

Monoterpenylglucosyltransferasen aus *Vitis  
vinifera*: Funktionelle Charakterisierung und Analytik  
der Produkte mittels LC-MS/MS

Dissertation zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Sarah Stanitzek**

aus

Rheinberg

Bonn 2014

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

1. Gutachter                      Prof. Dr. M. Wüst

2. Gutachter                      Prof. Dr. G. König

Tag der Promotion:              19.05.2014

Erscheinungsjahr:                2014

*Für meine Eltern*

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Wüst, für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit der praktischen Durchführung bedanken. Vielen Dank für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen. Die Zeit an der Universität Bonn wird mir immer in bester Erinnerung bleiben.

Ich bedanke mich weiterhin bei meinen Kooperationspartnerinnen Johanna Frotscher (Hochschule Geisenheim) und Friedericke Bönisch (Technische Universität München) für den ständigen Kontakt, die zahlreichen Diskussionen sowie die gute Zusammenarbeit.

Mein Arbeitskreis, die Bioanalytik, hat mich stets unterstützt, ermutigt und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Ich danke hierbei besonders Bianca May, Jochen Fischer, Andreas Wawrzun, Dr. Ursula Wölwer-Rieck, Frau Bauerdick sowie Christoph Gerlach für die vielen Diskussionen, die hilfreichen Tipps und das schöne Arbeitsklima. Einen großen Dank auch an Stefanie Naaf für die gute Zusammenarbeit während ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit.

Ich danke der Hochschule Geisenheim, Abteilung Rebzüchtung, für das Lesen der Beeren und die somit für mich einfache Bereitstellung des Probenmaterials.

Herrn Dr. Stefan Kehraus (Universität Bonn, Institut für Pharmazeutische Biologie) sei gedankt für die Aufnahme von NMR-Spektren. Ein großer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund für die unermüdliche Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Flüchtige Aromen und deren Biosynthese in <i>Vitis vinifera</i> .....	2
1.1.1 Flüchtige Aromastoffe.....	2
1.1.2 Biosynthese der Monoterpene .....	5
1.2 Nicht-flüchtige Aromastoffe.....	11
1.2.1 Industrielle Bedeutung der glycosidisch gebundenen Terpene .....	13
1.2.2 Glycosidisch gebundene Terpene als Aromavorstufen in Wein.....	14
1.3 Aktueller Kenntnisstand zu Glycosyltransferasen in <i>Vitis vinifera</i> .....	18
1.3.1 Glycosyltransferasen .....	18
1.3.2 Bildung von glycosidisch gebundenen Verbindungen .....	19
1.3.3 Substratspezifität der Glycosyltransferasen .....	24
1.4 Methoden zur Analytik von freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glycosiden .....	25

1.4.1	Isolierung und Detektion von freien Terpenen.....	25
1.4.2	Isolierung und Detektion von Monoterpen- $\beta$ -D-glycosiden .....	28
1.5	Aufgabenstellung und Zielsetzung .....	34
1.6	Lösungsstrategie .....	35
1.6.1	Synthese von Referenzsubstanzen und deren Analytik	35
<b>2.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
2.1	Charakterisierung der synthetisierten Referenzsubstanzen.....	38
2.1.1	Die synthetisierten Referenzstandards .....	38
2.1.2	Hydrolytische Spaltung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside .....	44
2.1.3	Optimierung der MS/MS-Detektion der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside .....	53
2.1.4	MALDI-TOF-MS.....	63
2.2	Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur Bestimmung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside in <i>Vitis vinifera</i> .....	66
2.2.1	Weitere vorläufig identifizierte Terpenglycoside in <i>Vitis vinifera</i> .....	71
2.2.2	Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze...	81

2.2.3	Wiederfindung der freien Terpene und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden nach der Festphasenextraktion .....	83
2.3	Bestimmung der Terpenprofile im Reifeverlauf.....	85
2.3.1	Bestimmung der Terpenprofile in Beerenhäuten ..	87
2.3.2	Bestimmung der Terpenprofile in anderen Geweben.....	93
2.4	Charakterisierung der potentiellen Monoterpenylglycosyltransferasen .....	103
2.4.1	Rekombinante Enzyme .....	103
2.4.2	Substratspezifität rekombinanter Glycosyltransferasen aus <i>Vitis vinifera</i> .....	104
2.4.3	Enantioselektivität der VvGT7, VvGT14 und VvGT15 .....	109
2.4.4	Identifizierung potentieller natürlicher Substrate der Monoterpenyl-glycosyltransferasen durch „Activity-Based Metabolomic Profiling“ .....	116
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>126</b>
3.1	Probenmaterial .....	126
3.2	Chemikalien .....	128
3.3	Synthese von Referenzsubstanzen.....	131
3.3.1	3,7-Dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol (Diendiol I) und 3,7-Dimethyl-1,7-Octadien-3,6-diol (Diendiol II) .....	131

3.3.2	Synthese von 2,6-Dimethyl-2,7-octadien-1,6-diol (8-Hydroxylinalool) .....	133
3.3.3	Synthese von [ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Citronellol .....	134
3.3.4	Synthese von Monoterpenyl-β-D-glucosiden .....	135
3.4	Probenaufarbeitung zur Bestimmung von freien und gebundenen Terpenen in verschiedenen Geweben mittels GC-MS bzw. LC-MS/MS .....	144
3.5	Hydrolyse der Monoterpen-β-D-glucoside sowie der gesamten Glycoside .....	147
3.5.1	Enzymatische Hydrolyse .....	147
3.5.2	Überprüfung der Ausbeute der enzymatischen Hydrolyse .....	147
3.5.3	Säurekatalysierte Hydrolyse .....	148
3.6	Wiederfindung der freien Monoterpene und Monoterpen-β-D-glucoside nach der Festphasenextraktion .....	149
3.7	Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Monoterpen-β-D-glucosiden mittels MALDI-TOF-MS .....	150
3.8	Activity-Based Metabolomic Profiling (ABMP) .....	151
3.9	Enantioselektive Analysen der Glycosyltransferasen .....	156
3.10	Chromatographiesysteme und Detektionsmethoden .....	157



3.10.1	GC-MS System.....	157
3.10.2	Solid Phase Microextraction (SPME) System ....	158
3.10.3	Enantio-GC-MS System .....	158
3.10.4	LC-MS/MS System .....	159
3.10.5	MALDI-TOF-MS System.....	161
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>162</b>
<b>5.</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>164</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>165</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS (ANHANG) .....</b>	<b>171</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>171</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS (ANHANG) .....</b>	<b>173</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>175</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>191</b>
	<b>POSTER UND PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>202</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABMP	Activity-Based Metabolomic Profiling
CAD	Collisionally Activated Dissociation (Stoßaktivierte Dissoziation)
DAD	Diodenarraydetektor
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronensprayionisation
EtAC	Ethylacetat
fwhm	full width a half maximum
GC	Gaschromatograph
GT	Glycosyltransferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (kurz: LC)
IPP	Isopentenylidiphosphat
IS	Interner Standard
LPP	Linalylphosphat
MALDI	Matrix Assited Laser Desorption Ionization

MEP	Methylerythritol-4-phospat
MeOH	Methanol
MRM	Multiple reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MVA	mevalonic acid (engl. Mevalonsäure)
NPP	Nerylpyrophosphat
PSPG	Plant Secondary Product Glycosyltransferase
PVPP	Polyvinylpyrollidon
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SPE	Solid Phase Extraction ( <i>engl.</i> ; Festphasenextraktion)
SPME	Solid Phase Micro Extraction ( <i>engl.</i> ; Festphasenmikroextraktion)
TIC	Totalionenchromatogramm
UGT	Uridindiphosphat-Glycosyltransferase
VvGT	<i>Vitis vinifera</i> Glycosyltransferase



# 1. Einleitung

Wein stellt ein wichtiges Kulturgut dar und wird seit Jahrtausenden getrunken. Seit jeher steht das Erforschen der Rebsorten und des Weinaromas im Vordergrund. Weiterhin existiert in Deutschland ein sehr umfassendes und komplexes Weinrecht.

Aus wirtschaftlicher Sicht wurden 2012 1,3 Mio. Hektoliter der deutschen Weine im Wert von 321 Mio. Euro exportiert, wobei hierbei der Hauptabnehmer die USA waren. In Deutschland wird vor allem die Rebsorte Riesling angebaut. Dieser machte 2012 22,4 % der bestockten Rebflächen aus. Mit einer Rebfläche von 22837 ha hat Deutschland damit 2012 den Platz 1 des weltweiten Riesling-Anbaus erzielt. Die Rebsorten Spätburgunder und Grauburgunder lagen 2012 jeweils auf Platz 3 der weltweiten Anbauregionen, der Weißburgunder sogar auf Platz 2 (Deutsches Weininstitut, 2013).

Die Zusammensetzung und Ausprägung der geruchsaktiven Verbindungen hat einen entscheidenden Einfluss auf das Aroma des Weines. Die Ausprägung der einzelnen geruchsaktiven Verbindungsklassen ist hierbei abhängig von der jeweiligen Rebsorte. Vor allem der Geruch und Geschmack bestimmt die Qualität des Weines (Wüst, 2003).

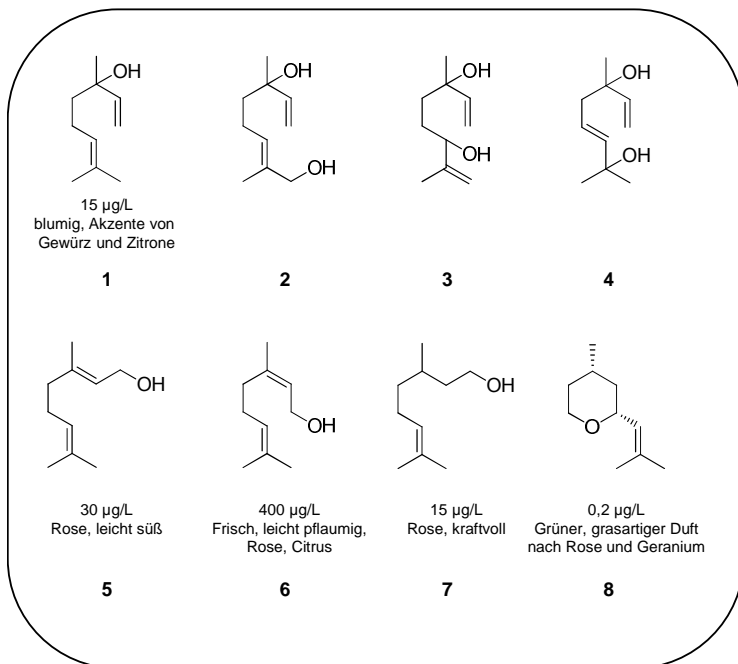
## **1.1 Flüchtige Aromen und deren Biosynthese in *Vitis vinifera***

### **1.1.1 Flüchtige Aromastoffe**

Pflanzen produzieren zahlreiche leicht flüchtige Verbindungen, deren natürliche Funktionen teilweise noch nicht bekannt sind. Gerade pflanzliche Sekundärmetabolite sind häufig von großem Interesse für die Lebensmittel- oder Pharmaindustrie. Sie können als Aromen eingesetzt werden oder finden durch technologische oder pharmazeutische Wirkungen Anwendung in verschiedensten Produkten. Demnach ist die Bedeutung und Erforschung der Biosynthese, der Struktur und der Funktion dieser Verbindungen in der Pflanze von enormem Interesse (Gershenzon und Dudareva, 2007).

Die Gruppe der Terpene stellt die größte Gruppe der Naturstoffe dar. Mittlerweile sind fast 40.000 Strukturen beschrieben, die sich von den Terpenen ableiten (Withers und Keasling, 2006). Vor allem für diese Gruppe besteht derzeit noch Forschungsbedarf. Hierbei steht die funktionelle Charakterisierung verschiedenster Enzyme, die für die Bildung von leichtflüchtigen Verbindungen verantwortlich sind, im Fokus der Wissenschaft. Eine weitere Herausforderung stellt die Erforschung der Umwelteinflüsse auf die Regulation der Enzyme verschiedener Stoffwechselwege dar (Lund und Bohlmann, 2006).

Es ist bereits bekannt, dass Sesquiterpene (C15-Terpene), aber auch Monoterpene bei der Anlockung von Insekten, der Abwehr von Fraßfeinden und der Kommunikation der Pflanzen untereinander biologisch eine Rolle spielen (Lawo et al., 2011; Raguso und Pichersky, 1999).



**Abbildung 1: Häufige Monoterpene in *Vitis vinifera*, mit Angabe ihrer Geruchsschwellenwerte und –eindrücke (Rychlik et al., 1998)**

Strukturen der Monoterpene Linalool (1), 8-Hydroxylinalool (2), Diendiol II (3), Diendiol I (4), Geraniol (5), Nerol (6), Citronellol (7) sowie *cis*-Rosenoxid (8).

Die Komposition, die Konzentration und die Geruchsschwellen zahlreicher, leicht-flüchtiger Verbindungen sind entscheidend für das Aroma des Weines. Dieses ist sehr komplex und setzt sich aus verschiedensten Verbindungen zusammen, die entweder biochemischen Ursprungs sind oder aber erst im Zuge des Weinprozesses (Fermentations-Bouquet) und der Lagerung gebildet werden. Desweiteren haben vor allem die Rebsorte, der Jahrgang und damit verbundene klimatische Bedingungen sowie der Standort, das so genannte *Terroir*, maßgeblichen Einfluss auf das primäre Weinaroma, welches die Komposition der genuin in der Pflanze vorkommenden Aromastoffe darstellt. Das Weinaroma setzt sich folglich aus dem primären, dem sekundären Aroma, dem Fermentations-Bouquet sowie dem Lagerungs-Bouquet zusammen. Beim sekundären Aroma werden aromaaktive Verbindungen durch Verarbeitungsprozesse gebildet. Das Fermentations-Bouquet beschreibt die Bildung von Aromastoffen während der Gärung, das Lagerungs-Bouquet hingegen die Bildung von Aromastoffen im Verlauf der Lagerung (Rapp, 1995).

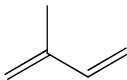
Im Wein spielen vor allem die Monoterpene eine besondere Rolle für das blumige und süße Aroma der Rebsorten Muskateller, Gewürztraminer oder Riesling. Häufig weisen die Rebsorten ähnliche Terpenprofile auf, die Menge der einzelnen Terpene variiert jedoch stark, was den sortentypischen Charakter maßgeblich prägt. Durch diese



Unterschiede können einzelne Rebsorten deutlich voneinander unterschieden werden (Rapp, 1992). Neben den Monoterpenen ist das Rosenoxid eine Schlüsselkomponente des Aromas des Gewürztraminers, welches eine Komponente des typischen „Lychee-Aromas“ darstellt. Es handelt sich hierbei um eine Etherverbindung, die aus dem Diol des Citronellols generiert wird (Ong und Acree, 1999). Im Unterschied dazu wird zum Beispiel das Aroma der Chardonnay-Rebsorten maßgeblich durch C13-Norisoprenoide geprägt (Sefton et al., 1993).

### 1.1.2 Biosynthese der Monoterpene

Die Terpene werden auch Isoprenoide genannt, da sie sich alle aus dem Grundgerüst des 2-Methyl-1,3-butadien (Isopren) ableiten (vgl. Abbildung 2) (Breitmaier, 2005). Die Monoterpene sind C10-Verbindungen und leiten sich demnach aus zwei Isopren-Einheiten ab.



**Abbildung 2: Die Isopren-Einheit, das Grundgerüst der Terpene**

Die Synthese von Terpenoiden erfolgt über die beiden Vorläuferverbindungen Isopentenylidiphosphat (IPP) sowie dem Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Die Bildung

von IPP läuft zum einem über den Mevalonsäure-Weg (MVA-Weg, MVA= *engl. mevalonic acid*), zum anderen über den seit Ende der 90er Jahre bekannten 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat/Methylerythritol-4-phosphat-Weg (DOXP/MEP-Weg) ab (vgl. Abbildung 3) (Lichtenthaler et al., 1997; Rohdich et al., 2001; Schwender et al., 1997).

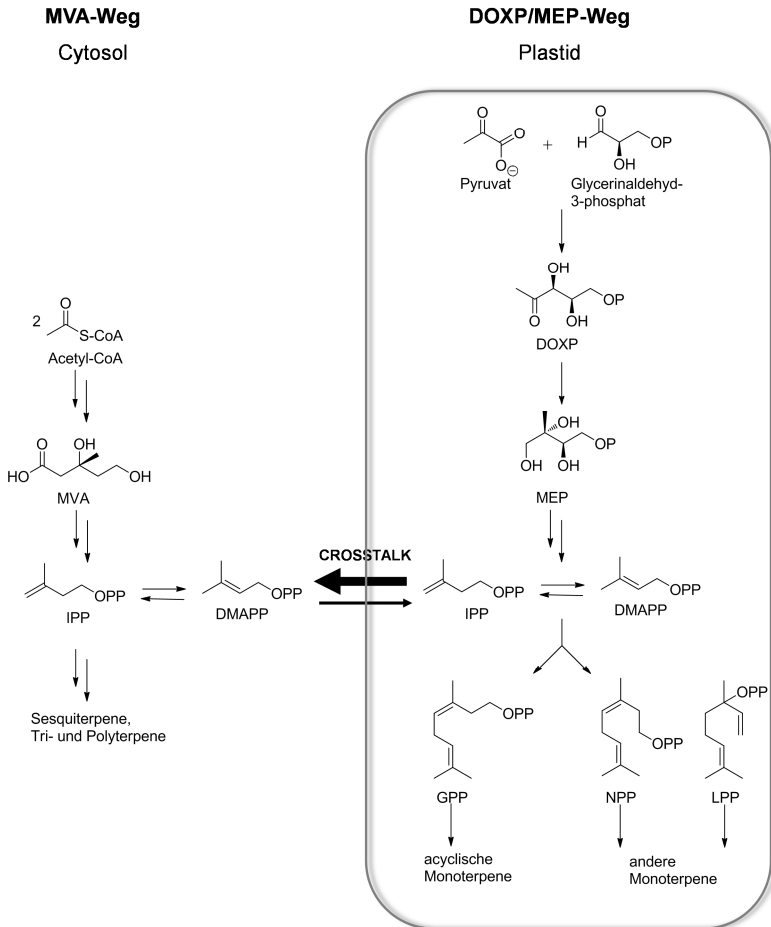
Der MVA-Weg läuft im Cytosol ab. Im ersten Schritt reagieren zwei Moleküle Acetyl-CoA in Anwesenheit der Acetoacetyl-CoA Thiolase zum  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl-glutaryl-CoA. Unter Anwesenheit einer weiteren Acetyl-CoA Einheit sowie zwei NADPH-Molekülen kommt es über das Zwischenprodukt 3-(S)-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA zur Bildung von Mevalonsäure (MVA). Die Mevalonsäure wird im Anschluss mit zwei ATP-Molekülen zum Mevalonsäurediphosphat phosphoryliert. Durch Decarboxylierungs- und Dehydratisierungsvorgängen entsteht daraus IPP (Breitmaier, 2005; Lichtenthaler, 2010).

Im Unterschied zum MVA-Weg läuft der DOXP/MEP-Weg im Plastid ab. Zur Synthese von IPP wird einem ersten Schritt 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat in Anwesenheit der DOXP-Synthase gebildet. Hierbei kommt es zur Abspaltung von CO<sub>2</sub>. Aus dem DOXP entsteht in Anwesenheit von NADPH und einer DOXP-Reduktoisomerase, 2-Methylerythritol-4-phosphat. Nach weiteren Syntheseschritten kommt es zur Bildung von

6

IPP (vgl. Abbildung 3). Es werden dafür insgesamt drei Moleküle NADPH sowie drei ATP-Äquivalente (ATP bzw. CTP) benötigt (Lichtenthaler, 2010).

Durch Reaktion von IPP mit DMAPP entsteht Geranylpyrophosphat (GPP), der direkte Präkursor der Monoterpene. Aus diesem können entweder acyclische Terpene gebildet werden, oder es entstehen hieraus durch *cis*-, *trans*-Isomerisierungen Nerylpyrophosphat (NPP) oder durch Umlagerungen Linalylpyrophosphat (LPP) (vgl. Abbildung 3) (Vasserot et al., 1995).



**Abbildung 3: Die Biosynthese der Terpene**

MVA= Mevalonsäure, DOXP= 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat, MEP= Methylerythritol-4-phosphat, IPP= Isopentenylidiphosphat, DMAPP= Dimethylallyldiphosphat, GPP= Geranylpyrophosphat, NPP= Nerylpyrophosphat, LPP= Linalylpyrophosphat

Die Bildung der Monoterpene erfolgt im Anschluss durch Umsatz des Geranylpyrophosphat in Anwesenheit verschiedener Terpensynthasen. Beispielsweise ist die Linalool/ Nerolidol-Synthase verantwortlich für die Bildung von Linalool (Martin et al., 2012).

Durch Inkubationsstudien unterschiedlicher Gewebe der Weinpflanze mit den isotoopenmarkierten Präkursoren [5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Mevalonsäurelacton und [5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-Deoxy-D-xylulose konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Monoterpene fast ausschließlich über den DOXP/MEP-Weg abläuft (Luan und Wüst, 2002). Die Biosynthese der Sesqui-, Tri- und Polyterpene ist hingegen im Cytosol lokalisiert und läuft über den MVA-Weg ab. In verschiedenen Pflanzenspezies konnte jedoch ein so genannter Crosstalk zwischen beiden Biosynthesewegen festgestellt werden (Gutensohn et al., 2012). Dieser konnte auch für die Gattung *Vitis* nachgewiesen werden. Nach Behandlung von Pflanzenmaterial der Gattung *Vitis* mit [5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-Deoxy-D-xylulose wurde neben Monoterpenen auch ein Einbau in verschiedene Sesquiterpene detektiert. Es findet somit auch ein Transport der im Plastid gebildeten Präkursoren ins Cytosol statt. Dieser „Crosstalk“ findet hauptsächlich vom Plastid ins Cytosol statt, nur im geringen Umfang vom Cytosol in den Plastiden (Hampel et al., 2005; May et al., 2013).

In den 1970er Jahren beschäftigten sich viele Arbeitsgruppen mit der Biosynthese der Terpene, ihrer Metabolisierung zu den Glycosiden sowie dem Transport dieser in andere Zellkompartimente. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die Biosynthese der Terpene vieler Gemüsepflanzen in den Blättern stattfindet. Sie werden dort zur Speicherung glycosyliert, um diese bei Bedarf in andere Gewebe zu transportieren. Weiterhin sollte die Glycosylierung die Hydrophilie erhöhen, wodurch ein Transport erleichtert wird (Gunata et al., 1986). Die transportierten Verbindungen können dann z.B. in Blüten durch anwesende Glucosidasen wieder freigesetzt werden, um dort zum Blütenduft beizutragen (Stahl-Biskup et al., 1993; Winterhalter und Skouroumounis, 1997).

Allerdings konnte festgestellt werden, dass die freien Aglykone, die in den Blüten nachgewiesen wurden, nicht mit der Zusammensetzung der glycosidischen Präkursoren in den Blättern übereinstimmten (Stahl-Biskup et al., 1993; Winterhalter und Skouroumounis, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Wasserlöslichkeit durch Glycosylierung nicht in allen Fällen wesentlich verbessert wurde. Beispielsweise erhöht sich bei dem Terpen Thymol die Wasserlöslichkeit durch die Glycosylierung kaum (Stahl-Biskup et al., 1993; Winterhalter und Skouroumounis, 1997).

Auch in *Vitis vinifera* wurde zunächst davon ausgegangen, dass die Synthese der Terpene in den Blättern stattfindet (Gunata et al., 1986). Markierungsstudien mit stabilisotopenmarkierten Präkursoren, wie [5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-Deoxy-D-xylulose, zeigten, dass neben Blattgeweben, die Biosynthese der Monoterpene auch in anderen Geweben wie Beerenfleisch und -häuten stattfindet (Hampel et al., 2005; Luan und Wüst, 2002).

## **1.2 Nicht-flüchtige Aromastoffe**

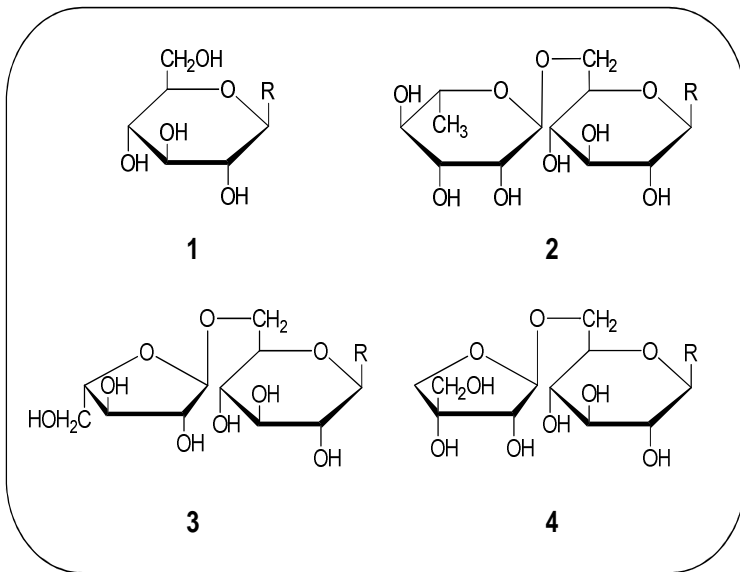
Monoterpene werden im Verlauf der Reife vermehrt gebildet und müssen von der Pflanze akkumuliert werden. Ihr eher lipophiler Charakter macht eine sofortige Speicherung in der Pflanze schwierig bzw. ist für diese zelltoxisch. Die Toxizität rührt daher, dass diese lipophilen Stoffe in hohen Konzentrationen labile Zellkomponenten der Pflanze, wie z.B. Membranstrukturen, zerstören können. Eine mögliche Form der Speicherung, die sich die Pflanze unter anderem zu Nutzen macht, ist die Metabolisierung der freien Terpene in ihre nicht-flüchtigen, glycosidisch gebundenen, geruchsinaktiven Verbindungen. Die Zuckerbindung befähigt die Pflanze, diese Stoffe leichter in der Zellvakuole zu speichern (Winterhalter und Skouroumounis, 1997). Francis und Allcock entdeckten 1969 erstmals gebundene Terpene in Rosen (Francis und Allcock, 1969). Dies war ein Meilenstein in der Geschichte der Monoterpen-glycosid-Analytik. In Weinbeeren wurden

glycosidische Verbindungen durch Cordonnier und Bayonove 1974 zum ersten Mal nachgewiesen.

Der größte Anteil an geruchsaktiven Verbindungen liegt zum Zeitpunkt der Vollreife glycosidisch gebunden vor und kann daher nicht zum Aroma der Beere beitragen (Stahl-Biskup et al., 1993). Dieses wird im Englischen häufig als „hidden aromatic potential“ bezeichnet (Gunata et al., 1985).

Die gebundenen Terpene können als Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside, als 6-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucoside (Rutinoside), 6-O- $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucoside (Arabinosylglycoside) sowie als 6-O- $\beta$ -D-Apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucoside (Apiosylglycoside) vorliegen (vgl. Abbildung 4) (Gunata et al., 1994). Hierbei stellen die Disaccharide den größten Anteil der gebundenen Terpene dar, Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside kommen nur in geringen Mengen vor. In Abhängigkeit der Rebsorte liegen die Apiosylglycoside bis zu 50 % vor (bezogen auf die Gesamtglycoside), die Rutinoside machen 6-13 % aus, hingegen die Glucoside nur 4-9 % (Maicas und Mateo, 2005). Die Bindung der jeweiligen Aglykone an den entsprechenden Zuckerrest erfolgt über das anomere C-Atom des  $\beta$ -D-Glucose-Restes und der Hydroxylgruppe des jeweiligen Monoterpenalkoholes. Katalysiert wird dieser Prozess unter anderem durch Glycosyltransferasen.





**Abbildung 4: Monoterpenglycoside in *Vitis vinifera***

Strukturen der  $\beta$ -D-Glucoside (1), der 6-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucoside (2), der 6-O- $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucoside (3) sowie der 6-O- $\beta$ -D-Apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucoside (4). R= Monoterpen-Rest

### 1.2.1 Industrielle Bedeutung der glycosidisch gebundenen Terpene

Neben den freien Terpenen haben auch ihre glycosidisch gebundenen Aglykone industrielle Bedeutung. So besitzen manche glycosidisch gebundene Terpene pharmakologische Wirkungen und können als so genannte „Prodrug“ Substanzen eingesetzt werden. Dies sind Substanzen, die zunächst

unwirksam sind und erst durch Verstoffwechslung im Körper in ihre aktiven Formen übergehen (Rivas et al., 2013).

Geraniol spielt in der Kosmetik- und Duftstoffindustrie eine besondere Rolle, da es den typischen Rosenduft verkörpert. Da freie Terpene meist sehr aromatisch sind, ihre glycosidisch gebundenen Analoga jedoch nicht, könnten letztere weiterhin in der Kosmetikindustrie als so genannte „controlled release“ Substanzen eingesetzt werden. Jene sind Verbindungen, die durch hydrolytische Spaltung und Freisetzung der freien Formen langsam ihr Aroma entfalten (Rivas et al., 2013).

## **1.2.2 Glycosidisch gebundene Terpene als Aromavorstufen in Wein**

Wie bereits in 1.2 erläutert, besitzen die gebundenen Terpene ein großes Aromapotential. Während der Weinbereitung, der Lagerung und der Alterung der Weine können diese Präkursoren teilweise freigesetzt werden. Die Freisetzung kann sowohl enzymatisch, als auch säurekatalytisch stattfinden.

### **1.2.2.1 Freisetzung von Terpenen während der Weinbereitung**

Bei der Klärung der Moste können glycosidisch gebundene Terpene teilweise freigesetzt werden. Dieses beruht auf der

Tatsache, dass hierfür eingesetzte Pektinasen, Glucosidase- und Arabinofuranosidase-Nebenaktivität besitzen, die zur Spaltung der gebundenen Terpene führen können (Carrau et al., 2008).

Auch können verschiedene Weinhefen, die zur Weinbereitung eingesetzt werden, Glucosidase-Nebenaktivität besitzen. Hefen, die nicht dem *Saccharomyces* Stamm angehören, zeigten sogar eine höhere Aktivität, als die klassische Weinhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Carrau et al., 2008).

Neben der Fermentation von Weinen durch Hefen kann durch Anwesenheit von Bakterien der Gattung *Oenococcus* die Malolaktische Fermentation (MLF) ablaufen. Hierbei wird im Wein vorkommender Zucker und Äpfelsäure zu Milchsäure umgewandelt. Als Nebenreaktion dieses mikrobiellen Säureabbaus werden auch glycosidisch gebundene Verbindungen gespalten, da die Gattung *Oenococcus* ebenfalls eine Glucosidase-Nebenaktivität zeigt (Boido et al., 2002; Ugliano et al., 2003). Vorteile einer gewünschten, induzierten Malolaktischen Fermentation sind ein geringerer Gehalt an titrierbarer Säure, ein verbessertes „mouthfeeling“ sowie ein spezielles Aroma. Die gezielte Induktion der Malolaktischen Fermentation wurde in den letzten Jahren beliebter, da hierdurch die spontan ablaufende Malolaktische Fermentation unterdrückt wird. Allerdings können bei der spontanen MLF unerwünschte Fehleraromen und Trübungen

entstehen. Der Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von Schwefeldioxid unterbunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass glycosidisch gebundene Monoterpene bei Ablauf einer Malolaktischen Fermentation zwar abgebaut wurden, aber keine Erhöhung der entsprechenden freien Aglykone nachgewiesen werden konnte. Es wurde vielmehr eine Umlagerung in andere Terpene nachgewiesen (Boido et al., 2002; Ugliano et al., 2006). Die  $\beta$ -Glucosidase-Nebenaktivität der Bakterienstämme *Oenococcus* ist als sehr gering zu betrachten (Boido et al., 2002).

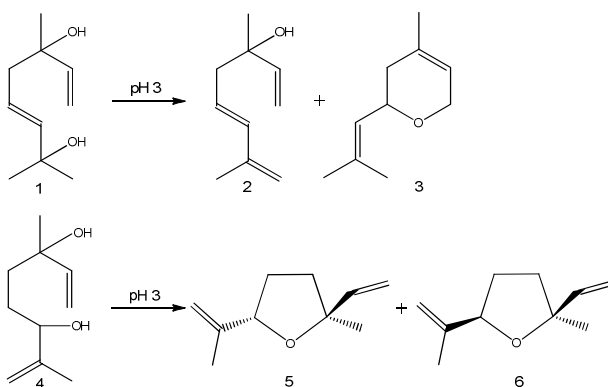
### **1.2.2.2 Einfluss der Weinalterung und Lagerung auf das Aromaprofil**

Neben den enzymatischen Hydrolysen von gebundenen Terpenen sind weiterhin säurekatalysierte Spaltungen beschrieben. Sie verlaufen langsamer als die enzymatischen Reaktionen und sind abhängig von dem jeweiligen Aglykon (Sarry und Gunata, 2004). Diese treten vor allem während der Fermentation und im Laufe der Lagerung durch Erniedrigung des pH-Wertes auf.

Vor allem in der ersten Woche der Lagerung ändert sich das Aromaprofil eines Weines stark. Es konnten hier Konzentrationserhöhungen einiger Verbindungen, bedingt durch die Hydrolyse der glycosidisch gebundenen Präkursoren, nachgewiesen werden (Loscos et al., 2010).

Diese Gehalte sanken im Verlauf der Lagerung jedoch wieder, was auf weitere Folgereaktionen zurückzuführen ist.

Die säurekatalytischen Umlagerungsreaktionen bewirken während der Lagerung eine Veränderung der ursprünglichen Aromakomponenten im Wein. Es werden dadurch vermehrt Substanzen gebildet, die originär nicht als gebundene Aglykone im Wein vorkommen. So bilden sich z.B. aus dem Polyol Diendiol I, Neroloxid und Hotrienol sowie die Linalooloxide aus dem Diendiol II (vgl. Abbildung 5) (Williams et al., 1980).



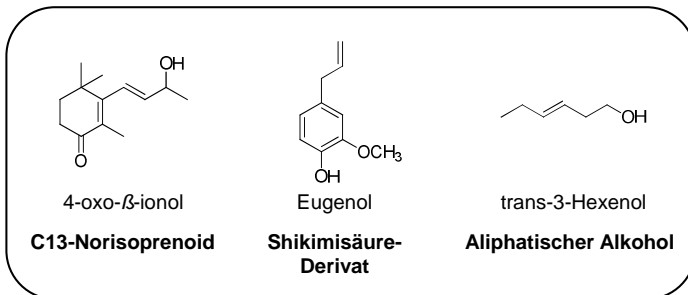
**Abbildung 5: Säurekatalysierte Umlagerungsreaktionen der Diendiole**

Im Säuren kommt es zur Bildung von Hotrienol (2) und Neroloxid (3) aus dem Diendiol I (1). Diendiol II (4) hingegen bildet unter den gleichen Bedingungen die furanoiden Linalooloxide 5 und 6 (5,6) (Williams et al., 1980).

### 1.3 Aktueller Kenntnisstand zu Glycosyltransferasen in *Vitis vinifera*

#### 1.3.1 Glycosyltransferasen

In *Vitis vinifera* sind derzeit über 200 verschiedene glycosilierte Verbindungen bekannt. Aglykone sind hierbei vor allem Monoterpene, C13-Norisprenoide, Shikimisäure-Derivate sowie aliphatische Alkohole (vgl. Abbildung 6) (Mathieu et al., 2005; Schneider et al., 2001; Skouroumounis und Winterhalter, 1994; Williams et al., 1983; Winterhalter et al., 1990; Wirth et al., 2001).



**Abbildung 6: Andere Substanzklassen, die in *Vitis vinifera* glycosidisch gebunden vorkommen können** (Skouroumounis und Winterhalter, 1994; Ugliano und Moio, 2008; Williams et al., 1983; Winterhalter et al., 1990)

Zahlreiche Forschungsarbeiten in Bereichen der Strukturaufklärung, der Gehaltsbestimmungen freier und gebundener Verbindungen sowie der Fermentationseinflüsse

liegen bereits vor. Die Terpenglycosylierung in *Vitis vinifera* sowie die daran beteiligten Enzyme wurde bisher nur wenig erforscht.

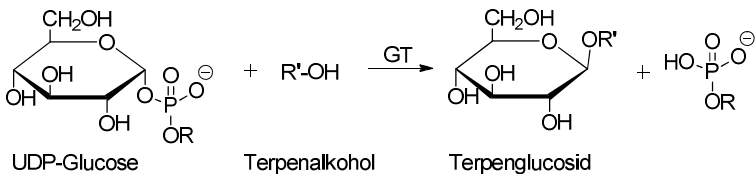
Forschungsarbeiten der letzten Jahre zeigten die Komplexität der Gruppe der Glycosyltransferasen (GTs) und beschrieben diese als „*Superfamily*“. Die GTs wurden in insgesamt 94 Gruppen klassifiziert (CAZy Datenbank; [www.cazy.org](http://www.cazy.org); Stand: 15. September 2013). Die Gruppe 1 listet Glycosyltransferasen, die niedermolekulare Verbindungen umsetzen, zu denen auch die Monoterpenalkohole zählen. Sie ist eine der größten Gruppe der Glycosyltransferasen. Innerhalb dieser sind insgesamt 5886 GTs beschrieben, von denen 3176 eukaryotischen Ursprungs sind (CAZy Datenbank; [www.cazy.org](http://www.cazy.org); Stand: 11. Oktober 2013).

