α-Dicarbonylverbindungen in Würze und in Bier

vorgelegt von
Dipl. LMChem
Arno Strähmel
geb. in Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat Lothar W. Kroh
Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Frank-Jürgen Methner
Gutachter: Dr. rer. nat. Manol Roussev

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. September 2015

Berlin 2016
D 83

Danksagung

Hiermit möchte ich mich in aller Form bei Herrn Prof. Dr. Kroh für die Überlassung des interessanten Themas, die wissenschaftlichen Anregungen, die fachliche Unterstützung und die freie Hand bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, meiner Oma, meiner Freundin und der ganzen Familie, die mit viel Geduld stets an mich geglaubt und mich in allem unterstützt haben.

Herzlichen Dank an die Fakultät III, FG Lebensmittelchemie und Analytik. Insbesondere an die guten Seelen des Hauses Frau Abboud, Frau Berghäuser, Frau Beyerlein, Frau Cämmerer, Frau Manteuffel und Frau Wilcopolski, da sie mich stets zu motivieren wussten und immer ein offenes Ohr hatten.

Der Fakultät III, FG Brauwesen gebührt ebenfalls mein Dank. Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Methner und Herrn Kunz für die zur Verfügung gestellten Proben, fachlichen Anregungen und Diskussionen bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Diplomanden/innen für Ihre Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Freundeskreis und bei allen anderen bedanken, die hier namentlich nicht erwähnt wurden, es aber verdient hätten.

Kurzfassung

α-Dicarbonylverbindungen sind Strukturen mit zwei benachbarten Carbonylgruppen, die eine zentrale Zwischenstufe von Zuckern während der Maillard-Reaktion darstellen. Daraus entstehen Aromen, Farbe, Antioxidantien und weitere Strukturen abhängig von den Edukten und den Reaktionsbedingungen. Um das Endprodukt Bier zu erhalten, werden mehrere Prozessstufen bei der Herstellung durchlaufen. Neben der Malzbereitung entstehen vor allem während des Würzekochens α-Dicarbonylverbindungen als reaktive Intermediate der Maillard-Reaktion. Veränderungen und Kontrolle der Braubedingungen können daher beim Bierbrauen zu einem verbesserten und definierten Produkt führen und / oder die Genusstauglichkeit positiv beeinflussen; Eigenschaften, die von zentraler Bedeutung für das Produkt sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst an verschiedenen Punkten der Sudhausarbeit, bei der die Würze produziert wird, Proben im Hinblick auf die stofflichen Veränderungen von α-Dicarbonylverbindungen, Ferulasäure sowie mengenmäßig bedeutsamer Aldehyde hin untersucht. Ein Fokus liegt dabei auf 1-Desoxy-2,3-hexosulose und D-*Arabino*-2-hexosulose und deren antioxidativem Beitrag im Bier. Dies erfolgte durch die Erfassung des reduzierenden Potentials mittels Chapon-Assay, des Endogenen Antioxidativen Potentials (EAP) und der Reducing Activity (RA) der untersuchten Sudhausproben. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden in Modellen umgesetzt und mittels der synthetisierten Reinsubstanz 1-Desoxy-2,3-hexosulose verifiziert. Mit den durchgeführten Untersuchungen der Sudhausarbeit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die antioxidativen Parameter starken Schwankungen unterlegen sind, sich dies aber nur sehr schwach in der Konzentration der α-Dicarbonylverbindungen widerspiegelt. Wenn die Reduktone Auswirkungen auf die antioxidativen Charakteristika von Würze besitzen, so konnten sie in dieser Arbeit nicht direkt nachgewiesen werden. Vielmehr sind Produkte der α-Dicarbonylverbindungen sowie Hopfeninhaltsstoffe die potenteren Verbindungen.

Abstract

During the Maillard Reaction, structures with two vicinal carbonyl groups, socalled α-dicarbonyls, are known as important key precursors. Depending on the reaction conditions these molecules are reactants for a variety of products resulting in color, flavour, antioxidative characteristics and other substances.

The production of beer takes place in several processing steps. α-dicarbonyls as important key precursors of the Maillard Reaction are formed especially during kiln drying at the end of malting and during the wort boiling process. So the control and variation of the brewing conditions during malting and boiling leads to a better and defined product with positive benefits in appearance, taste and shelf life. These properties are essential for the success of the product respectively the acceptance of the consumer.

In the current paper sampling at different stages of the brewhouse operations were completed. In these samples the change of concentration of α-dicarbonyls, ferulic acid and aldehydes with significant amounts were determined. In the course of this, the antioxidative properties of 1-deoxy-2,3-hexosulose and D-*arabino*-2-hexosulose are important parameters in beer. Therefore, the three parameters a) reducing potential by Chapon assay, b) the endogene antioxidative potential and c) the reducing activity were measured. The results obtained was verified with models and previously synthesized 1-deoxy-2,3-hexosulose.

With the experiments of the brewhouse operations, the present paper was able to demonstrate that the antioxidative parameters deviate considerably. These variations did not correlate very well with the change of concentration of α-dicarbonyls.

The influence of reductones to the antioxidative properties of wort is not clearly proven in this thesis. Rather, it seems to be the reaction products of the α-dicarbonyls, as well as hop components, are the much more powerful antioxidative substances.

Inhaltsverzeichnis

1 Abbildungsverzeichnis III
2 Tabellenverzeichnis VI
3 Abkürzungsverzeichnis IX
4 Einleitung 1
4.1 Geschichtlicher Abriss der Brauerei 1
4.2 Einteilung und allgemeine Zusammensetzung von deutschem Bier 2
5 Aufgabenstellung 4
6 Theorie 6
6.1 Kurzer Abriss der Bierherstellung 6
6.1.1 Rohstoffe 6
6.1.2 Der Brauprozess 7
6.2 Wichtige Inhaltsstoffe in Würze und Bier 12
6.2.1 Verbindungsklassen mit antioxidativer Wirkung 12
6.2.2 Zusammensetzung von Bieren im Speziellen - Metalle 16
6.2.3 Zusammensetzung von Bieren im Speziellen - Bittersäuren 16
6.3 Die Maillard-Reaktion in der Brauerei 18
6.3.1 Bildung von α-Dicarbonylen 19
6.4 Die Bedeutung von Ferulasäure 25
6.4.1 Vorkommen und Verbleib von Ferulasäure im Brauprozesses 25
6.4.2 Antioxidative Wirkungsweise von Phenolen und Phenolderivaten 27
6.4.3 Antioxidative Wirkungsweise von Ferulasäure im Speziellen 28
6.5 Die Alterung von Bier 30
6.5.1 Oxidative Vorgänge im Bier 31
6.5.2 Verständnis Eisen-Radikal Mechanismen 32
6.5.3 Bestimmung radikalischer Spezies 34
7 Verwendete Chemikalien und Lösungen 35
8 Methodenteil 40
8.1 Probennahme im Sudhaus 40
8.1.1 Aufbereitung der Sudhausproben für Sud 1 und Sud 2 43
8.2 Untersuchungen im Würzemodell 43
8.2.1 Durchführung Grundmodell 43
8.2.2 Erweitertes Modell mit Aminosäuren 44
8.2.3 Würzemodelle mit Ferulasäure 44
8.2.4 Würzemodelle mit Prolin und Ferulasäure 44
8.2.5 D-Glukoselösung bei 150 °C 44

8.3 Untersuchung kommerzieller Biersorten 45
8.4 α-Dicarbonylverbindungen 46
8.4.1 Messung von α-Dicarbonylverbindungen mittels RP-HPLC-DAD 48
8.4.2 Quantifizierung von α-Dicarbonylverbindungen 49
8.5 Bestimmung von Aldehyden 51
8.5.1 Bestimmung von Aldehyden und Ketonen als DNPH-Derivat 51
8.5.2 Probenaufarbeitung und Identifizierung 52
8.5.3 Quantifizierung 53
8.6 Bestimmung von Aldehyden als PFBOA-Derivat 54
8.6.1 Probenaufarbeitung 55
8.6.2 Identifizierung und Quantifizierung 55
8.7 Schnellmethode zur Bestimmung von Ferulasäure 57
8.7.1 Quantifizierung von Ferulasäure 58
8.8 Der Chapon-Assay 58
8.9 Das Endogene Antioxidative Potential und die T-Werte 59
8.10 Reducing Activity – RA 60
8.11 Bestimmung von Phenolcarbonsäuren mittels HPLC 61
9 Ergebnis- und Diskussionsteil 63
9.1 Untersuchungen während der Sudhausarbeit 63
9.1.1 Ergebnisse α-Dicarbonylverbindungen 63
9.1.2 Ergebnisse Aldehyde 69
9.1.3 Weitere Ergebnisse 73
9.1.4 Diskussion der Ergebnisse der Versuche Sud 1 und Sud 2 76
9.2 Würze - Modelluntersuchungen 81
9.2.1 Ergebnisse der Würzemodelle 81
9.2.2 Ergebnisse der Modelle mit Ferulasäure nach Abschnitt 8.2.3 und 8.2.4 90
9.2.3 Diskussion der Würzemodelle 94
9.2.4 Modell – D-Glukose 150 °C 101
9.2.5 Reaktion von Ferulasäure und 1-Desoxyhexosulose 106
9.2.6 Untersuchung kommerzieller Biersorten 110
9.2.7 Diskussion der Modelluntersuchungen 113
10 Zusammenfassung 116
11 Anhang – Verbrauchsmaterialien/Abbildungen/Spektren 118
12 Wertetabellen 123
13 Literaturverzeichnis 132

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 6-1: Bildung von Aldehyd-Bisulfitaddukten. 13

Abbildung 6-2: Struktur von L-Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure. 15

Abbildung 6-3: Abfangmechanismus von Radikalen durch 1-Desoxyhexosulose. 15

Abbildung 6-4: Ablauf der frühen Phase der Maillard-Reaktion. 19

Abbildung 6-5: Bildung von α-Dicarbonylverbindungen aus dem Amadori-Produkt der D-Glukose. 20

Abbildung 6-6: Postulierte Melanoidinstruktur vom Enol-Typ. 21

Abbildung 6-7: Allgemeiner Reaktionsverlauf des Streckerabbaus. 22

Abbildung 6-8: Bildung von Methylglyoxal aus 1-DH über Retro-Aldol-Reaktion. 23

Abbildung 6-9: Beispielhafte Übersicht der Folgereaktionen aus 1-DH im leicht sauren Milieu. 24

Abbildung 6-10: Biosynthese von Hydroxyzimtsäuren und Flavonoiden. 25

Abbildung 6-11: Quellen von Ferulasäure während des Brauprozesses. 26

Abbildung 6-12: Thermischer Abbau von Ferulasäure. 26

Abbildung 6-13: Mesomeriestabilisierung des Phenoxyradikals von Ferulasäure. 27

Abbildung 6-14: Mesomeriestabilisierung des Phenoxyradikals von Isoferulasäure. 27

Abbildung 6-15: Mechanismus der Kupfer-induzierten oxidierenden Wirkung von Ferulasäure nach Bourne und Rice-Evans (1997). 29

Abbildung 6-16: Redox-Cycling von Eisen(II) durch Ascorbinsäure ($AscH_2$: Ascorbinsäure, $DeAscH_2$: Dehydroascorbinsäure, FeO^{2+}: Ferrylion). 33

Abbildung 8-1: Fließschema zum verwendeten Brauverfahren für Sud 1 und Sud 2 mit eingesetzten Rohstoffmengen und Temperaturen. 42

Abbildung 8-2: Derivatisierungsreaktion von α-Dicarbonylverbindungen mit *o*PDA. 46

Abbildung 8-3: UV-Spektrum vom Glucoson-Chinoxalin. 46

Abbildung 8-4: Struktur von 2,3-Diphenyl-chinoxalin. 47

Abbildung 8-5: UV/Vis-Spektrum von 2,3-Diphenylchinoxalin. 47

Abbildung 8-6: Chromatogramm der zehn Standard Chinoxaline. 48

Abbildung 8-7: Derivatisierungsreaktion einer Carbonylverbindung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. 51

Abbildung 8-8: Abfangreaktion von Carbonylstrukturen durch PFBOA. 54

Abbildung 8-9: McLafferty Umlagerung von PFBOA-Derivaten aliphatischer gesättigter Aldehyde zu einem N-(Perfluorobenzyloxy) ethenaminion (m/z = 239) und einem aliphatischem Rest. 56

Abbildung 8-10: Entstehung eines Pentafluorobenzyl substituiertem Pyridiniumions (m/z = 276). 56

Abbildung 8-11: UV/Vis-Spektrum von Ferulasäure von 220–500 nm (λ in nm). 57

Abbildung 8-12: Dipyridil-Eisen(II)-Farbkomplex (rot). 58

Abbildung 8-13: Trapping-Reaktion von POBN. 59

Abbildung 8-14: Zusammenhang EAP-Wert und T_x-Wert. 60

Abbildung 8-15: Reduktion des DPPH-Radikals zu DPPH-H. 61

Abbildung 9-1: Übersicht I des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; grüner Pfeil: Zeitpunkt der Hopfengabe; Werte siehe Anhang Tabelle 12-15). 64

Abbildung 9-2: Übersicht II des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (bezogen auf 12 % Extrakt; grüner Pfeil: Zeitpunkt der Hopfengabe; Werte siehe Anhang Tabelle 12-15). 65

Abbildung 9-3: Übersicht III des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-15). 66

Abbildung 9-4: Übersicht I des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-16) 67

Abbildung 9-5: Übersicht II des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (Werte bezogen auf 12 % Extrakt, Werte siehe Anhang Tabelle 12-16). 67

Abbildung 9-6: Übersicht II des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-16). 68

Abbildung 9-7: Übersicht I des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-17). 69

Abbildung 9-8: Übersicht II des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-17). 70

Abbildung 9-9: Übersicht III des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (bezogen auf 12 % Extrakt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-17). 70

Abbildung 9-10: Übersicht I des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-18). 71

Abbildung 9-11: Übersicht II des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-18). 72

Abbildung 9-12: Übersicht III des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (bezogen auf 12 % Extrakt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-18). 72

Abbildung 9-13: Konzentrationen verschiedener Zucker von Sud 1 während der Sudhausarbeit in mM (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-19). 73

Abbildung 9-14: Konzentrationen verschiedener Zucker von Sud 2 während der Sudhausarbeit in mM (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-20). 73

Abbildung 9-15: Ferulasäuregehalt von Sud 1 und Sud 2 während der Sudhausarbeit (nicht extraktbereinigt). 74

Abbildung 9-16: ESR Kenndaten von Sud 1 während der Sudhausarbeit (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-17). 74

Abbildung 9-17: ESR Kenndaten von Sud 2 während der Sudhausarbeit (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-18). 75

Abbildung 9-18: Abspaltung von Formaldehyd bei der Cyclisierung von 1-DH. 78

Abbildung 9-19: Ferulasäurekonzentrationsverlauf der Modelle GM + FS und GM + Pro + FS [µM] (Werte siehe Anhang Tabelle 12-10). 90

Abbildung 9-20: Verlauf der Ferulasäurekonzentration der Modelle GM + FS und GM + AS + FS. 91

Abbildung 9-21: Relative Konzentration der Ferulasäure bezogen auf die Anfangskonzentrationen der Modelle GM + FS und GM + FS + AS. 92

Abbildung 9-22: Antioxidative Aktivität bestimmt mittels ESR. 93

Abbildung 9-23: Zusammenfassung der Bildung von α-Dicarbonylverbindungen im Würzemodell mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin (Werte siehe Abschnitt 9.2.1). 94

Abbildung 9-24: Bräunungsverlauf der Würzemodelle bei 420 nm. 95

Abbildung 9-25: Zusammenfassung der Bildung von α-Dicarbonylverbindungen im Würzemodell mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin sowie Ferulasäure (Werte siehe Abschnitt 9.2.1). 98

Abbildung 9-26: Entstehung von Aldehyden im Würzemodell mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin ohne Ferulasäure. 98

Abbildung 9-27: Entstehung von Aldehyden im Würzemodell mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin und Ferulasäure. 99

Abbildung 9-28: Bräunungsverlauf der Würzemodelle mit Ferulasäure bei 420 nm. 99

Abbildung 9-29: Zusammenhangzwischen dem α-Dicarbonylgehalt (Säulen) und der antioxidativen Aktivität des D-Glukose-Modells (Linie) (150 °C; pH 5,5; Phosphatgepuffert). 101

Abbildung 9-30: Zusammenhangzwischen dem α-Dicarbonylgehalt (Säulen) und der antioxidativen Aktivität des D-Glukose-Modells (Linie) mit Ferulasäure (150 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert). 102

Abbildung 9-31: Verlauf der Ferulasäurekonzentration im Modell Glc-FS (150 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert). 102

Abbildung 9-32: Vergleich der ESR Daten der Modelle Glc (150 °C), Glc + FS (150 °C), FS (100 °C), 1-DH + FS (100 °C) als Verbrauch DPPH in mol/L; alle pH 5,5 (phosphatgepuffert). 104

Abbildung 9-33: Vergleich Chapon-Daten der Modelle Glc (150 °C), Glc + FS (150 °C), FS (100 °C), 1-DH + FS (100 °C) in mM; alle bei pH 5,5 (phosphatgepuffert). Das Modell 1-DH + FS hat eine andere Skalierung auf der rechten Ordinate. 105

Abbildung 9-34: Postulierte Reaktion zwischen 1-Desoxyhexosuose und Ferulasäure. 106

Abbildung 9-35: α-Dicarbonylverbindungen und antioxidative Werte (ESR, als Verbrauch DPPH in mM) im Modell 1-DH mit Ferulasäure (100 °C; pH 5,5). 107

Abbildung 9-36: Konzentrationsverlauf von Ferulasäure der thermischen Behandlung einer entsprechenden Mischung mit 1-DH. 107

Abbildung 9-37: Überlagerung der Chromatogramme des Versuchs 1-DH mit Ferulasäure (325 nm; 100 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert): schwarz – 0 min, rosa – 30 min, blau – 60 min, braun – 120 min, grün – 240 min. 108

Abbildung 9-38: UV/Vis-Spektrum der Struktur bei ca. 3,8 Minuten (Peak D) im Chromatogramm Abbildung 9-37. 109

Abbildung 9-39: Ermittelte Gehalte der α-Dicarbonylverbindungen in vier Biersorten. 110

Abbildung 9-40: Ermittelte Gehalte der Aldehyde in den vier Biersorten Pilsner, Malzbier, Schwarzbier und Bock Bier. 111

Abbildung 9-41: Ermittelte Gehalte freier Ferulasäure in den vier Biersorten Pilsner, Malzbier, Schwarzbier und Bock Bier. 111

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Beispiele von Stammwürzegehältern verschiedener Biere 2

Tabelle 4-2: Allgemeine Zusammensetzung eines Vollbieres bezogen auf 1 L 3

Tabelle 6-1: Wirksame Malzenzyme während des Maischens 9

Tabelle 6-2: Vergleich Ober- und Untergärung bei der Bierherstellung 11

Tabelle 6-3: Sulfitgehalte verschiedener Biersorten in µM SO_2 13

Tabelle 6-4: Änderung der Konzentration von Eisen und Kupfer im Brauprozess 16

Tabelle 6-5: Bitterstoffausbeute verschiedener Hopfenprodukte 17

Tabelle 6-6: Biersorten und deren Bittereinheiten 17

Tabelle 6-7: Vergleich der antioxidativen Kraft von Ferulasäure (FS), Vanillinsäure (VS), Cumarsäure (CS) und Zimtsäure (ZS) 28

Tabelle 6-8: Tabelle mit Geruchsschwellenwerten einiger Substanzen [in Wasser; 20°C; in µg/L bzw. ppb] (Die Werte sind abhängig von der Person und daher nur Richtwerte) 30

Tabelle 8-1: Probennahmepunkte während der Sudhausarbeit 40

Tabelle 8-2: Liste der mittels HPLC-DAD bestimmbaren α-Diarbonylverbindungen, deren molekulare Masse, sowie der dazugehörigen Chinoxalin-Derivate 47

Tabelle 8-3: Parameter für die Bestimmung von Carbonylverbindungen als Chinoxalin-Derivate 48

Tabelle 8-4: Laufmittelgradient zur Trennung von Chinoxalinen 48

Tabelle 8-5: Kalibrierung von α-Dicarbonylverbindungen (durchschnittlicher Response aus drei Messungen; R^2: Bestimmtheitsmaß) 49

Tabelle 8-6: Standardabweichung der Kalibrierung von α-Dicarbonylverbindungen (Response absolut und prozentual) 49

Tabelle 8-7: Eingesetzte Konzentrationen [mg/L] und gemessener Response zur Bestimmung der Responsefaktoren von α-Dicarbonylverbindungen 50

Tabelle 8-8: Responsefaktoren für 2,3-DPC zu den untersuchten α-Dicarbonylverbindungen 50

Tabelle 8-9: Parameter für die Bestimmung von Carbonylverbindungen als DNPH-Derivate 52

Tabelle 8-10: Laufmittelgradient für die qualitative und quantitative Bestimmung von Carbonylverbindungen als DNPH-Derivate 52

Tabelle 8-11: Kalibrierung von DNPH-Aldehyden (Kalibrierfunktion aus drei Messungen als: rsp = a*c + b; R^2: Bestimmtheitsmaß) 53

Tabelle 8-12: Parameter für die Bestimmung von Carbonylverbindungen als PFBOA-Derivate 55

Tabelle 8-13: Kalibrierung von Aldehyden (Response x 10^6 aus einer Messung; R^2: Bestimmtheitsmaß) 57

Tabelle 8-14: Parameter für die Bestimmung von Ferulasäure 57

Tabelle 8-15: Kalibrierung von Ferulasäure (durchschnittlicher Response aus drei Messungen; R^2: Bestimmtheitsmaß – in Klammern: Standardabweichung in %) 58

Tabelle 8-16: Parameter für die Bestimmung von Hopfensäuren 61

Tabelle 8-17: Laufmittelgradient für die Bestimmung von Phenolcarbonsäuren 62

Tabelle 9-1: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM und GM + FS [µM] 82

Tabelle 9-2: Aldehydkonzentrationen der Modelle GM und GM + FS [µM] 82

Tabelle 9-3: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM + Gly und GM + Gly + FS [µM] 83

Tabelle 9-4: Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Gly und GM + Gly + FS [µM] 83

Tabelle 9-5: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM + Met und GM + Met + FS [µM] 84

Tabelle 9-6: Aldehydkonzentration des Modelle GM + Met und GM + Met + FS [µM] 84

Tabelle 9-7: α-Dicarbonylkonzentration der Modelle GM + Phe, GM + Phe + FS und GM + Phe + 10xFS [µM] 85

Tabelle 9-8: Aldehydkonzentrationen des Modelle GM + Phe, GM + Phe + FS und GM + Phe + 10xFS [µM] 85

Tabelle 9-9: α-Dicarbonylkonzentration der Modelle GM + Thr und GM + Thr + FS [µM] 86

Tabelle 9-10: Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Thr und GM + Thr + FS [µM] 86

Tabelle 9-11: α-Dicarbonylkonzentration der Modelle HM + Pro und HM + Pro + FS [µM] 87

Tabelle 9-12: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle mit Aminosäuren gleicher Molarität GM + Gly/Met/Phe/Thr/Arg + FS [µM] 88

Tabelle 9-13: Aldehydkonzentrationen der Modelle mit Aminosäuren gleicher Molarität GM + Gly/Met/Phe/Thr/Arg + FS [µM] 89

Tabelle 9-14: Ferulasäurekonzentrationen der Modelle GM + AS + FS [µM] 91

Tabelle 9-15: Ferulasäurekonzentrationen der Modelle – GM + AS + FS und GM + AS (gleiche Molarität) + FS [µM] 92

Tabelle 9-16: Ferulasäurekonzentrationen der Modelle GM + AS + FS [µM] normiert auf eine Anfangskonzentration von 50 µM (500 µM) 93

Tabelle 9-17: Heatmap des Konzentrationsverlaufes von Glucoson, 1-DH und 3-DH aller durchgeführten Modellversuche in µM 96

Tabelle 9-18: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle Glc und Glc + FS [µM]. Die bedingte Formatierung erfolgt von grün (niedrigster Wert) nach rot (höchster Wert). 103

Tabelle 11-1: Allgemeine Verbrauchsmaterialien 118

Tabelle 11-2: Sonstige Geräte 118

Tabelle 11-3: HPLC-DAD Anlage (Shimadzu Prominence®) 118

Tabelle 11-4: HPLC- Anlage zur semipräparativen Gewinnung von Bittersäuren 119

Tabelle 11-5: Geräte- und Parameter für die Bestimmung von Carbonylverbindungen als PFBOA-Derivate 119

Tabelle 11-6: Geräte und Parameter für die ESR-Messungen 119

Tabelle 11-7: Übersicht α-Dicarbonyle 120

Tabelle 11-8: Zusammenfassung Aldehyd-DNPH Derivate 121

Tabelle 11-9: Phenolcarbonsäuren, Retentionszeiten und UV-Spektren 122

Tabelle 12-1: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM und GM + FS [µM] 123

Tabelle 12-2: α-Dicarbonyl- und Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Gly und GM + Gly + FS [µM] 123

Tabelle 12-3: α-Dicarbonyl- und Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Met und GM + Met + FS [µM] 124

Tabelle 12-4: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM + Phe, GM + Phe + FS und GM + Phe + FS10x [µM] 124

Tabelle 12-5: Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Phe, GM + Phe + FS und GM + Phe + FS10x [µM] 125

Tabelle 12-6: α-Dicarbonyl- und Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Thr und GM + Thr + FS [µM] 125

Tabelle 12-7: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle gleicher Aminosäuremolaritäten GM + Gly/Met/Phe/Thr/Arg + FS [µM] (Einzelmessung) 126

Tabelle 12-8: Konzentrationsverlauf von α-Dicarbonylverbindungen und Ferulasäure [µM]; ESR-Daten als Verbrauch DPPH [mM] sowie Chapon-Daten als Menge gebildetes Eisen (II) [µM] im Modell 1-DH und Ferulasäure (100 °C; pH 5,5) 126

Tabelle 12-9: Aldehydkonzentrationen der Modelle gleicher Aminosäuremolaritäten GM + Gly/Met/Phe/Thr/Arg + FS [µM] (Einzelmessung) 127

Tabelle 12-10: Ferulasäurekonzentrationen in µM der Versuche GM + FS, GM + Pro + FS (100 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert); Glc + FS (150 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert) 127

Tabelle 12-11: ESR-Daten der Modelle Glc (150 °C), Glc + FS (150 °C), FS (100 °C), 1-DH + FS (100 °C) als Verbrauch DPPH in mol/L; (alle bei pH 5,5; phosphatgepuffert) 127

Tabelle 12-12: Chapon-Daten der Modelle: Glc (150 °C), Glc + FS (150 °C), FS (100 °C), 1-DH + FS (100 °C) in mM; (alle bei pH 5,5; phosphatgepuffert) 127

Tabelle 12-13: Konzentration [µM] von α-Dicarbonylen, Aldehyden und Ferulasäure der Biersorten Pilsner, Malzbier, Schwarzbier sowie Bock Bier 128

Tabelle 12-14: Definition der Probenahmepunkte von Sud 1 und Sud 2 129

Tabelle 12-15: Gehalte der α-Dicarbonylverbindungen an den Probenahmepunkten der Sudhausarbeit von Sud 1 (alle Werte in µM und nicht extraktbereinigt) 129

Tabelle 12-16: Gehalte der α-Dicarbonylverbindungen an den Probenahmepunkten der Sudhausarbeit von Sud 2 (alle Werte in µM und nicht extraktbereinigt) 129

Tabelle 12-17: Gehalte von Aldehyden und Werte der ESR-Messungen an den Probenahmepunkten der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; falls nicht anders angegeben, alle Werte in µM) 130

Tabelle 12-18: Gehalte von Aldehyden und Werte der ESR-Messungen an den Probenahmepunkten der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; falls nicht anders angegeben, alle Werte in µM) 130

Tabelle 12-19: Werte der Zuckermessungen von Sud 1 während der Sudhausarbeit in µM (ermittelt vom Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Brauwesen) 130

Tabelle 12-20: Werte der Zuckermessungen von Sud 2 während der Sudhausarbeit in µM (ermittelt vom Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Brauwesen) 131

3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2,3-DPC	*2,3*-Diphenylchinoxalin
AS	Aminosäure
CLA	cypridina luciferin analog (2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydro imidazol[1,2-alpha]pyrazin-3-on)
CS	Cumarsäure
DAD (PDA)	Dioden Array Detektor
DC	α-Dicarbonylverbindung
deio.	deionisiertes Wasser
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin-Radikal
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EA	Elektronenaffinität
EBU	European Bittering Units
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EN	Elektronegativität
ESR	Elektronenspinresonanz
et al.	*et alia*
FS	Ferulasäure
GC	Gaschromatographie
GSW	Geruchsschwellenwert
GM	Grundmodell
HPLC	*high performance liquid chromatography*
ibd.	*Ibidem*
LC	Flüssigchromatographie (*liquid chromatography*)
LDL	Low Density Lipoprotein
LOQ	Limit of Quantitation
MS	Massenspektrometrie
mM	milimol je Liter
µM	mikromol je Liter
n	Stichprobenanzahl
n. B.	matrixbedingt nicht bestimmbar
n. Chr.	nach Christus
NMR	Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*)
*o*PDA	*ortho*-Phenylendiamin
p.a.	*pro analysi*
PFBOA	(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)-hydroxylamin (Pentafluorobenzylhydroxylamin)
POBN	α-(4-Pyridyl-1-oxid)-N-*tert*-butylnitron
POF	*phenolic off-flavor*
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)
RP	Reversed Phase
rsp	Response
RT	Raumtemperatur
SPME	Solid Phase Micro Extraction

t_r	Retentionszeit
u. B.	unterhalb der Bestimmungsgrenze
v. Chr.	vor Christus
VS	Vanillinsäure
ZS	Zimtsäure

4 Einleitung

„Hopfen und Malz, Gott erhalt's!“ Mit dieser alten deutschen Redensart, die man nicht müde wird immer wieder zu zitieren, wird eines der traditionsreichsten Getränke in Deutschland wertgeschätzt: das Bier. Des „Deutschen liebstes Getränk“ wird dabei allerhand Positives sowie Negatives nachgesagt. Vieles davon wissenschaftlich fraglich, sind einige durchaus gesundheitlich förderliche Eigenschaften zu nennen. Maßvoll genossen, ist allgemein ein positiver Einfluss auf den Cholesterinspiegel anerkannt. Arterien werden vor Sklerose geschützt und der Verlauf von Osteoporose wird positiv beeinflusst.
Vor allem in den letzten Jahren durch die Erschließung neuer Marktsegmente und der Entwicklung neuer Technologien, ist ein schier unübersichtliches Produktspektrum entstanden. Angefangen von klassischen Biersorten untergliedert nach Stammwürzegehalt, über die „neuen“ Biermischgetränke bis hin zu exotischen Sorten ist für fast jeden Geschmack etwas dabei.
Letztlich ist aber unabhängig von der Biersorte für den Verbraucher die frische eines Bieres entscheidend für den Genusswert. Als Produkt natürlicher Rohstoffe ist die Dauer der Haltbarkeit abhängig von den Faktoren Temperatur, Zeit, Licht, von den Braubedingungen und den Rohstoffen. Diese Faktoren führen zu verschiedenen Produktchargen unterschiedlicher Qualität und Haltbarkeit.
Daher ist ein Ziel der Industrie, den Herstellungsprozess so weit wie möglich zu optimieren und zu standardisieren, um eine gleichbleibende Qualität zu gewährleisten, die Haltbarkeit so weit wie möglich zu erhöhen und so viele Ressourcen wie möglich zu sparen.

4.1 Geschichtlicher Abriss der Brauerei

Die Bierbrauerei geht weit in die Geschichte der Menschheit zurück und war bereits vor unserer Zeitrechnung bekannt. Das Keimen bzw. Vergären von Getreide, hervorgerufen durch unzureichende Lagerungsbedingungen, wurde schon seit Jahrtausenden beobachtet.
Die ersten Zeugnisse von Bier bzw. bierartigen Getränken stammen aus der Antike, genauer aus Mesopotamien etwa 3000 Jahre v. Chr. Die ältesten nachgewiesenen Überreste von Bier stammen aus Godin Tepe, einer prähistorische Siedlung im westlichen Zentraliran, etwa 300 v. Chr. Nach jetzigem Kenntnisstand waren jedoch die ersten systematischen Brauer die Ägypter. Als dortiges Grundnahrungsmittel und sogar als Zahlungsmittel anerkannt, verbreitete sich die Kunst des Bierbrauens vor allem durch das ausgedehnte Handelsnetz der Babylonier im gesamten Mittelmeerraum.
Der damalige Herstellungsprozess ging wahrscheinlich von in Wasser eingeweichten Fladenbroten aus. Durch wilde Hefen entstand daraus ein Produkt mit niedrigem Kohlensäure- und Alkoholgehalt, welches durch z. B. Honig, Baumrinde oder Wachholder schmackhafter gemacht wurde.
Im Laufe der Jahrhunderte änderten sich die Rohstoffe zur Herstellung. Der Einsatz regionaler Zutaten und die Entwicklung neuer Biersorten aus den neuen Rohstoffquellen nahmen ab dem Mittelalter in Europa stark zu. Vor allem in den Klosterbrauereien wurden die alten Techniken zum Brauen optimiert, weiterentwickelt und so ein geregelter Braubetrieb etabliert.

Verwendet wurden verschiedene Getreidearten, die mit Kräutermischungen, die so genannte Grut, gewürzt wurden. Von Vorteil war auch die Möglichkeit der Verarbeitung von minderwertigem Getreide zu einer kalorienhaltigen Ergänzung des damaligen Speiseplans.
Die entstandenen Getränke zeichneten sich nicht durch eine lange Haltbarkeit aus. Erst durch das Beimengen von Hopfen, wurde das Bier länger haltbar und es folgte ein sprunghafter Anstieg der kommerziellen Bierproduktion.
Eine Vielzahl an Verordnungen legte im Laufe der Jahrhunderte fest, welche Zutaten für die Herstellung verwendet werden durften. Erst 1516 wurde im bayerischen Reinheitsgebot die Verwendung von Wasser, Hopfen und Gerste festgelegt [1]. Hefe war zu dem damaligen Zeitpunkt nicht bekannt und fand daher keine Erwähnung. Dieses Reinheitsgebot hat bis heute im vorläufigen Biergesetz bestand. Seit dem 29. Juli 1993 ist die Herstellung von deutschem, nach dem Reinheitsgebot gebrautem Bier im vorläufigen Biergesetz geregelt. Zur Bereitung von untergärigem Bier ist nur die Verwendung von Gerstenmalz, Hopfen, Hefe und Wasser gestattet. Für die Bereitung von obergärigem Bier sind jedoch auch die Verwendung von anderem Malz (wobei unter Malz alles künstlich zum Keimen gebrachte Getreide verstanden wird) und die Verwendung von technisch reinem Rohr-, Rüben- oder Invertzucker sowie von Stärkezucker und aus Zucker der bezeichneten Art hergestellten Farbmitteln zulässig [2].

4.2 Einteilung und allgemeine Zusammensetzung von deutschem Bier

In Deutschland werden Biersorten nach ihrem Stammwürzegehalt unterschieden. Der Stammwürzegehalt bezeichnet den Anteil der aus dem Malz und Hopfen im Wasser gelösten, nicht flüchtigen Stoffe vor der Gärung. Tabelle 4-1 gibt einige Beispiele wieder.

Tabelle 4-1: Beispiele von Stammwürzegehältern verschiedener Biere [3]

Biersorte	Stammwürzegehalt
Starkbier	**≥ 16,0 %**
Doppelbock	18 %
Bockbier	16-17,9 %
Vollbier	**11,0-16,0 %**
Exportbier	12-13,5 %
Altbier	11,9 %
Kölsch	11,3 %
Pilsener	11,3-12,3 %
Weizenbier	11-13 %
Helles	11-13 %
Schankbier	**7,0-11,0 %**
Berliner Weiße	7-8 %
Einfachbier	**1,5-6,5 %**

Im Allgemeinen steht ein höherer Stammwürzegehalt für einen kräftigeren Geschmack und einer dunkleren Farbe des Bieres. Das Aromabild verändert sich in Richtung malzigere, kräftigere Noten und steht direkt im Zusammenhang mit dem endgültigen Alkoholgehalt sowie dem Nährwert des Endproduktes. In Deutschland erfolgt weiterhin die Besteuerung von Bier anhand der Unterscheidung des Stammwürzegehaltes.

Ein nach dem deutschen Reinheitsgebot gebrautes normales Vollbier hat die in Tabelle 4-2 dargestellte allgemeine Zusammensetzung. Die Werte unterliegen starken Schwankungen, je nach Sorte bzw. angewendeten Produktionsprozess.

Tabelle 4-2: Allgemeine Zusammensetzung eines Vollbieres bezogen auf 1 L [1, 2, 4, 5, 6, 7]

Zutat		Gehalt	
Wasser		**90–92 %**	
Alkohol		**0– > 10 %**	
Alkoholfreier Extrakt		**5–10 %**	
Kohlenhydrate		**80–85 %**	
Glukose		3500 mg	
Fruktose		2500 mg	
Saccharose		800 mg	
Maltose		35-45 g	
Maltotriose		10-15 g	
Dextrine		35-45 g	
Eiweiß		**6–9 %**	
Alanin	60-100 mg	Leucin	9-10 mg
Arginin	30-35 mg	Lysin	3-4 mg
Asparagin	20-25 mg	Methionin	1-2 mg
Asparaginsäure	2-5 mg	Phenylalanin	20-25 mg
Cystein	10-12 mg	Prolin	320-480 mg
Glutamin	1-4 mg	Serin	10-12 mg
Glutaminsäure	10-13 mg	Threonin	22-25 mg
Glycin	32-35 mg	Tryptophan	30-31 mg
Histidin	12-13 mg	Tyrosin	30-45 mg
Isoleucin	15-17 mg	Valin	30-35 mg
Glycerin		3–5 %	
Bitter-, Gerb- und Farbstoffe		2–3 %	
organische Säuren		0,7–1 %	
Mineralstoffe		**3–4 %**	
PO_4^{3-}	200-320 mg	SO_4^{2-}	170 mg
K^+	500-600 mg	$Cu^{+/2+}$	0,1-0,3 mg
Ca^{2+}	20-35 mg	Mn^{2+}	0,16 mg
Na^+	30-70 mg	Zn^+	0,06 mg
Mg^{2+}	80-100 mg	$Fe^{2+/3+}$	0,05-0,15 mg
SO_2		**1-5 mg**	
Nitrat		**25-33 mg**	
Phenolische Verbindungen		**150-160 mg**	
Anthocyanogene		**5–50 mg/L**	
Vitamine			
Niacin (B3)	7500 µg	Riboflavin (B2)	300-350 µg
Pantothensäure	1500-1600 µg	Thiamin (B1)	20-50 µg
Pyridoxin (B6)	600-750 µg	Biotin (H)	10-20 µg
Kohlensäure		**0,35–0,55 %**	

Der pH- Wert eines fertigen Bieres schwankt zwischen 4,35 und 4,6 [1].

5 Aufgabenstellung

Um zum fertigen Produkt Bier zu gelangen, werden mehrere Prozessstufen bei der Herstellung durchlaufen. An mehreren Stellen bzw. Zeitpunkten wird dabei thermisch prozessiert. Die unterschiedlichen Erhitzungsschritte im Verlauf des Bierbrauens und die Fülle an reduzierenden Kohlenhydrat- und Aminokomponenten in den zu verarbeitenden Zutaten begünstigen die chemischen Vorgänge der nichtenzymatischen Bräunung, bilden also eine ideale Grundlage für den Ablauf der Maillard-Reaktion.
Neben dem Prozess der Malzbereitung entstehen vor allem während des Würzekochens α-Dicarbonylverbindungen als wichtige reaktive Intermediate der Maillard-Reaktion. Im weiteren Verlauf bilden sich sowohl wichtige Aromastoffe wie Pyrrol-Derivate, Imidazole, Furane, Pyrane und Strecker-Aldehyde als auch Farbstoffe, die Melanoidine. Die Strecker-Aldehyde, die sowohl für positive Geschmackseindrücke als auch für verschiedene Fehlaromen im Bier verantwortlich gemacht werden können, leisten einen wichtigen Beitrag zur Akzeptanz eines Bieres beim Konsumenten.
Für ein besseres Verständnis der chemischen Abläufe der Maillard-Reaktion während des Brauens, für mögliche Einflussnahmen innerhalb des Prozesses und die Auswirkungen auf Lagerung bzw. Haltbarkeit sollen innerhalb dieser Arbeit drei molekulare Aspekte aus dem Brauprozess umrissen, nachmodelliert und analytisch betrachtet werden.
Ein Fokus soll dabei auf den antioxidativen Beitrag von α-Dicarbonylverbindungen mit Reduktonstruktur auf die Haltbarkeit von Bier liegen. Schon mehrfach untersucht sind die antioxidativen Einflüsse von phenolischen Verbindungen, Maillard-Endprodukten sowie von schwefelhaltigen Verbindungen wie Sulfit. Inwiefern Strukturen wie 1-Desoxy-2,3-hexosulose oder D-Arabino-2-hexosulose als Zwischenstufen eine Rolle spielen, ist umstritten.
Ausgehend vom eigentlichen Brauprozess soll im ersten Schritt die **Sudhausarbeit** untersucht werden. An verschiedenen Punkten der Herstellungsabfolge werden Proben im Hinblick auf die stofflichen Veränderungen bestimmter Verbindungen untersucht. Bestimmt werden sollen die Konzentrationen von ausgewählten α-Dicarbonylverbindungen sowie Ferulasäure als wichtigste polyphenolische Verbindung neben der *p*-Cumarsäure. Weiterhin sollen Aldehyde und Ketone (u.a. aus dem Strecker-Abbau) identifiziert und quantifiziert werden. Parallel sollen in Brauversuchen die antioxidativen Charakteristika der Proben bestimmt werden. Die Daten der antioxidativen Eigenschaften sollen die Interpretation der restlichen Werte und eine molekulare Betrachtungsweise unterstützen. Die Brauversuche werden in Kooperation mit dem Institut für Brauwesen durchgeführt.
Nach Durchführung der Sudhausarbeit sollen **Modellsysteme** erarbeitet, angepasst und mit den gemessenen Werten korreliert werden. Das Modell soll dabei aus einem komplexen Kohlenhydratgemisch, angelehnt an die vorhandenen Inhaltsstoffe zum Beginn des Kochens, bestehen. Die Reaktionsparameter werden ebenfalls wie bei der Kochung gewählt: 100 °C für mindestens eine Stunde.
Im Fall vergleichbarer und reproduzierbarer Ergebnisse, werden die Modelle in Hinblick einzelner Aminosäuren variiert und Auswirkungen betrachtet.

Die Erfassung von antioxidativen Parametern soll entsprechende Charakteristika und Eigenschaften bzw. deren Veränderung während der thermischen Prozessierung zeigen und mit den molekularstofflichen Veränderungen korrelieren.
Im Rahmen dieser Arbeit ist die Hefefermentation der in der Sudhausarbeit gewonnenen Proben und der Modelle nicht vorgesehen, so dass die direkten Auswirkungen der veränderten Parameter auf das fertige Bier nicht betrachtet werden. Deshalb soll eine Wertebasis fertiger Biere erarbeitet werden. Die Bestimmung der Konzentrationen von α-Dicarbonylverbindungen, Ferulasäure und Aldehyden verschiedener frischer und gealterter kommerzieller Biersorten verschaffen einen Überblick, in welchem Maße die bestimmten Analyten eine Rolle im fertigen Produkt Bier spielen.
Der letzte Teil dieser Arbeit betrachtet antioxidative Aspekte des Bieres. Ist eine Interaktion bestimmter antioxidativer Substanzen wie in der Literatur vorhergesagt möglich und führt dies eventuell zu noch potenteren Antioxidantien, welche den Brauprozess oder das fertige Produkt Bier in Hinblick auf die Haltbarkeit beeinflussen kann.

6 Theorie

6.1 Kurzer Abriss der Bierherstellung

Der Brauprozess gliedert sich in drei Schritte: der Malzbereitung, der Würzebereitung und der Gärung. Als Rohstoffe für untergärige Biere dienen nach dem Reinheitsgebot Malz, Hopfen, Hefe und Brauwasser (siehe 4.1). Ein schematischer Ablauf der untersuchten Würzebereitung findet sich unter Abbildung 8-1 Seite 42.

6.1.1 Rohstoffe

Gerste
Die Zusammensetzung der Gerste schwankt stark und ist von vielen Faktoren wie Bodenzusammensetzung, Niederschlagsmenge, usw. abhängig. Ein Gerstenkorn besteht im Allgemeinen zu 12–20 % aus Wasser und 80–88 % Trockensubstanz. Davon sind 58–66 % Kohlenhydrate (auf Trockensubstanz bezogen) in Form von Stärke als Amylose und Amylopectin vorhanden. Mit etwa 10–14 % sind andere, nichtstärkeartige Polysaccharide wie Cellulose, Hemicellulosen, Lignin und Gummistoffe zu finden. Diese haben insbesondere Stützfunktion und erhöhen die Festigkeit der Zellwände. Niedere Kohlenhydrate mit 1,5–3 % umfassen Saccharose, Raffinose, Maltose, Glukose und Fruktose. Der Eiweißgehalt bewegt sich um 8–11,5 % und umfasst Klebereiweiß, Reservestoffe und membrangebundene Eiweiße. Der Lipidgehalt von 2–3 % der Trockensubstanz, sind hauptsächlich Triglyceride. Diese befinden sich vor allem in der Aleuronschicht und dem Keimling des Gerstenkorns. [2, 3, 5, 7]
Gerste, welche für einen optimalen Brauprozess geeignet sein soll, besitzt eingeschränkte Eigenschaften. Sie hat einen hohen Stärkegehalt, liefert aus dem Malz reichlich Extrakt (vergärbaren Zucker) und besitzt ein gutes Quellvermögen. Eine sehr gute Keimfähigkeit von mindestens 95 % der Körner fördert den enzymatischen Abbau der Reservestoffe der Gerste und ergibt eine gute Extraktausbeute. Der Wassergehalt sollte zwischen 12–14 % liegen und 15 % nicht überschreiten. Dies ist vor allem für die Lagerung zur Überwindung der Keimruhe wichtig und um Verluste durch Stoffumsatz oder Befall durch Schadorganismen zu vermeiden. Ein mäßiger Eiweißgehalt von 9–10 % sorgt für eine gute Vermälzbarkeit, fördert die Schaumstabilität und beugt Trubbildungen vor. [*ibd.*]
Andere stärke- und zuckerhaltige Rohstoffe
Für obergärige Biere werden Mischungen von Weizenmalz und Gerstenmalz im Verhältnis 40:60 verwendet. Des Weiteren sind als Rohfrucht bezeichnete Beimischungen üblich, welche nach Stärkeaufschluss durch Kochen dem Maischprozess zugeführt werden. Dabei handelt es sich um unvermälztes Getreide, wie Weizen, Mais oder Bruchreis, die in Form von Schrot, Grieß und Mehl in Anteilen von 15–50 % eingemaischt werden können. Die Verwendung von Rohfrucht kann allerdings zu Störungen führen. Daher kann man aus Gerste, Weizen oder Mais durch enzymatische Hydrolyse oder Säurehydrolyse Extrakte in Form von Sirup oder Pulver gewinnen, die anstelle der Rohfrucht zum Einsatz kommen. [7]

Hopfen
Der Hopfen stellt durch enthaltene Aromaöle eine Aromakomponente dar und verleiht dem Bier durch seine Bitterstoffe den charakteristischen bitteren Geschmack. Außerdem wirkt er als Klärmittel und bewirkt durch enthaltene Gerbstoffe eine verbesserte Fällung der Eiweiße. Der Pektingehalt des eingesetzten Hopfens unterstützt die Schaumbildung. Die enthaltenden Bittersäuren und Hopfenharze wirken bakteriostatisch und fungieren als natürliches Konservierungsmittel. Je nach Bierart werden unterschiedliche Mengen Hopfen eingesetzt. [3, 7]
Brauwasser
Die Zusammensetzung des verwendeten Wassers hat großen Einfluss auf die Qualität und den Geschmack des Bieres. So bewirken Salze vor allem eine Veränderung des pH-Wertes von Maische und Würze. Zu hohe Gehalte an Magnesiumsulfat machen das Bier unangenehm bitter, während Mangan- und Eisensalze in hohen Konzentrationen zu Trübungen, Verfärbungen und Geschmacksverschlechterungen führen. Negativen Einfluss auf die Gärung haben zu hohe Mengen an Nitrat. Nitrat wird während der Gärung zu Nitrit umgewandelt, welches für die Hefen toxisch ist. Daher findet in jeder Brauerei speziell aufbereitetes Wasser Anwendung. [7]
Hefe
Eigenschaften des Bieres wie Farbe oder Aroma werden durch den eingesetzten Hefestamm sowie deren Vitalität beeinflusst. Die Geschwindigkeit und Stärke der Vergärung führt zu unterschiedlichen Mengen an erwünschten und unerwünschten Gärungsprodukten. Zur Bierherstellung werden ausschließlich *Saccharomyces*-Arten aus Reinzucht verwendet.

