

2015•2016
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Analyse van aromacomponenten in de dampfase van witte wijn via
Headspace-GC-MS

Promotor :
ing. Liesbet PAULS

Promotor :
dr. CHRISTINE PEETERS

Copromotor :
Dhr. PETER SALAETS
drs. ir. GUIDO DE METS

Selina Alessi

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële
wetenschappen: biochemie*

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

2015•2016
Faculteit Industriële
ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Analyse van aromacomponenten in de dampfase van witte
wijn via Headspace-GC-MS

Promotor :
ing. Liesbet PAULS

Promotor :
dr. CHRISTINE PEETERS

Copromotor :
Dhr. PETER SALAETS
drs. ir. GUIDO DE METS

Selina Alessi

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële
wetenschappen: biochemie*

Woord vooraf

Als laatstejaarsstudente industrieel ingenieur biochemie kreeg ik de mogelijkheid om mijn masterproef uit te voeren aan de Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen (FBIW) te Heverlee. Deze faculteit maakt deel uit van de “Groep Wetenschap & Technologie” van de Katholieke Universiteit Leuven (KULeuven) en staat in voor de universitaire opleiding tot bio-ingenieur [1].

Mijn masterproef kadert binnen het onderzoek naar aromastoffen in witte wijn. Het is een vervolg op de masterthesis van Drs. Ir. Guido De Mets; “Identification of fruit aromas in white wine, imitating the wine taster” en sluit aan op het doctoraatsonderzoek; “Measuring the sensory quality of wine”.

In de loop van mijn onderzoek kon ik altijd terugvallen op mijn promotoren. Daarom wil ik bij deze gebruik maken om hen persoonlijk te bedanken. Allereerst richt ik me tot Prof. Dr. Ir. Christine Peeters voor haar spontane inzet en enthousiasme. Ondanks haar drukke agenda stond ze altijd klaar om mijn vragen te beantwoorden en gaf ze terugkoppeling op mijn werk waardoor ik weer verder kon met mijn onderzoek. Ook op Drs. Ir. Guido De Mets kon ik steeds rekenen voor ruime feedback via mail. Aangezien mijn eindwerk verder onderzoek was op zijn doctoraatsthesis stelde hij duidelijke eisen en wist ik welke richting ik uit moest in mijn onderzoek. Verder wil ik ook Ing. Peter Salaets bedanken om mij de eerste weken wegwijs te maken in de laboratoria. Wanneer ik iets nodig had of een vraag had maakte hij, tussen zijn eigen werk door, altijd tijd vrij om mij te helpen. Uiteraard wil ik nog graag mijn interne promotor, Ing. Liesbet Pauls, bedanken voor haar motiverende en super vriendelijke feedback telkens wanneer ik erom vroeg. Op de weinige momenten dat ik aanwezig kon zijn in Diepenbeek maakte zij altijd tijd vrij voor een korte vergadering. Ook wil ik graag Dr. Jeroen Lievens bedanken voor zijn lessen communicatie en zijn feedback wat betreft spelling, grammatica e.d. Tot slot wil ik nog even de aandacht vestigen op de zeer behulpzame collega’s die ik de afgelopen maanden heb leren kennen. Zij stonden altijd voor mij klaar wanneer ik een vraag had of labomateriaal nodig had. Niets was te veel gevraagd. Ik kreeg zelfs hulp bij het verwerken van mijn resultaten, met dank aan Prof. Dr. Ir. Peter Goos en Ir. Elien Buyse. Ik heb de afgelopen maanden heel veel van jullie geleerd en ik ben heel blij dat ik deze ervaring heb morgen meemaken. Hopelijk zijn jullie tevreden met het resultaat!

Inhoudsopgave

Lijst met tabellen	20
Lijst met figuren	22
Verklarende woordenlijst	24
Abstract	26
Abstract in English	28
1 Inleiding	30
2 Literatuurstudie	17
2.1 Hoofdcomponenten in wijn.....	17
2.1.1 Organische zuren.....	17
2.1.2 Suikers en glycerol.....	17
2.1.3 Ethanol	17
2.1.4 Tannines	18
2.2 Aromacomponenten in wijn.....	18
2.2.1 Esters	19
2.2.2 Hogere alcoholen	22
2.2.3 Aldehyden en ketonen	23
2.2.4 Vluchtige zuren.....	23
2.2.5 Terpenen	23
2.3 Sensorische waarneming van aroma.....	24
2.3.1 Geurperceptie	24
2.3.2 Smaakperceptie.....	25
2.4 Analyse van aromastoffen	26
2.4.1 Headspacetechniek (HS).....	27
2.4.2 Opconcentreren	27
2.4.2.1 Vastefasemicro-extractie (SPME)	28
2.4.2.2 Vacuümdestillatie	29
2.4.3 Referentiestaal	31

2.4.4	Scheiden, detecteren en kwantificeren (GC-MS).....	31
3	Materiaal en methoden.....	35
3.1	Basislijn	35
3.2	Opconcentreren via een vacuümdestillatie	35
3.3	Referentiestaal	36
3.4	Headspacetechniek (HS).....	38
3.5	GC-MS-analyse.....	38
4	Resultaten en discussie	41
4.1	Basislijn	41
4.2	Opconcentreren via een vacuümdestillatie	43
4.3	Referentiestaal	43
4.3.1	Verwijderen uitschieters	44
4.3.2	Regressieanalyse	45
4.3.2.1	Effect verdunning.....	49
4.3.2.2	Effect temperatuur	54
4.3.2.3	Effect pH.....	54
4.3.2.4	Effect ethanolconcentratie	55
5	Conclusie en future work.....	57
	Literatuurlijst.....	59
	Bijlage	63
	Bijlage A: Dataset JMP	65

Lijst met tabellen

Tabel 1: Verschillende esters met hun kookpunt [15].	21
Tabel 2: Verschillende alcoholen in witte wijn met hun kookpunt [15].	22
Tabel 3: Verschillende terpenen in witte wijn met hun kookpunt [15].	24
Tabel 4: Instellingen 2 ⁴ -experiment	30
Tabel 5: Toekenning niveaus en factoren voor een 2 ⁴ -experiment.	30
Tabel 6: Gebruikte componenten voor referentiestaal [3].	36
Tabel 7: Verdunningsreeks referentiestaal.	37
Tabel 8: Testen met referentiestaal.	37
Tabel 9: Componenten in Gewurztraminer na HS-GC-MS-analyse.	42
Tabel 10: Resultaten regressieanalyse ethylacetaat.	46
Tabel 11: Resultaten regressieanalyse isoamylacetaat	46
Tabel 12: Resultaten regressieanalyse ethylhexanoaat.	47
Tabel 13: Resultaten regressieanalyse ethyloctanoaat	47
Tabel 14: Resultaten regressieanalyse ethyldecanoaat.	48
Tabel 15: Resultaten regressieanalyse linalool	48
Tabel 16: Resultaten regressieanalyse 3-methyl-1-butanol	49
Tabel 17: Significante factoren per component.	49

Lijst met figuren

Figuur 1: Alcoholfermentatie [8].....	18
Figuur 2: Esterificatie [11]	19
Figuur 3: Esterificatie gekoppeld met ATP [11].....	19
Figuur 4: Geurperceptie [19].....	25
Figuur 5: Doorsnede smaakpapil [19]	26
Figuur 6: Smaakpapillen op tong [19]	26
Figuur 7: Headspacetechniek (HS) [23]	27
Figuur 8: HS-SPME-procedure [24]	28
Figuur 9: Splitless injectie bij GC [27]	32
Figuur 10: Werking massaspectrometer [36]	33
Figuur 11: Voorbeeld massaspectrum voor koolstofdissulfide [34].....	34
Figuur 12: Vacuümdestillatie.....	35
Figuur 13: HS-GC-MS-apparatuur	38
Figuur 14: Chromatogram Gewurztraminer na HS-GC-MS-analyse	41
Figuur 15: De actuele i.f.v. de geschatte waarden voor ethylacetaat na regressieanalyse. Een uitschieter wordt in het vet weergegeven in de grafiek.....	44
Figuur 16: Piekoppervlakte i.f.v. concentratie voor alle componenten na HS-GC-MS-analyse (12% EtOH, 60°C, pH 5,9)	50
Figuur 17: K-waarde van een component [32]	52
Figuur 18: HS-GC-MS-analyse van ethyldecanoaat alleen in oplossing en in aanwezigheid van andere componenten (12% EtOH, 60°C, pH 5,9)	53
Figuur 19: Protonering door pH-verlaging [32].....	54

Verklarende woordenlijst

HS	headspace
GC	gaschromatografie of gaschromatograaf
MS	massaspectrometrie of massaspectrometer
SPME	<i>solid phase micro extraction</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i>
CP	centrumpunt
T	temperatuur
EtOH	ethanol
OFAT	<i>one-factor-at-a-time</i>

Abstract

Kenmerkend voor elke witte wijn is zijn specifiek aroma, zijnde een mengsel van vluchtige componenten die zich in de dampfase boven de wijn vrijzetten. Onderzoek naar de complexiteit van de aanwezige moleculen is belangrijk om verschillen in wijnaroma's aan te tonen. Het doel van dit onderzoek is enerzijds achterhalen welke componenten verantwoordelijk zijn voor een typisch wijnaroma. Vanwege hun zeer lage concentraties in de dampfase van wijn is een opconcentratie nodig zodat iedere component geanalyseerd kan worden. Opconcentreren gebeurt met behulp van de headspace techniek (HS), een simulatie van de wijnconsumptie door de mens. Om de gevoeligheid van de analyse te verhogen wordt dit voorafgegaan door een vacuümdestillatie. Anderzijds wordt onderzocht hoe de samenstelling van aromacomponenten in de headspace wordt beïnvloed. Dit gebeurt door het variëren van pH, temperatuur en ethanolconcentratie in een referentiestaal. Esters zijn het meest verantwoordelijk voor een specifiek wijnaroma. De vacuümdestillatie leidt tot verlies van de dampfase en bijgevolg onvermijdelijk verlies van aroma. GC-MS-analyses op een referentiestaal gevolgd door een regressieanalyse leren dat pH en temperatuur een significante invloed hebben. Tevens wordt elke aromacomponent op een welbepaalde manier beïnvloed en interageren aromacomponenten met elkaar. Bijgevolg is het simuleren van een wijnaroma een zeer complex gegeven en zijn interpretaties ervan mogelijk incorrect.

Abstract in English

Each white wine is characterized by its specific aroma, a mixture of volatile compounds in the headspace above the wine. Research on the complexity of these molecules is important in order to verify the differences in aromas of wines. The purpose of this research is, at first, to determine which compounds are responsible for creating a wine aroma. Because of their low concentration in the headspace, it is required to increase their concentration so that each compound can be analyzed. Concentration increasing is performed by using the headspace technique (HS), a simulation of the wine consumption by humans. In order to increase the sensitivity of the analysis, this technique is preceded by a vacuum distillation. Then, the impact of multiple factors that can alter the composition of aroma compounds in the headspace is examined. This is achieved by fluctuating pH, temperature and ethanol concentration in a reference sample. Esters are most responsible for a wine aroma. The vacuum distillation leads to loss of the gas phase and thus inevitable loss of aroma. GC-MS analyzes on a reference sample followed by a regression analysis indicates that pH and temperature have a significant influence. Therefore, each aroma compound is influenced in a certain way and aroma compounds interact with each other. Consequently, simulating a wine aroma is a very complex process and interpretations can therefore often be incorrect.

1 Inleiding

Een belangrijke factor in het karakteriseren van wijnkwaliteit is de aanwezigheid van het aroma dat men waarneemt bij het drinken en vooral het ruiken van wijn. De specifieke geur van witte wijn wordt bepaald door een mengsel van vluchtige componenten die zich in de dampfase boven de wijn vrijzetten. Verschillende nuances in het aroma maken het voor een wijnproducent interessant om de complexiteit van de aanwezige moleculen te onderzoeken [2]. Dit is nodig om een onderscheid te maken in de aroma's van verschillende witte wijnen en zo een wijn als kwalitatief hoogstaand te kunnen aanduiden. Zoals in de thesis van Drs. Ir. Guido De Mets wordt dit laatste beslist door een panel van professionele wijnconsumenten [3].

Achterhalen welke componenten in de dampfase verantwoordelijk zijn voor een bepaald wijnaroma is een doel van dit wetenschappelijk onderzoek. Aangezien de aromagevende componenten echter in lage concentraties aanwezig zijn in wijn (net voldoende om een aangename geur en smaak te geven voor de consument) is het een moeilijke opdracht deze te detecteren en te identificeren. Daarom is eerst een opconcentratie nodig zodat vervolgens een analyse kan worden toegepast waarbij de moleculen met zekerheid geïdentificeerd kunnen worden en dit op zo een manier dat de methode financieel haalbaar is voor wijnproducenten. Het opconcentreren wordt algemeen uitgevoerd via extractie en wordt beschouwd als een voorbehandelingsstap op de eigenlijke analyse [2]. De extractie is een scheidingsmethode op basis van de affiniteit van de componenten voor een omgeving of een fase. De meest gebruikte methode in gelijkaardige onderzoeken is de *solid phase micro extraction* (SPME) of vastefasemicro-extractie [4]. Omdat deze extractie een dure en selectieve methode is en dit onderzoek als doel heeft aromastoffen op te concentreren en te analyseren op een goedkope manier en op basis van de manier waarop de mens een wijn consumeert, wordt de headspacetechniek (HS) toegepast. Bij deze techniek diffunderen aromastoffen van de vloeistoffase naar de dampfase totdat het thermodynamisch evenwicht is bereikt. Het is deze dampfase dat het staal vormt voor analyse omwille van het feit dat de mens enkel moleculen in de dampfase kan ruiken. Aangezien de aromaopbrengst in de dampfase voor detectie te laag is, wordt de headspacetechniek voorafgegaan door een vacuümdestillatie. Wanneer de aromastoffen na het uitvoeren van de analyse gedetecteerd en geïdentificeerd kunnen worden, kan het opconcentratieproces als geslaagd worden beschouwd.

Naast een opconcentratie wordt onderzocht of de samenstelling van de aromacomponenten in de headspace beïnvloed kan worden door het variëren van omgevingsparameters die in commerciële witte wijnen verschillen. Door de belangrijkste aromacomponenten op te lossen in een ethanol-wateroplossing wordt een referentiestaal bereid waarbij pH, temperatuur en ethanolconcentratie gevarieerd worden voor analyse. Na een aantal inleidende testen wordt een experimenteel plan opgesteld en uitgevoerd waarna de bekomen resultaten statistisch worden verwerkt met het programma JMP (software van

SAS). Op deze manier kan op artificiële wijze het aroma van het referentiestaal beïnvloed worden en in verder onderzoek het aroma van een witte wijn.

Na de headspacetechniek (HS) worden de aromacomponenten (enerzijds uit opconcentratie, anderzijds uit een referentiestaal) geanalyseerd via GC-MS. In de eerste stap van de analyse worden de aromastoffen in de dampfase gedetecteerd via gaschromatografie (GC) waarna ze in de tweede en laatste stap via massaspectrometrie (MS) geïdentificeerd worden. GC-MS voorafgaand met een opconcentratie maakt analyses in het nanogram ($\mu\text{g/L}$) - gebied mogelijk wat belangrijk is voor aromatische componenten vermits deze in zeer lage concentraties aanwezig zijn [2], [4].

Welke moleculen aan de basis liggen van een aroma van een witte wijn wordt in Hoofdstuk 2 'Literatuurstudie' aangehaald na een korte inleiding over de hoofdcomponenten in een wijn. Deze hoofdcomponenten leveren een grote bijdrage in de wijnbereiding en dus ook in de vorming van belangrijke aromastoffen. Vervolgens wordt de sensorische waarneming van de aromastoffen kort aangehaald waarop de verdere HS-GC-MS-analyse is gebaseerd. Deze analyse voorafgegaan door experimentele procedures wordt in Hoofdstuk 3 'Materiaal en methoden' uitgebreid besproken en in Hoofdstuk 4 'Resultaten en discussie' geëvalueerd. Hoofdstuk 5 'Conclusie en future work', vat de belangrijkste bevindingen van dit onderzoek samen en eindigt met een vooruitblik voor verder onderzoek.

2 Literatuurstudie

2.1 Hoofdcomponenten in wijn

2.1.1 Organische zuren

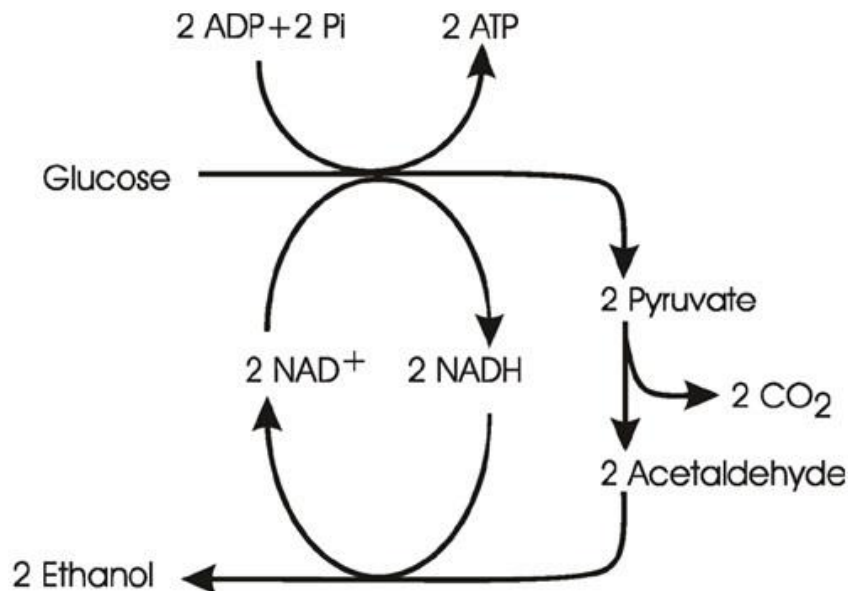
Zuur in wijn werkt conserverend en zorgt ervoor dat de wijn zijn frisheid en fruitigheid behoudt. Oorspronkelijk bevat de druif zuren zoals appelzuur, wijnsteenzuur en citroenzuur maar tijdens het gistingsproces worden ook zuren zoals melkzuur en azijnzuur gevormd. Suiker wordt enzymatische verkregen tijdens de rijping van de druiven (zie volgende paragraaf: Suikers en glycerol) [5]. Het suikergehalte stijgt en het zuurgehalte daalt in functie van de tijd. Het op tijd plukken van de druiven om een wijn te verkrijgen met optimaal suiker- en zuurgehalte is hier dus van uiterst belang [6].