In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* umfasst diese Gruppe 1 GT 120 Gene. (Lim, 2002), in *Vitis vinifera* ca. 156 Gene (persönliche Kommunikation, Johanna Frotscher, 2013).

### **1.3.2 Bildung von glycosidisch gebundenen Verbindungen**

Der Mechanismus der Glycosyltransferasen liegt in der Übertragung einer aktivierten Zucker-Einheit auf verschiedene Akzeptormoleküle wie Monoterpenalkohole. Diese Glycosylierung beruht auf dem Prinzip der nucleophilen

Substitution ( $S_N2$ ) (vgl. Abbildung 7). Die Bindung erfolgt hierbei hauptsächlich über Sauerstoff, selten auch über Stickstoff. Die Vertreter der Gruppe 1 GTs übertragen jeweils ein Uridindiphosphat-aktiviertes Zuckermolekül auf verschiedenste Akzeptormoleküle (vgl. Abbildung 8). GTs, deren Glucose Uridindiphosphat aktiviert ist, werden dann als UGTs bezeichnet (Ross et al., 2001); Glycosyltransferasen aus *Vitis vinifera* VvGTs.

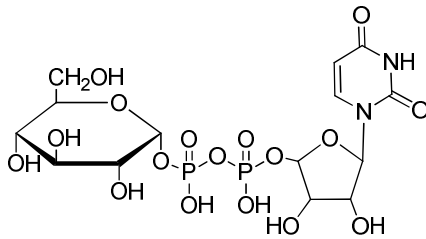


**Abbildung 7: Schema der Glycosylierungsreaktion, katalysiert durch eine Glycosyltransferase (GT)**

R= Uridinphosphat-Rest

Damit ein Akzeptormolekül als reaktives Nucleophil agieren kann, wird zunächst ein Proton abstrahiert. Der Schritt wird von einem Histidin-Rest des Enzymes katalysiert, der als Brönsted-Base agiert. Dieser befindet sich im aktiven Zentrum der UGT in der Nähe des Donors und Akzeptors (Brazier-Hicks et al., 2007).

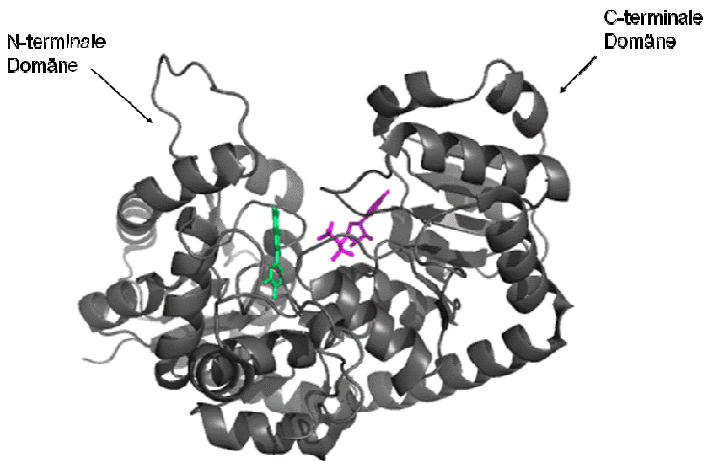




**Abbildung 8: Uridindiphosphat (UDP)- Glucose**

Die in Pflanzen vorkommenden GTs zeichnen sich durch eine stark konservierte PSPG (Plant Secondary Product Glycosyltransferase)-Box nahe des C-Terminus des Enzyms aus. Diese beschreibt einen Bereich, der aus 44 Aminosäure-Resten besteht. Sie ist hoch konserviert, d.h. hier besteht zwischen den einzelnen GTs große Sequenzhomologie. Diese stellt weiterhin die Nucleotid-Diphosphat Bindungsstelle für den aktivierten Zucker dar (Caputi et al., 2012). Im Gegensatz dazu ist das N-terminale Ende des Enzymes wichtig für die Bindung des Akzeptormoleküls, wie z.B. ein Monoterpenalkohol. Beim N-terminalen Ende hingegen herrscht häufig keine große Sequenzhomologie, da die unterschiedlichen GTs verschiedenste Akzeptoren mit unterschiedlichsten Strukturen binden (Wang, 2009).

Durch Faltung der UGT weist diese zwischen C- und N-terminaler Domäne strukturell betrachtet eine Art „Tasche“ auf. Hier findet sowohl die Bindung des Donors als auch die Akzeptors statt (Thorsoe et al., 2005).



**Abbildung 9: 3D-Struktur der VvGT1 mit UDP-Glucose und Quercetin im aktiven Zentrum (pdb: 2C9Z)**

Die UDP-Glucose ist hier pink markiert, hingegen ist das Quercetin grün dargestellt. (Osmani et al., 2009)

Innerhalb dieser Gruppe 1 GT wurden für 107 rekombinante UGTs aus *Arabidopsis thaliana* Substratscreenings durchgeführt. Davon zeigen 27 UGTs eine Aktivität auf Mono-, Sesqui- und Diterpene mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Während einige UGTs bevorzugt primäre Terpenalkohole glycosilieren, metabolisieren andere bevorzugt sekundäre und tertiäre Terpenalkohole. Weiterhin wird auch eine Aktivität gegenüber Carboxylgruppen zur Bildung von Glucoseestern beschrieben (Caputi et al., 2008).

Monoterpenylglycosyltransferasen sind in *Vitis vinifera* bislang noch nicht beschrieben. Es konnte lediglich gezeigt werden,

dass Proteinextrakte von Weinbeeren und -blättern eine Aktivität gegenüber zahlreichen Substraten, unter anderem auch gegenüber Monoterpenen, aufwiesen (Ford und Høj, 1998).

In *Vitis vinifera* sind derzeit wenige GTs beschrieben. Folgende Glycosyltransferasen konnten bislang identifiziert und funktionell charakterisiert werden:

- Flavonol-3-O-Glucuronosyltransferase (VvGT5) (Ono et al., 2010),
- Flavonol-3-O-Glycosyltransferase/Galactosyltransferase (VvGT6) (Ono et al., 2010),
- Resveratrol/Hydroxyzimtsäure-O-Glycosyltransferase (VLRSGt) in *Vitis labrusca* (Hall und De Luca, 2007),
- Anthocyan/Flavonol-3-O-Glycosyltransferase (UFGT/VvGT1) (Ford, 1998),
- Anthocyan-5-O-Glycosyltransferase (Jánváry et al., 2009).

Da Glycosyltransferasen zu einer großen Multigenfamilie gehören und sich die Sequenzen von Enzymen mit ähnlichen Akzeptoren häufig ähneln, ist es hilfreich, Informationen über bereits beschriebene Terpenglycosyltransferasen aus anderen Pflanzenspezies heranzuziehen.

Es wurden folgende Glycosyltransferasen in anderen Pflanzenspezies beschrieben, die unter anderem Terpene umsetzen:

- p-Hydroxymandelonitrile-O-Glycosyltransferase (UGT85B1) aus *Sorghum bicolor* (Hirse), die neben cyanogenen Glucosiden (Dhurrin) auch Terpene wie Nerol, Geraniol,  $\beta$ -Citronellol,  $\alpha$ -Terpineol, Linalool und Farnesol umsetzt (Hansen et al., 2003).
- Glucosyltransferase (EPGT) aus *Eucalyptus perriniana*, die verschiedene Substrate wie Zimtsäure, Menthol, Isoeugenol, 1,8-Cineole und weitere Verbindungen umsetzt (Nagashima et al., 2004).

### 1.3.3 Substratspezifität der Glycosyltransferasen

Wie in 1.3.1 beschrieben, liegen zahlreiche Verbindungen in der Pflanze glycosidisch gebunden vor. Hierbei ist von enormem Interesse, welche Glycosyltransferasen diese Glycosylierungen katalysieren. Es ist bekannt, dass einige GTs sehr substrat-, stereo- und regiospezifisch arbeiten (Osmani et al., 2009), wohingegen andere ein breites Spektrum an Verbindungen umsetzen, welches als Promiskuität bezeichnet wird. Diese Promiskuität macht es schwierig, die natürlichen Substrate der jeweiligen GTs zu identifizieren, da eine Vielzahl von Verbindungen in Frage kommen kann. Die Überprüfung einzelner Substrate ist sehr

24

zeitaufwändig und nicht effizient. Zur Identifizierung müsste eine Methode entwickelt werden, die in einem Schritt direkt eine Vielzahl potentieller, natürlicher Substrate mit einschließt und so die Identifizierung wesentlich erleichtert.

Glycosyltransferasen setzen somit oft ein breites Spektrum an Akzeptoren um, hingegen ist das Spektrum der Zuckerdonoren stark eingeschränkt. Als Zuckerdonor nutzen die Glycosyltransferasen der Gruppe 1 hauptsächlich UDP-Glucose. Es sind Arbeiten beschrieben, die andere potentielle Zuckerdonoren, als UDP-Glucose, untersuchen. Im Fall der UGT85B1 aus *Sorghum bicolor* konnte gezeigt werden, dass z.B. neben der UDP-Glucose auch zu einem geringen Anteil UDP-Galactose umgesetzt wird (Thorsoe et al., 2005).

## **1.4 Methoden zur Analytik von freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glycosiden**

### **1.4.1 Isolierung und Detektion von freien Terpenen**

Bislang werden zahlreiche Methoden angewendet, um freie und glycosidisch gebundene Terpene zu bestimmen. Die Extraktionen der Analyten finden meist in wässrigen Lösungen statt. Vorarbeiten zeigten, dass die direkte Extraktion aus den Geweben mit organischen Lösungsmitteln nicht den erwünschten Erfolg brachte. Weiterhin wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Kosten für Lösungsmittel zu senken und eine geringere Belastung der Umwelt anzustreben

(Ebeler, 2001). Demnach wurde die wässrige Extraktion zur Extraktion der Wahl. Dieser wird meist eine Carrez-Klärung oder Behandlung mit anderen Klärungsreagenzien, wie z.B. Polyvinylpyrrolidon (PVPP) angeschlossen, wobei z.B. durch die Verwendung von PVPP ein Analytverlust diskutiert wird (Cabaroğlu et al., 2003). Die anschließende Festphasenextraktion (SPE, *engl.* Solid Phase Extraction) ist ein gängiges Verfahren zur weiteren Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Proben. Durch geeignete Wahl des eingesetzten Lösungsmittels besteht sogar die Möglichkeit der simultanen Bestimmung von freien und gebundenen Terpenen. Weiterhin hat diese Methode den Vorteil, dass störende polare Matrix-Komponenten, wie z.B. Zucker, entfernt werden können. Sie werden zusammen mit anderen polaren Verbindungen durch Wasser von den jeweiligen SPE-Phasen eluiert, während unpolarere Verbindungen sowie glycosidische Präkursoren auf der Phase verbleiben. Neben diesem Verfahren werden teilweise auch andere Techniken, wie zum Beispiel eine Flüssig-Flüssig-Extraktion oder eine simultane Destillation/Extraktion angewendet (Sánchez-Palomo et al., 2009).

Eine weitere Möglichkeit der Extraktion ist die Festphasenmikroextraktion (SPME, *engl.* Solid Phase Microextraction) (Sánchez-Palomo et al., 2005). Hierbei werden die flüchtigen Analyten aus wässrigen Lösungen oder

Gewebeteilen direkt mit Hilfe einer SPME-Faser extrahiert. Die Methode hat den Vorteil, dass sie einfach anzuwenden ist, kein Lösungsmittel nötig ist und trotz kleinerer Probenmengen leichtflüchtige Substanzen sehr sensitiv detektiert werden können. Je nach Anwendungsbereich können die Proben direkt und ohne vorangeschaltete Probenaufarbeitung vermessen werden. So ist zum Beispiel die Messung von Terpenen, die über die Beerenhaut abgegeben werden, ohne Probenaufarbeitung mittels SPME möglich (May et al., 2013). Zur Analyse können verschiedene Fasern unterschiedlicher Polaritäten eingesetzt werden, wie z.B. Polyacrylatmaterialien. Da mit dieser Methode bevorzugt leichtflüchtige Verbindungen gemessen werden, eignet sie sich nicht zur Analyse der Monoterpen- $\beta$ -D-glycoside. Die einzelnen Fasertypen adsorbieren unterschiedliche Analyten mit unterschiedlichen Präferenzen. Desweiteren ist die Reproduzierbarkeit der jeweiligen Analysenbedingungen (Einstellung des Konzentrationsverhältnisses zwischen wässriger Phase/ Gasraum) schwierig. Eine Quantifizierung der Analyten ohne stabilisotopenmarkierte Interne Standards ist oftmals aufwendig und schwierig (Petrozziello et al., 2012).

Bei der Anwendung der oben genannten Methoden erfolgt die Quantifizierung von freien Monoterpenen meist klassisch mittels GC-MS. Hierbei wird häufig 2-Octanol oder 4-Nonanol

als Interner Standard verwendet (Fenoll et al., 2009; Sánchez-Palomo et al., 2009).

Zur Strukturaufklärung möglicher neuer geruchsaktiver Substanzen werden auch präparative HPLC-Systeme angewendet, die eine Trennung der Komponenten aus Weinbeeren oder Weinextrakten gewährleisten. Eine anschließende Detektion der Fraktionen kann weitere Informationen bezüglich Struktur oder Geruchsaktivität liefern. Im Falle einer Geruchsaktivität kann z.B. aus den einzelnen Fraktionen eine olfaktorische GC-Messung erfolgen. Zur Strukturaufklärung können bislang unbekannte Verbindungen aus den Extrakten isoliert und über NMR-Techniken näher charakterisiert werden (Aznar et al., 2001; Ferreira et al., 1999).

#### **1.4.2 Isolierung und Detektion von Monoterpen- $\beta$ -D-glycosiden**

Die Bestimmung der Monoterpen- $\beta$ -D-glycoside ist im Gegensatz zur Bestimmung der freien Terpene deutlich schwieriger, da hierfür Referenzstandards käuflich nicht erhältlich sind.

Dennoch sind zahlreiche Aufarbeitungsmethoden zur Bestimmung der Monoterpen- $\beta$ -D-glycoside in *Vitis vinifera* bereits beschrieben (Jeleń et al., 2012; Mateo und Jiménez,



2000). Die Analyse erfolgt entweder in Weinen, Säften oder in Extrakten verschiedener Pflanzenmaterialien (Gescheine, Beerenhäute, Blätter, Wurzeln).

Analog zu den freien Terpenen wird üblicherweise zur Bestimmung der gebundenen Analoga nach etwaiger Extraktion eine anschließende Adsorption an eine Festphase (SPE) angeschlossen. Nach diesem Aufarbeitungsschritt gibt es mehrere Lösungsansätze zur Bestimmung der Monoterpenglycoside. Diese können entweder als freigesetzte Aglykone nach hydrolytischer Spaltung mittels GC-MS, als gebundene Terpene nach Derivatisierungsschritten mittels GC-MS oder direkt über LC-MS detektiert werden. Einen zusammenfassenden Überblick zu den verschiedenen Aufarbeitungsmethoden sowie die jeweiligen untersuchten Gewebe und die Messmethoden gibt die Tabelle 1.

**Tabelle 1: Methoden zur Bestimmung von glycosidisch gebundenen Monoterpenen (verändert nach (Jeleń et al., 2012))**

Rebsorte/ Material	Aufarbeitung	Derivati sierung	Hydrolyse	Messsystem/ Analyten	Referenz
Gewürztraminer/ ganze Beeren ohne Kerne	Material vermahlen, Extraktion mit 8 mL H <sub>2</sub> O, SP		Enzym. Hydrolyse in Citrat-Puffer (50 mM,	GC-MS <b>Glycoside:</b> u.a. Geraniol, Nerol, Citronellol und	(Martin et al., 2012)
Muscat Hamburg/ ganze Beeren ohne Kerne (im Reifeverlauf 2005 und 2006)	200 g Material vermahlen; Extraktion mit H <sub>2</sub> O, SPE (C18) <b>IS:</b> je 5 µL (0,4 g/L) 2-Octanol & Thymol DVB		Enzym. Hydrolyse in Citrat- Phosphat- Puffer (0,2 M, pH 5) mit AR 2000	GC-MS <b>Glycoside:</b> u.a. Linalool, Geraniol, Nerol, Citronellol, Geraniol, Diendiol I	(Fenoll et al., 2009)
Falanghina/ Saft	15 mL Saft, SPE (C18), <b>IS:</b> -, keine Detektion der Terpen- glycoside über Standards	TMS	Enzym. Hydrolyse in Citrat- Phosphat- Puffer (0,2 M) mit Rohapect	SPME-GC-MS: TMS-Derivate, freigesetzte Aglykone sowie LC-MS & MALDI- TOF-MS <b>Glycoside:</b> Linalool, α- Terpineol, Geraniol	(Nasi et al., 2008)
Muscat „a petit grains“/ Häute, Saft und Wein	200 mL Wein, Saft oder Beeren- hautextrakt, SPE (SDVB) <b>IS:</b> 4-Nonanol, Phenyl-β-D- glucosid	TFA	Enzym. Hydrolyse in Citrat- Phosphat- Puffer (pH 5) mit AR 2000 (40°C, 18 h)	GC-MS <b>Glycoside:</b> u.a. Linalool, Citronellol, Nerol, Geraniol, α- Terpineol	(Palomo et al., 2006)

Rebsorte/ Material	Aufarbeitung	Derivati sierung	Hydrolyse	Messsystem/ Analyten	Referenz
				<b>Glycoside:</b> TFA-Derivate: $\beta$ -D-glucoside, Arabinosyl- und Apiosyl-glucoside sowie Rutinoside: u.a. Linalyl-, Neryl-, Geranyl-, Diendiol-, $\alpha$ -Terpenyl-glycoside	
Muscat of Alexandria und Shiraz/ Blätter, Beeren (1996)	25 g Blätter vermahlen und mit MeOH extrahieren, MeOH eindampfen und in H <sub>2</sub> O aufnehmen. Adsorption an Amberlite XAD-2. 100 mL Saft, Adsorption an XAD-2 <b>IS:</b> 4-Nonanol		Enzym. Hydrolyse in Citrat-Phosphat-Puffer (0,2 M, pH 5) mit Pektolase/Hemicellulase (40 °C, 16 h)	GC-FID und GC-MS <b>Glycoside:</b> C6-Alkohole, aliphatische Alkohole, C13-Norisoprenoide, Monoterpene und Shikimisäure-Derivate	(Wirth et al., 2001)
Sangiovese, Sauvignon Blanc, Grüner Veltliner, Chardonnay und Gewürztraminer/ Beeren	30 g tiefgefrorene, vermahlene Probe in Wasser homogenisieren. Adsorption an ENV+ Kartuschen <b>IS:</b> n-heptanol (100 mg/L)		Enzym. Hydrolyse mit AR 2000	GC-MS/MS <b>Glycoside:</b> Ester, Alkohole, Monoterpene, Aldehyde, Ketone, Norisoprenoide, Säuren und Ether	(Vrhovsek et al., 2014)

Wie in Tabelle 1 gezeigt, ist zur Bestimmung der gebundenen Terpene eine enzymatische Hydrolyse dieser mit anschließender Detektion der freigesetzten Terpene per GC-MS üblich (Maicas und Mateo, 2005). Von Nachteil ist, dass hierbei die Terpenglycoside nicht direkt, sondern nur über ihre Spaltprodukte bestimmt werden. Die Hydrolyseausbeuten sind stark abhängig vom eingesetzten Enzympräparat. Diese arbeiten meist sehr substratspezifisch und häufig verlaufen die Hydrolysen nicht vollständig (Gunata et al., 1990, 1988). Der Einsatz von Säuren zur Spaltung der glycosidischen Verbindungen wird selten verwendet, da es durch die sauren pH-Werte zu Umlagerungsreaktionen der Terpene kommen kann und somit das gemessene Profil stark verändert wird (Williams et al., 1982).

Eine weitere Möglichkeit ist die Derivatisierung der glycosidischen Verbindungen durch verschiedene Reagenzien. Hierbei wurden leicht flüchtigere Trimethylsilyl- (TMS-) oder Trifluoracetamid- (TFA-) Derivate gebildet (Palomo et al., 2006; Szczepaniak und Isidorov, 2011; Voirin et al., 1992). Da Monoterpen- $\beta$ -D-glycoside bzw. ihre derivatisierten Verbindungen käuflich nicht erhältlich sind, ist eine Identifizierung schwierig. Weiterhin werden zur Analyse der Derivate hohe Trenntemperaturen mit niedrigen Temperaturrampen benötigt. Die Methoden der

Derivatisierungen konnten sich demnach in den letzten Jahren nicht durchsetzen.

Darüber hinaus werden Techniken wie die Counter Current Chromatography gekoppelt mit HPLC-Auftrennungen oder Säulenchromatographische Trennungen wie HILIC (Hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie; *engl.* „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography“) -Trennungen zur Isolierung von Terpenglycosiden genutzt. Die anschließende Strukturaufklärung erfolgt häufig über NMR- oder MS-Techniken (D'Ambrosio et al., 2013; Marinos et al., 1994).

Wenige Vorarbeiten beschäftigten sich in den 1980er und 1990er Jahren mit der Analyse von Monoterpenglycosiden mittels massenspektrometrischen Detektionsmethoden. Hierbei wurde die Synthese der käuflich nicht erhältlichen Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside sowie deren Fragmentierungen und der Strukturaufklärung dieser mittels MS/MS beschrieben - auch unter Zuhilfenahme stabilisotopenmarkierter Analyten (Cole et al., 1989; Salles et al., 1991a). Desweiteren wurden säulenchromatographische Auftrennungen von synthetisierten Standards vorgenommen. Die Detektion erfolgte hier über UV (Bitteur et al., 1989; Salles et al., 1990). Mit Hilfe dieser Vorarbeiten konnten erste Informationen über die Fragmentierungen und Elutionsverhalten auf HPLC-Phasen gewonnen werden.

In den letzten Jahren gab es wenige Versuche zur LC-MS-Detektion der Terpenglycoside. Mittels LC-ESI/MS (ESI; Elektronensprayionisierung) und MALDI-TOF-MS wurden, ohne Verwendung von Referenzstandards, Terpenglycoside detektiert. Es wurden mögliche Masse/Ladungs ( $m/z$ ) - Verhältnisse der Vorläufer-Ionen zur vorläufigen Identifizierung genutzt (Nasi et al., 2008).

Weiterhin wurden in der Rebsorte Moscato Giallo Terpendisaccharide mittels NMR-Analytik identifiziert und über LC-MS/MS charakterisiert (Schievano et al., 2013).

Es konnten in der Literatur bisher keine Daten in Bezug auf eine bestehende LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in *Vitis vinifera* gefunden werden.

## **1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Die vorliegende Arbeit umfasst die Analytik von freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in verschiedenen Rebsorten und Geweben. Ziel war die Entwicklung einer LC-MS/MS Methode mit direkter Bestimmung der Monoterpenyl- $\beta$ -D-glucoside.

Hierzu mussten käuflich nicht erhältliche Standards (sowohl Monoterpendiole, als auch Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside) nach bereits bekannten Synthesewegen synthetisiert werden.

Desweiteren wurde die Entwicklung einer Stabilisotopen-Verdünnungs-Analyse (SIVA) angestrebt. Hierzu wurden deuteriummarkierte Interne Standards synthetisiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellte die funktionelle Charakterisierung von Monoterpenylglucosyltransferasen aus *Vitis vinifera* dar. Diese potentiellen Monoterpenylglucosyltransferasen wurden durch die Hochschule Geisenheim ausgewählt und durch die TU München in *Escherichia coli* exprimiert. Zur funktionellen Charakterisierung wurden jeweils benötigte Ansätze an der TU München durchgeführt und für weitere Versuche zur Verfügung gestellt.

Neben der Bestimmung der Enantioselektivität der GTs sollte eine Methode für die Identifizierung der natürlichen Substrate entwickelt werden. Wie bereits in Abschnitt 1.3.3 erwähnt, stellt diese Identifizierung eine Herausforderung aufgrund von bestehender Promiskuität der verschiedenen GTs sowie der großen Anzahl potentieller Substrate dar.

## **1.6 Lösungsstrategie**

### **1.6.1 Synthese von Referenzsubstanzen und deren Analytik**

Bevor eine LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden entwickelt werden konnte,

mussten die Referenzsubstanzen im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert werden. Im Anschluss wurde die optimale Trennung der Substanzen auf verschiedenen HPLC-Phasen getestet und die geeignetste zur weiteren Entwicklung der Methode verwendet. Die Detektion der Terpenglucoside erfolgte hierbei zunächst über einen Diodenarray-Detektor (DAD). Im Anschluss folgte die Entwicklung der MS-Methode.

Als Alternative zur LC-MS/MS Methode wurden in einem orientierenden Vorversuch die einzelnen Standards und ein Beerenhautextrakt zudem mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert. Als Grundlage für die Probenaufarbeitung wurden Vorarbeiten herangezogen und diese der jeweiligen Fragestellung und den Laborgegebenheiten angepasst (Nasi et al., 2008).

Zur enantioselektiven Analyse der rekombinanten Enzyme war die enantioselektive-GC-MS Messung der Produkte an modifizierten Cyclodextrinen (nach hydrolytischer Freisetzung) die Methode der Wahl.

Für die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der natürlichen Substrate der Monoterpenylglucosyltransferasen wurde das so genannte „Activity-Based Metabolomic Profiling“ angewandt und der Aufgabenstellung sowie den Laborgegebenheiten angepasst (de Carvalho et al., 2010).



„Activity-Based Metabolomic Profiling“ (ABMP) ist eine effiziente Methode zur Identifizierung der potentiellen, natürlichen Substrate der verschiedenen Enzyme (de Carvalho et al., 2010). Normale *in vitro* Assays basieren auf dem Prinzip der Glycosylierung eines einzelnen Substrates mit aktivierter Glucose in Anwesenheit des potentiellen Enzymes. Diese Tests sind aufwendig und decken meist nur einen Bruchteil möglicher Substrate ab. Beim ABMP werden komplexe biologische Matrices in Anwesenheit aktivierter Glucose durch die exprimierten Enzyme umgesetzt. Das Analytspektrum ist hier wesentlich umfangreicher. Im Fall der Glycosyltransferasen (GT) ist im Rahmen dieser Arbeit ein Pflanzenextrakt (konzentrierter Auszug eines Beerenhautextraktes) durch die jeweiligen exprimierten GTs in Anwesenheit von UDP-Glucose umgesetzt worden. Bei dem Pflanzenextrakt handelte es sich ausschließlich um glycosidisch gebundene Verbindungen, die für den o.g. Versuch durch eine enzymatische Hydrolyse freigesetzt wurden.

Zur Strukturaufklärung der Produkte wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedenste Analysentechniken wie GC- und/oder LC-MS Techniken genutzt. Eine weitere Möglichkeit ist die Kombination dieser Techniken mit präparativen Trenntechniken und anschließender Strukturaufklärung mittels NMR.

## **2. Ergebnisse und Diskussion**

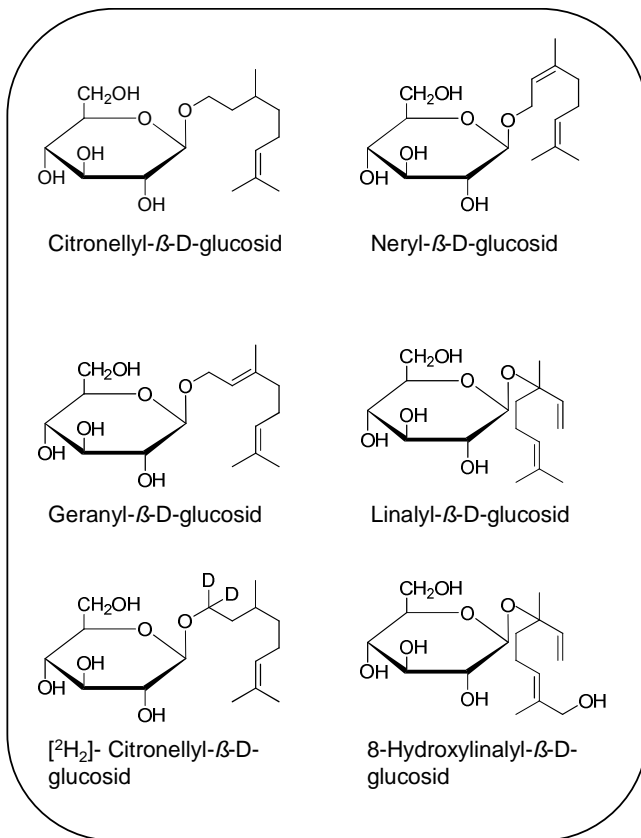
### **2.1 Charakterisierung der synthetisierten Referenzsubstanzen**

#### **2.1.1 Die synthetisierten Referenzstandards**

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Referenzstandards waren teilweise nicht käuflich erhältlich und mussten zunächst synthetisiert werden. Im Folgenden werden die durchgeführten Synthesen und die Synthesewege vorgestellt.

##### **2.1.1.1 Synthese von Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden**

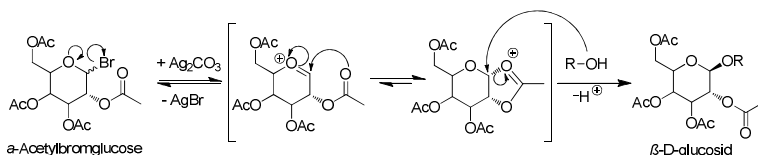
Die Monoterpen- $\beta$ -glucosid-Synthese ist durch die Koenigs-Knorr-Methode möglich (Paulsen et al., 1985). Nach diesen Vorschriften wurden vier Monoterpen- $\beta$ -glucoside, ein stabilisotopenmarkiertes Terpen- $\beta$ -D-glucosid sowie ein Monoterpendiol-glucosid synthetisiert (vgl. Abbildung 10).



**Abbildung 10: Strukturformeln der synthetisierten Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden**

Die Synthese des 8-Hydroxylinalyl- $\beta$ -D-glucosid erfolgte in zu geringer Ausbeute, so dass eine Charakterisierung über MS, nicht jedoch über NMR-Techniken, erfolgen konnte. Es wurde somit nicht als Referenzstandard eingesetzt.

Die Synthese der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside mit primären Alkoholen als Aglykone (Citronellol, Nerol und Geraniol) erfolgte über die Koenigs-Knorr-Reaktion mit Silbercarbonat als Katalysator (vgl. Abbildung 11) (Kürti, 2005).



**Abbildung 11: Reaktionsmechanismus der Koenigs-Knorr-Reaktion**

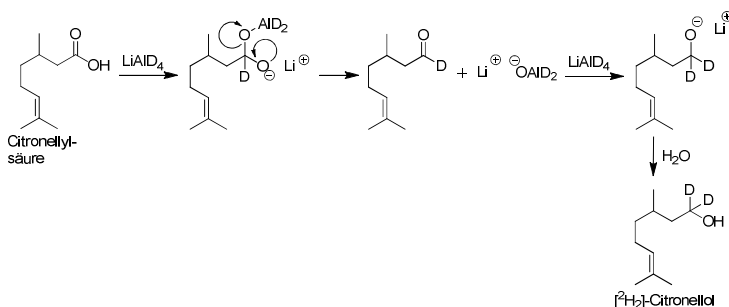
OAc= Acetylrest, R-OH= Monoterpenalkohol

Da  $\alpha$ -Acetylbromoglucose käuflich erhältlich ist, kann diese direkt für die Koenigs-Knorr-Reaktion eingesetzt werden. In einem ersten Reaktionsschritt reagiert diese durch den Coaktivator Silbercarbonat zum Oxocarbeniumion. Diese Reaktion ist regiospezifisch, sie findet immer am C1-Atom der Acetylbromoglucose statt. Ausgehend vom Oxocarbeniumion bildet die Acetylgruppe an dem C2-Atom ein Dioxolaniumion. Im Anschluss kommt es zu einem nucleophilen Angriff des Terpenalkoholes in Form einer  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion. Nach Protonabspaltung bildet sich ein acetyliertes Terpen- $\beta$ -D-glucosid, welches durch Natriummethylat im Anschluss deacetyliert wird (Kürti, 2005).

Die Glycosylierungsreaktion tertiärer Terpenalkohole verläuft über den Katalysator Silbercarbonat in nur sehr geringen Ausbeuten. Für diese Reaktion wurde der Katalysator Quecksilbercyanid gewählt (Hattori et al., 2004).

### 2.1.1.2 Synthese von [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Citronellole

Die Synthese von isotopenmarkiertem Citronellole erfolgte durch Reduktion der Citronellylsäure mit Lithiumaluminiumdeuterid (LiAlD<sub>4</sub>) (Wüst et al., 1998).



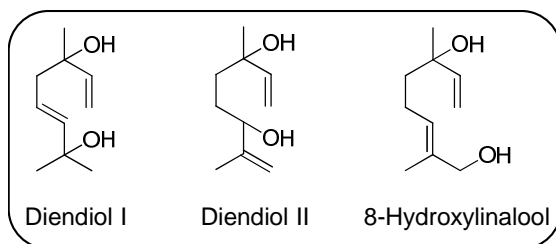
**Abbildung 12: Vorgeschlagener Mechanismus der Reduktion von Citronellylsäure zum [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Citronellole**

Carbonsäuren werden sehr effektiv mittels Lithiumaluminiumdeuterid zu den entsprechend Deuteriummarkierten Alkoholen reduziert (March, 1992). Der genaue Reaktionsmechanismus ist bislang noch nicht aufgeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass Lithiumaluminiumdeuterid zunächst als Base fungiert und ein Proton der Citronellylsäure

abstrahiert (Vollhardt et al., 2009). Es entsteht ein Carboxylat und es kommt zu einer Übertragung von zwei Deuteriumäquivalenten vom Lithiumaluminiumdeuterid. Es entsteht zweifach deuteriertes Citronellol.

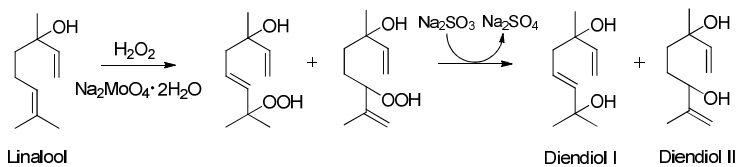
### 2.1.1.3 Synthese von Monoterpendiolen

Neben den Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden sind auch die Monoterpendiole Diendiol I, Diendiol II sowie das 8-Hydroxylinalool käuflich nicht erhältlich. Auch diese wurden nach bekannten Synthesewegen synthetisiert.



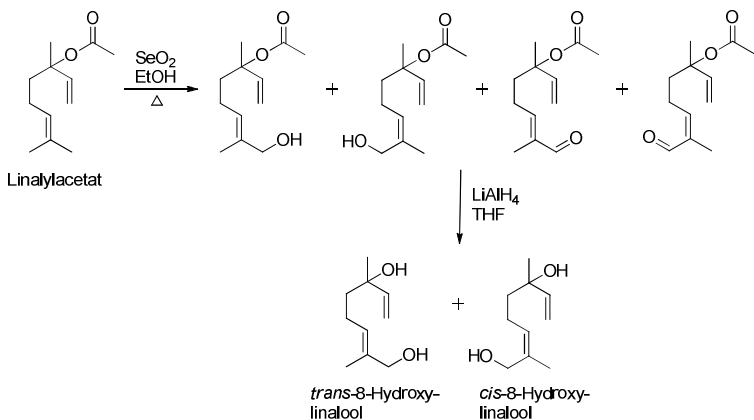
**Abbildung 13: Strukturformeln der synthetisierten Monoterpendiole**

Die Diole Diendiol I und Diendiol II wurden als Gemisch in einer Oxygenierungsreaktion mit generiertem Singulett-Sauerstoff ausgehend von Linalool synthetisiert (vgl. Abbildung 14) (Alsters et al., 2010). Es erfolgte eine entsprechende Reduktion zu den jeweiligen Alkoholen. Die Isomere wurden säulenchromatographisch getrennt.



**Abbildung 14: Reaktionsmechanismus der Diendiol I- und Diendiol II- Synthese**

Bei der Synthese von 8-Hydroxylinalool wird als Edukt das Linalylacetat verwendet. Im ethanolischen Milieu wird durch Zusatz von Selendioxid ( $\text{SeO}_2$ ) und durch Erhitzung das Kohlenstoff-Atom in Position 8 zum Alkohol bzw. zum Aldehyd oxidiert (Schwab, 1989). Die Carbonylgruppe wird durch Lithiumaluminiumhydrid ( $\text{LiAlH}_4$ ) zum Alkohol reduziert. Es entsteht ein Gemisch aus *cis*- und *trans*-8-Hydroxylinalool (vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Reaktionsmechanismus der 8-Hydroxylinalool-Synthese**

### 2.1.2 Hydrolytische Spaltung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside

Monoterpenglycoside werden häufig indirekt nach hydrolytischer Spaltung über ihre freigesetzten Aglykone mittels GC-MS detektiert. Damit zwischen freien und gebundenen Terpenen differenziert werden kann, müssen die hergestellten Extrakte zunächst mittels SPE aufgereinigt werden. Hierbei können die freien von den gebundenen Terpenen durch Wahl verschiedener Lösungsmittel separiert werden. Die freien Terpene können direkt, die gebundenen Terpene nach hydrolytischer Spaltung detektiert werden.

