemi.201970104](https://doi.org/10.1002/lemi.201970104)

Diskussionsvorträge

Könen, P. P. *In vino veritas* – HS-SPME-GCxGC-TOFMS und *in vivo*-labeling als Schlüssel zur Rebsortendifferenzierung? IEL-Oberseminar, Bonn, **2019**.

Könen, P. P. Analytik von Sesquiterpenen in Weinbeeren mittels HS-SPME-GCxGC-TOFMS und *in vivo* labeling. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, **2019**.

Könen, P. P. Sesquiterpenanalytik mittels mehrdimensionaler Gaschromatographie in Weinbeeren und Wein (*Vitis vinifera*). IEL-Oberseminar, Bonn, **2018**.

Posterbeiträge

Könen, P. P.; Wüst, M. Untersuchung der Sesquiterpen-Profile von Lemberger-Rotweinen mittels *ex vivo* Deuterium-Markierung und umfassender zweidimensionaler Gaschromatographie–Flugzeit–Massenspektrometrie zur Ermittlung von Markersubstanzen. LChG Tweet-your-Poster-Event 2020, Twitter (online), **2020**.

Könen, P. P.; Wüst, M. Sesquiterpenanalytik mittels mehrdimensionaler Gaschromatographie in Weinbeeren und Wein (*Vitis vinifera*). 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, **2018**.

Interviews

Wüst, M.; **Könen, P. P.** FOOD-Lab Interview zu Sesquiterpenanalytik in Weinbeeren und Weinen mittels GCxGC–TOF–MS. *FOOD-Lab* **2021**, 2, 42–44. http://www.blmedien.de/data/emags/blmedien/FOOD-Lab_02_2021/page_42.html.

Zuletzt geprüft am: 13.07.2021.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die mich während der Promotion unterstützt und diese Arbeit ermöglicht haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Matthias Wüst, für die Möglichkeit, an einem spannenden, lebensmittelchemischen Forschungsthema zu arbeiten und die exzellente Betreuung über die gesamte Promotionszeit. Ich bedanke mich insbesondere bei Ihnen für die zahlreichen fachlichen Ratschläge, Ihr Engagement und dass Sie mir die Teilnahme an den Lebensmittelchemikertagen in Berlin und Dresden ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Andreas Schieber danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Frau Prof. Dr. Gabriele Maria König sowie Herrn Prof. Dr. Jürgen Bajorath für Ihre Funktion in der Promotionskommission.

Für die Bereitstellung des Probenmaterials möchte ich Frau Prof. Dr. Bianca May vom Institut für Oenologie der Hochschule Geisenheim University, Herrn Prof. Dr. Ernst-Heinrich Rühl sowie Herrn Prof. Dr. Joachim Schmid vom Institut für Rebenzüchtung der Hochschule Geisenheim University und Frau Dr. Christa Lankes vom Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES) der Universität Bonn meinen Dank aussprechen.

Ich danke den zahlreichen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (IEL) für die fachliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Stefan Koschinski und Herrn Tudor Oita (Markes International GmbH), Frau Michaela Hayer (Northern Arizona University), Herrn Dr. Matthias Bernhard Hardy (BASF SE), Herrn Claudius Sebastian Mathy (Universitätsklinikum Erlangen) und Frau Silvia Hütte-Spürk (Universität Bonn) für Ihre wertvollen Ratschläge.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie: Meinen Eltern, Margareta und Peter, bin ich ewig dankbar für ihr Vertrauen und die unermüdliche Unterstützung auf dem Weg zur Promotion und weit darüber hinaus. Meinen Geschwistern, Stephanie und Christian, danke ich genauso wie Christoph, Lasse und Jonne für die Motivation und Hilfsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt Fatema für ihre wertvollen Ratschläge und die unzähligen Gespräche über mein Forschungsprojekt. Ich bin unendlich dankbar für ihre andauernde Unterstützung, ihre Geduld und den Rückhalt den sie mir gibt.