2.1.2 Suikers en glycerol

Tijdens de rijping wordt sucrose naar de druif getransporteerd waar het door een hydrolase (invertase) gesplitst wordt in glucose en fructose. Glucose kan zich door het enzym glucose isomerase omzetten tot fructose. Onder andere deze 2 suikers zorgen voor de zoete smaak van de vrucht [5]. Glycerol, een alcohol met een zoete smaak, levert ook een bijdrage in de zoetkracht van de wijn. In de volgende fase van de wijnbereiding, fermentatie genoemd, wordt een deel van de suiker vergist tot alcohol. Dit proces gaat door totdat de gewenste hoeveelheid suiker is gefermenteerd. Dit voorgaande is afhankelijk van het type wijn en de hoeveelheid suiker oorspronkelijk aanwezig in de druif. De concentratie aan (niet gefermenteerde) suiker in de wijn bepaalt de zoetkracht van een wijn [6].

2.1.3 Ethanol

Ethanol is het product dat verkregen wordt door fermentatie van suiker aanwezig in de druiven, dit proces wordt alcoholische gisting genoemd. De hoeveelheid suiker aanwezig in de druif bepaalt de maximale hoeveelheid alcohol dat gevormd kan worden. Het fermentatieproces is een natuurlijk proces dat door de wijnproducent kan gemanipuleerd worden om een gewenste wijn te verkrijgen [6], [7]. Figuur 1 geeft de globale pathway van de alcoholfermentatie weer [8].



Figuur 1: Alcoholfermentatie [8]

Glucose wordt tijdens de glycolyse door glycolytische enzymen omgezet tot pyruvaat. In een anaeroob milieu ondergaat pyruvaat een decarboxylatie waardoor acetaldehyde ontstaat. Bij deze stap komt CO₂ vrij. Acetaldehyde wordt tot slot gereduceerd tot ethanol [5], [9].

2.1.4 Tannines

Tannines zijn polyfenolen, antioxidanten die de wijnbewaring verlengen, en hebben dus net zoals zuren een conserverend effect. Tijdens wijnveroudering zal door oxidatie tannine polymeriseren en neerslaan wat de wijn verzacht. Tannines hebben immers een bittere smaak en blijven circuleren in de mond, op zoek naar eiwitten om zich aan vast te klampen en leveren zo een droog mondgevoel. Verder spelen tannines een belangrijke rol in de textuur (vooral in kleur) van rode wijn. Ze zijn aanwezig in de schil en in de pit van de druif en zijn dus vooral in een rode druif aanwezig [6].

Het verkrijgen van de gewenste concentraties van zuur, suiker, alcohol en tannine in wijn ligt aan de basis van de wijnbereiding en is voor iedere wijn verschillend. Tijdens deze bereiding speelt de gedeeltelijke (om)vorming tot aromacomponenten een cruciale rol.

2.2 Aromacomponenten in wijn

Tijdens de bereiding van wijn kunnen de aromastoffen op drie verschillende manieren ontstaan. Ten eerste kunnen ze vrijkomen bij het pletten van de druiven, gekoppeld aan eventuele enzymatische reacties (variëtaale aroma's of primaire aroma's). Ten tweede kunnen ze zich ontwikkelen tijdens de fermentatie (fermentatie-aroma's of secundaire aroma's) en ten derde tijdens de veroudering van de wijn (postfermentatie-aroma's of tertiaire aroma's) [10].

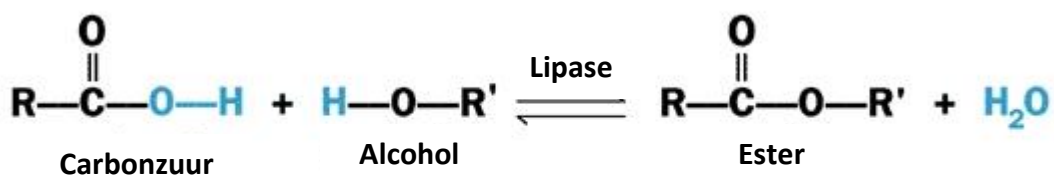
Aromastoffen zijn vluchtige componenten en hebben dus de neiging om naar de dampfase te ontsnappen. De relatieve volatiliteit van een molecule ten opzichte van de wijnoplossing is de bepalende factor. Deze is afhankelijk van de dampspanning (druk veroorzaakt door de aanwezige dampmoleculen) die op zijn beurt afhankelijk is van de temperatuur en van de eigenschappen van molecule en solvent.

Een reeks van chemische componenten aanwezig in wijn zijn esters, terpenen, benzenen, alcoholen, zuren, lactonen, carbonylverbindingen, acetalen, fenolen, zwavel- en stikstofbevattende vluchtige verbindingen [10].

In de volgende paragrafen worden de belangrijkste van deze componenten uitgebreid besproken aan de hand van enkele voorbeelden en hun voorkomen in witte wijn.

2.2.1 Esters

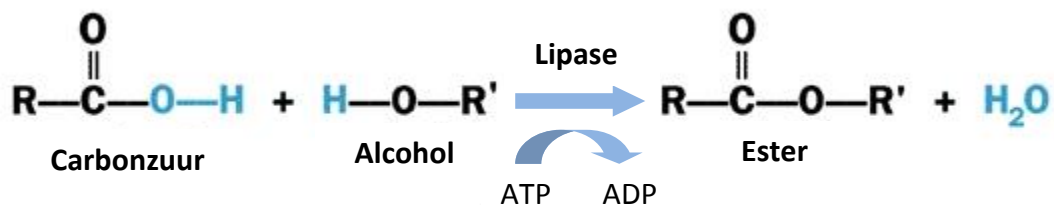
Esters vinden hun oorsprong in de druif maar worden vooral enzymatisch bereid tijdens de fermentatie. In dit proces reageren een deel van de gevormde alcoholen met organische zuren wat esters oplevert in lage concentraties. Figuur 2 geeft deze esterificatie met algemene structuurformules weer.



(met R en R' als algemene koolwaterstofgroepen)

Figuur 2: Esterificatie [11]

Het hydrolase, lipase, katalyseert deze hydrolysereactie in beide richtingen. Vanwege het vrijkomen van water is de reactie energetisch ongunstig en gaat in vivo dus naar links. Om deze omgekeerde hydrolysereactie, weergegeven in Figuur 3, mogelijk te maken dient er dus gekoppeld te worden met ATP. Dit wordt verkregen uit de eerste fase van de alcoholfermentatie (zie Figuur 1) [9], [12].



(met R en R' als algemene koolwaterstofgroepen)

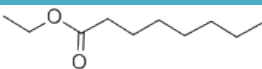
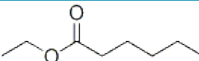
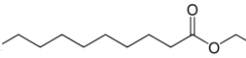
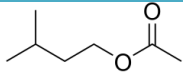
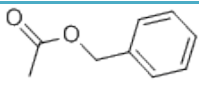
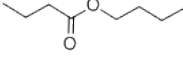
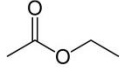
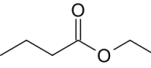
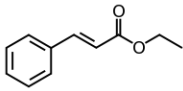
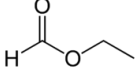
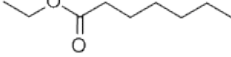
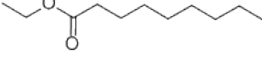
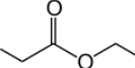
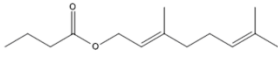
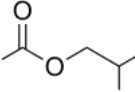
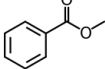
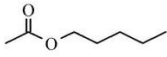
Figuur 3: Esterificatie gekoppeld met ATP [11]

De meest voorkomende esters zijn ethylesters en acetaatesters. Ethylesters worden gevormd door reactie van ethanol met een organisch zuur of een vetzuur. Voorbeelden van belangrijke gefermenteerde ethylesters zijn ethylbutyraat, ethylhexanoaat, ethyloctanoaat, ethyldecanoaat en ethyldodecanoaat. Acetaatesters worden gevormd door reactie van ethanol, of een ander alcohol, met een acetaat (derivaat van azijnzuur) [13]. Ethylesters en acetaatesters vormen de grootste kwalitatieve bestanddelen in wijn en zijn verantwoordelijk voor een karakteristiek en intens aroma. Er zijn meer dan 160 esters geïdentificeerd waarvan slechts enkele in voldoende grote hoeveelheden voorkomen en zo de belangrijkste vluchtige bestanddelen vormen die typisch zijn voor een fruitige wijngeur [10].

Belangrijke esters die een bijdrage leveren in het aroma van witte wijn zijn ethylacetaat, isoamylacetaat, ethylhexanoaat en ethyloctanoaat [10], [14]. Deze worden samen met een aantal andere veel voorkomende esters in Tabel 1 weergegeven. In de tabel wordt voor de meeste esters ook het kookpunt weergegeven, deze zijn nodig bij de vacuümdestillatie (zie pagina 29) [15].

Tabel 1: Verschillende esters met hun kookpunt [15].

De esters die veel voorkomen in witte wijn worden in het vetgedrukt weergegeven.

Ester	Structuur	Geur en/of voorkomen	Kookpunt (°C)
Ethyl octanoaat Ethyl caprylaat		Ester van octaanzuur en ethanol. Aanwezig in alcoholische dranken en wordt gebruikt in samenstellingen van fruitaroma's.	206-208
Ethyl hexanoaat Ethyl caproaat		aardbei	168
Ethyl decanoaat Ethyl capraat		fermentatieproduct bij wijnbereiding	245
Isopentylacetaat Isoamylacetaat		bananengeur	142
Benzylacetaat		peer, aardbei parfums, cosmetica	208
Butylbutyraat		ananas	165
Ethylacetaat		oplosmiddel, verf, lijm wijn	77
Ethylbutyraat		banaan, ananas, aardbei parfum, snoep	121
Ethylcinnamaat		kaneel aromastof	271-272
Ethylmethanoaat		limoen, rum, aardbei	
Ethylheptanoaat		abrikoos, kers, druif, framboos	
Ethylnonanoaat		druif	
Ethylpropanoaat		ananas parfum, drank, snoep, ...	98-100
Geranylacetaat		pelargonium	
Isobutylacetaat		kers, framboos, aardbei	118
Ethylbenzoaat		framboos, druif	
Pentylacetaat		peer, appel	149


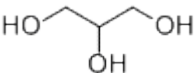
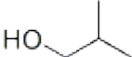
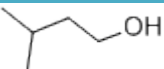
Volgens G. Antalick, M.-C. Perello en G. de Revel [16] is ethyloctanoaat in de hoogste concentratie aanwezig in wijn (180–2700 µg/L), gevolgd door ethylhexanoaat wat in hetzelfde concentratiegebied ligt (160–2000 µg/L). Ethylbutyraat en ethyldecanoaat bevinden zich in hetzelfde concentratiegebied maar iets lager dan de 2 voorgaande (respectievelijk 80–750 µg/L en 10–800 µg/L).

Lactonen zijn cyclische ketonen en ontstaan via intramoleculaire esterificatie tijdens de fermentatie en tijdens de bewaring van wijn [10].

2.2.2 Hogere alcoholen

Alcoholen worden, zoals eerder vermeld, gevormd tijdens de fermentatie van suikers en worden met organisch zuur deels omgezet tot esters. Ethanol en glycerol zijn kwalitatief de meest voorkomende alcoholen in wijn, gevolgd door diolen en hogere alcoholen (alcoholen met meer dan 2 koolstofatomen). Ethanol bepaalt eerder de structuur en textuur van wijn en hogere alcoholen zijn verantwoordelijk voor het aroma. Andere veel voorkomende gefermenteerde alcoholen in wijn zijn propanol, 2-methyl-1-propanol (isobutylalcohol), 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol (isoamylalcohol), 2-fenylethanol en 5-hexanol [10], [16]. Enkele van deze alcoholen worden in Tabel 2 weergegeven.

Tabel 2: Verschillende alcoholen in witte wijn met hun kookpunt [15]

Alcohol	Structuur	Geur en/of voorkomen	Kookpunt (°C)
Ethanol		Meest voorkomend in alcoholische dranken	78
Glycerol		Zoetmaker	290
Isobutylalcohol		Reagens in synthese van esters	108
Isoamylalcohol Isopentylalcohol		In bier, wijn en sterkedrank. Grondstof voor de synthese van geurstoffen.	131-132

2.2.3 Aldehyden en ketonen

Aldehyden en ketonen komen in wijn oorspronkelijk in kleine hoeveelheden voor en spelen dus geen intrinsieke rol in de bijdrage tot primaire aroma's. Het meest voorkomende aldehyde in wijn is acetaldehyde dat gevormd wordt in het gistingsproces tijdens de alcoholische fermentatie en vervolgens in concentratie toeneemt tijdens de bewaring door oxidatie van ethanol. Het gevormde aldehyde reageert verder tot azijnzuur wat resulteert in een afname van geurintensiteit en geurcomplexiteit en in het ontstaan van vluchtige zuren, die zogenaamde sherrygeuren vrijgeven (zie volgende paragraaf) [10]. Acetaldehyde heeft een kookpunt dat tussen 20-21°C ligt en heeft een sterk fruitige geur [15].

De concentratie aan vluchtige ketonen in wijn blijft laag gedurende de bereiding maar de kleine hoeveelheid oorspronkelijk aanwezig in de druif is wel bestand tegen het fermentatieproces. Typische vluchtige ketonen zijn β -damascenone, α -ionone, β -ionone en diacetyl. De eerste speelt een rol in vele witte wijnen waar het in hogere concentraties voorkomt en een gewenst aroma oplevert [10].

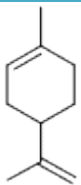
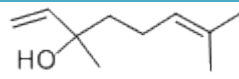
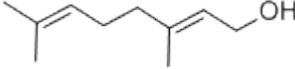
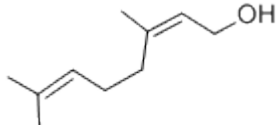
2.2.4 Vluchtige zuren

Vluchtige zuren in wijn ontstaan tijdens het fermentatieproces en is in beperkte hoeveelheden gewenst. Azijnzuur, boterzuur, propionzuur en barnsteen zuur dragen in geringe hoeveelheden bij tot het aroma en structuur van de wijn. Een toename van deze vluchtige zuren wordt veroorzaakt door aerobe bacteriën. Het remmen van hun aangroei en het vermijden van zuurstof is dus aan te raden [14], [17].

2.2.5 Terpenen

Een laatste component dat een bijdrage levert in een karakteristiek aroma zijn terpenen. Terpenen worden gevormd door een aantal isopreen-eenheden en zijn van nature in de druif aanwezig. De meest voorkomende terpenen (zie Tabel 3) in witte wijn zijn limoneen (citrus), linalool (koriander), geraniol en nerol (rozengeur). Uiteraard bevat wijn nog meerdere (minder voorkomende) terpenen die mee een rol spelen in de vorming van een aroma. Combinatie van verschillende terpenen levert een karakteristiek aroma voor een wijn [4], [18].

Tabel 3: Verschillende terpenen in witte wijn met hun kookpunt [15]

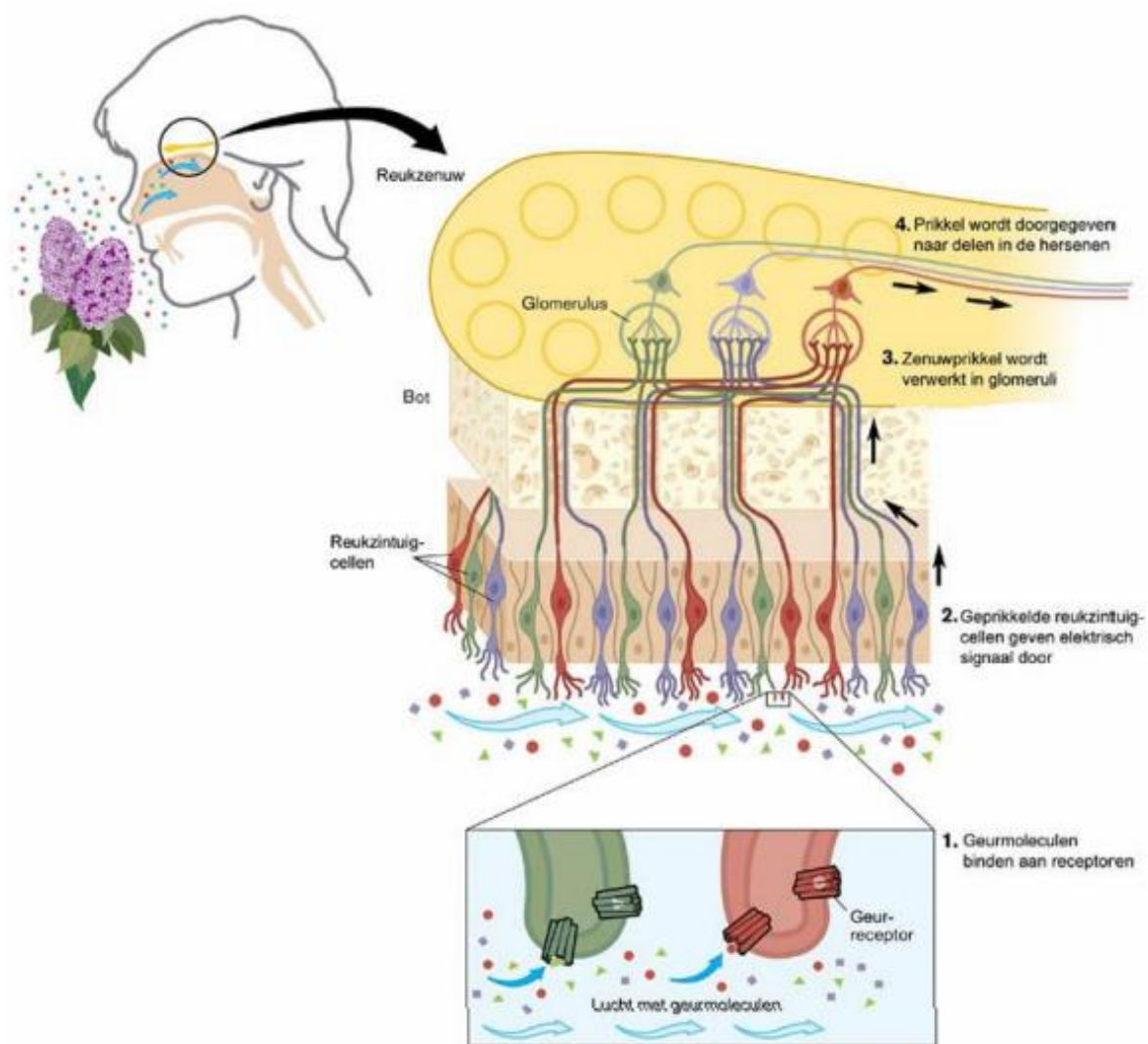
Terpeen	Structuur	Geur en/of voorkomen	Kookpunt (°C)
Limoneen		citroengeur	176-177
Linalool		koriander, lavendel	199
Geraniol		parfumerie, cosmetica, rozengeur	230
Nerol		frisse, citroen, bloemachtige geur	103-105

Van de 5 vermelde componenten zijn esters diegene met het grootste aandeel in de vorming van een bepaald aroma. Bij aromaperceptie tijdens de wijnconsumptie zijn het dus ook vooral deze moleculen die worden waargenomen. Hoe die waarneming precies gebeurt wordt in volgende paragraaf toegelicht. Verdere analyse van de aromastoffen, vooral esters dus, is hierop gebaseerd.