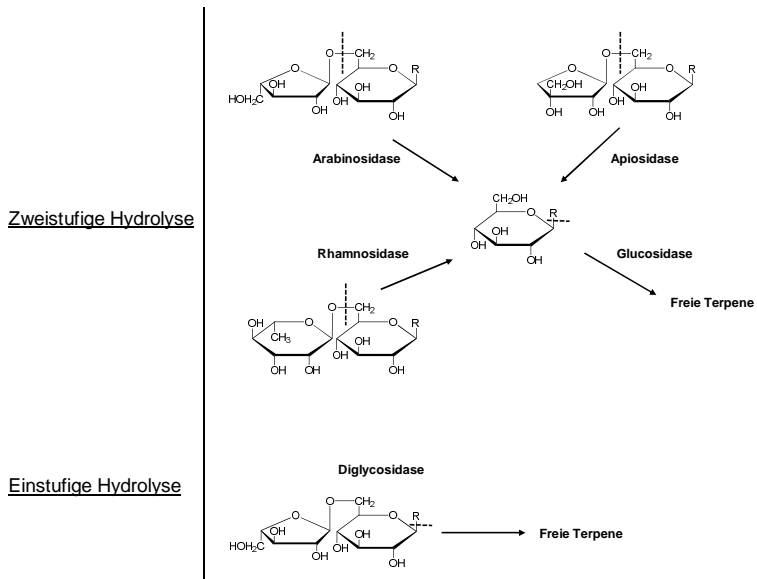


Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur direkten Analyse der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside mittels LC-MS/MS entwickelt. Diese Methode wurde der hydrolytischen Spaltung der Terpenglycoside vorgezogen. Nachteile wie eine unzureichende Spaltung oder Umlagerungsreaktion konnten so vermieden werden. Weiterhin wurde die Aufarbeitungsmethode um die zeitaufwändige Hydrolyse verkürzt.

Da die Terpen-Disaccharide mit dieser Methode aufgrund fehlender Referenzstandards nicht bestimmt werden können, wurde die Methode der enzymatischen Spaltung immer dann herangezogen, wenn eine orientierende Aussage über die Gesamtterpenglycoside erforderlich war.

Zur Optimierung der Aufarbeitung wurden verschiedene Enzympräparate in Hinblick auf eine effiziente und möglichst vollständige Hydrolyse getestet. Bei diesen Präparaten (AR 2000 und Glucanex) handelt es sich um gängige Enzympräparate, die zur Analyse von glycosidisch gebundenen Terpenen eingesetzt werden. Glucanex ist eine Enzymmischung aus dem Pilz *Trichoderma harzianum* und besitzt  $\beta$ -Glucanase-, Cellulase-, Protease- und Chitinase-Aktivität. AR 2000 ist ein pektinolytisches Enzympräparat, das Glucosidase-, Arabinofuranosidase-, Apiosidase- und Rhamnosidase-Aktivität besitzt (Sarry und Gunata, 2004). Es stammt aus dem Pilz *Aspergillus niger*. Die jeweiligen

Enzympräparate bestehen aus unterschiedlichen Mischungen der einzelnen Enzymarten. Ihre Hydrolyseaktivität unterscheidet sich teilweise deutlich voneinander.



**Abbildung 16: Ein- und Zweistufiger enzymatischer Hydrolysemechanismus**  
(Sarry und Gunata, 2004)

Der Mechanismus der Hydrolyse kann zwei- oder einstufig verlaufen (vgl. Abbildung 16). In dem zweistufigen Prozess wird bei vorhandenen Disacchariden zunächst ein Zuckerrest durch jeweilige Arabinosidasen, Apiosidasen oder Rhamnosidasen abgespalten. Es verbleiben Monoterpenglucoside, die durch Glucosidasen in Glucose und

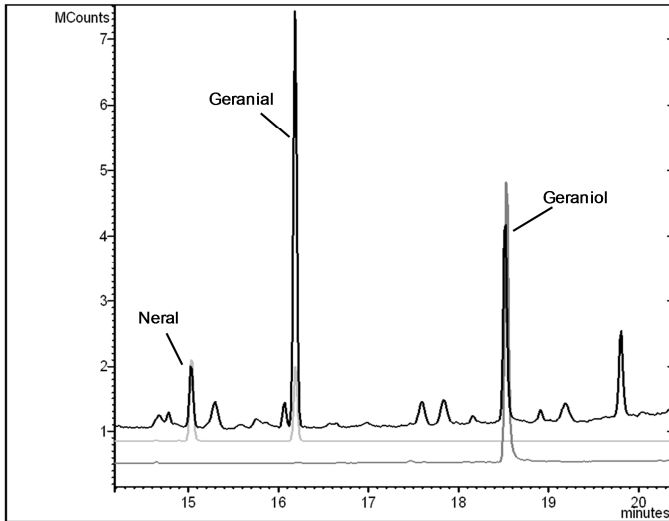
freie Terpene gespalten werden. Der einstufige Prozess verläuft über die Abspaltung des gesamten Zuckerrestes und sofortige Freisetzung des Aglykons (Gunata et al., 1988). Die Spaltung der Glycoside erfolgt bei Einsatz des Enzymes AR 2000 vermutlich über den zweistufigen Hydrolyseprozess, da es ein Enzympräparat ist, das Arabinosidase-, Apiosidase-, Rhamnosidase- sowie Glucosidase-Aktivität aufweist.

**Tabelle 2: Hydrolyseaktivität der Enzympräparate AR 2000 und Glucanex zur Spaltung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside (n=2)**

	AR 2000 [%]		Glucanex [%]	
Enzymmenge [mg]	50	100	50	100
Neryl- $\beta$ -D-glucosid	38,6 $\pm$ 0,6	41,3 $\pm$ 1,6	18,9 $\pm$ 4,5	11,1 $\pm$ 0,7
Geranyl- $\beta$ -D-glucosid	68,0 $\pm$ 6,6	76,8 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,4	13,1 $\pm$ 8,3
Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid	43,4 $\pm$ 0,9	39,9 $\pm$ 2,3	42,5 $\pm$ 0,81	44,6 $\pm$ 1,9
Linalyl- $\beta$ -D-glucosid	19,9 $\pm$ 2,1	-	27,0 $\pm$ 1,7	-

Mit den untersuchten Enzympräparaten konnte keine vollständige Hydrolyse erzielt werden. Für die in Tabelle 2 genannten Hydrolyseausbeuten wurden jeweils 50 mg Enzym und 20 mL Citratpuffer verwendet (vgl. 3.5.2). Die Hydrolyse erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 24 h (vgl. 3.5). Auch nach einer Erhöhung der Enzymmenge auf 100 mg konnte keine Erhöhung der Hydrolyseausbeute erzielt werden. Da mit AR 2000 insgesamt bessere Hydrolyseausbeuten erzielt wurden als mit Glucanex, wurde infolgedessen AR 2000 für die weiteren Hydrolysen gewählt.

Bei der Hydrolyse von Geranyl- $\beta$ -D-glucosid durch das Enzym Glucanex wurde lediglich eine Hydrolyseausbeute von 5 % erzielt. Die Chromatogramme der Hydrolysen von Geranyl- $\beta$ -D-glucosid durch AR 2000 bzw. Glucanex wiesen enorme Unterschiede im Analytspektrum auf. Nach Behandlung mit Glucanex konnten neben Geraniol über den Abgleich mit der NIST-Spektrenbibliothek und über Referenzstandards auch Neral und Geranial nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 17). Glucanex zeigte demnach erhöhte Nebenaktivität (Oxidation, Isomerisierung), die die Bildung von Neral und Geranial bewirkte.



**Abbildung 17: Nebenaktivität nach Spaltung von Geranyl- $\beta$ -D-glucosid mit Glucanex**

GC-MS-Chromatogramm des Geranyl- $\beta$ -D-glucosids nach der enzymatischen Spaltung durch Glucanex (schwarz) sowie die Chromatogramme der Referenzstandards Citral (1:1 Mischung aus Geranial und Neral; hellgrau) sowie Geraniol (dunkelgrau)

Eine Erhöhung der Hydrolysetemperatur von Raumtemperatur auf 40 °C ergab keine Steigerung der Ausbeute.

Die Hydrolyseraten sind stark abhängig vom jeweiligen Substrat des Monoterpen- $\beta$ -D-glucosids. Die eingesetzten Enzympräparate arbeiten somit sehr substratspezifisch, was bereits in der Literatur beschrieben wurde (Kang et al., 2010). Die Untersuchungen zeigten, dass Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside der tertiären Alkohole, wie z.B. Linalyl- $\beta$ -D-glucosid tendenziell

schlechter gespalten werden, als Substrate mit primären Alkoholgruppen. Diese Ergebnisse bestätigten die Daten anderer Arbeitsgruppen (Gunata et al., 1990, 1988).

Geranyl- $\beta$ -D-glucosid wird als Monoterpen- $\beta$ -D-glucosid eines primären Alkohols mit annähernd 70 % am effektivsten gespalten. Obwohl es sich bei Neryl- $\beta$ -D-glucosid um das *cis*-Isomer des Geranyl- $\beta$ -D-glucosid handelt, ist die Hydrolyseeffizienz der verwendeten Enzyme mit 38,6 % deutlich schlechter.

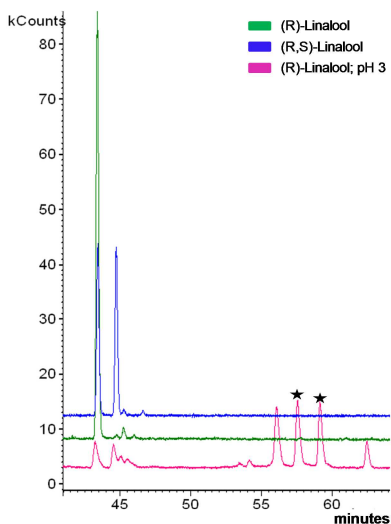
Durch unzureichende enzymatische Hydrolysen können somit die Verhältnisse der einzelnen Substrate zueinander verschoben und weiterhin können falsch negative Analysenergebnisse erhalten werden. Eine korrekte Quantifizierung der Terpenglycoside wird dadurch erschwert.

Die Differenzierung von genuinen Analyten und solchen, die aufgrund von Nebenaktivitäten der eingesetzten Enzyme entstehen, ist schwierig (vgl. Abbildung 17). Weiterhin ist die enzymatische Hydrolyse mit einer Dauer von 24 h und die anschließende Extraktion der freigesetzten Terpene sehr zeitaufwändig.

Eine weitere Möglichkeit der Freisetzung der Terpene aus den glycosidisch gebundenen Verbindungen ist die saure Hydrolyse. Jedoch kann die säurekatalysierte Spaltung bei

verschiedenen Terpenen zu unerwünschten Umlagerungen in andere Verbindungen führen. Andere Arbeiten zeigten, dass eine saure Hydrolyse bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 3,2 und pH 1) zu unterschiedlichen Terpenprofilen der untersuchten Weine und Standards führen kann (Williams et al., 1982).

In einem Experiment wurde (*R*)-Linalool den Bedingungen der säurekatalysierten Hydrolyse ausgesetzt (vgl. 3.5.3.2). Es bestätigten sich die o.g. Aussagen. Aus (*R*)-Linalool bildeten sich durch Umlagerungsreaktionen andere Terpene, wie unter anderem das  $\alpha$ -Terpineol (vgl. Abbildung 18). Weiterhin wurde gezeigt, dass (*R*)-Linalool unter diesen Bedingungen racemisiert.



**Abbildung 18: Umlagerungsreaktionen von (R)-Linalool unter sauren pH-Bedingungen**

Die Abbildung zeigt einen Overlay der GC-MS Chromatogramme (unter Verwendung einer chiralen stationären Phase) von racemischen Linalool (blau), (R)-Linalool (grün) und (R)-Linalool nach einstündiger Behandlung mit Tartrat-Puffer (pH 3, 100 °C) (pink). Die mit den Sternen gekennzeichneten Peaks stellen (R)- und (S)- $\alpha$ -Terpineol dar.

Aufgrund der überwiegenden Nachteile einer sauren gegenüber einer enzymatischen Hydrolyse wurde diese demnach nicht zur Bestimmung der Gesamtglycoside angewendet. Eine Analyse der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside direkt und nicht über die Spaltprodukte ist demnach unabdingbar, um die ursprüngliche



Monoterpenzusammensetzung der einzelnen Rebsorten zu bestimmen.

### **2.1.3 Optimierung der MS/MS-Detektion der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside**

Zu Beginn wurde zunächst überprüft, ob sich für die Analyse von Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden die positive oder negative Ionisierung eignet. Es zeigte sich, dass die negative Ionisierung für Terpenglucoside geeigneter ist, als die positive Ionisierung. Im Scan-Modus wurde im Positivmodus annähernd kein Signal detektiert, dass den Analyten zugeordnet werden konnte, hingegen war im Negativmodus ein deutliches, charakteristisches Signal sichtbar. Im Scan-Modus misst der Massenanalysator einen bestimmten Masse/Ladungs ( $m/z$ )-Bereich, der im Vorfeld von dem Anwender eingestellt wird (hier: 100-600  $m/z$ ; vgl. Tabelle 3). Neben dem  $[M-H]^-$  Ionen waren in diesem Modus noch weitere Vorläufer-Ionen, wie  $[M-H_n+Na_{n-1}]^-$  (Gross, 2012) mit  $n=3$  oder Acetat-Addukte  $[M+CH_3COO]^-$  erkennbar. Alkali-Ionen wie Natrium sind ubiquitär im Wasser, in Glasgeräten etc. verbreitet und treten somit als Addukte auf (Gross, 2012). Die Acetat-Addukte sind wahrscheinlich auf kleinste Verunreinigung aus der Synthese zurückzuführen.

Zur empfindlichen Bestimmung einer Substanz mittels LC-MS/MS musste diese zur Erstellung einer geeigneten MS-

Messmethode auf ihre optimalen Anregungsspannungen eingestellt werden. Dazu wurde die verdünnte Analytlösung (0,05 mg/mL) über eine Spritzenpumpe mit einem geringen Fluss von 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  dem MS zugeführt und die synthetisierten Standards über verschiedene Scan-Modi charakterisiert.

Dazu wurden folgende Experimente durchgeführt (nach (Gross, 2012)):

**Tabelle 3: Verschiedene MS/MS Messmodi**

<b>Modus</b>	<b>Q1</b>	<b>Q2</b>	<b>Q3</b>
Scan-Modus	m/z konstanter Bereich	kein Zerfall	m/z konstanter Bereich
Produkt-Ionen-Scan	m/z selektiert	Fragmentierung	m/z konstanter Bereich
Vorläufer-Ionen-Scan	m/z konstanter Bereich	Fragmentierung	m/z selektiert

Anhand der verschiedenen Messmodi konnten charakteristische Übergänge für die einzelnen Analyten festgelegt werden (vgl. Tabelle 4).

**Tabelle 4: Charakteristische Übergänge und Addukte der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside**

	Quadrupol	m/z	Zuordnung
Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid	Q1	317 361 377	[M-H] <sup>-</sup> [M-H <sub>n</sub> +Na <sub>n-1</sub> ] <sup>-</sup> , n=3 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>
	Q3	317: 161, 101	
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid	Q1	319 363 379	[M-H] <sup>-</sup> [M-H <sub>n</sub> +Na <sub>n-1</sub> ] <sup>-</sup> , n=3 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>
	Q3	319: 161, 101	
Neryl- bzw. Geranyl- $\beta$ -D-glucosid	Q1	315 359 375	[M-H] <sup>-</sup> [M-H <sub>n</sub> +Na <sub>n-1</sub> ] <sup>-</sup> , n=3 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>
	Q3	315: 113, 119	
Linalyl- $\beta$ -D-glucosid	Q1	315	[M-H] <sup>-</sup>
	Q3	315: 161, 113	

Vorläufer-Ionen und charakteristische Produkt-Ionen der synthetisierten Standards zur Entwicklung der LC-MS/MS Methode ohne Zusatz von Ammoniak zum Eluenten. Linalyl- $\beta$ -D-glucosid wurde nachträglich synthetisiert und an die bis dahin etablierte Methode sofort unter Optimalbedingungen angepasst, weshalb hier keine Bildung der Addukte aufgeführt ist. **Q1**: Quadrupol 1; **Q3**: Quadrupol 3

Der Zusatz eines Modifiers (hier: Ammoniak, 0,2 %) ergab eine deutliche Erhöhung der Signale (vgl. Tabelle 5). Die in

Tabelle 4 aufgeführten Vorläufer-Ionen  $[M-H_n+Na_{n-1}]^-$  und  $[M+CH_3COO]^-$  waren nach Zusatz von Ammoniak signifikant kleiner als das Vorläufer-Ion  $[M-H]^-$  und somit wurde die Methode nur für dieses Vorläufer-Ion optimiert. Bereits frühere Arbeiten bestätigten den Vorteil der Verwendung von Ammoniak als Hilfe zur Ionisierung der Analyten (Salles et al., 1990).

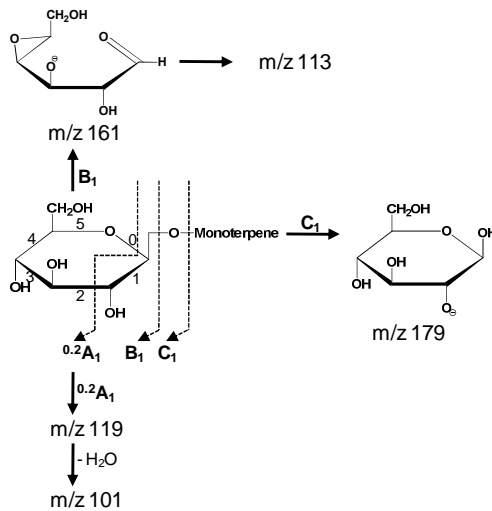
**Tabelle 5: Effekt von Ammoniak auf die Ionisierung der Terpen- $\beta$ -D-glucoside**

$[M-H]^-$	Geranyl- $\beta$ -D-glucosid m/z= 315	Neryl- $\beta$ -D-glucosid m/z= 315	Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid m/z= 317
+ NH <sub>3</sub>	2603400	874020	3889500
- NH <sub>3</sub>	103580	80920	629920

Gemessene Intensitäten verdünnter Standardlösungen (0,01 %) mit (+) und ohne (-) Zusatz von Ammoniak über die Spritzenpumpe im automatisierten Tuning-Modus. Intensitäten sind in cps angegeben; n=1

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden MS/MS-Experimente der  $[M-H]^-$  -Vorläufer- Ionen durchgeführt (Produkt-Ionen-Scan). Bei dem Produkt-Ionen-Scan misst der erste Massenanalysator (Quadrupol 1) lediglich das m/z Verhältnis der Vorläufer-Ionen, wie z.B. m/z= 317 für Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid, auch bezeichnet als SIM-Modus (SIM, engl. Selected

Ion Monitoring). Im zweiten Massenanalysator findet die Fragmentierung statt, der dritte Massenanalysator (Quadrupol 3) hingegen misst einen vorher definierten größeren Messbereich im sogenannten Scan-Modus. Hierbei zeigte sich, dass die Monoterpen-Glucoside ausschließlich Produkt-Ionen bilden, die aus dem Glucoserest generiert werden. Ein Abgleich mit den in der Literatur verfügbaren Informationen zur Fragmentierung von Terpenglucosiden und Glycosiden bestätigte dieses (Domon und Costello, 1988; Salles et al., 1991a). Produkt-Ionen, die aus den jeweiligen Aglykonen generiert werden, wurden nicht gefunden. Weiterhin zeigte isotopenmarkiertes 1,1-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Citronellyl-β-D-glucosid die gleichen Produkt-Ionen wie das unmarkierte Glucosid. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die Ionen aus dem unmarkierten Glucose-Rest entstehen und nicht aus dem markierten Rest des Aglykons.



### Abbildung 19: Fragmentierung der Monoterpen-β-D-glucoside mittels negativer ESI-MS/MS

Die Fragmentierung erfolgt jeweils ausgehend von  $[M-H]^-$ . Hierbei ist die OH-Gruppe, die ein Proton abspaltet nicht zugeordnet. Die tiefgestellten Zahlen der Buchstaben A, B und C stellen die Anzahl der glycosidischen Bindungen dar, die gespalten wurden (hier: 1). Die hochgestellten Zahlen am Buchstaben A kennzeichnen die weiteren Bindungsspaltungen, die zur Generierung der jeweiligen Produkt-Ionen ablaufen (Cole et al., 1989; Domon und Costello, 1988).

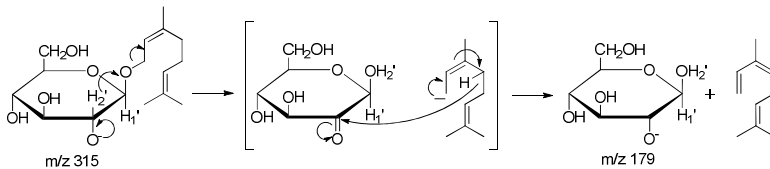
Alle untersuchten Monoterpen-β-D-glucoside zeigten ausgehend von den  $[M-H]^-$  Vorläufer-Ionen die gleichen Produkt-Ionen  $m/z = 161, 101, 179$  sowie  $113$ . Die Intensitäten der einzelnen Produkt-Ionen war jedoch abhängig vom jeweiligen Vorläufer-Ion. Während beim Linalyl- und Citronellyl-β-D-glucosid die Produkt-Ionen mit  $m/z = 161$  und  $113$  bzw.  $101$  mit höchster Intensität generiert wurden, so

fragmentierten Neryl- und Geranyl- $\beta$ -D-glucosid bevorzugt in die Produkt-Ionen  $m/z$  113 und 119. Das Produkt-Ion 179 wurde von allen Verbindungen mit der niedrigsten Intensität generiert. Es wurde demnach in der Analysenmethode nicht weiter berücksichtigt. Die unterschiedlichen Bildungen der Produkt-Ionen deuteten darauf hin, dass die Struktur des Aglykons eine Rolle bei der Fragmentierung zu spielen scheint.

Das Produkt-Ion  $m/z$  161  $[\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_5]^-$  entsteht durch eine B-Spaltung und anschließenden Protonen-Transfer (s. Abbildung 19). Durch die Erhöhung des CAD-Gas-Drucks (CAD; engl. „collisionally activated dissociation“, stoßaktivierte Dissoziation) wurde eine starke „In-Source“ Fragmentierung generiert. Hierbei fragmentierte das Vorläufer-Ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  bereits stark in seine Produkt-Ionen in der Ionenquelle. Ein Produkt-Ionen-Scan mit  $m/z$  161 als Vorläufer-Ion erbrachte  $m/z$  113 als Produkt-Ion,  $m/z$  113 wird somit aus  $m/z$  161 generiert. Hierbei geht ein Molekül der Summenformel  $\text{CH}_4\text{O}_2$  als Neutralteilchen verloren. Literaturquellen bestätigten dieses Ergebnis. (Cole et al., 1989). Einen Strukturvorschlag für  $m/z$  113 gibt es hierzu allerdings nicht.

Die Fragmentierung zum  $m/z$  179  $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6]^-$  verläuft über ein ketonisches Intermediat ab, bei dem ein Hydrid-Transfer vom Aglykon auf den glucosidischen Rest stattfindet (vgl. Abbildung 20) (Salles et al., 1991a). Das Aglykon wird als

neutrales Fragment abgespalten. Dieses wurde in früheren Arbeiten postuliert, indem MS/MS-Experimente mit stabilisotopenmarkierten und nicht markierten Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden durchgeführt wurden. Die entsprechende Markierung wurde dabei lediglich im Aglykon und nicht im Glucose-Rest nachgewiesen. In diesen Experimenten konnte keine Erhöhung der Masse im Produkt-Ion mittels MS-Detektion nachgewiesen werden. Das bestätigte die Vermutung, dass das Fragment-Ion aus dem Zucker-Rest generiert wird (Salles et al., 1991a).



**Abbildung 20: Fragmentierungsmechanismus zur Generierung des Fragmentes  $m/z$  179 am Beispiel des Neryl- $\beta$ -D-glucosids**

Analog hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit auch keine Massenerhöhung der Fragment-Ionen des 1,1- $^{2}\text{H}_2$ -Citronellyl- $\beta$ -D-glucosids im Vergleich zum Citronellyl- $\beta$ -D-glucosids nachgewiesen.

Das Produkt-Ion  $m/z$  119 entsteht durch weitere Fragmentierungen und Protonenaustausch aus dem Vorläufer-Ion  $m/z$  179. Es handelt sich hierbei um einen Neutralverlust von  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$ . Auch hier liegt kein Strukturvorschlag vor.



Bei dem Produkt-Ion  $m/z$  101 handelt es sich zwar um ein Fragment des Glucoserestes, der exakte Bildungsweg ist jedoch unklar. Es könnte hierbei aus Wasserabspaltung des  $m/z$  119 Ions gebildet werden oder aus dem  $m/z$  161 Ion generiert werden (Prome et al., 1987).

Aus den Tuning-Daten wurden für jeden Analyten zwei charakteristische Übergänge von Vorläufer- auf Produkt-Ion festgelegt und in einer Methode zusammengefasst. Diese Übergänge werden als MRM-Übergänge bezeichnet. (MRM; engl. „Multiple Reaction Monitoring“). Hierbei messen beide Massenspektrometer (Q1 und Q3) im SIM-Modus. Es werden nur die speziellen Massenübergänge gemessen (vgl. Tabelle 6; 3.10.4).

**Tabelle 6: Charakteristische MRM-Übergänge der Terpenglycoside (negative ESI-MS/MS)**

<b>Analyt</b>	<b>Übergang [m/z]</b>
Linalyl- $\beta$ -D-glucosid	315→161
	315→113
Neryl- $\beta$ -D-glucosid	315→119
	315→113
Geranyl- $\beta$ -D-glucosid	315→119
	315→113
Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid	317→101
	317→161
Octyl- $\beta$ -D-glucosid	291→101
	319→101
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid	319→101
	319→161
8-Hydroxylinalyl- $\beta$ -D-glucosid	331→119
	331→179
Terpenapiosyl-, Terpenarabinosyl-glycoside (s. Abschnitt 2.2.1.2)	447→315
	447→131
	447→149
	449→317
	449→131
	449→149
Terpenrutionoside (s. Abschnitt 2.2.1.2)	461→315
	463→317

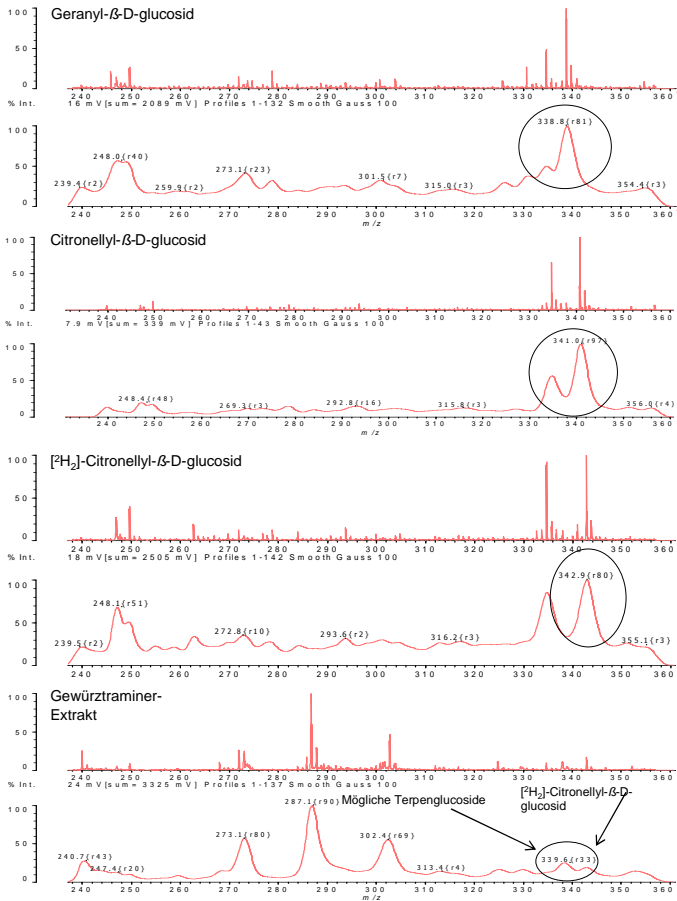
#### 2.1.4 MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS beschreibt die Methode der Matrix-unterstützten Laserdesorption/ Ionisation gekoppelt an einen *time of flight* Massenanalysator. Hierbei werden Analytmoleküle in eine Matrix (meist kristalline Festkörper mit niedrigem Dampfdruck) eingebettet und einige Mikroliter der Matrix/Analytmischung auf einer Metallplatte platziert und eingedampft (Gross, 2012).

Zur weiteren Standard-Charakterisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit Citronellyl- und [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Citronellyl- sowie Geranyl-β-D-glucosid vermessen. Zur Untersuchung, ob sich eine solche Methode neben der LC-MS/MS auch zur Analyse der Terpenglucoside in *Vitis vinifera* eignet, wurde ein Gewürztraminer-Beerenhautextrakt gemäß 3.4 aufgearbeitet. Die weitere Probenaufarbeitung und das Ansetzen der Matrixmischung erfolgte nach 3.7.

Bei der Analyse mittels MALDI-TOF-MS wurde positiv ionisiert, da die Matrix im negativen Modus Störsignale aufwies, die im Massenbereich der Analyten lagen.

Es bildeten sich hier ausschließlich Natriumaddukte  $[M+Na]^+$ , die auch schon mittels ESI-MS/MS ohne Ammoniakzusatz nachgewiesen werden konnten (vgl. Abbildung 21).



**Abbildung 21: MALDI-TOF-MS Chromatogramm verschiedener Standards sowie eines Gewürztraminer-Extraktes**

Die Ionisierung erfolgte im Positivmodus. Die eingekreiste Massenspur entspricht einem Natriumaddukt des jeweiligen Monoterpen-β-D-glucosids;  $[M+Na]^+$

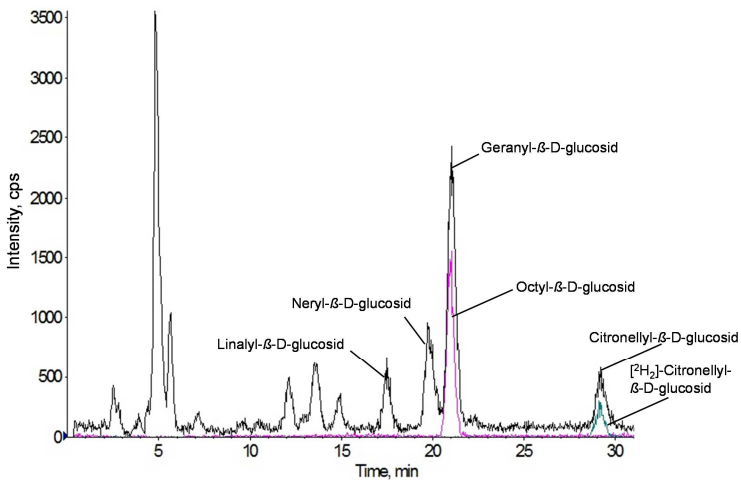
Vorarbeiten einer anderen Forschergruppe zeigten ebenfalls die Detektion von Monoterpen-β-D-glucosiden mittels MALDI-64

TOF-MS (Nasi et al., 2008). Im Gegensatz hierzu wurden von dieser Forschergruppe lediglich m/z-Werte nachgewiesen, die  $[M+H]^+$  entsprechen, Natrium-Addukte  $[M+Na]^+$  wurden nicht detektiert. Zur Detektion wurden lediglich *Vitis vinifera*-Extrakte verwendet, Referenzstandards lagen dieser Forschergruppe nicht vor. Da nach Abgleich mit Referenzstandards ausschließlich Addukte mit Natrium detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass die Forschergruppe wahrscheinlich keine Terpen- $\beta$ -D-glucoside detektiert hat.

Im Gewürztraminer-Extrakt zeigten sich geringe Spuren möglicher Terpenglucoside, was in Folgeversuchen durch Erhöhung der Extraktmenge weiter untersucht werden müsste. Die MALDI-TOF-MS Technik eignete sich als zusätzliche Methode zur Charakterisierung der Standards und lieferte vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die Terpenglucosidanalyse in Extrakten von *Vitis vinifera*. Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS-Technik können Standards und Extrakte ohne vorangeschaltete Auftrennung detektiert werden. Nachteilig ist hierbei jedoch, dass sich die einzelnen Analyten, wie z.B. Linalyl-, Neryl- und Geranyl- $\beta$ -D-glucosid, zwar strukturell unterscheiden, nicht jedoch anhand ihrer Molekularmassen. Eine Unterscheidung dieser Analyten ist so in einem Weinbeerenextrakt nicht möglich. Hierbei können lediglich Aussagen über die Gehalte an Gesamtglucosiden gemacht werden.

## 2.2 Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur Bestimmung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside in *Vitis vinifera*

Zur weiteren Methodenentwicklung wurde neben der Wahl geeigneter MS-Bedingungen, die Entwicklung einer HPLC-Methode vorgenommen. Hierbei wiesen mehrere stationäre Phasen gute Trenneigenschaften für Terpenglucoside auf. Zunächst wurde die Analyse der Extrakte isokratisch auf einer Synergi 4u Polar-RP Phase (4  $\mu$ m, 250x3 mm; Phenomenex; Elution H<sub>2</sub>O/Acetonitril; 75/25; v:v) durchgeführt (vgl. Abbildung 22).



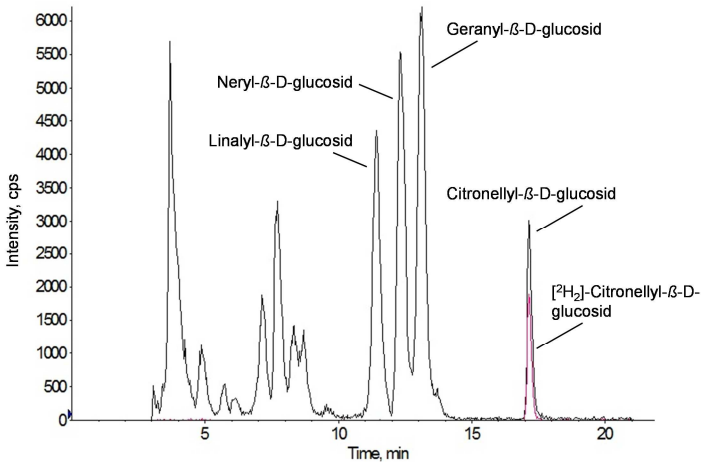
**Abbildung 22: LC-MS/MS Chromatogramm eines Gelben Muskateller Beerenhautextraktes**

Totalionenchromatogramm (TIC) der charakteristischen MRM-Übergänge der Terpenglucoside mit isokratischer Elution (H<sub>2</sub>O/ACN; 75/25; v:v) auf einer Synergi 4  $\mu$ m 66

Polar-RP-Phase, 250x3 mm (Phenomenex).  
Beerenhautextrakt, 2010, pink: extrahierter MRM-  
Übergang des Octyl- $\beta$ -D-glucosids; grün: extrahierter  
MRM-Übergang des [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosids.

Die Auftrennung der einzelnen Analyten war mit der Wahl der o.g. Bedingungen ausreichend. Linalyl-, Neryl-, Geranyl- und Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid konnten so aufgetrennt werden, dass sie einzeln quantifiziert werden konnten (vgl. Abbildung 22). Auch war die Methodendauer mit insgesamt 30 Minuten bei einer isokratischen Trennung für eine HPLC-Methode zufriedenstellend.

Da jedoch zur Unterstützung der Ionisierung der mobilen Phase 0,2 % Ammoniak zugesetzt wurde, erwies sich die Synergi-Polar RP Phase als ungeeignet, da sie lediglich bis zu einem pH-Wert von 7 stabil ist. Ein analoges Elutionsverhalten, jedoch pH-Stabilität bis zu einem Wert von 12, zeigte die RP-Phase Gemini-NX C18 (4  $\mu\text{m}$ , 250 x 3 mm, Phenomenex). Es wurde zudem ein Gradientenprogramm auf Acetonitril/Wasser-Basis zur Verkürzung der Analysendauer entwickelt (s. hierzu 3.10.4, Abbildung 23). Die Zeitersparnis betrug in etwa zehn Minuten.



**Abbildung 23: LC-MS/MS Chromatogramm eines Gelben Muskateller Beerenhautextraktes mit optimierter HPLC-Methode**  
 Totalionenchromatogramm (TIC) der charakteristischen MRM-Übergänge mit Gradientenelution auf einer Gemini-NX C18-Phase, 250x3 mm (Phenomenex) mit 0,2 % Ammoniakzugabe. Beerenhautextrakt, 2011, 15 Wochen nach Blüte; pink: extrahierter MRM-Übergang des [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Citronellyl-β-D-glucosids.