6.1.2 Der Brauprozess

6.1.2.1 Malzbereitung

Nach der Reinigung der geernteten Gerste zum Beispiel in einem Aspirateur, erfolgt zunächst die Einhaltung einer Keimruhe bei einem Wassergehalt des Korns von 12–14 % und maximal 15 °C in Silos. Die Keimruhe als Schutz gegen das Auskeimen bei ungünstigen Witterungsbedingungen, dauert in Abhängigkeit der Erntebedingungen einige Wochen bis Monate. Die im Anschluss künstlich herbeigeführte Keimung des Getreides wird als Mälzen verstanden und erfolgt in einer speziell vorgesehenen Mälzerei. Diese gliedert sich in drei Prozessstufen: das Weichen, die Keimung und das Darren. Das Weichen führt dem trockenen Gerstenkorn Wasser zu, um die Keimruhe zu verlassen. Die Keimung beginnt ab einem Wassergehalt von 30 % und führt zur Ausbildung von Enzymen, die dem Abbau von Reservestoffen (Stärke) dienen und somit für die Lebensprozesse und für die Entwicklung des Keims förderlich sind. Die damit einhergehende Auflösung des Korns ist für den Brauprozess unerlässlich. Der Abbau der nicht vergärbaren Reservestoffe, führt zu wasserlöslichen, für Hefen verwertbare Substrate. Zu geringe oder übermäßige Enzymbildung oder Enzymwirkung ist unerwünscht, da sich dadurch die Eigenschaften des Keimproduktes verschlechtern. Das Ende des Keimens wird durch das Schwelken bzw. Darren des gewonnenen Grünmalzes eingeleitet, bei dem das gekeimte Korn durch starken Wasserentzug in einen lagerfesten Zustand überführt wird. Gleichzeitig fördern die Temperaturen des Darrens die Bildung von Röstaromen. [7]

Weichen
Die Mälzerei beginnt mit dem Ankeimen, also der Zuführung des zum Keimen notwendigen Wassers. Dafür stehen viele verschiedene Verfahren zur Verfügung. Heute findet häufig ein Nass-Trocken-Verfahren Anwendung, bei dem periodisch Weichwasser zu- und abgeführt wird. Die Keimung beginnt bei einem Wassergehalt von ca. 30 %, wobei für eine optimale Entwicklung der Enzyme zur Auflösung des Mehlkörpers bis 48 %, teilweise sogar noch mehr, Gutsfeuchte nötig sind. Die Dauer ist von der Temperatur abhängig; je höher diese liegt, desto schneller erfolgt die Wasseraufnahme. Übliche Weichtemperaturen liegen zwischen 12 und 24 °C. [*ibd.*]
Keimen
Zur richtigen Entwicklung der Enzyme und der gewünschten Auflösung der Mehlkörper ist jedoch ein Wassergehalt von 44–48 %, teilweise auch darüber erforderlich, der zweckmäßig erst beim Keimen eingestellt wird. Bei meist 14–18 °C wird das Korn zum Keimen belassen. Die Dauer des Keimens ist verschieden und kann je nach Verfahren Stunden bis Tage betragen. Um die Keimung nicht zu stören oder zu stoppen, muss durch Atmung entstehende Wärme und Kohlenstoffdioxid entfernt und Sauerstoff zugeführt werden. Das Endprodukt des Keimens wird als Grünmalz bezeichnet. [*ibd.*]
Darren
Beim Darren wird dem leicht verderblichen Grünmalz durch Trocknen Wasser entzogen, um es in das lagerfähige so genannte Darrmalz zu überführen. Durch den Wasserentzug wird die Keimung beendet und es erfolgt die Bildung von Aroma- und Farbstoffen durch die Maillard-Reaktion. Unterschieden wird helles Darrmalz, welches auf einen Wassergehalt von 4,5 % getrocknet wird und dunkles Darrmalz mit einem Wassergehalt von 2,5 %. Helles Malz muss schnell getrocknet werden, um die einsetzende Maillard-Reaktion zu minimieren. Beim so genannten Schwelken wird bei 50–65 °C auf einen Wassergehalt von ca. 10 % verringert. Für die Endtrocknung auf den genannten Wassergehalt kommen Temperaturen zwischen 82 und 85 °C zum Einsatz. Der Vorgang des Schwelkens beim dunklen Malz ist deutlich verlangsamt, demzufolge können Enzyme länger wirken und die Maillard-Reaktion verstärkt ablaufen. Die schnelle Endtrocknung bei 100–105 °C führt zur Bildung intensiver Farb- und Aromastoffe. Spezialmalze, wie zum Beispiel das Caramalz für besonders malzige Biere, werden bei 60–80 °C zunächst „verzuckert“, um anschließend bei 150–180 °C geröstet zu werden. Es bilden sich dabei typische Caramelsubstanzen, die den besonderen Geschmack ausmachen. Die Einsatzmenge dieser Zusatzmalze liegt bei bis zu 10 %. [*ibd.*]

6.1.2.2 Würzebereitung

Die Bereitung der Würze erfolgt im so genannten Sudhaus und wird auch Sudhausarbeit genannt. Sie lässt sich in vier Stufen untergliedern: Schroten, Maischen, Läutern und Kochen.

Schroten
Hierbei handelt es sich um den rein mechanischen Vorgang mit Walzenmühlen zur Zerkleinerung des Malzes. Es entstehen Spelzen, Grieß und Mehl. Das Schroten ist von entscheidender Wichtigkeit für den Fortgang des Bierbrauens bis hin zur Bierqualität. Während die Spelzen möglichst nicht zerstört werden sollen, müssen die Mehlkörper gut zerkleinert werden, um genügend Extrakt zu liefern. [7]

Maischen

Beim Maischen werden die zerkleinerten Malzbestandteile in Brauwasser gelöst. Die dabei entstehende Lösung nennt man Würze und die Summe aller gelösten Bestandteile Extrakt. Die hochmolekularen Malzbestandteile müssen erst durch malzeigene Enzyme zu niedermolekularen wasserlöslichen Verbindungen abgebaut werden. Verschiedene Enzyme wirken bei dem Abbau von Stärke wie α- und β-Amylase und Grenzdextrinase. Die entstehenden Bruchstücke wie Maltose (aus β-Amylase) oder Oligodextrine (aus α-Amylase) werden dann mit Enzymen wie Maltase und Saccharase weiter abgebaut. Ebenfalls wirken proteolytische Enzyme wie Endo- und Exopeptidasen in der Maische. Die verschiedenen Enzyme wirken bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen optimal. In Tabelle 6-1 sind Beispiele wirkender Enzyme aufgelistet. Es entstehen vor allem Maltose, Maltotriose, Grenzdextrine, D-Glukose, D-Fruktose und Saccharose.

Die im Gerstenkorn eingelagerte **Stärke** besteht aus D-Glukose in Form von Amylose ((1→4)-α-glykosidische Bindungen) und Amylopektin ((1→4)- und (1→6)-α-glykosidische Bindungen). Die Gerstenkorn eigenen und während der Keimung gebildeten Enzyme überführen die Stärke während der Keimung und des Maischens in 40–45 % Maltose, 11–13 % Maltotriose, 5–7 % D-Glukose, 6–12 % niedere Dextrine (G4–G9), 19–24 % höhere Dextrine, 1–3,5 % D-Fruktose, 2–6 % Saccharose sowie α-Grenzdextrine. [3, 7]

Als **Eiweiß**bestandteile sind im Gerstenkorn insbesondere lösliche Albumine und Globuline im stärkehaltigen Endosperm, sowie die wasserunlöslichen Prolamine und Gluteline als Reserve-Eiweißstoffe zu finden. Während des Maischprozesses werden die löslichen und unlöslichen Eiweiße enzymatisch abgebaut. Die unlöslichen Prolamine und Gluteline gehen dabei teilweise in lösliche Proteine über. Problematisch sind zu hohe Eiweißgehalte. Während des Würzekochens stattfindende Oxidationsprozesse führen zur Quervernetzung von Proteinen durch Disulfidbrücken, die sich als so genannter „Teig“ auf die Treberschicht absetzen und das Läutern erschweren. Die Bedeutung eines guten Eiweißabbaus liegt in der Schaumhaltigkeit, der Vollmundigkeit und dem Kohlensäurebindungsvermögen des späteren Bieres sowie der richtigen Versorgung der Hefen mit Aminosäuren. [*ibd.*]

Tabelle 6-1: Wirksame Malzenzyme während des Maischens [7]

Enzym	Substrat	Produkt	Temp.[°C]	pH-Optimum	Inaktivierung [°C]
α-Amylase	Amylose/ (1→4)-α Bindungen	Oligosaccharide (G6-G7), α-Grenzdextrine (Maltose, D-Glukose)	72–75	5,6–5,8	> 80
β-Amylase	Amylose und Amylopektin/ (1→4)-α Bindungen	Maltose, β-Grenzdextrine	60–65	5,4–5,6	> 70
Maltase	Maltose	D-Glukose	35-40	6	> 45
Grenz-dextrinase	Amylopektin, Grenzdextrine/ (1→6)-α Bindungen	Oligosaccharide, Maltose	55-60	5,1	> 65
Endo-peptidasen	Proteine	Makro-, Polypeptide (später Oligo-, Dipeptide)	50	5,0	80
Exo-peptidasen	Proteine	Aminosäuren	40–45	7,2	80

Angestrebt wird die verschiedenen Temperaturoptima der Enzyme bis zum Erreichen der Abmaischtemperatur von 74–78 °C zu durchlaufen. Dafür stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, wobei man in zwei Hauptgruppen unterteilen kann. Beim **Dekoktionsverfahren** wird die Temperatur erhöht, indem Teilmengen der Maische abgezogen und gekocht und anschließend wieder mit der verbliebenen Maische vermischt werden. Durch das Kochen werden die Stärkekörner zusätzlich zerstört und somit besser zugänglich gemacht.
Infusionsverfahren, bei denen der Abbau der Stärke und Eiweiße durch die malzeigenen Enzyme stattfindet, verzichten auf das partielle Kochen der Maische und führen die Temperaturerhöhung durch direkte Befeuerung der Pfanne oder durch Zugabe von kochendem Wasser zur Maische in isolierten Gefäßen herbei.

Der Ablauf des Maischprozesses unterscheidet sich je nach gewünschter Biersorte. Gängige Verfahren sind das Dreimaischverfahren, das Zweimaischverfahren, das Einmaischverfahren, das Hochkurzmaischverfahren, das Springmaischverfahren und andere. Alle Verfahren werden je nach Anforderung angepasst und erfordern entsprechend große Erfahrung bei den Prozessschritten. Das für diese Arbeit abgewandelte Hochkurzmaischverfahren der Lehranstalt für Brauerei ist in Abbildung 8-1 Seite 42 dargestellt. Während zweier Brauansätze wurden an verschiedenen Punkten Proben entnommen und untersucht. Bei 62 °C wurde eingemaischt, wobei während der 10-minütigen Haltephase eine rasche Deaktivierung der Proteasen zu einem um 5–7 % verringerten niedermolekularen Gesamtstickstoffgehalt führt. Der Anteil hochmolekularer Stickstoffverbindungen, ist somit gegenüber Maischverfahren mit niedrigeren Einmaischtemperaturen erhöht. Die anschließende 30-minütige Rast bei 66 °C fördert die β-Amylase, welche bei der anschließenden 20-minütigen Rast bei 72 °C inaktiviert wird. Hier wirkt dann im Optimum die α-Amylase. Insgesamt erfolgt ein kräftiger Stärkeabbau und folglich der Anstieg des Zucker- bzw. des Extraktgehalts der Maische. Das anschließende Abmaischen erfolgt bei 78 °C. Dabei werden die Enzyme inaktiviert und der Stärkeabbau beendet bzw. sollte vollständig sein. [*ibd.*]

Läutern
Zur Gewinnung der Würze muss die erhaltene Maische von wasserunlöslichen Rückständen, den Trebern, getrennt werden. Dieser Vorgang wird Läutern genannt, wobei der im Maischprozess gewonnene heiße Sud in einen so genannten Läuterbottich umgefüllt wird. Die nach unten sinkenden Malzreste bilden den Malz- oder auch Treberkuchen, durch welchen der Sud gefiltert und die Vorderwürze gewonnen wird. Es folgt das Anschwänzen, bei der die Treber zum vollständigen Herauslösen der Extraktstoffe mit heißem Wasser übergossen werden. Die Häufigkeit des Anschwänzen bestimmt den anfänglichen Extraktgehalt, also die Konzentration der Stärkeabbauprodukte und des Malzzuckers der Würze bei Beginn des Kochens. Die in der Pfanne vereinte Vorder- und Nachwürze wird als Pfannevollwürze bezeichnet und im Anschluss gekocht.

Hopfen und Kochen der Würze
Beim Kochen der Würze kommt es zu einer Vielzahl an Veränderungen. Durch das verdampfende Wasser wird die durch das Läutern stark verdünnte Würze wieder aufkonzentriert. Der angestrebte Extraktgehalt der erhaltenen Ausschlagwürze ist abhängig vom gewünschten Biertyp.

Von großer Bedeutung für Geschmack und Stabilität des Bieres ist die Ausscheidung von Eiweißen, die später koagulieren und den so genannten Bruch der Würze bilden (Heißtrub). Die Bestandteile des Hopfens gehen in Lösung und die Bittersäuren werden in die Isoverbindungen umgewandelt. Der pH-Wert nimmt geringfügig ab und die Farbe nimmt zu. Die Kochzeit beträgt 70–120 min. Die Zugabe von Hopfen ist für das Aroma und den bitteren Geschmack des Bieres unerlässlich. Je nach zu produzierender Biersorte und gewünschter Bierbittere werden Mengen zwischen 130 und 450 g/hl Bier zugegeben. Die zuzuführende Menge richtet sich aber nach den im Hopfen enthaltenen Bitterstoffen. Weiterhin wirkt der Hopfen als Klärmittel unerwünschter Eiweiße und trägt zur Haltbarkeit des Bieres bei. Der Zeitpunkt der Hopfenzugabe ist unterschiedlich, meist aber relativ zu Beginn der Kochung. Nach der Kochung wird die Würze im Whirlpool geklärt. Durch das Wirken verschiedener Kräfte (Zentrifugal- und Zentripetalkräfte) setzen sich unlösliche Hopfenbestandteile sowie ausgefallene Eiweiße ab und werden von der Anstellwürze abgetrennt. Diese wird dann mit steriler Luft zur Sauerstoffsättigung durchströmt und anschließend in den Gärbottich überführt.

6.1.2.3 Gärung

Die Anstellwürze wird jetzt der Gärung unterworfen. Die enthaltenen vergärbaren Zucker werden in Alkohol, Kohlendioxid und einige andere Gärungsnebenprodukte umgesetzt. Bei einem Extraktgehalt von ca. 12 % entsteht ca. 4 % Alkohol. Allgemein unterscheidet man zwei Gärungsarten, die in der folgenden Tabelle 6-2 gegenüber gestellt sind.

Tabelle 6-2: Vergleich Ober- und Untergärung bei der Bierherstellung [1, 3]

	Obergärung	Untergärung
Hefeart	*Saccharomyces cerevisiae*	*Saccharomyces carlsbergensis*
Gärtemperatur	15–20 °C	5–10 °C
Gärdauer	2–7 Tage	6–10 Tage
Gärvorgang	intensive Hauptgärung, Hefe bildet Sprossverbände und steigt nach oben, Raffinose wird nur zu ca. einem Drittel vergoren	verhaltene Hauptgärung, Hefe kann keine Sprossverbände bilden und setzt sich ab, auch Raffinose wird vollständig vergoren
Nachgärung	je nach Biersorte, meist kurz	je nach Biersorte bis zu 16 Wochen bei -2–3 °C
Beispiele	Kölsch, Weißbier, Alt	Pils, Exportbier

Die Gärung ist ebenfalls stark am charakteristischen Biergeschmack sowie der Haltbarkeit beteiligt. Das entstandene Jungbier wird zur Nachreife für 2–12 Wochen in Lagertanks gepumpt. Nach Filtration des Bieres wird es in Lagertanks gepumpt oder direkt in Fässer, Flaschen oder Dosen abgefüllt [1].

Der gesamte Brauprozess lässt sehr viele Möglichkeiten zu, Einfluss auf die chemischen Vorgänge während des Verlaufs zu nehmen. Dementsprechend groß sind die Bemühungen der Brauindustrie und -forschung sinnvolle Beiträge für die Produktoptimierung zu erlangen. Die Schritte der Prozessführung erlauben es sehr einfach definierte Abschnitte zu setzen, die untersucht werden können. Mit Fokus auf die Maillard-Reaktion ist für diese Arbeit insbesondere die Sudhausarbeit interessant. Die Zusammensetzung der Proben ist sehr definiert sowie unter ständiger analytischer Kontrolle, um eine konstante Qualität zu gewährleisten. Die angewendeten Techniken sind ausgereift und der Erfahrungsschatz, wenn auch teilweise empirisch, ist sehr groß.

6.2 Wichtige Inhaltsstoffe in Würze und Bier

Neben Kohlenhydraten und Eiweißen bzw. Enzymen, welche als Majorkomponenten während des Brauprozesses die größte Rolle spielen, gibt es zusätzliche Inhaltsstoffe, die wichtige Eigenschaften und Einfluss auf das Endprodukt besitzen. Sie werden einerseits durch die Rohstoffe eingebracht und andererseits innerhalb des Brauprozesses generiert.

6.2.1 Verbindungsklassen mit antioxidativer Wirkung

Allgemein werden Antioxidantien definiert als Substanzen, die verglichen mit dem zu oxidierenden Substrat in einer niedrigeren Konzentration vorhanden sind und die Oxidation dieses Substrats signifikant verzögern oder verhindern [69].
Mit diesen Eigenschaften ist die Klasse von Verbindungen maßgeblich verantwortlich für die Haltbarkeit bzw. die Verhinderung des chemischen Verderbs eines Lebensmittels. Vielfach werden die gesundheitlichen Aspekte stark hervorgehoben, die die Antioxidantien für den Menschen direkt bewirken sollen. Die Mechanismen, die hinter dem komplexen Gebiet stecken, sind vielfältig und unübersichtlich. Sie komplexieren u. a. Metallionen und brechen radikalische Kettenreaktionen ab, wobei das entstehende Radikal träge bzw. stabil sein muss. Die Verbindungen, die diese Eigenschaften besitzen, sind praktisch in jeder Stoffklasse zu finden. Jedes Lebensmittel besitzt seine eigenen Antioxidantien bzw. Gruppen an Verbindungen, die typisch für den entsprechenden Charakter sind.
Für das Bier sind vor allem drei große Substanzgruppen an Antioxidantien wichtig: Schwefelverbindungen (v.a. Sulfite), polyphenolische Verbindungen einschließlich der Bittersäuren des Hopfen und Kohlenhydrate bzw. eigentlich wichtiger die Abbauprodukte aus diesen während der gesamten Prozessierung. Die genannten Verbindungsklassen stammen sowohl aus den Rohstoffen als auch dem Prozess des Brauens selbst.

Sulfit
Sulfit ist für das Bier die bedeutendste antioxidativ wirksame Verbindung. Es fördert die Aromastabilität und wurde auch schon zur Stabilisierung der Bierqualität eingesetzt [8]. Sulfit wird während der Fermentation durch den Hefemetabolismus als Zwischenprodukt der Reduktion von Sulfat zu Sulfid gebildet. Letzteres wird von der Hefe für die Synthese von schwefelhaltigen Aminosäuren benötig [9]. Endgehalte von 120–140 µM SO_2 führen zu den stabilsten Lagerbierprodukten, wobei normale Bierhefen Gehalte von etwa 30–100 µM erreichen [10]. Höhere Sulfitgehalte werden von speziellen Hefe- oder gestressten Hefestämmen sowie kräftigeren bzw. dunkleren Würzen erreicht. Niedrigere Werte sind durch die Hefen mit guter Nährstoffversorgung, hohe Lipidgehalte, gute Belüftung sowie vitalen Stämmen zu erreichen [7]. Trotz möglicher Einflussnahme streuen die Endgehalte in den fertigen Bieren recht stark Eine vom CVUA Karlsruhe 2005 durchgeführte Untersuchung von Bieren auf Sulfit ergab ein Wertespektrum, wie es in der nachfolgenden Tabelle 6-3 dargestellt ist.

Tabelle 6-3: Sulfitgehalte verschiedener Biersorten in µM SO_2

	Stammwürze [%]	n	min.	max.	Mittelwert
Bier (gesamt)	-	156	n.n.	253	66
Schankbier	7–8	3	n.n.	44	16
Vollbier	11–14	120	n.n.	253	64
Starkbier	>16	17	16	208	98
Mischgetränk	-	16	6	93	50

Eine Unterscheidung ist in Tabelle 6-3 anhand des Stammwürzegehaltes möglich, das heißt ein klarer Trend zwischen den Stammwürzegehalten und den Mittelwerten der Sulfitgehalte ist ersichtlich. Je höher der Stammwürzegehalt, desto höher der Sulfitgehalt.
Somit spielen die Fermentationsbedingungen eine sehr wichtige Rolle für die Lagerstabilität von Bier und besitzen den größten Einfluss auf die Menge an Sulfiten in Bier.

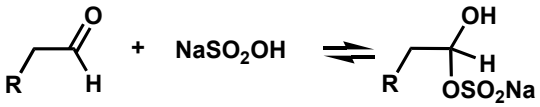


Abbildung 6-1: Bildung von Aldehyd-Bisulfitaddukten.

Für die antioxidative Wirkung von Sulfit werden zwei Hauptmechanismen beschrieben. Einerseits verhindert Sulfit als Antioxidans während der Lagerung die Oxidation von Alkoholen, indem es Sauerstoff bindet. Kaneda *et al.* zeigten 1991 in diesem Zusammenhang die inaktivierende Wirkung von Sulfit auf aktiven Sauerstoff [11]. Weiterhin maskiert Sulfit aromarelevante Aldehyde. Wie in Abbildung 6-1 dargestellt, ist es in der Lage mit Carbonylkomponenten, insbesondere mit Acetaldhyd, zu stabilen Addukten zu reagieren. Das Gleichgewicht ist schnell erreicht, auch wenn kein Überschuss an Sulfit vorliegt [12]. Andere Aldehyde als Acetaldehyd reagieren ebenfalls, jedoch scheint die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Komplexität des Aldehydmoleküls abzunehmen.
Die Bildung von Aldehyd-Bisulfitaddukten kann Aldehyde mit negativen Geruchs- oder Geschmackseindrücken, die „*stale-flavor*“ Komponenten, maskieren, was aber auch zum Problem werden kann.
Der aromarelevante Aldehyd *trans*-2-Nonenal (Geruchsschwellenwert 0,78 nM) wird als Oxidationsprodukt beim Abbau von Fetten durch Lipoxygenasen in Malz und Maische gebildet. In der Literatur wird die Reaktion des Aldehyds mit Sulfit beschrieben [13, 14]. Die gebildeten Addukte sind leichter im jungen Bier löslich und bestehen bis zum fertigen Produkt. Dort sind sie dann für das so genannte „*flavor-staling*“ durch Freigabe von *trans*-2-Nonenal mitverantwortlich. Das Nonenal-Level im Bier liegt etwa bei 1–3 nM, welches während der Lagerung steigt und den “*cardboard*“ Flavor bildet. Die Untersuchung kommerzieller japanischer Biere von Kaneda *et al.* 1996 zeigte jedoch nur das Vorhandensein von Acetaldehyd-Bisulfit und Spuren von freiem Sulfit (11–54 bzw. 1–18 µM) [15]. Weitere Aldehyd-Bisulfit-Addukte (auch Formaldehyd- bzw. Propionaldehyd-Bisulfit) wurden nicht gefunden. Für einen Einfluss des *trans*-2-Nonenalgehaltes im Bier müssten mindestens Gehalte von 1–3 nM Bisulfitaddukt zu finden sein, was aber nicht der Fall war. Kaneda *et al.* geben die Nachweisgrenze ihrer Methode mit kleiner 0,5 nM an. Damit scheint

zumindest die Abgabe von „schweren“ *off-flavor* Aldehyden aus Bisulfitaddukten nicht gegeben zu sein [11, 15].
Das Oxidationspotential von Sulfit liegt bei +0,93 V. Bisulfitaddukte mit Formaldehyd oder Acetaldehyd besitzen dahingegen ein geringeres Oxidationspotential. Es ist anzunehmen, dass sie die reduzierende Aktivität gegen verschiedene oxidierende Reagenzien verlieren [106]. Chapon *et al.* postulierten 1981, dass Sulfit durch die Adduktbildung seine stabilisierenden Eigenschaften verliert [16]. Laut Kaneda *et al.* verlieren die Addukte jedoch nicht die Fähigkeit, freie Radikale abzufangen [15]. Dies betrifft sowohl Sauerstoffradikale als auch andere während der Lagerung gebildete Radikale. Daher scheint mehr der antioxidative Charakter von Sulfit die Haltbarkeit von Bier positiv zu beeinflussen als der maskierende Effekt. Der Ursprung der unerwünschten Aldehyde, die für das „*flavor-staling*“ verantwortlich sind, scheint vielmehr durch Reaktionen während der Würzekochung gebildeter Alkohole mit oxidierenden Agenzien als durch Umsatz mit Hefen während der Fermentation und Lagerung sowie durch Oxidation von Fettsäuren der Gerste begründet zu sein.

Phenolische Verbindungen
Die zu den sekundären Pflanzeninhaltstoffen gehörenden phenolischen Verbindungen besitzen einige wichtige Funktionen im Bier wie Farbbildung, Aroma und antioxidative Aktivität. Unter dem Begriff Polyphenole sind viele Pflanzeninhaltsstoffe zusammengefasst, wie die Flavonoide (Flavanole, Flavonole, Anthocyane, u.a.), Benzoesäurederivate, Zimtsäurederivate und Stilbenderivate. Anthocyanogene (Proanthocyanidine) oxidieren durch Sauerstoff zu Anthocyanidinen und führen im Bier zu einem Rotstich [39]. Allerdings können sie auch mit Proteinen zu unlöslichen Komplexen polymerisieren. Wichtige flüchtige aromaaktive Verbindungen im Weizenbier sind die Phenole 4-Vinylguajacol und 4-Vinylphenol. Sie sind Decarboxylierungsprodukte der Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure) und *p*-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure) [17]. In Gerste können etwa 2–3 µmol Ferulasäure pro Gramm Trockengewicht gefunden werden, in fertigem Bier pendeln die Werte um ca. 20 µM [38]. Zwischen den Gersten-Malzen und der entsprechenden Würze besteht eine große Varianz der Bildung von freien und estergebundenen Hydroxyzimtsäuren. Ebenso innerhalb identischer Malz-Varietäten existieren Unterschiede von einzelnen Malz-Häusern.
Die antioxidativen Eigenschaften der genannten phenolischen Verbindungen sind durch die gute Delokalisierung und damit Stabilisierung der abgefangenen Radikale innerhalb der Struktur begründet (siehe Abbildung 6-13).
Phenolische Verbindungen und Polyphenole sind mit Polysacchariden in der Pflanzenzellwand assoziiert und liegen im Getreidekorn hauptsächlich verestert an Arabinoxylanen vor. Arabinoxylane, oder auch Pentosane, sind Hemicellulosen bestehend aus einer Hauptkette aus D-Xylose, die über (3→1)- und (2→1)-α-glycosidischen Bindungen mit einzelnen L(+)-Arabinosyl-Einheiten verknüpft sind. Sie stellen 60–70 % der Nicht-Stärke-Polysaccharide in Weizen sowie Roggen und 25–40 % in Gerste, die sich aber in den Randschichten des Korns konzentrieren. Etwa 55–70 % der Arabinoxylane sind über niedermolekulare phenolische Verbindungen (Diferulasäure) miteinander verbunden und lösen sich nur in alkalischen Lösungsmitteln [18]. Bei zu hohen Konzentrationen von phenolischen Verbindungen können geschmackliche Probleme beim fertigen Bier entstehen. Der aus den Phenolen entstehende „*phenolic off-flavor*“ (POF) wird als stark medizinisch, nelkenartig, würzig oder auch pflasterartig beschrieben. Er entsteht vor allem durch Kontaminationen mit

wilden Hefestämmen. Es gibt aber auch Biersorten, bei dem dieser Aromaeindruck erwünscht ist. Das trifft vor allem auf Biere zu, die mit britischen Hefestämmen gebraut wurden oder hohe Anteile an Weizen aufweisen, wie dem deutschen Hefeweizen.

Kohlenhydrate

Die meisten bekannten Antioxidantien im Lebensmittel sind wasserunlöslich. Ausnahmen sind Ascorbinsäure, Polyphenole und Sulfite. Wasserlösliche Antioxidantien werden mit dem Urin ausgeschieden, nachdem sie Sauerstoffradikale von wasserunlöslichen Antioxidantien wie den Tocopherolderivaten abgefangen haben [19]. Wasserlösliche Antioxidantien als Gegenstück zu den wasserunlöslichen spielen eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus dem Körper.

Reduzierenden Verbindungen, wie die aus Kohlenhydraten hervorgehenden Reduktone, werden einen großen Nutzen aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit und der geringen Toxizität vorausgesagt und sind stark beforschte Strukturen. Das bekannteste und immer noch beste Beispiel für die Struktur und Wirkungsweise von Reduktonen ist die Ascorbinsäure. Die Endiol-Struktur neben einer Carbonylstruktur ist für den starken antioxidativen Charakter verantwortlich (Abbildung 6-2).

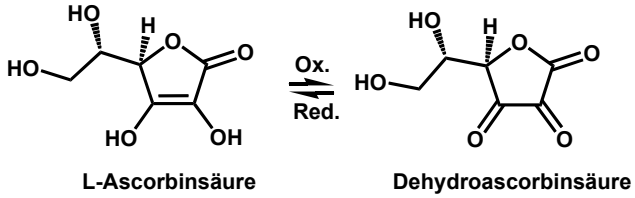


Abbildung 6-2: Struktur von L-Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure.

Die Endiol-Struktur wird leicht unter Elektronenabgabe zur Dehydroascorbinsäure oxidiert. Durch diese Eigenschaft ist die radikalabfangende Fähigkeit stark ausgeprägt. Das Beispiel Ascorbinsäure ist äußerst gut untersucht und wird auch für die Haltbarmachung von Lebensmitteln eingesetzt. Für andere Verbindungen, die eine Endiol-Struktur besitzen, wie zum Beispiel bei 1-Desoxyhexosulose (1-DH), konnte gezeigt werden, dass diese ähnliche reduzierende Eigenschaften besitzen [20, 21]. Diese für die vorliegende Arbeit wichtige Verbindung, ist durch seine Struktur in der Lage Radikale abzufangen, wobei das Endiol dabei oxidiert wird (Abbildung 6-3). Durch verschiedene Prozesse kann es wieder in die Endiol-Struktur zurückreagieren. Die Fragestellung dabei ist, ob ein antioxidativer Charakter oder im Gegenteil ein prooxidativer Charakter in Verbindung mit Metallionen wie Fe^{2+}/Fe^{3+} zu beobachten ist. Die genauen Reaktionsabläufe bezüglich der Kohlenhydrate werden in Abschnitt 6.3 betrachtet.

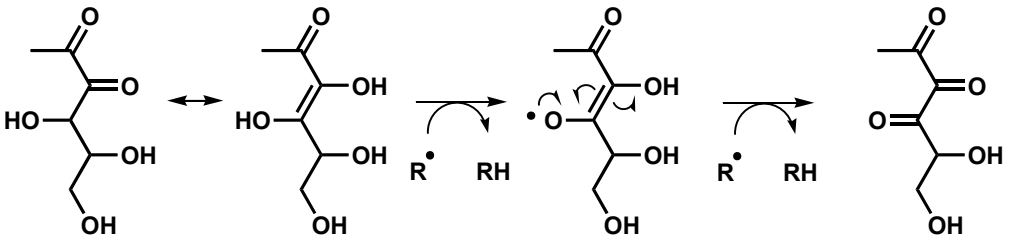


Abbildung 6-3: Abfangmechanismus von Radikalen durch 1-Desoxyhexosulose [19, 20].

Zusammenfassend sei erwähnt, dass Sulfit als wichtiges Antioxidans erst ab dem Gärprozess eine größere Rolle spielt. Im Malz und in der Würze bzw. der Sudhausarbeit sind Kohlenhydrate und phenolische Verbindungen mehr von Bedeutung. Durch das Gerstenkorn, als Ausgangsrohstoff in den Prozess gebracht, wird die Menge der phenolischen Komponenten durch Fällungen und Filtrationen am stärksten beeinflusst. Die Kohlenhydratkomponenten sind ab dem Maischen von Bedeutung und erfahren durch den gesamten Erhitzungsprozess tiefgreifende chemische Veränderungen. Makromoleküle werden zu reaktiven Zwischenstrukturen umgesetzt. Inwiefern sich beide Substanzklassen dabei chemisch beeinflussen, wird beforscht.

6.2.2 Zusammensetzung von Bieren im Speziellen - Metalle

Der Hauptgehalt von Metallionen wie Eisen, Kupfer, Cobalt, Nickel und Zink sind im Schaum und der Trübung von Bier konzentriert. Die enthaltenen Werte der Schwermetalle sind in den Trübungen um den Faktor 1–80 000 höher konzentriert, als im verbleibendem Bier; Kupferionen sind dabei ca. 60-mal höher konzentriert als Eisenionen. Es ist bekannt, dass Schwermetallionen Komplexe mit Amino-, Carboxyl-, Sulfhydryl- und phenolischen Hydroxylgruppen in Bier bilden, was zu den Trübungen führt.
Die Metallgehalte von Lagerbier liegen bei ca. 100 µg/L (Beispiel Sapporo Lagerbier; Summe Fe^{2+} und Fe^{3+}) und 30 µg/L Kupfer (Summe Cu^{+} und Cu^{2+}) [22].
Die Bedeutung von Metallionen auf die Lagerstabilität von Bier, ist seit den Untersuchungen von Fenton 1894 bezüglich der katalytischen prooxidativen Mechanismen von Eisen bekannt. Bei der nach Fenton benannten Reaktion, bildet das zweiwertige Ion von Eisen mit Wasserstoffperoxid unter Oxidation Hydroxylradikale, welche mit den stärksten oxidativen Charakter unter den Radikalen besitzen [23].
Das entstandene dreiwertige Eisen kann mit weiterem Wasserstoffperoxid reagieren und ein Superoxidradikal bilden, welches seinerseits mit Cu^{2+} zu Cu^{+} und Sauerstoff im so genannten Haber-Weiss Schema reagieren kann. Das Cu^{+} wiederum reagiert abermals mit Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen und Hydroxylionen.
Der Eintrag der Metallionen ist hauptsächlich durch die Rohstoffe als auch durch Metallkontakt von Malz, Maische, Würze und Bier zu erklären. Die Gehalte von Eisen und Kupfer nehmen während des Brauprozesses stark zu (Tabelle 6-4). Die Ionen von Eisen und Kupfer können Radikale in ähnlichem Maße generieren [*ibd.*].

Tabelle 6-4: Änderung der Konzentration von Eisen und Kupfer im Brauprozess [22]

	Eisen	Kupfer
Malz [mg/kg]	1–60	3–7
Würze [µg/L]	100–500	20–400
Bier [µg/L]	20–200	20–120

6.2.3 Zusammensetzung von Bieren im Speziellen - Bittersäuren

Die Bittersäuren des Bieres stammen aus dem Sekret weiblicher, unbefruchteter Hopfendolden, dem Lupulin. Dieser gelbe, harzige Puder ist reich an sekundären Inhaltsstoffen, wie eben den α- und β-Säuren (Humulone und Lupulone) sowie ätherischen Ölen (Aromastoffe) und Polyphenolen vor allem in Form von Anthocyanogenen, Quercetin-Glycoside, Kaempferol-Glycoside und Flavanole [24].
Die Hopfenbittersäuren gehören zur Substanzklasse der Phloroglucinderivate und gehen

bei der Lagerung kontinuierlich durch Autoxidation in so genannte Hartharze über. Sie sind antioxidativ sehr wirksam und besitzen lebensmittelkonservierende sowie bakteriostatische Eigenschaften. Sie sind in den getrockneten Hopfendolden in Konzentrationen von 5-25 % zu finden (Tabelle 6-5).

Tabelle 6-5: Bitterstoffausbeute verschiedener Hopfenprodukte [7, 25, 26]

Hopfenprodukt	Bitterstoffausbeute*
Doldenhopfen	20–25 %
Hopfenpellets	25–30 %
Hopfenextrakt	28–30 %

*** % Bitterstoff in Form von *iso*-α-Säuren im fertigen Bier**

Die Menge an Bitterstoffen im Endprodukt Bier ist sehr unterschiedlich, abhängig von der Art und Menge des Hopfenprodukts, deren Bitterstoffausbeute, den Braubedingungen sowie dem Alter des Bieres. Als Maß kann man grob die Bittereinheiten nehmen, die in etwa den Mengen an *iso*-α-Säuren im Bier entsprechen. Die Hopfenbittersäuren isomerisieren im Laufe des Brauprozesses in die entsprechenden *iso*-Formen, die die eigentlich bitteren Substanzen darstellen.

Tabelle 6-6: Biersorten und deren Bittereinheiten [7, 25, 26]

Biersorte	Bittereinheiten	mg *iso*-α-Säure/L
Weizen	15–20	15–20
Vollbier	18–24	18–24
Export	22–26	22–26
Bock	28–36	28–36
Pils	30–38	30–38
Alt	35–50	35–50

Tabelle 6-6 gibt eine Übersicht verschiedener Biersorten, deren Bittereinheiten sowie deren *iso*-α-Säuregehalt an.

6.3 Die Maillard-Reaktion in der Brauerei

Wird ein Brot gebacken, ein Stück Fleisch gebraten, Kaffee oder Kakao geröstet und bei vielen weiteren alltäglichen Dingen der Lebensmittelzubereitung, kommt man nicht umhin ein spezielles Gebiet der Lebensmittelchemie zu betrachten, das maßgeblich für Genusstauglichkeit und Geschmack von Lebensmitteln verantwortlich ist. Gemeint ist die Maillard-Reaktion, die 1912 von Louis-Camille Maillard zuerst beschrieben wurde. Sie ist bekannt als die Reaktion zwischen Aminoverbindungen und Kohlenhydraten, welche unser tägliches Brot erst entstehen lässt. Als ein Weg der nichtenzymatischen Bräunung stellt die Maillard-Reaktion eine komplexe Reaktionsfolge innerhalb der thermischen Prozessierung von Lebensmitteln dar. Sind an den Reaktionen nur Kohlenhydrate beteiligt, so spricht man von Karamelisierung. Sind daneben noch stickstoffhaltige Verbindungen wie Aminosäuren oder Proteine beteiligt, so ist von der Maillard Reaktion die Rede. Heute immer noch stark beforscht, werden immer wieder wichtige Puzzleteile dem allgemeinen Wissensstand hinzugefügt, welche dem Verständnis und somit der möglichen Beeinflussung und Steuerung der nichtenzymatischen Bräunung entgegenkommt.
Wichtig ist sie für die Bildung von Aroma, Geschmacks- und Farbstoffen; der Bildung antioxidativ wirksamer Verbindungen (Reduktone), begleitet aber auch von negativen Folgen wie z. B. der Verlust essentieller Aminosäuren. Die Komplexität der Reaktion, welche auch ihre Faszination ausmacht, ist aber auch ein großes Hindernis für allgemeingültige Aussagen. Dementsprechend können immer nur kleine Teile des Themengebietes aufgedeckt werden. Es entstehen verschiedene Substanzklassen, welche ihren jeweiligen Beitrag zur Charakterisierung und somit zum Erkennungswert des Lebensmittels beitragen. Für die Relevanz dieser Arbeit sollen jedoch nur zwei bedeutende Verbindungsklassen näher betrachtet werden: Aldehyde und α-Dicarbonylverbindungen.

Aldehyde

Aldehyde in Lebensmitteln sind wichtig für den Aromaeindruck. Dabei spielen sie sowohl eine Rolle für den positiven Genusswert, als auch als Indikator für Unreife oder Verderb. Hexanal zum Beispiel entsteht vor allem bei der Autoxidation von Fetten bzw. Fettsäuren in Lebensmitteln und kann durch seine grasig grüne Note zu Aromafehlern führen. Acetaldehyd, gebildet durch die Hefe während der ersten Gärtage, gehört zu den Jungbukettstoffen und verleiht dem Jungbier einen unreifen Charakter. Die Aldehyde werden während der Reifezeit reduziert und somit der vollmundige Geschmack vom Bier erreicht. Viele Aldehyde tragen zum Gesamtaroma des Bieres bei und sind auch im fertigen Produkt enthalten.

α-Dicarbonylverbindungen

Strukturen, die zwei benachbarte Carbonylgruppen enthalten, werden Diketone oder α-Dicarbonyle genannt. Sie stellen die zentralen Zwischenstufen von Zuckern während der Maillard-Reaktion dar, aus denen Aromen, Farbe, Antioxidantien und weitere Strukturen entstehen. Abhängig von den Edukten und den Reaktionsbedingungen, bilden sich eine ganze Reihe von Verbindungklassen. Dabei ist ein gewisser Einfluss auf die Reaktionsbedingungen möglich, um zu einem gewünschten Produkt zu gelangen oder die Genußtauglichkeit zu verbessern.

6.3.1 Bildung von α-Dicarbonylen

Bei der nichtenzymatischen Bräunungsreaktion im klassischen Sinne reagieren Kohlenhydrate mit Aminen. Sie läuft vorzugsweise zwischen 80–170 °C und Wassergehalten von 10–20 % ab [102].
Ohne Aminokomponente und unter trockenen Bedingungen läuft die so genannte Karamelisierung ab [27]. Durch Oxidation von Kohlenhydraten mit Sauerstoff entstehen farbige Verbindungen, die für die goldgelbe Farbe von allgemein benanntem Karamell verantwortlich sind und es entstehen die typischen aromatischen Caramelsubstanzen. Durch die nötigen hohen Temperaturen entstehen ebenfalls α-Dicarbonyle direkt durch Retro-Aldol-Reaktion. Die extremen Bedingungen der Karamelisierung sind, abgesehen beim Mälzen, für die Betrachtungen des Brauprozesses von Bier nicht von Bedeutung.
Seit Ende der 80er Jahre wird die Maillard-Reaktion allgemeinhin in drei Hauptphasen unterteilt. In der „frühen Phase“ addiert sich eine Aminogruppe nucleophil unter Wasserabspaltung an die Carbonylfunktion einer reduzierenden Aldose. Die entstehende Schiff’sche Base (Imin) lagert sich über das 1,2-Enaminol in eine Aminoketose (Amadori-Verbindung) um (vergleiche Abbildung 6-4). Da die meisten Kohlenhydrate als cyclisches Halbacetal vorliegen, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt vor der Addition, eine protonenkatalysierte Ringöffnung.
Nach Bildung des Amadori-Produktes erfolgt die Stabilisierung durch Ringschluss der Aminoketose zur Pyranose. Gebildete Pyranose-Formen des cyclischen Halbaminals neigen zur Mutarotation und stabilisieren sich durch die Umlagerung.
Reagiert statt der Aldose eine Ketose, wird die entstehende Struktur Heyns-Verbindung genannt.

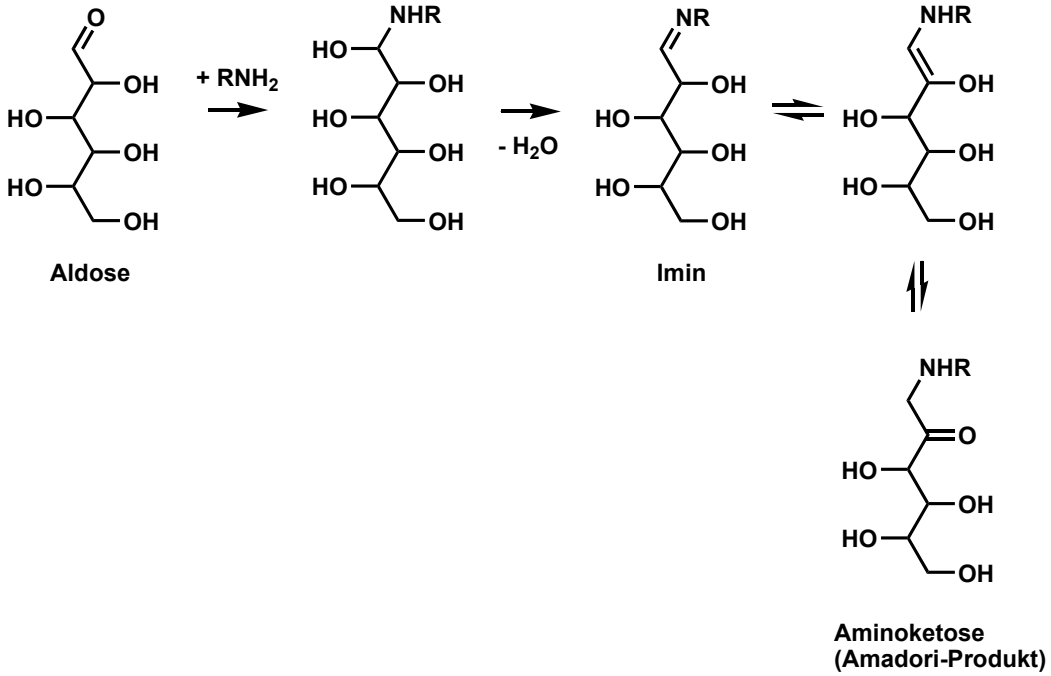


Abbildung 6-4: Ablauf der frühen Phase der Maillard-Reaktion [102].

In der sich anschließenden „fortgeschrittenen Phase“ bilden sich α-Dicarbonylverbindungen durch Enolisierungsreaktionen, β-Eliminierungen und Retro-Aldol-Reaktionen. Die ablaufenden Reaktionen, die zur Bildung von Amadori- bzw. Heynsverbindungen führen, laufen gut im pH-Bereich von 4–7 ab. Das ist entscheidend für die Betrachtung der Abläufe im Bier und während des Bierbrauens, da sich der pH-Wert zwischen 4 und 5 bewegt. Abbildung 6-5 stellt einen Ausschnitt möglicher Reaktionswege bei verschiedenen Bedingungen der Folgereaktion des Amadori-Produkts der D-Glukose dar. Abhängig vom pH-Wert entstehen 1-Desoxy-2,3-hexosulose (**1-DH**) eher im Neutralen oder 3-Desoxy-2-hexosulose (**3-DH**) eher im Sauren [102]. Durch Reduktion oder Strecker-Abbau von 1-DH und anschließender β-Eliminierung kann 1,4-Didesoxy-2,3-hexosulose (**1,4-DDH**) entstehen. Weiterhin entsteht 1,4-DDH aus Maltose durch den so genannten „*peeling off*“ Mechanismus. Zunächst wird 1-DH am reduzierenden Ende des Disaccharids gebildet und im Anschluss der Glukosylrest am C-4 β-eliminativ abgespalten [28].