2.3 Sensorische waarneming van aroma

2.3.1 Geurperceptie

Het aroma van wijn wordt bepaald door zeer veel verschillende aromacomponenten aanwezig in de wijn en is verantwoordelijk voor de geurwaarneming. Deze waarneming gebeurt doordat vluchtige stoffen in de neus geraken en daar binden met geurbindende eiwitten of receptoren aanwezig in het slijmvlies van het reukepitheel (reukzintuigcellen) (zie Figuur 4). Na deze prikkel wordt het enzym adenylaatcyclase geactiveerd en openen de ionenkanalen zich wat resulteert in een depolarisatie van de membraan. Bij een depolarisatie wordt de normale ionenbalans van de cel verstoord door het optreden van moleculair transport doorheen de celmembraan. Na^+ en vervolgens Ca^{2+} die oorspronkelijk buiten de cel worden gehouden, stromen na het openen van de poorten (gevolg van prikkel) wegens concentratieverschil naar binnen [12]. Dit signaal wordt naar het reukorgaan gestuurd en vervolgens waargenomen door de hersenen [2], [19].



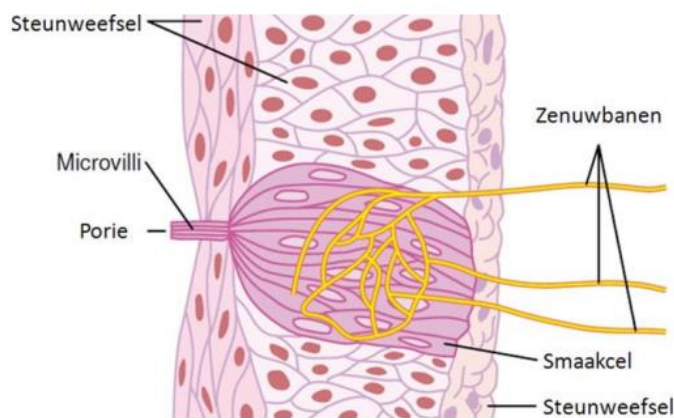
Figuur 4: Geurperceptie [19]

Naast deze orthonasale geurwaarneming door de neus gebeurt er ook een retronasale geurwaarneming in de mond. Aroma wordt immers niet enkel waargenomen tijdens het ruiken maar ook tijdens het proeven van wijn. Wanneer wijn in de mond wordt gebracht komen de vluchtige componenten vrij. Na circulatie in de mond worden de componenten waargenomen door het geurzintuig (mondelijke mededeling Drs. Ir. Guido De Mets), [20].

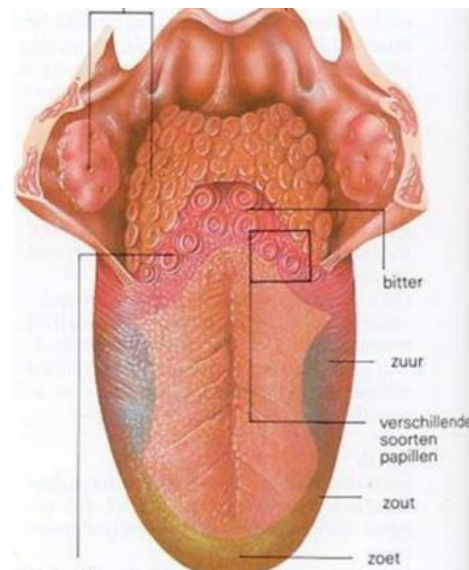
2.3.2 Smaakperceptie

Een volgende factor in de consumptie van wijn is de smaakwaarneming. Bij het drinken van wijn lossen wijnmoleculen gedeeltelijk op in het speeksel om vervolgens in de poriën van de smaakpapillen terecht te komen (zie Figuur 5). Onder deze poriën bevindt zich een hoopje smaakcellen, waarvan de microvilli specifieke receptoren bezitten. Dit houdt concreet in dat de receptoren bepaalde moleculen specifiek binden, bijvoorbeeld een molecule zout (vb. het natriumion uit keuzenzout) zal enkel gebonden worden door een receptor van smaakpapillen in het gebied op de tong waar zout wordt waargenomen (zie Figuur 6). Pas na een specifieke binding ontstaat een signaal (zoals hierboven uitgelegd) dat via de

zenuwbanen naar de hersenen wordt geleid. De hersenen herkennen waar de prikkel ontstaat en zo wordt (indien in voldoende hoge concentratie aanwezig) zuur, zout, bitter, zoet (of umami) waargenomen [19].



Figuur 5: Doorsnede smaakpapil [19]



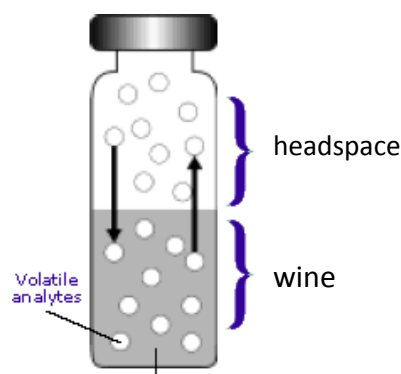
Figuur 6: Smaakpapillen op tong [19]

2.4 Analyse van aromastoffen

Het aroma van wijn wordt beïnvloed door de wijnmatrix, deze heeft immers effect op de vluchtigheid en op een stijging of daling in concentratie van de wijncomponenten in de dampfase of headspace. Voor analyse worden de aromacomponenten in deze dampfase opgevangen via de headspacetechniek. Omdat de componenten die verantwoordelijk zijn voor het wijnaroma in lage concentraties (ng/L) aanwezig zijn, is het belangrijk eerst een voorbehandelingsstap uit te voeren waarbij de te analyseren componenten worden opgeconcentreerd [4]. Door zijn hoge gevoeligheid is de meest voor de hand liggende methode hiervoor een vastefasemicro-extractie (SPME). Echter vanwege zijn selectieve vezel (zie pagina 28) geeft deze techniek geen juiste simulatie van de wijnperceptie door de mens weer. Bovendien voldoet een SPME niet aan de voorwaarde die in dit onderzoek is opgesteld. Het is een zeer dure methode en dus niet van toepassing voor wijnproducenten. Als goedkopere methode voor opconcentratie wordt een destillatie onder vacuüm geopteerd. Een alternatief in dit onderzoek is om de samenstelling van de aromacomponenten in de headspace te manipuleren door het variëren van parameters in een referentiestaal. De opgeconcentreerde componenten kunnen vervolgens via gaschromatografie (GC) gescheiden en met een massaspectrometer (MS) geïdentificeerd worden [2], [4], [21].

2.4.1 Headspacetechniek (HS)

Op basis van de manier waarop de mens een wijn consumeert of de aromastoffen ervaart, wordt een techniek toegepast die deze sensorische waarneming simuleert voor het analyseren van aroma. Zoals eerder vermeld wordt de geur van wijn die de mens waarneemt bepaald door een mengsel van vluchtige stoffen in de dampfase boven de wijn. Vanuit dit opzicht wordt geopteerd voor een headspacetechniek (HS) (zie Figuur 7). Concreet diffunderen aromacomponenten vanuit de vloeistoffase (wijnmatrix) naar de dampfase (headspace) totdat het thermodynamisch evenwicht is bereikt [22]. Bij deze techniek wordt staal genomen uit de dampfase boven de wijn en niet rechtstreeks uit de vloeistof [21], [23].



Figuur 7: Headspacetechniek (HS) [23]

Door het gebruik van deze techniek worden alle componenten die vrijkomen in de dampfase geïnjecteerd net zoals alle componenten die zich in de dampfase bevinden door de neus worden opgenomen. Op dit laatste zit immers wel enige selectiviteit. Sommige moleculen worden genegeerd, terwijl andere een groot effect hebben. Bovendien verschilt dit van individu tot individu (mondeline mededeling Drs. Ir. Guido De Mets). Een beperking van deze methode is een te lage aromaopbrengst in de dampfase waardoor aromastoffen niet met zekerheid gedetecteerd en geïdentificeerd kunnen worden. Om de opbrengst te verhogen worden in volgende paragraaf oplossingen voorgesteld die de vluchtigheid van de aromastoffen bevorderen zodat deze stoffen opconcentreren. Kookpunt, dampspanning en oplosbaarheid van de stoffen in water of ethanol hebben effect op de vluchtigheid en spelen hierbij dus een belangrijke rol.

2.4.2 Opconcentreren

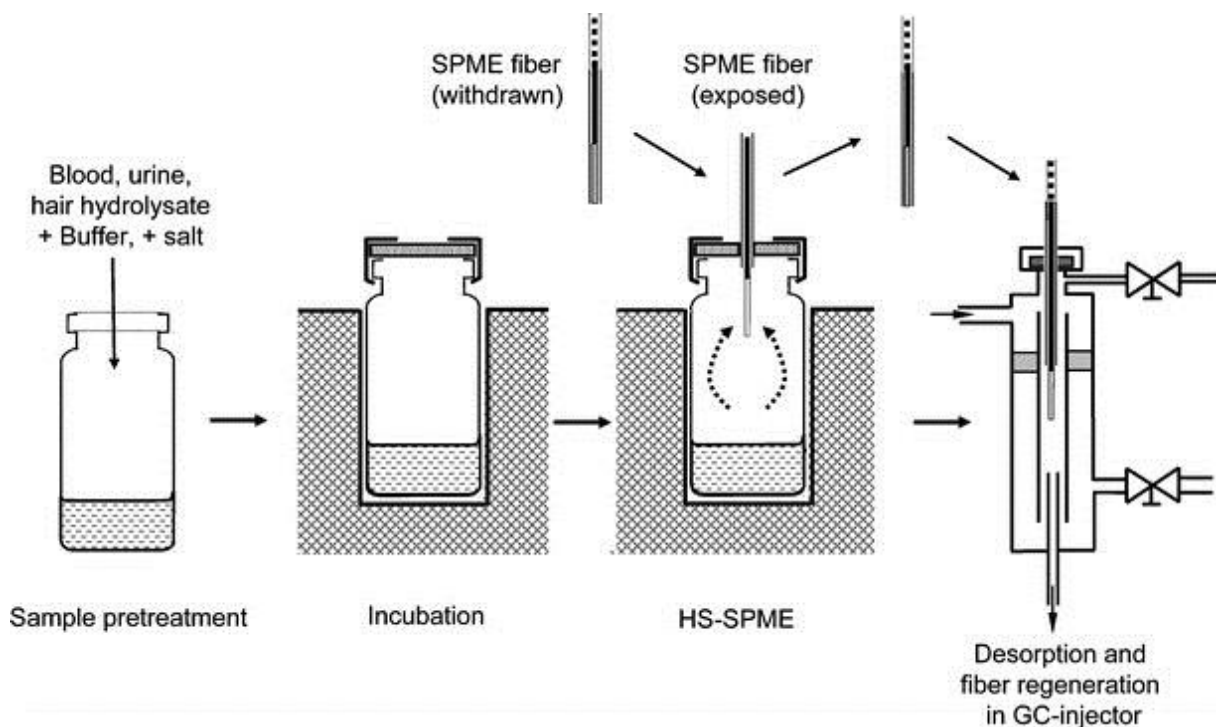
In de loop der jaren zijn verschillende technieken toegepast om aromastoffen op te concentreren. Deze technieken baseerden zich, zoals eerder vermeld, op extractie. Extraheren wordt beschouwd als een voorbehandelingsstap op de eigenlijke analyse en gebeurt op basis van de affiniteit van de componenten voor een omgeving of een fase [2]. Aanvankelijk werd een opconcentratie uitgevoerd via een vloeistof-vloeistof extractie. Dit werd al snel vervangen door een vastefase-extractie of *solid phase extraction* (SPE). Wegens

het gebruik van solventen, de trage analyse en de te lage gevoeligheid van deze technieken wordt vandaag de dag eerder gebruik gemaakt van een vastefasemicro-extractie of *solid phase micro extractie* (SPME) [2]. Deze extractie wordt hieronder besproken.

2.4.2.1 Vastefasemicro-extractie (SPME)

Literatuuronderzoek leert dat voor de isolatie van vluchtige wijncomponenten gebruik wordt gemaakt van de vastefasemicro-extractie of *solid phase micro extraction* (SPME). Deze techniek maakt gebruik van een gecoate, intrekbare vezel beschermd in een naald en werkt goed voor sporen van apolaire en semipolaire componenten in water. Een 30-tal aromacomponenten kunnen op deze manier geëxtraheerd worden [22]. SPME vertrekt vanuit hetzelfde principe als de headspacetechniek. De aromastoffen verdampen van de vloeistoffase naar de dampfase totdat het thermodynamisch evenwicht is bereikt. De componenten die zich in de dampfase bevinden, binden zich nu op de microvezel. Door het gebruik van een vezel wordt meer stoffen geëxtraheerd omwille van de constante aanvoer van componenten van de dampfase naar de vezel (stationaire fase) en tegelijkertijd van de vloeistoffase naar de dampfase. Deze techniek wordt daarom *headspace solid phase micro extraction* (HS-SPME) genoemd.

Figuur 8 verduidelijkt de opeenvolgende stappen van de HS-SPME-procedure.



Figuur 8: HS-SPME-procedure [24]

Een bepaalde hoeveelheid wijn wordt in een vial gebracht en vervolgens geïncubeerd. Deze incubatietijd is nodig om de aromastoffen de tijd te geven om te verdampen, eventueel onder roeren. Dit verhoogt de concentratie aan aromastoffen in de dampfase en dus ook de

gevoeligheid van de techniek. Na incuberen prikt de naald door het septum van de vial en wordt de vezel in de headspace gebracht. De vezel staat nu bloot aan de aromastoffen in de dampfase en extractie vindt plaats. Door de vezel (naald) vervolgens in de GC te injecteren worden de vastgehouden moleculen geresorbeerd [21], [23]. Als vezel kan, afhankelijk van de polariteit van te extraheren componenten, gebruikt worden gemaakt van polydimethylsiloxaan, polyacrylaat, polydimethylsiloxaan polydivinylbenzeen, polyethyleen glycol, carboxen, of combinaties van deze voorgaande. De voorkeur gaat uit naar een 50/30 µm DVB-CAR-PDMS fiber (divinyl benzene–Carboxen–polydimethylsiloxane) [21], [22].

Naast de hoge kostprijs is het nadeel van deze techniek dat de vezel selectief componenten extraheert. Enkel de aromastoffen die een (hoge) affiniteit hebben voor dit type vezel worden met de GC-MS geanalyseerd. Dit benadert de sensorische waarneming van de mens dus niet voldoende. Om dit probleem te minimaliseren kan gebruik worden gemaakt van een vezel met een algemene stationaire fase, een fase waar alle componenten een affiniteit voor hebben.

Omdat in dit onderzoek de aandacht is gevestigd op de kostprijs en het niet-selectief opvangen van de dampfase wordt als alternatief een vacuümdestillatie geopteerd.

2.4.2.2 Vacuümdestillatie

Met een vacuümdestillatie wordt getracht de concentratie aan componenten, die niet met de headspacetechniek geanalyseerd kunnen worden, te verhogen. Deze opstelling biedt bovendien de mogelijkheid grotere volumes aromatische witte wijn te analyseren.

De kookpunten van de aromastoffen en de onderdruk zijn hier belangrijke factoren. Door temperatuurstijgingen kan worden nagegaan of de componenten gescheiden kunnen worden op basis van hun kookpunt. Literatuuronderzoek leert dat hierbij een onderdruk aangelegd dient te worden zodat minder hoge temperaturen nodig zijn om de componenten in de wijn te doen verdampen. Na condensatie worden de verschillende aromafracties geanalyseerd met HS-GC-MS om de scheiding en opconcentratie te controleren. Er wordt verwacht dat in de gasfase van het destillaat de concentratie aan vluchtige aromastoffen zodanig is dat de extractieopbrengst via de headspacetechniek hoger zal liggen [23].

Uit literatuuronderzoek blijkt dat na een aantal inleidende testen een factorieel experiment dient opgesteld en uitgevoerd te worden. Door de bekomen resultaten daarna statistisch te verwerken wordt de meest efficiënte combinatie van parameters afgeleid [23]. Ter verduidelijking wordt in de volgende alinea een voorbeeld van een factorieel experiment uitgewerkt.

Om een optimale respons te verkrijgen bij de HS-GC-MS-analyse dienen een aantal experimenten uitgevoerd te worden waarbij de destillatieparameters variëren [23].

Bijvoorbeeld temperatuur, druk, wijnvolume en destillatietijd worden zowel op een hoog (1) als laag (-1) niveau ingesteld, aan de hand van waarden gevonden in de literatuur [21], [25]. Concreet is dit dus een experiment met 4 factoren op 2 niveaus (2^4 -experiment) wat 16 testen oplevert. Hieraan wordt best nog 2 keer een herhaling in het centrumpunt (CP) of gemiddelde toegevoegd om een lineaire benadering te verbeteren. Aan de hand van dit factorieel experimenteel design kan worden nagegaan bij welke combinatie van destillatieparameters de extractieopbrengst het grootst is. Een voorbeeld van de instellingen van een factorieel experimenteel design worden in Tabel 4 en Tabel 5 weergegeven.

Tabel 4: Instellingen 2^4 -experiment

Tests	A	B	C	D	Respons
1	-1	-1	-1	-1	
2	-1	-1	-1	1	
3	-1	-1	1	-1	
4	-1	-1	1	1	
5	-1	1	-1	-1	
6	-1	1	-1	1	
7	-1	1	1	-1	
8	-1	1	1	1	
9	1	-1	-1	-1	
10	1	-1	-1	1	
11	1	-1	1	-1	
12	1	-1	1	1	
13	1	1	-1	-1	
14	1	1	-1	1	
15	1	1	1	-1	
16	1	1	1	1	
17	0	0	0	0	
18	0	0	0	0	

Tabel 5: Toekenning niveaus en factoren voor een 2^4 -experiment

	Factor				
	A	B	C	D	
		Temperatuur (°C)	Druk (bar)	Tijd (min)	Volume (mL)
Niveau	-1	40	0,1	10	10
	1	80	1	60	100
CP	0	60	0,55	35	55

Een vacuümdestillatie heeft wel enkele praktische problemen. Enerzijds is destillatie algemeen een traag proces, anderzijds kan tijdens destillatie analiet verloren gaan [2], [21].