Nach Entwicklung einer optimalen HPLC-Methode wurden die MS-Bedingungen an den HPLC-Fluss und die Fließmittelzusammensetzung adaptiert. Dies war nötig, um die größtmögliche Intensität der Vorläufer- und Produkt-Ionen zu erzielen. Flussabhängige Parameter sind unter anderem das CAD-Gas, die Vernebelungsgase sowie die Temperatur des Vernebelungsflöns.



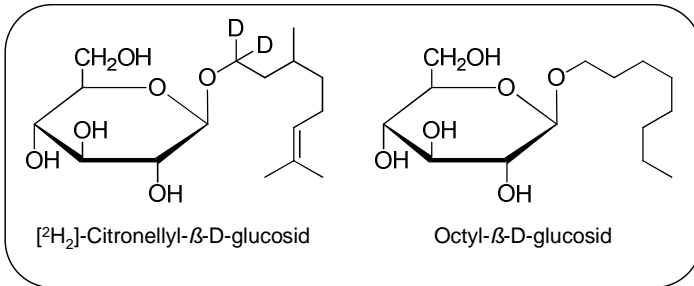
Zur Einstellung dieser Parameter wurde eine Analytlösung, die einen Terpenglucosidstandard enthielt, ohne vorangeschaltete HPLC-Säule mehrmals in kurzen Zeitabständen injiziert. Es wurde die Flussrate der optimierten HPLC-Methode gewählt (0,4 mL/min). Die Zusammensetzung der mobilen Phase entsprach den Anfangsbedingungen des Gradientenprogrammes. Die einzelnen Parameter wurden so verändert, dass die größtmögliche Intensität erzielt wurde. Die festgelegten Parameter sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tabelle 7: Adaption der Parameter an den HPLC-Fluss der LC-MS/MS Methode**

<b>Parameter</b>	<b>Gewählte Einstellung</b>
Curtain Gas (CUR)	20
Collision Gas (CAD)	1
Temperature (TEM)	450
Ion Source Gas 1 (GS1)	50
Ion Source Gas 2 (GS2)	50
Ion Spray Voltage (IS)	-4200

Hierbei zeigte sich, dass vor allem die Variation des Collision Gas (CAD) einen starken Einfluss auf die Intensität der Fragmente hatte. Niedrig-Energie CAD-Gas-Einstellungen (s. Tabelle 7) wiesen deutlich höhere Intensitäten auf, als im Vergleich zu den Intensitäten mit höheren CAD-Gas-

Einstellungen. Die Literaturrecherche bestätigte dieses Ergebnis (Cole et al., 1989).



**Abbildung 24: Strukturen der eingesetzten internen Standards für die LC-MS/MS Bestimmung**

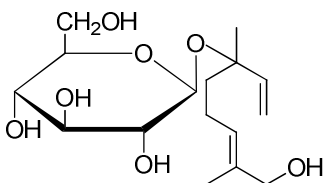
Als Interner Standard wurde [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid eingesetzt. Anfänglich wurden die Analyten Linalyl-, Neryl- und Geranyl- $\beta$ -D-glucosid über Octyl- $\beta$ -D-glucosid als interner Standard ausgewertet (vgl. Abbildung 24). Da jedoch [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid als interner Standard den zu bestimmenden Analyten strukturell ähnlicher ist, wurden auch die anderen Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside über den stabilisotopenmarkierten Standard ausgewertet. Octyl- $\beta$ -D-glucosid kann weiterhin auch als Minor Komponente in *Vitis vinifera* vorkommen und dadurch zu fehlerhaften Berechnungen führen (Ugliano und Moio, 2008). Das Octyl- $\beta$ -D-glucosid wurde somit als Interner Standard nicht weiter verwendet.

In Abbildung 22 und Abbildung 23 sind nicht alle Signale entsprechenden Analyten zugeordnet. Sie entsprachen zwar den in der Methode eingestellten MRM-Übergängen, konnten bislang jedoch keinen bestimmten Verbindungen zugeordnet werden. In 2.2.1 werden Vorschläge möglicher Terpenglycoside diskutiert.

## 2.2.1 Weitere vorläufig identifizierte Terpenglycoside in *Vitis vinifera*

### 2.2.1.1 Monoterpendiolglucoside

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem die Monoterpendiole 8-Hydroxylinalool sowie die Diendiole I und II synthetisiert. Desweiteren wurde versucht 8-Hydroxylinalyl-Glucosid durch Anwendung der Koenigs-Knorr-Reaktion zu synthetisieren (vgl. 3.3.4.6, Abbildung 25).

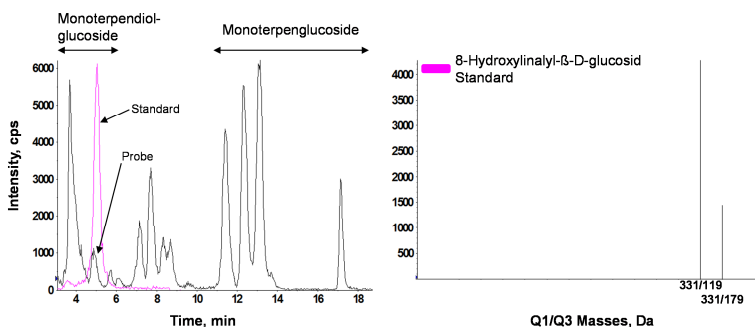


**Abbildung 25: Struktur des 8-Hydroxylinalyl- $\beta$ -D-glucosids**

Aufgrund zu geringer Syntheseausbeute des 8-Hydroxylinalyl- $\beta$ -D-glucosids konnte eine NMR-Messung nicht durchgeführt werden. Die LC-MS/MS-Daten stimmen jedoch mit der

Struktur in Abbildung 25 gut überein. Es ist aufgrund der Wahl des Katalysators Quecksilbercyanid bei der Koenigs-Knorr-Reaktion davon auszugehen, dass die tertiäre Alkoholgruppe, nicht die primäre, glucosidisch gebunden vorliegt.

Der Standard wurde mittels LC-MS/MS injiziert und die charakteristischen Übergänge in die Analysenmethode aufgenommen. Abbildung 26 zeigt zwei übereinander gelegte Chromatogramme des synthetisierten 8-Hydroxylinallylglucosid-Standards und eines Beerenhautextraktes des Gelben Muskatellers (2011, 15 Wochen nach der Vollblüte). Die Massenspuren der übereinander gelagerten Peaks stimmen überein und die entsprechenden Massenübergänge sind in Abbildung 26, rechts, dargestellt. Der Übergang 331→119 bzw. 331→179 entspricht hierbei den bereits erläuterten Fragmentierungsmustern der Monoterpenalkoholglucoside (s. Abbildung 19). Analog zu den Terpenglucosiden wird auch hier das Aglykon als Neutralteilchen abgespalten.



### Abbildung 26: Mögliche Terpendiolglycoside in einem Muskatellerextrakt

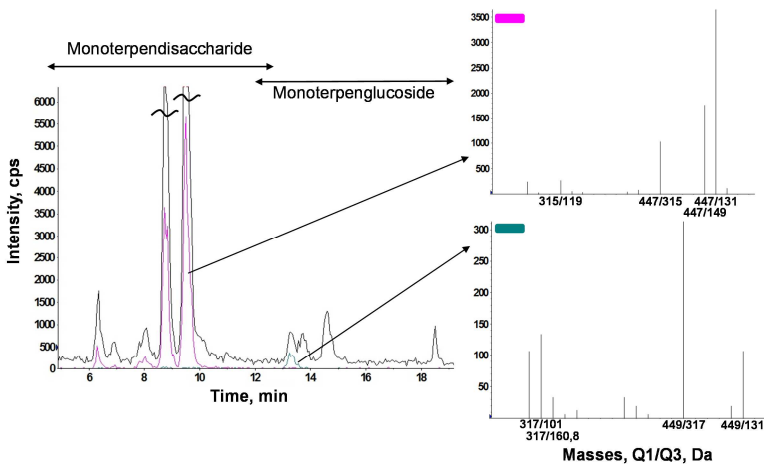
Overlay von zwei LC-MS/MS Chromatogrammen eines Muskatellerhaut-Extraktes (schwarz, 2011, 15 Wochen nach der Blüte, TIC) und eines synthetisierten 8-Hydroxylinalylglucosid-Standards (pink). Das MS/MS-Spektrum (rechts) zeigt die charakteristischen MRM-Übergänge des synthetisierten Standards. Hierbei sind die Intensitäten der Produkt-Ionen angegeben.

Diese Übergänge wurden weiterhin in mehreren Rebsorten und Geweben nachgewiesen. Der in Abbildung 26 früher eluierende Peak bei einer Retentionszeit von ca. 4 min zeigte ebenfalls die charakteristischen Übergänge der Terpendiolglucoside. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Strukturisomere des 8-Hydroxylinalylglucosids, z.B. die Diendiole I und II. Die Signale mit Retentionszeiten in dem Bereich von 6-10 min entsprachen den charakteristischen Übergängen der Monoterpen-β-D-glucoside.

### 2.2.1.2 Terpenrutinoside und Terpenapiosylglycoside

Wie bereits in 1.2 erwähnt, kommen neben den Monoterpenglucosiden auch vermehrt O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucoside (Rutinoside) sowie die 6-O- $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucoside (Arabinosylglycoside) und 6-O- $\beta$ -D-Apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucoside (Apiosylglycoside) in Weinbeeren vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Disaccharide nicht synthetisiert. Bislang wurden in der Literatur nur wenige Vorarbeiten zur Synthese und Analytik dieser Verbindungen beschrieben (Salles et al., 1990, 1991b).

Basierend auf diesen Arbeiten wurden mögliche MRM-Übergänge mit den entsprechenden Tuning-Daten der Terpenglucoside in die Methode eingepflegt und diverse Gewebeextrakte verschiedener Rebsorten untersucht.

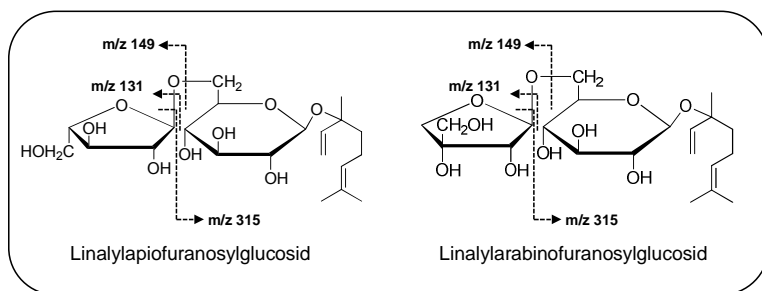


**Abbildung 27: LC-MS/MS Chromatogramm eines Gewürztraminer-Extraktes mit Markierung möglicher Terpenapiosyl- und Terpenarabinosylglycoside**

TIC (schwarz) der charakteristischen MRM-Übergänge eines Gewürztraminer Extraktes (Beerenhäute, 2011, 17 Wochen nach Blüte). Die in pink und grün markierten MRM-Übergänge stellen mögliche Apiosyl- und Arabinosylglycoside dar. Bei den pinkfarbenen Peaks handelt es sich möglicherweise um Terpendisaccharide, die an Terpene der Masse  $M=154$  g/mol gebunden sind (z.B. Linalool). Hingegen kann es sich bei dem grün markierten Peak um ein gebundenes Terpen mit  $M=156$  g/mol handeln (z.B. Citronellol). Mögliche Monoterpendiolglucoside sind hier nicht gezeigt. Sie würden früher eluieren.

Abbildung 27 zeigt mögliche Terpenapiosyl- und Terpenarabinosylglycoside mit gebundenen Terpenen der Masse  $M=154$  g/mol (pink) bzw.  $M=156$  g/mol (grün). Es wurden verschiedene Rebsorten und Gewebe aus *Vitis vinifera* auf die Massenübergänge möglicher

Terpendisaccharide untersucht. In fast allen Proben konnten diese Analyten mit großer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. Die Apiosyl- und Arabinosylglycoside mit einem Terpenrest der Masse  $M = 156$  g/mol coeluierten bei den so gewählten Bedingungen mit dem Linalylglucosid. Sie sind aber über ihre charakteristischen Massenübergänge voneinander unterscheidbar. Eine optimalere Trennung wäre in diesem Fall jedoch anstrebsam.



**Abbildung 28: Mögliches Fragmentierungsmuster am Beispiel des Linalylapiofuranosylglucosids und Linalylarabinofuranosylglucosids;  $[M-H]^- = 447$**

Der Massenübergang von  $447 \rightarrow 315$  spricht für eine Abspaltung des Pentoserestes als Neutralteilchen;  $[M-H-Pentose]^-$  (vgl. Abbildung 28). Weiterhin sind aufgrund von Ionenquellenfragmentierungen die typischen Übergänge der Terpenglucoside erkennbar (vgl. Abbildung 27; z.B.  $315 \rightarrow 119$ ). Der Übergang etwa von  $447 \rightarrow 131$  weist stark darauf hin, dass es sich bei der Massenspur  $m/z = 131$  um ein Fragment einer



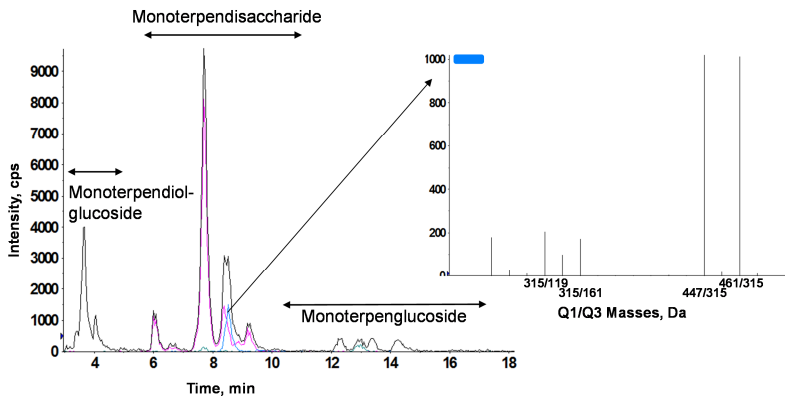
Pentose handelt (Marinos et al., 1994). In diesem Fall geht der Pentoserest nicht als Neutralteilchen verloren, sondern wird als Fragment detektiert. Auch bei dem Übergang 447→149 ist der Literatur zu entnehmen, dass es sich hierbei ebenfalls um ein Fragment des Pentoserestes handelt. Unter den in der Methode gewählten Einstellungen wird die Fragmentierung 447→131 bevorzugt. Der Übergang 447→315 konnte hingegen nur mit geringer Intensität nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu wird bei den Apiosyl- und Arabinosylglycosiden mit Aglykone der Molekülmasse  $M = 156 \text{ g/mol}$  der Übergang 449→317 bevorzugt gebildet, die Übergänge 449→149 sowie 449→131 werden unter den gegebenen Bedingungen mit geringerer Intensität generiert.

Der Literatur ist zu entnehmen, dass die Terpendisaccharide auf RP-HPLC-Säulen früher als die Terpenglucosiden eluieren (Salles et al., 1991b). Das Elutionsverhalten der Analyten in den verschiedenen Extrakten stimmte mit diesen Erkenntnissen überein. Fragmentierungs- sowie Elutionsverhalten lassen somit mit hoher Wahrscheinlichkeit auf mögliche Terpendisaccharide schließen. In Folgearbeiten müssten diese Verbindungen durch Referenzstandards eindeutig identifiziert werden.

Ohne die eindeutige Zuordnung über Referenzstandards ist zudem eine Unterscheidung zwischen 6-O- $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucosiden und 6-O- $\beta$ -D-Apiofuranosyl-

$\beta$ -D-glucosiden aufgrund gleicher Molekularmassen nicht möglich.

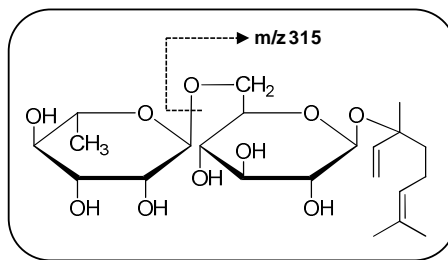
Die Elutionsreihenfolge der verschiedenen Terpendisaccharide müsste sich jedoch analog zu den Terpenglucosiden verhalten. Linalylglucosid eluiert früher als Citronellylglucosid, analog dazu müsste sich auch ein Linalyl-Disaccharid gegenüber einem Citronellyl-Disaccharid verhalten (Salles et al., 1990).



**Abbildung 29: LC-MS/MS Chromatogramm eines Muskatellerextraktes mit Markierung möglicher Terpenapiosyl-, Terpenarabinosylglycoside und -rutoside.**

TIC (schwarz) der charakteristischen MRM-Übergänge eines Muskatellerextraktes (Beerenhäute, 2011, 15 Wochen nach Blüte). Die pink und grün markierten Peaks entsprechen denselben MRM-Übergängen aus Abbildung 27. Der blau markierte Peak stellt ein mögliches Rutinosid dar, welches aufgrund der Molekularmasse höchstwahrscheinlich an ein Terpen mit  $M = 154 \text{ g/mol}$  (z.B. Geraniol) gebunden ist.

Abbildung 29 zeigt in blau markiert mögliche Terpenrutinoside, welche jedoch nicht in allen Rebsorten nachgewiesen wurden (nicht nachweisbar in Gewürztraminer, jedoch nachweisbar in Muskateller und Riesling). Die pink und grün markierten Peaks entsprechen den o.g. Terpenapiosyl- und den Terpenarabinosylglycosiden.



**Abbildung 30: Mögliches Fragmentierungsmuster am Beispiel des Linalylrutinosids;  $[M-H]^- = 461$**

Bei den Rutinosiden geht im Zuge der Fragmentierung der Rhamnoseresst als Neutralteilchen verloren, das verbleibende Terpenglucosid wurde als Fragment detektiert (MRM-Übergang von  $461 \rightarrow 315$ ). Somit würde auch hier der Zuckerrest an ein Terpen der Molekülmasse  $M = 154$  g/mol gebunden sein. Der Übergang  $463 \rightarrow 317$  war nicht nachweisbar. Die Übergänge von 461 auf die jeweiligen Fragmente des Rhamnose-Restes, also einer Hexose ( $461 \rightarrow 161$ ,  $\rightarrow 119$ ,  $\rightarrow 113$  oder  $\rightarrow 101$ ), wurden nicht überprüft.

Das in Abbildung 23 abgebildete Chromatogramm zeigt bei der Retentionszeit von 5-10 min bislang nicht zugeordnete Signale. Die Retentionszeiten dieser Signale stimmen mit denen der Terpendisaccharide überein. Diese würden in diesem Fall durch eine auftretende Ionenquellenfragmentierung zunächst als gängige Massenübergänge der Terpenglucoside erscheinen.

## 2.2.2 Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Linearität sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde mit wässrigen Standardlösungen bestimmt. Die dabei ermittelten Daten können der Tabelle 8 entnommen werden.

**Tabelle 8: Kalibrierungsdaten der entwickelten LC-MS/MS Methode**

Analyt	R <sup>2</sup>	Geradengleichung	Konz. Bereich [µg/mL]	NWG [µg/mL]	BG [µg/mL]
LinGlc	0,9958	y=0,22x+0,0586	0,8 - 80	0,8	1,2
NerGlc	0,9995	y=0,2423x+0,0263	5,0 - 210	0,8	1,2
GerGlc	0,9846	y=0,24223x+0,0263	3,4 - 230	0,8	1,2
CitrGlc	0,9988	y=1,0874x+0,0104	5,0- 190	1,9	2,5

LinGlc: Linalylglucosid, NerGlc: Nerylglucosid, GerGlc: Geranylglucosid, CitrGlc: Citronellylglucosid, NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze, Konz.Bereich: Konzentrationsbereich, R<sup>2</sup>= Korrelationskoeffizient

Die Daten wurden durch eine lineare Regression mit fünf Messpunkten ermittelt. Als Interner Standard wurde [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Citronellyl-β-D-glucosid verwendet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden durch Berechnung des Signal/Rauschverhältnisses (S/N, *engl.* signal to noise) festgelegt. Für die Nachweisgrenze wurde ein S/N von 5, für die Bestimmungsgrenze von 10 als Mindestwert gesetzt (ICH Expert Working Group, 1994).

Die Nachweisgrenzen von Linalyl-, Neryl- und Geranyl-β-D-glucosid liegen bei 0,8 µg/mL. Ab einer Konzentration von 1,2 µg/mL sind diese Substanzen in wässrigen Lösungen bestimmbar. Die Nachweisgrenze von Citronellyl-β-D-glucosid liegt bei 1,9 µg/mL, die Bestimmungsgrenze bei 2,5 µg/mL (vgl. Tabelle 8).

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Analyse von Beerenhäuten wurden berechnet. Diese Berechnung erfolgt aus den Ergebnissen der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in wässrigen Lösungen (vgl. Tabelle 9).

Auf eine „matrix-matched calibration“ wurde aufgrund der Verwendung eines stabilisotopenmarkierten Internen Standards verzichtet.

**Tabelle 9: Abschätzung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Terpen- $\beta$ -D-glucoside in Beerenhäuten**

Analyt	wässrige Lösungen [ $\mu\text{g/mL}$ ]		Beerenhautextrakte [ $\mu\text{g/kg}$ ]	
	NWG	BG	NWG	BG
LinGlc	0,8	1,2	80	120
NerGlc	0,8	1,2	80	120
GerGlc	0,8	1,2	80	120
CitrGlc	1,9	2,5	190	250

LinGlc: Linalylglucosid, NerGlc: Nerylglucosid, GerGlc: Geranylglucosid, CitrGlc: Citronellylglucosid, NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze

### **2.2.3 Wiederfindung der freien Terpene und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden nach der Festphasenextraktion**

Es sind bislang zahlreiche Aufarbeitungen für die Analyse von Monoterpenen und deren glycosidisch gebundenen Analoga bekannt. Eine verbreitete Methode ist die Aufreinigung durch die Festphasenextraktion (SPE).

Zur Überprüfung auf Eignung des eingesetzten Säulenmaterials wurden die Wiederfindungsraten

ausgewählter wässriger Standardlösungen nach Festphasenextraktion bestimmt. Die ermittelten Wiederfindungsraten bestätigten die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse. Die so durchgeführte Festphasenextraktion eignet sich sehr gut zur Aufarbeitung der Proben (vgl. Tabelle 10) (Piñeiro et al., 2004). Es wurden Wiederfindungsraten von mindestens 89 % für die freien Terpene und mindestens 91 % für die Terpenglucoside bestimmt. Zur Überprüfung, ob eine Elutionsmenge von jeweils 2 mL Lösungsmittel ausreicht, um die Analyten vollständig von der Festphase zu eluieren, wurde die Elution mit 2 x 2 mL des jeweiligen Lösungsmittels durchgeführt. Es konnten keine Analyten in der zweiten Fraktion nachgewiesen werden; die Elution ist somit vollständig.

**Tabelle 10: Wiederfindungsraten wässriger Monoterpen- und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosid-Standardlösungen nach der Festphasenextraktion**

<b>Analyt</b>	<b>Wiederfindungsrate [%]</b>
Linalool	104 $\pm$ 4
Citronellol	107 $\pm$ 1,5
Geraniol	89 $\pm$ 8
Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid	98,3 $\pm$ 2,7
Neryl- $\beta$ -D-glucosid	97,4 $\pm$ 4,8
Geranyl- $\beta$ -D-glucosid	90,9 $\pm$ 2,6

n=2 für Monoterpenalkohole; n=3 für Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside



Probeansätze mit Strata C-18 Kartuschen (Phenomenex, Aschaffenburg) zeigten starkes Untergrundrauschen bei den GC-MS Wiederfindungsexperimenten der freien Terpene und wurden daher nicht weiter als Säulenmaterial in Betracht gezogen.

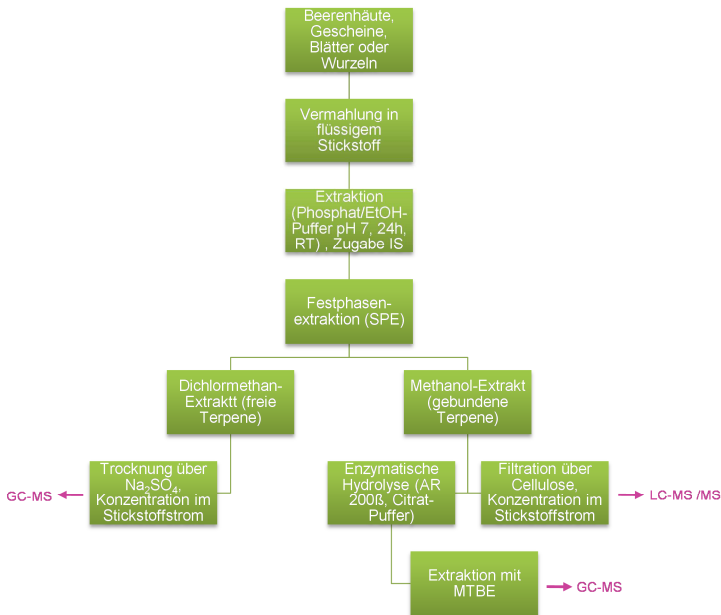
### **2.3 Bestimmung der Terpenprofile im Reifeverlauf**

Freie und gebundene Terpene wurden in verschiedenen Rebsorten und Geweben in *Vitis vinifera* gemessen. Die Bestimmung erfolgte in den Rebsorten Muscat a petits grains blanc FR 90; Gewürztraminer 11-18 Gm; Gewürztraminer FR 46-107; Weißer Riesling 239-34 Gm sowie in dem Weißen Riesling 24-196 Gm.

In allen fünf untersuchten Rebsorten wurden die Gehalte an freien und gebundenen Terpenen in Beerenhäuten gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden von der ganzen Beere nur die Beerenhäute untersucht, da diese die größten Gehalte an Metaboliten liefern (Gunata et al., 1985; Park et al., 1991). Auf die Analyse des Beerenfleisches sowie des Saftes wurde verzichtet.

Die Analyse von Gescheinen (Blütenstand der Weinrebe), Blättern und Wurzeln wurde bei den Rebsorten Gewürztraminer 11-18 Gm sowie bei dem Weißen Riesling 239-34 Gm durchgeführt.

Zur Analyse von Beerenhäuten wurden die Weinbeeren geschält und die Häute in Flüssigstickstoff vermahlen. Die anderen Gewebe wie Blätter, Gescheine oder Wurzeln konnten direkt in Flüssigstickstoff vermahlen werden. Im Anschluss erfolgte die Extraktion mit einem Phosphatpuffer/Ethanol-Gemisch. Nach 24 h bei Raumtemperatur konnten die Proben mit Carrez-Reagenzien geklärt und zentrifugiert werden. Im Anschluss erfolgte die SPE mit der Aufreinigung, Aufkonzentrierung und Trennung der freien von den glycosidisch gebundenen Terpenen. Freie Terpene wurden via GC-MS, Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside mittels LC-MS/MS bestimmt (vgl. Abbildung 31).



**Abbildung 31: Probenaufarbeitung verschiedener Gewebe aus *Vitis vinifera* zur Bestimmung freier und gebundener Monoterpene**

RT= Raumtemperatur, IS= Interner Standard

### 2.3.1 Bestimmung der Terpenprofile in Beerenhäuten

Der Gehalt an Monoterpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden variiert stark im Reifeverlauf zwischen verschiedenen Rebsorten und in verschiedenen Geweben. Die untersuchten Rebsorten lassen sich anhand ihrer Terpenprofile in zwei Gruppen einteilen. Die Rebsorten Gelber Muskateller und Gewürztraminer 11-18 Gm können den terpenreichen Rebsorten zugeordnet werden, den sogenannten „Muskat

betonten Rebsorten“. Hingegen kann der Gewürztraminer FR 46-107, der Weiße Riesling 239-34 Gm sowie der Weiße Riesling 24-196 Gm der Gruppe der terpenarmen Rebsorten zugeordnet werden. Letztere werden auch als „nicht Muskat betonte Rebsorten“ bezeichnet (Mateo und Jiménez, 2000). Der Gewürztraminer FR 46-107 wird im Rahmen dieser Arbeit der zweiten Gruppe zugeordnet, da er aufgrund einer Mutation annähernd keine Monoterpene biosynthetisiert (Battilana et al., 2008; Duchêne et al., 2008).

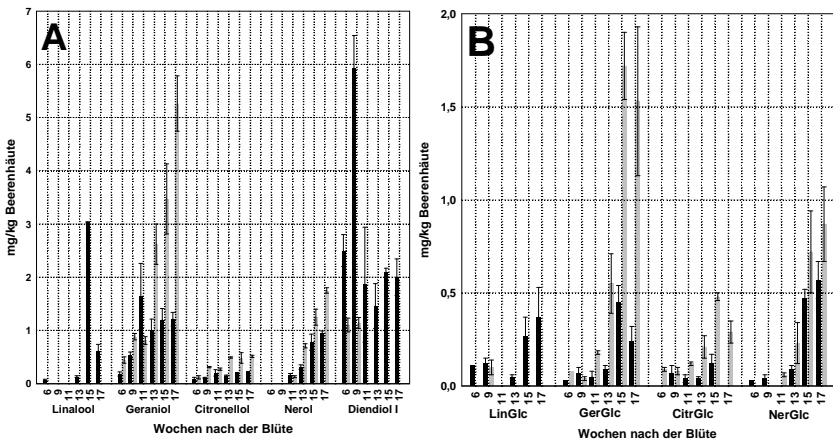
Die Gruppe der terpenreichen Sorten zeichnet sich durch hohe Gehalte und ein großes Analytspektrum an freien und gebundenen Terpenen aus. Annähernd zu jedem Erntetermin sind alle untersuchten Terpene nachweisbar (vgl. Abbildung 32 und Tabelle A 1). Lediglich bei dem Gewürztraminer 11-18 Gm konnte kein oder nur vereinzelt Linalool und Diendiol I bzw. Linalyl- $\beta$ -D-glucosid nachgewiesen werden.

Im Gewürztraminer 11-18 Gm steigen die Gehalte an Nerol und Geraniol während der Reife. Citronellol steigt zunächst an, stagniert jedoch gegen Ende der Reife. Diendiol I ist nur zu Beginn der Reife nachweisbar. Geraniol weist insgesamt die höchsten Gehalte an freiem Terpen in Gewürztraminer auf. Linalool ist in freier Form nicht nachweisbar. Bei Betrachtung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside ist das Geranyl- $\beta$ -D-glucosid die dominanteste Verbindung, welche im Verlauf der Reife stark ansteigt. Auch beim Neryl- $\beta$ -D-glucosid ist ein Anstieg zu

verzeichnen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur (Martin et al., 2012). Linalyl- $\beta$ -D-glucosid ist nur zu einem Erntezeitpunkt (9 Wochen nach Blüte) nachweisbar. Die Gehalte an freien Terpenen liegen über den Gehalten der gebundenen Terpene. Laut der Literatur sind die Gehalte an Geraniol, frei sowie glycosidisch gebunden, in Bezug auf die Monoterpene am höchsten. Linalool ist hingegen nur in sehr geringen Mengen vertreten (Vrhovsek et al., 2014). Eine Aussage über die Vergleichbarkeit der bestimmten Gehalte mit denen in der Literatur angegebenen Mengen, ist schwer abzuschätzen. In dieser Literatur wurde der Gehalt in den ganzen Beeren gemessen und die gebundenen Terpene als Gesamtglycoside nach enzymatischer Hydrolyse bestimmt (Vrhovsek et al., 2014).

Das Diendiol I ist die dominanteste Verbindung des Gelben Muskatellers. Die Gehalte steigen zu Beginn der Reife an, sinken anschließend und stagnieren zum Ende der Reife. Weitere dominierende Vertreter der freien Terpene sind Linalool und Geraniol. Citronellol und Nerol kommen in niedrigeren Konzentrationen vor. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur (Palomo et al., 2006). Linalool ist im Gelben Muskateller eher gegen Ende der Reife nachweisbar, hingegen als Glucosid fast zu jedem Erntezeitpunkt. Die Gehalte an Neryl-, Geranyl- und Linalyl- $\beta$ -D-glucosid steigen während der Reife an. Citronellyl- $\beta$ -D-

glucosid stagniert hingegen im Reifeverlauf und ist zum letzten Erntezeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz zum Gewürztraminer lässt sich in der Gruppe der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside nur schwer eine Hauptverbindung des Gelben Muskatellers festlegen. Die Gehalte an Linalyl- und Neryl- $\beta$ -D-glucosid sind annähernd vergleichbar. Das Geranyl- $\beta$ -D-glucosid sinkt tendenziell etwas zum Ende der Reife. Da das Diendiol I-glucosid nicht als Referenzstandard vorlag, konnten keine Aussagen über die Gehalte an gebundenem Diendiol I gemacht werden.

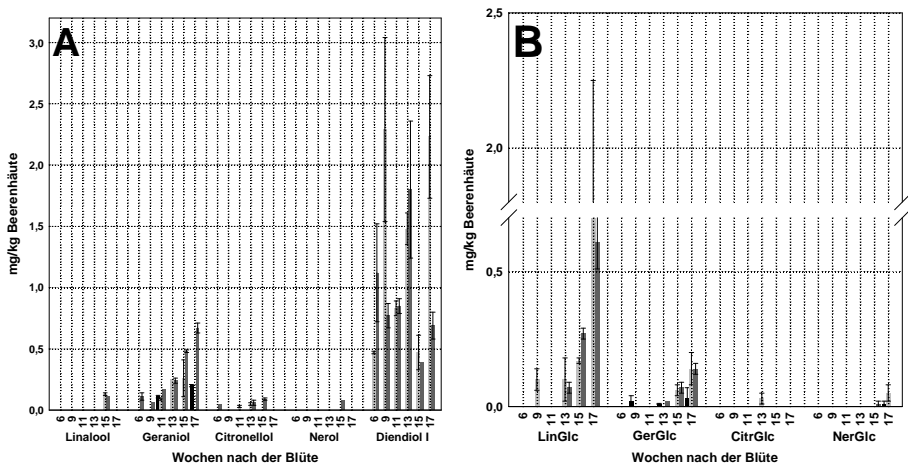


**Abbildung 32: Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in terpenreichen Rebsorten**

Freie Terpene (A) und Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside (B) in Beerenhäuten des Gelben Muskatellers (schwarz) und Gewürztraminers 11-18 Gm (grau) im Reifeverlauf (2011). Die Messungen erfolgten mittels GC-MS (A) und LC-MS/MS (B).

**LinGlc:** Linalyl- $\beta$ -D-glucosid; **GerGlc:** Geranyl- $\beta$ -D-glucosid; **CitrGlc:** Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid; **NerGlc:** Neryl- $\beta$ -D-glucosid; n=2

Bei den terpenarmen Sorten sind die Gehalte an freien und gebundenen Terpenen geringer als im Vergleich zu den terpenreichen Sorten. Das Analytspektrum ist zudem sehr eingeschränkt (Kalua und Boss, 2010). Die Riesling-Rebsorten zeigen vor allem Gehalte an Diendiol I und Geraniol. Der Gehalt an Diendiol I stagniert im Reifeverlauf, ist aber bei beiden Riesling-Klonen zu jedem Erntetermin nachweisbar. (vgl. Abbildung 33) Die anderen Terpene sind - wenn überhaupt- zum Ende des Reifeverlaufes nachweisbar, wobei Citronellol, Linalool und Nerol kaum im Weißen Riesling 239-34 Gm vorkommen. Auch hier sind diese Terpene eher Minorkomponenten. Beim Gewürztraminer FR 46-107 sind annähernd keine Terpene detektiert worden. Die Hauptkomponente in beiden Riesling-Klonen ist das Linalyl- $\beta$ -D-glucosid, wobei auch dieses eher gegen Ende der Reife nachweisbar ist. In geringen Mengen ist Geranyl- $\beta$ -D-glucosid in beiden Klonen nachweisbar, hingegen kommen Neryl- und Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid annähernd nicht vor (vgl. Abbildung 33 und Tabelle A 2).



**Abbildung 33: Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen-β-D-glucosiden in terpenarmen Rebsorten**

Freie Terpene (A) und Monoterpen-β-D-glucoside (B) in Beerenhäuten des Weißen Rieslings 24-196 Gm (dunkelgrau), Weißen Rieslings 239-34 Gm (hellgrau) und Gewürztraminers FR 46-107 (schwarz) im Reifeverlauf (2011). Die Messungen erfolgten mittels GC-MS (A) und LC-MS/MS (B)

**LinGlc:** Linalyl-β-D-glucosid; **GerGlc:** Geranyl-β-D-glucosid; **CitrGlc:** Citronellyl-β-D-glucosid; **NerGlc:** Neryl-β-D-glucosid; n=2

Es ist bekannt, dass die freien und gebundenen Terpene während der Reife tendenziell ansteigen (Fenoll et al., 2009; Wilson et al., 1984). Diese Aussage konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Beim Vergleich der freien Terpene mit dem Gehalt der gebundenen Terpene zeigte sich, dass in allen Fällen die Gehalte an freien Monoterpenen überwiegen. In der Literatur wurden bislang vermehrt Verhältnisse von gebundenen zu freien Terpenen von 1:1 bis 5:1 für Riesling- und Muskat-Rebsorten postuliert, bei Gewürztraminer-Rebsorten sogar 15:1 (Gunata et al., 1988).