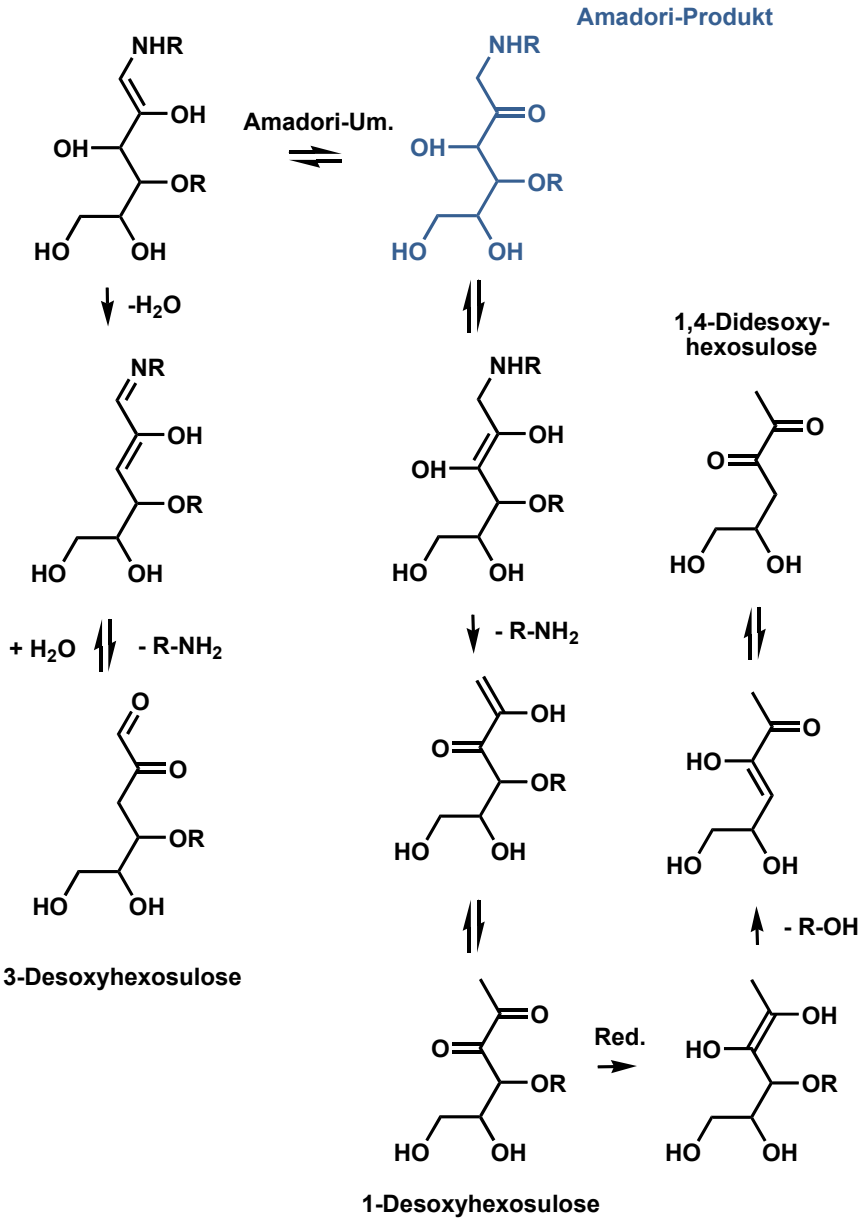


Abbildung 6-5: Bildung von α-Dicarbonylverbindungen aus dem Amadori-Produkt der D-Glukose [102].

Die beschriebenen Reaktionsabläufe gelten ebenfalls für Pentosen, welche im Bier jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielen.
Kurzkettigere Dicarbonyle wie das 3-Desoxypentoson (**3-DP**) werden vorwiegend aus Disacchariden generiert. Ausgehend vom 2,3-Enaminol wird der Glycosylrest am C-4-Atom über β-Eliminierung abgespalten. Es wird Wasser angelagert und es kommt zu einer Retro-Claisen-Kondensation unter Abspaltung eines Ameisensäureamins und der oxidativen Bildung von 3-DP aus einem 3-Desoxy-1,2-Endiol. Das Amin regiert mit Wasser zu Ameisensäure.
Unterschiedliche Reaktionen wie Enolisierungen, Eliminierungen und Zyklisierungen leiten die „finale Phase" der Maillard-Reaktion ein. Es entsteht ein sehr großes Spektrum an Verbindungen, teils wichtig für Aroma, Struktur oder Farbe. Unter neutralen wässrigen Bedingungen entstehen aus 1-DH β-Pyranon, Cyclopentenon und Isomaltolderivate. Aus β-Pyranon entsteht durch Abspaltung einer Hydroxygruppe und des Glukosylrestes R Maltol (Vergleiche Abbildung 6-9 am Ende des Abschnitts). Cyclopentenon steht über 1,5-Didesoxy-4-glukopyranosyl-2,3-hexodiulose-4-en (1,5-DDM) mit β-Pyranon im Gleichgewicht. Steht kein Glukosylrest zur Verfügung, entsteht fast ausschließlich Dihydro-γ-pyranon.
Neben den monomeren Reaktionsprodukten entstehen auch komplexere, teilweise stickstoffhaltige Verbindungen, die Melanoidine. Diese makromolekularen Verbindungen, sind strukturell wenig aufgeklärt und werden daher noch stark erforscht (Abbildung 6-6) [29]. Sie sorgen vor allem für Farbe und Textur eines erhitzten Lebensmittels. Auch der Beitrag zur Haltbarkeit wird diskutiert. Die konjugierten Doppelbindungen im Molekül, die auch den Hauptanteil zur Farbe beitragen, machen Melanoidine zum idealen Radikalfänger. Auch das Komplexieren von Schwermetallionen gehört zu ihren Eigenschaften, was durch freie Hydroxyl- und/oder Carboxylatgruppen an den äußeren Enden der Makrostruktur erklärt werden kann.

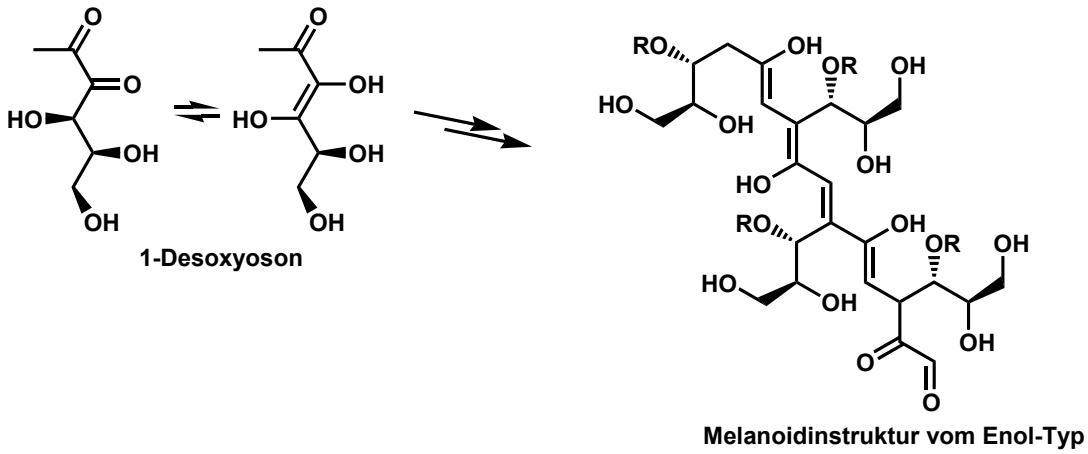


Abbildung 6-6: Postulierte Melanoidinstruktur vom Enol-Typ [29].

Alle Strukturmerkmale führen aber auch zu der Fragestellung, inwiefern nicht doch prooxidative Effekte eine Rolle spielen und die antioxidativen Eigenschaften überwiegen. Untersuchungen haben gezeigt, dass je nach komplexierten Metallion, eine ausgeprägte Fenton-Reaktion zu beobachten ist. Das heißt, es werden in erhöhtem und katalytischem Maße Hydroxylradikale produziert, welche im Lebensmittel den Verderb beschleunigen bzw. im lebenden Organismus zu Zellschäden führen können. Im Falle des Bierbrauens wird vor allem durch den Metabolismus der Hefen während des Gärens

Wasserstoffperoxid gebildet, das dann mit den, während der Sudhausarbeit gebildeten, Melanoidine reagieren könnte. Das als katalytischen Reaktionspartner benötige Eisen ist praktisch immer genügend vorhanden, sei es aus den Rohstoffen oder den technischen Anlagen.

Als weitere Produkte aus den α-Dicarbonylen sind die Aldehyde durch Retro-Aldol-Reaktion (Abbildung 6-8) und die so genannten Strecker-Aldehyde durch den entsprechenden Abbau wichtig (Abbildung 6-7). Letztere entstehen direkt aus der Reaktion zwischen Dicarbonylen und Aminosäuren durch oxidative Decarboxylierung unter Erhalt des Aminosäurerestes und sind wichtig für den Aromaeindruck des Lebensmittels; sie können aber auch zum *off-flavor* beitragen, wenn die gewollten Konzentrationen zu sehr ansteigen. Die durch Retro-Aldol-Reaktion gebildeten „kleinen" Aldehyde entstehen durch Spaltung des Dicarbonyl Grundgerüstes und werden in fortgesetzten Reaktionen schnell wieder umgesetzt, zum Beispiel durch Einbau in Melanoidine.

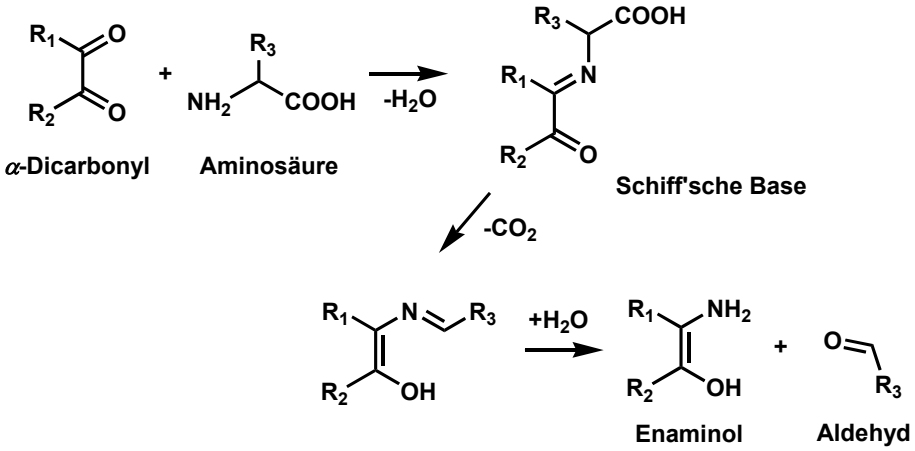


Abbildung 6-7: Allgemeiner Reaktionsverlauf des Streckerabbaus.

Glucoson (D-Arabino-2-hexosulose), ein α-Dicarbonyl mit stark diskutierten antioxidativen Eigenschaften, kann auf zwei Wegen gebildet werden. Ein Weg ist eine metallkatalysierte Radikalkettenreaktion ausgehend von Amadori-Produkten. Die Reaktion findet eher bei höheren pH-Werten und im Idealfall bei 80 °C statt [30, 31]. Alternativ wird der sauerstoffabhängige oxidative Weg aus dem 1,2-Enaminol unter Bildung von Glucoson-Imin vorgeschlagen, aus welchem durch Hydrolyse das Glucoson freigesetzt wird [32]. Im Anschluss kann **Glyoxal** durch Spaltung von Glucoson zwischen C-2 und C-3 gebildet werden. Die C-C Spaltungsreaktion ist überhaupt der wichtigste Bildungsmechanismus von kurzkettigen α-Dicarbonylen. Drei Mechanismen sind dabei von besonderer Bedeutung: Retro-Aldol-, β-Dicarbonyl- und α-Dicarbonyl-Spaltungen. Am häufigsten treten die Retro-Aldol-Reaktionen auf, die durch Aminfunktionen katalysiert werden und eigentlich bevorzugt im basischen ablaufen. Anschließende Reaktionen sind Wassereliminierungen oder Oxidationen. Die entstehenden Fragmente von C_2 bis C_5 sind meist reaktiver als die ursprünglichen C_6-Zucker. Dies zeigt sich häufig in den verzögerten Kurven von Antioxidativität und Bräunung, die hauptsächlich erst nach eingesetztem Abbau der „großen" Kohlenhydrate ansteigen. Weiterhin kann Glyoxal durch basenkatalysierte Retro-Aldol-Spaltung der Schiff'schen Base entstehen. Zunächst führt die Reaktion zu Glycolaldehyd-Imin, aus der durch Keto-Enol-Tautomerisierung und anschließendem Oxidationsschritt Glyoxal-Monoimin gebildet wird. Die im Anschluß ablaufende Hydrolyse setzt Glyoxal frei.

Das als Zwischenstufe gebildete Glycolaldehyd-Monoimin, das mit dem Glyoxal-Monoimin im Gleichgewicht steht, ist sehr wichtig für die Bräunungsreaktion. Zwei dieser Moleküle können zum Dialkyl-Pyrazin-Radikal-Kation kondensieren, welches als sehr bräunungsreaktiv beschrieben wird [33]. Das zwischen Glycolaldehyd und Glyoxal herrschende Redoxgleichgewicht, ist abhängig von reduzierenden Substanzen wie den Reduktonen. Die Bildung von Glyoxal ist daher nur am Anfang der ablaufenden Reaktionen der Hauptweg. Mit Bildung von reduzierenden Substanzen wird immer mehr Glycolaldehyd und somit verstärkt das Dialkyl-Pyrazin-Radikal-Kation gebildet [32].

Methylglyoxal wird ausgehend von einer Amadori Verbindung durch Retro-Aldol-Spaltung zwischen C-3 und C-4 von 1-DH gebildet (Abbildung 6-8).

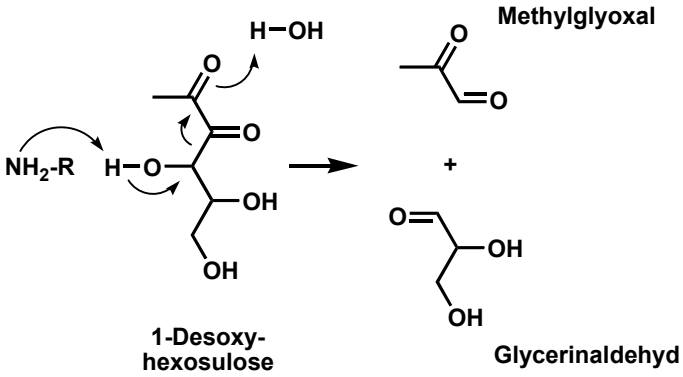


Abbildung 6-8: Bildung von Methylglyoxal aus 1-DH über Retro-Aldol-Reaktion.

Es entsteht zunächst Methylglyoxal-Diimin, welches durch β-Eliminierung der ersten Aminverbindung und anschließender Hydrolyse Methylglyoxal freisetzt [34]. Weiterhin ist eine Retro-Aldol-Reaktion von 1-DH oder 3-DH zur Bildung von Methylglyoxal möglich. Es erfolgt eine Spaltung zwischen C-3 und C-4 (Abbildung 6-8) und anschließende Keto-Enol-Tautomerisierung bzw. eine vinyloge β-Eliminierung von Wasser aus dem zweiten Zwischenprodukt Glycerinaldehyd [35].

Diacetyl wird aus dem 2,3-Endiol des 1-DH durch vinyloge β-Eliminierung und anschließendem Angriff eines Nucleophils am C-5 gebildet. Die nachfolgende Spaltung zwischen C-4 und C-5 setzt Diacetyl frei. Anders als die meisten anderen α-Dicarbonyle wird Diacetyl zusätzlich durch mikrobiellen Einfluss im Bier von eingesetzten Hefen gebildet. Als Dicarbonyl mit Aromaeindruck, entsteht es in nicht unerheblichen Mengen und kann das Bieraroma sehr stark beeinflussen. Es wird daher auch als Reifeindikator für Bier verwendet. Es entsteht aus der Vorstufe 2-Acetolactat durch oxidative Decarboxylierung. Hefen, die vital genug sind, können gleichzeitig das gebildete Diacetyl wieder abbauen. Andernfalls nimmt das Butteraroma zu stark zu und die Biercharge ist nicht mehr verkaufsfähig.

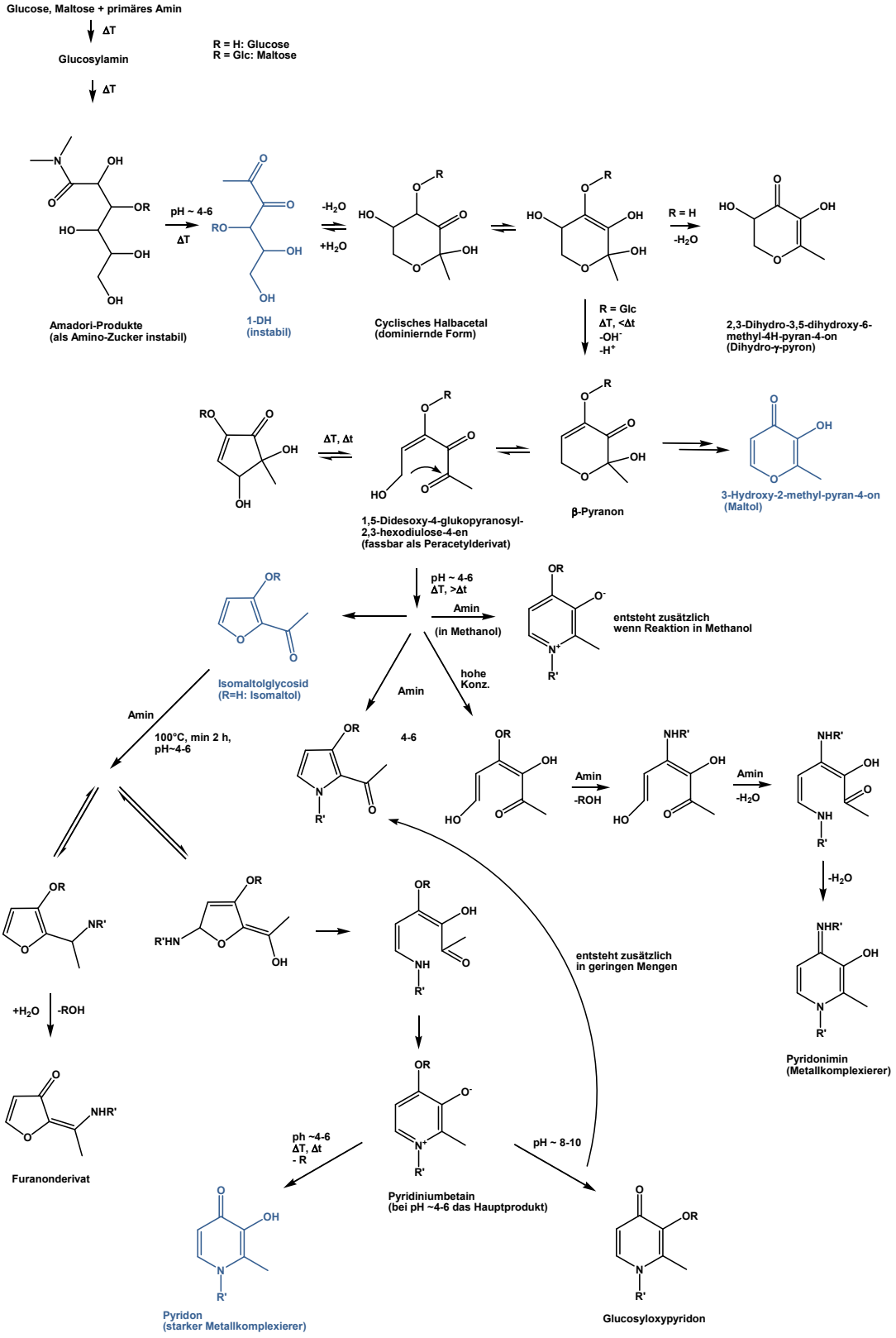


Abbildung 6-9: Beispielhafte Übersicht der Folgereaktionen aus 1-DH im leicht sauren Milieu [36].

6.4 Die Bedeutung von Ferulasäure

Hydroxyzimtsäuren spielen eine zentrale Rolle bei der Biosynthese von Polyphenolen in der Pflanze (Abbildung 6-10) und werden über den so genannten Shikimatweg oder auch Shikimisäureweg aus Phenylalanin oder Tyrosin gebildet [37, 38]. Die einfachen Phenolsäuren, Zimtsäure und ihre Derivate, sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind *p*-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure. Durch Oxidation der Seitenkette entstehen Derivate der Benzoesäure [39].

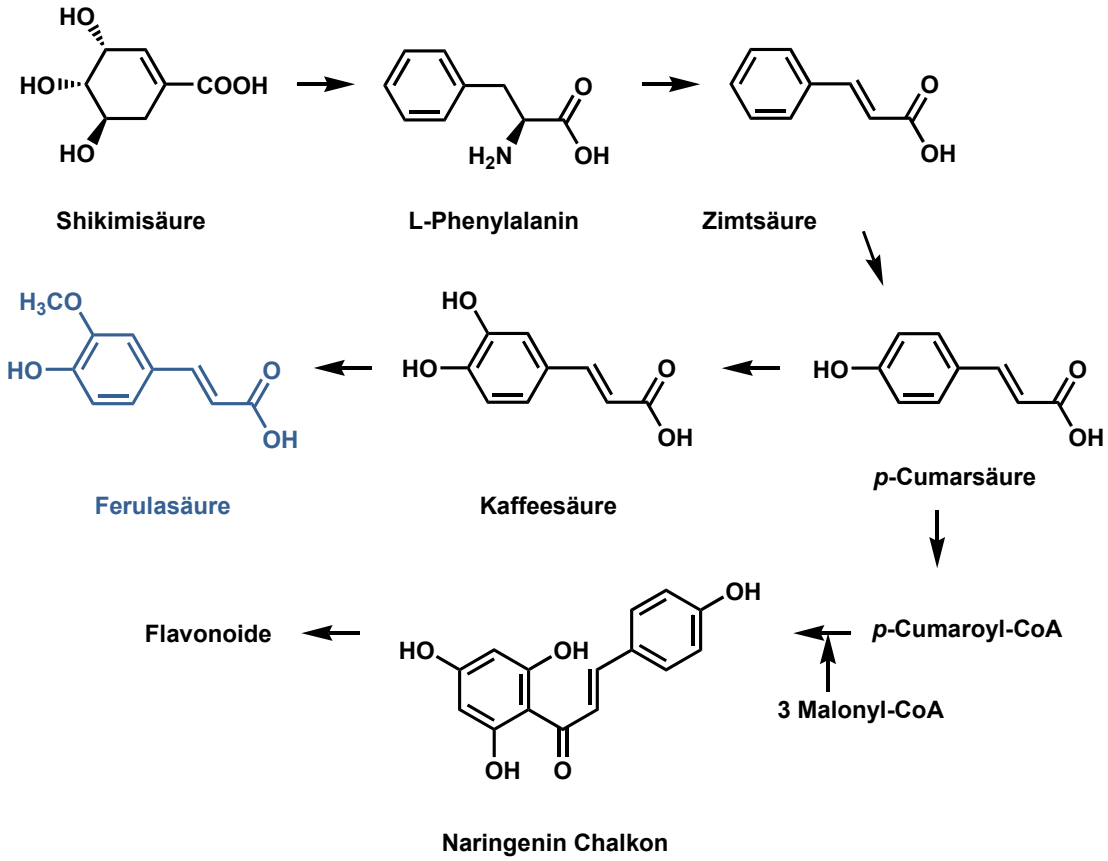


Abbildung 6-10: Biosynthese von Hydroxyzimtsäuren und Flavonoiden [37].

6.4.1 Vorkommen und Verbleib von Ferulasäure im Brauprozesses

Im Bier ist Ferulasäure neben der *p*-Cumarsäure eine der wichtigsten polyphenolischen Verbindung. Die Gehalte liegen bei 18 untersuchten Proben 2- und 6-reihiger Gerste zwischen 365–605 µg Ferulasäure pro Gramm Trockengewicht [40]. Bestimmt wurde dabei der Gesamtferulasäuregehalt nach der Methode von Pussayanawin [41]. In den äußeren Schichten des Gerstenkorns befinden sich ca. 77,7–82,3 % der gesamten Ferulasäure [42]. In Gerste ist der größte Anteil (35–75 %) gebunden als Ether an Lignin; der Rest liegt vor allem als Ester mit Arabinoxylanen der Hemicellulosen oder frei vor [43]. Möglich ist eine Hydrolyse der Esterbindungen durch Feruloylesterasen. Die Aktivität der Feruloylesterasen erreicht während des Brauprozesses am zweiten Tag der Keimung ein Maximum. Das Aktivitätsoptimum liegt bei 45 °C; bei 65 °C wird das Enzym weitestgehend denaturiert [44]. In Malz liegen ähnliche Gehalte von ca.

481–653 µg pro Gramm Trockengewicht wie in der Gerste vor. In der Maische, der Würze und im fertigen Bier setzt sich der Ferulasäuregehalt wiederum aus freier, ester- und ethergebundener Form zusammen. Während die freie Ferulasäure direkt in die Würze übergeht, werden von der estergebundenen Form nur ca. 1–4 % freigesetzt. 90 % davon verbleiben im Treber und 6–9 % estergebunden in der Würze. Die ethergebundene Ferulasäure geht zu 100 % mit den Trebern verloren, da keine Enzyme zur Spaltung vorhanden sind und auch die chemische Hydrolyse nur unter drastischen Bedingungen stattfindet [45].

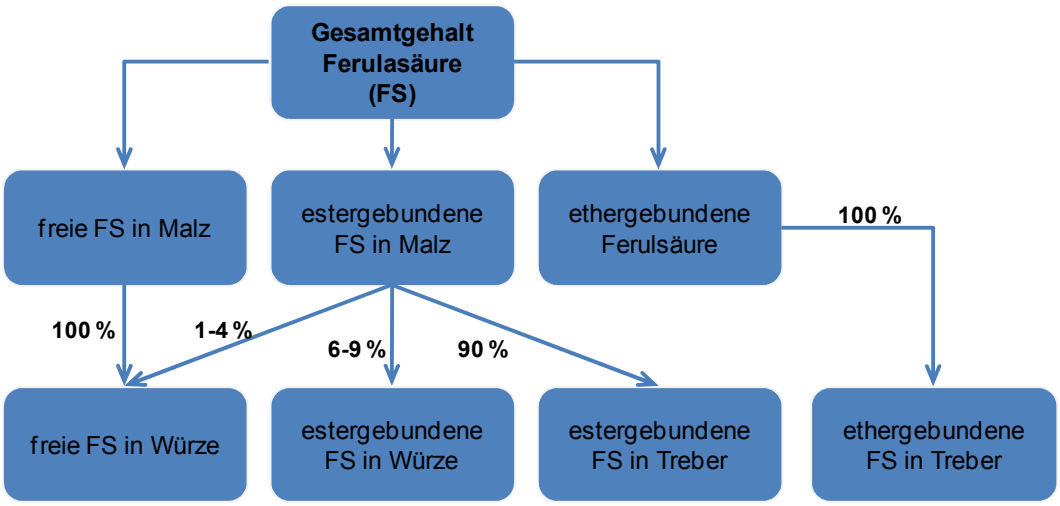


Abbildung 6-11: Quellen von Ferulasäure während des Brauprozesses [18].

Ein thermischer Abbau von Ferulasäure findet erst ab 245 °C statt. Es entsteht 4-Vinylguajacol als Hauptprodukt, eine für das Bier wichtige aromarelevante polyphenolische Verbindung (Abbildung 6-12) [46].

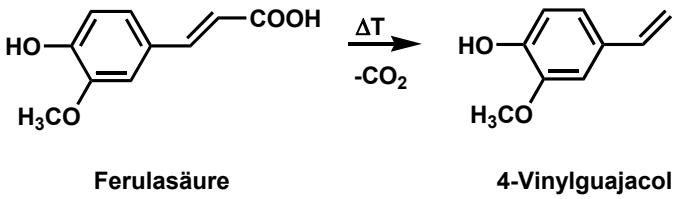
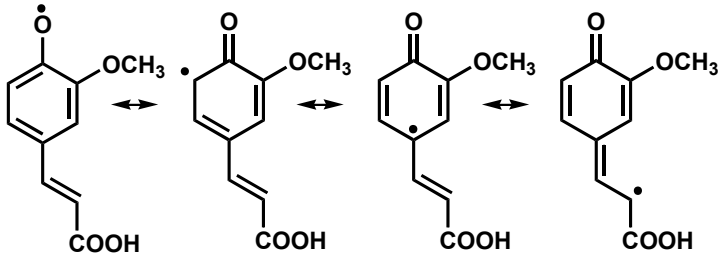


Abbildung 6-12: Thermischer Abbau von Ferulasäure [46].

Für die herrschenden Bedingungen des Brauprozesses ist der thermische Abbau daher nicht von Bedeutung. Der enzymatische Abbau durch Decarboxylierung spielt eine wesentlich wichtigere Rolle. Vor allem wilde Hefen und Hefen für die Weißbierproduktion produzieren die benötigte Ferulatdecarboxylase und werden als POF^+ bezeichnet (*phenolic off-flavor* positiv).

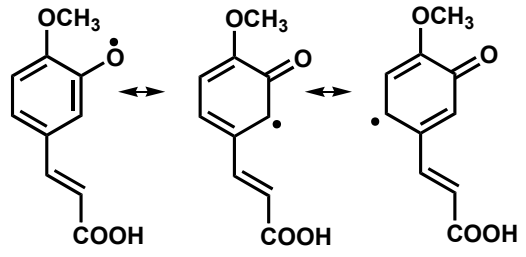
6.4.2 Antioxidative Wirkungsweise von Phenolen und Phenolderivaten

Die antioxidativen Eigenschaften von Phenolen liegen in der guten Delokalisierung der abgefangenen Radikale durch die Struktur begründet (Abbildung 6-13 und Abbildung 6-14). Die einzelnen Verbindungen besitzen einen unterschiedlich stark ausgeprägten antioxidativen Charakter, abhängig von den strukturellen Merkmalen. So sind Zimtsäurederivate allgemein antioxidativ wirksamer als Benzoesäurederivate. Die Doppelbindung in der Seitenkette trägt zur Stabilisierung des entstehenden Phenoxyradikals bei (Delokalisierung von ungepaarten Elektronen). Dahingegen verschlechtert die Carboxylgruppe der Benzoesäurederivate die Protonenabgabe des Phenolrestes. Methoxygruppen oder Catecholgruppen erhöhen die antioxidative Aktivität durch Stabilisierung des Phenoxyradikals. Für eine antioxidative Aktivität bei Phenolsäuren sind mindestens zwei Hydroxylgruppen nötig [47].
Bei Ferulasäure führt die Methylierung der Hydroxygruppe in *ortho*-Position, zu einer Abnahme der antioxidativen Aktivität gegenüber der Kaffeesäure. Ferulasäure ist aber dennoch effektiver als Monophenole, weil die Methoxygruppe mit Möglichkeit zur Elektronenabgabe eine erhöhte Stabilisierung des resultierenden Aryloxylradikals durch eine Elektronendelokalisierung nach Abgabe eines Wasserstoffatoms der Hydroxygruppe erlaubt [48]. Bedeutung für die antioxidative Aktivität von Ferulasäure hat neben der Hydroxy- und Methoxygruppe auch die laterale Doppelbindung. Sie trägt maßgeblich zur Stabilisierung des Phenoxyradikals bei [49].



Ferulasäure

Abbildung 6-13: Mesomeriestabilisierung des Phenoxyradikals von Ferulasäure.



Isoferulasäure

Abbildung 6-14: Mesomeriestabilisierung des Phenoxyradikals von Isoferulasäure.

6.4.3 Antioxidative Wirkungsweise von Ferulasäure im Speziellen

Ferulasäure agiert als Antioxidans gegen Peroxyradikal induzierte Oxidation. Im Vergleich zu Ferulasäure (FS) besitzen Vanillinsäure (VS), Cumarsäure (CS) und Zimtsäure (ZS) eine geringere antioxidative Kraft in einem DPPH Assay nach 21 Stunden; CS zeigte die geringste Aktivität [50]. Das Fehlen von 4-Hydroxy und/oder einer 3-Methoxygruppe destabilisiert das entstehende Radikal, was bei CS und ZS der Fall ist. Daher sind CS und ZS keine effektiven ROS Fänger. In Anwesenheit von Metallionen konnte für Ferulasäure sowohl antioxidative als auch prooxidative Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration beobachtet werden [51]. Bei Inkubation von LDL (*Low Density Lipoprotein*) mit 5 µM Kupfer(II) (als $CuSO_4$) mit der gleichen Konzentration an Ferulasäure, wurde keine Veränderung der gemessenen *lag-time* (gleichbedeutend mit EAP) von LDL in Bezug auf die Kontrolle ohne Kupfergabe beobachtet. Ferulasäure ist in der Lage Kupferionen in einem Verhältnis von 1:1 zu komplexieren [52] und scheint so weder antioxidative noch prooxidative Aktivität zu besitzen. Auch bei der Untersuchung von Natella *et al.* [49] konnte weder eine pro- noch eine antioxidative Aktivität von Ferulasäure bei identischer Kupferkonzentration beobachtet werden.

Tabelle 6-7: Vergleich der antioxidativen Kraft von Ferulasäure (FS), Vanillinsäure (VS), Cumarsäure (CS) und Zimtsäure (ZS) [50]

Substanz	E (mV)	DPPH
FA	400	-1,39
VS	450	-0,92
CS	---	-0,11
ZS	750	-0,67

Liegt die Konzentration von Ferulasäure unter der Kupferkonzentration, scheinen verstärkt prooxidative Reaktionen aufzutreten. Die Kupferionen werden dabei reduziert und die Oxidation von LDL wird dadurch verstärkt [52]. Wenn die Konzentration von Ferulasäure höher ist als die der Kupferionen, setzt die antioxidative Wirkung verstärkt ein (bei 7,5 µM Ferulasäure wird die *lag-time* um 40 % verlängert). Untersuchungen von Dihydroferulasäure und Isoferulasäure ergaben ausschließlich prooxidative Effekte [51].

6.4.3.1 Mechanismus

Die prooxidative Wirkung von Ferulasäure in Anwesenheit von Kupfer wird stark diskutiert. Eine Erklärung ist die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Ferulasäure. Das dabei entstehende Phenoxyradikal abstrahiert von anderen Reaktionspartnern Wasserstoffatome, stabilisiert sich dadurch wiederrum selbst und steht wieder als Reduktionsmittel zur Verfügung. Dies führt zu fortgesetzten radikalischen Reaktionen. Das gebildete Cu^{+} reagiert seinerseits im Haber-Weiss-Schema mit Hydroperoxiden wie Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen und Hydroxylionen, wobei es sich ebenfalls zu Cu^{2+} regeneriert (Abbildung 6-15).

Die Stöchiometrie des Komplexes bei der Wechselwirkung von Kupfer und Ferulasäure beträgt 1:1 [51]. Die Reaktion von Cu^{+} mit Hydroperoxiden (ROOH) ist schneller als die Reduktion von Cu^{2+}, d. h. die Reaktion von Cu^{2+} mit ROOH ist der eigentlich limitierende Schritt in diesem Prozess. Die Beschleunigung der Oxidationsrate bzw. die konzentrationsabhängige prooxidative Aktivität der Ferulasäure wurde den Reaktionen von Kupfer entsprechend auch bei höheren Konzentrationen von Eisen beobachtet [51].

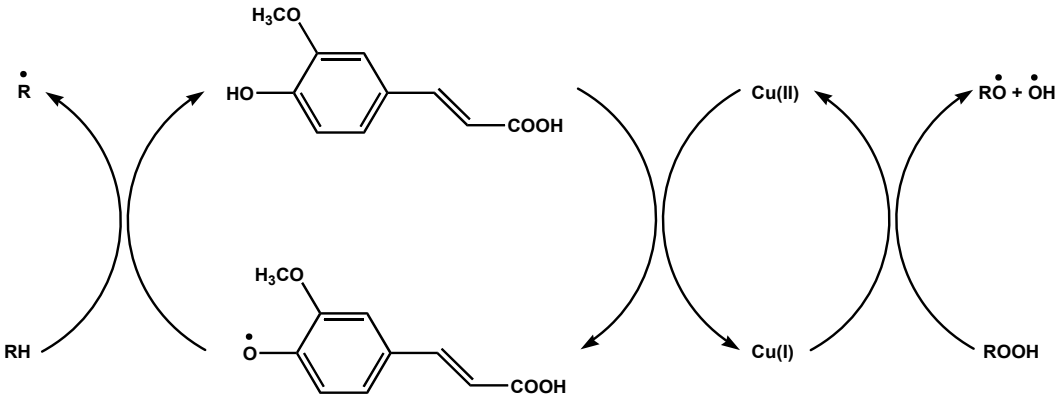


Abbildung 6-15: Mechanismus der Kupfer-induzierten oxidierenden Wirkung von Ferulasäure nach Bourne und Rice-Evans (1997).

Für Isoferulasäure und Dihydroferulasäure sind prooxidative Wirkungen ebenfalls zu beobachten. Beide Substanzen scheinen wie Ferulasäure in der Lage zu sein, Kupferionen zu reduzieren. Allerdings wurden ausschließlich prooxidative Tendenzen und nicht wie bei Ferulasäure auch eine antioxidative Eigenschaften beobachtet [52]. Der Grund dafür könnte die laterale Doppelbindung sein, welche bei Dihydroferulasäure fehlt. Folglich ergibt sich eine geringere Stabilisierung des bei der Oxidation entstehenden Phenoxyradikals. Isoferulasäure besitzt zwar eine laterale Doppelbindung, allerdings kann die Seitenkette aufgrund der Position der Substituenten des Phenolrestes nicht mit in die Mesomeriestabilisierung des Phenoxyradikals einbezogen werden (Abbildung 6-14). Eine Hydroxygruppe in *para*-Stellung zur Seitenkette wie bei Ferulasäure erlaubt eine Mesomeriestabilisierung unter Einbeziehung der lateralen Doppelbindung und erhöht so die antioxidative Aktivität. Bei Isoferulasäure dagegen befindet sich die Hydroxygruppe in *meta*-Stellung zur Seitenkette und eine Mesomeriestabilisierung unter Einbeziehung der lateralen Doppelbindung ist nicht möglich.

Der beschriebene Prozess kann als Redox-Cycling bezeichnet werden und durch Abreaktion des durch Kupfer(II) entstandenen Phenoxyradikals vermindert werden. Der Abbau von Ferulasäure wurde elektrochemisch untersucht und zeigt eine Oxidationsreaktion erster Ordnung, d.h. die Oxidation ist durch Massentransport limitiert. Die Elektrolyse von Ferulasäure in wässriger Lösung führt hauptsächlich zur Bildung von Kaffeesäure und Methoxychinon als erste Intermediate. Diese werden weiter zu Malonsäure, Oxalsäure und Ameisensäure oxidiert [53]. Der angenommene Mechanismus der Oxidation von Ferulasäure geht von einem Zweielektronentransfer über Mesomerie stabilisierte Kationenintermediate aus. Tatsächlich findet ein Einelektronentransfer und Bildung von Mesomerie stabilisierten Phenoxyradikalen statt. Zur Verteilung des Elektrons können vier mesomere Grenzstrukturen angenommen werden, wobei die Elektroneneffekte der Methoxy-, Carboxyvinyl- und Oxogruppe die unterschiedliche Verteilung der entstehenden Endprodukte verursachen. Ein zweiter Einelektronentransfer führt zu den entsprechenden Carbokationen. Fortgesetzte Hydrolyse, weiteren Reduktions- bzw. Oxidationsschritte und/oder Ligandenabspaltung in Form von Methanol oder Acrylsäure führen dann zu den unterschiedlichen Oxidationprodukten 3,4-Dioxozimtsäure, Kaffeesäure, Methoxyparabenchinon u.a. [*ibd.*].

6.5 Die Alterung von Bier

Die stofflichen Veränderungen der Inhaltsstoffe während der Lagerung von Bier zu verstehen und zu beeinflussen, stellt das Hauptinteresse der Brauindustrie und heutiger Forschungsbemühungen dar. Neben dem Verderb durch Mikroorganismen und die Trubbildung, stehen heute Geschmacksveränderungen und Geschmacksstabilität im Vordergrund der Forschung.
Im Laufe der Lagerung entstehen unter anderem so genannte Alterungsaldehyde, die beim gewünschten Geschmack einen unangenehmen *off-flavor* und somit die Ungenießbarkeit des Bieres hervorrufen. Die entstehenden flüchtigen Aldehyde entstehen auf mehreren möglichen Reaktionswegen, wobei jeweils andere Verbindungen entstehen. Die möglichen Reaktionen laufen dabei teilweise parallel ab und beeinflussen sich auch gegenseitig. Reaktionen wie Oxidation höherer Alkohole, oxidativer Abbau von Hopfeninhaltstoffen, Autoxidation von Fettsäuren, oxidativer Abbau von Aminosäuren durch den Strecker-Abbau spielen dabei eine Rolle unterschiedlicher Gewichtung. Bei der Oxidation höherer Alkohole durch Melanoidine fungieren letztere als Wasserstoffakzeptoren. Beim oxidativen Abbau von Hopfeninhaltstoffen und der Autoxidation von Fettsäuren sind Melanoidine gleichzeitig antioxidativ wirksam. Die Hopfeninhaltstoffe ihrerseits inhibieren wiederum die Oxidation der höheren Alkohole, der Aminosäuren und der ungesättigten Fettsäuren. Sie fungieren dabei als Elektronendonor [54]. Folglich sind im Lebensmittel Bier die chemischen Zusammenhänge sehr komplex und reaktive Abhängigkeiten groß.
Eine wichtige geschmacksbestimmende Zutat ist das Malz. Die Herstellung wie unter 6.1.2.1 beschrieben ist nur eine grobe Verallgemeinerung der Möglichkeiten während des Herstellungsprozesses. Durch Veränderung der Prozessparameter während der Keimung und den anschließenden Trocknungs- und Darrstufen, werden vielfältigste Malzvarietäten mit unterschiedlichen Eigenschafte erhalten. Damm und Kringstad [55] identifizierten schon 1964 2- und 3-Methylbutanal als die dominierenden Alterungsaldehyde. Es wurden aber mittlerweile in vielen weiteren Forschungsarbeiten weitere wichtige Verbindungen gefunden. Mittlerweile zählt man über 250 flüchtige Strukturen (Tabelle 6-8).

Tabelle 6-8: Tabelle mit Geruchsschwellenwerten einiger Substanzen [in Wasser; 20°C; in µg/L bzw. ppb] (Die Werte sind abhängig von der Person und daher nur Richtwerte) [56, 57, 58, 59]

Substanz	Geruchsqualität	Geruchsschwellenwert
Benzaldehyd	bittermandel	350
2- und 3-Methylbuttersäure	süßlich	200
Methylvanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd)	Vanille	20
Dimethylsulfid	gekochtes Gemüse	20
Acetaldehyd	stechend, fruchtig	4
1-Octen-3-on	metallisch, pilzartig	10
Hexanal	grün	4,5
Phenylacetaldehyd	honigartig	4
3-Methylbutanal (Isovaleraldehyd)	malzig	3
2-Methylpropanal	malzig	1
Methional (3-(Methylthio) propionaldehyd)	gekochte Kartoffel	0,2
2-Methylbutanal	malzig	0,2
(*E,E*)-2,4-Decadienal	fettartig, wachsig	0,07
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2*H*)-furanon	Karamell	0,04

Der Fokus lag lange Zeit bei der Aufklärung der Mechanismen zur Entstehung von *trans*-2-Nonenal als ein Produkt der Fettoxidation [60]. Durch Oxidation von Linolsäure während des Maischens entsteht ein Aroma, das als "pappkartonartig" beschrieben wird. Der Prozess der Bieralterung ist aber weitaus komplexerer Natur. Prozesse zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und sich daraus ergebene radikalische Abläufe sind ungleich bedeutender für die Bieralterung. Sie sind in der Lage Radikalkettenreaktionen zu initiieren und aufrecht zu erhalten. Weiterhin ist die Maillard-Reaktion eine wichtige Einflusskomponente auf die Haltbarkeit. Es werden aromaaktive Verbindungen und Vorstufen erzeugt, die starken Einfluss auf das Aromaprofil besitzen. So werden in einer fortgesetzten Reaktion, der Strecker-Reaktion, Aminosäuren durch α-Dicarbonylverbindungen zu teilweise flüchtigen, aromarelevanten Aldehyden umgesetzt. In Bezug auf die oxidative Stabilität inaktivieren oder aktivieren die Produkte und Intermediate der Maillard-Reaktion Radikale und beeinflussen das Redoxpotential vieler Oxidationsprozesse [61]. So dienen Melanoidine als Elektronenakzeptoren bei der Oxidation höherer Alkohole.
Generell trägt das Entstehen von Radikalen während des Herstellungsprozesses des Bieres maßgeblich zur Haltbarkeit von Bier bei. Die Temperatur während des Trocknungs- und Röstprozesses hat einen direkten Einfluss auf die Generierung von Radikalen im produzierten Malz, wobei der Gehalt mit der Temperatur ansteigt. Der höchste Gehalt tritt in der Spelze gebunden im Pilsner Malz auf. In geröstetem Malz können Radikale hingegen im gesamten Korn verteilt gefunden werden. Ein Transfer aus den in den Spelzen eher fest gebundenen Radikalen findet nur im geringeren Maße statt. Anders in geröstetem Malz, wo sich die Radikale im gesamten Korn verteilen, so dass der Großteil aus dem wasserlöslichem Teil des Korns in das Bier über gehen [62].
Phenolische Verbindungen beeinflussen als dritter Faktor ebenfalls stark die oxidative Stabilität des Bieres, tragen mit ihrer antioxidativen Aktivität zum Gesamtpotential bei [63] und bei deren Abbau entstehen aromaaktive Substanzen [46].

6.5.1 Oxidative Vorgänge im Bier

Der Einfluss von Schwermetallionen, insbesondere Eisenionen, auf die Oxidation von Bier wurde von Kaneda *et al.* 1992 untersucht [22]. Die Versuche zeigten bei Zugabe von H_2O_2, Fe^{3+} oder Fe^{2+} bzw. in Kombination einen beschleunigten oxidativen Abbau von Bierkomponenten während der Lagerung. Mittels Elektronenspinresonanz (ESR) wurde das Signal von freiem Fe^{3+} bestimmt, welches im Laufe der Bieralterung anstieg. Demnach wird in frischem Bier vorhandenes Fe^{2+} im Verlauf der Lagerung zu Fe^{3+} oxidiert. Dabei entstehende Hydroxylradikale führen letztlich zu Trübungen und zur Alterung des Bieres. Dieser Oxidationsprozess ist als Fenton-Reaktion bekannt:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$ [*ibd.*].

Das entstehende freie Fe^{3+} kann wieder reduziert werden, was zu einem katalysierten Radikalbildungsmechanismus führt, einem so genannten Redox-Cycling. Der Radikalbildungsprozess im Zusammenhang mit Eisen wird in Abschnitt 6.5.2 nochmals genauer betrachtet.
Aufgrund der durch Radikale eingeleiteten Oxidationsprozesse entstehen aliphatische und ungesättigte Aldehyde, welche mitverantwortlich für den *off-flavor* von gealtertem Bier sind. Die Oxidation findet an verschiedenen Bierkomponenten wie Alkohole, Hopfenbitterstoffen (zum Beispiel Isohumulone) und ungesättigte Fettsäuren statt.