2.4.3 Referentiestaal

Een alternatief in dit onderzoek is gebaseerd op het beïnvloeden van de samenstelling van de aromacomponenten in de headspace. Uit literatuuronderzoek kunnen een aantal aromastoffen gekozen worden op basis van hun voorkomen in witte wijn en op basis van hun chemische structuur (zie ook 2.2 Aromacomponenten in wijn). Deze componenten (esters, zuren, alcoholen en terpenen) in oplossing leveren een referentiestaal. Aan de hand van dit referentiestaal kan via HS-GC-MS-analyses onderzocht worden in welke mate de vluchtigheid van de stoffen wordt beïnvloed [25]. Concreet wordt dit verwezenlijkt door het variëren van parameters, gevonden in de literatuur, die in een commerciële wijn lichtjes verschillen. De concentratie ethanol in de oplossing kan hierbij gevarieerd worden om na te gaan in welke verhouding ethanol/H₂O de aromastoffen het meest vluchtig voorkomen of het meest de neiging hebben om te ontsnappen aan water. Ook een verandering in de pH en temperatuur kunnen hierop een effect hebben. Ethanolconcentratie en pH worden door de producent bepaald, de temperatuur door de consument. Evenals bij de vacuümdestillatie dient na een aantal inleidende experimenten opnieuw een factorieel experiment opgesteld te worden om te bepalen welke parameters invloed hebben op de verandering in samenstelling van de aromastoffen in de headspace [23]. Voor het referentiestaal en het factorieel experiment die in dit onderzoek worden toegepast wordt verwezen naar pagina 36.

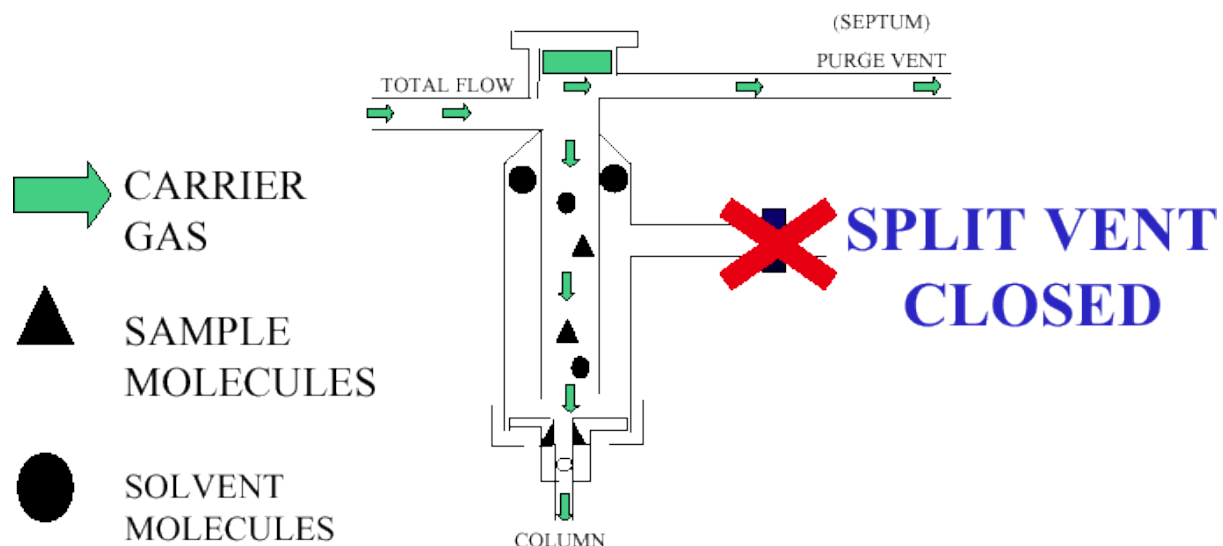
2.4.4 Scheiden, detecteren en kwantificeren (GC-MS)

Na de headspacetechniek worden de aromamoleculen in de gaschromatograaf geïnjecteerd voor analyse. Injectie gebeurt, zoals eerder vermeld, vanuit de dampfase en dus dient het vloeibaar staal best eerst al roerend opgewarmd te worden zodat de headspace voldoende aromastoffen bevat voor detectie [23]. De temperatuur waarop dit gebeurt wordt zodanig gekozen dat de verdamping van water onder controle wordt gehouden. Waarom dit vermeden dient te worden, wordt op het einde van de volgende alinea verklaard. Door temperatuurverhoging neemt de verdamping van de aromacomponenten toe en ontstaat er sneller een evenwicht tussen damp- en vloeistoffase. Aromamoleculen zijn vrij apolair en hebben eerder de neiging om te ontsnappen naar de gasfase dan (polaire) watermoleculen. Hoe langer de koolstofketen van aromacomponenten, hoe meer apolair, hoe slechter oplosbaar in water en hoe hoger het kookpunt (zie Tabel 6) [26].

Met de naald van de injectiespuit wordt staal opgezogen uit de dampfase en vervolgens geïnjecteerd in de verdampingskamer waar het met het draaggas meegevoerd wordt naar de kolom [22]. Omwille van de lage concentratie van de te analyseren moleculen wordt

verwacht dat deze injectie splitless gebeurt (zie Figuur 9). Dit houdt in dat het volledige staal op de kolom wordt gebracht [21], [23]. De scheiding van de monstermoleculen vindt plaats op basis van hun affiniteit voor een apolaire stationaire fase en kookpunten van de moleculen. Moleculen met een lage affiniteit elueren eerder en worden sneller gedetecteerd wat een lage retentietijd oplevert. De retentietijd is afhankelijk van de eigenschappen van de moleculen. In dit onderzoek zijn de te analyseren componenten eerder apolair. De mate van hun polariteit bepaalt hun affiniteit voor de stationaire fase. Een component met een hoge affiniteit ondervindt een sterke interactie met de apolaire kolom, elueert als laatste (hoge retentietijd) en is dus sterk apolair. Een component met een lage affiniteit, heeft een zwakke interactie en een lage retentietijd en is dus eerder polair [22]. Hieruit is duidelijk dat de polaire watermoleculen absoluut vermeden moeten worden op de apolaire kolom. Contaminatie met water veroorzaakt slechte scheidingen.

Splitless Injection



Figuur 9: Splitless injectie bij GC [27]

Zoals Figuur 9 weergeeft is bij een splitless injectie het splitventiel gesloten tijdens de injectie. Dit houdt in dat het geïnjecteerde staal volledig op de kolom terechtkomt. Splitless injectie verhoogt de gevoeligheid en wordt gebruikt bij stalen met een lage concentratie, zoals in dit onderzoek [27].

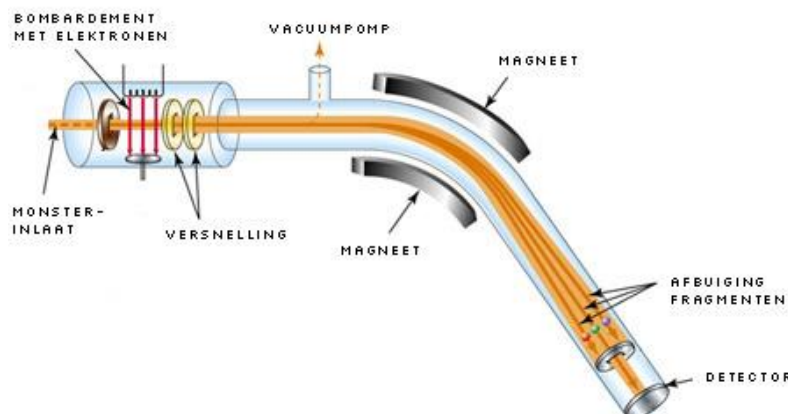
Het nadeel van een splitless injectie is dat een enorme bandverbreding ontstaat omdat er teveel staal op de kolom wordt aangebracht. Dit is een gevolg van het groot volume dat op de kolom gebracht wordt door injectie van de dampfase. Het is in dat geval zinvol over te schakelen naar een split injectie waarbij de meerderheid van het staal wordt afgevoerd via het open splitventiel. Hierdoor komt slechts een deel van het staal op de kolom, dit levert smallere pieken. (mondeline mededeling Roel Wuyts, *Interscience*)

De gescheiden moleculen worden vervolgens gedetecteerd en gekwantificeerd met een vlammionisatiedetector (FID) [23]. De FID detecteert alle organische verbindingen die branden in een luchtwaterstofvlam. Dit resulteert in een chromatogram waarvan de oppervlakte onder elke piek een maat is voor de concentratie van de moleculen [22].

Literatuuronderzoek leert dat, om te kwantificeren een standaardreeks van de te bepalen componenten bereid en geanalyseerd dient te worden. De piekoppervlaktes kunnen vervolgens in functie van de gekende concentraties worden uitgezet en zo wordt een ijklijn opgesteld. Door hierna een analiet met een onbekende concentratie onder dezelfde proefomstandigheden te analyseren kan via interpolatie van de bekomen piekoppervlakte de gevraagde concentratie berekend worden. Verder is in de literatuur te vinden dat om nauwkeuriger te werk te gaan best gebruik wordt gemaakt van een inwendige standaard. Hiervan wordt in ieder staal telkens dezelfde hoeveelheid toegevoegd. Door de verhouding van piekoppervlaktes van standaard/staal in functie van de concentraties uit te zetten kan een rico of responsfactor worden bepaald. Op deze manier kunnen eventuele praktische fouten achterhaald worden [22]. Een inwendige standaard moet wel aan een aantal criteria voldoen:

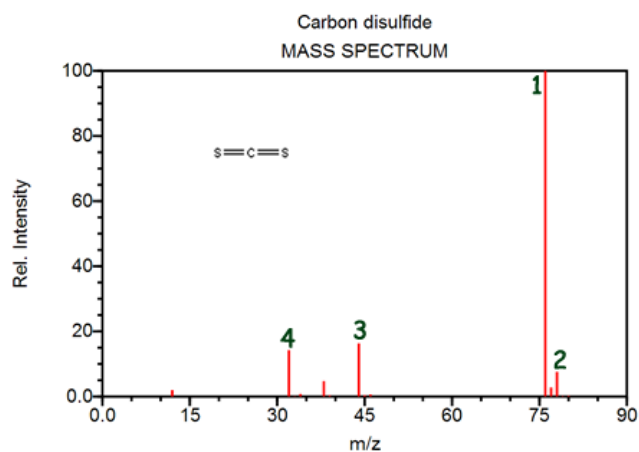
- de standaard moet voldoende gescheiden zijn van de componenten;
- de standaard moet ongeveer dezelfde concentratie hebben dan die van de componenten;
- de inwendige standaard moet ongeveer dezelfde chemische structuur bezitten en mag niet reageren met de andere componenten in het staal;
- de standaard moet zeer zuiver en stabiel zijn [22].

De monstermoleculen worden tot slot geïdentificeerd met een massaspectrometer. In de massaspectrometer worden de monstermoleculen geïoniseerd, versneld in een aangelegd elektrisch veld en vervolgens afgebogen door een magnetisch veld. De ionen worden dus gescheiden op basis van hun massa-ladingsverhouding (m/z) en worden achtereenvolgens gedetecteerd (zie Figuur 10) [26]



Figuur 10: Werking massaspectrometer [36]

In Figuur 11 wordt een voorbeeld van een massaspectrum weergegeven. De relatieve intensiteit wordt uitgezet in functie van de m/z waarden.



Figuur 11: Voorbeeld massaspectrum voor koolstofdissulfide [34]

3 Materiaal en methoden

3.1 Basislijn

Voor het vastleggen van een basislijn wordt gebruik gemaakt van een witte wijn die bekend staat voor zijn zeer intens lycheearoma, namelijk Gewurztraminer. Dat is een krachtige, ronde en robuuste wijn uit Frankrijk met een weelderig boeket van fruit, bloemen en kruiden.

Van deze Gewurztraminer wordt 8 mL in een 20 mL vial gepipetteerd. Deze volumeverhouding wordt toegepast zodat er nog voldoende ruimte in de vial is voor de aromacomponenten om te verdampen. Dit staal ondergaat nu de HS-GC-MS-analyse. Het chromatogram dat na deze analyse wordt weergegeven is de basis in dit onderzoek. De pieken in dit chromatogram moeten na opconcentratie grotere oppervlaktes geven waardoor de componenten met zekerheid geïdentificeerd kunnen worden. Wanneer dit verwezenlijkt is, kan er gesproken worden van een optimalisatie van de HS-GC-MS-analyse. Hoe tewerk wordt gegaan om het opconcentreren mogelijk te maken wordt in de volgende paragraaf verklaard.

3.2 Opconcentreren via een vacuümdestillatie

Voor het opstellen van een vacuümdestillatie waarbij parameters zodanig zijn ingesteld dat de aromaopbrengst via de headspacetechniek hoger ligt, zijn eerst een reeks destillatietesten nodig. Deze testen worden steeds uitgevoerd met een Rotavap (zie Figuur 12).



Figuur 12: Vacuümdestillatie

60 mL van de Gewurztraminer bevindt zich in een draaiende rondbodemkolf dat met het warmwaterbad wordt verwarmd. Door het aansluiten van een manometer kan worden afgelezen hoeveel onderdruk op de Rotavap is aangelegd. Hier wordt telkens een onderdruk van 0,1 bar aangelegd. Het variëren van de temperatuur (40°C, 50°C, 60°C en 70°C) van het waterbad levert verschillende destillatietesten op. Na opwarmen wordt de vloeistof in de waterkoeler gecondenseerd en opgevangen in een kolf. Van dit destillaat wordt 8 mL in een 20 mL vial gepipetteerd om vervolgens een HS-GC-MS-analyse uit te voeren.

3.3 Referentiestaal

Voor het bereiden van het referentiestaal worden de componenten uit Tabel 6 opgelost in een ethanol-wateroplossing. De keuze van deze componenten is gebaseerd op hun voorkomen in witte wijn (uit literatuuronderzoek) en hun chemische structuur.

Tabel 6: Gebruikte componenten voor referentiestaal [3]

Component	CAS-nummer [28]	Kooktemperatuur (°C) [15]
Esters		
Ethylacetaat	141-78-6	77
Isoamylacetaat	123-92-2	142
Ethylhexanoaat	123-66-0	168
Ethyl octanoaat	106-32-1	206-208
Ethyldecanoaat	110-38-3	250-252
Terpenen		
Linalool	78-70-6	199
Zuren		
Hexaanzuur	142-62-1	202-203
Octaanzuur	124-07-2	237
Alcoholen		
2-methyl-1-butanol	137-32-6	126-129
3-methyl-1-butanol	123-51-3	130

Zoals bij de vacuümdestillatie worden ook hier verschillende testen uitgevoerd waarbij een aantal parameters (pH, temperatuur, ethanolconcentratie) worden gevarieerd. Dit gebeurt als voorbereiding op een factorieel experiment dat een optimale combinatie van deze parameters oplevert. Een optimale combinatie houdt in dat de vluchtigheid van de componenten toeneemt en dat ze dus meer opconcentreren in de headspace.

Een test bestaat uit een stockoplossing waarvan in drievoud eenzelfde verdunningsreeks wordt gemaakt. Deze verdunningsreeks is weergegeven in Tabel 7. Voor het bereiden van de stockoplossing (verdunning 1) wordt 250 µL van iedere component uit Tabel 6 in een 50 mL maatkolfje gebracht en aangelengd met een ethanoloplossing. Vervolgens wordt 5 mL uit

deze verdunning 1 (=stockoplossing) gepipetteerd naar een 20 mL maatkolffje en aangelengd met dezelfde ethanoloplossing (=verdunning 2). Dit wordt 6 keer herhaald zodat in totaal 8 maatkolffjes telkens voor ¼ verdund zijn. Van ieder maatkolffje wordt 8 mL in een 20 mL vial gepipetteerd. Dit in drievoud levert 24 stalen per test voor HS-GC-MS-analyse.

Tabel 7: Verdunningsreeks referentiestaal.

Het concentratiegebied van wijn ligt tussen 0,06726 g/L en 0,00105 g/L.

Verdunning	Concentratie (g/L)
1	4,30450
2	1,07613
3	0,26903
4	0,06726
5	0,01681
6	0,00420
7	0,00105
8	0,00026

De ethanolconcentratie, de pH en de temperatuur variëren naargelang de verschillende testen. Tabel 8 geeft de uitgevoerde testen weer.

Tabel 8: Testen met referentiestaal

Test	EtOH-concentratie (%)	pH	Temperatuur (°C)
1	12	5,9	60
2	10	5,9	60
3	14	5,9	60
4	12	3,9	60
5	12	8,9	60
6	12	5,9	45
7	12	5,9	75

Voor de eerste test wordt een 12% ethanoloplossing gemaakt, de pH van deze oplossing bedraagt 5,9. De temperatuur waarop de headspacetechniek wordt uitgevoerd is 60°C. Dit zijn de instellingen waaruit vertrokken wordt. Op basis hiervan wordt voor de volgende testen telkens een waarde hoger en een waarde lager gekozen. Dit resulteert in een *one-factor-at-a-time* (OFAT) experiment. De pH-verhoging gebeurt door toevoegen van een druppel NaOH (10%), pH-verlaging door het toevoegen van een druppel HCl (5%).