Derartige Vergleiche mit der Literatur sind schwierig, da im Rahmen dieser Arbeit lediglich die an Glucose gebundenen Terpene bestimmt wurden; eine Analytgruppe, die im Hinblick auf die Gesamtglycoside nur einen Anteil von ca. 10 % ausmacht (Maicas und Mateo, 2005).

### **2.3.2 Bestimmung der Terpenprofile in anderen Geweben**

Neben der Bestimmung der Terpenprofile in Beerenhäuten wurde auch die Analyse der Terpene in Blättern, Gescheinen und Wurzeln in den Rebsorten Weißer Riesling 239-34 Gm und Gewürztraminer 11-18 Gm durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei den Gescheinen und Blättern jeweils im Laufe der Blüte bzw. des Wachstums 2012. Für die Analyse in Wurzeln wurden Zwei-Augenstecklinge im Alter von einem Jahr ausgewählt. Ein Zwei-Augensteckling ist hierbei ein kleines Stück vom Spross mit zwei Trieben.

#### **2.3.2.1 Bestimmung der Terpenprofile in Gescheinen**

Der Gewürztraminer zeichnet sich vor allem durch hohe Konzentrationen an Linalyl- $\beta$ -D-glucosid und Geranyl- $\beta$ -D-glucosid zum Zeitpunkt der Vollblüte aus. Es werden hier Gehalte von annähernd 100 mg/kg Gescheinen erreicht (vgl. Abbildung 34, Tabelle A 3). Die Gescheine weisen somit bei Betrachtung aller Gewebearten die höchsten Analytmengen

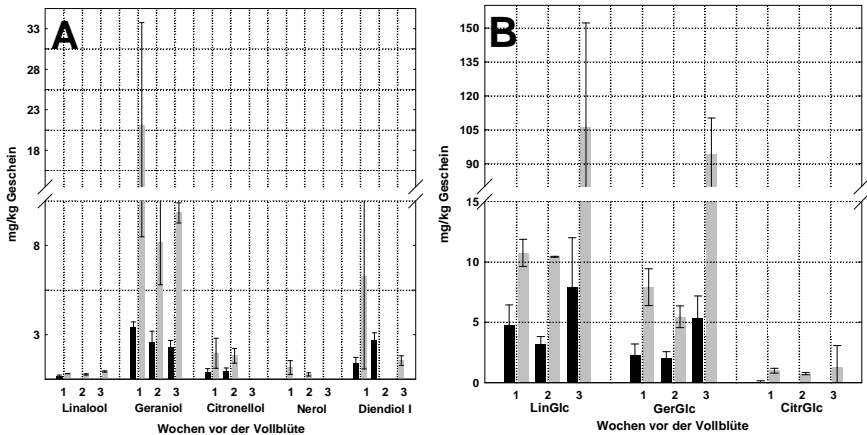
auf. Auffällig ist, dass Linalool in den Gescheinen des Gewürztraminers als freies Terpen nur in Spuren nachweisbar ist, hingegen die Gehalte an Linalyl- $\beta$ -D-glucosid im Reifeverlauf stark ansteigen (von 10 mg/kg auf 100 mg/kg Geschein im Verlauf der Blüte, vgl. Abbildung 34). Neben dem Linalool sind noch etwas höhere Konzentrationen an Diendiol I nachweisbar. Die dominanteste Verbindung der freien Terpene ist das Geraniol.

Auch bei dem untersuchten Riesling-Klon ist Geraniol die dominanteste Verbindung. Linalool, Nerol und Citronellol sind meist nicht nachweisbar. Kurz vor der Vollblüte ist das Diendiol I gut nachweisbar, nicht mehr jedoch zum Zeitpunkt der Vollblüte. (vgl. Abbildung 34 und Tabelle A 3).

Im Fall der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside sind die Gehalte an Geranyl- und Linalyl- $\beta$ -D-glucosid am höchsten, hingegen sind Citronellyl- und Neryl- $\beta$ -D-glucosid nicht nachweisbar. Die Gehalte an gebundenen Terpenen steigen tendenziell während der Reife (vgl. Abbildung 34).

Die Analyse der Beerenhäute ergab, dass sich eine terpenreiche von einer terpenarmen Rebsorte sowohl durch ihre Gehalte an freien und gebundenen Terpenen, als auch anhand des Analytspektrums unterscheiden lässt. Im Gegensatz zu dem Terpenprofil in Beerenhäuten, lassen sich die untersuchten Rebsorten im Bezug auf ihre Gescheine

lediglich durch die Gehalte unterscheiden. Beide Rebsorten weisen ein ähnliches Analytenspektrum auf. Der Gewürztraminer weist auch hier als terpenreiche Sorte die höchsten Gehalte an Terpenen in Gescheinen auf.



### Abbildung 34: Freie Terpene und Monoterpen-β-D-glucoside in Gescheinen während der Blüte

Gehalte an freien Terpenen (A) und Monoterpen-β-D-glucosiden (B) in Weißen Riesling 239-34 Gm (schwarz) und Gewürztraminer 11-18 Gm (grau) Gescheinen (2012). 1: vier Wochen vor der Vollblüte; 2: zwei Wochen vor der Vollblüte; 3: Woche der Vollblüte. n=2; bei fehlenden Balken waren die Analyten nicht bestimmbar, Neryl-β-D-glucosid lag unterhalb der Nachweisgrenze  
**LinGlc**: Linalyl-β-D-glucosid; **GerGlc**: Geranyl-β-D-glucosid; **CitrGlc**: Citronellyl-β-D-glucosid

Vor allem die stark ansteigenden Gehalte an Linalyl-β-D-glucosid in Gescheinen sind sehr bemerkenswert, da während der Blüte kaum freies Aglykon nachweisbar ist. Linalool zählt mit zu den bedeutenden Verbindungen, die das Aroma der Gescheine ausmachen (Dudareva et al., 1999). Entsprechend dazu wurde in früheren Arbeiten eine hohe Expression des Linalylsynthase-Gens in Blüten der Pflanze *Clarkia breweri* beschrieben (Dudareva et al., 1996). Geringe Gehalte an freiem Linalool implizieren jedoch nicht, dass Linalool nicht in größeren Mengen produziert wird. Gerade dieses Phänomen

deutet daraufhin, dass die Gescheine eine Glycosyltransferase besitzen, die speziell für die Glycosylierung von Linalool zuständig ist, da die Gehalte an Linalyl- $\beta$ -D-glucosid während der Blüte enorm ansteigen. Eine weitere Möglichkeit ist die Umwandlung in andere Linalool- verwandte Metabolite wie z.B. das Diendiol oder die Linalooloxide (Raguso und Pichersky, 1999).

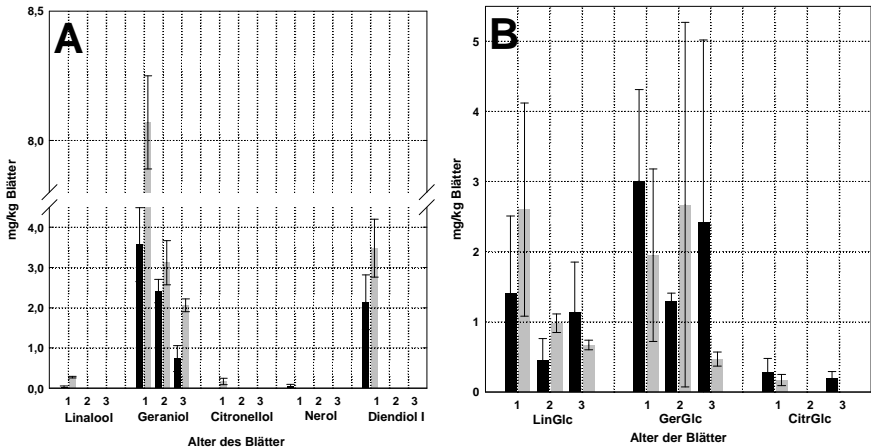
Die signifikant höheren Gehalte an freien und gebundenen Terpenen im Vergleich zu anderen Geweben sind für Gescheine nicht ungewöhnlich. Ähnlich hohe Gehalte wurden bereits in Rosen nachgewiesen (Francis und Allcock, 1969). Die Literaturrecherche ergab bislang keine vorliegenden Arbeiten zur Bestimmung von freien und gebundenen Monoterpenen in *Vitis vinifera*-Blüten.

### **2.3.2.2 Bestimmung der Terpenprofile in Blättern**

Das Analytenspektrum in Blättern ist in beiden untersuchten Rebsorten sehr eingeschränkt. Diendiol I, Geraniol, Geranyl- $\beta$ -D-glucosid sowie Linalyl- $\beta$ -D-glucosid weisen die höchsten Konzentrationen in Blättern auf. Andere Analyten, sowohl frei als auch gebunden, sind nur in Spuren nachweisbar. Freies Linalool ist nur in der ersten Woche in Spuren nachweisbar, dafür aber größere Mengen Diendiol I.

Die Gehalte und Analytenspektren der untersuchten Rebsorten ähneln sich sehr stark, so dass bei den Blättern eine terpenreiche von einer terpenarmen Rebsorte nicht unterschieden werden kann.

In Übereinstimmung mit den in der Literatur gefundenen Werten sinken die freien und gebundenen Terpene in Blättern während der Alterung (vgl. Abbildung 35 und Tabelle A 3). Der Literatur entsprechend ist Geraniol der dominanteste Vertreter der Monoterpene in Blättern (Gunata et al., 1986). Ähnlich zu anderen Geweben wie Gescheinen oder Wurzeln nutzen auch hier die Pflanzen die Produktion von Terpenen als Schutzstoffe vor Pathogenen (Hampel et al., 2005).



**Abbildung 35: Monoterpen-β-D-glucoside in Blättern während des Alterungsprozesses**

Gehalte an freien Terpenen (A) und Monoterpen-β-D-glucosiden (B) in Blättern der Rebsorten Weißer Riesling 234-34 Gm (schwarz) und Gewürztraminer 11-18 Gm (grau).

1: Blatt, eine Woche alt; 2: Blatt, drei Wochen alt; 3: Blatt, fünf Wochen alt

**LinGlc:** Linalyl-β-D-glucosid; **GerGlc:** Geranyl-β-D-glucosid; **CitrGlc:** Citronellyl-β-D-glucosid; n=2; bei fehlenden Balken waren die Analyten nicht bestimmbar, Neryl-β-D-glucosid lag unterhalb der Nachweisgrenze

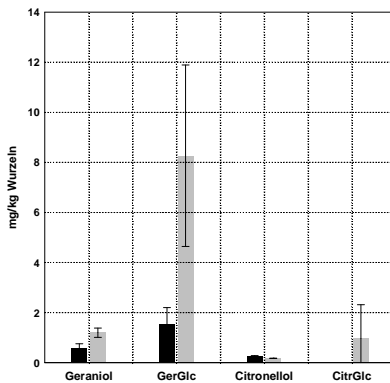
### 2.3.2.3 Bestimmung der Terpene in Wurzeln

Neben den anderen genannten Geweben wurden zudem die Wurzeln eines einjährigen Zwei-Augenstecklings des Gewürztraminers und Weißen Rieslings untersucht.

Die Wurzeln einer Pflanze sind das wichtigste Organ, verantwortlich für die Gesundheit der Pflanze, die Aufnahme

und Speicherung von Nährstoffen und Wasser. Gerade in der Erde ist die Pflanze vielen Mikroben und Herbivoren ausgesetzt.

In Wurzeln konnten ausschließlich höhere Gehalte an Geraniol und Geranyl- $\beta$ -D-glucosid sowie Citronellol und Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid nachgewiesen werden. Der Gehalt an gebundenen Terpenen überwiegt gegenüber dem Gehalt an freien Terpenen (vgl. Tabelle A 3 und Abbildung 36).



**Abbildung 36: Freie Terpene und Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside in verschiedenen Rebsorten**

Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden im Weißen Riesling 249-34 Gm (schwarz) und Gewürztraminer 11-18 Gm (grau). **GerGlc**: Geranyl- $\beta$ -D-glucosid; **CitrGlc**: Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid; n=2

In der Literatur ist beschrieben, dass bei Wurzeln, die von Phylloxera (Reblaus) befallen waren, die Biosynthese

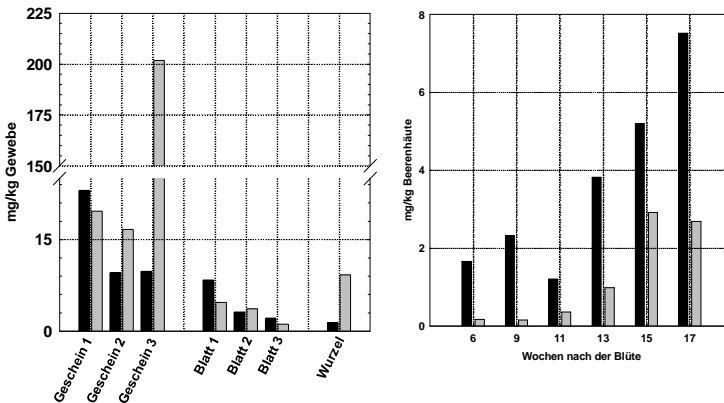


bestimmter Monoterpene wie Geraniol stärker angeregt war als in Wurzeln, die nicht befallen waren (Lawo et al., 2011). Demnach scheint die Biosynthese der Terpene in Wurzeln also ein wichtiger Vorgang bei dem Schutz vor Fraßfeinden zu sein, was die höheren Gehalte an Terpenen erklären könnte. Die Gehalte an Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden sind in Wurzeln sogar höher als z.B. in Beerenhäuten.

#### **2.3.2.4 Vergleich der unterschiedlichen Gewebe**

Am Beispiel des Gewürztraminers 11-18 Gm werden im Folgenden die unterschiedlichen Gehalte in den untersuchten Geweben miteinander verglichen.

Es zeigt sich, dass die Gesamtgehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in den einzelnen Geweben sehr stark variieren (vgl. Abbildung 37).



**Abbildung 37: Gesamtgehalte an freien Terpenen und Monoterpen-β-D-glucosiden in Gewürztraminer 11-18 Gm**

Gehalte an freien Terpenen (schwarz) und Monoterpen-β-D-glucosiden (grau) in Gescheinen, Blättern, Wurzeln (links) und Häuten (rechts) des Gewürztraminers. Links: Geschein 1: vier Wochen vor der Vollblüte; Geschein 2: zwei Wochen vor der Vollblüte; Geschein 3: Woche der Vollblüte; Blatt 1: eine Woche alt; Blatt 2: drei Wochen alt; Blatt 3: fünf Wochen alt; Ernte: 2012. Rechts: Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen-β-D-glucosiden in Beerenhäuten, Lese: 2011. n=2; freie Terpene wurden mittels GC-MS, gebundene via LC-MS/MS bestimmt.

Die Gehalte an freien Terpenen in Gescheinen sinken tendenziell während der Blüte, wohingegen die Gehalte an Monoterpen-β-D-glucosiden stark ansteigen. Im Vergleich zu allen anderen, untersuchten Geweben, sind die Gehalte in Gescheinen am größten. Die nächstgrößeren Gehalte an Monoterpen-β-D-glucosiden wurden in Wurzeln bestimmt. Die Gehalte in Blättern und Häuten sind annähernd vergleichbar. Freie Terpene und Monoterpen-β-D-glucoside sinken in

Blättern während der Reife. Hingegen steigen die Gehalte in Beerenhäuten im Verlauf der Reife.

Die Gescheine sowie die Wurzeln der Pflanzen stellen wichtige Organe der Pflanze dar. Die Wurzel sorgt für die Versorgung der Pflanze mit Wasser, für die Aufnahme von Nährstoffen sowie deren Speicherung. In 2.3.2.3 wurde bereits diskutiert, dass Terpene, frei sowie glycosidisch gebunden, als Schutzstoffe der Pflanze agieren und diese somit vermehrt gebildet werden, sobald ein „Angriff“ auf die Pflanze stattfindet. In Gescheinen sorgen Terpene für die Anlockung von Insekten und auch für die Kommunikation zwischen Nachbarpflanzen (u.a. bei Stressinduktion) (Dicke et al., 2009). Demnach sind auch hier erhöhte Gehalte an Terpenen nicht verwunderlich. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, warum gerade Gescheine und Wurzeln signifikant höhere Gehalte aufweisen, als die anderen untersuchten Gewebe.

## **2.4 Charakterisierung der potentiellen Monoterpenylglycosyltransferasen**

### **2.4.1 Rekombinante Enzyme**

Es wurden potentielle Kandidatengene ausgewählt, diese in *Escherichia coli* exprimiert (HS Geisenheim, TU München). Umsatzreaktionen mit UDP-Glucose und den jeweiligen Aglykonen wurden durchgeführt und die Reaktionsprodukte der Universität Bonn zur Analyse zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 38: 3D gemodelte Struktur der VvGT14 (TU München)**  
Die Berechnungen zur postulierten Struktur erfolgten durch Friedericke Bönisch. Der in pink markierte Bereich stellt die PSPG Box dar.

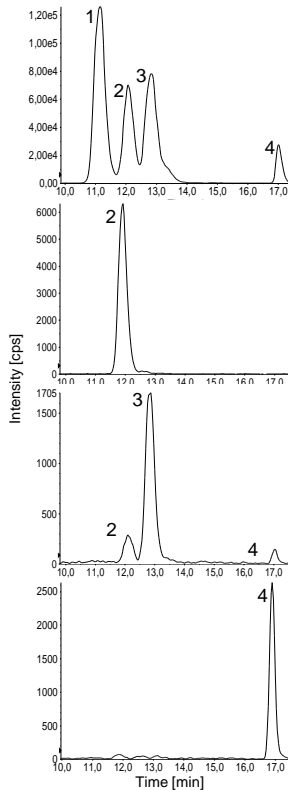
#### **2.4.2 Substratspezifität rekombinanter Glycosyltransferasen aus *Vitis vinifera***

Zur Bestimmung der Substratspezifität der potentiellen Monoterpenyl-glycosyltransferasen wurden die Substrate einzeln in Gegenwart von UDP-Glucose durch die verschiedenen VvGTs umgesetzt. Etwaige Reaktionsprodukte wurden der Universität Bonn zur Verfügung gestellt und mittels LC-MS/MS vermessen (vgl. Abbildung 39 und Abbildung 40).

**Tabelle 11: Monoterpensubstrate der exprimierten Glycosyltransferasen**

<b>Bezeichnung der UGT</b>	<b>Rebsorte</b>	<b>Substrat:</b>
VvGT7	Weißer Riesling 239-34 Gm, Gelber Muskateller FR 90	Nerol, Geraniol, Citronellol
VvGT14	Weißer Riesling 239-34 Gm Gewürztraminer 11-18 Gm	Nerol, Geraniol, Citronellol, Linalool
VvGT15	Weißer Riesling 239-34 Gm, Gelber Muskateller FR 90, Gewürztraminer 11-18 Gm	Nerol, Geraniol, S-Citronellol
VvGT16	Gewürztraminer 11-18 Gm	Nerol, Geraniol, Citronellol

Die Identifizierung erfolgte über die jeweiligen Reaktionsprodukte (Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside) der einzelnen Glucosyltransferasen mittels LC-MS/MS.

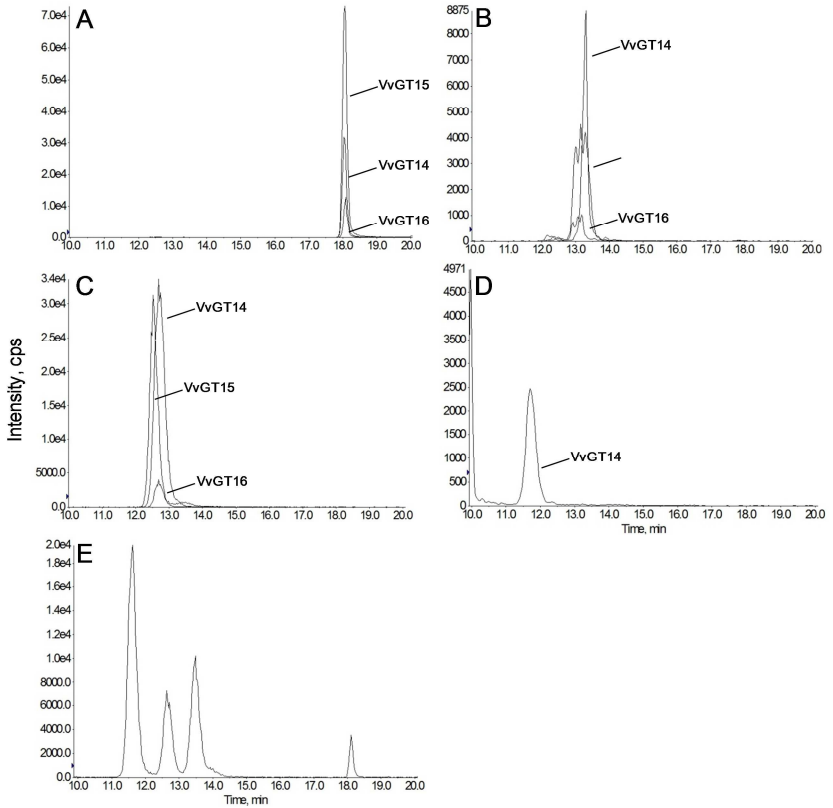


**Abbildung 39: Nachweis der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside durch Umsatz mit VvGT7**

Das erste LC-MS/MS Chromatogramm zeigt einen Terpenglucosidstandardmix mit Linalyl- (1), Neryl-(2), Geranyl-(3) und Citronellyl-Glucosid (4); die unteren Chromatogramme zeigen jeweils Nachweise von Neryl-, Geranyl- und Citronellyl-Glucosid nach Umsatz der jeweiligen Substrate mit UDP-Glucose durch VvGT7. Die Chromatogramme zeigen den TIC der charakteristischen MRM-Übergänge. Es wurde eine Gaussian-Glättung der Peaks durchgeführt.

VvGT7 setzt nur primäre Alkohole, keine tertiären Alkohole um (vgl. Abbildung 39). Es zeigte sich hierbei, dass die VvGT7 beim Umsatz von Geraniol mit UDP-Glucose in einer Nebenreaktion in geringen Mengen Neryl- und Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid gebildet wurden.

VvGT14 und VvGT15 setzen ebenfalls primäre Alkohole um (vgl. Abbildung 40). Zusätzlich wird Linalool, als tertiärer Alkohol, von der VvGT14 umgesetzt.



**Abbildung 40: Nachweis der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside nach Umsetzung durch verschiedene GTs mittels LC-MS/MS**

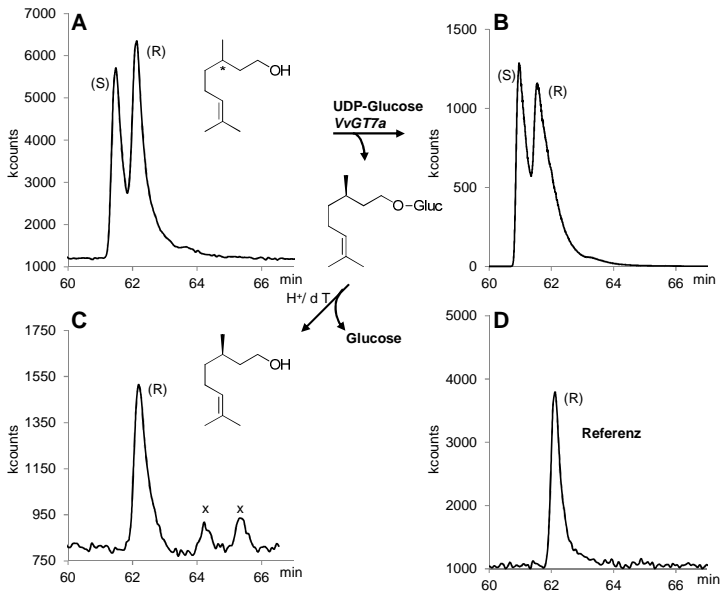
**A:** Overlay-Chromatogramme des Citronellyl- $\beta$ -D-glucosids nach Umsetzung mit VvGT14, VvGT15 und VvGT16. **B:** Nachweis von Geranyl-, **C:** Neryl- und **D:** Linalyl-Glucosid. **E:** Terpenglucosidstandard (hierbei Elutionsreihenfolge mit steigender Retentionszeit: Linalyl-, Neryl-, Geranyl- und Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid).



### **2.4.3 Enantioselektivität der VvGT7, VvGT14 und VvGT15**

Zur Bestimmung der Enantioselektivität von VvGT7, VvGT14 und VvGT15 wurde das zu untersuchende, racemische Substrat (Citronellol oder Linalool) mit UDP-Glucose durch die entsprechende Glycosyltransferase umgesetzt (TU München).

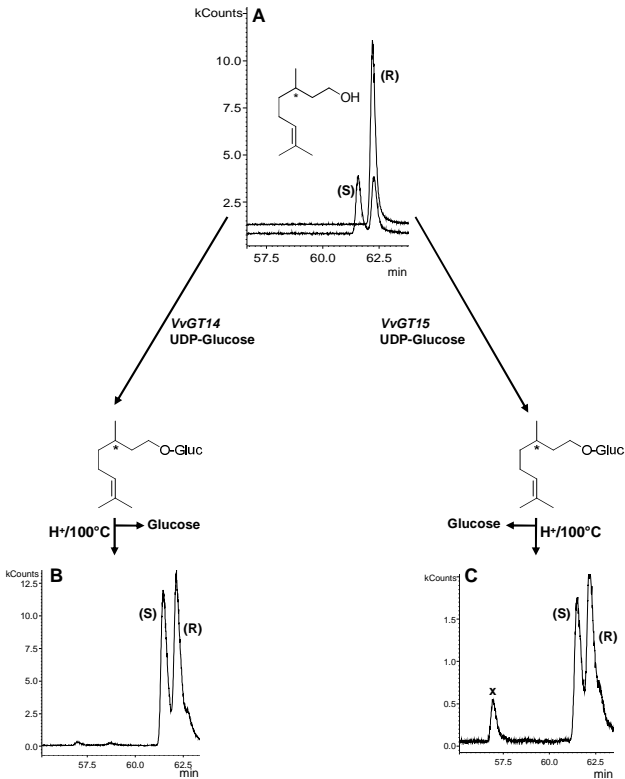
Wie in Abbildung 32 zu erkennen, wird Citronellol und das entsprechende Glucosid in Beerenhäuten akkumuliert, wenn auch in geringeren Konzentrationen als im Vergleich zu anderen Substraten. Dennoch spielt es eine Rolle für Muskatbetonte-Rebsorten. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass (S)-Citronellol in Weinbeeren akkumuliert wird (Luan et al., 2005).



**Abbildung 41: Enantioselektive GC-MS Analyse der VvGT7 gegenüber Citronellol**

SPME-GC-MS Messung zur Bestimmung der Enantioselektivität von VvGT7; **(A)** Freies, racemisches Citronellol als Substrat für VvGT7; **(B)** leichte Abreicherung an (R)-Citronellol in freiem, nicht umgesetzten Citronellol; **(C)** durch säurehydrolytische Spaltung freigesetztes (R)-Citronellol, die als „x“ markierte Peaks stellen Hydrolyse-Nebenprodukte dar. **(D)** enantiomerenreines (R)-Citronellol als Referenzstandard

VvGT7 zeigte eine deutliche Präferenz für das (*R*)-Citronellol. Es zeigte sich sowohl eine Abreicherung von freiem, nicht umgesetzten (*R*)-Citronellol, als auch die ausschließliche Bildung von (*R*)-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid (als freigesetztes Citronellol) (vgl. Abbildung 42). Es scheint somit eine eher untergeordnete Rolle bei der Metabolisierung des Citronellols bzw. der Monoterpene zu spielen, da dieses Enantiomer üblicherweise nicht in Trauben akkumuliert wird.

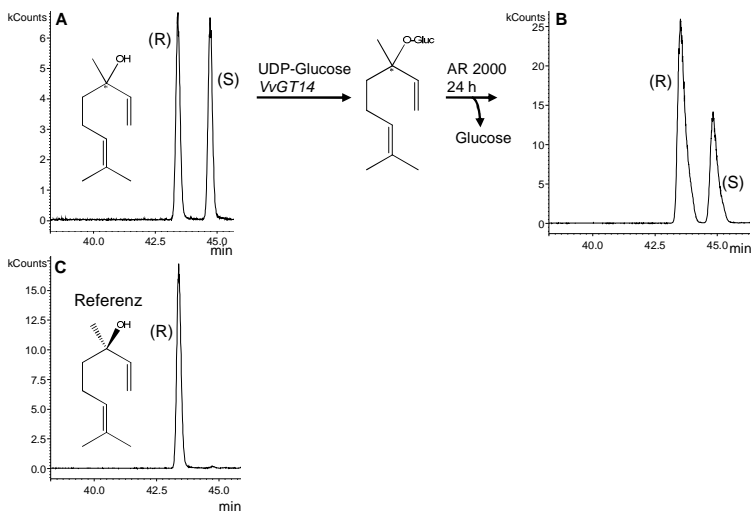


**Abbildung 42: Enantioselektive GC-MS Analyse der VvGT14 und VvGT15 gegenüber Citronellol**

SPME-GC-MS Messung zur Bestimmung der Enantioselektivität von VvGT14 und VvGT15 nach säurehydrolytischer Spaltung des Citronellyl- $\beta$ -D-glucosids **A**: Referenzchromatogramme von racemischem Citronellol und enantiomerenreinem (*R*)-Citronellol; **B+C**: racemisches Citronellol nach saurer Spaltung des Citronellyl- $\beta$ -D-glucosids durch VvGT14 (**B**) und VvGT15 (**C**). Alle Chromatogramme sind als charakteristische SIM-Spuren ( $m/z$  69, 81,123) dargestellt. Als „x“ markierte Peaks stellen Hydrolyse-Nebenprodukte dar.

VvGT14 und VvGT15 zeigten keine Präferenz für (*R*)- oder (*S*)-Citronellol in Langzeitassays (vgl. Abbildung 42).

Basierend auf den Ergebnissen der kinetischen Assays präferieren VvGT14 und VvGT15 hingegen das (*S*)-Enantiomer des Citronellols (TU München).

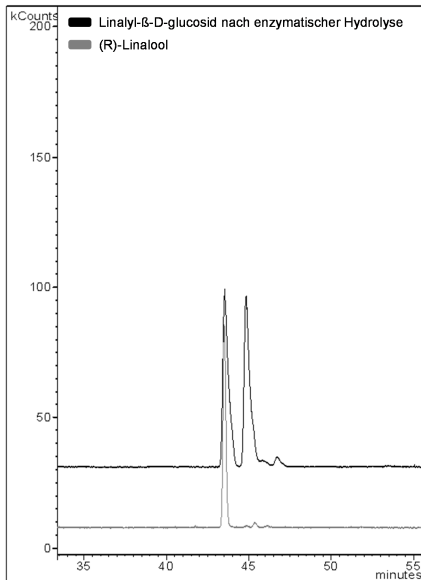


**Abbildung 43: Enantioselektive Analyse der VvGT14 gegenüber Linalool**

**A:** racemisches Linalool als Substrat für VvGT14 **B:** Freigesetztes Linalool nach enzymatischer Hydrolyse von Linalyl- $\beta$ -D-glucosid durch AR 2000. **C:** (*R*)-Linalool als Referenzstandard

Im Gegensatz zu den enantioselektiven Analysen des Citronellyl- $\beta$ -D-glucosids wurden die Ansätze des Linalyl- $\beta$ -D-glucosids nicht säurehydrolytisch, sondern durch

enzymatische Hydrolyse mittels AR 2000 gespalten. Ursache hierfür ist die Racemisierung von enantiomerenreinem Linalool während der säurehydrolytischen Spaltung. Weiterhin finden starke Umlagerungsreaktionen zu anderen Terpenen statt, was die Konzentration des Linalools enorm erniedrigt (vgl. Abbildung 18) und die Detektion somit erschwert. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von racemischem Linalyl- $\beta$ -D-glucosid durch AR 2000 keine Enantiodiskriminierung durch das Spaltenzym erfährt (vgl. Abbildung 44) (Gunata et al., 1990; Lückner et al., 2001).



**Abbildung 44: Racemisches Linalyl-β-D-glucosid nach enzymatischer Hydrolyse mit AR 2000**

Overlay der SPME-GC-MS Chromatogramme eines (*R*)-Linalool-Referenzstandards (grau) und eines racemischen Linalyl-β-D-glucosid-Standards nach enzymatischer Hydrolyse (schwarz).

VvGT14 zeigte eine leichte Enantiopräferenz gegenüber dem (*R*)-Enantiomer des Linalools (vgl. Abbildung 43).

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in Rebsorten wie Morio Muscat oder Muscat Ottonel die Enantiomerenreinheit für freies (*S*)-Linalool größer ist als für das Linalyl-β-D-glucosid. Dies spricht für eine Diskriminierung des (*S*)-Enantiomeres bei der Glycosylierungsreaktion (Luan

et al., 2004). Da die VvGT14 eine leichte Präferenz für das (R)-Enantiomer aufweist, ist eine Bedeutung der VvGT14 für die Glycosylierung von Linalool nicht ausgeschlossen.

#### **2.4.4 Identifizierung potentieller natürlicher Substrate der Monoterpenyl-glycosyltransferasen durch „Activity-Based Metabolomic Profiling“**

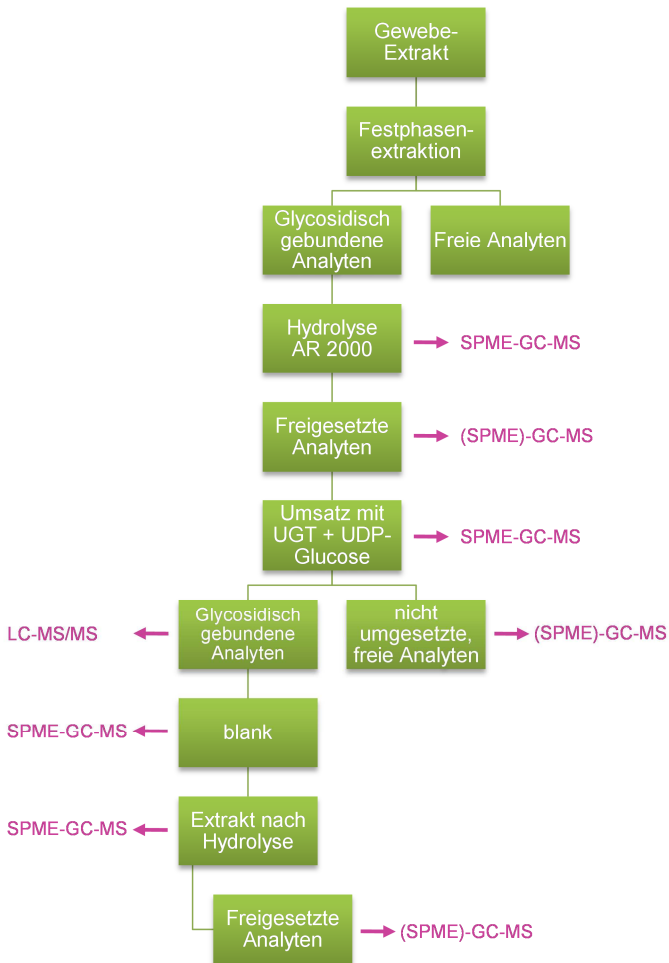
Zur Messung der Aktivität der rekombinanten Enzyme wurden diese jeweils mit einzelnen Terpensubstraten in Anwesenheit von UDP-Glucose umgesetzt und der Umsatz mittels LC-MS/MS überprüft (vgl. 2.4.2). Hierbei zeigten sich verschiedene Aktivitäten auf die o.g. Substrate.

Sofern eine Glycosyltransferase *in vitro* ein Substrat in Anwesenheit von UDP-Glucose umsetzt, ist damit die biologische Relevanz *in vivo* noch nicht bestätigt. Zur Identifizierung weiterer natürlicher Substrate wurden die vier VvGTs zusätzlich zu den verschiedenen, einzelnen Terpenen mit einem Aglykon-Extrakt eines Gewürztraminers 11-18 Gm, der zahlreiche potentielle, natürliche Substrate enthält, umgesetzt. Mit Hilfe dieser Technik kann zum Beispiel die Präferenz für Terpene in Gegenwart anderer Substanzklassen überprüft werden bzw. neue Substrate identifiziert werden (de Carvalho et al., 2010). Die Massenspektrometrie eignet sich hierbei als gutes Verfahren zur Detektion möglicher Substrate (Barglow und Cravatt, 2007).



Es wurden Beerenhäute eines Gewürztraminers 11-18 Gm eines frühen (8 Wochen nach Blüte) und späten (16 Wochen nach Blüte) Erntetermins des Jahrganges 2012 extrahiert.