Letztere spielen mengenmäßig im Bier bzw. in der Gerste nur eine geringe Rolle. Sie bilden jedoch, wie im vorherigen Abschnitt am Beispiel des *trans*-2-Nonenal beschrieben, äußerst aromaaktive Verbindungen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure, die während der Malzbereitung und beim Maischen enzymatisch oder durch Autooxidation abgebaut werden. Der enzymatische Abbau erfolgt beispielsweise während der Keimung der Gerste durch Lipoxygenasen zu Hydroperoxiden und anschließender Spaltung durch Hydroperoxidlyasen. Die Autooxidation als typisches Beispiel eines Radikalkettenmechanismus führt über Peroxy-, Alkoxy- oder Alkylradikalen zu geruchslosen Monohydroperoxiden. Durch β-Spaltung werden dann flüchtige Verbindungen, hauptsächlich Aldehyde, gebildet.
Die durch Metallionen hervorgerufenen Oxidationsprozesse wurden durch Zugabe von DTPA oder EDTA zu den untersuchten Proben durch Chelatisieren der Eisenionen unterdrückt.
Eine Möglichkeit die Alterung von Bier während der Lagerung sehr gut zu verfolgen, bietet die Chemilumineszenz (CL) [64]. Kaneda *et al.* haben verschiedene CL Techniken entwickelt, um Brauprobleme zu untersuchen [65]. Wurde frisches Bier bei 60 °C forciert gealtert, blieb die CL für 30 Minuten konstant. Danach stieg diese an und erreichte nach 50–70 Minuten ein Maximum, um anschließend langsam abzusinken. Die CL von oxidiertem Bier hat die maximale Intensität bei 450, 480, 510, 550 und 580 nm. Carbonylkomponenten besitzen Maxima bei 440 nm und zwischen 520 und 530 nm, Singulett Sauerstoff u.a. bei 480, 520, 580 und 635 nm. Kaneda *et al.* haben ebenfalls die Rolle von aktivem Sauerstoff während des „*flavor staling*“ von Lagerbier mittels CL untersucht [66], wobei 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazol[1,2-alpha] pyrazin-3-on (CLA) benutzt wurde. Diese Verbindung reagiert nur mit aktiven Sauerstoffspezies wie $^1O_2$ und O_2^- und zeigt somit eine sehr spezifische Lumineszenz bei Anwesenheit Letzterer [67,68].

6.5.2 Verständnis Eisen-Radikal Mechanismen

Die Bildung von Hydroxy-Radikalen in Systemen die $^{\bullet}O_2^-$ und H_2O_2 erzeugen, erfordert die Anwesenheit eines geeigneten Metallionen Katalysators [69]. Eine Vielzahl von Ionen wie Cu^{2+}, Ti^{3+}, Co^{2+} und Cr^{2+} sind gut untersuchte $^{\bullet}OH$ Promotoren, aber gerade das Eisen rückt immer mehr als Promoter in den Fokus der Forschung. Freie Eisenionen sowie Komplexe mit organischen Säuren, phenolischen Verbindungen, Proteinen, Sulfiden beschleunigen die $^{\bullet}OH$ Generierung [70]. Ob und wie stark diese Komplexe in der Lage sind in den Redoxvorgängen der Fenton-Reaktion zu interagieren (diese zu beschleunigen oder zu hemmen), spielt eine immer wichtigere Rolle. Sehr gut untersuchte und verstandene Systeme *in vivo* sind eisenbindende Proteine wie Ferritin, Lactoferrin, Transferrin sowie Hämoglobin. Zum Beispiel ist die sehr schnelle Oxidation von Oxyhämoglobin durch Zugabe von H_2O_2 für einen Organismus von zentraler Bedeutung. Das entstehende Methämoglobin, bei dem das enthaltende Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert wurde, wird schnell unter Abgabe des Eisens abgebaut. Das frei werdende Eisen kann reduziert werden und regiert mit weiterem H_2O_2 unter Bildung von $^{\bullet}OH$ in einer Fenton-Typ Reaktion.
Solche Prozesse laufen in ähnlicher Form auch in der Biermatrix ab. Durch den Brauprozess vorwiegend in der Oxidationstufe +II vorhandenes Eisen wird durch Proteine oder phenolische Verbindungen stabilisiert. Im Laufe der Lagerung oder bei erhöhtem „Stress“ bei falscher Lagerung wird Eisen abgegeben und in einer Fenton-Typ Reaktion oxidiert. Das entstehende Fe^{3+} kann jedoch durch biereigene reduktive

Verbindungen wieder zum Fe^{2+} reduziert werden und ist somit reaktiv im Sinne einer Fenton-Reaktion.
Als reduktive Verbindungen kommen Reduktone wie zum Beispiel die gut untersuchte Ascorbinsäure in Frage. Diese kann durch Redox-Cycling des Eisens die $^{\bullet}OH$ Generierung beschleunigen (Abbildung 6-16).

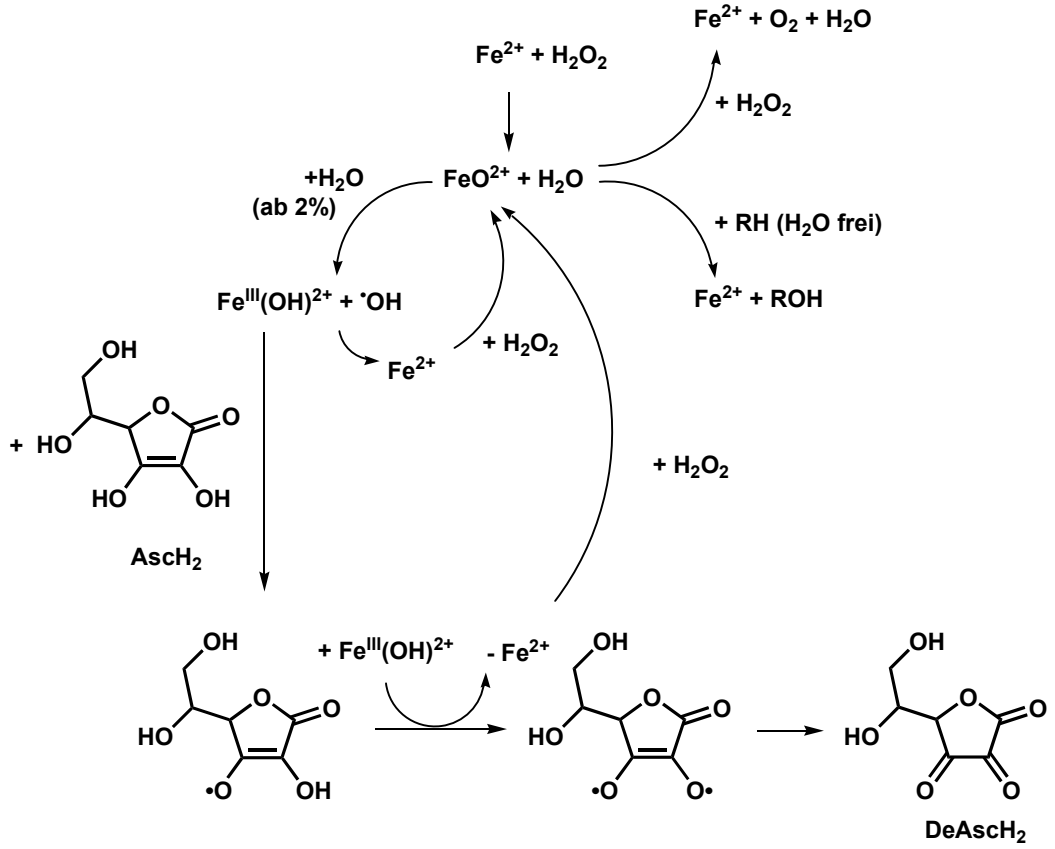


Abbildung 6-16: Redox-Cycling von Eisen(II) durch Ascorbinsäure ($AscH_2$: Ascorbinsäure, $DeAscH_2$: Dehydroascorbinsäure, FeO^{2+}: Ferrylion) [71].

Untersuchungen von Sugimoto *et al.* haben gezeigt, dass eine Verbindung als kurzlebiges Intermediat entstehen kann, die bei Zugabe von Desferrioxamin partiell gehemmt wird. Bei dieser Verbindung scheint es sich um eine Ferryl-Verbindung zu handeln. Nach Sugimoto *et al.* besteht dieser Resonanz-Hybrid aus drei Oxidationsstufen und besitzt nach außen hin die Valenzenladung +IV:

$FeO^{2+} \rightarrow [Fe^{II}O \leftrightarrow Fe^{IV}{=}O \leftrightarrow Fe^{III}(^{\bullet}O^{-})]$ [*ibd.*].

Sie ist äußerst reaktiv, wenn auch etwas weniger als $^{\bullet}OH$ [69, 70, 71].

6.5.3 Bestimmung radikalischer Spezies

Um Aussagen über das Ausmaß der Entstehung von Radikalen und den antioxidativen Eigenschaften von Proben machen zu können, findet die Elektronenspinresonanz Anwendung. Mit dieser Untersuchungsmethode ist es möglich Substanzen zu untersuchen, die ungepaarte Elektronen und somit ein permanentes magnetisches Moment besitzen. Die ESR macht sich dabei den Zeeman-Effekt zunutze, bei dem es zu einer Aufhebung der Entartung der energetischen Niveaus von ungepaarten Elektronen in einem äußeren magnetischen Feld kommt. Die Höhe der Energiedifferenz der Aufspaltung ist abhängig von der Stärke des magnetischen Feldes H und es gilt:

$$g * \mu_0 * \mu_B * H = h * f$$

g : Landé-Faktor; μ_0 : magnetische Feldkonstante; μ_B : Bohrsches Magneton;
H : magnetisches Feld; h : plancksches Wirkungsquantum; f : Frequenz .

Bei den Bedingungen der ESR liegt die Energiedifferenz der Aufspaltung im Mikrowellenbereich. Bei Anregung mittels hochfrequenter Wechselfelder bei 9 bis 10 GHz erfolgt Resonanzabsorption, welche registriert wird. Instrumentell wird üblicherweise die Frequenz der Mikrowellenstrahlung konstant gehalten und die Magnetfeldstärke verändert.

Für diese Arbeit werden ESR-Messungen in Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Brauwesen durchgeführt. Prinzipiell dienen die Messungen nicht der Strukturaufklärung, sondern vielmehr der mengenmäßigen Bestimmung von Radikalen sowie der reduzierenden Eigenschaften der untersuchten Proben, wobei verschiedene Techniken zur Anwendung kommen. Um die äußerst schnell abreagierenden freien Radikale erfassen zu können, werden die Untersuchungen mit Hilfe von Spin-Trapping-Reagenzien oder stabilisierten Radikalen durchgeführt. Mit dem Spin-Trap-Reagenz α-(4-Pyridyl-1-oxid)-N-*tert*-butylnitron (POBN) wird das so genannte endogene antioxidative Potential (EAP) sowie die T-Werte der Proben bestimmt (siehe Abschnitt 8.9). Dahingegen wird die so genannte Reducing Activity mit dem stabilisierten 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazinradikal bestimmt (Abschnitt 8.10) [72].

7 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Formel	Molmasse [g/mol]	Reinheit/ Konzentration	Firma	CAS
(E,E)-2,4-Decadienal	$C_{10}H_{16}O$	152,23	techn. 85 %	Sigma Aldrich	25152-84-5
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	394,32	95 %	Sigma Aldrich	1898-66-4
2,4-Dinitrophenylhydrazin	$C_6H_6N_4O_4$	198,14	p.a., 50 % in H_2O	Fluka	119-26-6
2-Methylbutanal	$C_5H_{10}O$	86,13	95 %	Sigma Aldrich	96-17-3
2-Methylpropanal	C_4H_8O	72,11	99 %	Sigma Aldrich	78-84-2
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-oxo-propionsäure	$C_9H_8O_5$	196,16	≥ 95 %	Fluka	4228-66-4
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	$C_9H_{10}O_3$	166,18	≥ 98 %	Fluka	501-97-3
3,4-Dihydroxybenzoesäure	$C_7H_6O_4$	154,12	≥ 98 %	Fluka	99-50-3
3-Methylbutanal	$C_5H_{10}O$	86,13	rein	Merck	590-86-3
4-Methoxyzimtsäure	$C_{10}H_{10}O_3$	178,18	≥ 98 %	Fluka	830-09-1
Acetaldehyd	C_2H_4O	44,1	99,5 %	Sigma Aldrich	75-07-0
Aceton	C_3H_6O	58,08	p.a.	Carl Roth	67-64-1
Acetonitril	C_2H_3N	41,05	HPLC grade, ≥ 99,9 %	Carl Roth	75-05-8
Ammoniumeisen(II)sulfat	$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$	284,05	p.a.	Sigma Aldrich	10045-89-3
Ammoniumeisen(III)sulfat	$NH_4Fe(SO_4)_2$	266,00	p.a.	Sigma Aldrich	10138-04-2
Benzaldehyd	C_7H_6O	106,13	99 %	Sigma Aldrich	100-52-7
Butanal	C_4H_8O	72,11	99 %	Sigma Aldrich	123-72-8
Essigsäure	$C_2H_4O_2$	60,05	p.a.	Carl Roth	64-19-7
Ethanol	C_2H_6O	46,07	p.a.	Merck	64-17-5
Ethylacetat	$C_4H_8O_2$	88,11	p.a.	Fisher Scientific	141-78-6
Ferulasäure	$C_{10}H_{10}O_4$	194,19	≥ 99 %.	Fluka	1135-24-6
Formaldehyd	CH_2O	30,03	37 %	Sigma Aldrich	50-00-0
Hexanal	$C_6H_{12}O$	100,16	97 % +	Fluka	66-25-1
Hydroxykaffeesäure	$C_9H_8O_5$	196,16	≥ 98 %	Fluka	6093-59-0
Kaffeesäure	$C_9H_8O_4$	180,16	≥ 95 %	Fluka	331-39-5
Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat	$C_6FeK_4N_6*3H_2O$	422,34	p.a.	Sigma Aldrich	13943-58-3
Kaliumhydroxid	KOH	56,11	p.a.	Merck	1310-58-3
m-Cumarsäure	$C_9H_8O_3$	164,16	≥ 98 %	Roth	14755-02-3
Methanol	CH_4O	32,04	p.a.	Merck	67-56-1
Methanol	CH_4O	32,04	HPLC grade, ≥ 99,9 %	Merck	67-56-1
Methanol-d4	CD_4O	36,04	≥ 99,8 %	Euriso-top	811-98-3
Methansäure	CH_2O_2	46,03	98 %	Fluka	64-18-6
Methylmercaptopropionaldehyd (Methional)	C_4H_8OS	104,17	rein	Merck	3268-49-3
Natriumhydroxid	NaOH	40,00	p.a., 1 M	Bernd Kraft	1310-73-2
n-Hexan	C_6H_{14}	86,18	p.a.	Carl Roth	110-54-3
o-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)-hydroxylamin hydrochlorid	$C_7H_5ClF_5NO$	249,57	99 % +	Alfa Aesar	57981-02-9
o-Cumarsäure	$C_9H_8O_3$	164,16	≥ 97 %	Fluka	614-60-8
o-Phenylendiamin	$C_6H_8N_2$	108,14	umkristallisiert	Fluka	95-54-5
o-Phosphorsäure	H_3PO_4	98,00	85 %	Carl Roth	7664-38-2
p-Cumarsäure	$C_9H_8O_3$	164,16	≥ 98 %	Sigma-Aldrich	7400-08-0
Pentanal	$C_5H_{10}O$	86,13	98 % +	Fluka	110-62-3
Phenylacetaldehyd	C_8H_8O	120,15	98 %	Acros	122-78-1

Chemikalie	Formel	Molmasse [g/mol]	Reinheit/ Konzentration	Firma	CAS
Phenylacetaldehyd	C_8H_8O	120,15	90 % +	Sigma Aldrich	122-78-1
Propanal	C_3H_6O	58,08	97 %	Sigma Aldrich	123-38-6
Salzsäure	HCl	36,46	p.a., mind. 37 %	Bernd Kraft	7647-01-0
Sinapinsäure	$C_{11}H_{12}O_5$	224,21	≥ 98 %	Sigma-Aldrich	530-59-6
tert-Butylmethylether	$C_5H_{12}O$	88,15	p.a.	Merck	1634-04-4
trans-Zimtsäure	$C_9H_8O_2$	148,16	≥ 99 %	Sigma-Aldrich	140-10-3
Trichloressigsäure	$C_2HCl_3O_2$	163,39	p.a.	Merck	76-03-9
Zinkacetatdihydrat	$C_4H_6O_4Zn*2H_2O$	219,50	p.a.	Sigma Aldrich	5970-45-6
α,α'-Dipyridil	$C_{10}H_8N_2$	156,19	p.a.	Sigma Aldrich	366-18-7

Ferulasäure-Stammlösung (0,5 mM)
10 mg Ferulasäure [M = 194,19 g/mol] werden in 100 mL Phosphatpuffer (pH 5,5) gelöst.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
Ferulasäure	$C_{10}H_{10}O_4$	H 315-319-335 P 261-305, 351, 338	

Phosphatpuffer (0,02 M, pH 5,5)
2,72 g Kaliumdihydrogenphosphat [M = 136,09 g/mol] werden eingewogen und in 1000 mL deio. Wasser gelöst. Separat werden 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat [M = 141,96 g/mol, wasserfrei] in 100 mL deio. Wasser gelöst. Die Einstellung des pH-Werts erfolgt durch tropfenweise Zugabe der Natriumhydrogenphosphatlösung zur Kaliumhydrogenphosphatlösung.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	–	–
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	–	–

***ortho*-Phenylendiamin-Lösung (*o*PDA-Lösung; 65 mM)**
351,5 mg *ortho*-Phenylendiamin [M = 108,14 g/mol] werden eingewogen und in 50 mL Methanol HPLC grade gelöst. Die Lösung muss in Alufolie gewickelt im Tiefkühler aufbewahrt werden. Sobald die fertige Lösung kräftig gelb wird, muss sie entsorgt und neu angesetzt werden. Ein leichter Gelbton ist immer zu beobachten.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
ortho-Phenylendiamin	$C_6H_8N_2$	H 351-341-301-332 312-319-317-400-410 P 281-273-302+352 305+351+338-309+310	

2,3-Diphenylchinoxalin-Lösung (2,3-DPC-Lösung; 7,1 mM)
100,2 mg 2,3-Diphenylchinoxalin [M = 282,3 g/mol] werden eingewogen und in 50 mL Methanol HPLC grade gelöst. Die Lösung ist bei 4 °C im Kühlschrank haltbar.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
2,3-Diphenylchinoxalin	$C_{20}H_{14}N_2$	H 315-H319-H335 P 261-305+351+338	

PFBOA-Lösung (100 mM)
Zur Herstellung der PFBOA-Stammlösung werden circa 250 mg *o*-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl) hydroxylaminhydrochlorid [M = 249,57 g/mol] in einen 10 mL Messkolben eingewogen und mit deio. Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird alle zwei Wochen frisch angesetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Kühlschrank.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
o-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl) hydroxylamin hydrochlorid	$C_7H_5ClF_5NO$	(S22-24/25)	–

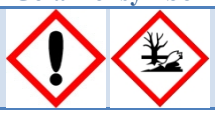
2,4-DNPH-Lösung (2 mM)
Zur Herstellung der Stammlösung werden circa 54 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin [40 % in H_2O; M = 198,14 g/mol] in einem 100 mL Messkolben eingewogen und mit Methanol aufgefüllt. Die Lösung wird alle zwei Wochen frisch angesetzt. Die Lagerung erfolgt im Gefrierschrank bei etwa -20 °C.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
2,4-Dinitrophenylhydrazin	$C_6H_6N_4O_4$	H 228-302-319 P 210- 305+351+338	

Carrez I (360 mM)
Zur Herstellung werden 38 g Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat [M = 422,34] eingewogen und in 250 mL deio. Wasser gelöst. Die Lösung ist bei 4 °C im Kühlschrank lange haltbar.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat	$C_6FeK_4N_6*3H_2O$	H 412 P 273	–

Carrez II (1 M)
Zur Herstellung werden 57 g Zinkacetatdihydrat [M = 219,50] eingewogen und in 250 mL deio. Wasser gelöst. Die Lösung ist bei 4 °C im Kühlschrank lange haltbar.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
Zinkacetatdihydrat	$C_4H_6O_4Zn*2H_2O$	H 302-410 P 262-273	

Eisen(III)sulfat-Lösung (0,56 mM) – Lösung A
150 mg Ammoniumeisen(III)sulfat [M = 266 g/mol] werden in einen 50 mL Messkolben eingewogen und mit 5 mL deio. Wasser sowie 0,2 mL konz. Schwefelsäure versetzt. Nach dem Lösen wird mit deio. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
Ammoniumeisen(III) sulfat	$NH_4Fe(SO_4)_2$	H 290	

α,α′-Dipyridil-Lösung (0,32 mM) – Lösung B
50 mg α,α′-Dipyridil [M = 156,19g/mol] werden in einem 50 mL Messkolben eingewogen und mit 45 mL deio. Wasser sowie 4 mL 0,1 N Schwefelsäure versetzt. Nach dem Lösen wird mit deio. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
α,α′-Dipyridil	$C_{10}H_8N_2$	H 301+311 P 260-280- 302+352-309-310	

Eisen(II)sulfat-Lösung (10 mM) – Mohrsches Salz Kalibrierlösung
147 mg Ammoniumeisen(II)sulfat [M = 294,05 g/mol] werden genau in eine 50 mL Messkolben eingewogen und mit deio. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
Ammoniumeisen(II)sulfat	$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$	–	–

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-Stammlösung (1,9 mM)
733 mg 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl [M = 394,32 g/mol] werden genau in einen 100 mL Messkolben eingewogen und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt.

Substanz	Formel	H und P	Gefahrensymbol
2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	H 317-334 P261-280-342+311	

Phenolcarbonsäuren-Stammlösung (10 mM)
Eine entsprechende Menge Phenolcarbonsäure wird in 9,8 mL Reinstwasser und 0,2 mL Acetonitril gelöst.

Substanz in mg	Molmasse [g/mol]	H und P	Gefahrensymbol
Kaffeesäure - 18,0	180,16	H 315-319-335-351-361 P 261-281-305+351+338	
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure - 16,6	166,18		
Hydroxykaffeesäure – 19,6	196,16		
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-oxo-propionsäure – 19,6	196,16		
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure – 16,6	166,18		
Ferulasäure – 19,4	194,19	H 315-319-335 P: 261-305+351+338	
p/o/m-Cumarsäure – 16,4	164,16	H 301-315-319-335 P 261-P301+P310-P305 + P351 + P338	
4-Methoxyzimtsäure – 17,8	178,18	H315-319-335 P261-305+351+338	
3,4-Dihydroxybenzoesäure – 15,4	154,12	H315-319-335 P261-305+351+338	
Sinapinsäure – 22,4	224,21	H315-319-335 P261-305+351+338	
trans-Zimtsäure – 14,8	148,16	H315-319-335 P261-305+351+338	

8 Methodenteil

8.1 Probennahme im Sudhaus

Am Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Brauwesen wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt (Sud 1: 100 % Pilsner Malz und Sud 2: 90 % Pilsner Malz und 10 % Caramalz (Herstellung bei 150–180 °C)).
Während der so genannten Sudhausarbeit der Brauansätze wird die Würze durch mehrere Temperier- und Kochschritte aus Malz, Wasser und Hopfen gewonnen. Die Sudhausarbeit lässt sich in die Schritte unterteilen: Maischen, Abläutern, Kochen und Kühlen.
An bestimmten Punkten der Prozessabfolge werden Proben genommen (Tabelle 8-1) und in Hinblick der stofflichen Veränderung von α-Dicarbonylverbindungen, Aldehyden sowie Ferulasäure und Kohlenhydraten untersucht. Weiterhin wurden die antioxidativen Charakteristika der Proben bestimmt. Die Daten der antioxidativen Eigenschaften sollen der Interpretation der restlichen Werte und einer molekularen Korrelation dienlich sein.

Tabelle 8-1: Probennahmepunkte während der Sudhausarbeit

Nummer	Zeit [min]	Probenahmepunkt
#1	0	Einmaischen
#2	9	vor der 1. Rast
#3	39	nach der 1. Rast
#4	45	vor der 2. Rast
#5	65	vorm Läutern
#6	146	Vorderwürze
#7	275	Pfanne Voll
#8	289	Kochbeginn
#9	294	nach Hopfen
#10	319	30 min Kochen
#11	349	60 min Kochende
#12	419	nach Whirl
#13	430	Anstellwürze

Die Auswahl der Probenahmepunkte erfolgt bei definierten Temperaturänderungen während des Prozesses. Der schematische Ablauf des verwendeten Hochkurz-Maischverfahrens ist in Abbildung 8-1 auf Seite 42 dargestellt. Es wird mit 30 kg geschrotetem Malz und 100 L Brauwasser bei 62 °C eingemaischt. Während der zwei folgenden Rasten bei 66 °C sowie 72 °C werden hochmolekulare Malzbestandteile durch malzeigene Enzyme zu niedermolekularen wasserlöslichen Verbindungen abgebaut, wobei verschiedene Enzyme wie α- und β-Amylase, Grenzdextrinase, Maltase und Saccharase beim entsprechenden Temperaturoptimum wirken. Im Anschluß folgt das Abmaischen bei 78 °C und die gewonnene Maische wird nun im Läuterbottich einem Filtrationsprozess unterworfen. Über einem geschlitzten Senkboden erfolgt der Einfluss der Maische unter Ausbildung des Trebers durch Ablagern unlöslicher Bestandteile. Durch die so gebildete Filterschicht wird zunächst die Vorderwürze abgeläutert und es folgen drei Nachgüsse mit heißem Brauwasser von je ca. 40 L, um im Treber verbliebene Würze auszuwaschen (Anschwänzen). Die so gewonnene Pfannevollwürze, mit einem Volumen von ca. 200 L, wird zum Kochen

gebracht, um den gewünschten Extraktgehalt zu erreichen, restliche Enzyme zu denaturieren und durch Gerinnen abzuscheiden sowie die Würze zu sterilisieren. Kurz nach Kochbeginn erfolgt die Hopfengabe und die Temperatur wird ungefähr eine Stunde lang gehalten, bis der Extraktgehalt ca. 11,5 % beträgt, was mittels Glasspindel während des Kochprozesses kontrolliert wird. Ist der gewünschte Extraktgehalt erreicht, wird die Würze in einen Whirlpool tangential eingeleitet, wobei sich ausgefallene Bestandteile (Heißtrub) als Kegel in der Mitte der rotierenden Lösung absetzen. Die klare Ausschlagwürze wird im Gegenstromverfahren abgekühlt und als Anstellwürze in Gärtanks gepumpt, wo durch Zugabe der Hefe der Gärprozess in Gang gesetzt wird.
Das Brauverfahren ist für beide Sude gleich. Die während der Sudhausarbeit gewonnenen Proben unterliegen während des Prozesses starken Schwankungen der enthaltenen Wassermenge. Für die verbesserte Vergleichbarkeit werden die Messwerte daher standardisiert. Es muss eine Messgröße als Bezugspunkt gewählt werden, welche das Aufkonzentrieren oder Verdünnen deutlich macht. Als Messgröße kommt der Extrakt in Frage, der alle während des Einmaischens in Lösung gehenden Stoffe umfasst. Die erhaltenen Ergebnisse werden unterschiedlich betrachtet. Zum Einen direkt ohne Korrektur bzgl. des Extraktes und zum Anderen bezogen auf 12 % Extrakt. Das Bezugssystem ist notwendig, da während der gesamten Sudhausarbeit der Extraktgehalt durch Verdünnen und Einkochen stark schwankt. Da der Extrakt die Summe aller nichtflüchtigen Stoffe umfasst, kann hier auf die ermittelten Werte des Extraktes relativiert werden. Für die Ausschlagwürze wird ein Extraktgehalt um 11,5 % angestrebt. Um diesen Wert zu erreichen wird der gesamte Brauprozess standardmäßig kontinuierlich kontrolliert. Mit den ermittelten Extraktwerten werden die Gehalte auf 12 % standardisiert. Die entsprechenden Werte von Sud 1 und Sud 2 sind in Tabelle 12-15 und Tabelle 12-16 im Anhang aufgeführt.

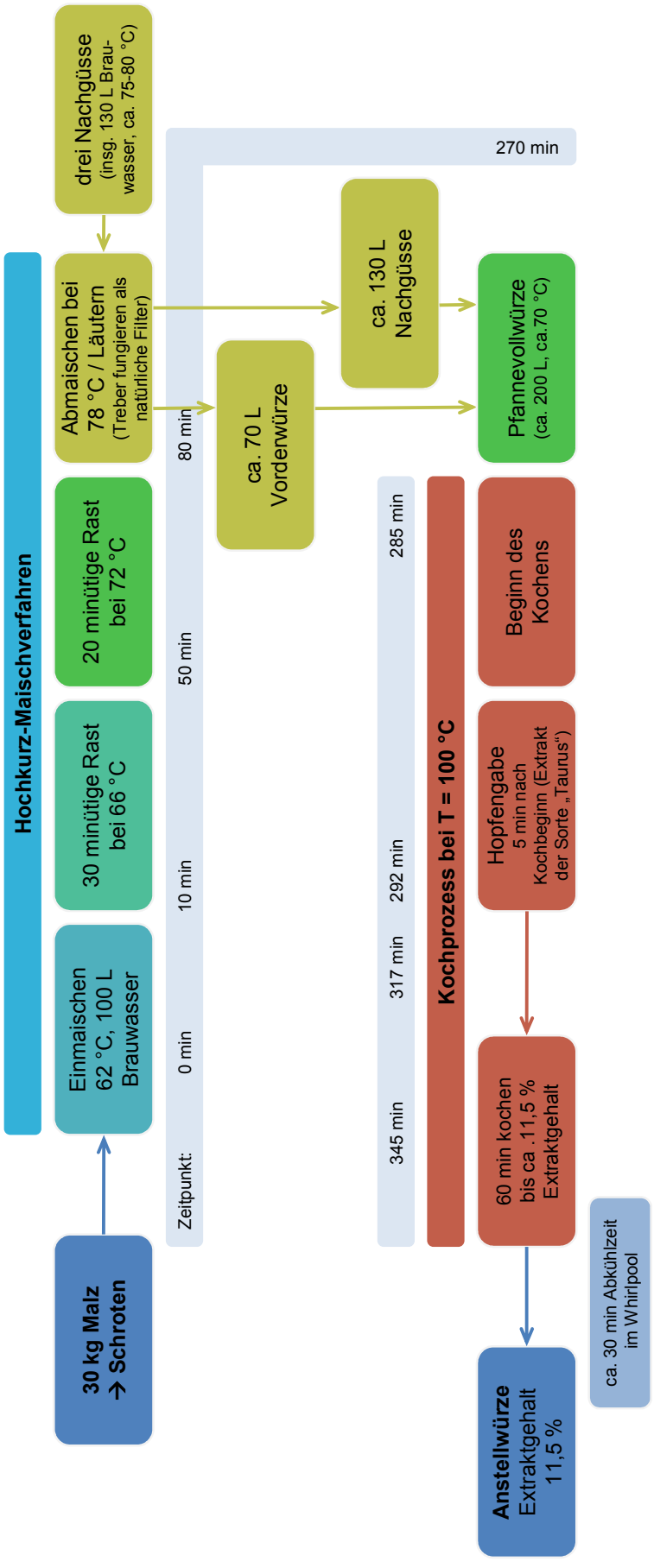


Abbildung 8-1: Fließschema zum verwendeten Brauverfahren für Sud 1 und Sud 2 mit eingesetzten Rohstoffmengen und Temperaturen.

8.1.1 Aufbereitung der Sudhausproben für Sud 1 und Sud 2

Für die Bestimmung der α-Dicarbonylverbindungen werden ca. 30 mL der Sudhausproben direkt nach der Probennahme mit 15 mL einer 65 mM methanolischen *o*PDA-Lösung versetzt und sofort im Wasserbad gekühlt. Zur Aufbewahrung werden die Proben bei -18 °C gelagert. Die bei Raumtemperatur aufgetauten Proben werden in

verschließbare Zentrifugengläser überführt und für fünf Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und 15 mL davon mit 5 mL Trichloressigsäure (20 % in Methanol) zur Fällung von Proteinen und anderer Matrix versetzt. Das verschlossene Zentrifugenglas wird für eine Stunde bei -18 °C zur Vervollständigung der Fällung gelagert und abermals 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird kalt filtriert und mit 1 N NaOH versetzt (vier Teile Probe, ein Teil NaOH-Lösung). Die Lösung kann dann direkt in der HPLC vermessen werden (siehe Abschnitt 8.4 Seite 46). Zur Bestimmung der Aldehyde wird die nach der zweiten Zentrifugation gewonnene Lösung zur Bestimmung der α-Dicarbonyl-verbindungen verwendet und entsprechend Abschnitt 8.5.2 Seite 52 aufgearbeitet. Zur Bestimmung von Ferulasäure werden die Proben in 100 mL Zentrifugengläser bei 4000 rpm 45 Minuten zentrifugiert und der Überstand durch harte Filter abdekantiert. Das Filtrat kann direkt vermessen werden; injiziert werden maximal 20 µL (siehe Abschnitt 8.7 Seite 57).

8.2 Untersuchungen im Würzemodell

Zur Untersuchung der Einflüsse von Maillard-Produkten im System Bier, ist ein Verständnis der Reaktionen in einer vereinfachten Matrix unumgänglich. Diese Matrix soll der Würze während der Sudhausarbeit ähneln, aber dennoch einfach genug sein, um mögliche störende Einflussfaktoren auszuschließen. Daher handelt es sich bei dem verwendeten Modell um eine der Literatur entnommenen Variante nach Hashimoto *et al.* [54]. Dieser hatte sich in den 1970er Jahren mit Reaktionen und Mechanismen beschäftigt, die zur Bildung von flüchtigen Aldehyden und zur Bräunung im Bier beitragen.
Das Modell besteht aus Maltose, D-Glukose, D-Xylose und einer Aminosäure in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5. Für die Versuche wurden die Aminosäuren L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Prolin und L-Threonin verwendet.

8.2.1 Durchführung Grundmodell

7,2 g Maltose, 1,8 g D-Glukose, 150 mg Xylose sowie optional 150 mg einer Aminosäure werden in 100 ml 0,02 M Phosphatpuffer (pH 5,5) gelöst. Jeweils 2 mL der Lösung werden in 10 mL Spießampullen gefüllt. Diese werden über einem Bunsenbrenner zugeschmolzen und für die Zeiten 0, 20, 40, 60, 90, 120 und 240 Minuten bei 100 °C in einem Heizblock erhitzt. Die abgekühlten Ampullen werden aufgebrochen und mit 20 µL internem Standard (2,3-DPC; 7,1 mM) versetzt. Aus der Lösung werden Farbe (420 nm), α-Dicarbonylverbindungen und Aldehyde bestimmt. Die erhitzte und mit *o*PDA versetzte Lösung kann direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt werden (0,4 mL erhitztes Biermodell + 0,1 ml *o*PDA 65 mM in Methanol; siehe Abschnitt 8.4.1). Die mit *o*PDA versetzte Lösung wird ebenfalls zur Bestimmung der

Carbonylverbindungen verwendet und einer Derivatisierung mit DNPH unterzogen (siehe Abschnitt 8.5.2). Die einfachste Möglichkeit der Bestimmung von Farbänderungen besteht in der spektroskopischen Absorptionsmessung. Hierfür werden 600 µL der Lösung photometrisch bei 420 nm gegen deio. Wasser gemessen [73, 74, 75, 76].

8.2.2 Erweitertes Modell mit Aminosäuren

Für die Versuche mit Aminosäuren werden L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Prolin und L-Threonin verwendet. Dazu werden dem Grundmodell (8.2.1) ca. 150 mg der entsprechenden Aminosäure hinzugefügt. Die weiteren Schritte erfolgen analog denen des Grundmodells.
Als Abwandlung der Modellversuche, um die Reaktivitäten der einzelnen Aminosäuren untereinander in Bezug auf die Würzemodelle besser einschätzen zu können, sind die Aminosäuren L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Threonin und L-Arginin in der selben Molarität (20 mM) angesetzt worden. Die weiteren Schritte erfolgen analog derer des Grundmodells.

8.2.3 Würzemodelle mit Ferulasäure

Die unter 8.2.2 hergestellten Modelle werden mit 10 mL einer Ferulasäure-Stammlösung (0,5 mM) hergestellt und mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH 5,5) auf 100 mL aufgefüllt. Die weiteren Schritte erfolgen analog derer des Grundmodells.

8.2.4 Würzemodelle mit Prolin und Ferulasäure

Bei dem Würzemodell mit der Aminosäure L-Prolin wird die Versuchszeit bis 240 Minuten verlängert. Die folgenden Schritte bzw. die Aufarbeitung der Proben erfolgt analog derer des Grundmodells. Zusätzlich werden für diese Modelle bei der Probenaufarbeitung weitere 50 µL der gebräunten Lösung zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität nach Chapon sowie 100 µL zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels ESR verwendet.

8.2.5 D-Glukoselösung bei 150 °C

Für diesen Versuch werden 18 g D-Glukose in 100 mL Phosphatpuffer gelöst und jeweils 2 mL für 10, 30, 60, 120 und 240 Minuten im Thermoblock bei 150 °C erhitzt. Als zweiten Ansatz werden 11 mg Ferulasäure in 100 mL der hergestellten D-Glukoselösung gelöst und ebenfalls bei denselben Parametern erhitzt. Die abgekühlten Lösungen werden mit 40 µL internem Standard (2,3-DPC; 7,1 mM) versetzt und analog des Grundmodells behandelt. Wegen den hohen Konzentrationen werden abweichend für die ESR-Messung nur 50 µL Probe verwendet.

8.3 Untersuchung kommerzieller Biersorten

Um die Zusammensetzung von Bieren im Hinblick auf α-Dicarbonylverbindungen, Aldehyde und Ferulasäure zu bestimmen, werden kommerzielle Biere wie nachfolgend beschrieben untersucht. Die erworbenen Biere werden direkt nach dem Erwerb und nach viermonatiger Lagerung bei 6 °C analysiert (jeweils eine Flasche gleicher Charge).

Probenaufarbeitung α-Dicarbonylverbindungen
50 mL einer entgasten Bierprobe (Ultraschall, Rühren) werden mit 300 µL 2,3-DPC-Lösung (7,1 mM) und 15 mL methanolische *o*PDA-Lösung (65 mM) versetzt, gut vermischt und für 24 h bei -18 °C ausgefroren. Die Probe wird eiskalt filtriert und anschließend bei 4000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Zu 500 µL der Lösung werden 450 µL deio. Wasser und 25 µL Carrez I Lösung pipettiert, gut geschüttelt und nach 10 Minuten 25 µL Carrez II Lösung hinzupipettiert. Nach weiteren 10 Minuten wird die Mischung bei 10.000 rpm 30 Minuten bei 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wird mittels HPLC vermessen (siehe Abschnitt 8.4.1).

Probenaufarbeitung Aldehyde
450 µL des Überstandes der im vorherigen Abschnitt mit Carrez gefällten Probe werden mit 75 µL 1 N HCl und 225 µL 2 mM 2,4-DNPH-Lösung versetzt und für 30 Minuten bei 70 °C derivatisiert. Die erhaltene Lösung wird mittels HPLC analysiert (siehe Abschnitt 8.5.1).

Probenaufarbeitung Ferulasäure
Die erhaltene Lösung zur Messung von α-Dicarbonylverbindungen wird zur Bestimmung von Ferulasäure verwendet und direkt mittels HPLC vermessen (siehe Abschnitt 8.7).

8.4 α-Dicarbonylverbindungen

Aufgrund der hohen Reaktivität von α-Dicarbonylverbindungen und um weitere Reaktionen zu verhindern, ist es notwendig diese zu derivatisieren und in eine stabile Form zu überführen. Die Abfangreaktion muss schnell und quantitativ ablaufen und das Produkt stabil sein. Es stehen verschiedene Abfangreaktionen zur Verfügung, jedoch hat sich nur eine als wirklich effizient erwiesen und praktische Anwendung gefunden [77]. Abbildung 8-2 zeigt die Reaktion bei der α-Dicarbonylverbindungen mit *ortho*-Phenylendiamin in Chinoxaline überführt werden.

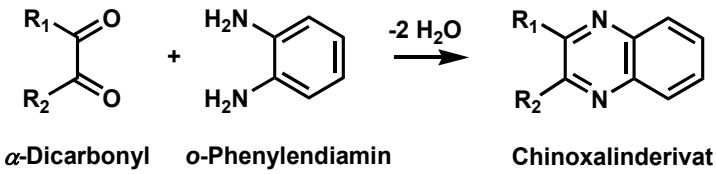


Abbildung 8-2: Derivatisierungsreaktion von α-Dicarbonylverbindungen mit *o*PDA.

ortho-Phenylendiamin wird als Abfangreagenz für α-Dicarbonylverbindungen verwendet. Unter Wasserabspaltung entstehen stabile, UV-aktive Chinoxalin-Derivate mit einem charakteristischen Spektrum wie unter Abbildung 8-3 am Beispiel des Glucoson-Chinoxalins dargestellt.

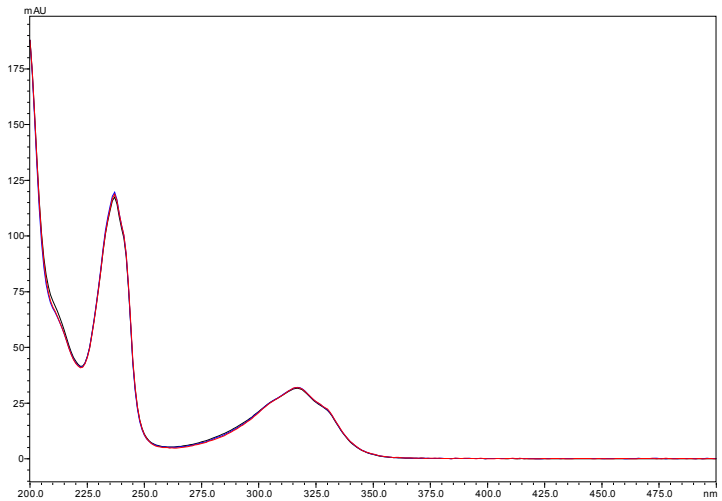


Abbildung 8-3: UV-Spektrum vom Glucoson-Chinoxalin.

Unterschiede in den Spektren zwischen den einzelnen α-Dicarbonylderivaten sind äußerst gering und betreffen die Verschiebung der Maxima um wenige Nanometer und das Höhenverhältnis derselben. Beide Effekte sind aber zu vernachlässigen. In Abhängigkeit von der Kettenlänge ist die Derivatisierung innerhalb von fünf Stunden quantitativ, wobei kurzkettige α-Dicarbonylverbindungen schneller reagieren als langkettige [78]. Die Chinoxaline können als stabil angesehen werden. Quasi Ausnahmen stellen Glyoxal und Methylglyoxal dar, bei denen sich aufgrund ihres geringen Molekulargewichts und der damit verbundenen geringfügigen Flüchtigkeit ein Verlust von ungefähr 5 und 7 % nach einer Woche ergibt. Als problematisch zu sehen

ist die Diskussion, dass *o*PDA hohen oxidativen Stress erzeugt und somit die Bildung von auf oxidativem Weg entstandenen α-Dicarbonylverbindungen fördert. Dies führt zu falsch positiven Ergebnissen bei Glucoson oder Glyoxal [79, 80].

2,3-Diphenylchinoxalin als interner Standard

Durch die Einführung des internen Standards 2,3-Diphenylchinoxalin (2,3-DPC) wird eine Quantifizierung durch internen Standard möglich. Die Struktur von 2,3-DPC ist in Abbildung 8-4 dargestellt. Die Verbindung entsteht durch Kondensation von Benzil und 1,2-Phenylendiamin, ist sehr stabil und stört die Detektion anderer Chinoxaline nicht. Aufgrund des stark unpolaren Charakters eluiert 2,3-DPC sehr spät von der Säule. Das UV/Vis-Spektrum ist mit denen der zu bestimmenden Substanzen ähnlich (Abbildung 14). Für gaschromatographische Anwendungen ist die Verbindung ebenfalls gut geeignet.

Tabelle 8-2: Liste der mittels HPLC-DAD bestimmbaren α-Diarbonylverbindungen, deren molekulare Masse, sowie der dazugehörigen Chinoxalin-Derivate

α-Dicarbonylverbindung	M [g/mol]	M (Chinoxalin-Derivat) [g/mol]
Glyoxal	58,08	130,15
Methylglyoxal	72,06	144,20
Diacetyl	86,09	158,23
1,4-Didesoxypentosulose	114,11	186,21
3-Desoxypentosulose	132,12	204,23
1,4-Didesoxyhexosulose	146,14	218,26
1-Desoxyhexosulose	162,14	234,26
3-Desoxyhexosulose	162,14	234,26
Glucoson	178,14	250,26
2,3-Diphenylchinoxalin	214,26	282,35

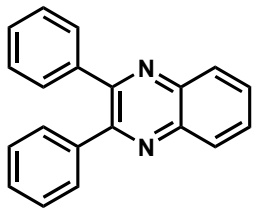


Abbildung 8-4: Struktur von 2,3-Diphenyl-chinoxalin.

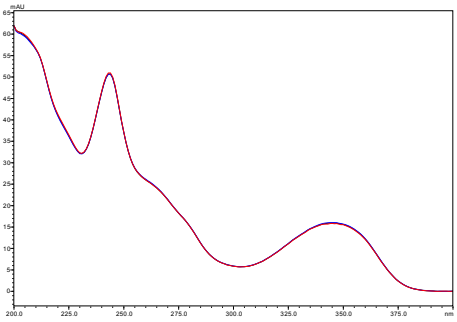


Abbildung 8-5: UV/Vis-Spektrum von 2,3-Diphenylchinoxalin.

8.4.1 Messung von α-Dicarbonylverbindungen mittels RP-HPLC-DAD

Die Analyse von Strukturen mit α-Dicarbonylcharakter erfolgt mittels RP-HPLC-DAD. Tabelle 8-4 gibt den verwendeten Methanol/Wasser-Gradient wieder. Für die Trennung der α-Dicarbonylverbindungen wird eine MN Nucleosil© Säule RP18 5 µm, 4.6 × 250 mm der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Identifizierung und Bestimmung erfolgt mittels Diodenarraydetektor (DAD). Wie unter Abschnitt 8.4 beschrieben, zeigen Chinoxaline ein charakteristisches Spektrum (Abbildung 8-3) mit zwei Maxima bei etwa 230 und 310 nm sowie zwei Minima bei 220 und 260 nm. Die Quantifizierung erfolgt bei 318 nm. Als Beispielchromatogramm ist ein Gemisch von zehn Chinoxalinen (inklusive internem Standard 2,3-DPC) in Abbildung 8-6 dargestellt (Tabelle 11-7).

Tabelle 8-3: Parameter für die Bestimmung von Carbonylverbindungen als Chinoxalin-Derivate

Säule	Laufmittel	Bedingungen
MN Nucleosil© RP18 EC 5 µm, 4.6 × 250 mm, 120 Å (Macherey–Nagel)	Methanol HPLC grade, Reinstwasser	1 mL/min; Gradient; 35 °C

Tabelle 8-4: Laufmittelgradient zur Trennung von Chinoxalinen

Zeit [min]	Methanol [Vol %]	H_2O reinst [Vol %]
0	20	80
0–10	20	80
10–25	33	67
25–32	82	18
32–39	95	05
39–41	95	05
41–46	20	80
46–51	20	80

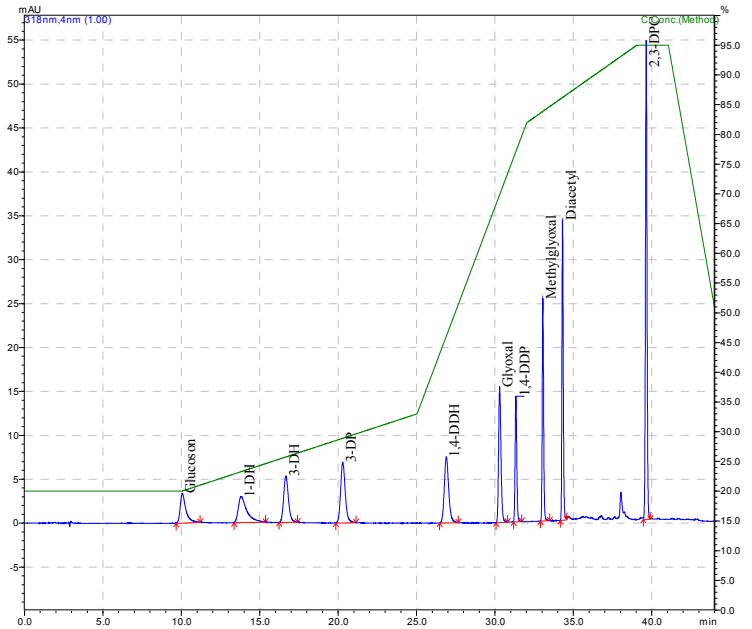


Abbildung 8-6: Chromatogramm der zehn Standard Chinoxaline.