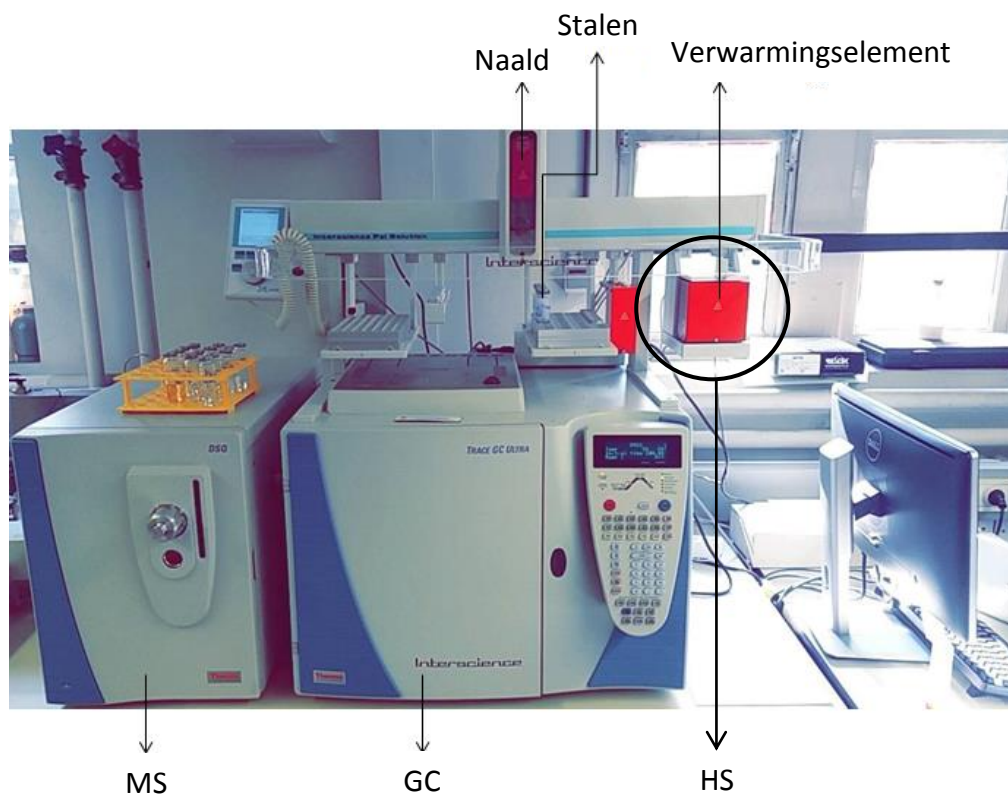
Een extra test wordt uitgevoerd door de instellingen van test 1 opnieuw te gebruiken maar ditmaal enkel 250 µL van het ester ethyldecanoat toe te voegen. Om eventuele onderlinge interacties te achterhalen worden de andere componenten niet toegevoegd aan de stockoplossing.

3.4 Headspacetechniek (HS)

Vorbereid staal (8 mL in 20 mL vial) wordt via een automatische robot in het verwarmingselement (zie Figuur 13) geplaatst waar het gedurende 10 min op een bepaalde temperatuur al roerend wordt opgewarmd. Deze temperatuur wordt vóór analyse geprogrammeerd en is afhankelijk van de uitgevoerde test (zie Tabel 8). Hierna wordt via de automatische robot 1 mL staal uit de dampfase opgezogen en geïnjecteerd in de GC-MS.

3.5 GC-MS-analyse

Na de headspacetechniek (HS) worden de aromamoleculen in de gaschromatograaf (Trace GC Ultra van het merk *Interscience*) geïnjecteerd voor analyse (zie Figuur 13).



Figuur 13: HS-GC-MS-apparatuur
HS: headspacetechniek
GC: gaschromatograaf
MS: massaspectrometer

Met de naald van de injectiespuit wordt 1 mL staal opgezogen uit de dampfase (uit vial dat zich in het verwarmingselement bevindt) en vervolgens geïnjecteerd in de verdampingskamer (200°C) waar het met het draaggas mee de kolom ingaat. Om redenen aangehaald in de literatuurstudie gebeurt de injectie split. Bij een split injectie wordt de meerderheid staal afgevoerd via het open splitventiel. Er komt dus slechts een deel van het

staal op de kolom, dit levert smallere pieken. Als dragergas (mobiele fase) wordt Helium gebruikt met een constante gasflow van 1,5 mL/min. Om de geëxtraheerde moleculen te scheiden wordt gebruik gemaakt van een Rxi[®]-5Sil MS (fused silica) kolom (stationaire fase) met een lengte van 60 m, een binnendiameter van 0,25 mm en een filmdikte van 1 µm. De scheiding vindt plaats op basis van de affiniteit van de monstermoleculen voor deze apolaire stationaire fase en kookpunten van de moleculen.

Om een optimale scheiding op basis van kookpunt te krijgen wordt het volgende temperatuursprogramma ingesteld:

- gedurende 2 min wordt de temperatuur op 100°C behouden;
- vervolgens stijgt de temperatuur aan 15°C/min tot 230°C;
- en tot slot wordt de temperatuur 10 min constant gehouden op 230°C.

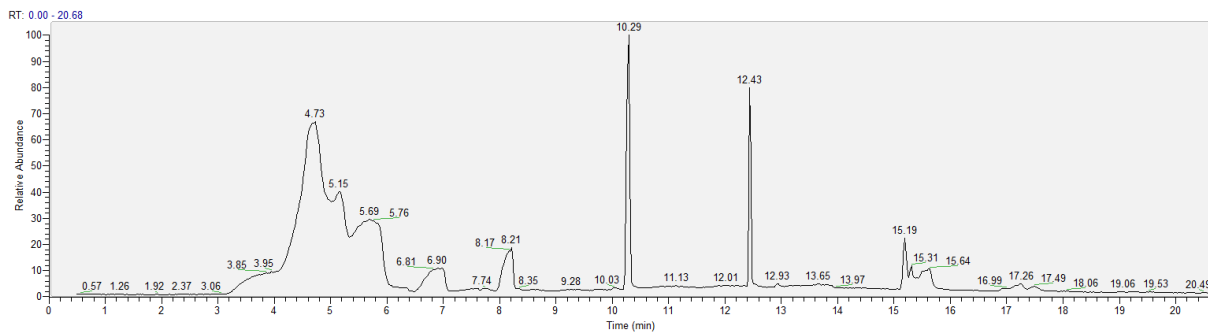
De gescheiden moleculen worden vervolgens gedetecteerd en gekwantificeerd met een vlamionisatiedetector (FID). Dit resulteert in een chromatogram met verschillende pieken waarvan de oppervlakte onder de piek de concentratie van de moleculen weergeeft.

De monstermoleculen worden tot slot geïdentificeerd met een massaspectrometer (DSQ) van *Interscience* (zie eerder in Figuur 13). De massaspectrometer identificeert ieder van deze componenten door de 'NIST/EPA/NIH Main Library' te doorlopen. Deze bibliotheek wordt ter beschikking gesteld door de software 'Xcalibur'.

4 Resultaten en discussie

4.1 Basislijn

Het staal Gewurztraminer geeft na HS-GC-MS-analyse het chromatogram weer dat aan de basis van dit onderzoek ligt. Figuur 14 geeft dit chromatogram weer.



Figuur 14: Chromatogram Gewurztraminer na HS-GC-MS-analyse

Deze pieken komen overeen met een component aanwezig in de witte wijn. De massaspectrometer identificeert ieder van deze componenten. Tabel 9 geeft de componenten weer met de zekerheid van identificatie en hun retentietijd.

Tabel 9: Componenten in Gewurztraminer na HS-GC-MS-analyse.
De resultaten die representatief zijn worden in het vetgedrukt aangeduid.

Retentie (min)	Component	Kans (%)
0,57	Caroteen	12,71
1,26	Prednisolonacetaat	14,18
1,92	Colchicine	21,43
2,37	Prednisolonacetaat	21,71
3,06	Beclomethason	12,31
3,81	Ethanol	79,35
3,95	Ethanol	71,04
4,73	Ethylacetaat	96,76
5,15	Ethylacetaat	93,66
5,69	Isopentyl alcohol	55,64
5,76	Isopentyl alcohol	72,12
6,81	Isopentylacetaat	49,17
6,90	Isopentylacetaat	51,46
7,74	Digitoxine	19,27
8,17	2-ethylheptaanzuur	25,75
8,21	Trans-2-hexenylhexanoaat	29,54
8,35	Digitoxine	36,39
9,28	Digitoxine	19,36
10,03	Ricinolzuur	23,21
10,29	Ethylactanoaat	85,15
11,13	Digitoxine	51,13
12,01	Digitoxine	50,53
12,43	Dodecaanzuur	41,23
12,93	Gibberellinezuur	39,20
13,65	Ricinolzuur	18,59
13,97	Digitoxine	30,82
15,19	Diethylester	29,28
15,31	Digitoxine	14,54
15,64	Diethylester	66,95
16,99	Digitoxine	16,12
17,26	Digitoxine	38,57
18,06	Digitoxine	26,27
19,06	Digitoxine	49,35
19,53	Digitoxine	13,02
20,49	Digitoxine	26,40

Het valt op dat het aantal te identificeren componenten gering is. Opconcentratie om dit aantal te doen toenemen is dus een noodzaak.

4.2 Opconcentreren via een vacuümdestillatie

De resultaten van verschillende destillatietesten worden kort besproken.

Door temperatuurstijgingen en het aftappen van verschillende fracties kunnen componenten op basis van hun kookpunt gescheiden worden. Hier worden geen extreme resultaten vastgesteld maar een scheiding tussen esters en alcoholen is duidelijk doordat esters enkel aanwezig zijn in de eerste fracties. Dit wijst erop dat esters meer vluchtige componenten zijn dan alcoholen en dat (vanwege de hoge kookpunten van esters) niet enkel het kookpunt de verdamping naar de headspace bepaalt maar dat ook de dampspanning en de eigenschappen van molecule en solvent een invloed hebben.

Het siroopachtig residu bevat suikers en is vrij van aromacomponenten.

Een opgevangen vacuümstaal levert geen identificeerbare pieken.

Na het uitvoeren van verschillende destillatietesten is op geen enkele manier een opconcentratie van de aromacomponenten in de dampfase gekomen. De componenten die na HS-GC-MS-analyse geïdentificeerd kunnen worden zijn niet opvallend meer in aantal dan die wat in een oorspronkelijk wijnstaal gedetecteerd worden. Deze resultaten leren dat vacuümdestillatie geen goede opconcentratiemethode is vanwege een aantal praktische problemen. Door het vacuümzuigen en het niet snel genoeg koelen is er namelijk veel verlies van de vluchtige aromastoffen. Verder blijft in een grote destillatieopstelling veel aroma achter. Een microdestillatie zou geen voordeel leveren want het koelprobleem wordt niet verholpen en de bedoeling van een destillatie is juist om met grote hoeveelheden te werken. Een oplossing is om de destillatie rechtstreeks uit te voeren aan de GC-MS door het installeren van een *cryogenic trap*. Op deze manier wordt de dampfase zeer sterk gekoeld (tot -200°C) en wordt het verlies aan aroma vermeden [29]. Dit is echter niet te verwezenlijken in het labo vanwege de te hoge kostprijs. Bijgevolg biedt een vacuümdestillatie geen oplossing voor het probleem in dit onderzoek aangezien de vraag is om een methode te zoeken die betaalbaar is en praktisch uit te voeren door wijnproducenten.

4.3 Referentiestaal

De resultaten van de verschillende testen met het referentiestaal (OFAT) uit Tabel 8 worden statistisch verwerkt met het programma JMP (software van SAS). Voor de waarnemingen en hun bijhorende piekoppervlaktes wordt verwezen naar de dataset in Bijlage A: Dataset JMP. De componenten hexaanzuur, octaanzuur en 2-methyl-1-butanol uit Tabel 6 worden niet opgenomen in deze resultaten. Deze geven na HS-GC-MS-analyse geen piek in het chromatogram wat erop wijst dat deze componenten niet in de headspace terechtkomen. De chemische verklaring hiervoor is dat zuren meer polair zijn dan esters en hierdoor waterstofbruggen vormen met de polaire ethanol-wateroplossing. Het alcohol

2-methyl-1-butanol valt vanwege haar gelijkaardige chemische structuur en kookpunt samen met de piek van 3-methyl-1-butanol (zie Tabel 6).

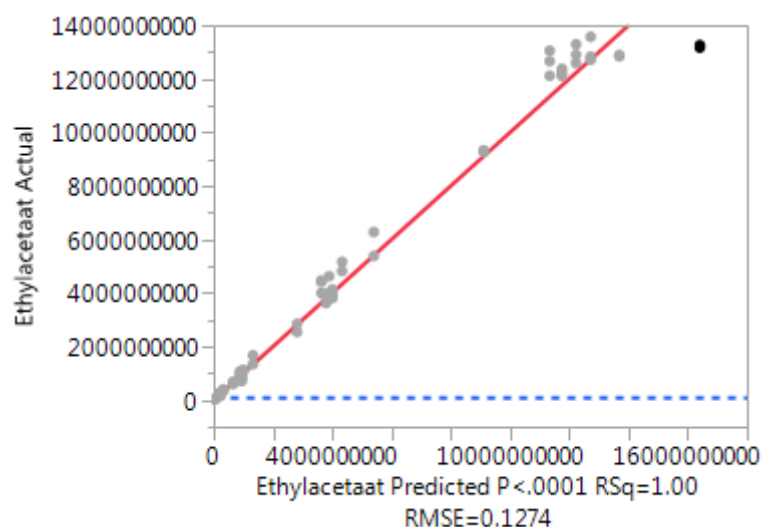
4.3.1 Verwijderen uitschieters

Voor de analyse van de data, gebeurt een controle op uitschieters. Voor iedere component wordt het volgend regressiemodel opgesteld en gebruikt:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{pH} + \beta_2 X_{Temp} + \beta_3 X_{Eth} + \beta_4 X_{Verd} + \beta_5 X_{Blok} + \beta_6 X_{Verd} * X_{pH} + \beta_7 X_{Verd} * X_{Temp} + \beta_8 X_{Verd} * X_{Eth} + \beta_9 X_{Verd} \text{ ja/nee} + \varepsilon \quad (1)$$

Met Y_i de piekoppervlakte van component i , β_0 het intercept, β_1 het effect van de pH, β_2 het effect van de temperatuur, β_3 het effect van de ethanolconcentratie, β_4 het effect van de verdunning, β_5 het effect van blok staalnamen, β_6 het interactie-effect van de verdunning met de pH, β_7 het interactie-effect van de verdunning met de temperatuur, β_8 het interactie-effect van de verdunning met de ethanolconcentratie, β_9 het effect van staal verdunnen ja of neen en ε de foutterm.

Met behulp van het geschatte regressiemodel wordt vervolgens, voor iedere component, een grafiek opgesteld waarin de actuele waarden in functie van de geschatte waarden worden uitgezet. Deze grafiek geeft aan hoe goed het geschatte model de werkelijke piekoppervlaktes benadert. Op de diagonale lijn zijn de actuele waarden gelijk aan de geschatte waarden. Een waarde sterk afwijkend van de diagonaal wordt beschouwd als een uitschieter [30]. Een voorbeeld van de besproken grafiek wordt in Figuur 15 weergegeven voor één component (ethylacetaat).



Figuur 15: De actuele i.f.v. de geschatte waarden voor ethylacetaat na regressieanalyse. Een uitschieter wordt in het vet weergegeven in de grafiek.

Door voor iedere component deze grafiek te controleren, worden alle uitschieters uit de dataset verwijderd. In totaal worden 5 waarnemingen niet mee opgenomen in de analyse. Deze worden in Bijlage A: Dataset JMP, doorstreept weergegeven.

De parameter 'verdund ja-nee' is toegevoegd aan het regressiemodel (1) met de reden dat de meetpunten van de stockoplossing (verdunding 1) een lichte afwijking vertonen op het model ten opzichte van de andere verdunningen. Deze parameter geeft enkel aan of er verdund is of niet en wordt verder niet besproken omdat deze impliciet vervat zit in de parameter 'verdunding'. Wel geeft deze een statistisch een meer correct model weer (mondelijke mededeling Dr. Ir. Peter Goos).

4.3.2 Regressieanalyse

Na het verwijderen van de uitschieters, wordt op de dataset opnieuw een regressieanalyse uitgevoerd. Via deze statistiek wordt nagegaan welke experimentele factoren belangrijk (significant) zijn in dit uitgevoerd experiment. Opnieuw wordt de vergelijking van het regressiemodel (1) gebruikt, maar nu op de data zonder uitschieters. Met behulp van een regressieanalyse worden de effecten (β_i) geschat op een betrouwbaarheidsniveau van 95%. Wanneer de P-waarde kleiner is dan het significantieniveau (5%) van een effect, wordt het effect als significant beschouwd. Zo wordt nagegaan welke parameters significant zijn en dit voor elke component. De resultaten van deze regressieanalyse in JMP worden voor ethylacetaat, isoamylacetaat, ethylhexanoaat, ethyloctanoaat, ethyldecanoaat, linalool en 3-methyl-1-butanol respectievelijk weergegeven in Tabel 10, Tabel 11, Tabel 12, Tabel 13, Tabel 14, Tabel 15 en Tabel 16. De onderlinge interacties tussen temperatuur, pH en ethanolconcentratie kunnen niet geschat worden wegens perfecte collineariteit met de effecten afzonderlijk. Dit is het nadeel van een *one-factor-at-a-time* experiment. De interacties hangen zozeer samen dat hun effecten niet bepaald kunnen worden. Voor elke component blijkt dat het geschatte regressiemodel een zeer goede benadering geeft van de actuele data door een zeer hoge R-waarde.

Tabel 10: Resultaten regressieanalyse ethylacetaat

Summary of fit	
RSquare	0.99877
RSquare Adj	0.998695
Root Mean Square Error	0.129941
Mean of Response	18.37184
Observations (or Sum Wgts)	140

Term	Estimate	Std Error	DFDen	t Ratio	Prob> t
Intercept	22.023099	0.036148	46.14	609.25	<.0001*
Ethanol(%) (10,14)	0.0042069	0.033942	42.08	0.12	0.9020
pH(3.9,8.9)	0.0725992	0.034392	46.52	2.11	0.0402*
Temperatuur (°C) (45,75)	0.4281812	0.038512	57.63	11.12	<.0001*
Log[Verdunning (g/L)]	1.036953	0.007427	47.83	139.62	<.0001*
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Ethanol(%)	-0.009447	0.010748	43.05	-0.88	0.3843
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*pH	0.0048875	0.010914	48.06	0.45	0.6563
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Temperatuur (°C)	-0.013072	0.013101	60.78	-1.00	0.3223
Verdund Ja-Neen	-0.244503	0.074118	48.47	-3.30	0.0018*

Tabel 10 geeft een P-waarde kleiner dan 5% in het oranje weer. De bijhorende parameter wordt als significant beschouwd in dit experiment. De pH, temperatuur en verdunning zijn dus significante parameters voor ethylacetaat. Concreet houdt dit in dat wanneer de pH toeneemt, de piekoppervlakte van ethylacetaat ook zal toenemen. Dit levert slechts een lichte toename van de piekoppervlakte op vanwege de kleine positieve β -schatting van 0,0725 of vanwege de P-waarde (0,0402), die net onder de grens van 5% ligt. Wanneer de temperatuur toeneemt, zal de piekoppervlakte sterk toenemen door de hoge positieve β -schatting (0,4281). Bij afnemende verdunning (hoge concentratie aan aroma) zal de piekoppervlakte toenemen door de negatieve β -schatting (-0,2445). De piekoppervlakte hangt dus sterk af van de verdunning.