Zunächst wurde das ABMP mit dem Extrakt des späteren Lesetermins (18 Wochen nach Blüte, 2012) durchgeführt. Hierzu wurde das SPE-Eluat, das alle glycosidisch gebundenen Analyten enthielt, mit AR 2000 hydrolysiert und die freigesetzten Verbindungen mittels GC-MS vermessen (vgl. 3.5.1, Abbildung 45). Danach erfolgte der Umsatz dieser freigesetzten Aglykone in Anwesenheit von UDP-Glucose (radioaktiv-markiert und nicht-markiert). (Friedericke Bönisch, TU München, Arbeitsgruppe Prof. Schwab, Technologie der Naturstoffe)



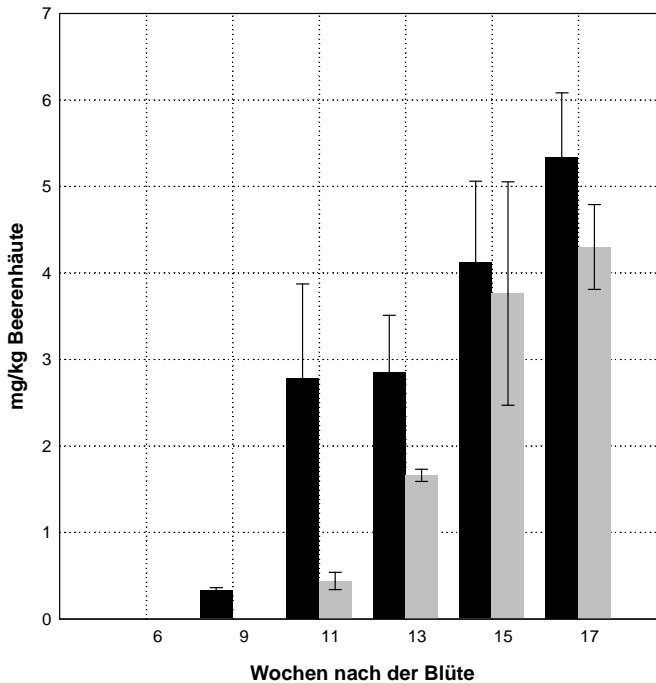
**Abbildung 45: Probenaufarbeitungsschema zur Identifizierung potentieller, natürlicher Substrate durch Anwendung des ABMP**

Nach dem Umsatz wurden freie, nicht umgesetzte Aglykone vermessen sowie die Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside mittels LC-

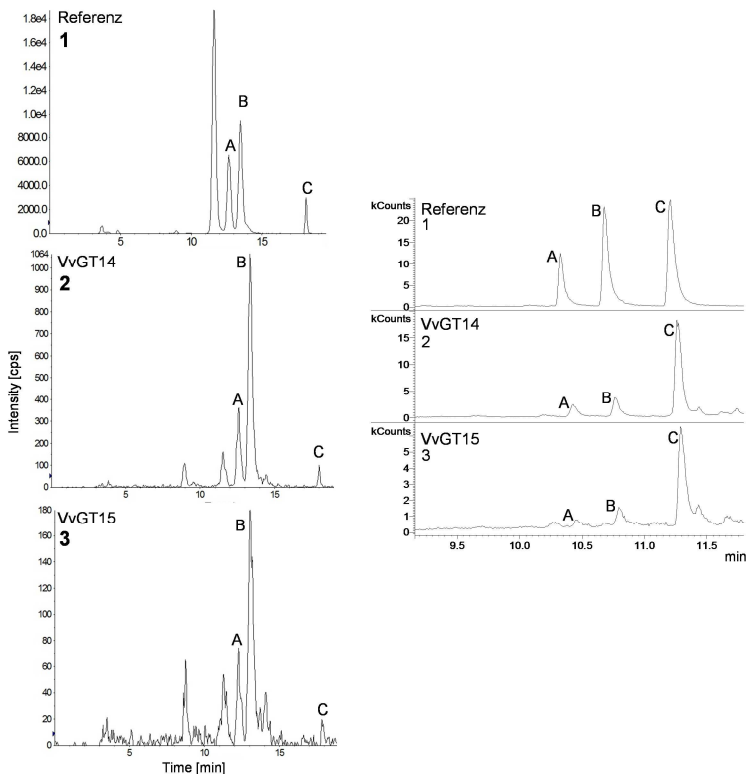
MS/MS bzw. alle gebundenen Aglykone nach enzymatischer Hydrolyse mittels GC-MS (vgl. Abbildung 45).

Da die LC-MS/MS-Methode spezifisch auf den Nachweis von Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden optimiert wurde, konnten hiermit dementsprechend auch nur diese Analyten nachgewiesen werden. Es wurden weiterhin die enzymatisch freigesetzten Analyten über GC-MS vermessen. Die GC-MS Messungen lieferten Aussagen über etwaige andere mögliche Substrate, die nicht der Substanzklasse der Monoterpene angehören.

*In vitro* glycosyliert VvGT7 bei Verabreichung der einzelnen Substrate Nerol, Geraniol und Citronellol. Im Gegensatz dazu zeigte VvGT7 keinen Umsatz der Terpene aus dem Gewürztraminer-Extrakt. Es konnte lediglich durch Anwendung dieser Methode Geranylsäure (als freies Aglykon nach enzymatischer Hydrolyse) als weiteres Substrat identifiziert werden. Geranylsäure spielt bei dem Aroma der Weinbeeren keine Rolle, kommt jedoch in der Weinbeere vor (Rocha et al., 2007; Sánchez-Palomo et al., 2009). Die Gehalte an freier Geranylsäure wurden ebenfalls bestimmt (vgl. Abbildung 46).



**Abbildung 46: Bestimmung freier Geranolsäure in Beerenhäuten**  
 GC-MS Messungen der freien Geranolsäure in terpenreichen Sorten wie Muskateller (schwarz) und Gewürztraminer 11-18 Gm (grau) während des Reifeverlaufes 2011.



**Abbildung 47: Detektion potentieller natürlicher Substrate der VvGT14 und VvGT15 mittels LC-MS/MS und GC-MS**

Nachweis der potentiellen, natürlichen Substrate von VvGT14 (2) und VvGT15 (3) mittels LC-MS/MS (links) und GC-MS (rechts). links: (1) Standardgemisch bestehend aus Linalyl-(nicht beschriftet), Neryl(A)-, Geranyl (B)- und Citronellyl (D)- $\beta$ -D-glucosid; (2) Detektion der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside nach Umsetzung eines Aglykon-Extraktes des Gewürztraminers 11-18 Gm (18 Wochen nach Blüte) mit UDP-Glucose durch VvGT14; (3) Detektion der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside nach Umsetzung durch VvGT15; Die Chromatogramme sind als TIC der MRM-Übergänge dargestellt rechts: (1) Standardgemisch

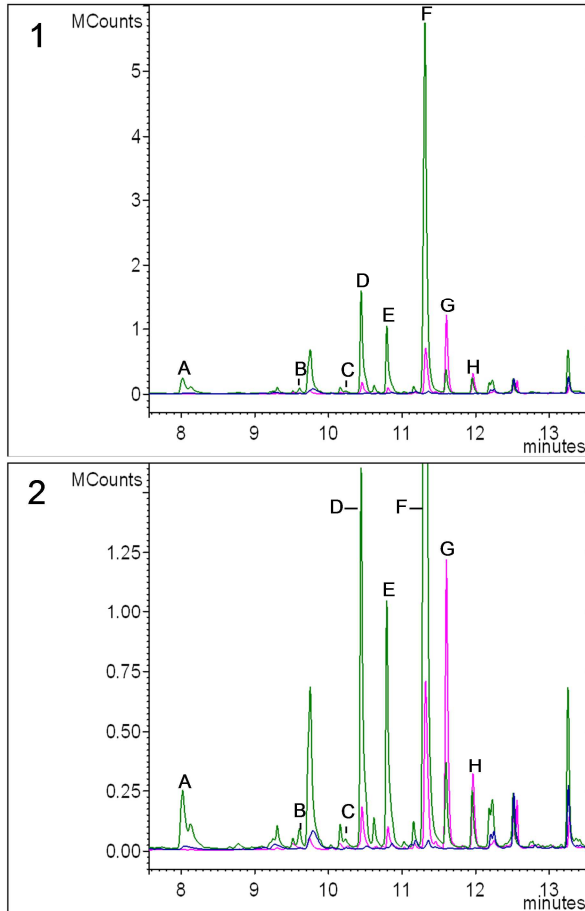
bestehend aus Citronellol (A), Nerol (B) und Geraniol (C); (2) SPME-GC-MS Chromatogramm der freigesetzten Terpene nach Umsatz des Aglykon-Extraktes mit UDP-Glucose durch VvGT14, (3) SPME-GC-MS Chromatogramm nach Umsatz mit VvGT15; dargestellt sind die charakteristischen SIM-Spuren (69, 81) der Terpene; Glättung wurde angewendet.

VvGT14 und VvGT15 glycosylierten Nerol, Geraniol und Citronellol nach Umsatz mit dem Gewürztraminer-Extrakt (18 Wochen nach Blüte, vgl. Abbildung 47). Die Analyten konnten sowohl mittels LC-MS/MS als auch als freigesetzte Aglykone über GC-MS nachgewiesen werden.

Nach Umsatz des Extraktes des späteren Lesetermins (18 Wochen nach Blüte) wurden neben den aufgeführten Terpenalkoholen weitere potentielle Substrate von VvGT14 über GC-MS detektiert. Das Experiment wurde aus diesem Grund wiederholt. Aufgrund von Probenmangel wurde hierbei der Gewürztraminer-Extrakt des früheren Lesetermins (8 Wochen nach Blüte) verwendet.

Der Umsatz der VvGT14 mit dem Gewürztraminer-Extrakt (früherer Erntetermin, 8 Wochen nach Blüte) zeigte sich erneut deutliche Aktivität auf Nerol, Geraniol und Citronellol. Ferner wurden Phenylalkohol und Benzylalkohol als weitere Substrate identifiziert (vgl. Abbildung 48). Die Nachweise an Monoterpenen sind mit dem Ansatz des früheren Erntetermins des Gewürztraminers (vgl. Abbildung 48) um ein Vielfaches deutlicher als beim ersten Ansatz des späteren Erntetermins

(vgl. Abbildung 47). Viele Faktoren können hierfür eine Rolle spielen. Zu Beginn des Profilings wurden die Monoterpene sowohl über GC-MS als auch über LC-MS/MS Messungen detektiert, um eine doppelte Absicherung des Ergebnisses zu erhalten. Es waren hierfür zahlreiche Aufarbeitungsschritte notwendig, die zu Analytverlusten geführt haben können. Im Rahmen des Folgeexperimentes mit dem frühen Gewürztraminer-Extrakt wurde auf die LC-MS/MS Detektion verzichtet. Dieser wurde nur nach enzymatischer Hydrolyse mittels GC-MS vermessen, da sich für die Suche nach unbekanntem Substraten die LC-MS/MS Methode nicht eignete.



**Abbildung 48: Identifizierung möglicher natürlicher Substrate der VvGT14 mittels SPME-GC/MS Detektion**

SPME-GC/MS Chromatogramme (TIC) der enzymatisch freigesetzten, glycosidisch gebundenen Aglykone eines Gewürztraminer-Extraktes (früher Lesetermin, 8 Wochen nach der Blüte) vor (**pink**) und nach (**grün**) Umsatz mit UDP-Glucose durch VvGT14. Als Blindmessung wurde der gleiche Extrakt durch denaturierte VvGT14 umgesetzt



(blau). 2 stellt eine Vergrößerung des Chromatogrammes 1 dar A: Linalool; B: Neral; C: Geranial, D: Citronellol; E: Nerol; F: Geraniol; G: Benzylalkohol; H: Phenylethanol

Weiterhin waren die Analyten Geranial und Neral in geringen Mengen nachweisbar (vgl. Abbildung 48, B und C). Da es sich bei den Verbindungen um Aldehyde handelt und diese nicht glycosidisch gebunden vorliegen können, sind diese wahrscheinlich auf Aufarbeitungs- oder enzymatischen Artefakten aus Verunreinigungen zurück zu führen. Zudem wurde nach Umsatz durch die VvGT14 Linalool nachgewiesen (vgl. Abbildung 48), welches im ursprünglichen Extrakt nach enzymatischer Hydrolyse und vor Umsatz mit der jeweiligen GT (vgl. Abbildung 48; pink) nicht detektiert wurde. Wie auch schon in den Profilen des Gewürztraminers zu erkennen war, konnte Linalyl- $\beta$ -D-glucosid selten nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 32, B). Linalool ist demnach kein charakteristisches Substrat für Gewürztraminer-Rebsorten. Es scheint somit wahrscheinlich, dass auch die Bildung von Linalool bzw. Linalyl-glucosid auf Nebenreaktionen der exprimierten Enzyme zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse des ABMP zeigen deutliche Hinweise, dass es sich bei den exprimierten VvGTs (VvGT14 und VvGT15) um potentielle TerpenGTs handeln kann. VvGT7 zeigte lediglich sehr geringen Umsatz gegenüber Geranilsäure beim ABMP, so dass weitere natürliche Substrate für diese Glycosyltransferase noch identifiziert werden müssen.

### **3. Experimenteller Teil**

#### **3.1 Probenmaterial**

Die Analyse von Monoterpenalkoholen und ihren gebundenen Analoga erfolgte in verschiedenen Rebsorten und Geweben. Das jeweilige Probenmaterial wurde von der Hochschule Geisenheim (Abteilung Rebenzüchtung) zur Verfügung gestellt. Dieses wurde in verschiedenen Jahren im Reifeverlauf gelesen und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren. Es wurden hierbei folgende Rebsorten beprobt:

- Muscat a petits grains blanc FR 90,  
Gelber Muskateller
- Gewürztraminer 11-18 Gm
- Gewürztraminer FR 46-107
- Weißer Riesling 239-34 Gm
- Weißer Riesling 24-196 Gm

**Tabelle 12: Gewebe und Lesetermine**

<b>Gewebe</b>	<b>Anzahl der Termine</b>	<b>Lesedaten</b>
Beerenhäute	6	6, 9, 11, 13, 15, 17 Wochen nach der Blüte (2011)
Gescheine	3	4 und 2 Wochen vor der Vollblüte sowie die Woche der Vollblüte (2012)
Blätter	3	1, 3 und 5 Wochen alt (2012)
Wurzel	1	Zwei-Augensteckling; gesteckt: 13.01.2011, geerntet: 20.04.2012

Zur Analyse von freien und gebundenen Terpenen in Beerenhäuten wurden die Beeren des Jahrgangs 2011 verwendet.

Die Gehaltsbestimmungen in anderen Geweben wie Blättern (Abbildung A 1), Gescheinen (Abbildung A 2) und Wurzeln erfolgte mit Material aus dem Jahre 2012. Die Analysen wurden hierbei nur mit den Rebsorten Gewürztraminer 11-18 Gm und Weißer Riesling 239-34 Gm durchgeführt.

Zur Bestimmung der Terpene in Wurzeln wurden Zweiaugenstecklinge in einem Zeitraum von einem Jahr herangezogen. Gesteckt: 13.1.2011, Geerntet: 20.4.2012

Für das „Activity-Based Metabolomic Profiling“ wurden Gewürztraminer 11-18 Gm Proben mit den Ernteterminen 8 und 16 Wochen nach Blüte aus 2012 verwendet.

### 3.2 Chemikalien

**Tabelle 13: Verwendete Chemikalien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Acetonitril; HPLC grade	VWR, Leuven (Belgien)
Acetylbromglucose, ≥ 95 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Amberlite IR-120	Fluka
Ammoniaklösung 25 %	Merck, Darmstadt
AR 2000, Rapidase ®	DSM Food Specialities B.V., Delft (Niederlande)
tert-Butylmethylether, ≥ 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Citral, 95 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Citronellol, ≥ 95 %	Sigma Adrich Chemie GmbH, Steinheim
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Diethylether	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3,7-Dimethyl-6-Octensäure, ≥ 94 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Dichlormethan, GC Ultra Grade	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt mit Petrolether	Julius Hoesch GmbH und Co. KG, Düren
Ethylacetat, Analytical Grade Reagent	Fisher Scientific, Loughborough (UK)
Ethylenglycol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Geraniol, $\geq 90\%$	Roth, Karlsruhe
Geranylsäure, 85 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glucanex® , Lysing Enzymes from <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hexan, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Kieselgel 40-63 $\mu\text{m}$ , Normasil 60	VWR, Leuven (Belgien)
Linalool, rein	Roth, Karlsruhe
Linalylacetat, $\geq 97\%$	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lithiumaluminiumdeuterid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lithiumaluminiumhydrid	Merck, Darmstadt
Methanol, Gradient Grade	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt

---

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen, z.A.	Th. Geyer GmbH und Co. KG, Renningen
Natriummolybdat-Dihydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumsulfat, wasserfrei	KMF Laborchemie Handels GmbH
Natriumsulfid	Merck, Darmstadt
Nerol, 97 %	Alfa Aesar, Karlsruhe
2-Octanol	ZVE Chemikalienlager, Universität Bonn
Quecksilber(II)cyanid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure, 1 M	Fisher Scientific, Loughborough (UK)
Selendioxid, 98 %	Merck, Darmstadt
Silbercarbonat, 99,5 %	Alfa Aesar, Karlsruhe
$\alpha$ -Terpineol, 96 %	Alfa Aesar, Karlsruhe
Tetrahydrofuran, dried, p.A.	Applichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, 33 %	Merck, Darmstadt
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt

---

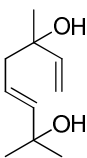
### **3.3 Synthese von Referenzsubstanzen**

Käuflich nicht erhältliche Referenzsubstanzen wurden nach bereits bekannten Synthesewegen synthetisiert. Die Charakterisierung der Substanzen erfolgte mittels GC-MS, LC-MS/MS und NMR-Techniken ( $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR). Bei den NMR-Daten sind die chemischen Verschiebungen in ppm relativ zu dem internen Standard Chloroform angegeben,  $\sigma=7,26$  (Singulett,  $^1\text{H}$ -NMR), 77 (Triplett,  $^{13}\text{C}$  NMR).  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren wurden auf einem Bruker Avance 300DPX Spektrometer aufgenommen (300 MHz für  $^1\text{H}$  NMR und 75 MHz für  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren).

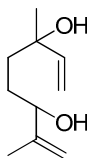
Die angegebenen NMR-Daten wurden mit Literaturdaten verglichen und stimmen mit diesen nahezu überein (Konda et al., 1997; Paulsen et al., 1985; Salles et al., 1991a; Weckerle et al., 2003).

#### **3.3.1 3,7-Dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol (Diendiol I) und 3,7-Dimethyl-1,7-Octadien-3,6-diol (Diendiol II)**

Ein Gemisch aus Diendiol I und II wurde in einer Oxygenierungsreaktion mit generiertem Singulett-Sauerstoff aus dem Linalool gemäß (Alsters et al., 2010) synthetisiert.



Diendiol I



Diendiol II

**Abbildung 49: Strukturformeln des Diendiol I und Diendiol II**

Chemikalien:

m (Linalool):	2,4098 g	(0,016 mol)
m (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O):	167,6 mg	
V (Ethylenglykol):	15 mL	
V (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 33 %):	5 mL	
m (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ):	1,93 g	

Ausbeute (Rohprodukt) 4,6 g

Auf eine säulenchromatographische Aufreinigung wurde verzichtet.

Aus 0,016 mol Edukt sind nach der Reaktion 0,01 mol Produkt entstanden, was einer Ausbeute von 64 % entspricht.

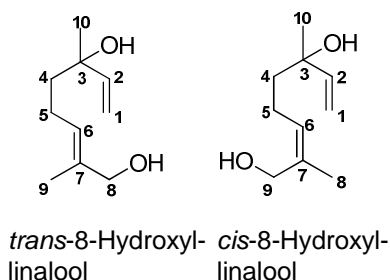
MS (EI, iontrap) (Diendiol I): 67 (100), 82 (94,8), 71 (69,5), 43 (65,8), 41 (16,5), 55 (14,7), 83 (14,4)

MS (EI, iontrap) (Diendiol II): 67 (100), 43 (59,9), 71 (44,5), 55 (24,7), 41 (20,8), 68 (18,3), 82 (17,5), 39 (14,8), 69 (11,1)



### 3.3.2 Synthese von 2,6-Dimethyl-2,7-octadien-1,6-diol (8-Hydroxylinalool)

Die Darstellung erfolgte nach bereits bekannten Synthesewegen (Schwab, 1989).



**Abbildung 50:** Strukturformeln des *cis*- und *trans*-8-Hydroxylinalool

#### Chemikalien:

m (Linalylacetat):	4,0101 g	(0,02 mol)
m (SeO <sub>2</sub> ):	1,1 g	
V (EtOH)	30 mL	

Ausbeute (Rohprodukt; 1. Reaktionsschritt) 4,6 g

Das Rohprodukt wurde im Anschluss mittels LiAlH<sub>4</sub> in THF reduziert.

Das Produkt wurde nach Reduktion in Aliquoten mittels Säulenchromatographie (Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$ ) durch Hexan/Ethylacetat (1:1; v:v) aufgereinigt.

Bei der Reduktion wurde nicht das komplette Rohprodukt eingesetzt. Es wurden aus dem Aliquoten Teil Rohprodukt 0,002 mol Produkt erhalten.

MS: 67 (100), 43 (95), 71 (71,7), 55 (38,2), 79 (36,8), 93 (33,4), 41 (31,2), 68 (24,4), 81 (23,5), 96 (23,5), 95 (19,2), 123 (5,6)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\sigma=1,27$  (3H, s, 10-H); 1,52-1,6 (2H, m, 4-H); 1,63 (3H, s, 9-H); 2,0-2,1 (2H, m, 5-H); 3,96 (3H, s, 8-H), 5,05 (1H, dd, 1a-H); 5,2 (1H, dd, 1b-H); 5,41 (1H, t, 6-H); 5,89 (dd, 1H, 2-H)

### 3.3.3 Synthese von [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellol

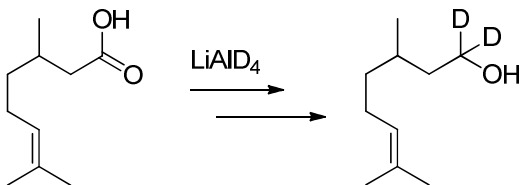


Abbildung 51: Synthese von [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellol

Die Synthese von isotopenmarkiertem Citronellol erfolgte durch Reduktion der Citronellylsäure mit Lithiumaluminiumdeuterid ( $\text{LiAlD}_4$ ) (Wüst et al., 1998).

Dazu wurde Citronellylsäure tropfenweise zu, mit  $\text{LiAlD}_4$  versetzter, etherischer Lösung gegeben. Das Ganze wurde eine Stunde unter Rühren gekocht. Nach dem Abkühlen wurde der Überschuss an  $\text{LiAlD}_4$  mit Wasser hydrolysiert und der Niederschlag mit verdünnter  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung gelöst. Das Produkt wurde mit 70 mL Diethylether ausgeschüttelt.

#### Chemikalien:

m(Citronellylsäure):	2,4812 g	(15 mmol)
m( $\text{LiAlD}_4$ in Diethylether, 1 M):	25 mL	(17,75 mmol)

15 mmol Edukt ergaben 9,65 mmol Produkt, was einer Ausbeute von 66 % entspricht.

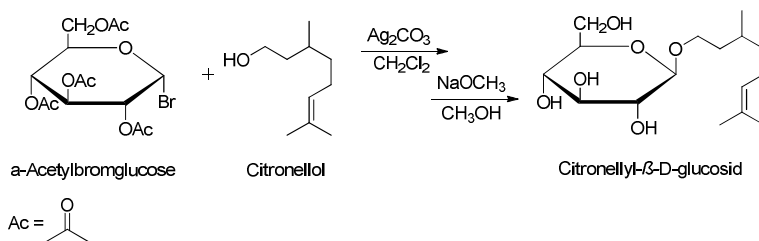
MS: 69 (100), 83 (81,4), 41 (59,5), 97 (42,3), 55 (34,4), 125 (17,8), 140 (9,8)

### **3.3.4 Synthese von Monoterpenyl- $\beta$ -D-glucosiden**

Die Glycosylierung von primären Terpenalkoholen zu den entsprechenden Monoterpenyl- $\beta$ -D-Glucosiden erfolgte nach der bereits etablierten „Koenigs-Knorr-Methode“ (Paulsen et

al., 1985). Alle hier durchgeführten Synthesen wurden nach dieser Methode synthetisiert.

Hierzu wurde das jeweilige Aglykon in Anwesenheit von Silbercarbonat mit  $\alpha$ -Acetylbromglucose umgesetzt. Die nucleophile Substitution ( $S_N2$ ) von Brom durch das Monoterpenol erfolgte bei Raumtemperatur in Dichlormethan in Abwesenheit von Licht und Sauerstoff unter Stickstoff-Atmosphäre. Das acetylierte Terpenglucosid wurde im Anschluss durch Natriummethylat in methanolischer Lösung deacetyliert (vgl. Abbildung 52).



**Abbildung 52: Koenigs-Knorr-Synthese am Beispiel von Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid**

Zur Synthese von Monoterpenyl- $\beta$ -D-glucosiden mit tertiären Terpenalkoholen wurde ein modifiziertes Koenigs-Knorr-Verfahren angewendet, bei dem anstatt Silbercarbonat Quecksilbercyanid als Katalysator verwendet wurde (Hattori et al., 2004). Die Deacetylierung erfolgte mittels Kaliumcarbonat in methanolischer Lösung.

Die Rohprodukte wurden mittels Flash-Chromatographie mit Kieselgel 60 als stationäre Phase und Hexan/Ethylacetat/Methanol (5:5:1; v:v) aufgereinigt.

### 3.3.4.1 (*E*)-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl $\beta$ -D-glucopyranosid (Geranyl- $\beta$ -D-glucosid)

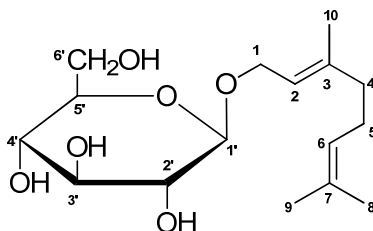


Abbildung 53: Geranyl- $\beta$ -D-glucosid

#### Chemikalien:

m (Geraniol):	329,8 mg
m ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ):	1,1573 g
m ( $\alpha$ -Acetylbromglucose)	1,8494 g

Das Produkt wurde anschließend über Säulenchromatographie mit Hexan/Ethylacetat/Methanol (5:5:1; v:v) aufgereinigt.

Ausbeute: 31 %

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\sigma=1,59$  (s, 3H, 9-H), 1,65 (s, 3H, 8-H), 1,67 (s, 3H, 10-H), 2,0-2,1 (m, 4H, 4-H, 5-H), 3,23-3,69 (m, 10H), 4,16-4,36 (m, 2H, 1-H), 5,05-5,09 (m, 1H, 1'-H), 5,32-5,39 (t, 1H, 2-H, 6-H)

### 3.3.4.2 (Z)-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl $\beta$ -D-glucoopyranosid (Neryl- $\beta$ -D-glucosid)

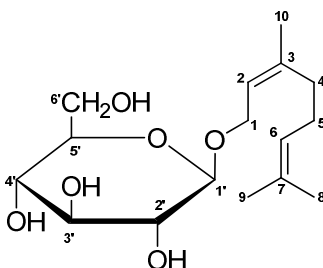


Abbildung 54: Neryl- $\beta$ -D-glucosid

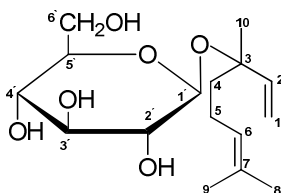
#### Chemikalien:

m (Nerol):	586,5 mg	(3,68 mmol)
m ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ):	2 g	
m ( $\alpha$ -Acetylbromglucose)	3,13 g	(7,6 mmol)
m (Molsieb, 3A)	1,6 g	

Das Produkt wurde anschließend über Säulenchromatographie mit Hexan/Ethylacetat/Methanol (5:5:1; v:v) aufgereinigt.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\sigma=1.58$  und  $1.66$  (2s, 6H; 8-H, 10-H),  $1.73$  (s, 3H, 9-H),  $2.04$ - $2.08$  (m, 4H, 4-H, 5-H),  $3.21$ - $3.90$  (m, 10H),  $4.15$ - $4.35$  (m, 2H, 1-H),  $5.0$ - $5.1$  (m, 1H, 1'-H),  $5.35$  (m, 1H, 2-H)

### 3.3.4.3 (*R,S*)-3,7-dimethyl-1,6-octadienyl $\beta$ -D-glucofuranosid (Linalyl- $\beta$ -D-glucosid)



**Abbildung 55: Linalyl- $\beta$ -D-glucosid**

#### Chemikalien:

m (Linalool):	2,5270 g
m ( $\text{Hg}_2(\text{CN})_2$ ):	4 g
m ( $\alpha$ -Acetylbromglucose)	2,5000 g
V (Acetonitril, trocken)	26 mL

Die Synthese von Linalyl- $\beta$ -D-glucosid erfolgte nach der modifizierten Koenigs-Knorr-Methode mit Quecksilbercyanid als Katalysator (Hattori et al., 2004).

Das acetylierte Rohprodukt wurde vor Deacetylierung mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (stationäre Phase:

Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$ ; mobile Phase: Hexan/Ethylacetat (4/1; v:v)).

Die Deacetylierung erfolgte mittels Kaliumcarbonat in wasserfreier methanolischer Lösung. Hierfür wurden 30 mmol Produkt in 60 mL Methanol (wasserfrei) gelöst und 3,2 mmol Kaliumcarbonat hinzugefügt. Der Ansatz wird 12 h bei RT gerührt.

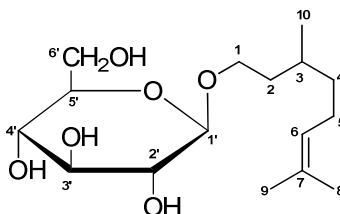
Das Produkt wurde anschließend wieder über Säulenchromatographie mit Hexan/Ethylacetat/Methanol (5:5:1; v:v) aufgereinigt.

Für die Reaktion wurden 0,016 mol Edukt eingesetzt. Es wurden davon 1015 mg acetyliertes Rohprodukt aufgereinigt. Hiervon ergaben sich 0,5 mmol Produkt (Linalyl- $\beta$ -D-glucosid).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\sigma=1.57$  und  $1.66$  (2s, 6H; 8-H, 10-H),  $1.31$  (s, 3H, 9-H),  $1.62$  (m, 2H, 4-H)  $1.89$ - $2.04$  (m, 2H, 5-H),  $3.31$ - $3.85$  (m, 9H),  $4.11$  (m, 1H, 1'-H),  $5.05$  (t, 1H, 6-H)  $5.10$ - $5.26$  (2H, m, 1-H),  $5.82$  (dd; 1H, 2-H),  $5.96$  (dd, 1H, 2-H)



### 3.3.4.4 (3*R*,3*S*)-3,7-dimethyl-6-octenyl $\beta$ -D-glucopyranosid (Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid)



**Abbildung 56: Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid**

#### Chemikalien:

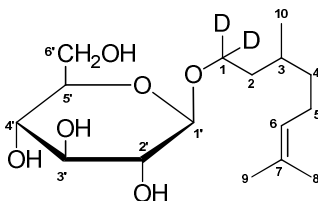
m (Citronellol):	506 mg
m ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ):	1,7258 g
m ( $\alpha$ -Acetylbromglucose)	2,5540 g
m (Molsieb, 3 A)	1,4 g

Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie mit Kieselgel 40-63  $\mu\text{m}$  (Normalsil 60) als stationärer Phase und Hexan/Ethylacetat/Methanol (5/5/1; v:v) aufgereinigt.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\sigma=0,92$  (d, 3H, 9-H); 1,62 und 1,70 (2s, 6H, 8- und 10-H); 1,9-2,0 (m, 2H); 3.27-4,0 (m, 12H); 4.34 (d, 1H,  $J=6,1$  Hz, 1'-H ); 5.08 (t, 1H, 6-H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 17,6; 19,5; 25,4; 25,7; 29,5; 36,5; 37,2; 61,1; 68,9; 69,0; 73,2; 75,5; 76,2; 102,7; 124,6; 131,9

### 3.3.4.5 1,1-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- (3*R*,3*S*)-3,7-dimethyl-6-octenyl β-D-glucopyranosid (1,1-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Citronellyl-β-D-glucosid)



**Abbildung 57:** [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Citronellyl-β-D-glucosid

#### Chemikalien:

m (1,1-[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Citronellol):	509,5 mg
m (Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ):	1,7767 g
m (α-Acetylbromglucose)	2,5062 g
m (Molsieb, 3 A)	1,5111 g

Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie mit Kieselgel 40-63 μm (Normalsil 60) als stationärer Phase und Hexan/Ethylacetat/Methanol (5/5/1; v:v) aufgereinigt.

3,22 mmol Edukt ergaben 1,61 mmol Produkt, was einer Ausbeute von 50 % entspricht.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): σ=0,88 (d, 3H, 9-H); 1,58 und 1,66 (2s, 6H, 8- und 10-H); 1,1-1,57 (m, 5H); 1,9-2,0 (m, 2H, 5-H), 3.15-3.9 (m, 7H); 4.29 (d, 1H, J=7,8 Hz); 5.09 (t, 1H, 6-H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 17,6; 19,4; 25,4; 25,7; 29,5; 36,2;  
37,2; 60,4; 73,3; 75,5; 76,3; 102,5; 124,5; 131,2

### 3.3.4.6 (2E)2,6-Dimethyl-2,7-octadien-1,6-diol- $\beta$ -D-glucopyranosid (8-Hydroxylinalyl- $\beta$ -D-glucosid)

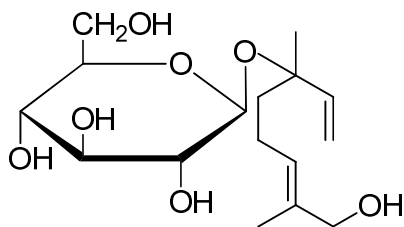


Abbildung 58: 8-Hydroxylinalyl- $\beta$ -D-glucosid

#### Chemikalien:

m (8-Hydroxylinalool):	248 mg (0,0015 mol)
m ( $\text{Hg}_2(\text{CN})_2$ ):	410 mg
m ( $\alpha$ -Acetylbromglucose)	200 mg

8-Hydroxylinalool wurde, wie in 3.3.2 beschrieben, synthetisiert. Analog zum Linalyl- $\beta$ -D-glucosid erfolgte auch hier die Synthese nach der modifizierten Koenigs-Knorr-Reaktion (Hattori et al., 2004).

Die Deacetylierung erfolgte in 10 mL 60 % MeOH und Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  Ammoniak (25 %). Der Ansatz wurde insgesamt 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 12 h wurden erneut

100 µL Ammoniak hinzugegeben. Es wurden 467,1 mg Rohprodukt erhalten.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie mit Kieselgel 40-63 µm (Normalsil 60) als stationärer Phase und Hexan/Ethylacetat (1/2; v:v) aufgereinigt. Es wurden 35 mg Produkt erhalten.

0,0015 mol Edukt ergaben 0,0001 mol Produkt, was einer Ausbeute von 10 % entspricht.

Eine NMR-Messung war aufgrund der zu geringen Ausbeute nicht möglich. Das erhaltene Produkt wurde dennoch mittels LC-MS/MS charakterisiert. Es zeigten sich jedoch plausible MRM-Übergänge von  $m/z$  331→119 bzw. 179. Die Wahl des Katalysators begünstigt die Glycosylierung an der tertiären Hydroxylgruppe. Es ist also davon auszugehen, dass die Bindung an dieser Position (vgl. Abbildung 58) erfolgte.

### **3.4 Probenaufarbeitung zur Bestimmung von freien und gebundenen Terpenen in verschiedenen Geweben mittels GC-MS bzw. LC-MS/MS**

Die Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden wurden in Geweben wie Beerenhäuten, Blüten, Blättern und Wurzeln bestimmt. Für die Terpenanalyse wurden 10 g Beerenhäute bzw. 4 g der anderen Gewebe benötigt. Die Trauben wurden zunächst geschält und die Beerenhäute von

anhaftendem Fruchtfleisch und Zellsaft befreit. Das Probenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff zu einem homogenen Pulver vermahlen und mit einer Phosphatpufferlösung (0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7) und 13% Ethanol unter Licht- und Sauerstoffausschluss extrahiert (24h, RT) (Jesús Ibarz et al., 2006). Zur Bestimmung von freien Terpenen wurde 2-Octanol als interner Standard eingesetzt. Für die Bestimmung von Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden wurde eine Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse angewendet, indem [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid als Interner Standard eingesetzt wurde (vgl. Tabelle A 5). Die Konzentration an zugesetztem Standard hing vom Reifegrad sowie der Art des Probenmaterials ab und musste dementsprechend angepasst werden. 2-Octanol wurde in Mengen von 0,3-6,8 mg/kg Probenmaterial, [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid in Konzentrationen von 0,1-3,5 mg/kg Probenmaterial zugesetzt. Carrez-Reagenzien (Carrez I und II je 1 mL) wurden zur Abtrennung von Proteinverbindungen hinzugefügt und der auftretende Niederschlag zusammen mit anderen Rückständen und Trubstoffen der Extraktion durch Zentrifugation abgetrennt (14500 rpm, 20 min, 5 °C).