8.4.2 Quantifizierung von α-Dicarbonylverbindungen

Die Quantifizierung während der Arbeiten im Sudhaus erfolgt mittels externer Kalibrierung und während der restlichen Versuche mit Hilfe eines internen Standards. Die Methode des internen Standards stand zum Zeitpunkt der Versuche im Sudhaus noch nicht zur Verfügung.
Die externe Kalibrierung wird durch Verdünnen eines Standardmixes (200 mg/L in deio. H_2O) mit 20 % Methanol auf 0,5–10,0 mg/L erhalten. Nach der Messung der Kalibrierreihe und durch Umstellen der erhaltenen Regressionsgeraden, kann durch Rückrechnung der gemessenen Flächen der Proben unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte der Gehalt bestimmt werden.

Die sich für die Kalibrierung ergebenden statistischen Grundwerte zeigen für die neun untersuchten Verbindungen ein sehr gutes Bestimmtheitsmaß (Tabelle 8-5).

Tabelle 8-5: Kalibrierung von α-Dicarbonylverbindungen (durchschnittlicher Response aus drei Messungen; R^2: Bestimmtheitsmaß)

	Konzentration in mg/L							
	20	15	10	7,7	5	3	0,1	R^2
Glucoson	1191634	920406	635384	467446	276550	166389	4636	0,9979
1-DH	1423469	1097665	736778	549096	330742	198319	5559	0,9989
3-DH	1414752	1117263	775442	589285	380845	228374	6720	0,9970
3-DP	1709248	1340015	925592	703982	446362	272320	8493	0,9978
1,4-DDH	1735663	1364039	943732	715679	453049	274856	8928	0,9976
Glyoxal	2283449	1799029	1232270	933388	592626	353150	11366	0,9978
1,4-DDP	1806270	1419834	981804	745319	470259	280625	9108	0,9975
Methylglyoxal	2049357	1607456	1103280	833450	524830	314950	10045	0,9980
Diacetyl	2670281	2094739	1431005	1077822	675006	401941	12556	0,9980

Tabelle 8-6: Standardabweichung der Kalibrierung von α-Dicarbonylverbindungen (Response absolut und prozentual)

	Standardabweichung (absolut)							Standardabweichung (prozentual)						
Glucoson	32129	1657	8046	12444	1545	7400	n.a.	2,7	0,2	1,3	2,7	0,6	4,4	-
1-DH	8083	17381	15603	14661	1311	21157	n.a.	0,6	1,6	2,1	2,7	0,4	10,7	-
3-DH	65233	27217	30169	22039	27958	16544	1961	4,6	2,4	3,9	3,7	7,3	7,2	5,8
3-DP	28459	11917	7733	5882	2255	4976	1545	1,7	0,9	0,8	0,8	0,5	1,8	3,6
1,4-DDH	29293	15723	8461	6865	3082	6020	1775	1,7	1,2	0,9	1,0	0,7	2,2	4,0
Glyoxal	30898	20979	17850	9094	6845	4529	845	1,4	1,2	1,4	1,0	1,2	1,3	1,5
1,4-DDP	33417	9882	14476	4525	3256	4390	1693	1,9	0,7	1,5	0,6	0,7	1,6	3,7
Methylglyoxal	34543	18571	11846	7039	5517	5140	2919	1,7	1,2	1,1	0,8	1,1	1,6	5,8
Diacetyl	33906	27824	7295	5219	2680	4789	214	1,3	1,3	0,5	0,5	0,4	1,2	0,3

Als interner Standard wird 2,3-Diphenylchinoxalin verwendet. Um den Responsefaktor zu den einzelnen α-Dicarbonylverbindungen zu ermitteln, werden drei Kalibrierpunkte mit definiertem Gehalt an Analyt und internem Standard vermessen. Die Berechnung des Response erfolgt nach der Formel:

$$c_A = x * \frac{A_A * c_{iStd}}{A_{iStd}}$$

c_A : Konzentration Analyt; x : Responsefaktor; A_{An} : Fläche Analyt;
c_{iStd} : Konzentration interner Standard; A_{iStd} : Fläche interner Standard

In Tabelle 8-7 und Tabelle 8-8 sind die ermittelten Responsewerte und errechneten Responsefaktoren enthalten.

Tabelle 8-7: Eingesetzte Konzentrationen [mg/L] und gemessener Response zur Bestimmung der Responsefaktoren von α-Dicarbonylverbindungen

	Konzentration in mg/L		
	6,078	**8,442**	**10,13**
2,3-DPC	276121	380551	465361
	Konzentration in mg/L		
	1,386	**1,155**	**0,99**
Glucoson	102725	85759	74864
1-DH	137349	113080	92773
3-DH	134788	112030	97286
3-DP	168380	141804	122210
1,4-DDH	175203	147208	127060
Glyoxal	194849	164118	140634
1,4-DDP	127484	107018	91826
Methylglyoxal	188453	158446	135908
Diacetyl	247512	207887	178357

Tabelle 8-8: Responsefaktoren für 2,3-DPC zu den untersuchten α-Dicarbonylverbindungen

	Responsefaktoren			Mittelwert	Standard-abweichung [%]
Glucoson	0,61	0,61	0,61	0,61	0,49
1-DH	0,46	0,46	0,47	0,46	1,30
3-DH	0,47	0,46	0,47	0,47	0,27
3-DP	0,37	0,37	0,37	0,37	0,92
1,4-DDH	0,36	0,35	0,36	0,36	0,80
Glyoxal	0,32	0,32	0,32	0,32	0,94
1,4-DDP	0,49	0,49	0,49	0,49	0,78
Methylglyoxal	0,33	0,33	0,33	0,33	0,85
Diacetyl	0,25	0,25	0,25	0,25	0,80

8.5 Bestimmung von Aldehyden

Für die Analyse von Aldehyden und Ketonen werden in der Literatur mehrere Möglichkeiten beschrieben. In dieser Arbeit werden zwei Methoden Anwendung finden. Zum einen erfolgt die Bestimmung als Dinitrophenylhydrazin (DNPH)-Derivate mittels HPLC vor allem aus den Sudhaus- und Modellproben. Zum anderen als Derivate des (2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl) hydroxylamin hydrochlorid mittels Gaschromatographie für trockene und stark matrixbelastete Proben.

8.5.1 Bestimmung von Aldehyden und Ketonen als DNPH-Derivat

Für die Bestimmung von Carbonylverbindungen hat sich aufgrund der hohen Reaktivität und Selektivität die Verwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) bewährt [81, 82, 83]. Abbildung 8-7 zeigt die Abfangreaktion, die mit einem nucleophilen Angriff des Hydrazins am C-Atom der Carbonylkomponente oder einem elektrophilen Angriff eines Protons am Sauerstoff der Carbonylverbindung ausgelöst wird. Anschließende Eliminierung von Wasser führt zum Hydrazon-Derivat. Die chromatografische Trennung und anschließende Bestimmung erfolgt mit RP-HPLC-DAD, da die entstehenden Hydrazone sehr stabil sind und ein charakteristisches UV/Vis-Spektrum besitzen.

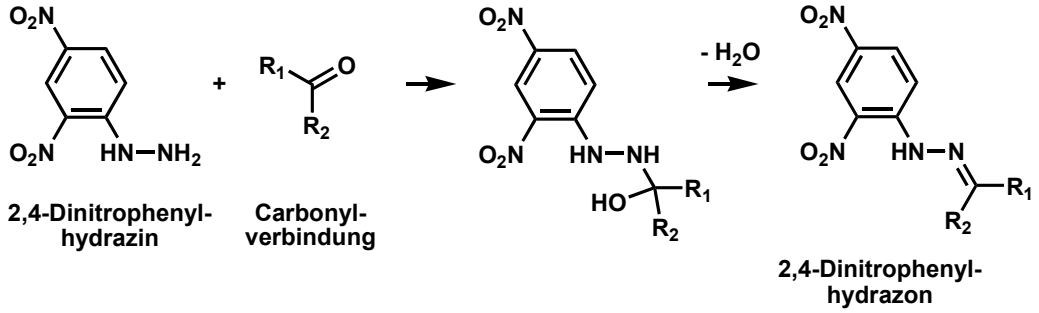


Abbildung 8-7: Derivatisierungsreaktion einer Carbonylverbindung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Die Effektivität der Reaktion ist von der Temperatur, der Reaktionszeit und der Art der Substituenten abhängig, da diese die Ladungsverteilung an der Carbonyl-gruppe und somit die Stärke des Dipolmoments bestimmen. Durch den 2,4-Dinitrophenylrest erhalten die reaktiven Wasserstoffatome am Stickstoffatom des Hydrazins eine höhere positive Partialladung. Das erhöht ebenfalls die Geschwindigkeit der Reaktion, da die Affinität zum partial negativ geladenen Sauerstoff der Carbonylgruppe steigt. Zusätzliche Protonierung des Hydrazinrestes erhöht ebenfalls die Partialladung der reaktiven Wasserstoffatome, weshalb die Reaktion bevorzugt in Gegenwart von Säuren stattfindet [84]. Die Trennung der DNPH-Derivate erfolgt mittels HPLC mit einer Sunfire© C18 3,5 µM, 3.0 × 150 mm der Firma Waters. Es wird ein Methanol/Wasser-Gradient benutzt und die Detektion erfolgt bei 360 nm, wobei 20 µL injiziert werden.

Tabelle 8-9: Parameter für die Bestimmung von Carbonylverbindungen als DNPH-Derivate

Säule	Laufmittel	Bedingungen
Sunfire© C 18 3,5 µm; 100 Å, 3.0 x 150 mm (Waters)	Methanol HPLC grade, Reinstwasser mit 0,05 % Essigsäure (reinst)	0,5 mL/min; Gradient; 50 °C

Tabelle 8-10: Laufmittelgradient für die qualitative und quantitative Bestimmung von Carbonylverbindungen als DNPH-Derivate

Zeit t [min]	MeOH [Vol %]	H_2O^* reinst [Vol %]
0	40	60
35	90	10
40	40	60
45	40	60

*0,05 % AcOH

8.5.2 Probenaufarbeitung und Identifizierung

Der optimale Ablauf der Derivatisierung von Carbonylverbindungen mit DNPH wurde im Zuge der Diplomarbeit von Carolin Poweleit (2008) bestimmt und auf die Fragestellung angewandt. Dazu werden 600 µL Probe mit 100 µL 1 N Salzsäure und 300 µL 5 mM DNPH-Lösung versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wird das Gemisch verschlossen 30 Minuten bei 70 °C im Trockenschrank derivatisiert. Wurde im Verlauf der Probenaufarbeitung Trichloressigsäure zur Fällung hinzugefügt, so werden noch 100 µL 1 N Natron-lauge nach der Derivatisierung hinzugefügt. Dieser Schritt entfällt, sollte die Probe nur leicht sauer sein. Die gewonnene Probelösung kann jetzt mittels HPLC untersucht werden.

Die Identifizierung der DNPH-Aldehyde erfolgt über die Retentionszeiten und die UV/Vis-Spektren von Standardsubstanzen. Insgesamt werden 15 Aldehyd-DNPH-Derivate als Standard-Mix vermessen. Die charakteristischen UV/Vis-Spektren weisen zwei Maxima bei 225 und 360 nm, ein Minium bei 295 nm und eine für jede Struktur individuelle Schulter bei ca. 260 nm auf. Tabelle 11-8 im Anhang fasst die Eigenschaften der gemessenen Aldehyd-Derivate zusammen.

Darstellung von Phenylacetaldehyd-DNPH

Das DNPH-Derivat von Phenylacetaldehyd war zum Zeitpunkt der durchgeführten Versuche käuflich nicht erwerblich und wurde daher selbst dargestellt. Als Produkt des Strecker-Abbaus ist es eine wichtige aromarelevante Verbindung. Das Phenylacetaldehyd-DNPH wird in Anlehnung an die Synthesearbeit des Glykolaldehyd-DNPH-Standards durch Carolin Poweleit (2008) hergestellt. Dabei reagiert 2,4-Dinitrophenylhydrazin äquimolar mit Phenylacetaldehyd. Etwa 1 g DNPH (50 % in Wasser) werden in 100 mL 2 M Salzsäure bei circa 60 °C unter Rückfluss gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 310 µL Phenylacetaldehyd (Dichte $\rho = 1{,}075$ g/mL) hinzupipettiert und das Gemisch 30 Minuten im Eisbad gerührt. Der Niederschlag wird mit je 50 mL 2 M Salzsäure und deio. Wasser gewaschen und anschließend bei 40 °C über Nacht im Trockenschrank getrocknet; nachfolgend wird aus Ethanol umkristallisiert. Der Rückstand wird mit etwas Ethanol versetzt und unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Dann wird Ethanol so lange zugegeben, bis sich der Rückstand in dem heißen Ethanol löst. Während des Abkühlens entstehen orangefarbene metallisch glänzende Plättchen. Diese sind gut in Acetonitril löslich und als Standard für die HPLC einsetzbar.

8.5.3 Quantifizierung

Die Bestimmung der Menge der identifizierten DNPH-Aldehyde erfolgt mittels externer Kalibrierung der Fläche (Tabelle 8-11).

Tabelle 8-11: Kalibrierung von DNPH-Aldehyden (Kalibrierfunktion aus drei Messungen als: rsp = a*c + b; R^2: Bestimmtheitsmaß)

Substanz (als DNPH-Derivat)	a	b	R^2	linearer Bereich [µM]	t_r [min]
Glycolaldehyd	184998	-26678	0,99994	1–50	7,0
Formaldehyd	196248	-37060	0,99992	0,5–32	10,2
Acetaldehyd	206361	-14440	0,99991	0,3–12	14,2
Acrolein	219345	-30842	0,99857	0,2–10	18,1
Aceton	188142	2896	0,99821	0,2–10	18,4
Propionaldehyd	190342	-8943	0,99876	0,2–10	19,4
Crotonaldehyd	195179	-10158	0,99971	0,2–8	22,2
Methacrolein	199759	-12884	0,99991	0,2–8	23,2
Σ Butanon/Butyraldehyd	163100	-19810	0,99978	0,2–16	23,5
Benzaldehyd	186866	-15258	0,99922	0,2–7	25,7
Phenylacetaldehyd	200333	-1314572	0,99614	5–225	26,2
Cyclohexanon	175699	-16185	0,99979	0,3–16	26,9
Valeraldehyd	158713	-5692	0,99904	0,2–7	27,3

8.6 Bestimmung von Aldehyden als PFBOA-Derivat

Eine zufriedenstellende quantitative Bestimmung von aromarelevanten Aldehyden ist vor allem im Spurenbereich infolge komplexer Matrices und der Anwesenheit einer Vielzahl anderer flüchtiger Substanzen schwierig.
Um diese Probleme zu minimieren wird die Festphasenmikroextraktion (SPME) aus dem dynamischen Headspace einer Probe verwendet. Eine komplexe Probenaufarbeitung ist nicht notwendig, was zu weniger Arbeitsschritten, einem geringeren Zeitbedarf, lösungsmittelfreiem Arbeiten und somit zu kostengünstigen Analysen führt [85]. Erstmals wurde die einfache, lösungsmittelfreie Anreicherungstechnik von Pawliszyn *et al.* 1989 vorgestellt [*ibd.*]. Ausgenutzt wird das Verteilungsgleichgewicht zwischen den in der Probe (bzw. im Gasraum über der Probe) befindlichen und den an einer beschichteten Faser adsorbierten Analytmolekülen. Die Behandlung und Aufbereitung der Proben sollte möglichst schonend erfolgen, da Temperaturerhöhungen oder Änderungen des pH-Wertes zu Veränderungen in der Aromazusammensetzung führen können.
Zwei Techniken finden zur Extraktion Anwendung: Bei der „*direct immersion*“ wird die SPME-Faser direkt in die Probe eingetaucht (meist Wasserproben). Nachteil dieser Technik ist eine nicht reproduzierbare Anlagerung von Kohlenhydraten und Eiweißen bei komplizierten Matrices. Die SPME-Faser kann daher auch nur den Headspace der Probe extrahieren. Nichtflüchtige Substanzen können somit die Extraktion nicht beeinflussen. Die Desorption der Moleküle von der Faser erfolgt thermisch im Injektor eines Gaschromatographen oder mit Hilfe von geeigneten Lösungsmitteln in einer Desorptionskammer eines SPME-HPLC-Interface.
Zur Erhöhung der Selektion von Carbonylen, bietet sich eine Derivatisierung vor der Extraktion an. Allgemein sind verschiedene Derivatisierungsmethoden in der Literatur beschrieben. Bei der Reaktion von Aldehyden mit Dinitrophenylhydrazin (siehe 8.5.1) werden die entstehenden Hydrazone vor allem mittels HPLC-DAD bestimmt [86, 87, 88, 89]. Jedoch sind die DNPH-Derivate sehr schwerflüchtig und besitzen nur eine geringe thermische Stabilität. Daher ist diese Methode für SPME nur bedingt geeignet.
Die Methode der Wahl ist die Derivatisierung mit PFBOA. Dabei werden thermisch stabile Oxim-Derivate gebildet (Abbildung 8-8), die mittels GC bestimmt werden können [90, 91].

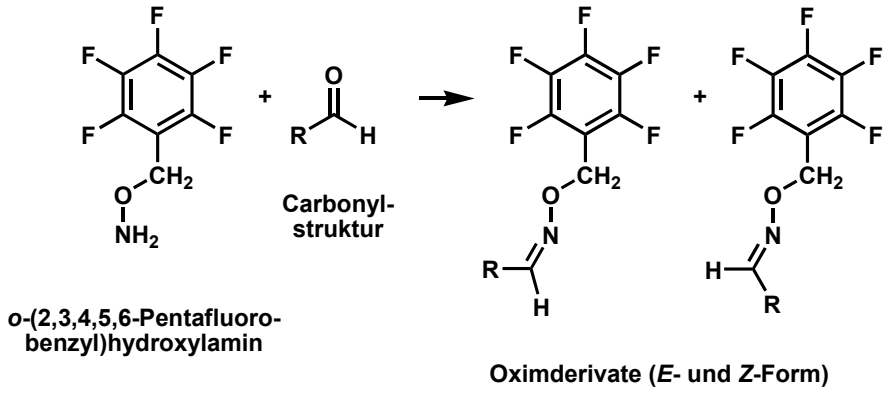


Abbildung 8-8: Abfangreaktion von Carbonylstrukturen durch PFBOA.

Die elektronegativen Fluoratome stabilisieren die Ringstruktur, so dass PFBOA und dessen Derivate unter einer Vielzahl von Bedingungen unverändert bleiben. Die Derivatisierung erfolgt in der Probe oder direkt auf der Faser (*on-fiber*).
Wie in Abbildung 8-8 ebenfalls ersichtlich, bilden die meisten Aldehyde außer Formaldehyd zwei Isomere die im Chromatogramm als Doppelpeaks erscheinen. Zur Quantifizierung wird die Summe beider Peakflächen benutzt.

8.6.1 Probenaufarbeitung

Für die Analyse werden 50 mg Probe in 18 mL Reinstwasser aufgeschwemmt. Dazu werden 1 mL einer 100 mM PFBOA-Lösung und 1 mL interner Standard gegeben. Als interne Standards werden Ethyltoluen und Decanal in einer Endkonzentration von 2–5 µg/20 mL verwendet. Das Gemisch wird in einem verschlossenen 100 mL Headspace Gläschen bei 60 °C temperiert und die vorkonditionierte (5 Minuten bei 260 °C) SPME-Faser (65 µm Poly(dimethyl-siloxan)/divinylbenzen (PDMS/DVB)) für 30 Minuten in der Lösung oder Suspension unter ständigem Rühren mittels Magnetrührstäbchen beladen. Anschließend erfolgt die Injektion in den GC. Die Desorption von der SPME-Faser erfolgt im Injektor bei 260 °C zwei Minuten lang. Die Quantifizierung erfolgt durch Responsefaktoren über den internen Standard. Die gemessenen Werte sind in mmol/kg Probe angegeben. Die Geräteparameter sind in Tabelle 8-12 dargestellt.

Tabelle 8-12: Parameter für die Bestimmung von Carbonylverbindungen als PFBOA-Derivate

Säule	Trägergas	GC-Parameter	MS-Parameter
SGE Analytical Science, BPX5 30 m x 0,25 mm ID x 0,5 µm	Helium 5.0 (99,999 %)	Injektion: flow 1 mL/min, 260 °C, splitless 1 min Temperaturprogramm: 50 °C für 4 min, 7 °C/min auf 340 °C, 5 min halten	Source 200 °C; Transferline 250 °C; scan m/z = 40-550

Die Wahl der verwendeten Faser fiel auf eine PDMS/DVB beschichtete Fiber. Von den unterschiedlichen Faserbeschichtungen erhält man bei dieser aufgrund ihrer hohen Fähigkeit zur Fixierung von PFBOA und dessen Derivate die besten Extraktionsergebnisse für die vorliegende analytische Aufgabe [92, 93].

8.6.2 Identifizierung und Quantifizierung

Die untersuchten Verbindungen werden zur Identifizierung und zur Bestimmung der Retentionszeiten einzeln als Standardsubstanzen gemessen. Von jedem Aldehyd wird eine wässrige Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/L hergestellt und wie unter 8.6.1 beschrieben aufgearbeitet und vermessen. Anhand der entstehenden typischen Fragmente der einzelnen Strukturen erfolgt dann die endgültige Zuordnung der Verbindungen.
Allen gemein ist das Fragment mit der Masse m/z = 181, ein Pentafluorobenzyl-Ion. Weiterhin zeigen sich bei aliphatischen, gesättigten Aldehyden ein weiteres typisches Fragment-Ion mit m/z = 239, das aus einer McLafferty-Umlagerung resultiert (Abbildung 8-9) [92].

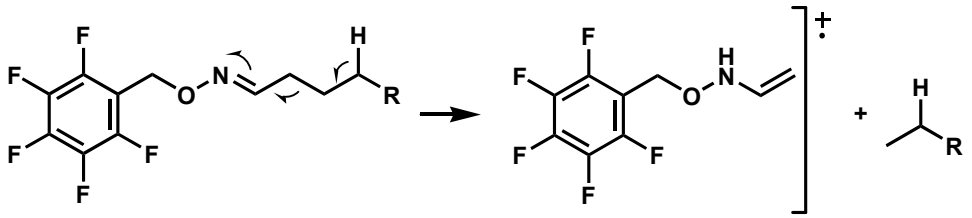


Abbildung 8-9: McLafferty Umlagerung von PFBOA-Derivaten aliphatischer gesättigter Aldehyde zu einem N-(Perfluorobenzyloxy) ethenaminion (m/z = 239) und einem aliphatischem Rest.

Im Massenspektrum von α,β-ungesättigten Aldehyden wie zum Beispiel 2,4-Decadienal entsteht das Fragment-Ion m/z = 276. Dieses ist ein N-O-CH_2-pentafluorobenzyl substituiertes Pyridinium-Ion [92].

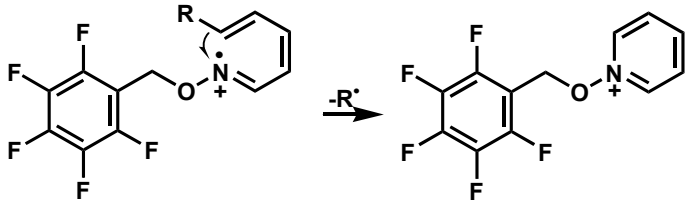


Abbildung 8-10: Entstehung eines Pentafluorobenzyl substituiertem Pyridiniumions (m/z = 276).

Mittels der internen Standards Ethyltoluen und Decanal, werden die Aldehyde quantifiziert. Die Bestimmung der Responsefaktoren erfolgt an jedem Messtag durch einen Standardmix bestehend aus: Ethyltoluen, Decanal, 2-(Methyl)butyraldehyd, 3-(Methyl)butyraldehyd, Acetaldehyd, Formaldehyd, Methional, Phenylacetaldehyd.

Verbindung [-PFBOA]	Molmasse [g/mol]	Fragmente [m/z]	t_r [min]
Fomaldehyd	225,115	181, 99, 161	10,2
Acetaldehyd	239,15	181, 209, 161	11,7; 11,8
Propanal	253,17	181, 236, 182	13,0; 13,1
2-Methylpropanal	267,19	181, 43, 195	13,7 (Summe)
Butanal	267,19	181, 239, 41	14,5; 14,6
2-Methylbutanal	281,23	181, 239, 57	15,1; 15,2
3-Methylbutanal	281,23	181, 239, 41	15,4; 15,5
Pentanal	281,23	181, 239, 41	16,0; 16,1
Hexanal	295,25	181, 239, 41	17,6; 17,7
2,4-Decadienal	347,33	181, 276, 55	26,2 (Summe)
Methional	299,26	181, 180, 65	20,0 (Summe)
Benzaldehyd	301,22	181, 180, 65	21,4; 21,5
Phenylacetaldehyd	315,25	181, 91, 117	22,3; 22,4

Quantifizierung
Die Bestimmung der Menge der identifizierten PFBOA-Aldehyde erfolgt mittels externer Kalibrierung der Summe der Fläche von *syn*- und *anti*-Isomeren. Da die Injektion manuell und nur alle 70 Minuten erfolgen kann, werden nur Einfachbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 8-13: Kalibrierung von Aldehyden (Response x 10^6 aus einer Messung; R^2: Bestimmtheitsmaß)

	Konzentration in µg/L					
	20	40	60	80	100	R^2
Acetaldehyd	8,0	11,7	15,4	19,1	22,8	0,95
2-Methylpropanal	12,3	16,3	20,3	24,3	28,3	0,99
2-Methylbutanal	11,8	15,2	18,6	22,0	25,4	0,99
3-Methylbutanal	15,4	21,0	26,7	32,3	37,9	0,97
Hexanal	17,6	21,8	26,0	30,3	34,5	0,95
2,4-Decadienal	2,1	4,3	6,4	8,6	10,8	0,98
Methional	1,8*	90,7*	179,5*	268,4*	357,2*	0,97
Benzaldehyd	0,6	1,7	2,7	3,7	4,7	0,97
Phenylacetaldehyd	0,3	0,4	0,6	0,8	0,9	0,98

(* Response x 10^3)

8.7 Schnellmethode zur Bestimmung von Ferulasäure

Ferulasäure wird mittels RP-HPLC-DAD mit einer XTerra© MS C18 der Firma Waters vermessen. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus 18 % Acetonitril und 0,5 % Eisessig in Reinstwasser verwendet. Die Messung erfolgt isokratisch mit einem Fluss von 0,4 mL pro Minute und einer Säulentemperatur von 40 °C. Die Identifizierung erfolgt durch Vergleich der Retentionszeit von ca. 4,4 Minuten und des UV/Vis-Spektrums mit einem Ferulasäurestandard (Abbildung 8-11). Charakteristisch sind zwei Maxima bei 233 und 321 nm, ein Minimum bei 261 nm und eine kennzeichnende Schulter bei etwa 302 nm.

Tabelle 8-14: Parameter für die Bestimmung von Ferulasäure

Säule	Laufmittel	Bedingungen
XTerra© MS C18 3,5 µm; 3.0 x 150 mm (Waters)	18 % Acetonitril in 0,5 % Essigsäure	isokratisch; 40°C

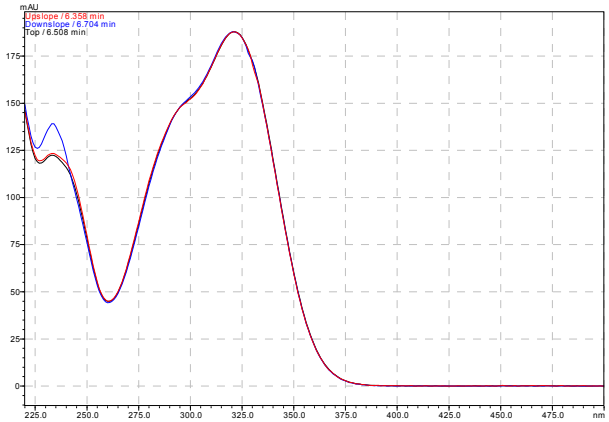


Abbildung 8-11: UV/Vis-Spektrum von Ferulasäure von 220–500 nm (λ in nm).

8.7.1 Quantifizierung von Ferulasäure

Die Quantifizierung erfolgt bei 325 nm über eine externe Kalibrierung. Dazu wird die unter Abschnitt 7 beschriebene Ferulasäure-Stammlösung in Laufmittel auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Der lineare Bereich der Kalibrierung geht von 5–50 µM, wobei der LOQ bei 0,002 µM liegt.

Tabelle 8-15: Kalibrierung von Ferulasäure (durchschnittlicher Response aus drei Messungen; R^2: Bestimmtheitsmaß – in Klammern: Standardabweichung in %)

Konzentration in µM								
6,2	10,3	16,5	20,6	26,8	30,9	37,1	41,2	R^2
292744	487977	755598	943702	1238748	1431848	1759325	1983479	0,99932
(4,4)	(1,9)	(3,9)	(2,7)	(3,3)	(5,2)	(2,4)	(2,6)	

8.8 Der Chapon-Assay

Der Chapon-Assay dient der Bestimmung des reduzierenden Potentials von Substanzen. Die von Chapon und Louis entwickelte Methode beruht, ähnlich der Phenanthrolin-Methode, auf der Reduktion von dreiwertigem Eisen zu zweiwertigem Eisen [94]. Die zweiwertigen Eisenionen bilden zusammen mit α,α′-Dipyridil einen roten Farbkomplex, welcher bei 510 nm photometrisch vermessen werden kann (Abbildung 8-12).

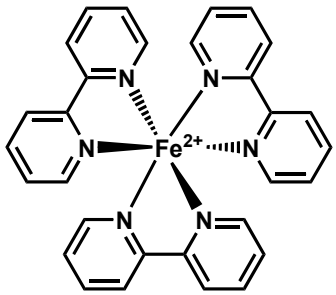


Abbildung 8-12: Dipyridil-Eisen(II)-Farbkomplex (rot).

Reagenzien

Alle Versuche müssen standardisiert bei einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt werden; Proben und Reagenzien werden vor Gebrauch entsprechend temperiert. Zur Aufbewahrung werden alle Proben und Reagenziengefäße zum Schutz vor Licht in Alufolie gewickelt und im Kühlschrank gelagert. Hier sind sie einige Wochen stabil.

Messung
Für eine Probenmessung werden 0,05 mL Lösung A und 1,95 mL Lösung B (siehe 7, Seite 40) direkt in einer Küvette gemischt. Die Absorption der Mischung wird ca. 5–10 Minuten bei 510 nm gemessen, bis das Messsignal sich stabilisiert hat. Dann wird die Ausgangsextinktion ebenfalls bei 510 nm gemessen. Durch Zugabe von 0,05 mL der Probelösung wird die Reaktion gestartet. Nach fünf Minuten Reaktionszeit wird die Absorption abgelesen (Tabelle 11-2).

Kalibrierung
Die Kalibrierung erfolgt mit Eisen(II) als Mohr´schem Salz von 0,05 bis 10 mM. Dazu wird die entsprechende Stammlösung verdünnt und anstatt der Proben 0,05 mL der Kalibrierlösung hinzugegeben.

8.9 Das Endogene Antioxidative Potential und die T-Werte

Durch die Bestimmung des **EAP-Wertes** eines Lebensmittels, lassen sich Aussagen über die antioxidative Aktivität treffen. Mit der Methode von Uchida [95] und Kaneda *et al.* [96], modifiziert nach Methner *et al.* [97], wird mittels eines Forciertestes die Radikalgenerierung beschleunigt, diese mit dem Spin-Trap-Reagenz POBN abgefangen, stabilisiert und messbar gemacht. In der zu untersuchenden Probe zunächst vorhandene Antioxidantien verhindern die Entwicklung von Radikalen. Sind diese aber nach einer gewissen Zeit aufgebraucht, fängt POBN die frei entstehenden Radikale ab und macht diese bestimmbar. Der Zeitpunkt, ab Start des Forciertestes bis zum Auftreten des ersten Signals, wird in Minuten angegeben und EAP genannt. Zur Forcierung wird die Probe auf 55–60 °C erhitzt und für eine sensitivere Messung Ethanol zugesetzt. Hydroxylradikale reagieren mit dem Ethanol zu langlebigeren 1-Hydroxyethylradikalen, welche besser getrappt werden können (Abbildung 8-13) [98].

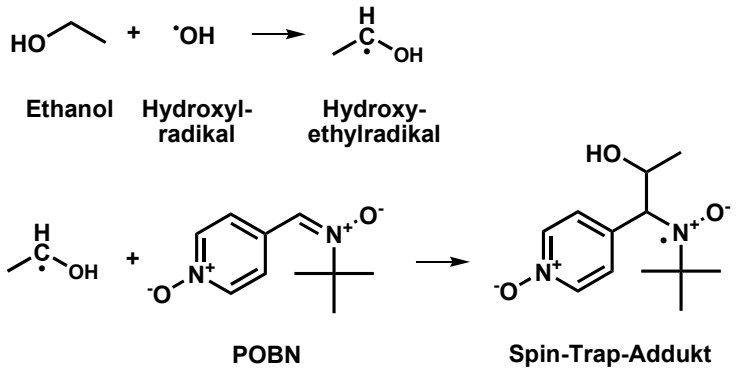


Abbildung 8-13: Trapping-Reaktion von POBN.

Die **T-Werte** einer Probe geben die ESR-Signalintensität, also die Menge an Radikalen nach einer bestimmten Zeit beim Forciertest wieder [95]. Als Trapping-Reagenz wird POBN eingesetzt. Es werden verschiedene Zeiten angeben wie T_{240}- und T_{600}-Werte entsprechend 240 und 600 Minuten. Dies hat messtechnische Gründe, da die Werte bis zum Erreichen einer stabilen Plateauphase beobachtet werden, d.h. zwischen Radikalerzeugung und -abreaktion herrscht ein Gleichgewicht.
Die Bestimmung von EAP- und T_x-Wert und der Zusammenhang zwischen beiden Größen sind exemplarisch in Abbildung 8-14 dargestellt.

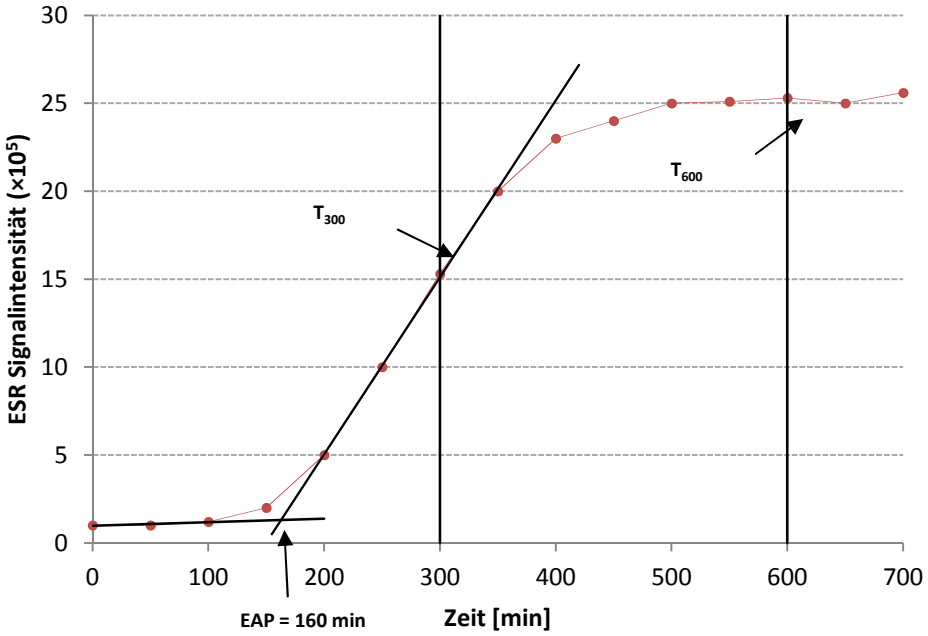


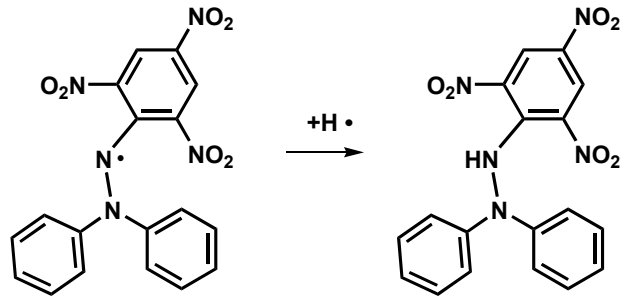
Abbildung 8-14: Zusammenhang EAP-Wert und T_x-Wert.

8.10 Reducing Activity – RA

Die Reducing Activity einer Lösung wird mit dem violett gefärbten, stabilisierten Radikal 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin bestimmt. Die Verbindung kann durch Wasserstoffabstraktion reduziert werden und stellt die oxidativen Verhältnisse dar. Durch die Reduktion ändert sich die Farbe von violett nach gelb. Diese Farbänderung kann dann photometrisch bestimmt und so Rückschlüsse über die Konzentration gemacht werden.
Die Messung mittels ESR ist ebenfalls möglich und bietet den Vorteil, dass etwaige Eigenfärbungen der zu messenden Probe nicht stören. Bestimmt wird dabei das abnehmende Signal des DPPH-Radikals gegen die Zeit. Die RA ist das Verhältnis der gebildeten Gesamtfläche im erhaltenen Diagramm mit der Teilfläche über der Kurve gemäß folgender Formel:

$$RA\ [\%] = A_{oben}/A_{gesamt}*100\ \%$$

Je größer der erhaltene Wert, desto mehr reduzierende Substanzen sind in der Lösung vorhanden, die in der Lage sind DPPH zu reduzieren.



2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazylradikal **2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazin**

Abbildung 8-15: Reduktion des DPPH-Radikals zu DPPH-H.

Alternativ wird der Abbau von DPPH als antioxidative Aktivität nach 25 Minuten in mmol/L angegeben. Die eingesetzte Menge DPPH-Radikal wird aus der prozentualen Angabe der RA ausgerechnet und mit der eingesetzten Menge Probe ins Verhältnis gesetzt.
Für die Versuche wird vor Beginn der Messung eine frische 1:10 Verdünnung aus der DPPH-Stammlösung in Ethanol hergestellt. Für die Messung werden 500 µL der verdünnten DPPH-Lösung mit 100 µL (Maischmodelle) bzw. 50 µL (D-Glukosemodelle) Probe gemischt und nach exakt 45 s im Resonator über einen Zeitraum von 25 Minuten gemessen (Geräteparameter siehe Tabelle 11-6). Für die Blindwerte erfolgt die Messung mit den entsprechenden Mengen Ethanol.

8.11 Bestimmung von Phenolcarbonsäuren mittels HPLC

Die Bestimmung von Phenolcarbonsäuren erfolgt mittels RP-HPLC-DAD mit einer Luna® RP18 HPLC Säule (Luna® 5 µm, C18 100 Å, 3,0 x 150 mm) der Firma Phenomenex. Die Messung wird mit einem Gradienten aus Acetonitril/Reinstwasser (0,5 % AcOH) (Tabelle 8-17) bei einem Fluss von 0,5 mL/Minute durchgeführt. Die Säule wird auf 40 °C temperiert und es werden 20 µL injiziert. Die Qualifizierung der Phenolcarbonsäuren erfolgt durch Retentionszeiten- und UV-Spektrenvergleich mit Phenolcarbonsäurestandards (Tabelle 11-9). Die Quantifizierung erfolgt durch eine Einpunktkalibrierung.
Es werden von insgesamt zwölf Phenolcarbonsäuren definierte Mengen als Standards eingewogen und vermessen. Ausgewählt wurden die, die im Bier am meisten zu erwarten sind. Die entsprechenden Einwaagen und Auflistung befinden sich in Abschnitt 7.

Tabelle 8-16: Parameter für die Bestimmung von Hopfensäuren

Säule	Laufmittel	Bedingungen
Luna© RP 18 5 µm; 100 Å, 3.0 x 150 mm (Phenomenex)	Acetonitril, Reinstwasser mit 0,5 % Essigsäure	0,5 mL/min; Gradient; 40°C

Tabelle 8-17: Laufmittelgradient für die Bestimmung von Phenolcarbonsäuren

Zeit t [min]	ACN [Vol %]	H_2O^* reinst [Vol %]
0	5	95
5	5	95
9	9	91
30	13	87
45	27	73
50	33	67
55	33	67
65	50	50
67	50	50
72	5	95
78	5	95

*0,5 % AcOH

9 Ergebnis- und Diskussionsteil

9.1 Untersuchungen während der Sudhausarbeit

In den folgenden Abschnitten werden die gewonnenen Werte von Sud 1 und Sud 2 dargestellt und im Abschnitt 9.1.4 diskutiert. Die verwendeten Farben eines jeden Prozessschrittes in Abbildung 8-1 Seite 42 entspricht einer Temperatur. Auf den nachfolgenden Diagrammen wird die zu einem bestimmten Zeitpunkt herrschende Temperatur entsprechend der Skala oberhalb eines Diagramms zugeordnet. Die entsprechende Farbwahl stimmt mit denen in Abbildung 8-1 überein. Ein grüner Pfeil in den nachfolgenden Diagrammen kennzeichnet jeweils den Zeitpunkt der Hopfengabe.

9.1.1 Ergebnisse α-Dicarbonylverbindungen

Sud 1:
Die Zusammensetzung von Sud 1 und die Aufarbeitung der während der Sudhausarbeit genommenen Proben sind in Abschnitt 8.1 beschrieben.
Bei der Untersuchung der Sudhausproben konnten Glucoson, 1-DH, 3-DP, 3-DH, Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl bestimmt werden (Abbildung 9-1). Am meisten wird 3-DH mit bis zu 140 µM gebildet und der Übersichtlichkeit halber in Abbildung 9-1 auf einer eigenen grünen Ordinate dargestellt.
Bis zum Kochbeginn liegen die Konzentrationen von Glucoson, 1-DH und 3-DP zwischen 5 und 15 µM in einer ähnlichen Größenordnung. Glyoxal liegt bei etwa 3 µM. Methylglyoxal und Diacetyl sind nachweisbar, aber praktisch nicht von Bedeutung. Methylglyoxal und Diacetyl werden aufgrund der geringen Werte in der auf 12 % Extrakt korrigierten Darstellung (Abbildung 9-2) nicht mehr berücksichtigt. Der Gesamtgehalt der bestimmten α-Dicarbonylverbindungen erreicht zu keinem Zeitpunkt die Konzentration von 3-DH.
Ab Kochbeginn steigt die Konzentration von 3-DH stark an und erreicht ein Maximum in der Abkühlphase bzw. der abgekühlten Anstellwürze mit über 140 µM.
Den gleichen Trend wie 3-DH mit maximal 30 µM hin zum Ende des Kochens zeigt auch 1-DH. Im Verlauf des Abkühlens sinkt der Gehalt kontinuierlich auf 27 µM. Glucoson wird mit Beginn des Kochens weniger gebildet und sinkt auf eine Konzentration von fast 5 µM, während Glyoxal nicht mehr bestimmbar ist.

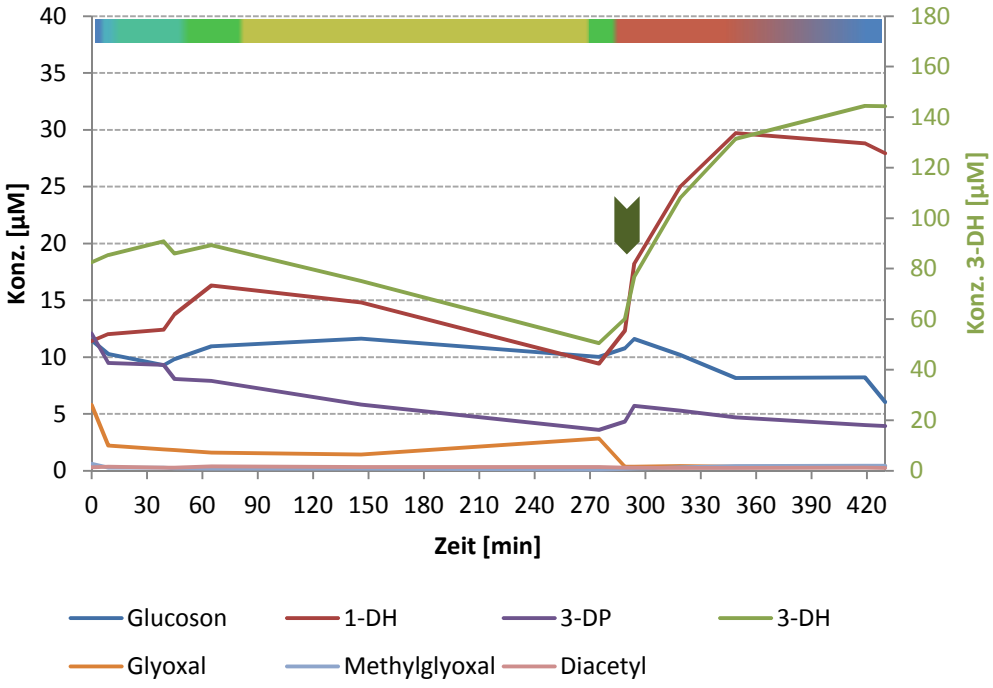


Abbildung 9-1: Übersicht I des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; grüner Pfeil: Zeitpunkt der Hopfengabe; Werte siehe Anhang Tabelle 12-15).

Zum Zeitpunkt der Hopfengabe bei etwa 290 Minuten (grüner Pfeil in Abbildung 9-1) steigen die Konzentrationen von 3-DH und 1-DH kurzzeitig stärker an als am Kochbeginn bei etwa 280–285 Minuten. Dieser Effekt hält etwa fünf Minuten an. Dann sinkt die Geschwindigkeit des Konzentrationsanstieges wieder auf das Niveau des Kochbeginns. Einen ähnlichen Effekt verursacht die Hopfengabe auch bei Glucoson und 3-DP, deren beschleunigte Bildung jedoch sehr viel geringer ausgeprägt ist. Die Konzentrationen beider Verbindungen sinken ebenfalls nach weiteren fünf Minuten mit nachlassen des Hopfeneffektes unter das Niveau der Pfannevollwürze ab.
Werden die gemessenen Werte auf 12 % Extrakt bezogen (vergleiche Abschnitt 8.1), so zeigt sich folgendes Bild: Alle Dicarbonylverbindungen stabilisieren sich während des Maischens von 0–270 Minuten auf einem jeweilig eigenen, aber stabilen Niveau (Abbildung 9-2). Einzig Glucoson steigt kontinuierlich bis zum Beginn des Kochens an. Mit Kochbeginn zeigt sich dann das schon beschriebene Bild mit einer Ausnahme. Der Einfluss der Hopfengabe bei etwa 290 Minuten (grüner Pfeil in Abbildung 9-2) führt zu einer Veränderung der Geschwindigkeit der α-Dicarbonylgenerierung. Die Steigung der Konzentrationsänderungen der α-Dicarbonylverbindungen von Kochbeginn bis kurz vor der Hopfengabe ist niedriger als kurz nach der Hopfengabe. Dort steigen die Werte von 3-DH, 1-DH, Glucoson sowie 3-DP sprunghaft an. Nach etwa 50 Minuten sinken die Werte von 3-DH und 1-DH wieder etwas, um dann mit derselben Rate wie vor der Zugabe anzusteigen. Im Gegensatz dazu sinkt die Glucosonkonzentration nach der Hopfengabe kontinuierlich.