Tabel 11: Resultaten regressieanalyse isoamylacetaat

Summary of fit	
RSquare	0.993894
RSquare Adj	0.993521
Root Mean Square Error	0.273117
Mean of Response	19.46863
Observations (or Sum Wgts)	140

Term	Estimate	Std Error	DFDen	t Ratio	Prob> t
Intercept	22.99133	0.117808	45.59	195.16	<.0001*
Ethanol(%) (10,14)	0.0530406	0.112248	43.68	0.47	0.6389
pH(3.9,8.9)	0.1380656	0.111978	45.69	1.23	0.2239
Temperatuur (°C) (45,75)	0.329032	0.121435	50.34	2.71	0.0092*
Log[Verdunning (g/L)]	0.9578101	0.024055	46.51	39.82	<.0001*
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Ethanol(%)	-0.014628	0.035418	44.14	-0.41	0.6816
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*pH	-0.010707	0.035367	46.32	-0.30	0.7634
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Temperatuur (°C)	-0.029725	0.040925	52	-0.73	0.4709
Verdund Ja-Neen	-1.290886	0.239825	46.54	-5.38	<.0001*

Op dezelfde wijze worden de data voor isoamylacetaat geanalyseerd. Voor een significantieniveau van 5% zijn temperatuur en verdunning significant voor isoamylacetaat.

Tabel 12: Resultaten regressieanalyse ethylhexanoaat

Summary of fit	
RSquare	0.989738
RSquare Adj	0.989111
Root Mean Square Error	0.339376
Mean of Response	19.60051
Observations (or Sum Wgts)	140

Term	Estimate	Std Error	DFDen	t Ratio	Prob> t
Intercept	23.016619	0.155206	46.04	148.30	<.0001*
Ethanol(%) (10,14)	0.0278557	0.148059	44.32	0.19	0.8516
pH(3.9,8.9)	0.1779075	0.147517	46.13	1.21	0.2340
Temperatuur (°C) (45,75)	0.4198289	0.159552	50.28	2.63	0.0113*
Log[Verdunning (g/L)]	0.9138509	0.031673	46.88	28.85	<.0001*
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Ethanol(%)	-0.010023	0.046704	44.72	-0.21	0.8311
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*pH	-0.014587	0.046574	46.69	-0.31	0.7555
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Temperatuur (°C)	-0.024446	0.053722	51.79	-0.46	0.6510
Verdond Ja-Neen	-1.588218	0.315778	46.89	-5.03	<.0001*

Ook voor ethylhexanoaat zijn de parameters temperatuur en verdunning significant.

Tabel 13: Resultaten regressieanalyse ethyloctanoaat

Summary of fit	
RSquare	0.979675
RSquare Adj	0.978434
Root Mean Square Error	0.442358
Mean of Response	19.26337
Observations (or Sum Wgts)	140

Term	Estimate	Std Error	DFDen	t Ratio	Prob> t
Intercept	22.564507	0.203639	46.6	110.81	<.0001*
Ethanol(%) (10,14)	-0.020526	0.194286	44.88	-0.11	0.9163
pH(3.9,8.9)	0.1393073	0.19355	46.68	0.72	0.4753
Temperatuur (°C) (45,75)	0.5293787	0.209281	50.8	2.53	0.0146*
Log[Verdunning (g/L)]	0.8556644	0.041554	47.43	20.59	<.0001*
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Ethanol(%)	-0.00688	0.061284	45.29	-0.11	0.9111
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*pH	-0.013149	0.061105	47.24	-0.22	0.8305
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Temperatuur (°C)	0.0410982	0.070459	52.3	0.58	0.5622
Verdond Ja-Neen	-2.498858	0.414294	47.44	-6.03	<.0001*

Voor ethyloctanoaat zijn ook de parameters temperatuur en verdunning significant.

Tabel 14: Resultaten regressieanalyse ethyldecanoaat

Summary of fit					
RSquare	0.9718				
RSquare Adj	0.970078				
Root Mean Square Error	0.450952				
Mean of Response	19.03171				
Observations (or Sum Wgts)	140				
Term	Estimate	Std Error	DFDen	t Ratio	Prob> t
Intercept	21.836552	0.261049	46.16	83.65	<.0001*
Ethanol(%) (10,14)	-0.063539	0.249947	45.05	-0.25	0.8005
pH(3.9,8.9)	0.1236192	0.248081	46.2	0.50	0.6206
Temperatuur (°C) (45,75)	0.6295135	0.26614	48.81	2.37	0.0220*
Log[Verdunning (g/L)]	0.6987531	0.053177	46.72	13.14	<.0001*
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Ethanol(%)	0.0019939	0.078774	45.31	0.03	0.9799
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*pH	-0.018256	0.078235	46.55	-0.23	0.8165
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Temperatuur (°C)	0.1316178	0.08935	49.81	1.47	0.1470
Verdund Ja-Neen	-3.088358	0.530218	46.69	-5.82	<.0001*

Uit tabel 14 wordt afgeleid dat ook voor ethyldecanoaat de parameters temperatuur en verdunning significant zijn.

Tabel 15: Resultaten regressieanalyse linalool

Summary of fit					
RSquare	0.986526				
RSquare Adj	0.985704				
Root Mean Square Error	0.386889				
Mean of Response	17.75503				
Observations (or Sum Wgts)	140				
Term	Estimate	Std Error	DFDen	t Ratio	Prob> t
Intercept	21.176704	0.152482	46.01	138.88	<.0001*
Ethanol(%) (10,14)	0.01807	0.144976	43.75	0.12	0.9014
pH(3.9,8.9)	0.1491371	0.144952	46.14	1.03	0.3089
Temperatuur (°C) (45,75)	0.7450916	0.157933	51.7	4.72	<.0001*
Log[Verdunning (g/L)]	0.9177816	0.031165	47.06	29.45	<.0001*
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Ethanol(%)	-0.011652	0.045768	44.28	-0.25	0.8002
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*pH	-0.02427	0.045812	46.9	-0.53	0.5988
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Temperatuur (°C)	0.032023	0.053307	53.63	0.60	0.5506
Verdund Ja-Neen	-1.546191	0.310726	47.15	-4.98	<.0001*

Voor linalool geldt eveneens dat de parameters temperatuur en verdunning significant zijn.

Tabel 16: Resultaten regressieanalyse 3-methyl-1-butanol

Summary of fit					
RSquare	0.995887				
RSquare Adj	0.995635				
Root Mean Square Error	0.226663				
Mean of Response	18.25154				
Observations (or Sum Wgts)	140				
Term	Estimate	Std Error	DFDen	t Ratio	Prob> t
Intercept	21.60797	0.078428	40.19	275.51	<.0001*
Ethanol(%) (10,14)	0.0017386	0.074283	37.56	0.02	0.9815
pH(3.9,8.9)	0.156908	0.07457	40.38	2.10	0.0416*
Temperatuur (°C) (45,75)	0.7341213	0.081926	47.18	8.96	<.0001*
Log[Verdunning (g/L)]	0.943279	0.016057	41.39	58.75	<.0001*
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Ethanol(%)	-0.030926	0.023472	38.19	-1.32	0.1955
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*pH	-0.019655	0.023597	41.3	-0.83	0.4097
(Log[Verdunning (g/L)] +3.48149)*Temperatuur (°C)	-0.044301	0.027725	49.43	-1.60	0.1164
Verdund Ja-Neen	-0.2513	0.16011	41.59	-1.57	0.1241

Tenslotte geeft tabel 16 weer dat voor 3-methyl-1-butanol de parameters pH, temperatuur en verdunning significant zijn.

Samenvattend geeft Tabel 17 de significante factoren in dit experiment per component weer.

Tabel 17: Significante factoren per component

	pH	EtOH-concentratie (%)	T (°C)	Verdunning
ethylacetaat	X		X	X
isoamylacetaat			X	X
ethylhexanoaat			X	X
ethyloctanoaat			X	X
ethyldecanoaat			X	X
linalool			X	X
3-methyl-1-butanol	X		X	X

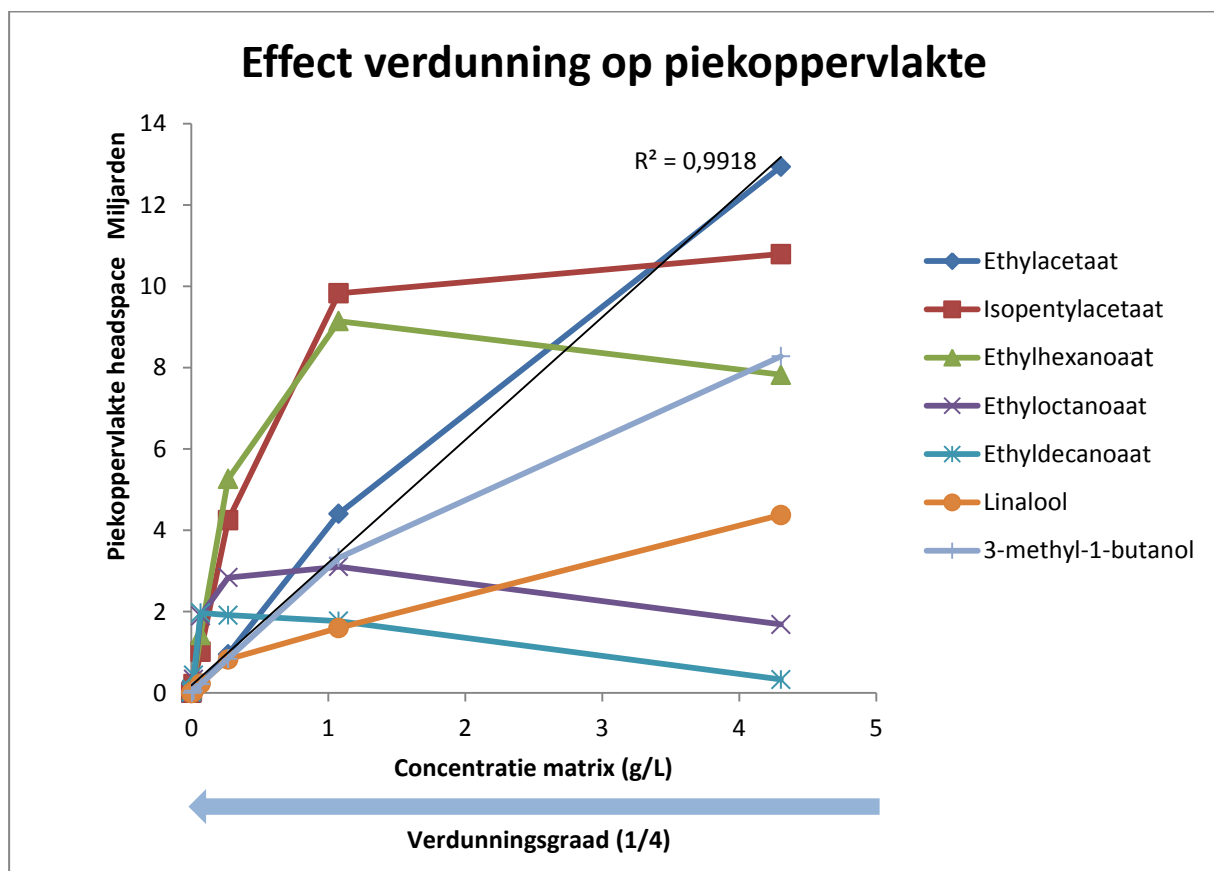
Voor elke aromacomponent hebben temperatuur en verdunning een effect op de samenstelling van de componenten in de headspace. De pH heeft slechts een effect op 2 van de componenten, ethylacetaat en 3-methyl-1-butanol. De chemische achtergrond van deze effecten worden in volgende paragrafen verklaard.

4.3.2.1 Effect verdunning

Het effect van de verdunning is eenvoudig te verklaren door het feit dat wanneer minder aromacomponenten in de vloeistof aanwezig zijn, er minder in de headspace kunnen vrijkomen. Piekoppervlaktes zijn bijgevolg laag. De concentratie van de componenten in de vloeistof is dus van belang voor een optimale HS-GC-MS-analyse. Van de verdunningsreeks

uit Tabel 7, resulteert een niet of weinig verdunde oplossing (stalen 1 t.e.m. 4) in een chromatogram met smalle en duidelijke pieken. Een sterk verdunde oplossing (stalen 5 t.e.m. 8) resulteert in een chromatogram met brede en interfererende pieken. In Tabel 7 is het concentratiegebied voor witte wijn vermeld. Dit gebied bevat grotendeels de concentraties waarbij te lage piekoppervlaktes en te veel interfererende pieken worden waargenomen. Deze waarneming duidt opnieuw aan dat opconcentratie van aromacomponenten in wijn noodzakelijk is voor een representatief chromatogram.

Figuur 16 geeft het effect van de verdunning op de piekoppervlakte voor elke aromacomponent grafisch weer. Voor deze weergave wordt de HS-GC-MS-analyse met de basisinstellingen (12% EtOH, 60°C, pH 5,9) gebruikt.



Figuur 16: Piekoppervlakte i.f.v. concentratie voor alle componenten na HS-GC-MS-analyse (12% EtOH, 60°C, pH 5,9)

Figuur 16 toont aan dat de piekoppervlaktes van de headspace in functie van de concentraties in de matrix verschillen naargelang de component. Er is bijgevolg geen algemene vaststelling voor de componenten als mengsel wat betreft de piekoppervlakte. Bijvoorbeeld het verloop van de piekoppervlakte van **ethylacetaat** neemt lineair af in functie van de verdunning. Terwijl bij **ethyldecanoaat** de piekoppervlakte in de eerste fase stijgt en naarmate er meer verdund wordt in een tweede fase daalt. Dit wijst erop dat elke component anders reageert, een apart karakter vertoont en aromastoffen een invloed

hebben op elkaar. Deze waarnemingen zijn enerzijds te wijten aan de fysische interacties van de componenten en anderzijds aan de specifieke K-waarde van een component. Dit is de verdelingscoëfficiënt tussen de matrix en de gasfase bij evenwicht. Deze verschijnselen worden in de volgende paragrafen toegelicht.

Fysische interacties

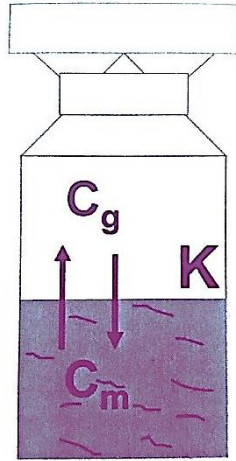
Zuren en alcoholen zijn door hun OH-functie polaire moleculen (zie Figuur 2 pagina 19 voor structuurformules). Ze ondergaan waterstofbruggen onderling en met water. Hierdoor worden ze sterk weerhouden in de matrix en komen ze maar weinig vrij in de headspace. Bij een zuur kan deze waterstofbinding zelfs op 2 plaatsen gebeuren. Om deze reden wordt een zuur iets sterker weerhouden in de oplossing dan een alcohol.

De esters (zie Tabel 1 pagina 21 voor structuurformules) echter ondergaan naast waterstofbrugvorming (met andere componenten en niet onderling) een minder sterke dipool-dipool interactie. Een langere koolstofketen levert een –I-effect waardoor de koolstof positiever wordt. Het dipoolmoment wordt groter en bijgevolg wordt deze molecule meer weerhouden in de matrix. Dit verklaart waarom de meest apolaire (door de langste koolstofketen) verbinding, ethyldecanoaat, in het niet verdunde staal maar weinig vrijkomt. Het terpeen linalool bevat enerzijds een polaire OH-functie en anderzijds een apolaire koolstofketen (zie Tabel 3 pagina 24 voor structuurformule). Met toenemende verdunning wordt de sterke waterstofbrugvorming via de OH-functie doorslaggevend. Dit verklaart de afname in piekoppervlakte bij linalool. De vluchtigheid van een component hangt dus af van de concentratie van de andere componenten of met andere woorden van de omgeving waarin hij zich bevindt [26], [31].

Hieruit blijkt dat in dit onderzoek de interacties van vluchtige componenten (ook niet vluchtige componenten) in de matrix een grote invloed hebben op de aromaperceptie. Deze interacties hebben immers een effect op de vluchtigheid van de aromacomponenten waardoor concentratievariaties optreden in de headspace [2].

K-waarde

De K-waarde van een bepaalde component is de verdelingscoëfficiënt van die component tussen de matrix en de gasfase (headspace) bij evenwicht [32]. Figuur 17 geeft de K-waarde visueel weer.



$$K = \frac{C_m}{C_g} \quad (2)$$

Figuur 17: K-waarde van een component [32]

Met C_m de concentratie van de component in de matrix (bij evenwicht) en C_g de concentratie van de component in de gasfase (bij evenwicht) [32].

De K-waarde is afhankelijk van de component en van zijn omgeving [32]. De K-waarde van een component wordt dus beïnvloed wanneer deze zich in een mengsel bevindt.

Wanneer de concentratie van de component in de matrix overheerst is de K-waarde hoog. Een zo laag mogelijke K-waarde is dus gewenst. Op die manier zal de concentratie van de component in de headspace hoog zijn en is de component als zeer vluchtig te beschouwen. Naargelang de K-waarde is ook de volumeverhouding gas/matix van belang [32].