Der klare Überstand wurde mittels Festphasenextraktion (SPE) aufgereinigt und aufkonzentriert. Durch Einsatz verschiedener Lösungsmittel wurden freie Terpene von gebundenen Terpenen getrennt.

Hierzu wurden folgende Bedingungen gewählt (vgl. Tabelle 14) (Piñeiro et al., 2004):

Festphasensäulenmaterial: Lichrolut EN, 200 mg, Merck

**Tabelle 14: Durchführung der Festphasenextraktion**

1. Konditionierung	4 mL Dichlormethan, 4 mL Methanol, 4 mL Ethanol (12 %, v:v)
2. Beladung	Probe auf die Säule geben
3. Waschschritt	10 mL Wasser, im Anschluss trocknen
4. Elution	2 mL Dichlormethan (freie Terpene), 2 mL Methanol (gebundene Terpene)

Nach der Elution wurde der Dichlormethanextrakt mit Natriumsulfat getrocknet, auf etwa 200  $\mu$ L im leichten Stickstoffstrom eingengt und mittels GC-MS gemessen. Für die direkte Bestimmung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside mittels LC-MS/MS wurde der Methanolextrakt filtriert (Membranfilter, regenerierte Cellulose, 0,45  $\mu$ m) und mit Hilfe des Rotationsverdampfers bis zur Trockne eingengt. Im Anschluss wurde der Rückstand in 200  $\mu$ L ACN/H<sub>2</sub>O (50:50, v:v) aufgenommen.

### **3.5 Hydrolyse der Monoterpen- $\beta$ -D-glycoside sowie der gesamten Glycoside**

#### **3.5.1 Enzymatische Hydrolyse**

Zur Bestimmung der gesamten gebundenen Monoterpen- $\beta$ -D-glycoside wurde hier der methanolische Extrakt nach SPE-Aufreinigung bis zur Trockne eingeeengt, in 20 mL Citrat-HCl-Puffer (0,1 Mol, pH 4) aufgenommen, 2-Octanol als Interner Standard und 50 mg des Enzyms AR 2000 hinzugefügt. Im Anschluss wurde die Mischung 24 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach der enzymatischen Hydrolyse wurden die freigesetzten Terpene mit 20 mL tert-Butylmethylether (MTBE) ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und im leichten Stickstoffstrom auf ca. 200  $\mu$ L eingeeengt. Im Anschluss wurden diese Extrakte mittels GC-MS gemessen.

#### **3.5.2 Überprüfung der Ausbeute der enzymatischen Hydrolyse**

Mit Hilfe der synthetisierten Standards wurde die Ausbeute der enzymatischen Hydrolyse kontrolliert. Es wurde die Menge und Art des eingesetzten Enzyms optimiert, indem die Enzympräparate AR 2000 und Glucanex eingesetzt und die Ansätze mit jeweils 50 mg und 100 mg Enzympräparationen durchgeführt wurden. Weiterhin wurde die Hydrolyseausbeute

bei einer höheren Temperatur (40 °C) als Raumtemperatur überprüft.

Hierzu wurden 50 µL der Stammlösung (0,5 mg/mL) in 20 mL Citrat-HCl-Puffer (pH 4) gelöst. Jeder Analyt wurde einzeln enzymatisch hydrolysiert, damit etwaige Umlagerungsreaktionen durch Einsatz der Enzympräparate leichter nachweisbar waren und den Analyten zuzuordnen waren. Die Ansätze wurden, wie in 3.5.1 beschrieben, nach 24 h weiter aufgearbeitet.

### **3.5.3 Säurekatalysierte Hydrolyse**

#### **3.5.3.1 Säurekatalysierte Hydrolyse von Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid**

Zur sauren Spaltung von Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid wurde dieses mit HCl (2 mL, 0,1 M, pH 1) eine Stunde bei 100 °C unter Rühren hydrolysiert (Skouroumounis und Sefton, 2000). Die Detektion erfolgte mittels SPME-GC-MS.

#### **3.5.3.2 Säurekatalysierte Hydrolyse von Linalyl- $\beta$ -D-glucosid**

Linalyl- $\beta$ -D-glucosid wurde bei mildereren pH-Bedingungen (pH 3) mittels 0,03 M Tatratt-Puffer eine Stunde bei 100°C unter Rühren hydrolysiert (Mateo et al., 1997). Auch hier erfolgte die Detektion mittels SPME-GC-MS.



### **3.6 Wiederfindung der freien Monoterpene und Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside nach der Festphasenextraktion**

Zur Überprüfung der Wiederfindung wässriger Monoterpen- $\beta$ -D-glucosid Standardlösungen nach SPE-Aufreinigung wurden Stammlösungen ausgewählter Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside in Konzentrationen von 0,1 mg/mL in Methanol angesetzt. Im Anschluss wurden 500  $\mu$ L der Geranyl-, Neryl- und Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid Stammlösungen in einem Phosphatpuffer (0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7)/Ethanol-Gemisch gelöst. Das Volumen des Puffer/Ethanol-Gemisches entsprach dem Volumen, das für eine Einwaage von 10 g benötigt wird. Die SPE wurde gemäß 3.4 durchgeführt und auch hier der methanolische Extrakt bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1; v:v) aufgenommen, in einen 5 mL Messkolben überführt, 50  $\mu$ L Octyl- $\beta$ -D-glucosid (1 mg/mL) als Interner Standard hinzugefügt und aufgefüllt. Um weitere Aufarbeitungseinflüsse und weitere Analytverluste zu vermeiden, wurde auf eine enzymatische Hydrolyse verzichtet. Die Analyse der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside erfolgte mittels LC-MS/MS. Zur Berechnung der Wiederfindungsraten wurden Einpunktkalibrierungen durchgeführt, indem Referenzstandardlösungen der Konzentration 0,01 mg/mL mittels LC-MS/MS vermessen wurden.

Für die Bestimmung von freien Terpenen wurde als Matrix ein Modellsaft erstellt. Dieser wurde gemäß der amtlichen

Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00.106 angesetzt (2006). Zu 25 mL des Modellsaftes wurden 100 µL einer Standardlösung (0,01 mg/mL) zugesetzt, die die Analyten Linalool, Geraniol, Citronellol sowie den Internen Standard 2-Octanol enthielten.

Die Festphasenextraktion sowie die weitere Aufarbeitung wurde, wie in 3.4 beschrieben, durchgeführt.

### **3.7 Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden mittels MALDI-TOF-MS**

Für die Bestimmung von Terpen- $\beta$ -D-glucosiden in Weinbeerenhäuten wurde eine übliche Extraktion von ca. 10 g Beerenhäuten durchgeführt und eine SPE angeschlossen (vgl. 3.4.). Das Eluat von 2 mL Methanol wurde für die weitere Probenaufarbeitung verwendet. Weiterhin wurden zwei Standards (Geranyl- und Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid sowie [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid) mittels MALDI-TOF-MS vermessen.

Ansatz der Matrix (Nasi et al., 2008):

Ein Gemisch aus  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (2:8; v:v) und 0,1 % Trifluoressigsäure wurde angesetzt und in 1 mL dieses Gemisches wurden 5 mg Hydroxyzimtsäure gelöst.

### Ansatz der Probenlösungen:

Gewürztraminer-Extrakt: 300 µL Aliquot auf 75 µL Matrix

Standards: 0,5 mg Analyt auf 50 µL Matrix

Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils auf die Messplatte aufgegeben, im Vakuum getrocknet und im Anschluss mittels MALDI-TOF-MS vermessen (siehe 3.10.5).

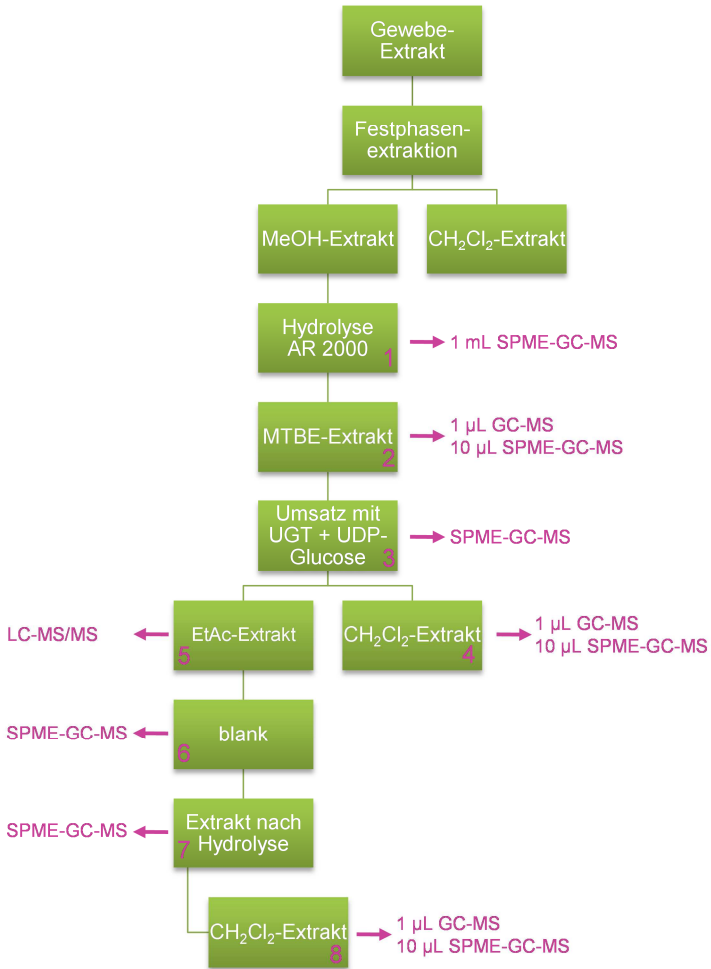
### **3.8 Activity-Based Metabolomic Profiling (ABMP)**

Für das „Activity-Based Metabolomic Profiling“ wurden Extrakte einer terpenreichen Rebsorte verwendet. Basierend auf den Gehaltsmessungen aus dem Jahre 2011 wurde der Gewürztraminer des zweiten (8 Wochen nach Blüte) und letzten Erntetermines (18 Wochen nach Blüte) aus 2012 ausgewählt. Die potentiellen Glycosyltransferasen VvGT7, VvGT14 sowie VvGT15 wurden in Anwesenheit von UDP-Glucose mit dem jeweiligen Extrakt umgesetzt. Weiterhin wurde die VvGT7 mit einem Muskateller-Beerenhautextraktes, 15 Wochen nach Blüte, aus dem Jahre 2011 umgesetzt (Friedericke Bönisch, Biotechnologie der Naturstoffe, TU München). Die Extrakte enthielten die extrahierten glycosidischen Verbindungen, die durch eine enzymatische Hydrolyse freigesetzt wurden.

Es wurde wie folgt verfahren:

A) Bereitstellung des Extraktes und Messung der glycosidisch gebundenen Verbindungen vor dem Umsatz mit den jeweiligen Glycosyltransferasen

Zur Herstellung des Extraktes mussten die im Extrakt enthaltenen, gebundenen Verbindungen zunächst über SPE angereichert werden und im Anschluss enzymatisch freigesetzt werden, damit diese dann als freigesetzte Aglykone für die jeweiligen Glycosyltransferasen zur Verfügung standen. Hierzu wurden die ausgewählten Proben, wie in 3.5.1 beschrieben, aufgearbeitet. Der nach SPE erhaltene methanolische Extrakt wurde zunächst mittels AR 2000 hydrolysiert (siehe Abbildung 59, Nr. 1). Nach Hydrolyse wurde ein Aliquot von 1 mL mittels SPME-GC-MS vermessen. Der restliche Hydrolyseansatz wurde mit MTBE ausgeschüttelt und sowohl als 1  $\mu$ L Flüssiginjektion nochmals mittels GC-MS als auch als verdampfter 10  $\mu$ L-Ansatz (von einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ L) mittels SPME-GC-MS vermessen (siehe Abbildung 59, Nr. 2). Im Anschluss wurden die MTBE-Extrakte mit den jeweiligen Glycosyltransferasen und UDP-Glucose umgesetzt (TU München).



**Abbildung 59: Probenaufarbeitungsschema für das „Activity-Based Metabolomic Profiling“**

Die genommenen Messpunkte sowie die Art der Messung sind in pink gekennzeichnet.

B) Umsatz der verschiedenen Glycosyltransferasen mit den freigesetzten Aglykonen des Extraktes in Anwesenheit von UDP-Glucose

Die Genexpression potentieller Monoterpen-GTs sowie der Umsatz dieser mit den jeweiligen Beerenhautextrakten und UDP-Glucose wurden an der TU München (TU München) durchgeführt.

C) Detektion nicht umgesetzter, freier Verbindungen und Trennung der freien und gebundenen Analyten über die Flüssig-/Flüssigextraktion

Nach Umsatz mit den jeweiligen potentiell aktiven GTs (Probengesamtvolumen ca. 200  $\mu$ L) wurden die nicht umgesetzten, noch frei vorliegenden Terpene in den Extrakten zunächst mittels SPME-GC-MS vermessen (siehe Abbildung 59, Nr. 3) und im Anschluss mit Dichlormethan (2x 200  $\mu$ L) extrahiert (siehe Abbildung 59, Nr. 4). Zum Extrahieren der gebundenen Terpene wurde der Extrakt daraufhin zweifach mit jeweils 200  $\mu$ L EtAc ausgeschüttelt und mit Wasser gewaschen. Die vereinigten EtAc-Phasen wurden im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt und in MeOH aufgenommen (siehe Abbildung 59, Nr. 5).

#### D) Detektion gebundener Verbindungen mittels LC-MS/MS

Die vorliegende MeOH-Phase wurde mittels LC-MS/MS vermessen (siehe Abbildung 59, Nr. 5). Im Anschluss wurde der Extrakt zur Trockne eingedampft und es wurde mittels SPME-GC-MS die Abwesenheit von freien Terpenen überprüft (siehe Abbildung 59, Nr. 6).

#### E) Enzymatische Hydrolyse der gebundenen Verbindungen und die Detektion der freigesetzten Aglykone mittels GC-MS

Danach wurde dieser durch Zugabe von 2 mL Citrat-HCl-Puffer und 20 mg AR 2000 enzymatisch hydrolysiert (24 h, RT). Nach der Hydrolyse wurden die freigesetzten Terpene zunächst mittels SPME-GC-MS gemessen (siehe Abbildung 59; Nr. 7), im Anschluss mit Dichlormethan extrahiert und der Extrakt sowohl als 10 µL Aliquot via SPME-GC-MS als auch als Flüssiginjektion vermessen (siehe Abbildung 59; Nr. 8).

#### Verwendete Blindwerte

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen der oben genannten Extrakte nach Hydrolyse sowie Blindwerte gemessen, damit falsch positive Signale aus der Matrix ausgeschlossen werden

konnten. Diese Blindwerte enthielten die jeweilige Glycosyltransferase sowie die UDP-Glucose.

Für die zusätzlichen Messungen mit dem Gewürztraminer-Extrakt des frühen Lesetermins wurde ein Blindwert vermessen, der neben der UDP-Glucose sowie der GT auch Beerenhautextrakt enthielt, bei dem jedoch die zugesetzte GT durch vorherige Hitzebehandlung inaktiviert wurde.

### **3.9 Enantioselektive Analysen der Glycosyltransferasen**

Zur Bestimmung der Enantioselektivität der Glycosyltransferasen VvGT7, VvGT14 und VvGT15 wurde racemisches Citronellol bzw. Linalool mit UDP-Glucose in Anwesenheit der jeweiligen GT umgesetzt (TU München). Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurden alle Messungen mittels SPME-GC-MS und nicht über Flüssiginjektionen durchgeführt.

Nach der Umsetzung wurde zunächst nicht-umgesetztes, freies Substrat gemessen und im Anschluss dieses durch Extraktion mittels Dichlormethan entfernt. Eine Abwesenheit freier Substrate wurde durch erneute SPME-GC-MS Messung überprüft.

Im Anschluss wurde das verbleibende Monoterpen- $\beta$ -D-glucosid säurehydrolytisch gespalten (vgl. 3.5.3). Im Falle des Linalyl- $\beta$ -D-glucosids wurde eine herkömmliche enzymatische



Hydrolyse zur Freisetzung des Linalool angewendet (2 mL Citrat-Puffer, 20 mg AR 2000).

### 3.10 Chromatographiesysteme und Detektionsmethoden

#### 3.10.1 GC-MS System

**Tabelle 15: GC-MS System**

---

Gaschromatograph	Varian Saturn 3900 GC
Injektor	Split/Splitless Injektor, 220 °C
Säule	Phenomenex Zebron ZB-WAXplus (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Temperaturprogramm	60 °C (3 min) // 10 °C/min→250 °C (5 min)
Trärgas	Helium, Fluss 1 mL/min
Detektor	Varian Saturn 2100T-MS ion-trap
Ionisierung	Electron impact ionization (EI), 70 eV Ionisierungsenergie; trap-Temperatur 170 °C
Software	Varian Workstation

---

Die Split-Einstellungen wurden je nach Probenart und Reifegrad gewählt. Alle Chromatogramme wurden im „Full Scan“ Modus mit m/z 40-300 aufgenommen und im SIM (*selected ion monitoring*) Modus auf den spezifischen Ionenspuren der jeweiligen Analyten ausgewertet (vgl. Tabelle A 4).

### 3.10.2 Solid Phase Microextraction (SPME) System

Die Bedingungen für das GC-MS System sind äquivalent zu 3.10.1.

**Tabelle 16: Solid Phase Microextraction (SPME)**

---

Agitator-Temperatur	60 °C
Inkubationszeit	30 min
Schütteln während der Inkubation	500 rpm
Extraktionszeit	10 min
Desorptionszeit	15 min
Fasermaterial	Polyacrylat 35 µm Film, Supelco (Bellefonte, USA)

---

### 3.10.3 Enantio-GC-MS System

**Tabelle 17: Enantio-GC-MS System**

---

Gaschromatograph	Varian GC-450
Injektor	Split/Splitless Injektor, 250 °C
Säule	DiAc $\beta$ (heptakis-(2,3-di-O-acetyl-6-O-tert.-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -cyclodextrin) (26 m x 0,32 mm x 0,1 µm)
Temperaturprogramm	70 °C(3 min)//0,5 °C/min→130 °C//20 °C/min→200 °C (3 min)

---

---

Trägergas	Helium, Fluss 1 mL/min
Detektor	Varian MS-240 ion-trap
Ionisierung	Electron impact ionization (EI), 70 eV Ionisierungsenergie; trap-Temperatur 170 °C
Software	Varian Workstation

---

Die Split-Einstellungen wurden je nach Probenart und Reifegrad gewählt. Alle Chromatogramme wurden im „Full Scan“ Modus mit m/z 40-300 aufgenommen und im SIM (selected ion monitoring) Modus auf den spezifischen Ionenspuren der jeweiligen Analyten ausgewertet.

### 3.10.4 LC-MS/MS System

**Tabelle 18: HPLC-MS/MS System**

---

HPLC-System	HP 1050 HPLC mit manuellem Rheodyne-Ventil, Probenschleife 10 µL
HPLC-System (seit Januar 2013)	Shimadzu LC 20 AD mit gekoppeltem Autosampler SIL-20 AHT
Säulenofen	40 °C
Säule	Phenomenex Gemini-NX C18, 250 x 3 mm, 4 µm

---

---

Fluss	0,4 mL/min
Gradientenelution	Linearer Gradient H <sub>2</sub> O/ACN (7:3; v:v) mit 0,2 % NH <sub>3</sub> bis 12 min// H <sub>2</sub> O/ACN (4:6; v:v) mit 0,2 % NH <sub>3</sub> bis 18 min
Detektor	API 2000 Quadrupol MS (Applied Biosystems, AB Sciex)
Ionisierung	Electrospray-Ionisierung (ESI, negative Ionisierung, Heater probe 450 °C, N <sub>2</sub> als Curtain, Nebulizing und Collision Gas)
Software	Analyst 1.4.2 (AB Sciex), seit Dezember 2012 Analyst 1.6.1 (AB Sciex)

---

Zur Detektion von Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden wurden die synthetisierten Referenzstandards zunächst manuell auf ihre maximalen Anregungspotentiale eingestellt und ihre charakteristischen MRM-Übergänge ermittelt. (Cole et al., 1989; Salles et al., 1991a) Im Anschluss wurde hieraus eine Methode für die vier Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside mit jeweils zwei charakteristischen MRM-Übergängen pro Analyt geschrieben (vgl. Tabelle A 6).

### 3.10.5 MALDI-TOF-MS System

**Tabelle 19: MALDI-TOF-MS System**

---

MALDI-TOF-MS System	Axima Confidence (Shimadzu Biotech)
Messmodus	curve field reflectron TOF mode
Laser	Stickstoff Laser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ )
Power	70
Profiles	500
Shots	20
Software	Launchpad 2.8
Mass Resolution	>14000 fwhm

---

## 4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine SIVA-LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden entwickelt. Hierzu wurden käuflich nicht erhältliche Standards synthetisiert. Zur optimalen Methodenentwicklung wurden die Monoterpen- $\beta$ -D-glucosid-Standards weiterhin mittels LC-MS/MS sowie MALDI-TOF-MS charakterisiert. Neben der Analyse mittels LC-MS/MS ergab die MALDI-TOF-MS Analyse vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf eine schnelle Analysenmethode ohne ein vorangeschaltetes Trennsystem wie eine GC- oder HPLC-Trennung. Die gängige Analyse der gebundenen Terpene nach enzymatischer Hydrolyse und Messung der freigesetzten Aglykone mittels GC-MS ermöglichte die Bestimmung der Gesamtglycoside. Allerdings bestehen bei dieser Technik Schwachstellen, die eine exakte Analyse der gebundenen Terpene erschweren. Zum einen verläuft die enzymatische Hydrolyse nicht vollständig und ist stark abhängig vom jeweils eingesetzten Enzympräparat. Zum anderen können etwaige Umlagerungsreaktionen die originäre Zusammensetzung des Terpenprofils verfälschen. Die säurekatalysierte hydrolytische Spaltung ist hier nicht als Alternative anzusehen, da im stärkeren Maße Umlagerungsreaktionen auftreten können.

Mit der erstellten LC-MS/MS-Methode wurden verschiedene Pflanzengewebe (Häute, Blätter, Gescheine sowie Wurzeln) von fünf Rebsorten während des Reifeverlaufs auf ihre Monoterpen- und Monoterpenglucosidgehalte hin analysiert. Durch Wahl charakteristischer MRM-Übergänge konnten weitere Glycoside wie Polyol-glucoside oder Terpendisaccharide in Weinbeeren nachgewiesen werden.

Die direkte Analyse der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside wurde besonders im Hinblick auf die Charakterisierung der Monoterpenylglucosyltransferasen entwickelt.

Die Anwendung des „Activity-Based Metabolomic Profiling“ erlaubte die Identifizierung möglicher natürlicher Substrate der rekombinanten Monoterpenylglucosyltransferasen in Verbindung mit GC-MS und LC-MS/MS-Techniken.

## 5. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine LC-MS/MS Methode mit stabilisotopen-markiertem Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid entwickelt.

Durch Messung charakteristischer Übergänge der Terpendisaccharide konnten Signale in den Extrakten der Weinpflanze nachgewiesen werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit diesen Analyten zugeordnet werden können. Zur sicheren Identifizierung sollte ein Abgleich mit entsprechend synthetisierten Standards erfolgen, die bislang käuflich nicht erhältlich sind.

Die potentiellen natürlichen Substrate der VvGT7 konnten bislang noch nicht identifiziert werden. Terpene wurden zwar bei *in vitro* Messungen und Umsatz mit jeweils einem Analyten umgesetzt, jedoch konnte beim „Activity-Based Metabolomic Profiling“ außer gegenüber Geranylsäure keine weitere Aktivität gegenüber Terpenen nachgewiesen werden.



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufige Monoterpene in <i>Vitis vinifera</i> , mit Angabe ihrer Geruchsschwellenwerte und –eindrücke (Rychlik et al., 1998).....	3
Abbildung 2: Die Isopren-Einheit, das Grundgerüst der Terpene.....	5
Abbildung 3: Die Biosynthese der Terpene .....	8
Abbildung 4: Monoterpenglycoside in <i>Vitis vinifera</i> .....	13
Abbildung 5: Säurekatalysierte Umlagerungsreaktionen der Diendiole.....	17
Abbildung 6: Andere Substanzklassen, die in <i>Vitis vinifera</i> glycosidisch gebunden vorkommen können .....	18
Abbildung 7: Schema der Glycosylierungsreaktion, katalysiert durch eine Glycosyltransferase (GT).....	20
Abbildung 8: Uridindiphosphat (UDP)- Glucose .....	21
Abbildung 9: 3D-Struktur der VvGT1 mit UDP-Glucose und Quercetin im aktiven Zentrum (pdb: 2C9Z) .....	22

Abbildung 10: Strukturformeln der synthetisierten Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden .....	39
Abbildung 11: Reaktionsmechanismus der Koenigs-Knorr- Reaktion.....	40
Abbildung 12: Vorgeschlagener Mechanismus der Reduktion von Citronellylsäure zum [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellol.....	41
Abbildung 13: Strukturformeln der synthetisierten Monoterpendiole .....	42
Abbildung 14: Reaktionsmechanismus der Diendiol I- und Diendiol II- Synthese .....	43
Abbildung 15: Reaktionsmechanismus der 8-Hydroxylinalool- Synthese.....	44
Abbildung 16: Ein- und Zweistufiger enzymatischer Hydrolysemechanismus .....	46
Abbildung 17: Nebenaktivität nach Spaltung von Geranyl- $\beta$ -D- glucosid mit Glucanex .....	49
Abbildung 18: Umlagerungsreaktionen von ( <i>R</i> )-Linalool unter sauren pH-Bedingungen.....	52

Abbildung 19: Fragmentierung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside mittels negativer ESI-MS/MS.....	58
Abbildung 20: Fragmentierungsmechanismus zur Generierung des Fragmentes m/z 179 am Beispiel des Neryl- $\beta$ -D-glucosids .....	60
Abbildung 21: MALDI-TOF-MS Chromatogramm verschiedener Standards sowie eines Gewürztraminer-Extraktes.....	64
Abbildung 22: LC-MS/MS Chromatogramm eines Gelben Muskateller Beerenhautextraktes .....	66
Abbildung 23: LC-MS/MS Chromatogramm eines Gelben Muskateller Beerenhautextraktes mit optimierter HPLC-Methode.....	68
Abbildung 24: Strukturen der eingesetzten internen Standards für die LC-MS/MS Bestimmung .....	70
Abbildung 25: Struktur des 8-Hydroxylinalyl- $\beta$ -D-glucosids ...	71
Abbildung 26: Mögliche Terpendiolglycoside in einem Muskatellerextrakt .....	73

Abbildung 27: LC-MS/MS Chromatogramm eines Gewürztraminer-Extraktes mit Markierung möglicher Terpenapiosyl- und Terpenarabinosylglycoside.....	75
Abbildung 28: Mögliches Fragmentierungsmuster am Beispiel des Linalylapiofuranosylglucosids und – arabinofuranosylglucosids; $[M-H]^- = 447$ .....	76
Abbildung 29: LC-MS/MS Chromatogramm eines Muskatellerextraktes mit Markierung möglicher Terpenapiosyl-, Terpenarabinosylglycoside und -rutoside. ....	78
Abbildung 30: Mögliches Fragmentierungsmuster am Beispiel des Linalylrutosids; $[M-H]^- = 461$ .....	79
Abbildung 31: Probenaufarbeitung verschiedener Gewebe aus <i>Vitis vinifera</i> zur Bestimmung freier und gebundener Monoterpene.....	87
Abbildung 32: Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in terpenreichen Rebsorten .....	90
Abbildung 33: Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in terpenarmen Rebsorten.....	92
Abbildung 34: Freie Terpene und Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside in Gescheinen während der Blüte .....	96

Abbildung 35: Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside in Blättern während des Alterungsprozesses .....	99
Abbildung 36: Freie Terpene und Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside in verschiedenen Rebsorten.....	100
Abbildung 37: Gesamtgehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in Gewürztraminer 11-18 Gm .	102
Abbildung 38: 3D gemodelte Struktur der VvGT14 (TU München).....	104
Abbildung 39: Nachweis der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside durch Umsatz mit VvGT7 .....	106
Abbildung 40: Nachweis der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside nach Umsetzung durch verschiedene GTs mittels LC-MS/MS .....	108
Abbildung 41: Enantioselektive GC-MS Analyse der VvGT7 gegenüber Citronellol .....	110
Abbildung 42: Enantioselektive GC-MS Analyse der VvGT14 und VvGT15 gegenüber Citronellol .....	112
Abbildung 43: Enantioselektive Analyse der VvGT14 gegenüber Linalool .....	113

Abbildung 44: Racemisches Linalyl- $\beta$ -D-glucosid nach enzymatischer Hydrolyse mit AR 2000.....	115
Abbildung 45: Probenaufarbeitungsschema zur Identifizierung potentieller, natürlicher Substrate durch Anwendung des ABMP.....	118
Abbildung 46: Bestimmung freier Geranylsäure in Beerenhäuten .....	120
Abbildung 47: Detektion potentieller natürlichen Substrate der VvGT14 und VvGT15 mittels LC-MS/MS und GC-MS.....	121
Abbildung 48: Identifizierung möglicher natürlicher Substrate der VvGT14 mittels SPME-GC/MS Detektion .....	124
Abbildung 49: Strukturformeln des Diendiol I und Diendiol II .....	132
Abbildung 50: Strukturformeln des <i>cis</i> - und <i>trans</i> -8-Hydroxylinalool .....	133
Abbildung 51: Synthese von [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellol .....	134
Abbildung 52: Koenigs-Knorr-Synthese am Beispiel von Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid .....	136
Abbildung 53: Geranyl- $\beta$ -D-glucosid .....	137

Abbildung 54: Neryl- $\beta$ -D-glucosid .....	138
Abbildung 55: Linalyl- $\beta$ -D-glucosid.....	139
Abbildung 56: Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid .....	141
Abbildung 57: [ $^2\text{H}_2$ ]-Citronellyl- $\beta$ -D-glucosid.....	142
Abbildung 58: 8-Hydroxylinalyl- $\beta$ -D-glucosid .....	143
Abbildung 59: Probenaufarbeitungsschema für das „Activity-Based Metabolomic Profiling“ .....	153

## **Abbildungsverzeichnis (Anhang)**

Abbildung A 1: Blätter der Rebsorten Gewürztraminer 11-18 Gm (A) und des Weißen Rieslings 239-34 Gm (B) .....	200
Abbildung A 2: Gescheine des Gewürztraminers 11-18 Gm (A) und des Weißen Rieslings 239-34 Gm (B).....	201

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Methoden zur Bestimmung von glycosidisch gebundenen Monoterpenen (verändert nach (Jeleń et al., 2012)) .....	30
---	----

Tabelle 2: Hydrolyseaktivität der Enzympräparate AR 2000 und Glucanex zur Spaltung der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside (n=2) .....	47
Tabelle 3: Verschiedene MS/MS Messmodi .....	54
Tabelle 4: Charakteristische Übergänge und Addukte der Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside .....	55
Tabelle 5: Effekt von Ammoniak auf die Ionisierung der Terpen- $\beta$ -D-glucoside .....	56
Tabelle 6: Charakteristische MRM-Übergänge der Terpenglycoside (negative ESI-MS/MS) .....	62
Tabelle 7: Adaption der Parameter an den HPLC-Fluss der LC-MS/MS Methode .....	69
Tabelle 8: Kalibrierungsdaten der entwickelten LC-MS/MS Methode .....	81
Tabelle 9: Abschätzung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Terpen- $\beta$ -D-glucoside in Beerenhäuten .....	83
Tabelle 10: Wiederfindungsraten wässriger Monoterpen- und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosid- Standardlösungen nach der Festphasenextraktion .....	84



Tabelle 11: Monoterpensubstrate der exprimierten Glycosyltransferasen .....	105
Tabelle 12: Gewebe und Lesetermine .....	127
Tabelle 13: Verwendete Chemikalien .....	128
Tabelle 14: Durchführung der Festphasenextraktion .....	146
Tabelle 15: GC-MS System .....	157
Tabelle 16: Solid Phase Microextraction (SPME) .....	158
Tabelle 17: Enantio-GC-MS System .....	158
Tabelle 18: HPLC-MS/MS System .....	159
Tabelle 19: MALDI-TOF-MS System .....	161

## **Tabellenverzeichnis (Anhang)**

Tabelle A 1: Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in terpenreichen Rebsorten .....	191
Tabelle A 2: Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in terpenarmen Rebsorten .....	192

Tabelle A 3: Freie Terpene und Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside in Geweben von <i>Vitis vinifera</i> .....	194
Tabelle A 4: SIM-Spuren der analysierten Terpene .....	196
Tabelle A 5: Responsefaktoren der Terpene und Terpenglucoside in Abhängigkeit ihrer Internen Standards..	196
Tabelle A 6: MRM-Übergänge und Anregungsspannungen der ESI-MS/MS-Methode.....	198

## Literaturverzeichnis

Alsters, P.L., Jary, W., Nardello-Rataj, V., Aubry, J.-M. (2010). "Dark" Singlet Oxygenation of  $\beta$ -Citronellol: A Key Step in the Manufacture of Rose Oxide. *Org. Process Res. Dev.* *14*, 259–262.

Aznar, M., López, R., Cacho, J.F., Ferreira, V. (2001). Identification and Quantification of Impact Odorants of Aged Red Wines from Rioja. GC–Olfactometry, Quantitative GC-MS, and Odor Evaluation of HPLC Fractions. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 2924–2929.

Barglow, K.T., Cravatt, B.F. (2007). Activity-based protein profiling for the functional annotation of enzymes. *Nat. Methods* *4*, 822–827.

Battilana, J., Costantini, L., Emanuelli, F., Sevini, F., Segala, C., Moser, S., Velasco, R., Versini, G., Grando, M.S. (2008). The 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major QTL affecting monoterpene content in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* *118*, 653–669.

Bitteur, S., Günata, Z., Brillouet, J.-M., Bayonove, C., Cordonnier, R. (1989). GC and HPLC of grape monoterpene glycosides. *J. Sci. Food Agric.* *47*, 341–352.

Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E. (2002). Effect of  $\beta$ -Glycosidase Activity of *Oenococcus oeni* on the Glycosylated Flavor Precursors of Tannat Wine during Malolactic Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* *50*, 2344–2349.

Brazier-Hicks, M., Offen, W.A., Gershater, M.C., Revett, T.J., Lim, E.-K., Bowles, D.J., Davies, G.J., Edwards, R. (2007). Characterization and engineering of the bifunctional N- and O-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20238–20243.

Breitmaier, E. (2005). *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone* (Weinheim: Wiley-VCH).

Cabaroglu, T., Razungles, A., Baumes, R., Günata, Z. (2003). Effect of fining treatments on the aromatic potential of white wines from Muscat Ottonel and Gewurztraminer cultivars. *Sci. Aliments* 23, 411–424.

Caputi, L., Lim, E.-K., Bowles, D.J. (2008). Discovery of New Biocatalysts for the Glycosylation of Terpenoid Scaffolds. *Chem. - Eur. J.* 14, 6656–6662.

Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S., Martens, S. (2012). A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land: Phylogeny reconstruction of plant family 1 UGTs. *Plant J.* 69, 1030–1042.

Carrau, F.M., Boido, E., Dellacassa, E. (2008). Terpenoids in Grapes and Wines: Origin and Micrometabolism during the Vinification Process. *Nat. Prod. Commun.* 3, 577–592.

De Carvalho, L.P.S., Zhao, H., Dickinson, C.E., Arango, N.M., Lima, C.D., Fischer, S.M., Ouerfelli, O., Nathan, C., Rhee, K.Y. (2010). Activity-Based Metabolomic Profiling of Enzymatic Function: Identification of Rv1248c as a Mycobacterial 2-Hydroxy-3-oxoadipate Synthase. *Chem. Biol.* 17, 323–332.

Cole, R.B., Tabet, J.C., Salles, C., Crouzet, J. (1989). Structural „memory effects” influencing decompositions of glucose alkoxide anions produced from monoterpene glycoside isomers in tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 3, 59–61.

D'Ambrosio, M., Harghel, P., Guantieri, V. (2013). Isolation of intact glycosidic aroma precursors from grape juice by

hydrophilic interaction liquid chromatography: Isolation of wine aroma precursors. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 189–192.

Deutsches Weininstitut (2013). *Deutscher Wein Statistik 2013/2014*.

Dicke, M., van Loon, J.J.A., Soler, R. (2009). Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat. Chem. Biol.* 5, 317–324.

Domon, B., Costello, C.E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate* 5, 397–409.

Duchêne, E., Butterlin, G., Claudel, P., Dumas, V., Jaegli, N., Merdinoglu, D. (2008). A grapevine (*Vitis vinifera* L.) deoxy-d-xylulose synthase gene colocalizes with a major quantitative trait loci for terpenol content. *Theor. Appl. Genet.* 118, 541–552.

Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M., Pichersky, E. (1996). Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* 8, 1137–1148.