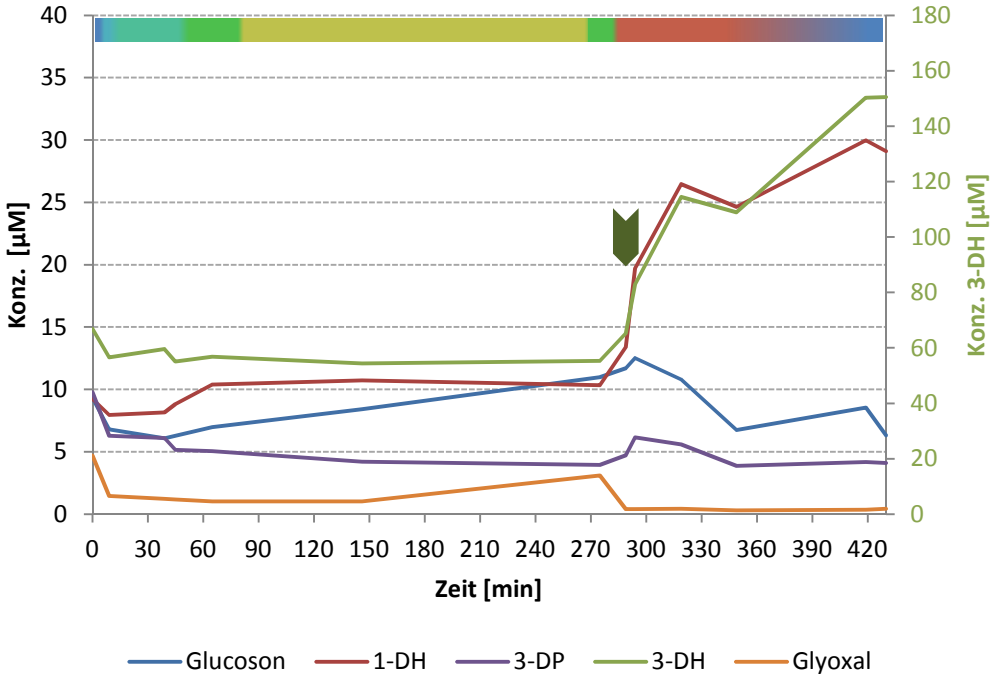


Abbildung 9-2: Übersicht II des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (bezogen auf 12 % Extrakt; grüner Pfeil: Zeitpunkt der Hopfengabe; Werte siehe Anhang Tabelle 12-15).

Abbildung 9-3 zeigt die Mengenverhältnisse der gebildeten α-Dicarbonylverbindungen einzeln sowie aufsummiert und liefert in Bezug auf die Gesamtmenge eine Vorstellung der Größenordnungen der gebildeten Verbindungen. Dargestellt sind die gegen den Extraktgehalt unkorrigierten Werte. Zu erkennen ist wieder die relativ stabile Phase während des Maischens und das kontinuierliche Absinken der Werte mit Beginn des Abmaischens durch die Nachgüsse. Ab 290 Minuten mit Beginn der Kochung steigen dann die Gesamtgehalte bis zur Abkühlphase an.

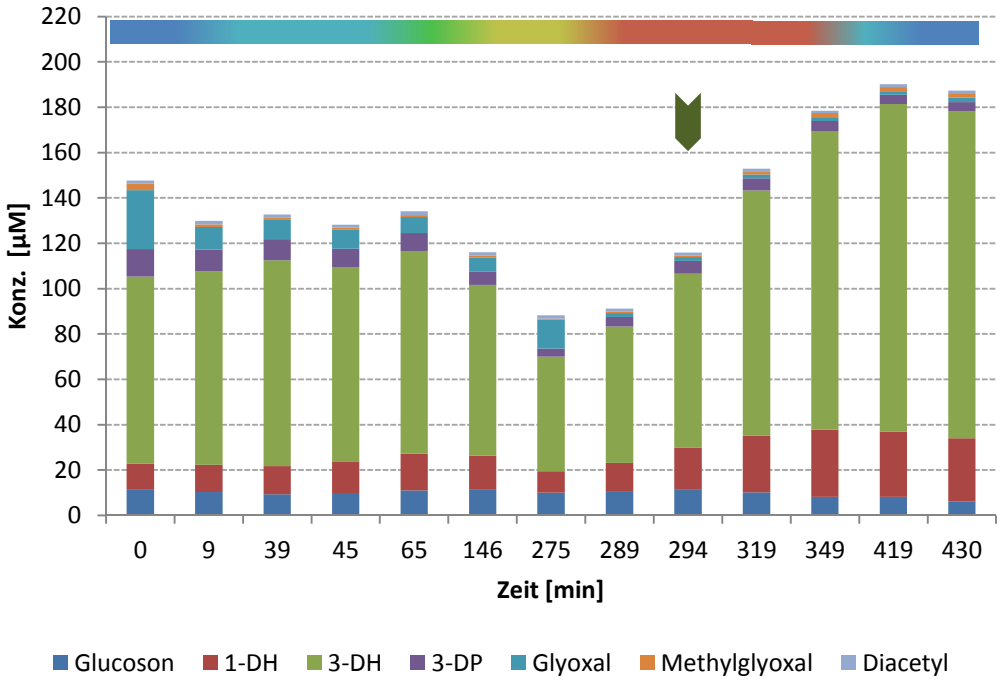


Abbildung 9-3: Übersicht III des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-15).

Sud 2:

Die Zusammensetzung von Sud 2, Vergleich mit Sud 1 und die Aufarbeitung der während der Sudhausarbeit genommenen Proben sind in Abschnitt 8.1 beschrieben. Die Art und Menge der gebildeten α-Dicarbonylverbindungen sind mit Sud 1 vergleichbar. Am meisten wird 3-DH mit bis zu 140 µM gebildet, gefolgt von Glucoson, 1-DH und 3-DP. Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl können nachgewiesen werden, spielen mengenmäßig eine eher untergeordnete Rolle (Abbildung 9-4).

Bis zum Kochbeginn schwanken die Gehalte von Glucoson, 1-DH und 3-DP zwischen 5 und 15 µM. Alle Verbindungen zusammen erreichen in der Summe nicht die Werte von 3-DH, welche während des Maischens 80 µM betragen. Ab Kochbeginn steigt die Konzentration von 3-DH stark an und erreicht den Höchstwert in der Abkühlphase bzw. der abgekühlten Anstellwürze mit über 140 µM.

Ein Unterschied in den Suden ist bei den Konzentrationen von Glucoson und 1-DH zu erkennen. Während des Maischens bis zum Beginn der Kochung wird etwas mehr Glucoson als 1-DH gebildet, was im Sud 1 umgekehrt war. Weiterhin steigt der Gehalt von 1-DH mit der Hopfengabe (grüner Pfeil Abbildung 9-4) bzw. dem Kochbeginn bei etwa 285 Minuten nur kurzzeitig an und bleibt dann im Gegensatz zu Sud 1 auf stabilem Niveau (vergleiche Abbildung 9-4).

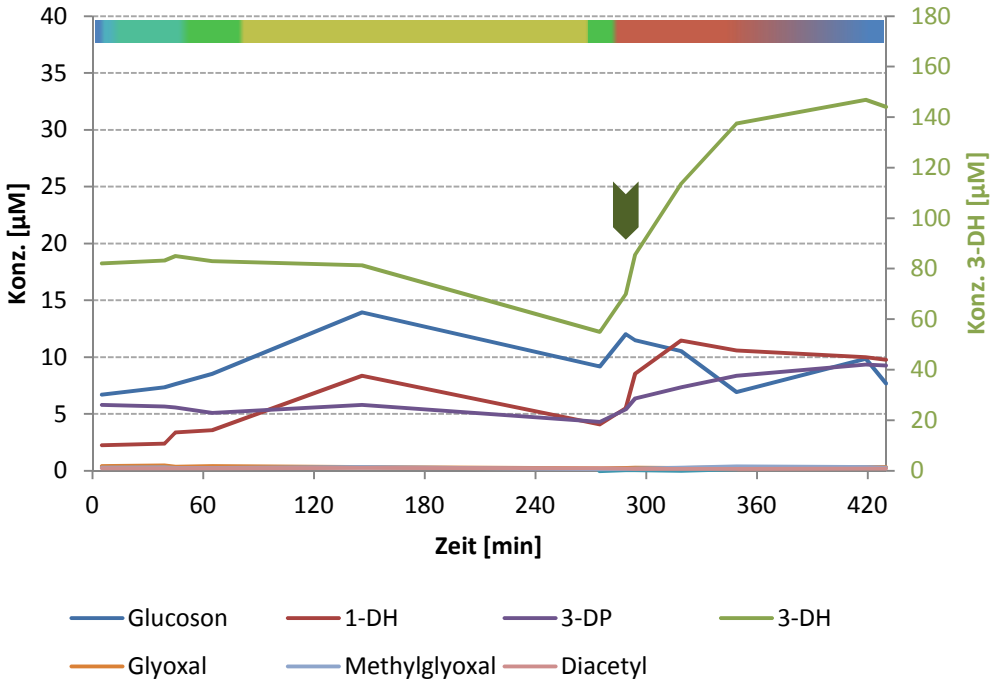


Abbildung 9-4: Übersicht I des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-16)

Die auf 12 % Extrakt korrigierten Werte zeigen dieselben, wie eben beschrieben, Trends (Abbildung 9-5).

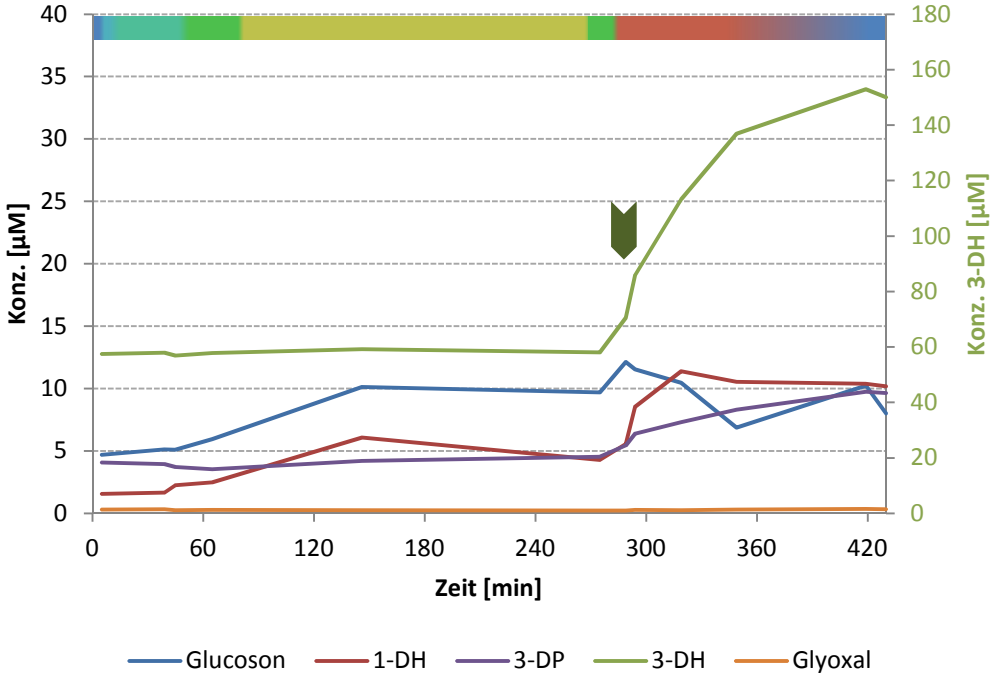


Abbildung 9-5: Übersicht II des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (Werte bezogen auf 12 % Extrakt, Werte siehe Anhang Tabelle 12-16).

Während des Maischprozesses steigen nur die Konzentrationen von Glucoson und 1-DH leicht, aber kontinuierlich an. Die Konzentrationen der übrigen α-Dicarbonyl-verbindungen stagnieren. Während des Kochens wird nur 3-DH deutlich vermehrt gebildet. Die Steigerung der α-Dicarbonylbildung zum Zeitpunkt der Hopfengabe bei etwa 290 Minuten wie in Sud 1 ist vorhanden, aber bei weitem nicht so ausgeprägt.
Abbildung 9-5 gibt die Mengenverhältnisse der gebildeten α-Dicarbonyl-verbindungen einzeln sowie aufsummiert wieder und liefert in Bezug auf die Gesamtmenge eine Vorstellung der Größenordnungen der gebildeten Menge. Die Werte zum Zeitpunkt 0 Minuten waren nicht auswertbar und sind daher nicht im Diagramm zu finden. In Abbildung 9-5 und Abbildung 9-6 ist das Fehlen der Werte zum Zeitpunkt 0 Minuten aufgrund der Skalierung der Zeitachse nicht so deutlich. Dargestellt sind in Abbildung 9-5 die gegen den Extraktgehalt unkorrigierten Werte. Zu erkennen ist wieder die relativ stabile Phase während des Maischens und das kontinuierliche Absinken der Werte mit Beginn des Abmaischens durch die Nachgüsse. Ab Beginn der Kochung bei 290 Minuten steigen dann die Werte wieder bis zur Abkühlphase an.

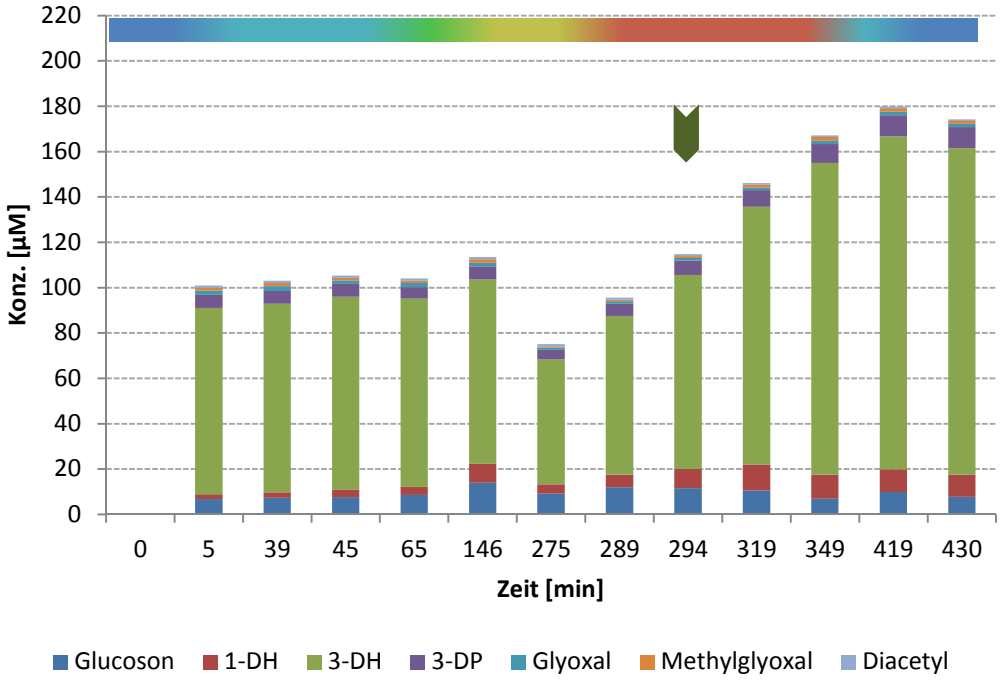


Abbildung 9-6: Übersicht II des Verlaufes der α-Dicarbonylbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-16).

9.1.2 Ergebnisse Aldehyde

Sud 1:
Die Zusammensetzung von Sud 1 und die Aufarbeitung der während der Sudhausarbeit genommenen Proben sind in Abschnitt 8.1 beschrieben.
Im Sud 1 sind hohe Formaldehydgehalte zu finden (Abbildung 9-7), die während des Maischens auf bis zu 250 µM ansteigen und während des Abmaischens bzw. bis zur Pfannevoll auf 70 µM absinken. Mit Kochbeginn steigt der Formaldehydgehalt nur leicht auf 80 µM an. Mit der Hopfengabe (grüner Pfeil Abbildung 9-7) sinkt die Formaldehydkonzentration nochmals kurz, steigt innerhalb von fünf Minuten an und erreicht mit 130 µM ein Maximum. Zur Anstellwürze hin wird ein Konzentrationsniveau von knapp 100 µM gehalten. Der hohe Anfangswert von über 300 µM wird als Ausreißer betrachtet.
Acetaldehyd und Glycolaldehyd bleiben während des gesamten Prozesses relativ konstant um 50 µM bzw. 20 µM. Auffällig sind nur zwei „Einbrüche“ in den Werten während der zweiten Rast bei etwa 50 Minuten und kurz nach der Hopfengabe bei etwa 290 Minuten (grüner Pfeil Abbildung 9-7).

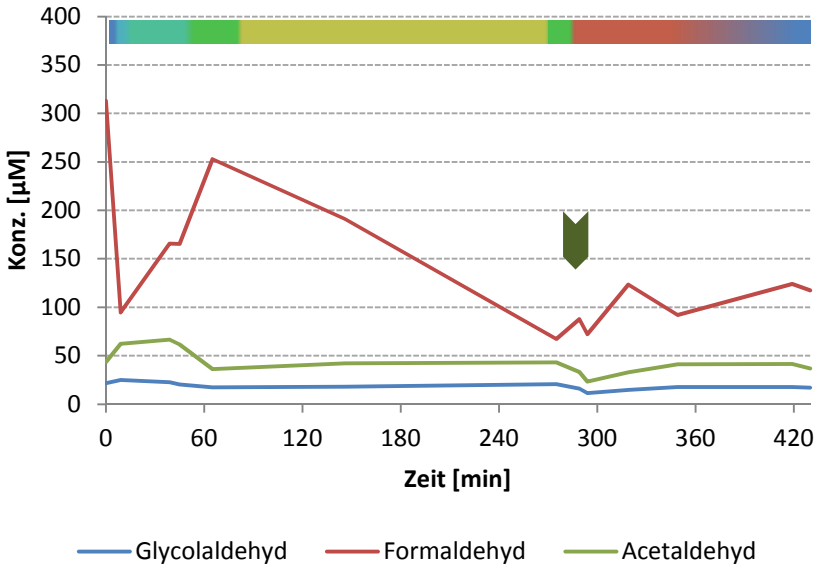


Abbildung 9-7: Übersicht I des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-17).

Die Übersicht II in Abbildung 9-8 gibt die entstehenden Mengenverhältnisse einzeln bzw. aufsummiert wider, wobei die gegen den Extraktgehalt unkorrigierten Werte dargestellt sind. Formaldehyd zeigt gegenüber Glycol- und Acetaldehyd deutlich höhere Gehalte. Stabile Phasen, wie bei den α-Dicarbonylverbindungen zu erkennen waren, treten nicht auf. Während des Maischens ist kein Trend ersichtlich, allerdings sinken die Werte mit Beginn des Abmaischens durch die Nachgüsse ab. Mit Beginn der Kochung ab 290 Minuten steigen dann die Werte wieder bis zur Abkühlphase an.

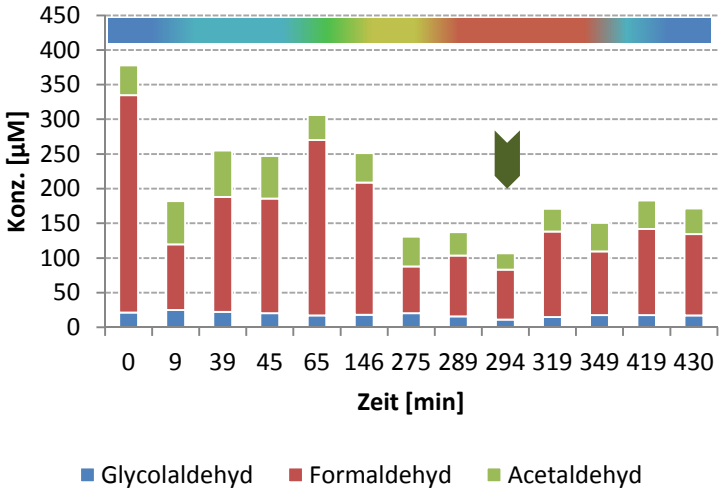


Abbildung 9-8: Übersicht II des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-17).

Werden die Werte auf 12 % Extrakt normiert (Abbildung 9-9) zeigt sich, dass die Gesamtmenge an Aldehyden stets Werte zwischen 150–200 µM annimmt. Der hohe Anfangswert von über 300 µM ist ein Messfehler und wird daher nicht betrachtet.

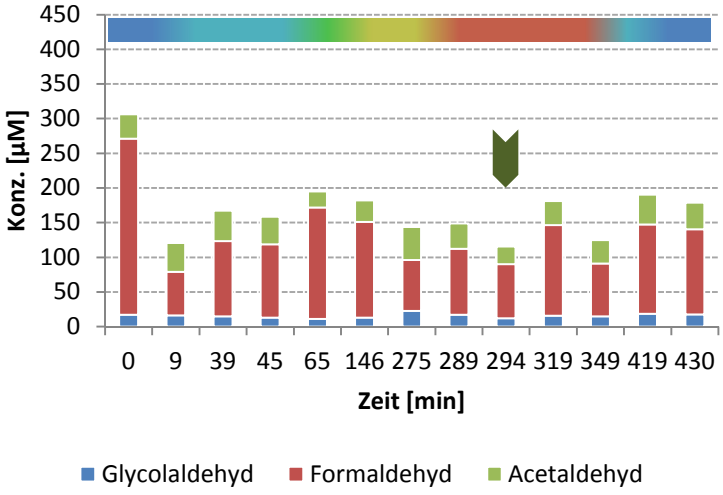


Abbildung 9-9: Übersicht III des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 1 (bezogen auf 12 % Extrakt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-17).

Sud 2:
Die Zusammensetzung von Sud 2 und die Aufarbeitung der während der Sudhausarbeit genommenen Proben sind in Abschnitt 8.1 beschrieben.
Sud 2 besitzt einen sehr viel höheren Formaldehydgehalt als Sud 1, der während der Hopfengabe am Beginn des Kochens auf fast 900 µM steigt und zur Anstellwürze hin auf etwa 800 µM sinkt. Die Gehalte von Glycol- und Acetaldehyd bleiben während der Sudhausarbeit relativ konstant um 100 bzw. 20–40 µM. Die Werte von Glycolaldehyd liegen damit über denen von Sud 1. Acetaldehyd wird in ähnlichen Größenordnungen im Vergleich zu Sud 1 gebildet. Während der zweiten Rast und der Hopfengabe bei etwa 290 Minuten sind Schwankungen zu erkennen.

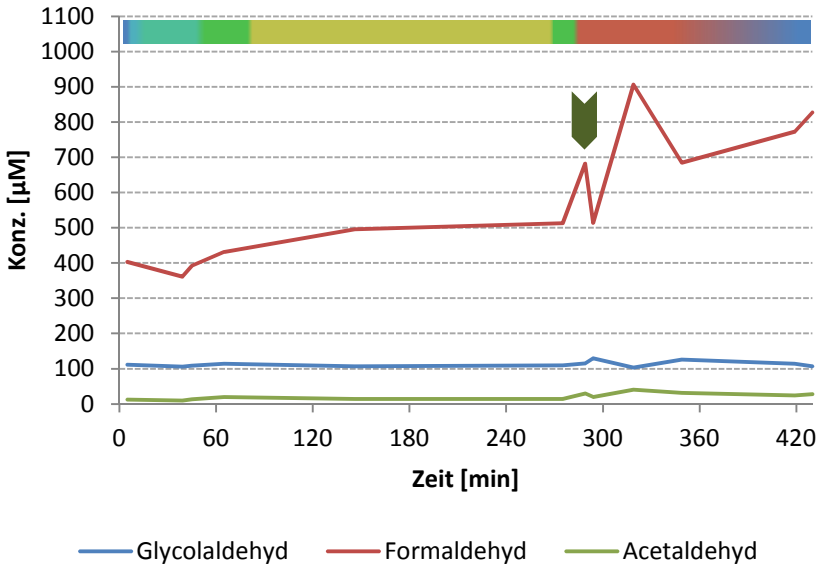


Abbildung 9-10: Übersicht I des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-18).

Die Übersicht II in Abbildung 9-11 gibt die entstehenden Mengenverhältnisse einzeln bzw. aufsummiert wieder, wobei die gegen den Extraktgehalt unkorrigierten Werte dargestellt sind.
Deutlich zeigen sich die hohen Werte von Formaldehyd gegenüber Glycol- und Acetaldehyd. Dabei ist der ansteigende Trend von Formaldehyd zu erkennen. Das Maximum von etwa 900 µM wird während der Hälfte des Kochens bei 319 Minuten erreicht. Der „Einbruch“ kurz vor der Hopfengabe bei 294 Minuten (grüner Pfeil Abbildung 9-11) ist durch die Verdünnungen der Nachgüsse zu erklären.

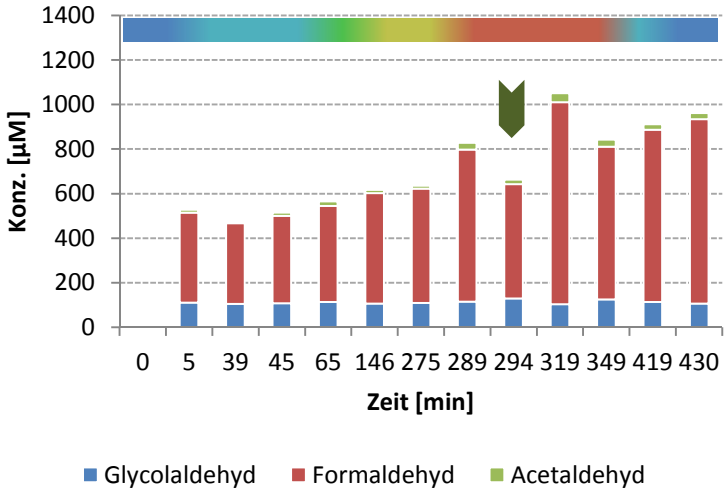


Abbildung 9-11: Übersicht II des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-18).

Werden die Werte auf 12 % Extrakt bezogen, ist ein eindeutiger Trend bei der Aldehydbildung, speziell Formaldehyd, zu erkennen. Im Gegensatz zu Sud 1 wird während der gesamten Sudhausarbeit die Formaldehydbildung beschleunigt.

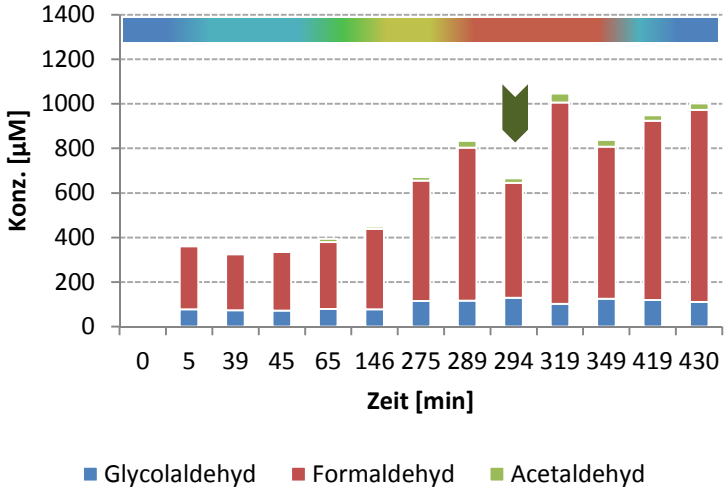


Abbildung 9-12: Übersicht III des Verlaufes der Aldehydbildung während der Sudhausarbeit von Sud 2 (bezogen auf 12 % Extrakt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-18).

9.1.3 Weitere Ergebnisse

Zuckergehalte:
In Abbildung 9-13 und Abbildung 9-14 sind die nicht extraktbereinigten Werte der Zuckergehalte während der Sudhausarbeit an jeweils sechs Punkten dargestellt. Die Werte gleichen sich und unterliegen nur geringen Schwankungen. Ein geringer Anstieg der Werte ist nach dem Einmaischen verursacht durch die Enzymaktivität zu erkennen (nur ersichtlich in Abbildung 9-13). Ein Absinken bei Pfannevoll (Sud 1) bzw. Kochbeginn (Sud 2) ist durch die zugegebenen Nachgüsse zu erkennen.

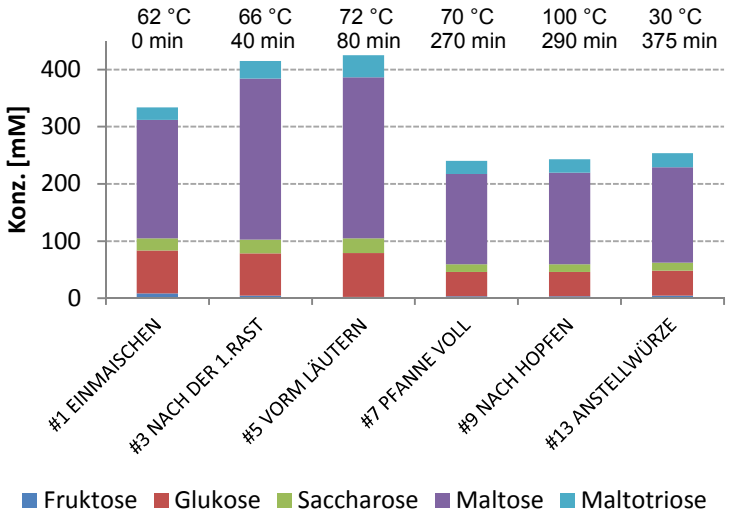


Abbildung 9-13: Konzentrationen verschiedener Zucker von Sud 1 während der Sudhausarbeit in mM (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-19).

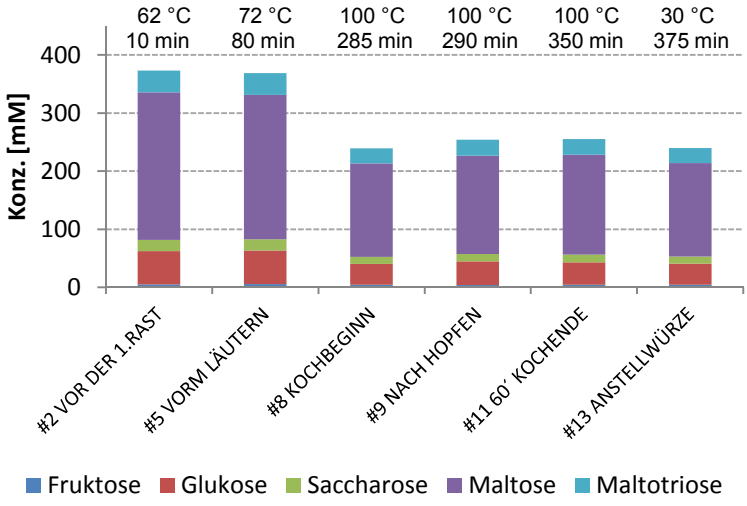


Abbildung 9-14: Konzentrationen verschiedener Zucker von Sud 2 während der Sudhausarbeit in mM (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-20).

Ferulasäuregehalt:
Die gemessenen Mengen freier Ferulasäure liegen bei beiden Suden zwischen 4–10 µM. Die Zugabe der Nachgüsse ist deutlich durch das starke Absinken der Konzentration zu erkennen. Der nachfolgende Anstieg ist die Aufkonzentration durch das Kochen und die Freigabe gebundener Ferulasäure zu erklären.

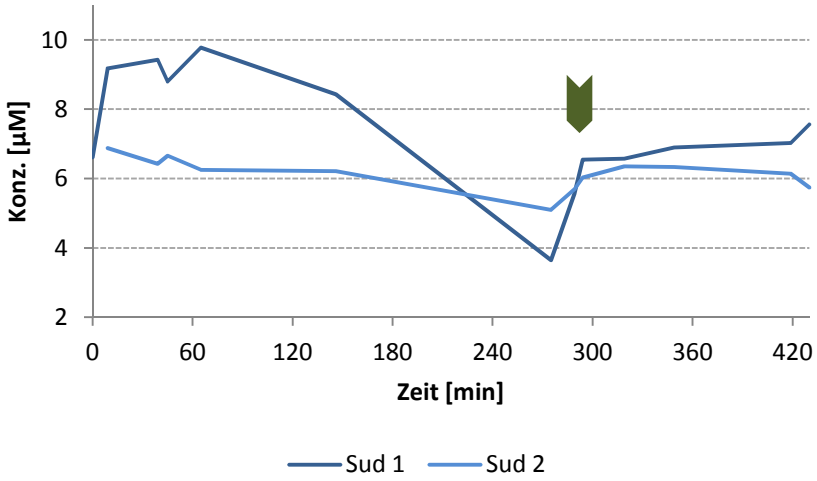


Abbildung 9-15: Ferulasäuregehalt von Sud 1 und Sud 2 während der Sudhausarbeit (nicht extraktbereinigt).

Antioxidative Parameter – EAP:
Das ermittelte Endogene Antioxidative Potential von Sud 1 steigt erst ab der zweiten Rast an und bleibt bis zum Beginn des Kochens konstant bei ca. 16 Minuten. Im Anschluss steigt das EAP sprunghaft an und wird mit der Hopfengabe, durch die im Hopfen enthaltenen phenolischen Verbindungen, nochmals auf 56 Minuten erhöht. Während des Kochens sinkt der Wert kontinuierlich und erreicht 27 Minuten in der Anstellwürze (Abbildung 9-16).

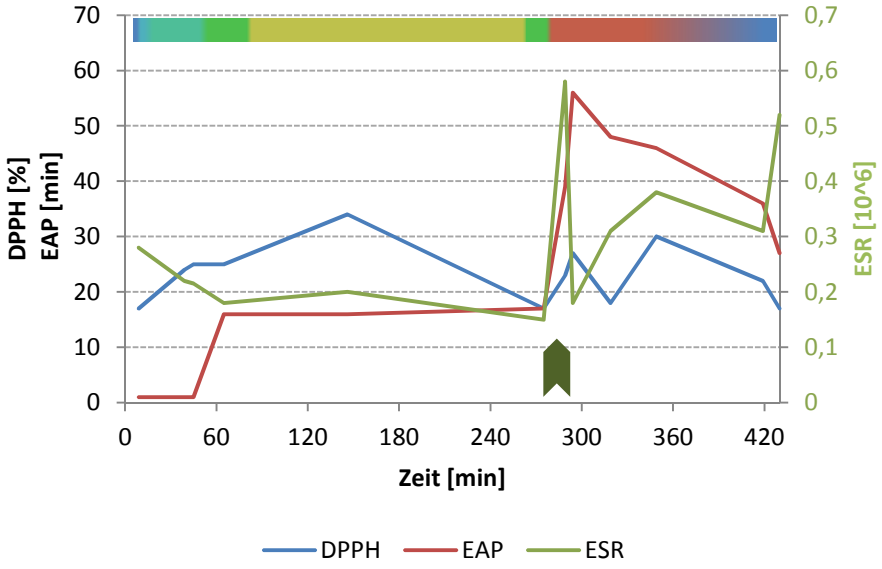


Abbildung 9-16: ESR Kenndaten von Sud 1 während der Sudhausarbeit (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-17).

Das EAP von Sud 2 ist fast doppelt so lange nicht bestimmbar wie das von Sud 1, entwickelt sich erst mit den Nachgüssen und steigt dann kontinuierlich bis zum Beginn des Kochens auf etwa 30 Minuten. Während des Kochens folgt ein starker „Einbruch“ auf zwölf Minuten, um im Anschluss wieder auf den Endwert der Anstellwürze von etwa 29 Minuten anzusteigen. Das entspricht etwa dem Endwert von Sud 1.

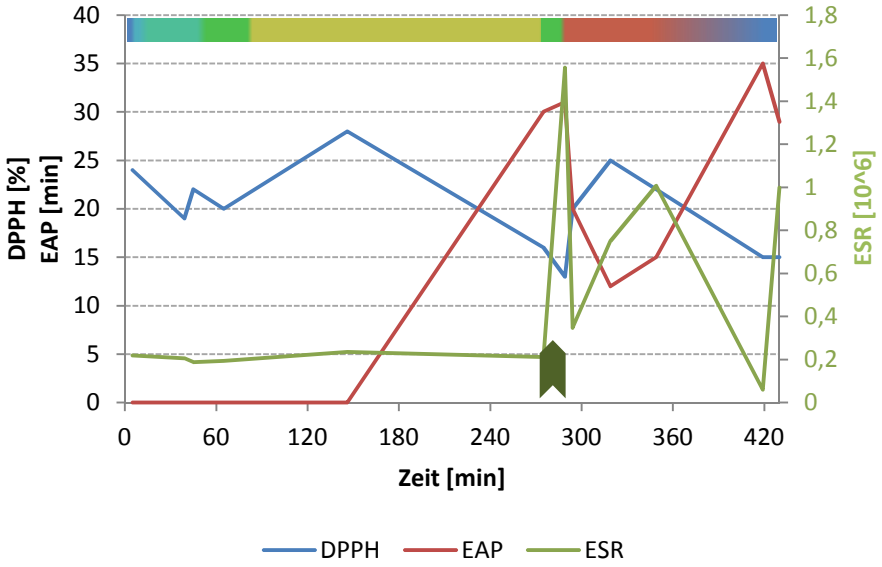


Abbildung 9-17: ESR Kenndaten von Sud 2 während der Sudhausarbeit (nicht extraktbereinigt; Werte siehe Anhang Tabelle 12-18).

Antioxidative Parameter – T-Werte:
Die T-Werte (T_{240} Sud 1 bzw. T_{600} Sud 2) gleichen sich vom Verlauf her. Allerdings ist die Intensität der Signale von Sud 2 (Abbildung 9-17, ESR) zum Sud 1 (Abbildung 9-16, ESR) teilweise um den Faktor 3 größer. Bis zum Beginn des Kochens bleiben die Signale relativ konstant bei etwa 200 000. Mit der Hopfengabe kommt es zu einem sprunghaften Anstieg und die Werte steigen kurzzeitig auf 600 000 im Sud 1 bzw. 1 600 000 im Sud 2. Innerhalb weniger Minuten sinken dann die Werte fast bis auf den Ursprungswert, um dann während des gesamten Kochens wieder kontinuierlich anzusteigen. Zum Ende des Kochens bzw. während des Abkühlens verringert sich die Radikalgenerierung und steigt dann zur Anstellwürze hin auf Endwerte von knapp 500 000 in Sud 1 bzw. 1 000 000 in Sud 2 wieder stark an.

Antioxidative Parameter – Reducing Activity:
Die Reducing Activity bewegt sich bei Sud 1 etwa im Bereich von 20–30 % (DPPH Abbildung 9-16) und bei Sud 2 aufgrund der etwas niedrigeren Reduktonwerte im Bereich von 15–25 % (DPPH Abbildung 9-17). Der Beginn des Kochens zeigt einen kleinen Ausschlag, jedoch treten keine eindeutigen Trends auf.

9.1.4 Diskussion der Ergebnisse der Versuche Sud 1 und Sud 2

Die Art des verwendeten Malzes hat Einfluss auf die ablaufenden Reaktionen während der Sudhausarbeit. In Abhängigkeit vom Röstgrad ist mengenmäßig Maltose der am häufigsten vorkommende Zucker im Malz. Der Gesamtzuckergehalt beträgt bei hellem Malz ca. 55 %, bei dunklerem Caramalz durch Abbau zu Röst- und Caramelsubstanzen durch den angewendeten Röstvorgang bei 150–180 °C nur ca. 34 %. Im Gegensatz dazu ist D-Glukose als Monosaccharid im Caramalz mit 5,4 % (helles Malz 3,2 %) durch den enzymatischen Abbau von Polysacchariden höher vertreten. Die insgesamt niedrigere Zuckerkonzentration im Caramalz ist zum Einen mit der durch höhere Temperaturen verursachten geringeren Enzymaktivität und zum Anderen durch die verstärkt ablaufende Maillard-Reaktion während des Röstprozesses zu erklären.
Vergleicht man die Konzentration der freien Aminosäuren von etwa 0,6 % in hellem Malz bzw. 0,4 % in Caramalz wird die Vermutung der Abreaktion durch die Maillard-Reaktion gestützt. Im Caramalz ist die Bildung der α-Dicarbonylverbindungen bzw. Röstprodukte höher. Während der Sudhausarbeit sind die gebildeten **α-Dicarbonylverbindungen** in Art und Menge in beiden Suden vergleichbar. Mengenmäßig spielt eindeutig 3-DH die bedeutendste Rolle, gefolgt von Glucoson, 1-DH und 3-DP, was für den pH-Bereich und den gegebenen Bedingungen zu erwarten war und auch in anderen Arbeiten in ähnlicher Weise so gefunden wurde [30, 80].
Werden die Zuckermessungen herangezogen, so sind die ermittelten molaren Zuckergehalte in der Summe um etwa den Faktor 10 000 größer als die der α-Dicarbonylverbindungen. Daher sind durchaus höhere Werte zu erwarten gewesen (Vergleiche Abbildung 9-13 ab Seite 73). Allerdings finden Abreaktionen der α-Dicarbonylverbindungen statt, die in Abbildung 6-9 Seite 24 beispielhaft aufgeführt sind. Das bestätigen die Arbeiten von Liedke, der Glucoson durch Zugabe von *o*PDA vor dem Start der Reaktion abgefangen hat und die Werte von Glucoson sogar die von 3-DH übertrafen [30]. Bei diesem von Liedke durchgeführten akkumulierenden Versuchen kann davon ausgegangen werden, dass damit andere Parameter, v.a. die hier wichtigen Werte der ESR Messungen, verfälscht waren. Weiterhin ist der oxidative Einfluss von *o*PDA auf das Reaktionssystem immer noch nicht hinreichend geklärt [79, 99].
Glucoson wird bevorzugt im neutral-basischen Milieu, idealerweise bei 80 °C gebildet [100]. Der herrschende pH-Wert während des Maischens und Würzekochens liegt um 5,5 [101] und somit im leicht sauren pH-Bereich. Die Werte von Glucoson steigen dennoch bis zum Abmaischen in beiden Suden beständig an. Die Abmaischtemperatur liegt bei 78 °C und damit praktisch bei der Idealtemperatur der Glucosonbildung [100]. Erst beim Erreichen der Kochtemperatur bei etwa 290 Minuten sinkt der Glucosongehalt wieder.
Die Konzentrationen der anderen α-Dicarbonylverbindungen (außer 3-DH) bleiben während des Maischens und des Kochens nahezu konstant und werden nur kurzeitig von der Hopfengabe gesteigert. Anscheinend beeinflusst der verwendete Hopfenextrakt massiv das Redoxsystem des Sudes, obwohl die gegebene Menge mit ca. 30 g eher gering im Verhältnis zur Gesamtmenge der Pfannevollwürze von etwa 200 L ist. Es ist davon auszugehen, dass Endprodukte die über oxidative Reaktionswege entstehen unterdrückt werden und somit eine Abreaktion von α-Dicarbonylverbindungen verhindert wird. Der Einfluss der gegebenen Hopfenmenge ist jedoch nur kurzfristig. Die Werte gehen nach kurzer Zeit wieder zu den alten Bildungsgleichgewichten zurück.

Das unterschiedliche Verhalten von Glucoson und 1-DH in den Suden ist nicht eindeutig zu klären. Der Gehalt von Glucoson ist in beiden Ansätzen ähnlich groß, wohingegen 1-DH in Sud 1 im Vergleich zu Sud 2 fast doppelt so viel gebildet wird. Zudem erfolgt die Bildung im Sud 1 ab Beginn des Kochens verstärkt und pendelt sich um 25 µM ein, während im Sud 2 der Wert auf annähernd 10 µM ansteigt.
Die Spaltprodukte Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl werden nur in geringen Mengen gebildet und spielen somit eher eine untergeordnete Rolle. Da die Verbindungen sehr reaktiv bzw. sogar flüchtig sind [79], werden die aus den Vorläufern Glucoson, 1-DH und 3-DH gebildeten Strukturen vor allem zu Melanoidinen bzw. farbigen Strukturen abreagieren [29].
Die Bildung von 3-DP ist mit dem gut aufgeklärten Reaktionsweg über die oxidative Spaltung aus Disacchariden zu erklären [27]. Daher ist die große Menge Maltose (100–200 mM) in den Suden diesen Reaktionsweg sehr förderlich.
Die **Zuckergehalte** bleiben in beiden Suden fast konstant. Ein Abreagieren ist praktisch nicht erkennbar. Die Reduzierung der Gehalte bei Pfannevoll bei Sud 1 bzw. zum Kochbeginn bei Sud 2 sind lediglich auf einen Verdünnungseffekt durch die erfolgten Nachgüsse zurückzuführen. Der leichte Anstieg der Zuckergehalte vom Einmaischen zur Rast ist durch die gewollte Enzymaktivität zur Generierung der Mono-, Di- und Trisaccharide aus der Stärke zu erklären. Die nachfolgenden Werte scheinen konstant, was auf einsetzenden Abreaktionen durch die Maillard-Reaktion zurückzuführen ist, die zum Beispiel in Abbildung 6-9 auf Seite 24 dargestellt ist.
Die gebildeten **Aldehyde** lassen eine Unterscheidung des verwendeten Malzes zu. Durch die Zugabe von 10 % Caramalz zum Sud 2 können von Anfang an fast doppelt so hohe Werte als im Sud 1 ermittelt werden, wobei der erste Messpunkt von Sud 1 als Ausreißer betrachtet wird. Die Aldehydkonzentrationen steigern sich im Laufe des Prozesses auf fast das Dreifache. Im Gegensatz dazu bleiben die Ergebnisse von Sud 1 relativ konstant. Einen Einfluss der Hopfengabe auf die Aldehydgehalte wie bei den α-Dicarbonylverbindungen ist weder bei Sud 1 noch Sud 2 zu beobachten.
In beiden Suden wird **Formaldehyd** anteilig am meisten gebildet, was vor allem aus dem α-Dicarbonylabbau aus 3-DH als ein Spaltprodukt der α-Dicarbonylspaltung [102] und im geringen Maße als Strecker-Aldehyd der Aminosäure Glycin entsteht. Da die freie Aminosäurekonzentration mit zunehmenden Röstgrad des Malzes durch Abreaktion mit reduzierenden Zuckern absinkt, sind die hohen Werte eher direkt aus der Maillard-Reaktion zu erklären. Ein weiteres Beispiel von jedoch eher geringerer Bedeutung ist die Abspaltung von Formaldehyd aus 1-DH während der Bildung von Furanon (Abbildung 9-18). Dieser Reaktionsweg kann jedoch nur angenommen werden, da Furanon nicht bestimmt wurde.
Eine eindeutige Erklärung für die hohen Formaldehydwerte, die eindeutig aus dem Caramalz stammen, ist auch der Literatur nur schwer zu entnehmen. Die Röstbedingungen von 150–180 °C bei der Caramalzproduktion führen nicht nur zu den hohen Formaldehydgehalten, sondern die Röstprodukte scheinen ebenfalls für die beschleunigte Generierung von Formaldehyd während der Sudhausarbeit verantwortlich zu sein. Letztere scheinen stärker Einfluss zu nehmen, da der Anteil von Caramalz nur 10 % beträgt.