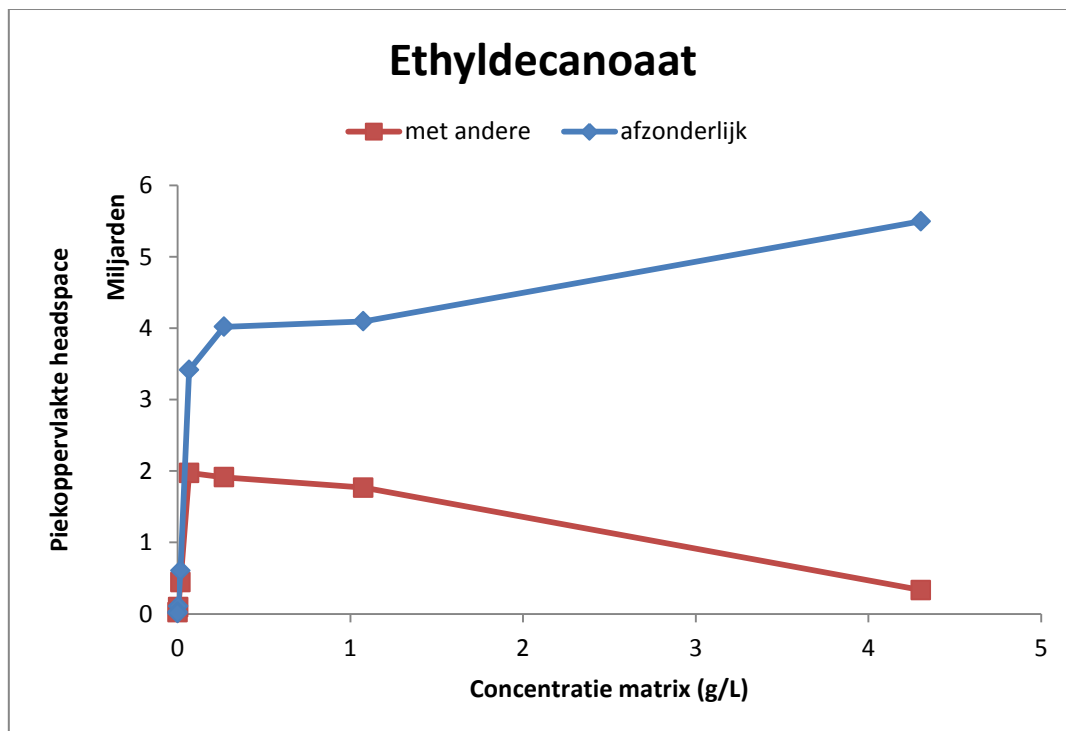
$$\beta = \frac{V_g}{V_m} \quad (3)$$

Bij een hoge K-waarde is β verwaarloosbaar, bij een lage K-waarde dient de volumeverhouding nauwkeurig toegepast te worden. Deze wordt zo gekozen dat er voldoende ruimte in de headspace is opdat onderlinge componenten in de matrix geen concurrentie op elkaar uitoefenen om naar de dampfase te diffunderen. De mogelijkheid bestaat om met GC-MS de K-waarde van iedere component te achterhalen [32]. Wegens tijdsgebrek wordt dit niet uitgevoerd.

De invloed van een mengsel op de K-waarde van een component en de concurrentie of interactie tussen de componenten in de matrix wordt wel onderzocht door een referentiestaal met alle componenten (volgens Tabel 6) te vergelijken met een referentiestaal met slechts 1 component. De aandacht wordt gevestigd op ethyldecanoaat.

Figuur 18 toont de piekoppervlakten van ethyldecanoaat alleen in oplossing en van ethyldecanoaat in aanwezigheid van andere componenten (uit Figuur 16). De

referentiestalen hebben een ethanolconcentratie van 12%, een pH van 5,9 en worden opgewarmd tot 60°C. De piekoppervlakte van de headspace wordt uitgezet in functie van de concentratie aromacomponenten in de matrix.



Figuur 18: HS-GC-MS-analyse van ethyldecanoaat alleen in oplossing en in aanwezigheid van andere componenten (12% EtOH, 60°C, pH 5,9)

De rode curve uit Figuur 18 leert dat wanneer ethyldecanoaat met de andere aromacomponenten is opgelost, deze in de niet verdunde oplossing (4,3045 g/L) maar weinig vrijkomt in de headspace. Zit ethyldecanoaat alleen in oplossing dan kan het ook maar alleen (ongestoord) vrijkomen en in de headspace opconcentreren, vandaar de hogere ligging van de blauwe curve. Naast CO₂, N₂ en ethanol is ethyldecanoaat de enige component die zich in de dampfase boven de vloeistof bevindt. De K-waarde van ethyldecanoaat is dus duidelijk beïnvloed door de aanwezigheid van de andere componenten.

Een volgende vaststelling is dat in aanwezigheid van andere componenten en naarmate meer verdund wordt, ethyldecanoaat toeneemt in de dampfase. Dit is mogelijk omdat, door het verdunnen, de andere componenten nu in mindere mate in de matrix aanwezig zijn. Opmerkelijk is dat hoewel ethyldecanoaat in dezelfde mate verdund is, deze toch toeneemt in de headspace. De verdunning van ethyldecanoaat zelf is dus verwaarloosbaar ten opzichte van de aanwezigheid van de andere componenten. Dit is immers niet het geval wanneer ethyldecanoaat alleen in oplossing is. De component neemt nu wel logischerwijs af in de headspace naarmate er meer verdund wordt. Uit deze vergelijking is duidelijk dat de componenten elkaar beïnvloeden en met elkaar interageren. Bijgevolg treedt er concurrentie op wat betreft het verdampen naar de headspace. Uit dit feit kan ook

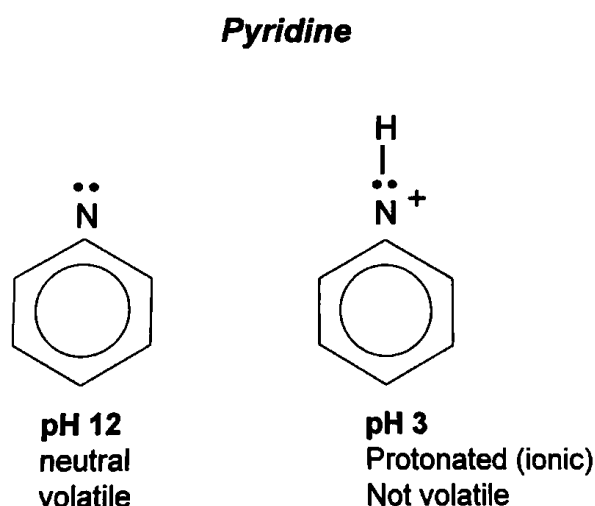
geconcludeerd worden dat het opstellen van ijklijnen en het bepalen van detectielimieten van de componenten onmogelijk is in headspace-analyses. De variërende concentraties in de dampfase zijn immers verantwoordelijk voor een niet lineair verband. Eveneens kan vanwege de onderlinge interacties geen inwendige standaard worden toegevoegd.

4.3.2.2 Effect temperatuur

Het effect van de temperatuur is te wijten aan de onderlinge fysische interacties van de componenten die breken door een toename in temperatuur. Componenten komen meer vrij en de piekoppervlaktes nemen toe. Hieruit blijkt dat de temperatuur waarop een wijn geconsumeerd wordt van groot belang is voor de aromaperceptie.

4.3.2.3 Effect pH

Het effect van de zuurtegraad wordt verklaard aan de hand van een voorbeeld met pyridine uit Figuur 19.



Figuur 19: Protonering door pH-verlaging [32]

Door de pH te verlagen zorgt de zure omgeving voor het protoneren van de aromacomponent. Deze blijft bijgevolg opgelost in de zure waterige oplossing en komt niet vrij in de headspace. De niet geïoniseerde vorm daarentegen is vluchtig en verdampt naar de headspace [32]. De moleculen ethylacetaat en 3-methyl-1-butanol waarvoor de pH significant is, zijn te vergelijken met pyridine. Bij de andere componenten is dit effect te verwaarlozen. Vanwege de langere koolstofketen in deze moleculen is het eerder vermelde effect van de dipool-dipool interactie doorslaggevend.

Een pH-verhoging heeft dus slechts op enkele componenten een positieve invloed (opconcentratie in de headspace door toename vluchtigheid). Met deze kennis kan de samenstelling van de aromacomponenten in de headspace gemanipuleerd worden om een gewenst aroma te creëren.

4.3.2.4 Effect ethanolconcentratie

Ethanolconcentratie wordt in dit experiment beschouwd als geen invloed hebbende op de samenstelling van aromacomponenten in de headspace. Een chemische verklaring spreekt dit resultaat enigszins tegen. Door het toevoegen van meer ethanol in water wordt de oplossing enerzijds meer apolair (maar nog altijd vrij polair door OH-functie van ethanol) en bevat de oplossing anderzijds meer alcohol. Zuren en alcoholen kunnen op deze manier meer waterstofbruggen ondergaan en worden weerhouden in de matrix. De esters, zelf vrij apolair, worden in de eerste fase sterker weerhouden door waterstofbruggen en dipool-dipoolbindingen (met ethanol) en komen met verdunnen in een tweede fase vrij. Ethanolconcentratieverhoging resulteert in theorie dus in lagere piekoppervlaktes.

Dat na statistische analyse de ethanolconcentratie toch als niet significant wordt beschouwd duidt erop dat deze interacties verwaarloosbaar zijn. Dit kan te wijten zijn aan de té kleine marge tussen de concentratievariëaties van ethanol. Hoewel in een aantal inleidende testen de ethanolconcentratie verder gevarieerd is van 8% tot 16%, zijn er geen opmerkelijke verschillen tussen deze variëaties waar te nemen. Vanwege dit voorgaande en vanwege tijdsgebrek is in het verdere verloop van dit onderzoek een herhaling in drievoud met deze concentraties niet verder uitgetest.

Een verandering in ethanolconcentratie heeft dus weinig tot geen invloed op de samenstelling van de aromacomponenten in het headspace. Bijgevolg wordt in dit onderzoek een aroma niet beïnvloed door de ethanolconcentratie.

5 Conclusie en future work

De componenten die het meest verantwoordelijk zijn voor de geurperceptie zijn esters, maar de invloed van andere componenten zoals zuren en alcoholen creëert een typisch wijnaroma.

De vacuümdestillatie dat als opconcentratieproces in dit opzet uiteen is gezet wordt als niet geslaagd beschouwd. De concentratie aan aromacomponenten in de headspace blijft te laag om alle moleculen met zekerheid te detecteren en de identificeren via HS-GC-MS-analyse. Opconcentratie van de aromacomponenten met behulp van een vacuümdestillatie kan niet worden verwezenlijkt wegens het verlies van de dampfase en bijgevolg onvermijdelijk verlies aan aroma, veroorzaakt door het vacuümzuigen en de té trage condensatie van de dampfase. In verder onderzoek zou dit probleem verholpen kunnen worden door het installeren van een *cryogenic trap* waardoor de vacuümdestillatie rechtstreeks uitgevoerd kan worden aan de GC-MS. Wegens het niet beschikbaar zijn is dit niet uitgetest in dit onderzoek. Bovendien is het een erg dure techniek die weinig perspectief biedt om te gebruiken door de wijnproducenten in het kader van aroma-analyse tijdens de wijnproductie.

Temperatuur en pH zijn parameters die de samenstelling van de aromacomponenten in de headspace beïnvloeden. De pH van een wijn en de temperatuur waarop een wijn gedronken wordt bepalen bijgevolg het specifiek wijnaroma. Deze variaties kunnen in de toekomst eventueel worden toegepast op witte wijn in plaats van op een referentiestaal. Door dezelfde variaties uit te voeren op verschillende wijnen kunnen onderlinge verschillen in aroma vergeleken worden. Ethanolconcentratie heeft hier weinig of geen invloed op. In verder onderzoek kan hier dieper worden op ingegaan door enerzijds een grotere ethanolconcentratie marge toe te passen of anderzijds een volledig factorieel experiment uit te werken. In dit opzet wordt vertrokken van een basisinstelling en verandert er telkens 1 parameter, een *one-factor-at-a-time* experiment. Een factorieel experiment met 3 parameters op 3 niveaus levert 27 testen op. Wegens tijdsgebrek wordt dit voorgaande niet uitgetest. In verder onderzoek is het ook interessant om de behandelde headspacetechniek te vergelijken met de vastefasemicro-extractie (SPME). Het verschil in gevoeligheid kan worden onderzocht door een vergelijking te maken in het aantal en in de hoeveelheid geëxtraheerde componenten. Op deze manier wordt nagegaan hoe selectief de vezel van een SPME is en welke methode de meeste componenten analyseert.

Het belangrijkste besluit dat uit dit onderzoek gehaald kan worden is dat elke aromacomponent een apart karakter vertoont en dus anders reageert naargelang zijn chemische structuur. Hierbij speelt de omgeving waarin de moleculen zich vertoeven een belangrijke rol. Zowel de oplossing als de andere aanwezige componenten hebben een invloed op het gedrag van een bepaalde molecule. De interactie en de concurrentie tussen de aromacomponenten onderling bepalen de samenstelling van de componenten in de

headspace en aldus het specifiek aroma. Bijgevolg is het simuleren van een wijnaroma een zeer complex gegeven en zijn interpretaties ervan mogelijk incorrect.

Literatuurlijst

- [1] R. Uyttebroeck, „KULeuven,” 2016. [Online]. Available: <http://www.biw.kuleuven.be/>. [Geopend 19 maart 2016].
- [2] C. Muñoz-González, J. Rodríguez-Bencomo, V. Moreno-Arribas en Á. Pozo-Bayón, „Beyond the characterization of wine aroma compounds: looking for analytical approaches in trying to understand aroma perception during wine consumption.,” *Anal Bioanal Chem*, p. 1497–1512, 2011.
- [3] G. De Mets, „Identification of fruit aromas in white wine, imitating the wine taster.,” Leuven, 2012.
- [4] A. Gamero, W. Wesselink en C. de Jong, „Comparison of the sensitivity of different aroma extraction techniques in combination with gas chromatography–mass spectrometry to detect minor aroma compounds in wine.,” *Journal of Chromatography A*, pp. 1-7, 2012.
- [5] M. V. Moreno-Arribas en M. C. Polo, *Wine Chemistry and Biochemistry*, Madrid, Spain: Springer, 2009.
- [6] N. Hawks Miller, „Snooth Media Network,” 15 augustus 2012. [Online]. Available: <http://www.snooth.com/articles/five-key-wine-components-and-how-to-detect-them/?viewall=1#ixzz4107Z9dwP>. [Geopend 23 februari 2016].
- [7] C. Kissack, „The Winedoctor,” 2013. [Online]. Available: <http://www.thewinedoctor.com/advisory/tastecomponents.shtml>. [Geopend 23 februari 2016].
- [8] P. Held, Artist, *Schematic representation of the fermentation process..* [Art]. BioTek, 2012.
- [9] M. Meyers, *Metabolisme*, 2015.
- [10] E. Hodson, „Electronic Theses and Dissertations at VirginiaTech,” 2004. [Online]. Available: <https://theses.lib.vt.edu/theses/available/etd-08312004-151935/unrestricted/CaptureandReturnBodyMatter.pdf>. [Geopend 24 februari 2016].
- [11] „Organic chemistry in our daily life,” 9 maart 2014. [Online]. Available: <http://gen2chemistassignment.weebly.com/blog/what-are-the-uses-of-esters>. [Geopend 29 mei 2016].
- [12] M. Meyers, *Biochemische thermodynamica*, 2014.
- [13] A. Oberholster, „University of California: Division of Agriculture and Natural Resources,” [Online]. Available: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:zXUfqg7StSkJ:ucanr.edu/repository/a/%3Fa%3D92483+&cd=1&hl=nl&ct=clnk&gl=be>. [Geopend 10 maart 2016].
- [14] „De Brabantse wijnbouwers,” September 2009. [Online]. Available: <http://www.brabantsewijnbouwers.nl/index.php?section=13&page=82&student=302>. [Geopend 25 februari 2016].

- [15] „ChemicalBook,” 2016. [Online]. Available: <http://www.chemicalbook.com/>. [Geopend februari 2016].
- [16] G. Antalick, M.-C. Perello en G. de Revel, „Esters in Wines: New Insight through the Establishment of a Database of French Wines,” 2014.
- [17] A. Adam, E. Flamez en S. Maes, „ArthurAdam,” 2014. [Online]. Available: http://arthuradam.weebly.com/uploads/4/7/3/0/47307009/vluchtige_zuren_in_wijn.pdf. [Geopend 10 juni 2016].
- [18] M. J, „Terpenes in the Aroma of Grapes and Wines: A Review.,” *Viticultural and Oenological Research Institute*, pp. 49-58, 1983.
- [19] „Gezondheidsuniversiteit Maastricht UMC,” 2016. [Online]. Available: http://www.gezondheidsuniversiteit.nl/sites/gezondheidsuniversiteit/files/lesmateriaal_avond_2.pdf. [Geopend 28 februari 2016].
- [20] „Springer Link,” Springer International Publishing AG, Part of Springer Science+ Business Media, [Online]. Available: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-540-29678-2_5128. [Geopend 10 juni 2016].
- [21] Y. Belisario-Sánchez, A. Taboada-Rodríguez, F. Marín-Iniesta, A. Iguaz-Gainza en A. López-Gómez, „Aroma Recovery in Wine Dealcoholization by SCC Distillation,” *Springer*, p. 2529–2539, 2012.
- [22] L. Braeken en R. Dewaele, *Analytische scheidingstechnieken en accreditatie*, 2013.
- [23] G. De Mets, „GC/MS, improving the extraction yield with distillation.,” KULeuven, 2015.
- [24] *Steps in the analysis by headspace SPME (HS-SPME)*. [Art]. ResearchGate, 2008-2016.
- [25] G. Blanch, G. Reglero en M. Herraiz, „Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation-solvent extraction device,” *Food Chemistry*, p. 439–444, 1996.
- [26] E. Van Hoof, *Organische chemie 1*, 2012.
- [27] *Splitless injection*. [Art]. Trajan Scientific Australia, 2015.
- [28] G. De Mets, „Volatiles in wine,” Leuven, 2016.
- [29] „GL Sciences,” [Online]. Available: <http://www.glsciences.eu/html/cryotrap.html>. [Geopend 30 mei 2016].
- [30] „JMP Statistical Discovery,” SAS Institute Inc, [Online]. Available: http://www.jmp.com/support/help/Graphs_for_Goodness_of_Fit.shtml. [Geopend 24 mei 2016].
- [31] „Rangschikking volgens stijgende polariteit en kookpunt,” 2015. [Online]. Available: http://inwefiles.martenserver.com/files/chemieII/chemieII_rangschikking_volgens_polariteit_en_kookpunt.pdf. [Geopend 27 mei 2016].
- [32] S. v. Venetiën, Auteur, *Statische headspace analyses*. [Performance]. Interscience, 2016.

- [33] L. Acena, L. Vera, J. Guasch, O. Busto en M. Mestres, „Chemical Characterization of Commercial Sherry Vinegar Aroma by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Olfactometry,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p. 4062–4070, 2011.
- [34] *Carbon disulfide mass spectrum*. [Art]. ScienceGeek, 2014.
- [35] M. Dziadas en H. Jelen, „Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach,” *Analytica Chimica Acta*, p. 43–49, 2010.
- [36] E. Van Hoof, Artist, *Schematische weergave van een massaspectrometer*. [Art]. Organische chemie 1, 2012.
- [37] A. Beuckelaers, „Universiteitsbibliotheek Gent,” juni 2012. [Online]. Available: http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/894/654/RUG01-001894654_2012_0001_AC.pdf. [Geopend 7 maart 2016].