Dudareva, N., Piechulla, B., Pichersky, E. (1999). Horticultural Reviews. In *Biogenesis of Floral Scent*, pp. 31–54.

Ebeler, S.E. (2001). Analytical Chemistry: Unlocking The Secrets Of Wine Flavor. *Food Rev. Int.* 17, 45–64.

Fenoll, J., Manso, A., Hellin, P., Ruiz, L., Flores, P. (2009). Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening. *Food Chem.* 114, 420–428.

Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Escudero, A., López, R., Cacho, J. (1999). Semipreparative reversed-phase liquid

chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *J. Chromatogr. A* 864, 77–88.

Ford, C.M. (1998). Cloning and Characterization of *Vitis vinifera* UDP-Glucose: Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase, a Homologue of the Enzyme Encoded by the Maize Bronze-1 Locus That May Primarily Serve to Glucosylate Anthocyanidins in Vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 9224–9233.

Ford, C.M., Høj, P.B. (1998). Multiple glucosyltransferase activities in the grapevine *Vitis vinifera* L. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4, 48–58.

Francis, M.J.O., Allcock, C. (1969). Geraniol  $\beta$ -d-glucoside; occurrence and synthesis in rose flowers. *Phytochemistry* 8, 1339–1347.

Gershenson, J., Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3, 408–414.

Gross, J. (2012). *Massenspektrometrie Ein Lehrbuch.* (Spektrum Akademischer Verlag GmbH).

Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., Cordonnier, R.E. (1985). The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.* 36, 857–862.

Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., Cordonnier, R.E. (1986). Changes in free and bound fractions of aromatic components in vine leaves during development of muscat grapes. *Phytochemistry* 25, 943–946.

Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Tapiero, C., Cordonnier, R.E. (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl .beta.-D-glucosides

by various .beta.-glucosidases. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1232–1236.

Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J.-M., Bayonove, C., Cordonnier, R. (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* **184**, 139–149.

Gunata, Z., 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 *Proceedings of the International Conference*, pp. 219–245.

Gutensohn, M., Nagegowda, D.A., Dudareva, N. (2012). Involvement of Compartmentalization in Monoterpene and Sesquiterpene Biosynthesis in Plants. In *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*, T.J. Bach, and M. Rohmer, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 155–169.

Hall, D., De Luca, V. (2007). Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (*Vitis labrusca*): Grape resveratrol/hydroxycinnamic acid GT. *Plant J.* **49**, 579–591.

Hampel, D., Mosandl, A., Wüst, M. (2005). Induction of de Novo Volatile Terpene Biosynthesis via Cytosolic and Plastidial Pathways by Methyl Jasmonate in Foliage of *Vitis vinifera* L. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2652–2657.

Hansen, K.S., Kristensen, C., Tattersall, D.B., Jones, P.R., Olsen, C.E., Bak, S., Møller, B.L. (2003). The in vitro substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyanohydrin glucosyltransferase from *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* **64**, 143–151.

Hattori, S., Kawaharada, C., Tazaki, H., Fujimori, T., Kimura, K., Ohnishi, M., Nabeta, K. (2004). Formation Mechanism of

2,6-Dimethyl-2,6-Octadienes from Thermal Decomposition of Linalyl  $\beta$ -D-Glucopyranoside. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 2656–2659.

ICH Expert Working Group (1994). ICH Harmonised Tripartite Guideline- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).

Jánváry, L., Hoffmann, T., Pfeiffer, J., Hausmann, L., Töpfer, R., Fischer, T.C., Schwab, W. (2009). A Double Mutation in the Anthocyanin 5- O -Glucosyltransferase Gene Disrupts Enzymatic Activity in *Vitis vinifera* L. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3512–3518.

Jeleń, H.H., Majcher, M., Dziadas, M. (2012). 4.06 - Sample Preparation for Food Flavor Analysis (Flavors/Off-Flavors). In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, ed. (Oxford: Academic Press), pp. 119–145.

Jesús Ibarz, M., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N., Cacho, J. (2006). Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *J. Chromatogr. A* **1116**, 217–229.

Kalua, C.M., Boss, P.K. (2010). Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest: Volatile compounds cultivar comparison. *Aust. J. Grape Wine Res.* **16**, 337–348.

Kang, W., Xu, Y., Wang, Y. (2010). Effects of Different  $\beta$ -D-Glycosidases on Bound Aroma Compounds in Muscat Grape Determined by HS-SPME and GC-MS. *J. Inst. Brew.* **116**, 70–77.



Konda, Y., Toida, T., Kaji, E., Takeda, K., Harigaya, Y. (1997). First total synthesis of two new diglycosides, neohancosides A and B, from *Cynanchum hancockianum*. *Carbohydr. Res.* *301*, 124–143.

Kürti, L. (2005). *Strategic applications of named reactions in organic synthesis: background and detailed mechanisms* (Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press).

Lawo, N.C., Weingart, G.J.F., Schuhmacher, R., Forneck, A. (2011). The volatile metabolome of grapevine roots: First insights into the metabolic response upon phylloxera attack. *Plant Physiol. Biochem.* *49*, 1059–1063.

Lichtenthaler, H.K. (2010). The Non-mevalonate DOXP/MEP (Deoxyxylulose 5-Phosphate/Methylerythritol 4-Phosphate) Pathway of Chloroplast Isoprenoid and Pigment Biosynthesis. In *The Chloroplast*, C.A. Rebeiz, C. Benning, H.J. Bohnert, H. Daniell, J.K. Hooper, H.K. Lichtenthaler, A.R. Portis, and B.C. Tripathy, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 95–118.

Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* *400*, 271–274.

Lim, E.-K. (2002). Evolution of substrate recognition across a multigene family of glycosyltransferases in *Arabidopsis*. *Glycobiology* *13*, 139–145.

Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., Ferreira, V. (2010). Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chem.* *120*, 205–216.

Luan, F., Wüst, M. (2002). Differential incorporation of 1-deoxy- $\beta$ -xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. *Phytochemistry* 60, 451–459.

Luan, F., Hampel, D., Mosandl, A., Wüst, M. (2004). Enantioselective Analysis of Free and Glycosidically Bound Monoterpene Polyols in *Vitis vinifera* L. Cvs. Morio Muscat and Muscat Ottonel: Evidence for an Oxidative Monoterpene Metabolism in Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2036–2041.

Luan, F., Mosandl, A., Munch, A., Wüst, M. (2005). Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of L. cv. Scheurebe: demonstration of stereoselective reduction, *l*-isomerization, oxidation and glycosylation. *Phytochemistry* 66, 295–303.

Lücker, J., Bouwmeester, H.J., Schwab, W., Blaas, J., Van Der Plas, L.H.W., Verhoeven, H.A. (2001). Expression of Clarkia S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- $\beta$ -d-glucopyranoside: Transgenic petunia accumulates linalyl-glycoside. *Plant J.* 27, 315–324.

Lund, S.T., Bohlmann, J. (2006). The Molecular Basis for Wine Grape Quality-A Volatile Subject. *Science* 311, 804–805.

Maicas, S., Mateo, J.J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 322–335.

March, J. (1992). *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure.* (Wiley).

Marinos, V.A., Tate, M.E., Williams, P.J. (1994). Protocol for FAB MS/MS characterization of terpene disaccharides of wine. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2486–2492.

Martin, D.M., Chiang, A., Lund, S.T., Bohlmann, J. (2012). Biosynthesis of wine aroma: transcript profiles of

hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase, geranyl diphosphate synthase, and linalool/nerolidol synthase parallel monoterpenol glycoside accumulation in Gewürztraminer grapes. *Planta* 236, 919–929.

Mateo, J., Jiménez, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr. A* 881, 557–567.

Mateo, J.J., Gentilini, N., Huerta, T., Jiménez, M., Di Stefano, R. (1997). Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *J. Chromatogr. A* 778, 219–224.

Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., Günata, Z. (2005). A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *J. Exp. Bot.* 56, 2721–2731.

May, B., Lange, B.M., 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.

Nagashima, S., Tomo, S., Orihara, Y., Yoshikawa, T. (2004). Cloning and characterization of glucosyltransferase cDNA from *Eucalyptus perriniana* cultured cells. *Plant Biotechnol.* 21, 343–348.

Nasi, A., Ferranti, P., Amato, S., Chianese, L. (2008). Identification of free and bound volatile compounds as typicalness and authenticity markers of non-aromatic grapes and wines through a combined use of mass spectrometric techniques. *Food Chem.* 110, 762–768.

Ong, P.K.C., Acree, T.E. (1999). Similarities in the Aroma Chemistry of Gewürztraminer Variety Wines and Lychee (*Litchi chinesis* Sonn.) Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 47, 665–670.

Ono, E., Homma, Y., Horikawa, M., Kunikane-Doi, S., Imai, H., Takahashi, S., Kawai, Y., Ishiguro, M., Fukui, Y., Nakayama, T. (2010). Functional Differentiation of the Glycosyltransferases That Contribute to the Chemical Diversity of Bioactive Flavonol Glycosides in Grapevines (*Vitis vinifera*). *Plant Cell* 22, 2856–2871.

Osmani, S.A., Bak, S., Møller, B.L. (2009). Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* 70, 325–347.

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

Park, S.K., Morrison, J.C., Adams, D.O., Noble, A.C. (1991). Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *J. Agric. Food Chem.* 39, 514–518.

Paulsen, H., Le-Nguyén, B., Sinnwell, V., Heemann, V., Seehofer, F. (1985). Synthese von Glycosiden von Mono-, Sesqui- und Diterpenalkoholen. *Liebigs Ann. Chem.* 1513–1714.

Petrozziello, M., Borsa, D., Guaita, M., Gerbi, V., Bosso, A. (2012). Quantification by solid phase micro extraction and stable isotope dilution assay of norisoprenoid compounds in red wines obtained from Piedmont rare varieties. *Food Chem.* 135, 2483–2489.

Piñeiro, Z., Palma, M., Barroso, C.G. (2004). Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* 513, 209–214.

Prome, J.-C., Aurelle, H., Prome, D., Savagnac, A. (1987). Gas phase glycosidic cleavage of oxynions from alkyl glycosides. *Org. Mass Spectrom.* 22, 6–12.

Raguso, R.A., Pichersky, E. (1999). New Perspectives in Pollination Biology: Floral Fragrances. A day in the life of a linalool molecule: Chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: Linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biol.* 14, 95–120.

Rapp, A. (1992). Aromastoffe des Weines. *Chem. Unserer Zeit* 26, 273–284.

Rapp, A. (1995). Possibilities of characterizing wine varieties by means of volatile flavor compounds. In *Developments in Food Science*, (Elsevier), pp. 1703–1722.

Rivas, F., Parra, A., Martinez, A., Garcia-Granados, A. (2013). Enzymatic glycosylation of terpenoids. *Phytochem. Rev.* 12, 327–339.

Rocha, S.M., Coelho, E., Zrostlíková, J., Delgadillo, I., Coimbra, M.A. (2007). Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability. *J. Chromatogr. A* 1161, 292–299.

Rohdich, F., Kis, K., Bacher, A., Eisenreich, W. (2001). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 535–540.

Ross, J., Li, Y., Lim, E., Bowles, D.J. (2001). Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol.* 2, reviews3004.

Rychlik, M., Schieberle, P., Grosch, W. (1998). Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants (Garching: Deutsche Forschungsanstalt für

Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München).

Salles, C., Jallageas, J.-C., Crouzet, J. (1990). Chromatographic separation and partial identification of glycosidically bound volatile components of fruit. *J. Chromatogr. A* 522, 255–265.

Salles, C., Jallageas, J.-C., Beziat, Y., Cristau, H.-J. (1991a). Synthesis of 4- and 10-deuterated neryl and geranyl- $\beta$ -D-glucosides and their use in corroboration of a mechanism proposed for the fragmentation of heterosides in tandem mass spectrometry. *J. Label. Compd. Radiopharm.* XXXI, 11–22.

Salles, C., Jallageas, J.C., Fournier, F., Tabet, J.C., Crouzet, J.C. (1991b). Apricot glycosidically bound volatile components. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1979–1983.

Sánchez-Palomo, E., Diazmaroto, M., Perezcoello, M. (2005). Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC–MS. *Talanta* 66, 1152–1157.

Sánchez-Palomo, E., Alañón, M.E., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A., Pérez-Coello, M.S. (2009). Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice. *Talanta* 79, 871–876.

Sarry, J., Gunata, Z. (2004). Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.* 87, 509–521.

Schievano, E., D'Ambrosio, M., Mazzaretto, I., Ferrarini, R., Magno, F., Mammi, S., Favaro, G. (2013). Identification of wine aroma precursors in Moscato Giallo grape juice: A nuclear magnetic resonance and liquid chromatography–mass spectrometry tandem study. *Talanta* 116, 841–851.

Schneider, R., Razungles, A., Augier, C., Baumes, R. (2001). Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. *J. Chromatogr. A* 936, 145–157.

Schwab, W. (1989). Untersuchung über nichtflüchtige Metabolite pflanzlicher Aromastoffe.

Schwender, J., Zeidler, J., Gröner, R., Müller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F.W., Lichtenthaler, H.K. (1997). Incorporation of 1-deoxy-d-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.* 414, 129–134.

Sefton, M.A., Francis, I.L., Williams, P.J. (1993). The Volatile Composition of Chardonnay Juices: A Study by Flavor Precursor Analysis. *Am J Enol Vitic* 44, 359–370.

Skouroumounis, G.K., Sefton, M.A. (2000). Acid-Catalyzed Hydrolysis of Alcohols and Their  $\beta$ -d-Glucopyranosides. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2033–2039.

Skouroumounis, G.K., Winterhalter, P. (1994). Glycosidically Bound Norisoprenoids from *Vitis vinifera* cv. Riesling Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1068–1072.

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.

Szczepaniak, L., Isidorov, V.A. (2011). Gas chromatographic retention indices of trimethylsilyl derivatives of terpene alcohols. *J. Chromatogr. A* 1218, 7061–7064.

Thorsoe, K.S., Bak, S., Olsen, C.E., Imberty, A., Breton, C., Moller, B. (2005). Determination of Catalytic Key Amino Acids and UDP Sugar Donor Specificity of the Cyanohydrin Glycosyltransferase UGT85B1 from *Sorghum bicolor*.

Molecular Modeling Substantiated by Site-Specific Mutagenesis and Biochemical Analyses. *PLANT Physiol.* 139, 664–673.

Ugliano, M., Moio, L. (2008). Free and hydrolytically released volatile compounds of *Vitis vinifera* L. cv. Fiano grapes as odour-active constituents of Fiano wine. *Anal. Chim. Acta* 621, 79–85.

Ugliano, M., Genovese, A., Moio, L. (2003). Hydrolysis of Wine Aroma Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5073–5078.

Ugliano, M., Bartowsky, E.J., McCarthy, J., Moio, L., Henschke, P.A. (2006). Hydrolysis and Transformation of Grape Glycosidically Bound Volatile Compounds during Fermentation with Three *Saccharomyces* Yeast Strains. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6322–6331.

Vasserot, Y., Arnaud, A., Galzy, P. (1995). Monoterpenol glycosides in plants and their biotechnological transformation. *Acta Biotechnol.* 15, 77–95.

Voirin, S.G., Baumes, R.L., Gunata, Z.Y., Bitteur, S.M., Bayonove, C.L., Tapiero, C. (1992). Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. *J. Chromatogr. A* 590, 313–328.

Vollhardt, K.P.C., Butenschön, H., Elvers, B., and Schore, N.E. (2009). *Organische Chemie* (Weinheim: Wiley-VCH).

Vrhovsek, U., Lotti, C., Masuero, D., Carlin, S., Weingart, G., Mattivi, F. (2014). Quantitative metabolic profiling of grape, apple and raspberry volatile compounds (VOCs) using a GC/MS/MS method. *J. Chromatogr. B*.



Wang, X. (2009). Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS Lett.* 583, 3303–3309.

Weckerle, B., Toth, G., Schreier, P. (2003). Linalool disaccharides as flavour precursors from green coffee beans (*Coffea arabica*). *Eur Food Res Technol* 6–10.

Williams, P., Strauss, C., Wilson, B., Massy-Westropp, R. (1983). Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol in *Vitis Vinifera* grapes. *Phytochemistry* 22, 2039–2041.

Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B. (1980). Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.* 28, 766–771.

Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B., Massy-Westropp, R.A. (1982). Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene .beta.-D glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agric. Food Chem.* 30, 1219–1223.

Wilson, B., Strauss, C.R., Williams, P.J. (1984). Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.* 32, 919–924.

Winterhalter, P., Skouroumounis, G.K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation. *Biotechnol. Aroma Compd.-Adv. Biochem. Eng.* 55, 73–105.

Winterhalter, P., Sefton, M.A., Williams, P.J. (1990). Two-dimensional GC-DCCC analysis of the glycoconjugates of monoterpenes, norisoprenoids, and shikimate-derived metabolites from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1041–1048.

Wirth, J., Guo, W., Baumes, R., Gunata, Z. (2001). Volatile Compounds Released by Enzymatic Hydrolysis of Glycoconjugates of Leaves and Grape Berries from *Vitis vinifera* Muscat of Alexandria and Shiraz Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2917–2923.

Withers, S.T., Keasling, J.D. (2006). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 980–990.

Wüst, M. (2003). Wein- Qualität entscheidet sich in Nanogramm. *Chem. Unserer Zeit* 37, 8–17.

Wüst, M., Rexroth, A., Beck, T., Mosandl, A. (1998). Mechanistic aspects of the biogenesis of rose oxide in *Pelargonium graveolens* L'Heritier. *Chirality* 10, 229–237.

(2006). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB.

## Anhang

**Tabelle A 1: Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in terpenreichen Rebsorten**

Wochen nach der Blüte			6	9	11	13	15	17	
Gewürz- traminer 11-18 Gm	Linalool	frei	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		$\beta$ -D- glucosid	n.d.	0.1 $\pm 0.04$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		frei	n.d.	n.d.	0.13 $\pm 0.02$	0.71 $\pm 0.04$	1.25 $\pm 0.15$	1.75 $\pm 0.05$	
	Nerol	$\beta$ -D- glucosid	n.d.	n.d.	0.06 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.11	0.72 $\pm 0.22$	0.87 $\pm 0.2$	
		frei	0.44 $\pm 0.06$	0.88 $\pm 0.06$	0.81 $\pm 0.07$	2.62 $\pm 0.38$	3.47 $\pm 0.66$	5.26 $\pm 0.52$	
		$\beta$ -D- glucosid	0.08 $\pm 0$	0.04 $\pm 0.01$	0.18 $\pm 0.01$	0.55 $\pm$ 0.16	1.72 $\pm 0.18$	1.53 $\pm 0.4$	
	Geraniol	frei	0.12 $\pm 0.03$	0.31 $\pm 0.01$	0.27 $\pm 0.02$	0.49 $\pm 0.01$	0.48 $\pm 0.1$	0.51 $\pm 0.02$	
		$\beta$ -D- glucosid	0.09 $\pm 0.01$	0.08 $\pm 0.02$	0.12 $\pm 0.01$	0.21 $\pm 0.06$	0.48 $\pm 0.02$	0.29 $\pm 0.06$	
		frei	1.1 $\pm 0.13$	1.14 $\pm 0.16$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Muscat a petits grains blanc FR 90	Linalool	frei	0.06 $\pm 0.02$	n.d.	n.d.	0.13 $\pm 0.02$	3.03 $\pm 0.01$	0.62 $\pm 0.12$
			$\beta$ -D- glucosid	0.11 $\pm 0$	0.12 $\pm 0.03$	n.d.	0.05 $\pm 0.01$	0.27 $\pm 0.10$	0.37 $\pm 0.16$
			frei	n.d.	n.d.	0.16 $\pm 0.03$	0.31 $\pm 0.04$	0.78 $\pm 0.15$	0.94 $\pm 0.05$
Nerol		$\beta$ -D- glucosid	0.03 $\pm 0$	0.04 $\pm 0.02$	n.d.	0.09 $\pm 0.02$	0.47 $\pm 0.05$	0.57 $\pm 0.10$	
		frei	0.18 $\pm 0.04$	0.53 $\pm 0.06$	1.64 $\pm 0.62$	1.00 $\pm 0.21$	1.20 $\pm 0.21$	1.21 $\pm 0.13$	
		$\beta$ -D- glucosid	0.03 $\pm 0$	0.07 $\pm 0.03$	0.05 $\pm 0.03$	0.09 $\pm 0.02$	0.45 $\pm 0.09$	0.24 $\pm 0.08$	
Geraniol		frei	0.09 $\pm 0.03$	0.11 $\pm 0.01$	0.20 $\pm 0.06$	0.15 $\pm 0.01$	0.21 $\pm 0$	0.23 $\pm 0$	
		$\beta$ -D- glucosid	n.d.	0.07 $\pm 0.04$	0.04 $\pm 0.02$	0.04 $\pm 0.01$	0.12 $\pm 0.05$	n.d.	
		frei	2.5 $\pm 0.3$	5.93 $\pm 0.61$	1,86 $\pm 1.08$	1.46 $\pm 0.42$	2.09 $\pm 0.08$	2 $\pm 0.34$	

n.d.: not detected, nicht bestimmbar - : nicht nachweisbar,  
Gehalte sind aufgeführt in mg/kg Häute; n=2

**Tabelle A 2: Gehalte an freien Terpenen und Monoterpen- $\beta$ -D-glucosiden in terpenarmen Rebsorten**

Wochen nach der Blüte			6	9	11	13	15	17
Weißer Riesling 239-34 Gm	Linalool	frei	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.13 ±0.18	n.d.
		$\beta$ -D-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	0.10 ±0.08	0.17 ±0.01	1.71 ±0.54
	Nerol	frei	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		$\beta$ -D-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05 ±0.03
	Geraniol	frei	n.d.	n.d.	0.09 ±0.01	0.25 ±0	0.26 ±0.15	n.d.
		$\beta$ -D-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06 ±0.02	0.14 ±0.06
	Citronellol	frei	n.d.	n.d.	0.03 ±0.01	0.05 ±0.01	n.d.	n.d.
		$\beta$ -D-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	0.03 ±0.02	n.d.	n.d.
	Diendiol I	frei	0.47 ±0.01	2.29 ±0.75	0.83 ±0.06	1.48 ±0.13	0.47 ±0.14	2.23 ±0.5
	Weißer Riesling 24-196 Gm	Linalool	frei	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11 ±0
$\beta$ -D-glucosid			n.d.	n.d.	n.d.	0.07 ±0.02	0.27 ±0.02	0.61 ±0.1
Nerol		frei	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.08 ±0	n.d.
		$\beta$ -D-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.01 ±0.01	n.d.
Geraniol		frei	0.11 ±0.03	0.06 ±0	0.17 ±0	0.24 ±0.02	0.48 ±0.01	0.67 ±0.04
		$\beta$ -D-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	0.02 ±0	0.07 ±0.02	0.14 ±0.02
Citronellol		frei	0.05 ±0	n.d.	n.d.	0.06 ±0.02	0.09 ±0.01	n.d.
		$\beta$ -D-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Diendiol I		frei	1.12 ±0.4	0.77 ±0.1	0.85 ±0.06	1.8 ±0.56	0.39	0.69 ±0.11

Gewürz- traminer FR 46-107	Linalool	frei	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.
		$\beta$ -D- glucosid	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.
	Nerol	frei	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.
		$\beta$ -D- glucosid	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	0.01 $\pm 0.01$
		frei	-	n.d.	0.11 $\pm 0.01$	n.d.	-	0.20 $\pm 0.01$
	Geraniol	$\beta$ -D- glucosid	-	0.02 $\pm 0.02$	n.d.	0.01 $\pm 0.00$	-	0.03 $\pm 0.04$
		frei	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.
	Citronellol	$\beta$ -D- glucosid	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.
		frei	-	-	-	-	-	-

n.d.: not detected, nicht bestimmbar - : nicht nachweisbar,  
Gehalte sind aufgeführt in mg/kg Häute; n=2

**Tabelle A 3: Freie Terpene und Monoterpen- $\beta$ -D-glucoside in Geweben von *Vitis vinifera***

		Ges 1	Ges 2	Ges 3	Blatt 1	Blatt 2	Blatt 3	Wurzel	
Weißer Riesling 239-34 Gm	frei	0.17 $\pm 0.06$	n.d.	n.d.	0.02 $\pm 0.04$	n.d.	n.d.	n.d.	
	Lin	$\beta$ -D-glucosid	4.78 $\pm 1.64$	3.18 $\pm 0.63$	7.91 $\pm 4.09$	1.41 $\pm 1.10$	0.45 $\pm 0.31$	1.14 $\pm 0.71$	n.d.
		frei	n.d.	n.d.	n.d.	0.04 $\pm 0.06$	n.d.	n.d.	n.d.
	Ner	$\beta$ -D-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		frei	2.93 $\pm 0.28$	2.07 $\pm 0.62$	1.79 $\pm 0.39$	3.57 $\pm 0.92$	2.42 $\pm 0.29$	0.74 $\pm 0.32$	0.57 $\pm 0.19$
	Ger	$\beta$ -D-glucosid	2.28 $\pm 0.93$	2.00 $\pm 0.56$	5.32 $\pm 1.86$	3.01 $\pm 1.30$	1.30 $\pm 0.11$	2.42 $\pm 2.60$	1.52 $\pm 0.68$
		frei	0.39 $\pm 0.20$	0.42 $\pm 0.21$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.27 $\pm 0.02$
	Citr	$\beta$ -D-glucosid	0.06 $\pm 0.09$	n.d.	n.d.	0.28 $\pm 0.20$	n.d.	0.19 $\pm 0.10$	n.d.
		Dien	frei	0.86 $\pm 0.36$	-	1.04 $\pm 0.27$	2.14 $\pm 0.68$	-	-
	Gewürztraminer 11-18 Gm	frei	0.32 $\pm 0.01$	0.28 $\pm 0.04$	0.44 $\pm 0.03$	0.28 $\pm 0.02$	n.d.	n.d.	n.d.
Lin		$\beta$ -D-glucosid	10.74 $\pm 1.13$	10.43 $\pm 0.04$	106.25 $\pm 45.92$	2.60 $\pm 1.52$	0.98 $\pm 0.13$	0.67 $\pm 0.07$	n.d.
		frei	0.66 $\pm 0.38$	0.28 $\pm 0.09$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ner		$\beta$ -D-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		frei	20.63 $\pm 12.6$	7.7 $\pm 2.4$	9.33 $\pm 0.57$	8.07 $\pm 0.18$	3.12 $\pm 0.55$	2.06 $\pm 0.16$	1.20 $\pm 0.19$
Ger		$\beta$ -D-glucosid	7.90 $\pm 1.52$	5.46 $\pm 0.90$	94.22 $\pm 16.03$	1.95 $\pm 1.23$	2.67 $\pm 2.60$	0.47 $\pm 0.10$	8.26 $\pm 3.62$
		frei	1.46 $\pm 0.85$	1.32 $\pm 0.41$	n.d.	n.d.	n.d.	0.08 $\pm 0.13$	0.18 $\pm 0.01$
Citr		$\beta$ -D-glucosid	1.00 $\pm 0.20$	0.75 $\pm 0.1$	1.27 $\pm 1.79$	0.17 $\pm 0.08$	n.d.	n.d.	0.96 $\pm 1.36$

Dien	frei	5.79 ±5.21	2.17 ±0.43	-	3.48 ±0.72	-	-	-
------	------	---------------	---------------	---	---------------	---	---	---

n.d.= nicht detektierbar. Das Probenmaterial wurde 2012 geerntet. Bei der Wurzel handelt es sich um Zwei-Augenstecklinge, die in einem Zeitraum von einem Jahr herangezogen wurden. Gesteckt: 13.1.2011, Geerntet: 20.4.2012; Ges 1: Geschein, vier Wochen vor der Vollblüte; Ges 2: Geschein, zwei Wochen vor der Vollblüte; Ges 3: Geschein, Woche der Vollblüte; Blatt 1: eine Woche alt; Blatt 2: zwei Wochen alt; Blatt 3: drei Wochen alt; Gehalte sind aufgeführt in mg/kg Geschein, n=2; Lin= Linalool, Ner= Nerol, Ger= Geraniol, Citr= Citronellol, Dien= Diendiol I.

**Tabelle A 4: SIM-Spuren der analysierten Terpene**

Analyt	SIM-Spuren (m/z)
Citronellol	69, 81, 123
Diendiol I	82, 71, 43
Linalool	71, 93
Nerol	69, 93
Geraniol	69, 93, 123
Geranylsäure	69, 100, 123

**Tabelle A 5: Responsefaktoren der Terpene und Terpenglucoside in Abhängigkeit ihrer Internen Standards**

Analyt	2-Octanol	1-Octanol	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Citronellyl-glucosid	Octyl-glucosid
Citronellol	1,83	0,98	-	-
Diendiol I	1,20	0,56	-	-
Linalool	1,36	0,77	-	-
Nerol	1,66	0,93	-	-
Geraniol	1,37	0,82	-	-
Linalyl-glucosid	-	-	0,37	1,62
Neryl-glucosid			0,33	1,36
Geranyl-glucosid			0,28	0,93

Da für Citronellyl-glucosid der isotonenmarkierte Standard verwendet wurde, wurde in dieser Tabelle hierfür kein Responsefaktor aufgeführt, da er dem Wert 1 entsprechen würde. Die Responsefaktoren der Terpene gelten für die in 196



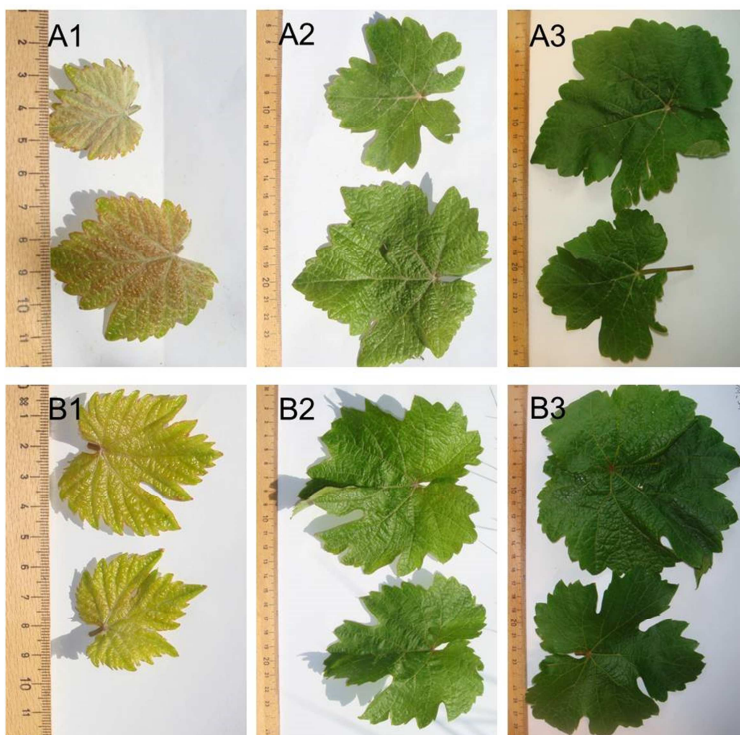
3.10.1 aufgeführte GC-MS Säule, analog dazu für die Terpenglucoside die in 3.10.4 aufgeführte LC-MS Säule.

**Tabelle A 6: MRM-Übergänge und Anregungsspannungen der ESI-MS/MS-Methode**

<b>Analyt</b>	<b>Q1 Masse [Da]</b>	<b>Q3 Masse [Da]</b>	<b>Dwell Zeit [msec]</b>	<b>DP</b>	<b>FP</b>	<b>EP</b>	<b>CEP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
Linalyl-, Neryl- und Geranyl- glucosid	315,1	119,0	150	-11	-350	-11	-28	-12	-24
	315,1	112,9	150	-11	-350	-11,5	-28	-20	-22
	315,1	160,8	150	-11	-350	-11,5	-28	-6	-32
Citronellyl- glucosid	317,1	101	150	-56	-350	-7,5	-18	-18	-20
	317,1	160,8	150	-56	-260	-7,5	-18	-12	-30
Octyl- glucosid	291,1	101,0	150	-51	-300	-9	-16	-18	-24
	291,1	161	150	-51	-300	-9	-16	-12	-30
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]- Citronellyl- glucosid	319,0	101,0	150	-136	-90	-8,5	-18	-18	-20
	319,0	160,8	150	-136	-90	-8,5	-12	-20	-32
Diolglucosid	331	119	150	-66	-350	-11	-17	-16	-22
	331	178,9	150	-66	-350	-11	-17	-16	-22
Terpen- Apiosyl- glycoside	447	315	150	-20	-350	-11	-20	-12	-22
	447	149	150	-20	-350	-11	-20	-12	-22
	447	131	150	-20	-350	-11	-20	-12	-22
	449	317	150	-56	-260	-7,5	-20	-12	-30
	449	149	150	-56	-260	-7,5	-20	-12	-30

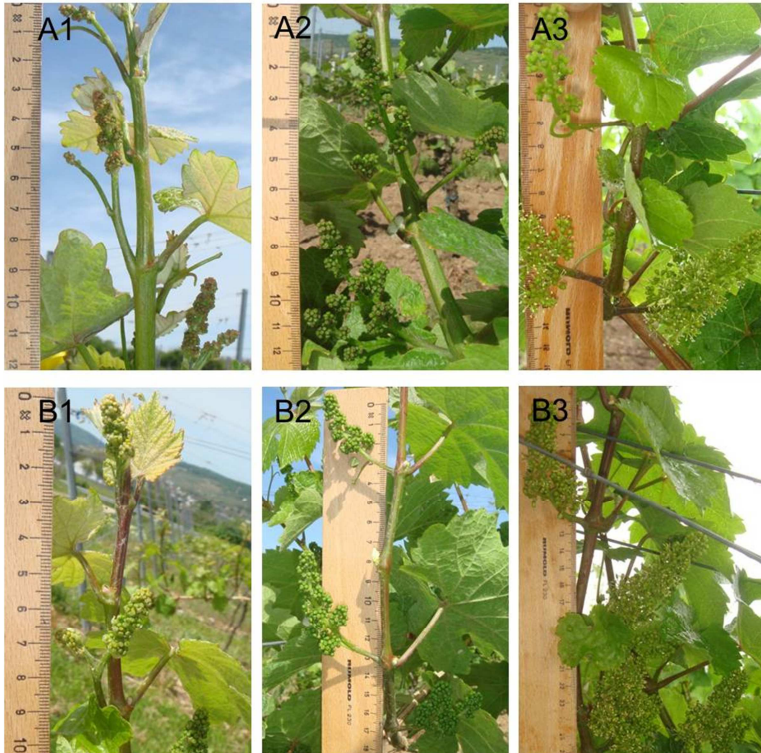
	449	131	150	-56	-260	-7,5	-20	-12	-30
	461	315	150	-20	-350	-11	-20	-12	-22
Terpen-	461	149	150	-20	-350	-7,5	-20	-12	-22
Rutinoside	461	131	150	-20	-350	-7,5	-20	-12	-22
	463	317	150	-56	-260	-7,5	-20	-12	-22

---



**Abbildung A 1: Blätter der Rebsorten Gewürztraminer 11-18 Gm (A) und des Weißen Rieslings 239-34 Gm (B)**

Zur Analysen wurden Blätter zweier Rebsorten während des Wachstums vermessen. Zur Messung des Alters der Blätter wurden jeweils einige Blattknospen an den Rebstöcken markiert und wochenabhängig gesammelt. (1) Blatt eine Woche alt, (2) 3 Wochen alt (3) 5 Wochen alt. (Fotos: Johanna Frotscher, Hochschule Geisenheim)



**Abbildung A 2: Gescheine des Gewürztraminers 11-18 Gm (A) und des Weißen Rieslings 239-34 Gm (B)**  
 Abbildungen der Gescheine 4 Wochen vor der Blüte (1), 2 Wochen vor der Blüte (2) und zum Zeitpunkt der Vollblüte (3). (Fotos: Johanna Frotscher, Hochschule Geisenheim)

## Poster und Publikationen

Stanitzek, S.; Wüst, M. Analysis of glycosidically-bound monoterpene alcohols by LC-MS/MS. *In Vino Analytica Scientia* 2011- Proceedings of the 7<sup>th</sup> Symposium. Verlag der TU Graz, Graz **2011**, p. 152

Stanitzek, S.; Wüst, M. Analysis of glycosidically-bound monoterpene alcohols by LC-MS/MS. *40. Deutscher Lebensmittelchemikertag* 2011-Kurzreferate. Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V., Frankfurt am Main **2011**, p. 184

Stanitzek, S.; Wüst, M. Entwicklung einer SIVA-LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Monoterpenyl-beta-D-glucopyranosiden in Weinbeeren. *41. Deutscher Lebensmittelchemikertag* 2012-Kurzreferate. Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V., Frankfurt am Main **2012**, p. 112

Bönisch<sup>1</sup>, F.; Frotscher<sup>1</sup>, J.; Stanitzek<sup>1</sup>, S.; Rühl, E.; Wüst, M.; Bitz, O.; Schwab, W.; A UDP-glucose:monoterpenol glucosyltransferase adds to the chemical diversity of the grapevine metabolome (*Vitis vinifera* L). *PLANT PHYSIOLOGY*, **01.05.2014** <sup>1</sup>geteilte Erstautorenschaft