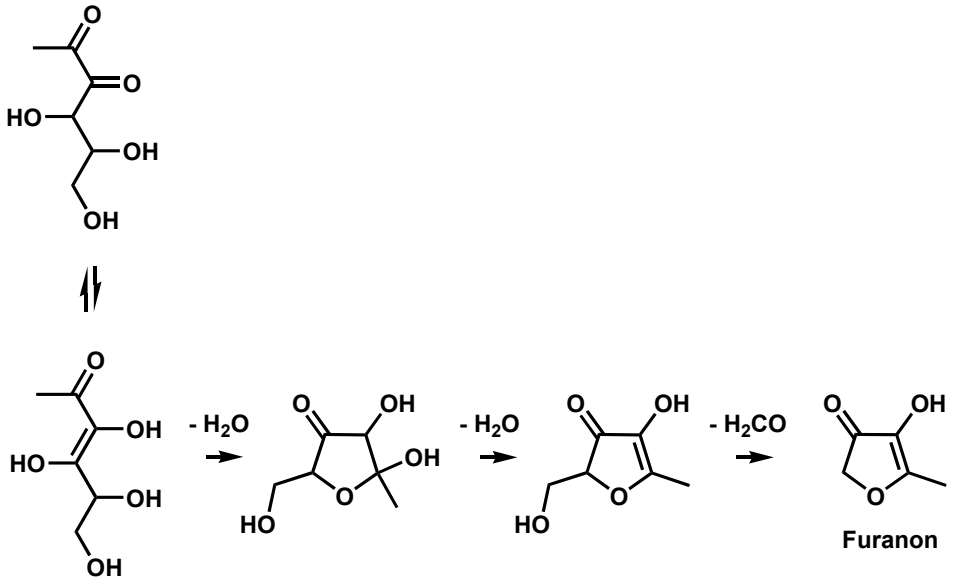


Abbildung 9-18: Abspaltung von Formaldehyd bei der Cyclisierung von 1-DH [102].

Die sehr hohen Werte an Formaldehyd werden im weiteren Verlauf der Gärung und Lagerung wieder stark reduziert (Vergleiche Abschnitt 8.3). Ein gewisser Anteil von Formaldehyd fällt mit dem Trub durch Bildung von Komplexen mit Polyphenolen aus. Literaturwerte geben 13–47 µM Formaldehyd in Dosen- und Flaschenbier an [103], was teilweise bestätigt werden konnte. Lawrence *et al.* gehen davon aus, dass die Beschichtungen der Verpackungen Formaldehyd in das Bier freigibt [*ibd.*]. Die ermittelten Werte lassen den Brauprozesses ebenfalls als Quelle zu.
Im Gesamtvergleich sind **Acetaldehyd** und **Glycolaldehyd** weniger bedeutend. Acetaldehyd ist der Strecker-Aldehyd aus Alanin. Wichtiger jedoch ist, dass es ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung ist. Durch Decarboxylierung von Pyruvat durch Pyruvatdecarboxylase des Hefemetabolismus kommt es zum starken Anstieg im fertigen Bier. Acetaldehyd ist der Hauptaldehyd im Bier und macht den Anteil von 60–97 % aller Aldehyde im Bier aus [104], spielt im Brauprozess aber praktisch keine Rolle. In beiden Suden nur in geringen Mengen gebildet, bleibt die Konzentration während des Prozesses relativ konstant. Bei Glycolaldehyd sieht das Bild etwas differenzierter aus. Es bildet sich im Sud 2 mit 100 µM deutlich mehr als im Sud 1 mit etwa 30 µM. Zudem ist im Sud 2 eine gewisse Steigerung während des Kochens zu erkennen, was vor allem auf die Abspaltung aus 1-DH über das entsprechende Amadori-Produkt bzw. das Zuckerfragmentierungsprodukt der D-Glukose zurückzuführen ist [105]. Generell ist Glycolaldehyd sehr reaktiv und reagiert sehr schnell unter anderem zu Pyrazinen weiter.

Wie schon beschrieben, ist die Aldehydkonzentration im fertigen Bier allgemein niedriger als während des Brauprozesses (vergleiche Abschnitt 8.3). Einerseits werden die Aldehyde durch Verstoffwechselung der Hefen „verbraucht“ und andererseits tragen fortgesetzte Reaktionen, im Besonderen die Reaktion mit Sulfiten [106] zu Formaldehyd- und Acetaldehyd-Bisulfit-Addukten, zur Verringerung der Konzentration bei. Im Gegensatz zum freien Sulfit, besitzen Bisulfit-Addukte bei pH 4,3 ein nur sehr geringes Oxidationspotential bei 0,93 V, so dass die Reducing Activity gegenüber oxidativen Substanzen verloren geht. Dennoch behalten die Bisulfit-Addukte ihre Radikalfangende Wirkung zum Beispiel gegenüber aktiven Sauerstoffspezies und

reduzieren gleichermaßen wie freies Sulfit die Entwicklung von Chemilumineszenz im lagernden Bier, verhindern die Reaktion freier Radikale (vergleiche Abschnitt 6.5.1) [*ibd.*].
Die unterschiedlichen Formen der Sulfite, frei wie auch als Addukt, werden dabei in untereinander vergleichbarem Maß verbraucht. So konnte gezeigt werden, dass Acetaldehyd-Bisulfit die Bildung von Trübungen und Geschmacksveränderungen während der Lagerung verhindert [*ibd.*]. Da Acetaldehyd im fertigen Bier mengenmäßig gegenüber allen Aldehyden überwiegt, ist dieses von größter Bedeutung.
Mit Formaldehyd-Bisulfit wird die Trübungsbildung interessanterweise bei 37 °C jedoch beschleunigt. Der Effekt wird von abgegebenem Formaldehyd verursacht, das Bisulfit-Addukt selbst hat keine trübungsfördernden Eigenschaften. Das Sulfit wird aber zu Sulfat oxidiert, welches Formaldehyd abgibt. Formaldehyd bildet bekanntlich mit Polyphenolen wie Proanthocyanidinen große unlösliche Komplexe, während andere Aldehyde wie Acetaldehyd diese Eigenschaft nicht besitzen [11-13].
Die Bildung von Radikalen erfolgt durch Autoxidation molekularen Sauerstoffs ($^3O_2$) zu $^{\bullet}O_2^-$ während der Lagerung von abgefülltem Bier. Durch Metallkatalyse im Sinne einer Haber-Weiss-Reaktion werden $^{\bullet}OH$ Radikale aus $^{\bullet}O_2^-$ und/oder H_2O_2 gebildet. Freies Sulfit sowie Carbonyl-Bisulfit-Addukte unterbrechen an diesem Punkt die Radikalreaktion [16, 106].
Als weitere Verbindung wurde **Ferulasäure** bestimmt (Abbildung 9-15). Beide Sude zeigen prinzipiell dieselben Tendenzen bzgl. Menge und Verlauf. Der leichte Anstieg ist durch Freisetzung von estergebundener Ferulasäure von Arabinoxylanen durch Feruloylesterasen zu erklären. Die leicht erhöhten Werte von Sud 1 bestätigen dies, da die Enzyme bei den Temperaturen der Caramalzherstellung denaturiert werden und somit im Sud 2 nicht mehr wirken können, was auch in der Literatur so beschrieben wird [42, 43].
Für die **antioxidativen Parameter** scheinen der Beginn des Kochens bzw. die Hopfengabe die interessantesten Zeitpunkte zu sein. Die Aussage des EAP als Maß für die Fähigkeit der Maische bzw. des Sudes Radikale abzufangen wird an diesen Punkten sehr deutlich. Das in beiden Suden zu Beginn praktisch nicht bestimmbare EAP wird während des Maischens nur wenig aufgebaut. Erst das Kochen erhöht das EAP und wird nochmals merklich bei der Hopfengabe gesteigert (Abbildung 9-16 und Abbildung 9-17). Letzteres induziert gleichzeitig eine starke Radikalgenerierung, was die T-Werte beider Sude anzeigen. Dabei wird die absolute Radikalmenge durch das Spin-Trap Reagenz POBN bestimmt. Diesen Effekt zu erklären ist relativ schwierig. Beiden Suden wird dadurch das gewonnene EAP wieder stark entzogen, was in dem plötzlichen Absinken der Werte zu beobachten ist, so dass der EAP des Sud 2 halbiert wird. Insgesamt sind die Werte des EAP von Sud 2 trotz mehr Melanoidine geringer. Der Aufbau benötigt länger und scheint auf einen negativen Einfluss des Caramalzes hinzudeuten. Das wird zudem durch den fast dreifach höheren T-Wert bei der Hopfengabe deutlich. Schwierig ist die Aussage zu treffen, ob wirklich mehr Radikale durch das Caramalz zu dem Zeitpunkt der Hopfengabe entstehen oder ob das geringere EAP dazu führt, dass weniger Radikale abgefangen werden. Möglich ist auch, dass beide Effekte zusammen wirken. Die Werte der Reducing Activity sind nur wenig aufschlussreich, wobei Antioxidantien erfasst werden, die in der Lage sind Wasserstoffatome zu abstrahieren. Das betrifft vor allem Substanzen mit Hydrochinoncharakter oder auch Reduktone. Da die Menge an gebildeten Reduktonen über dem Prozess der Sudhausarbeit in der Summe gesehen nahezu konstant ist, spiegelt sich dies auch in der Reducing Activity wider. Dies trifft ebenfalls auf die Ferulasäure zu, da sich die Werte während der Sudhausarbeit kaum ändern. Sud 1 bildet etwas mehr

Reduktone und besitzt auch die etwas größere Reducing Activity. Im Umkehrschluss kann für die Reduktone gefolgert werden, dass der Anteil der Bildung des EAP der selbigen nur gering ist. Da das EAP während der Radikalgenerierung deutlich absinkt, sollte sich ein Verbrauch an Reduktonen in einer Verminderung der Reducing Activity widerspiegeln, was jedoch nicht bestätigt werden konnte.

9.2 Würze - Modelluntersuchungen

Zur Untersuchung der Einflüsse von Maillard-Produkten im System Bier, ist ein Verständnis der Reaktionen in einer vereinfachten Matrix unumgänglich. Daher wird im Folgenden ein Modellsystem aus einem komplexen Kohlenhydratgemisch, angelehnt an die vorhandenen Inhaltsstoffe zu Beginn des Würzekochens, genauer betrachtet. Diese Matrix ähnelt der Würze während der Sudhausarbeit, ist aber dennoch einfach genug sein, um möglichst störende Einflussfaktoren auszuschließen. Bei dem verwendeten Würzemodell handelt es sich um eine der Literatur entnommene und für die eigenen Ziele abgeänderte Modellvariante (siehe Abschnitt 8.2) [54]. Die Zusammensetzung ist den Suden gegenüber vereinfacht und es werden nur einzelne Aminosäuren variiert. Die Parameter der Modelle werden wie jene beim Kochen der Würze gewählt: 100 °C für mindestens eine Stunde. Die Modelle beinhalten Maltose, D-Glukose, D-Xylose und eine Aminosäure in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5. Für die Versuche wurden die Aminosäuren L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Threonin, L-Prolin und L-Arginin verwendet. Die Wahl der Aminosäuren erfolgte nach mengenmäßiger Bedeutung im Bier (L-Prolin ist mit 320–480 mg je Liter Bier am meisten vorhanden) und der Verfügbarkeit zum Zeitpunkt des Experimentes. Weiterhin repräsentieren die unterschiedlichen Aminosäuren die verschiedenen Gruppen, in welche sie eingeteilt werden: hydrophil (L-Glycin), aromatisch (L-Phenylalanin), schwefelhaltig (L-Methionin), polar (L-Threonin), basisch (L-Arginin), heterocyclisch (L-Prolin).
Die gemessenen Werte werden mit den Messwerten der Sudhausarbeit korreliert. Die Erfassung von antioxidativen Parametern soll entsprechende Charakteristika und Eigenschaften bzw. deren Veränderung während der thermischen Prozessierung zeigen und mit den molekularstofflichen Veränderungen korreliert werden.

9.2.1 Ergebnisse der Würzemodelle

Für eine bessere Übersicht zeigen die nachfolgenden Tabellen zusammengefasst die α-Dicarbonyl- sowie Aldehydgehalte der Modellversuche dargestellt als Heatmap. Die bedingte Formatierung der Heatmap erfolgt von grün (niedrigster Wert) nach rot (höchster Wert), wobei die Darstellung einer Aminosäure zusammengehörig ist. So sind beispielsweise die Versuche mit und ohne Ferulasäure von L-Glycin direkt miteinander vergleichbar. Die Ergebnisse sind nach Versuch (Grundmodell - GM), der zugegebenen Aminosäure (im Dreibuchstabencode), ohne und mit Ferulasäure (FS) in µM angegeben. Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze (kleinster Kalibrierpunkt) werden als u. B. angegeben.
Folgendermaßen sind die Aminosäuren den Versuchen zugeordnet:

- L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Threonin und L-Prolin für GM-Modelle
- L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Threonin und L-Arginin für GM-Modelle gleicher Molarität
- L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Threonin und L-Prolin für Versuche mit Ferulasäure
- L-Prolin für antioxidative Untersuchungen

Grundmodell ohne Aminosäure, ohne und mit Ferulasäure

Tabelle 9-1: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM und GM + FS [µM]

Zeit [min]	0	10	30	60	120
Modell	**GM; 100 °C; pH 5,5**				
Glucoson	u. B.	3,7	13,6	23,4	27,2
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DH	0,9	1,9	5,2	7,4	30,6
3-DP	u. B.	0,3	2,0	3,5	11,3
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	0,3	0,7	3,1	3,6	3,3
Methylglyoxal	1,1	0,7	1,3	2,2	5,6
Diacetyl	u. B.	0,1	0,3	0,4	0,5
	GM + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glucoson	u. B.	13,0	22,9	26,5	25,5
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DH	1,0	1,4	2,4	4,9	10,5
3-DP	u. B.	0,6	1,7	3,6	4,8
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Methylglyoxal	0,6	0,8	0,9	1,4	2,5
Diacetyl	1,5	0,1	0,1	0,2	0,1

Die Ergebnisse des Grundmodells (Tabelle 9-1) zeigen für die theoretisch zu erwartenden Werte ein entsprechendes Verhalten. Auffallend sind die Werte für Glucoson und 3-DH, welche mit jeweils ca. 30 µM ein ähnliches Niveau nach 120 Minuten erreichen.
Ferulasäure scheint auf die Bildung von 3-DH einen hemmenden Einfluss zu besitzen, da es um ein Drittel weniger gebildet wird. Glucoson wird hingegen schneller generiert, überschreitet jedoch nicht das Niveau vom Versuch ohne Ferulasäure. Weiterhin wird beim Versuch mit Ferulasäure die Bildung der kurzkettigen α-Dicarbonylverbindungen (Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl) erheblich reduziert, die Menge von Methylglyoxal wird halbiert und Glyoxal kann nicht mehr bestimmt werden. Diacetyl bleibt innerhalb der Standardabweichung (Anhang) gleich.

Die Aldehydkonzentrationen der Modelle ohne und mit Ferulasäure, zeigen kein gemäß Tabelle 9-2 einheitliches Bild. Die Messwerte von Glycolaldehyd waren matrixbedingt nicht auswertbar und fehlen daher. Formaldehyd und Acetaldehyd waren ab 20 Minuten bestimmbar. Die Werte von Formaldehyd steigen bis 120 Minuten ohne Ferulasäure auf einen Wert von 26 µM. Mit Ferulasäure sind die Formaldehydwerte hingegen niedriger und bewegen sich um 5 µM. Acetaldehyd bleibt ebenfalls auf stabilem Niveau, wird jedoch mit Ferulasäure etwa doppelt so viel gebildet. Ohne Ferulasäure liegt der Wert um 5 µM, mit Ferulasäure bei etwa 9 µM.

Tabelle 9-2: Aldehydkonzentrationen der Modelle GM und GM + FS [µM]

Zeit [min]	0	20	40	60	120
Modell	**GM; 100 °C; pH 5,5**				
Glycolaldehyd					
Formaldehyd		4,9	13,4	20,8	26,2
Acetaldehyd		5,0	4,0	6,2	2,1
	GM + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glycolaldehyd					
Formaldehyd		4,2	3,4	6,2	4,1
Acetaldehyd		8,7	9,0	11,4	9,5

Grundmodell mit L-Glycin, ohne und mit Ferulasäure

Das Modell mit der einfachsten Aminosäure L-Glycin zeigt ein ähnliches Verhalten wie das Grundmodell. Es werden durch den katalytischen Einfluss der Aminogruppe mehr α-Dicarbonylverbindungen gebildet. 3-DH entsteht am meisten, gefolgt von Glyoxal als dessen typisches Spaltprodukt. 1-DH sowie dessen Spaltprodukt Methylglyoxal können praktisch nicht bestimmt werden. Glucoson wird nur wenig gebildet und verbleibt auf stabilem Niveau.

Bei Zugabe von Ferulasäure zum Modell tritt eine Verschiebung der Bildung zugunsten von 1-DH auf, das deutlich messbar ist und kontinuierlich bis auf 13 µM nach 120 Minuten ansteigt. Die Werte von Methylglyoxal sind ebenfalls erhöht. Die Konzentration von Glucoson halbiert sich im Vergleich zum reinen Glycin-Modell. Des Weiteren reduziert sich die Bildung von 3-DH und Glyoxal bleibt auf ähnlichem Niveau.

Tabelle 9-3: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM + Gly und GM + Gly + FS [µM]

Zeit [min]	0	20	40	60	120
Modell	**GM + Gly; 100 °C; pH 5,5**				
Glucoson	u. B.	16,5	16,9	15,8	14,1
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	0,8
3-DH	u. B.	18,9	41,0	58,5	102,6
3-DP	u. B.	1,3	3,5	4,6	6,0
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	0,1	0,7
Glyoxal	u. B.	16,4	25,7	30,4	6,2
Methylglyoxal	u. B.	2,5	4,6	5,9	5,4
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
	GM + Gly + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glucoson	u. B.	8,2	8,0	8,1	7,7
1-DH	3,2	6,9	8,9	10,0	13,2
3-DH	1,7	13,6	31,6	43,7	75,9
3-DP	u. B.	2,0	2,8	3,4	3,5
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	9,5	15,6	20,8	24,4
Methylglyoxal	u. B.	12,5	20,4	29,1	46,5
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Der Vergleich der Aldehydkonzentrationen des Modells zeigt bei Zugabe von Ferulasäure eine eindeutige Verschiebung der Werte zugunsten der Glycol- und Acetaldehydwerte. Formaldehyd verbleibt mit Ferulasäure auf niedrigem, stabilem Niveau. Die Bildung von Glycolaldehyd korreliert sehr gut mit der Bildung von 1-DH, aus welchem es primär gebildet wird.

Die Werte für die Aldehyde bei 0 Minuten ohne Ferulasäure waren matrixbedingt nicht auswertbar.

Tabelle 9-4: Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Gly und GM + Gly + FS [µM]

Zeit [min]	0	20	40	60	120
Modell	**GM + Gly; 100 °C; pH 5,5**				
Glycolaldehyd		u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Formaldehyd		12,3	22,3	29,7	52,4
Acetaldehyd		8,4	8,0	6,2	6,9
	GM + Gly + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glycolaldehyd	10,0	12,8	13,5	9,4	7,8
Formaldehyd	5,7	6,0	4,9	6,9	6,8
Acetaldehyd	19,4	28,9	11,2	63,5	31,7

Grundmodell mit L-Methionin, ohne und mit Ferulasäure

Im Modell mit L-Methionin wird Glucoson nur im geringen Maße gebildet. Das Maximum tritt mit 9 µM schon bei 40 Minuten Reaktionszeit auf. 3-DH zeigt einen ähnlichen Verlauf wie im Modell mit Glycin. Glyoxal wird langsam gebildet und bleibt ab 40 Minuten auf stabilem Niveau. Des Weiteren wird mit Ferulasäure mehr Glucoson gebildet und es entsteht 1-DH in gut bestimmbaren Mengen. Der Konzentrationsverlauf von 3-DH bleibt gleich. Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl werden nicht beeinflusst.

Tabelle 9-5: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM + Met und GM + Met + FS [µM]

Zeit [min]	0	20	40	60	120
Modell	**GM + Met; 100 °C; pH 5,5**				
Glucoson	u. B.	6,3	9,0	7,4	6,1
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	2,6
3-DH	u. B.	16,2	40,9	56,2	114,0
3-DP	u. B.	u. B.	1,5	3,2	5,4
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	6,6	12,4	13,7	13,1
Methylglyoxal	u. B.	u. B.	u. B.	1,3	4,0
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
	GM + Met + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glucoson	u. B.	17,6	16,4	12,2	16,8
1-DH	5,1	9,2	10,3	11,0	13,3
3-DH	0,4	17,8	40,1	59,8	114,1
3-DP	u. B.	2,1	4,0	4,2	5,3
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	u. B.	10,7	8,0	12,1
Methylglyoxal	u. B.	u. B.	2,4	2,7	6,4
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Die Aldehyde verhalten sich ähnlich wie im Glycin-Modell. Die Bildung von Formaldehyd wird bei Zugabe von Ferulasäure gehemmt und verbleibt auf niedrigem Niveau. Im Gegensatz dazu wird mehr Glycolaldehyd gebildet, welches aber schneller wieder abreagiert. Acetaldehyd wird deutlich mehr gebildet.
Die Werte für die Aldehyde bei 0 Minuten ohne Ferulasäure waren matrixbedingt nicht auswertbar.

Tabelle 9-6: Aldehydkonzentration des Modelle GM + Met und GM + Met + FS [µM]

Zeit [min]	0	20	40	60	120
Modell	**GM + Met; 100 °C; pH 5,5**				
Glycolaldehyd		5,2	4,7	7,5	5,4
Formaldehyd		13,7	26,8	10,4	39,8
Acetaldehyd		5,3	3,0	6,7	1,2
	GM + Met + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glycolaldehyd	14,2	10,1	11,0	10,3	9,6
Formaldehyd	6,8	6,4	6,8	6,6	6,6
Acetaldehyd	50,1	27,3	76,6	38,6	30,8

Grundmodell mit L-Phenylalanin, ohne und mit Ferulasäure

Wird dem Modell L-Phenylalanin zugegeben, so zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie bei den anderen Modellen. Glucoson wird in ähnlichem Maße gebildet, 1-DH kann nicht bestimmt werden und 3-DH erreicht nach 120 Minuten mit 100 µM den höchsten Wert aller α-Dicarbonylverbindungen.
Die Zugabe von Ferulasäure hat hier keinen deutlich anderen Einfluss als vorher, während bei den anderen Modellen die Bildung von 1-DH positiv beeinflusst wird.
Eine Steigerung der Ferulasäurekonzentration auf das Zehnfache (maximale Löslichkeit von Ferulasäure unter den Bedingungen) hat auf die Bildung von 1-DH einen unterdrückenden Einfluss und 1,4-DDH tritt zum ersten Mal in messbaren Mengen auf.
Die Werte der Aldehyde sind ähnlich jenen der anderen Modelle. Der Steigerung der Ferulasäurekonzentration folgen eine erhöhte Bildung von Glycolaldehyd und eine Verringerung der Bildung von Formaldehyd. Zudem wird bei Erhöhung der Ferulasäurekonzentration vermehrt Acetaldehyd gebildet.
Die Werte für die Aldehyde bei 0 Minuten ohne Ferulasäure waren matrixbedingt nicht auswertbar.

Tabelle 9-7: α-Dicarbonylkonzentration der Modelle GM + Phe, GM + Phe + FS und GM + Phe + 10xFS [µM]

Zeit [min]	0	20	40	60	120
Modell	**GM + Phe; 100 °C; pH 5,5**				
Glucoson	u. B.	12,2	17,1	7,7	15,3
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	2,0
3-DH	u. B.	15,5	36,5	42,7	99,0
3-DP	u. B.	1,9	4,4	5,9	9,4
1,4-DDH	u. B.	u. B.	0,4	0,2	0,2
Glyoxal	u. B.	11,3	23,8	17,8	34,0
Methylglyoxal	u. B.	1,7	2,7	4,0	5,5
Diacetyl	u. B.	u. B.	2,3	23,2	7,4
	GM + Phe + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glucoson	u. B.	19,3	17,6	19,3	21,9
1-DH	u. B.	11,7	7,0	7,5	11,4
3-DH	u. B.	14,5	34,7	57,3	119,2
3-DP	u. B.	u. B.	1,1	2,0	5,4
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	10,8	15,5	21,7	27,9
Methylglyoxal	u. B.	u. B.	u. B.	1,3	3,9
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
	GM + Phe + 10xFS; 100 °C; pH 5,5				
Glucoson	u. B.	17,9	18,9	19,0	14,9
1-DH	u. B.	u. B.	3,9	4,3	6,9
3-DH	u. B.	15,6	34,3	53,6	103,4
3-DP	u. B.	3,2	4,5	6,1	8,3
1,4-DDH	u. B.	1,9	2,5	3,2	4,8
Glyoxal	u. B.	13,0	20,2	25,8	28,1
Methylglyoxal	u. B.	3,3	3,6	5,1	7,5
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Tabelle 9-8: Aldehydkonzentrationen des Modelle GM + Phe, GM + Phe + FS und GM + Phe + 10xFS [µM]

Zeit t [min]	0	20	40	60	120
Modell	**GM + Phe; 100 °C; pH 5,5**				
Glycolaldehyd		u. B.	u. B.	u. B.	5,6
Formaldehyd		17,3	27,1	45,9	66,3
Acetaldehyd		10,5	11,0	11,2	5,6
	GM + Phe + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glycolaldehyd	14,2	10,1	11,0	10,3	9,6
Formaldehyd	6,8	6,4	6,8	6,6	6,6
Acetaldehyd	5,5	4,3	5,8	7,2	7,5
	GM + Phe + 10xFS; 100 °C; pH 5,5				
Glycolaldehyd	8,8	9,3	9,7	9,1	8,5
Formaldehyd	13,6	8,2	13,8	9,7	8,3
Acetaldehyd	29,7	14,6	28,7	13,9	5,6

Grundmodell mit L-Threonin, ohne und mit Ferulasäure

Die Ergebnisse mit L-Threonin unterscheiden sich nur wenig von den bisherigen Aminosäure-Modellen. Trotz der zusätzlichen Hydroxylgruppe und des damit polaren Charakters entsteht kein verändertes α-Dicarbonylspektrum. Erst durch Zugabe von Ferulasäure wird mehr Glucoson gebildet und 1-DH entsteht in messbaren Mengen.

Die Zugabe von Ferulasäure wirkt sich positiv auf die Bildung von 1-DH aus, so dass dessen Konzentration hier die höchste Konzentration aller Modelle aufweist. Die Bildung von 3-DH wird ebenfalls erhöht.

Tabelle 9-9: α-Dicarbonylkonzentration der Modelle GM + Thr und GM + Thr + FS [µM]

Zeit [min]	0	20	40	60	120
Modell	GM + Thr; 100 °C; pH 5,5				
Glucoson	u. B.	7,7	10,6	8,5	12,6
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	3,7
3-DH	1,1	12,0	27,7	39,4	81,1
3-DP	u. B.	1,4	2,8	4,2	6,3
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	0,1
Glyoxal	u. B.	1,5	4,6	4,5	8,3
Methylglyoxal	u. B.	u. B.	1,0	5,1	3,8
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
	GM + Thr + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glucoson	u. B.	17,7	21,1	21,5	24,5
1-DH	3,9	8,3	9,6	11,2	18,0
3-DH	u. B.	16,3	37,4	58,0	112,3
3-DP	u. B.	2,4	4,1	6,9	12,0
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	9,0	3,7	6,4	11,0
Methylglyoxal	u. B.	2,6	0,4	2,0	4,0
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Tabelle 9-10: Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Thr und GM + Thr + FS [µM]

Zeit [min]	0	20	40	60	120
Modell	GM + Thr; 100 °C; pH 5,5				
Glycolaldehyd		38,5	46,4	42,6	53,1
Formaldehyd		98,7	85,6	139,4	103,7
Acetaldehyd		66,6	62,6	79,2	70,0
	GM + Thr + FS; 100 °C; pH 5,5				
Glycolaldehyd	11,1	10,6	10,5	9,9	9,0
Formaldehyd	6,2	6,7	6,3	6,4	6,1
Acetaldehyd	49,8	43,2	79,1	42,6	32,5

Die Werte der Aldehyde sind im einfachen Modell um einiges höher als die der anderen Modelle. Formaldehyd wird anteilig am meisten gebildet. Der Zugabe von Ferulasäure folgt allgemein eine verringerte Bildung, wobei Acetaldehyd mengenmäßig am meisten entsteht. Die Werte für die Aldehyde bei 0 Minuten ohne Ferulasäure waren matrixbedingt nicht auswertbar.

Grundmodell mit L-Prolin, ohne und mit Ferulasäure

Die Aminosäure L-Prolin hat auf das Grundmodell nicht so einen großen Einfluss wie die anderen Aminosäuren. Die Werte ähneln denen des Grundmodells. Glucoson wird bis zum Endzeitpunkt etwas weniger gebildet. 1-DH ist nicht nachweisbar. 3-DH wird im Vergleich zu den anderen Modellen mit 35 µM nach 120 Minuten nur zu einem Drittel gebildet.

Die Zugabe von Ferulasäure hat praktisch keinen Einfluss auf das Spektrum der gebildeten α-Dicarbonylverbindungen, da weder signifikant mehr noch weniger Strukturen gebildet werden.

Tabelle 9-11: α-Dicarbonylkonzentration der Modelle HM + Pro und HM + Pro + FS [µM]

Zeit [min]	0	10	30	60	120
Modell	**GM + Pro; 100 °C; pH 5,5**				
Glucoson	u. B.	5,2	15,1	12,7	16,7
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DH	0,5	1,9	7,1	17,8	35,0
3-DP	u. B.	0,5	2,0	3,9	9,4
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Methylglyoxal	0,5	1,3	0,7	1,7	4,4
Diacetyl	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
Modell	**GM + Pro + FS; 100 °C; pH 5,5**				
Glucoson	u. B.	5,4	12,0	15,7	15,4
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DH	0,4	1,5	4,2	10,2	27,9
3-DP	u. B.	0,4	1,5	3,7	7,6
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	12,3
Methylglyoxal	0,6	0,7	0,7	1,5	3,9
Diacetyl	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2

Die Werte für die Aldehyde in An- und Abwesenheit von Ferulasäure waren matrixbedingt nicht auswertbar.

Modelle mit Aminosäuren gleicher Molarität

Um den Einfluss der Aminosäuren auf das betrachtete Produktspektrum aus molarer Sicht besser beurteilen zu können, entsprechen die Einwaagen der Aminosäuren der hier beschriebenen Modelle 20 mM.

Tabelle 9-12: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle mit Aminosäuren gleicher Molarität GM + Gly/Met/Phe/Thr/Arg + FS [µM]

Zeit [min]	0	60	120	240	0	60	120	240
Modell	GM + Gly (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5				GM + Met (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5			
Glucoson	u. B.	11,2	9,7	13,8	u. B.	13,9	12,2	12,4
1-DH	3,6	9,9	13,2	24,5	3,9	11,0	15,5	23,8
3-DH	3,6	41,9	75,9	115,6	1,2	52,6	106,7	174,2
3-DP	u. B.	5,3	3,5	4,8	u. B.	4,5	6,0	7,9
1,4-DDH	u. B.	u. B.	0,6	1,2	u. B.	2,1	2,2	3,5
Glyoxal	u. B.	27,1	27,5	34,6	u. B.	14,8	15,1	15,2
Methylglyoxal	u. B.	7,8	5,7	10,4	u. B.	3,1	4,8	6,1
Diacetyl	u. B.	u. B.	1,1	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Modell	GM + Phe (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5				GM + Thr (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5			
Glucoson	u. B.	14,0	16,7	18,7	u. B.	19,1	20,0	20,2
1-DH	3,6	11,7	17,9	32,0	3,8	13,7	21,0	41,0
3-DH	3,6	49,1	106,8	165,7	3,6	53,5	113,8	192,7
3-DP	u. B.	6,5	7,7	8,7	u. B.	6,9	7,1	8,0
1,4-DDH	u. B.	3,0	0,7	1,5	u. B.	3,1	0,8	1,7
Glyoxal	u. B.	27,5	31,2	34,5	u. B.	12,9	10,5	22,5
Methylglyoxal	u. B.	7,2	5,4	7,7	u. B.	7,5	6,1	11,1
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	4,0	3,3	u. B.
Modell	GM + Arg (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5							
Glucoson	u. B.	15,8	20,8	19,7				
1-DH	4,0	9,9	15,2	27,5				
3-DH	1,4	338,6	359,4	321,0				
3-DP	u. B.	6,6	11,8	13,4				
1,4-DDH	u. B.	u. B.	8,1	8,7				
Glyoxal	u. B.	27,9	25,8	13,7				
Methylglyoxal	u. B.	8,7	11,1	10,9				
Diacetyl	u. B.	5,2	5,9	7,7				

Abbildung 9-11 gibt die Werte der gemessenen α-Dicarbonylverbindungen als Heatmap der äquimolaren Modellversuche wider. Die bedingte Formatierung erfolgt von grün (niedrigster Wert) nach rot (höchster Wert) und Versuchsweise. Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze (kleinster Kalibrierpunkt) werden als u. B. angegeben. Zu erkennen ist, dass sich die Versuche in den gebildeten Verbindungen nur marginal unterscheiden. Bei der Konzentration von 3-DH ist ein aufsteigender Trend von L-Glycin, L-Methionin, über L-Phenylalanin zu L-Threonin zu erkennen. Die restlichen α-Dicarbonylverbindungen verhalten sich jedoch sehr ähnlich. Im Modell mit L-Arginin ist die höchste 3-DH-Konzentration zu finden, was durch den basischen Charakter und der damit erhöhten Reaktivität der Aminosäure zu erklären ist.

Dennoch werden die restlichen gemessenen α-Dicarbonylverbindungen nicht vermehrt gebildet.

Tabelle 9-13: Aldehydkonzentrationen der Modelle mit Aminosäuren gleicher Molarität GM + Gly/Met/Phe/Thr/Arg + FS [µM]

Zeit [min]	0	30	60	120	0	60	120	240
Modell	**GM + Gly (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5**				**GM + Met (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5**			
Glycolaldehyd	15,1	16,0	15,1	16,3	15,4	15,9	18,3	18,7
Formaldehyd	15,9	10,4	21,0	11,8	19,1	12,0	7,7	6,7
Acetaldehyd	48,6	18,7	59,8	24,1	32,3	21,6	18,9	13,1
Modell	**GM + Phe (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5**				**GM + Thr (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5**			
Glycolaldehyd	15,2	15,1	13,4	13,9	16,7	14,5	13,2	16,2
Formaldehyd	14,3	14,3	19,9	14,9	21,5	31,0	25,8	18,3
Acetaldehyd	26,4	11,8	32,8	15,0	23,2	16,3	18,9	26,9
Modell	**GM + Arg (20 µM) + FS (50 µM); 100 °C; pH 5,5**							
Glycolaldehyd	14,5	44,9	35,3	27,0				
Formaldehyd	1,5	61,6	45,6	126,2				
Acetaldehyd		7,4	13,3					

Die zu den äquimolaren Modellversuchen gehörenden Konzentrationen von Glycol-, Form- und Acetaldehyd sind in Tabelle 9-13 dargestellt. Wie bei den Werten der α-Dicarbonylverbindungen ist nur ein geringer Unterschied zwischen den Versuchen zu erkennen, abgesehen vom Modell mit Arginin. Nach 120 Minuten wird ein Wert von 126 µM erreicht, welcher den höchsten Wert der Modelle darstellt.

9.2.2 Ergebnisse der Modelle mit Ferulasäure nach Abschnitt 8.2.3 und 8.2.4

Die Werte der gemessenen α-Dicarbonylverbindungen der unter Abschnitt 8.2.3 und 8.2.4 beschriebenen GM-Modelle wurden schon im Abschnitt 9.2.3 betrachtet. In diesem Abschnitt werden nur Ergebnisse bezüglich Ferulasäure herangezogen und diskutiert.

Ergebnisse Würzemodelle mit Ferulasäure

In Abbildung 9-19 ist der Verlauf des Abbaus von Ferulasäure im Grundmodell in An- und Abwesenheit der Aminosäure L-Prolin dargestellt. Die Werte sinken bei beiden Modellen innerhalb der Versuchsdauer von vier Stunden, jedoch ist der Betrag eher gering.

Der Abbau bzw. die Abreaktion kann in anderen Modellen ebenfalls beobachtet werden. Abbildung 9-20 zeigt den Verlauf der Ferulasäurekonzentration aller Modelle im Vergleich. Abgesehen von den Unterschieden der Anfangskonzentration, ist die Geschwindigkeit des Abbaus bei allen Modellen innerhalb der ersten 120 Minuten sehr ähnlich, wobei innerhalb der Versuchszeit keine Plateauphase zu erkennen ist. Die Abstände der anfänglichen Konzentrationen bleiben auf ähnlichem Niveau. Also findet ein Abbau statt, der unabhängig von der Ferulasäurekonzentration ist.

Um die anfänglichen Schwankungen der Ausgangskonzentrationen auszugleichen, sind in Abbildung 9-21 (Seite 92) die Werte der Ferulasäure in Relation zur Anfangskonzentration gesetzt bzw. in Tabelle 9-16 die Werte rechnerisch auf 50 µM bezogen aufgeführt. In dieser Darstellung ist eine Rangfolge der Reaktivitäten besser ersichtlich. Im Modell mit L-Glycin wird Ferulasäure mit 13,3 µM innerhalb von 120 Minuten am stärksten abgebaut, gefolgt von L-Phenylalanin und L-Threonin. Im Grundmodell in An- und Abwesenheit von L-Methionin oder L-Prolin erfolgt der Ferulasäureabbau am langsamsten, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit etwa 7 µM pro 120 Minuten beträgt.

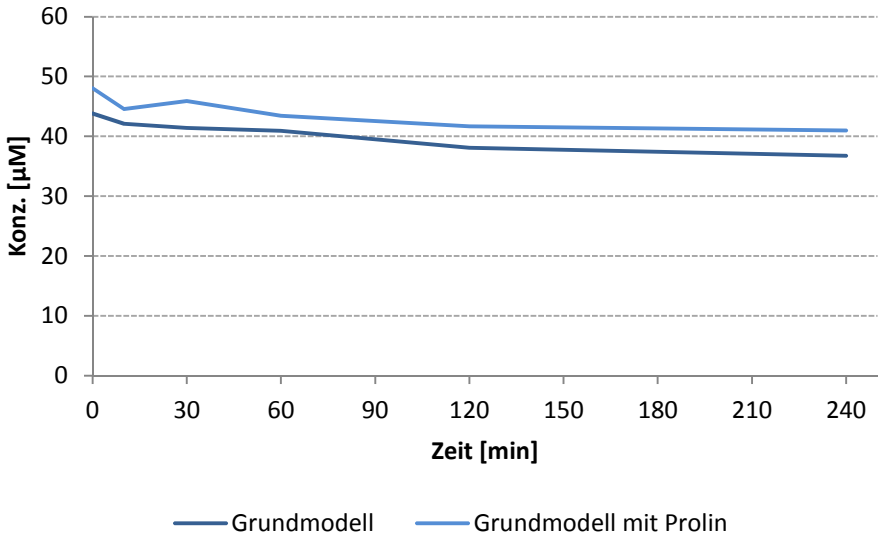


Abbildung 9-19: Ferulasäurekonzentrationsverlauf der Modelle GM + FS und GM + Pro + FS [µM] (Werte siehe Anhang Tabelle 12-10).

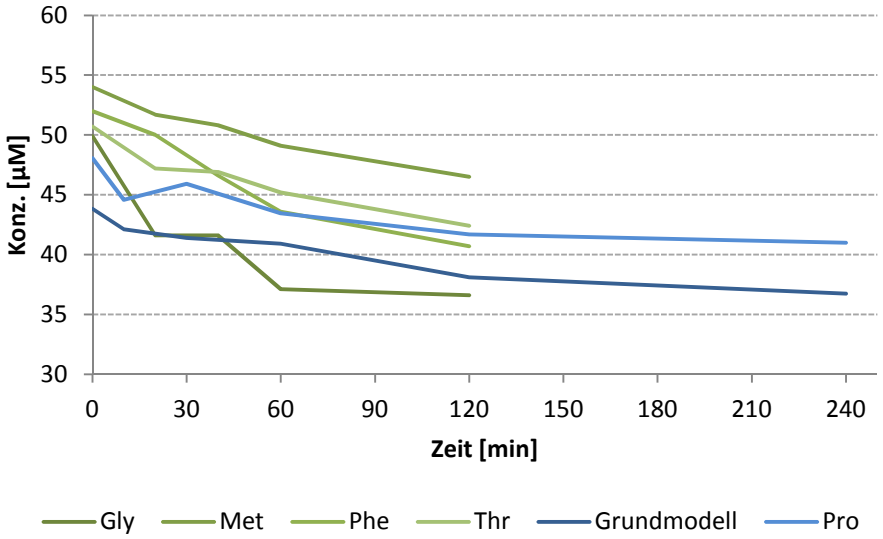


Abbildung 9-20: Verlauf der Ferulasäurekonzentration der Modelle GM + FS und GM + AS + FS.

In Tabelle 9-14 und Tabelle 9-16 ist der Abbau der Ferulasäure der Würzemodelle mit Ferulasäure nochmals mit Werten als Heatmap dargestellt. Demgemäß ist ein Abbau innerhalb der abgebildeten 120 Minuten Messzeit von ungefähr 10 µM Ferulasäure bei allen Modellen ersichtlich. Aufgrund der Konzentrationsschwankungen ist ein eindeutiger Einfluss auf die Abbaurate, wie schon erwähnt, schwierig zu erkennen.

Das Modell mit der zehnfachen Konzentration an Ferulasäure weist mit 10 % relativ betrachtet die geringsten Abbaurate auf. Ein Vergleich mit den anderen Modellen ist jedoch aufgrund der hohen Konzentration nicht sinnvoll und nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Tabelle 9-14: Ferulasäurekonzentrationen der Modelle GM + AS + FS [µM]

Zeit [min]	**0**	**20**	**40**	**60**	**120**
Ferulasäurekonzentrationen der GM-Modelle					
	43,8	42,1 (10 min)	41,1 (30 min)	40,9	38,1
Gly	49,9	41,6	41,6	37,1	36,6
Met	54,0	51,7	50,8	49,1	46,5
Phe	52,0	50,0	46,6	43,6	40,7
Thr	50,7	47,2	46,9	45,2	42,4
Pro	48,1	44,6 (10 min)	45,9 (30 min)	43,5	41,7
Phe 10×FS	535,5	520,4	496,3	499,0	482,0

Tabelle 9-15 zeigt ebenfalls, dass der Abbau der Ferulasäure unabhängig von den hier verwendeten Aminosäuren ist, wobei die Ausgangskonzentrationen der Aminosäuren äquimolar gewählt wurden. Die Abbauraten von Ferulasäure liegen wieder bei etwa 10 µM innerhalb von 120 Minuten. Die Steigerung der Reaktionszeit auf 240 Minuten gemäß Abbildung 9-21 führte zu keinem verstärktem Abbau, so dass die Abbaukurve mit der Zeit abflacht.

Tabelle 9-15: Ferulasäurekonzentrationen der Modelle – GM + AS + FS und GM + AS (gleiche Molarität) + FS [µM]

Zeit [min]	0	60	120	240
Vergleich gleicher Molarität (FS 50 µM; AS 20 mM)				
Gly	55,3	48,9	46	44,3
Met	57	50,3	50,4	48,5
Phe	56,4	49,7	48,1	45,5
Thr	53,4	49,2	42,9	41,3
Arg	55,1	52,1	46,7	40,4

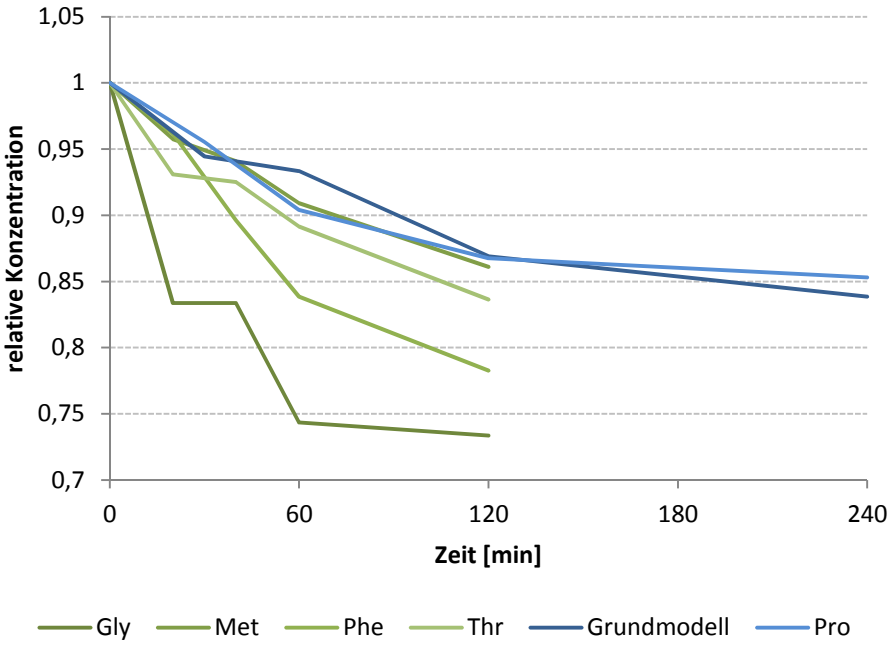


Abbildung 9-21: Relative Konzentration der Ferulasäure bezogen auf die Anfangskonzentrationen der Modelle GM + FS und GM + FS + AS.

Tabelle 9-16: Ferulasäurekonzentrationen der Modelle GM + AS + FS [µM] normiert auf eine Anfangskonzentration von 50 µM (500 µM)

Zeit [min]	0	20	40	60	120
Ferulasäurekonzentrationen normiert auf 50 µM bzw. 500 µM					
	50,0	48,1 (10 min)	46,9 (30 min)	46,7	43,5
Gly	50,0	41,7	41,6	37,1	36,7
Met	50,0	47,9	47,1	45,5	43,1
Phe	50,0	48,1	44,8	41,9	39,1
Thr	50,0	46,5	46,2	44,5	41,8
Pro	50,0	46,4 (10 min)	47,7 (30 min)	45,2	43,3
Phe 10xFS	500,0	485,8	463,4	465,9	450,0

Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität der Versuche zeigt eine einheitliche, konstante Entwicklung der Werte über den Versuchszeitraum (Abbildung 9-22). Das bedeutet, dass keine Substanzen unter den gegebenen Bedingungen gebildet werden, die eine größere Menge DPPH-Radikal reduzieren könnten. Der Ansatz mit der Aminosäure L-Prolin besitzt im Vergleich die größte antioxidative Aktivität, die sinkt, wenn Ferulasäure hinzugefügt wird.
Das Grundmodell und das Grundmodell mit Ferulasäure besitzen zueinander ähnliche Werte.

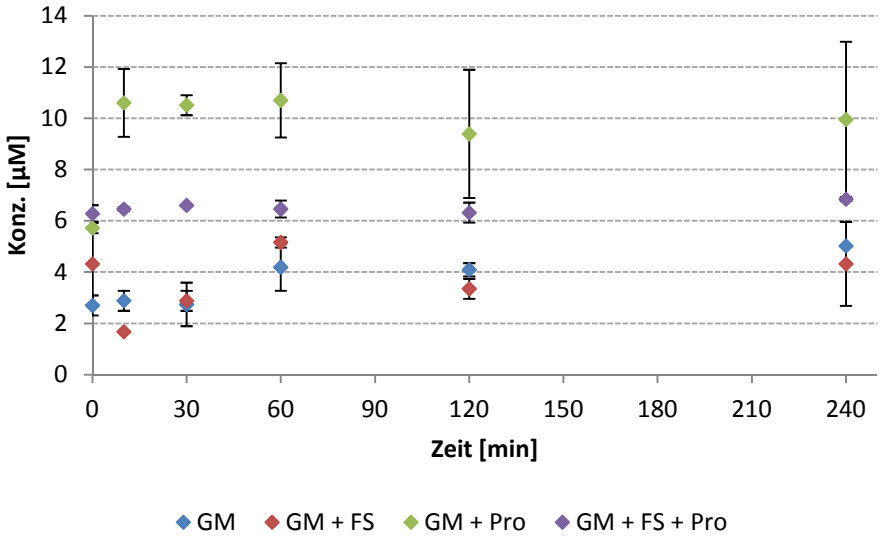


Abbildung 9-22: Antioxidative Aktivität bestimmt mittels ESR.