Bijlage

Bijlage A: Dataset JMP 65

Bijlage A: Dataset JMP

	Verduunning	Staal	Blok	EtOH- conc (%)	T pH (°C)	Ethylacetaat	Isopentylacetaat	Ethylhexanoaat	Ethylactanoaat	Ethyldecanoaat	Linalool	3-methyl-1- butanol	verdund Ja-nee
1	4,304500	1	1	12	5,9 60	13293826553	10784143778	7495206620	1508535777	256306129	7751123070	8819626345	1
2	4,304500	1	1	12	5,9 60	12906326141	14037530424	12351878240	8652330970	9292429064	11149865203	14023381328	1
3	4,304500	1	1	12	5,9 60	12585928997	10803560599	8157789969	1863644064	410309456	1004857852	7737846503	1
4	1,076125	2	2	12	5,9 60	3999527399	7914802488	7771753986	4106384030	1112772425	1095598700	2729180840	0
5	1,076125	2	2	12	5,9 60	4628002605	10867581249	9745138651	3312844774	726763982	1799890713	3781629945	0
6	1,076125	2	2	12	5,9 60	4594529389	10704300397	9916255833	3462618333	763635038	1902956811	3471476605	0
7	0,269031	3	3	12	5,9 60	739526643	2000295812	2146387601	2675555114	2256571592	333189562	591377454	0
8	0,269031	3	3	12	5,9 60	1024424544	5357743673	6682848987	456857404	1816235555	1058959365	925810350	0
9	0,269031	3	3	12	5,9 60	1095380028	5386087138	6958843809	5389117638	1667083701	1087020896	1008590794	0
10	0,067258	4	4	12	5,9 60	180046923	470854117	480187639	568259575	905137118	71341516	153975169	0
11	0,067258	4	4	12	5,9 60	246261724	1283938923	1841126168	2410503420	2425879460	294064679	236474946	0
12	0,067258	4	4	12	5,9 60	266647701	1280461208	1952394364	2713344083	2589302760	314222174	258883029	0
13	0,016814	5	5	12	5,9 60	39651501	103078222	105537584	97106307	130673557	12342207	32956780	0
14	0,016814	5	5	12	5,9 60	57139469	298593207	428100057	521109520	749079039	58601183	58579049	0
15	0,016814	5	5	12	5,9 60	49803764	251326782	370786255	387165402	449868366	53837083	65804943	0
16	0,004204	6	6	12	5,9 60	8997702	22946252	23630489	21712816	30248622	3107767	7097443	0
17	0,004204	6	6	12	5,9 60	12023021	62939826	93563914	91818388	105710673	11352549	14254289	0
18	0,004204	6	6	12	5,9 60	12530924	60529462	92640046	100681656	145937513	11033356	11495943	0
19	0,001051	7	7	12	5,9 60	2163759	5722706	6216783	5490759	8467557	830721	1701692	0
20	0,001051	7	7	12	5,9 60	3217348	14958248	22201704	23614862	25663695	2930326	3004310	0
21	0,001051	7	7	12	5,9 60	2917356	14263595	22082371	21221713	29440587	2467490	3058764	0
22	0,000263	8	8	12	5,9 60	912269	2210148	2388196	2164601	4195654	955919	850846	0
23	0,000263	8	8	12	5,9 60	1025036	5204122	6746380	6300112	8782119	959400	987832	0
24	0,000263	8	8	12	5,9 60	916908	5063561	6810024	7217635	10948249	888778	786122	0
25	4,304500	1	9	10	5,9 60	13573678422	10596543475	7596260214	2287284596	655765991	1501042266	9156306318	1

26	4,304500	4	9	10	5,9	60	12714039074	13185511161	17564695607	17784850814	8194539219	10304272792	15734375696	1
27	4,304500	1	9	10	5,9	60	12832360144	10765359968	8193103349	2028378752	324005681	1167377820	9439183253	1
28	1,076125	2	10	10	5,9	60	3930059781	6823513958	6317067565	4329711366	1433553375	1138528802	2771712101	0
29	1,076125	2	10	10	5,9	60	4128367116	6528109089	5954398975	3964607392	1594029917	1217298179	3074339570	0
30	1,076125	2	10	10	5,9	60	3815691477	7272596917	6812689342	3971274158	1273541259	1219400768	2717552612	0
31	0,269031	3	11	10	5,9	60	709289668	1501801891	1447667976	1402282156	1701184769	254108599	539001757	0
32	0,269031	3	11	10	5,9	60	977529968	1861934117	1703025490	1613253772	2048130165	309579031	754261574	0
33	0,269031	3	11	10	5,9	60	861863693	2165476498	2419016266	2812883329	2243330160	457490677	683016913	0
34	0,067258	4	12	10	5,9	60	156895862	307752304	291852997	225427856	280632272	44408886	126542774	0
35	0,067258	4	12	10	5,9	60	227371654	438699306	399732524	317545073	448819251	59852652	188000487	0
36	0,067258	4	12	10	5,9	60	208858618	520620259	578206541	561106391	839699934	88299179	174724666	0
37	0,016814	5	13	10	5,9	60	35742473	70272426	65003774	41585698	45128005	9099027	28775759	0
38	0,016814	5	13	10	5,9	60	63249165	121797486	112746566	80918990	80677113	19037766	52023775	0
39	0,016814	5	13	10	5,9	60	43986249	111259285	126627030	116823539	136670441	15987819	37249318	0
40	0,004204	6	14	10	5,9	60	7548648	17203981	15011163	9374743	9398625	2623209	8013200	0
41	0,004204	6	14	10	5,9	60	9249851	16873820	16049617	9826328	8706852	2249635	7325425	0
42	0,004204	6	14	10	5,9	60	9599064	24311246	27650345	25526142	35879380	3403158	8095823	0
43	0,001051	7	15	10	5,9	60	2146496	4552121	4725957	2848790	4296265	1632741	1716740	0
44	0,001051	7	15	10	5,9	60	2799123	4354033	4603578	3381860	4056447	690421	3216210	0
45	0,001051	7	15	10	5,9	60	2105388	5842153	7235700	6357151	9441574	870044	1823122	0
46	0,000263	8	16	10	5,9	60	697678	1306343	1889350	1192453	3736874	493880	562783	0
47	0,000263	8	16	10	5,9	60	555409	2506898	3753972	4504468	5891487	887101	789828	0
48	0,000263	8	16	10	5,9	60	708316	2350937	2863055	2594486	4229060	566034	618761	0
49	4,304500	1	17	14	5,9	60	12115252050	10620378611	7217140493	1527540105	254540006	870946223	6643524064	1
50	4,304500	1	17	14	5,9	60	12230955404	10006015213	6891303598	1717725715	458926506	1142815545	6647039910	1
51	4,304500	1	17	14	5,9	60	12377954033	10493963544	7634640347	1878185734	444434820	1056629032	7131810821	1
52	1,076125	2	18	14	5,9	60	3741917601	6543398129	6373527527	4068942999	1512881739	1137994968	2523237878	0
53	1,076125	2	18	14	5,9	60	3624474322	7630331473	6498156379	3784236490	1128144920	1025801566	2252270750	0
54	1,076125	2	18	14	5,9	60	3957999688	7531115376	7114963468	4080252998	1609810321	1383897705	2482637182	0
55	0,269031	3	19	14	5,9	60	857322144	1692799485	1742827146	1920759262	2093041582	336467893	629482126	0

56	0,269031	3	19	14	5,9	60	745158888	1866112294	1574927619	1171059304	1222579984	325768672	582723835	0
57	0,269031	3	19	14	5,9	60	895020943	2306209692	2434325161	2678744596	2275488460	489248112	697004338	0
58	0,067258	4	20	14	5,9	60	197040382	383542219	382736987	362146558	510661875	64633888	149054999	0
59	0,067258	4	20	14	5,9	60	177711717	421934299	352502644	216951224	200771175	59629882	140151522	0
60	0,067258	4	20	14	5,9	60	209680866	524141049	535477386	485101959	558496615	87550946	162500687	0
61	0,016814	5	21	14	5,9	60	43235974	85465875	85794680	72425855	86741329	11705741	33234127	0
62	0,016814	5	21	14	5,9	60	38963902	93357908	78837403	41769574	33990608	11329256	32365017	0
63	0,016814	5	21	14	5,9	60	44093303	113161717	117131450	92436224	97050669	18166041	37760595	0
64	0,004204	6	22	14	5,9	60	10213118	19749530	19857832	14208339	18718991	3105688	7568722	0
65	0,004204	6	22	14	5,9	60	9850489	22398088	19338924	11019680	9814787	2878075	8051831	0
66	0,004204	6	22	14	5,9	60	9940224	24374341	26112292	20601593	20324961	3807127	9732093	0
67	0,001051	7	23	14	5,9	60	2290726	6599371	5894189	4465763	6331809	1090577	2303309	0
68	0,001051	7	23	14	5,9	60	2166446	6599371	7612770	3022839	3533620	1090577	2236533	0
69	0,001051	7	23	14	5,9	60	2786265	6901590	7612770	5589988	6349317	1380480	2236533	0
70	0,000263	8	24	14	5,9	60	682935	1854897	2514183	2098713	4235400	534281	720972	0
71	0,000263	8	24	14	5,9	60	805215	2569859	2731789	1827959	1949234	566711	1189728	0
72	0,000263	8	24	14	5,9	60	741670	3341922	3610091	2626484	4171617	809671	1599789	0
73	4,304500	1	25	12	3,9	60	13053024775	10886081205	7442297283	1390805002	271246765	825759074	6677679837	1
74	4,304500	1	25	12	3,9	60	12116865716	11455910818	8589521992	1945246857	342734133	1223248359	8085797432	1
75	4,304500	1	25	12	3,9	60	12659977512	10765044659	7739714426	1634505006	355547577	1007003440	6810244457	1
76	1,076125	2	26	12	3,9	60	4465552985	10455223840	9514074791	3200377929	608486900	1581972469	2694361456	0
77	1,076125	2	26	12	3,9	60	4412375861	14368355020	20334248670	33340767192	15008711601	16988150933	6307718864	0
78	1,076125	2	26	12	3,9	60	4001868140	9984680867	9418897311	3082320822	569074200	1553810546	2514667667	0
79	0,269031	3	27	12	3,9	60	740292692	3818067792	5363352252	4333828291	1485452977	915350525	526437040	0
80	0,269031	3	27	12	3,9	60	1040694652	3843844346	4572177206	4425725852	3636407564	853117209	650652443	0
81	0,269031	3	27	12	3,9	60	855005203	4371419968	5991161347	4770226323	1972872807	1006476147	736019651	0
82	0,067258	4	28	12	3,9	60	213983758	1026461946	1684220463	2519776474	2083035689	283227469	189828234	0
83	0,067258	4	28	12	3,9	60	270393049	1065041522	1403623936	1911172752	2589595333	272519694	242264115	0
84	0,067258	4	28	12	3,9	60	212053973	968698164	1441550386	2284631703	2389045075	272673100	196500357	0
85	0,016814	5	29	12	3,9	60	51642237	242867374	376032501	561418658	850544957	58850804	45343180	0

86	0,016814	5	29	12	3,9	60	59465494	245200227	317926091	379997476	528493646	51745022	57343845	0
87	0,016814	5	29	12	3,9	60	48826773	229239273	329015170	426077384	599944189	53125076	48952870	0
88	0,004204	6	30	12	3,9	60	12600996	54878915	84939112	103042791	138566908	11028916	12221499	0
89	0,004204	6	30	12	3,9	60	12700246	53484994	70846031	83970029	111866318	11532572	14632620	0
90	0,004204	6	30	12	3,9	60	10220634	47981383	71441057	79610455	93740234	10631267	11554624	0
91	0,001051	7	31	12	3,9	60	2566079	13074569	20560875	22897704	29978683	2861870	2260963	0
92	0,001051	7	31	12	3,9	60	3328274	12627526	18202105	19551771	24840478	2824766	2648938	0
93	0,001051	7	31	12	3,9	60	2870383	12021246	17125613	18268141	21348905	2320580	2240204	0
94	0,000263	8	32	12	3,9	60	1004433	4090462	6211363	6715657	9381519	1059045	812528	0
95	0,000263	8	32	12	3,9	60	725514	4186783	5965852	7199945	10850437	1343739	739705	0
96	0,000263	8	32	12	3,9	60	754084	4299008	5705020	6311387	8878639	1003647	873248	0
97	4,304500	1	33	12	8,9	60	12838134080	11967012072	9305053572	1860289788	353657361	1058523443	8114348165	1
98	4,304500	1	33	12	8,9	60	12893598217	11958010592	9427101617	1982255943	365924944	1133072587	8207491898	1
99	1,076125	2	34	12	8,9	60	4814240805	10987594173	10213194909	3505905656	677432636	1694787108	3161877991	0
100	1,076125	2	34	12	8,9	60	4819228397	10316819578	9848069692	3770864253	1204610518	2005146438	2968741879	0
101	1,076125	2	34	12	8,9	60	5160442965	11057283318	10195353167	3377646136	723975578	1818110108	3521740307	0
102	0,269031	3	35	12	8,9	60	1127789381	5083804926	6659471783	5289224011	1873458853	962743432	894058588	0
103	0,269031	3	35	12	8,9	60	1114291133	5181138526	6643197985	4691759194	2269977278	1068792505	949235997	0
104	0,067258	4	36	12	8,9	60	278357041	1363286422	2157474819	2778046574	2257840121	309517561	227370110	0
105	0,067258	4	36	12	8,9	60	267565315	1202014902	1785227653	2308122492	2294074290	262210541	219749102	0
106	0,067258	4	36	12	8,9	60	275868780	1269793759	1835283415	2329706397	2641080629	306302525	245306492	0
107	0,016814	5	37	12	8,9	60	59840016	268279390	385489928	460058620	769917767	50280982	51745625	0
108	0,016814	5	37	12	8,9	60	62946901	302700267	433004720	445979611	572844497	64300328	63502557	0
109	0,004204	6	38	12	8,9	60	14061139	74677099	121638508	137584438	193988795	13130850	11801176	0
110	0,004204	6	38	12	8,9	60	12259835	54180320	76802858	70743462	90290808	7878272	11512602	0
111	0,004204	6	38	12	8,9	60	13665932	67842503	101583886	100646084	126186916	15838263	15642841	0
112	0,001051	7	39	12	8,9	60	3865546	14323122	22526853	21976330	35595529	2838734	5900588	0
113	0,001051	7	39	12	8,9	60	3235680	17336644	28371202	27080498	30002494	5807016	5734732	0
114	0,000263	8	40	12	8,9	60	698806	4759536	7049918	6491631	9989759	1152627	650201	0
115	0,000263	8	40	12	8,9	60	802049	6824043	11542008	11014475	12190885	3268301	2867366	0

116	4,304500	1	41	12	5,9	45	9268660692	7477343021	4147721272	776015190	133883304	424083592	3261564983	1
117	4,304500	1	41	12	5,9	45	9332105403	7684331238	4269885583	851940601	140184681	443071785	3137364802	1
118	1,076125	2	42	12	5,9	45	2849821315	7846911732	5304025037	1148099613	175055583	600987409	1582536572	0
119	1,076125	2	42	12	5,9	45	2542636207	6776932955	5404277698	1376888181	204131291	603465179	1283239095	0
120	0,269031	3	43	12	5,9	45	681653159	4671797864	5016146327	1884836190	302161280	515603573	462033788	0
121	0,269031	3	43	12	5,9	45	592309532	2334762234	2785679788	1952243320	596304662	260613146	351849728	0
122	0,067258	4	44	12	5,9	45	165190848	1108043941	1443957301	1368433197	724959624	124974241	118275438	0
123	0,067258	4	44	12	5,9	45	128611935	521418218	660964770	616836217	7014911045	63496376	96953550	0
124	0,016814	5	45	12	5,9	45	35497322	248305934	327158116	346854375	547996309	25164556	27820042	0
125	0,016814	5	45	12	5,9	45	27782139	112408619	143809803	129699651	125461828	13731214	20415680	0
126	0,004204	6	46	12	5,9	45	9275763	60186277	82691361	80491715	106895859	6512964	7500638	0
127	0,004204	6	46	12	5,9	45	7348233	27682602	37063905	34563412	46261394	3803253	5899892	0
128	0,001051	7	47	12	5,9	45	2443390	13978573	19604859	18639646	21274725	2037819	2420920	0
129	0,000263	8	48	12	5,9	45	508966	5123509	7175619	6675681	7360205	1336017	1175947	0
130	4,304500	1	49	12	5,9	75	13168489155	11786765497	8993983194	3156413886	1568895419	2199146366	6761359548	1
131	4,304500	1	49	12	5,9	75	13260488061	13739497709	12181075069	9055677819	7427953016	8632181016	12631256897	1
132	1,076125	2	50	12	5,9	75	5383638454	10759374722	10968222624	6282491561	4234949739	3819884425	2716903736	0
133	1,076125	2	50	12	5,9	75	6280007907	11654981341	12223660370	7021986078	2747345201	3741344249	4670180419	0
134	0,269031	3	51	12	5,9	75	1340443655	5030433442	6317337239	6684534013	6895560668	1446421652	1090360694	0
135	0,269031	3	51	12	5,9	75	1673892627	5366281831	6555408999	6924754343	6285706946	1482440791	1464033784	0
136	0,067258	4	52	12	5,9	75	341591951	1297697399	1731579835	2164010941	3028859769	326837721	364113870	0
137	0,067258	4	52	12	5,9	75	398568544	1379648657	1810239150	2081189291	2780879837	264209700	375250302	0
138	0,016814	5	53	12	5,9	75	69295312	263216726	341831576	326164202	365154205	84433817	102299193	0
139	0,016814	5	53	12	5,9	75	81110370	294350018	399422223	381262309	401408320	75774121	112984862	0
140	0,004204	6	54	12	5,9	75	17131677	107779842	159816871	140968009	127965270	24071735	38470685	0
141	0,004204	6	54	12	5,9	75	19949829	92693487	146741573	144226069	145138327	18713419	35011431	0
142	0,001051	7	55	12	5,9	75	4506318	25995501	46543553	35080371	31496130	15084299	21202414	0
143	0,001051	7	55	12	5,9	75	5181693	31391921	54936709	47353842	43925732	8184085	17500227	0
144	0,000263	8	56	12	5,9	75	1370819	11024918	19214856	12301454	11154712	1935601	3441326	0
145	0,000263	8	56	12	5,9	75	1727889	15504853	29293771	18661393	12780406	3835584	6648516	0

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Analyse van aromacomponenten in de dampfase van witte wijn via Headspace-GC-MS

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**

Jaar: **2016**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Alessi, Selina

Datum: **13/06/2016**