Die Versuche mittels Chapon lieferten keine verwertbaren Aussagen, d.h. die Versuchslösungen entwickelten keine bzw. nur eine geringe reduzierende Kraft gegenüber Fe^{3+}-Ionen. Daher konnte auch keine Abbildung erstellt werden.

9.2.3 Diskussion der Würzemodelle

Das α-Dicarbonyl, das am meisten bei allen Modellen entsteht, ist 3-DH. Im sauren Milieu der gewählten Versuchsbedingungen verläuft der Abbau der D-Glukose hauptsächlich über 1,2-Enolisierung des Amadori-Produktes. Der Bildungsweg von 1-DH, also der Reaktionsweg über die 2,3-Enolisierung, spielt praktisch keine Rolle. Erst nach langem Erhitzen sind Spuren der Verbindung zu finden. Weiterhin besitzt 1-DH nur eine geringe Halbwertszeit in den Reaktionslösungen, so dass die Abreaktion von gebildetem 1-DH eventuell schneller verläuft als dessen Bildung bzw. als es die Analytik zur Erfassung eine genauere Bestimmung erlaubt [102, 107, 108].
Unerwartet gering fallen bei allen Modellen die Konzentrationen für 3-DP aus. D-Xylose, welches als primäres Abbauprodukt 3-DP bilden sollte, ist im Vergleich zu D-Glukose nur zu einem Zehntel im Modell enthalten. Demgegenüber steht aber mehr als die fünfzigfache Menge Maltose. Als Hauptabbauprodukt ist hier das 3-DP zu erwarten, jedoch ist die geringe Aktivität der Maltose der limitierende Faktor [28], was durch die Versuche gut bestätigt wird. Die Gegenwart von Ferulasäure hat praktisch keinen Einfluss auf die Bildung von 3-DP (Abbildung 9-23 und Abbildung 9-25).

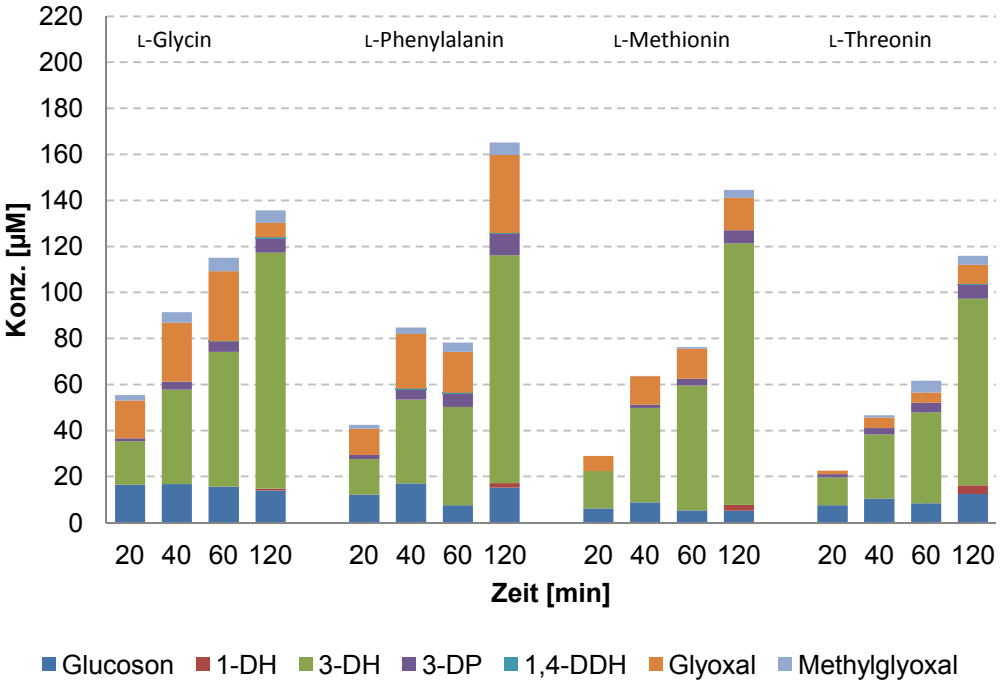


Abbildung 9-23: Zusammenfassung der Bildung von α-Dicarbonylverbindungen im Würzemodell mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin (Werte siehe Abschnitt 9.2.1).

In Abbildung 9-23 werden die gebildeten α-Dicarbonylverbindungen der Modelle mit dem größten Einfluss der verwendeten Aminosäuren direkt miteinander verglichen. Obgleich die Unterschiede nicht groß sind, werden in den Modellen mit L-Threonin am wenigsten α-Dicarbonylverbindungen gebildet und L-Phenylalanin am meisten. Glucoson wird unter den gegebenen Bedingungen nur in geringen Mengen gebildet. Idealerweise radikalisch-oxidativ bei neutral-basischen pH-Werten und Temperaturen

um 80 °C sind in den durchgeführten Modellen nicht unerhebliche Mengen zu finden [30, 31].
Der alternative Mechanismus über eine sauerstoffabhängige Oxidation des 1,2-Enaminol scheint als Entstehungsweg ebenfalls eine Rolle zu spielen. Jedoch gilt dies nur im eingeschränkten Maße, da sämtliche Versuche in abgeschmolzenen Spießampullen durchgeführt wurden. Diese enthalten den beim Zuschmelzen enthaltenen Sauerstoff. Ist dieser verbraucht, steht kein weiterer mehr zur Verfügung.
Methylglyoxal und Diacetyl spielen als Hauptspaltprodukte der α-Dicarbonylverbindungen nur eine untergeordnete Rolle in den Modellen. Nur Glyoxal ist mengenmäßig noch interessant. Gebildet unter anderem durch oxidative Spaltung von Glucoson, stellen die konstanten Werte von letzterem eine gute Quelle für Glyoxal dar. Dieses steht mit Glyoxal-Monoimin und letztlich über reduktive Schritte auch mit Glycolaldehyd-Imin im Gleichgewicht, was wichtig für die Bildung von Dialkyl-Pyrazin-Radikal-Kationen ist, einem bedeutenden Precursor für die Bräunung [32, 33].
Da zwischen Glycolaldehyd und Glyoxal ein Redoxgleichgewicht herrscht, sollten unter Einfluss von reduktiven Verbindungen Glycolaldehyd nachweisbar sein. In den Modellen mit L-Glycin und L-Phenylalanin ist jedoch kein Glycolaldehyd nachweisbar. Dafür sind die gefundenen Mengen Glyoxal höher als in den Modellen mit L-Methionin und L-Threonin, in welchem Glycolaldehyd nachweisbar war. Obwohl die Werte von L-Threonin verfälscht sind, konnte eindeutig Glycolaldehyd nachgewiesen werden (Abbildung 9-26, Seite 98).
Zieht man die Bräunung der Modelle heran (Abbildung 9-23), zeigt sich keine eindeutige Zuordnung der Farbentwicklung der vier Aminosäuren, wobei die gemessenen Absorptionswerte zu niedrig sind, um die auftretenden Schwankungen nicht durch methodische Schwankungen zu erklären. Ein erhöhter Gehalt von Glycolaldehyd zeigt in den durchgeführten Versuchen keine verstärkte Bräunung an.

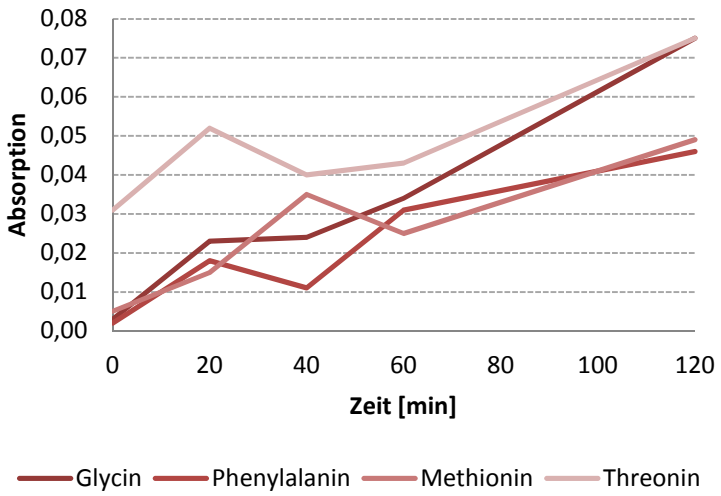


Abbildung 9-24: Bräunungsverlauf der Würzemodelle bei 420 nm.

Methylglyoxal spielt, wie schon erwähnt, nur eine untergeordnete Rolle. Trotz der großen Menge gebildeten 3-DH läuft die Retro-Aldol-Reaktion bzw. die Spaltung zwischen C-3 und C-4 unter den pH-Bedingungen nicht bevorzugt ab. Weitere Möglichkeiten der 3-DH Bildung, wie die Retro-Aldol-Spaltung der aminierten oder direkt der Amadori-Verbindung, werden aufgrund des pH-Wertes ebenfalls wenig favorisiert.
Die nachfolgende Tabelle 9-17 gibt die Werte der drei am meisten gebildeten α-Dicarbonylverbindungen Glucoson, 1-DH und 3-DH als Heatmap aller Modellversuche wider. Die bedingte Formatierung erfolgt von grün (niedrigster Wert) nach rot (höchster Wert). Dabei werden jeder Verbindung alle Werte gegenübergestellt.

Tabelle 9-17: Heatmap des Konzentrationsverlaufes von Glucoson, 1-DH und 3-DH aller durchgeführten Modellversuche in µM

	Zeit [min]	0	20	40	60	120
GM	Glucoson	u. B.	3,7 (10 min)	13,6 (30 min)	23,4	27,2
GM + FS		u. B.	13,0 (10 min)	22,9 (30 min)	26,5	25,5
GM + Gly		u. B.	16,5	16,9	15,8	14,1
GM + Gly + FS		u. B.	8,2	8,0	8,1	7,7
GM + Met		u. B.	6,3	9,0	7,4	6,1
GM + Met + FS		u. B.	17,6	16,4	12,2	16,8
GM + Phe		u. B.	12,2	17,1	7,7	15,3
GM + Phe + FS		2,0	19,3	17,6	19,3	21,9
GM + Phe + 10×FS		4,2	17,9	18,9	19,0	14,9
GM + Thr		u. B.	7,7	10,6	8,5	12,6
GM + Thr + FS		u. B.	17,7	21,1	21,5	24,5
GM + Pro		u. B.	5,2 (10 min)	15,1 (30 min)	12,7	16,7
GM + Pro + FS		u. B.	5,4 (10 min)	12,0 (30 min)	15,7	15,4
GM	1-DH	u. B.	u. B. (10 min)	u. B. (30 min)	u. B.	u. B.
GM + FS		u. B.	u. B. (10 min)	u. B. (30 min)	u. B.	u. B.
GM + Gly		u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	0,8
GM + Gly + FS		3,2	6,9	8,9	10,0	13,2
GM + Met		u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	2,6
GM + Met + FS		5,1	9,2	10,3	11,0	13,3
GM + Phe		u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	2,0
GM + Phe + FS		u. B.	11,7	7,0	7,5	11,4
GM + Phe + 10×FS		u. B.	u. B.	3,9	4,3	6,9
GM + Thr		u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	3,7
GM + Thr + FS		3,9	8,3	9,6	11,2	18,0
GM + Pro		u. B.	u. B. (10 min)	u. B. (30 min)	u. B.	u. B.
GM + Pro + FS		u. B.	u. B. (10 min)	u. B. (30 min)	u. B.	u. B.
GM	3-DH	0,9	1,9 (10 min)	5,2 (30 min)	7,4	30,6
GM + FS		1,0	1,4 (10 min)	2,4 (30 min)	4,9	10,5
GM + Gly		u. B.	18,9	41,0	58,5	102,6
GM + Gly + FS		1,7	13,6	31,6	43,7	75,9
GM + Met		u. B.	16,2	40,9	56,2	114,0
GM + Met + FS		0,4	17,8	40,1	59,8	114,1
GM + Phe		1,1	15,5	36,5	42,7	99,0
GM + Phe + FS		u. B.	14,5	34,7	57,3	119,2
GM + Phe + 10×FS		3,0	15,6	34,3	53,6	103,4
GM + Thr		1,1	12,0	27,7	39,4	81,1
GM + Thr + FS		u. B.	16,3	37,4	58,0	112,3
GM + Pro		0,5	1,9 (10 min)	7,1 (30 min)	17,8	35,0
GM + Pro + FS		0,4	1,5 (10 min)	4,2 (30 min)	10,2	27,9

Der Tabelle 9-17 ist der Einfluss der Einzelkomponenten auf die Modelle bezüglich Aminosäure und Ferulasäure zu entnehmen. Am einfachsten zu beschreiben ist dies bei 3-DH. Deutlich ist der positive Einfluss der Aminosäuren auf dessen Bildung zu erkennen. Wie unter Abschnitt 6.3.1 dargelegt, wirken die Aminosäuren katalytisch auf den Abbau von Kohlenhydraten, wie es auch in der Literatur mehrfach beschrieben wird [101, 107, 108]. Außer bei der Aminosäure L-Prolin wird die Menge 3-DH durch Zugabe von L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin oder L-Threonin verdrei- bis vervierfacht. Mit Aminosäurekomponente werden etwa 100 µM 3-DH nach 120 Minuten erreicht. Einzig die Aminosäure L-Prolin weist, ebenso wie die Gegenwart von Ferulasäure, keine erkennbaren Auswirkungen auf die Bildung von 3-DH auf.
Etwas differenzierter ist in der Übersicht die Bildung von 1-DH zu betrachten. Eindeutig ist der positive Einfluss auf die Bildung bei Anwesenheit von Ferulasäure zu erkennen. Ohne Ferulasäure praktisch nicht bestimmbar, wird es durch Zugabe der phenolischen Verbindung in nachweisbaren Mengen gebildet. Ein partieller Einfluss von Phenolsäuren auf die Bildung von Maillardprodukten wird von Peterson *et al.* beschrieben, welche als Ursache die Beeinflussung radikalischer Intermediate der Maillard-Reaktion nannten [110]. Nur beim Grundmodell und mit L-Prolin ist kein 1-DH auch im Beisein von Ferulasäure bestimmbar.
Bei Glucoson ist das Gesamtbild am komplexesten. Am meisten gebildet beim Grundmodell, scheint hier der oxidative Weg aus dem 1,2-Enaminol abzulaufen [32]. Bei Anwesenheit einer Aminosäure ist die Bildung von Glucoson gehemmt, wobei die Reduzierung der Werte von Glucoson nach 120 Minuten bei jeder Aminosäure verschieden stark ausgeprägt ist. L-Methionin hat den stärksten hemmenden Effekt und L-Threonin praktisch keinen.

Bei einem Gesamtvergleich der drei gebildeten α-Dicarbonylverbindungen Glucoson, 1-DH und 3-DH kann für die Modelle mit L-Methionin und L-Threonin eine etwas geringere Aktivität in Bezug auf die gebildete Menge von α-Dicarbonylverbindungen als die Modelle mit L-Phenylalanin und L-Prolin gezeigt werden. L-Threonin mit seiner zusätzlichen Hydroxylgruppe bzw. Hydroxyaminosäuren allgemein führen wegen Nebenreaktionen durch den nucleophilen Charakter zur Verlangsamung der Maillard-Reaktion. L-Methionin als schwefelhaltige Aminosäure wirkt ebenfalls durch die nucleophilen Eigenschaften hemmend. Ob bei L-Methionin ein antioxidativer Charakter ebenfalls zum Tragen kommt ist unklar.
Abbildung 9-25 zeigt den veränderten Reaktionsverlauf der ermittelten α-Dicarbonylverbindungen der Modelle bei Anwesenheit von Ferulasäure. Glucoson wird in deutlich bestimmbaren Mengen in allen vier Modellen mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin oder L-Threonin gebildet. Weiterhin wird im Gegensatz zu den Modellen ohne Ferulasäure wie sie in Abbildung 9-23 dargestellt sind, 1-DH in messbaren Mengen gebildet. Die weiteren α-Dicarbonylverbindungen 3-DH, 3-DP, 1,4-DDH, Glyoxal und Methylglyoxal zeigen eine ähnliche Verteilung wie schon in den Modellen ohne Ferulasäure (Abbildung 9-23).

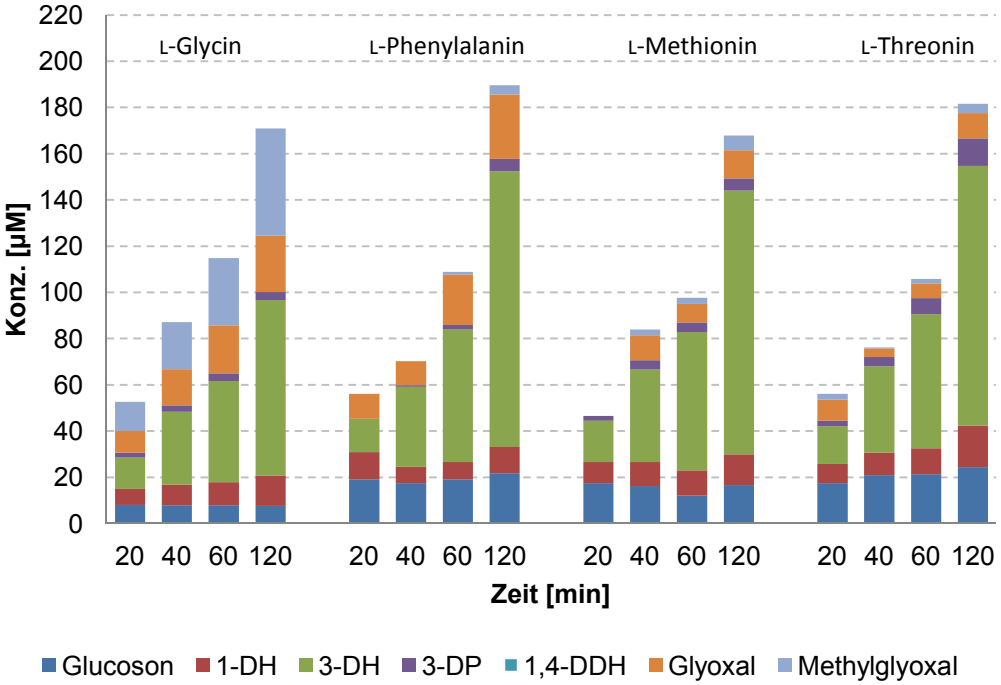


Abbildung 9-25: Zusammenfassung der Bildung von α-Dicarbonylverbindungen im Würzemodell mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin sowie Ferulasäure (Werte siehe Abschnitt 9.2.1).

Die gebildeten Mengen der Aldehyde (Abbildung 9-26) lassen sich mit den Ergebnissen der Sudhausarbeit vergleichen. Am meisten wird Formaldehyd gebildet, gefolgt von Acetaldehyd. Die hohen Aldehydwerte des Modells mit L-Threonin sind durch die besonderen Eigenschaften von L-Threonin mit der zusätzlichen Hydroxylgruppe zu erklären. Yaylayan *et al.* haben den thermischen Abbau von L-Threonin untersucht und fanden Acetaldehyd durch Retro-Aldol-Spaltung [109].

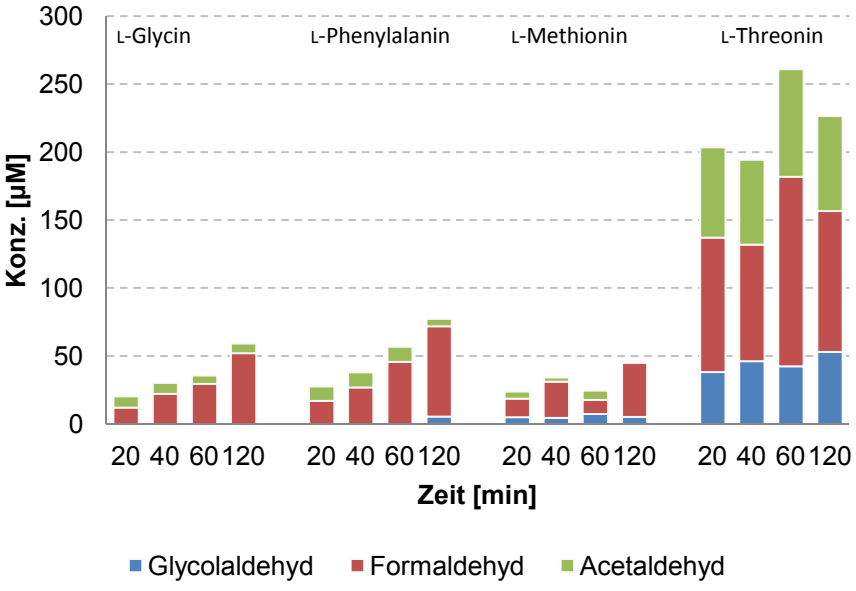


Abbildung 9-26: Entstehung von Aldehyden im Würzemodell mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin ohne Ferulasäure.

In Hinblick auf die Ergebnisse der Versuche mit Ferulasäure (Abbildung 9-27) ändert sich die Verteilung der gebildeten Aldehyde drastisch. Die Werte vom L-Threonin-Modell liegen nun mengenmäßig im Bereich der anderen Modelle. Formaldehyd ist kaum mehr bestimmbar und es wird mehr Acetaldehyd sowie Glycolaldehyd gebildet.

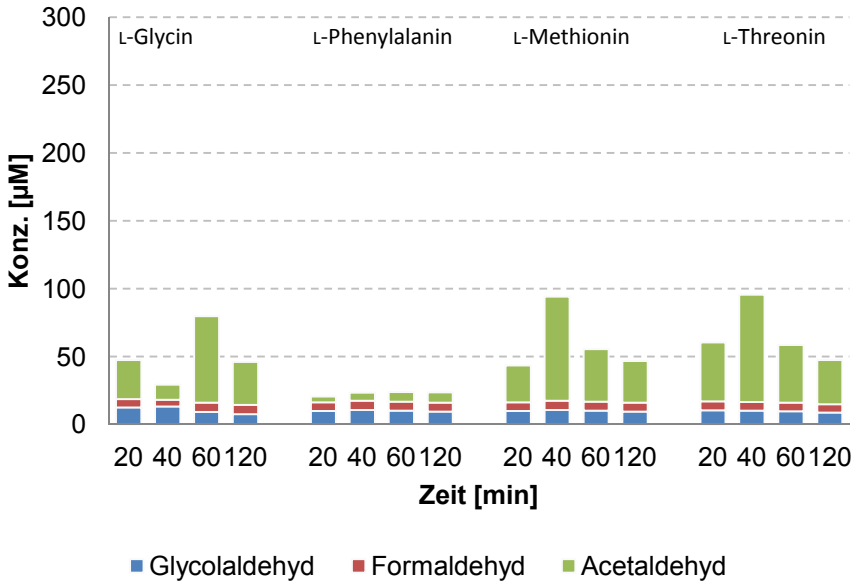


Abbildung 9-27: Entstehung von Aldehyden im Würzemodell mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin und Ferulasäure.

Hauptsächlich wird Formaldehyd durch Retro-Aldol-Reaktionen gebildet.

Die Auswirkungen die Ferulasäure insbesondere auf die nachweisbare Menge gebildeten Formaldehyds zeigt, sind nicht in den realen Proben der Sudhausarbeit wiederzufinden. Obgleich dort nicht unerhebliche Mengen der Phenolcarbonsäure vorkommen, betragen die ermittelten Konzentrationen von Ferulasäure nur etwa ein Fünftel der Modelle.

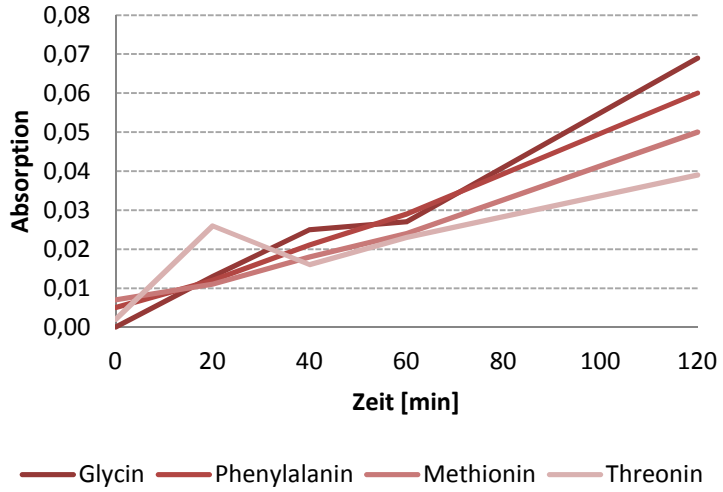


Abbildung 9-28: Bräunungsverlauf der Würzemodelle mit Ferulasäure bei 420 nm.

In Abbildung 9-28 ist die gemessene Bräunung bei 420 nm der vier Aminosäuren L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin mit Ferulasäure dargestellt. Die gezeigten Verläufe in Abbildung 9-28 sind denen der Versuche ohne Ferulasäure in Abbildung 9-24 praktisch gleich, wobei der Unterschied des Anstiegs der Bräunungsintensität nur gering ist. Letzteres zeigt sich auch in den Werten von 3-DH (Tabelle 9-17), da die Verbindung als Indikator für die Bräunung herangezogen werden kann [100]. Bei allen Modellen mit Aminosäuren, bei An- oder Abwesenheit von Ferulasäure, sind die gebildeten Mengen 3-DH wie beim Bräunungsverlauf sehr ähnlich.
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Ferulasäure einen Einfluss auf das Maillard-Reaktionssystem besitzt. Die Phenolsäure beeinflusst die Entstehung von 1-DH und Glucoson positiv, wenngleich die Erhöhung der gebildeten Mengen von Letzterem gering ausfällt und nur bei 3-DH lässt sich keine erkennbare Änderung beobachten. Ein ähnlicher Effekt wurde schon beobachtet, einhergehend mit einem negativen Einfluss auf die Bildung von Maillard generierten Aromakomponenten [110]. Vermutet wird, dass während der Maillard-Reaktion gebildete Radikalintermediate wie Dialkylpyrazine, aufgrund der antioxidativen Wirkung von phenolischen Verbindungen abgefangen werden. Die Bildung von Maillard-Produkten wird dadurch reduziert [111].
Hinsichtlich des Vergleichs zwischen den Aminosäuren (Tabelle 9-12) kommt kaum ein Unterschied zum Tragen. Einzig L-Arginin bildet wesentlich mehr α-Dicarbonylverbindungen als die anderen Aminosäuren. Besonders deutlich tritt der Effekt bei der Menge gebildeten Formaldehyds auf, die mit Ferulasäure deutlich reduziert wird.
Hinsichtlich der antioxidativen Aktivität (Abbildung 9-22) lassen sich leider keine Aussagen treffen. Die Bedingungen für eine eindeutige Aussage sind offensichtlich nicht gegeben.

9.2.4 Modell – D-Glukose 150 °C

Für diesen Versuch wird eine phosphatgepufferte, einmolare D-Glukoselösung im Thermoblock bei 150 °C erhitzt. Ein zweiter Ansatz wird mit Ferulasäure ebenfalls bei 150 °C erhitzt (siehe Abschnitt 8.2.5).

Ergebnisse D-Glukose bei 150 °C

Die Anfangskonzentration von D-Glukose sowie die Temperatur sind in diesem Modell höher als in den anderen Modellen, um eindeutigere Effekte zu erzielen.

Die gemessenen α-Dicarbonylkonzentrationen sind daher höher als in den bisherigen Modellen. Schon nach 10 Minuten sind in der Summe 800 µM α-Dicarbonylverbindungen bestimmbar (Abbildung 9-29). Die Mengenverteilung der einzelnen α-Dicarbonylverbindungen ist anders als in den Würzemodellen.

Den Hauptanteil macht wiederum 3-DH aus. Glucoson ist nur bis 30 Minuten Reaktionszeit und anteilig in wesentlich geringeren Mengen bestimmbar (Abbildung 9-29). 1-DH wird hingegen über dem gesamten Versuchszeitraum mit relativ konstanten Werten gebildet. Methylglyoxal wird ebenfalls in nicht unerheblichen Mengen von 50–100 µM gefunden.

Nach 30 Minuten wird ein Maximum in der Summe der bestimmten α-Dicarbonylverbindungen mit einem Wert von fast 1 mM erreicht. Im Anschluss sinken die Konzentrationen kontinuierlich. Die Werte für die antioxidative Aktivität sind in der Abbildung 9-29 als oranger Graph ergänzend aufgeführt. Die antioxidative Aktivität der Lösung steigt kontinuierlich während der gesamten Reaktionszeit, wobei die gewählte Darstellungsform in Abbildung 9-29 eine beschleunigte Bildung der antioxidativen Aktivität suggeriert, obwohl die α-Dicarbonylgenerierung bereits nach 60 Minuten abklingt.

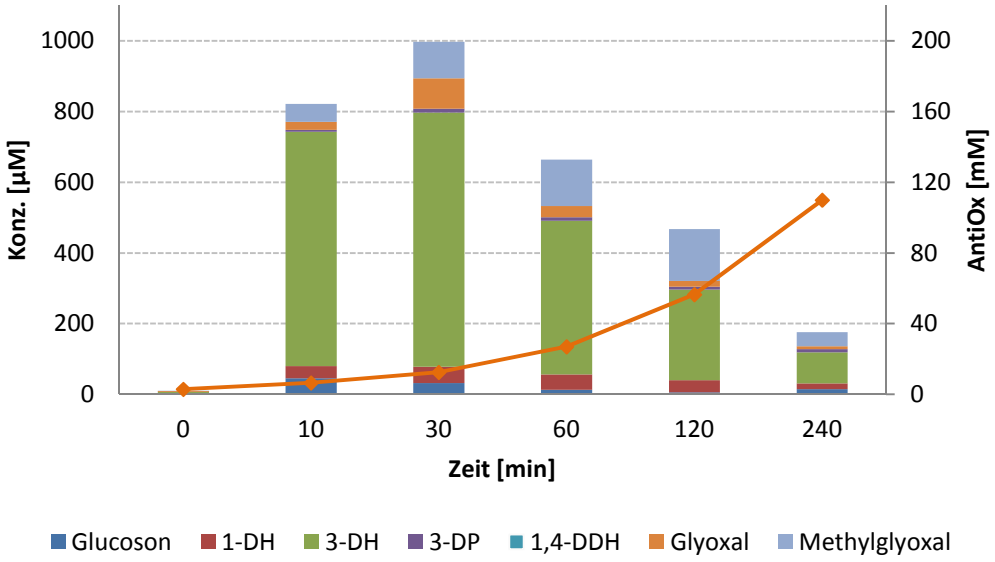


Abbildung 9-29: Zusammenhangzwischen dem α-Dicarbonylgehalt (Säulen) und der antioxidativen Aktivität des D-Glukose-Modells (Linie) (150 °C; pH 5,5; Phosphatgepuffert).

Wird dem Modell Ferulasäure zugegeben, so ist ein hemmender Effekt auf die Bildung von α-Dicarbonylverbindungen erkennbar (Abbildung 9-30). 3-DH stellt wieder die

Hauptverbindung dar, jedoch werden maximal Zweidrittel der Werte des vorherigen Versuchs erreicht. Der Gesamtwert und anteilig 3-DH erreichen wieder bei 30 Minuten das Maximum. Glucoson und 1-DH sind kaum und nur innerhalb der ersten 30 Minuten bestimmbar. Gleichförmig, jedoch beschleunigt steigt die antioxidative Aktivität und erreicht fast den doppelten Wert als im Versuch nur mit D-Glukose.

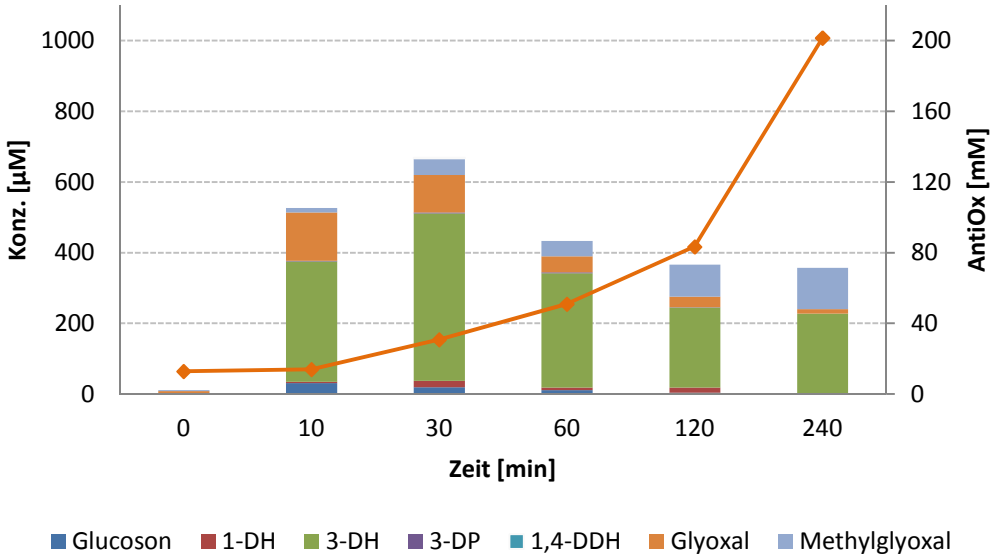


Abbildung 9-30: Zusammenhangzwischen dem α-Dicarbonylgehalt (Säulen) und der antioxidativen Aktivität des D-Glukose-Modells (Linie) mit Ferulasäure (150 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert).

Die genauen Werte für die α-Dicarbonylverbindungen sind in Tabelle 9-18 Seite 103 aufgelistet. In Hinblick auf den Ferulasäuregehalt in Abbildung 9-31 findet ein stetiger Abbau bis 120 Minuten Reaktionszeit statt. Danach stagniert der Wert bei etwa 60 µM.

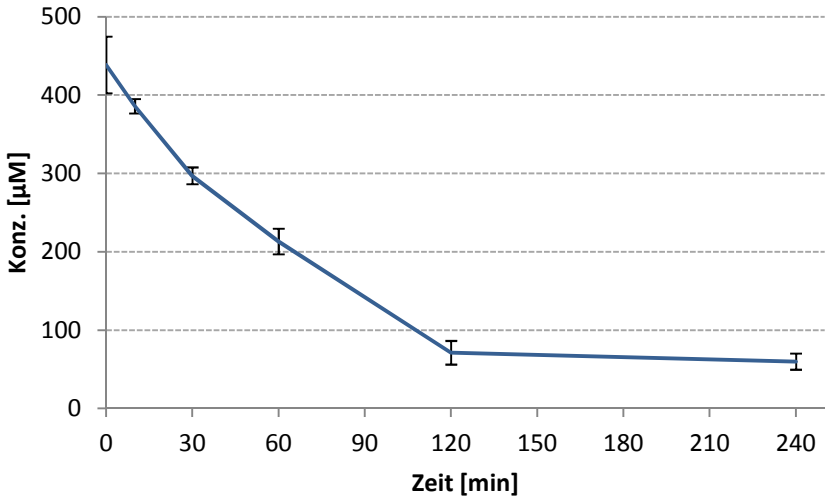


Abbildung 9-31: Verlauf der Ferulasäurekonzentration im Modell Glc-FS (150 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert).

Der Abbau der Ferulasäure ist zu erklären durch während der thermischen Behandlung gebildete Radikale. Diese degradieren die Ferulasäure stufenweise zu einfacheren phenolischen Verbindungen wie Vanilin oder Guajacol, welche nicht weiter bestimmt wurden [46].
In Tabelle 9-18 sind die absoluten Werte der bestimmten α-Dicarbonylverbindungen der beiden Versuche D-Glukose und D-Glukose mit Ferulasäure als Heatmap dargestellt. Die Formatierung erfolgt über den gesamten Wertebereich beider Versuche. Deutlich zeigt sich, dass Ferulasäure einen hemmenden Effekt unter den Versuchsbedinungen auf die α-Dicarbonylbildung hat.

Tabelle 9-18: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle Glc und Glc + FS [µM]. Die bedingte Formatierung erfolgt von grün (niedrigster Wert) nach rot (höchster Wert).

Zeit [min]	0	10	30	60	120	240
Modell	Glc; 150 °C; pH 5,5					
Glucoson	2,1	46,6	33,0	14,1	6,7	16,1
1-DH	u. B.	34,1	45,9	43,7	34,2	15,7
3-DH	5,6	662,6	719,6	434,6	256,5	87,9
3-DP	u. B.	5,9	10,2	9,7	7,9	8,7
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	2,8	22,8	86,6	31,5	16,5	8,5
Methylglyoxal	0,4	50,9	102,8	131,4	147,0	39,5
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Modell	Glc + FS; 150 °C; pH 5,5					
Glucoson	u. B.	32,0	20,3	12,3	4,7	u. B.
1-DH	u. B.	3,7	18,0	7,5	14,3	2,8
3-DH	2,9	340,3	473,7	323,2	226,6	225,7
3-DP	0,1	2,1	2,3	2,6	1,2	u. B.
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	6,5	136,4	106,1	45,4	29,6	12,5
Methylglyoxal	2,9	12,6	47,6	43,0	90,6	117,3
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Der Vergleich der antioxidativen Aktivität der Versuche (Abbildung 9-32) zeigt den eigentlich linearen Anstieg über die Reaktionszeit. Deutlich ist die Steigerung des DPPH-Verbrauchs bei Anwesenheit von Ferulasäure ersichtlich. Wird die Reaktionszeit verlängert (Versuch D-Glukose Abbildung 9-32), so setzt sich der lineare Trend zumindest bei dem durchgeführten Versuch weiter fort. Dies widerspricht somit der Vermutung einer gewissen antioxidativen Kapazität unter den gegebenen Bedingungen für die bestimmten α-Dicarbonylverbindungen Glucoson und 1-DH. Beide haben ihr Konzentrationsmaximum bei etwa 30 Minuten und sinken danach kontinuierlich ab. Es liegt also die Vermutung nahe, dass andere Verbindungen mit antioxidativen Eigenschaften entstehen, zum Beispiel sich über die Zeit kontinuierlich aufbauende Melanoidinstrukturen [29], die mit ihrem konjugierten Doppelbindungssystem radikalfangende Eigenschaften besitzen. Inwiefern sich Ferulasäure in dieses System integriert ist offen. Jedoch scheint eine komplexe Interaktion zwischen der α-Dicarbonylbildung und Ferulasäure sowie den antioxidativen Eigenschaften zu existieren.

Zwei weitere Versuche sind in Abbildung 9-32 dargestellt. Die Bräunung von Ferulasäure und Ferulasäure mit 1-DH bei 100 °C über 240 Minuten (siehe Abschnitt 9.2.5) zeigt, dass weder Ferulasäure alleine noch mit 1-DH als Reinsubstanz beim Erhitzen bei 100 °C eine antioxidative Aktivität entwickelt.

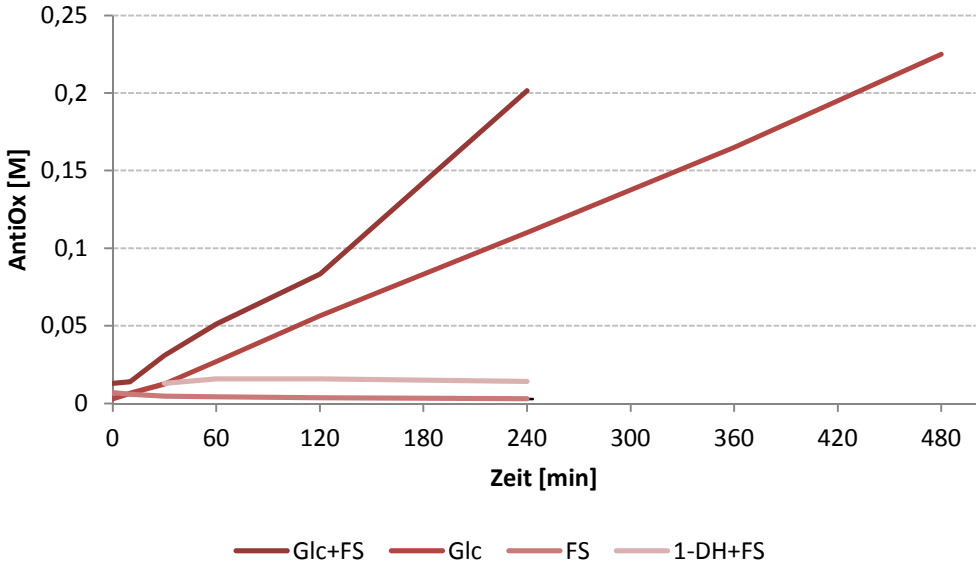


Abbildung 9-32: Vergleich der ESR Daten der Modelle Glc (150 °C), Glc + FS (150 °C), FS (100 °C), 1-DH + FS (100 °C) als Verbrauch DPPH in mol/L; alle pH 5,5 (phosphatgepuffert).

Als weitere antioxidative Kenngröße wurde der Chapon-Assay der Modelle, als Maß für die Fähigkeit reduzierend auf Fe^{3+}-Ionen zu wirken, untersucht (Abbildung 9-33). Wieder ist ein kontinuierlicher Anstieg der beiden Versuche mit D-Glukose zu erkennen, so wie es schon bei den DPPH-Messungen auftrat. Im Unterschied zu Abbildung 9-32 ist beim Versuch von 1-DH mit Ferulasäure ein geringer Anstieg zu erkennen.
Ferulasäure alleine ergab keine Werte im Chapon-Assay und ist deshalb nicht abgebildet. Selbst eine Erhöhung der Konzentration der Ferulasäurelösung auf über 10 mM ergab keine Ergebnisse.

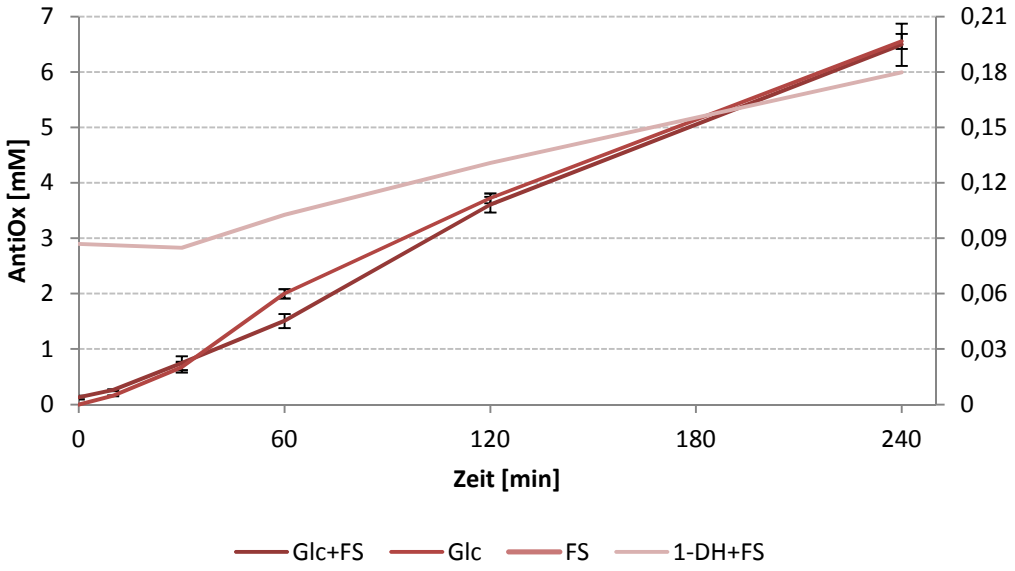


Abbildung 9-33: Vergleich Chapon-Daten der Modelle Glc (150 °C), Glc + FS (150 °C), FS (100 °C), 1-DH + FS (100 °C) in mM; alle bei pH 5,5 (phosphatgepuffert). Das Modell 1-DH + FS hat eine andere Skalierung auf der rechten Ordinate.

9.2.5 Reaktion von Ferulasäure und 1-Desoxyhexosulose

Bei der Untersuchung antioxidativer Eigenschaften von Malz-Modellsystemen postulierten Samaras *et al.* eine Verbindung die aus der Veresterung eines Reduktons mit Ferulasäure entsteht, wie in Abbildung 9-34 dargestellt [112]. Die Eigenschaften der entstehenden Verbindung sollen einen exponentiellen Anstieg des antioxidativen Potentials bewirken. Da, wie schon gezeigt, große Mengen Ferulasäure und Reduktone während des Brauprozesses entstehen, ist die Reaktion denkbar, um den Anstieg der antioxidativen Aktivität von Würze teilweise zu erklären. Mit Modellreaktionen ist ein Nachweis der Verbindung zu erbringen und gleichfalls der Zusammenhang zwischen der nachzuweisenden Substanz und der exponentiell erhöhten antioxidativen Aktivität zu zeigen, anstatt nur die Summierung der Potentiale der Ausgangsverbindungen zu ermitteln.

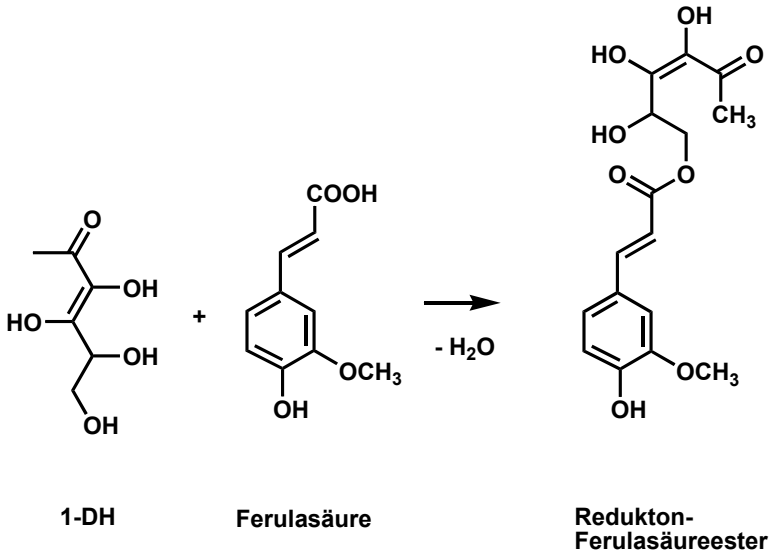


Abbildung 9-34: Postulierte Reaktion zwischen 1-Desoxyhexosuose und Ferulasäure [112].

Für das Modell werden 1 mg Ferulasäure und 1 mg 1-DH in Phosphatpuffer (pH 5,5) gelöst und anschließend auf 10 mL aufgefüllt. Je 2 mL der Lösung werden in Spießampullen überführt und für 10, 30, 60, 120 und 240 Minuten bei 100 °C erhitzt. Die restlichen Arbeitsschritte und Messungen erfolgen analog derer für die Maischmodellstammlösung mit L-Prolin (Abschnitt 8.2.3).

Ergebnisse für die Reaktion Ferulasäure und 1-Desoxyhexosulose

In Abbildung 9-35 sind die Messwerte der α-Dicarbonylverbindungen dargestellt. Die gemessene Anfangskonzentration von etwa 230 µM beträgt nur ca. ein Drittel der erwarteten Menge von etwa 620 µM. Die eingewogene Substanz war damit nicht sehr rein. Trotzdem ist eindeutig der Abbau von 1-DH bei 100 °C zu erkennen. Andere α-Dicarbonylverbindungen außer Methylglyoxal und Diacetyl sind nicht nachweisbar. Methylglyoxal ist von Anfang an im Modell enthalten und durch eine Verunreinigung des synthetisierten 1-DH ins System gelangt. Während der 240 Minuten zeigt sich auch keine nennenswerte Änderung der Konzentration. Diacetyl wird dagegen im Laufe der Reaktion gebildet. Die Mengen sind im Verhältnis zur Ausgangskonzentration von 1-DH sehr gering. Die Ferulasäurekonzentration nimmt während des Erhitzens von 480 µM auf ca. 400 µM ab (Abbildung 9-36). Die Abnahme ist dabei nicht kontinuierlich und beschleunigt sich ab ca. 60 Minuten etwas. Im selben Zeitraum steigt die Reducing Activity des 1-DH Modells und fällt nach einer Erhitzungszeit von 120 Minuten wieder ab.

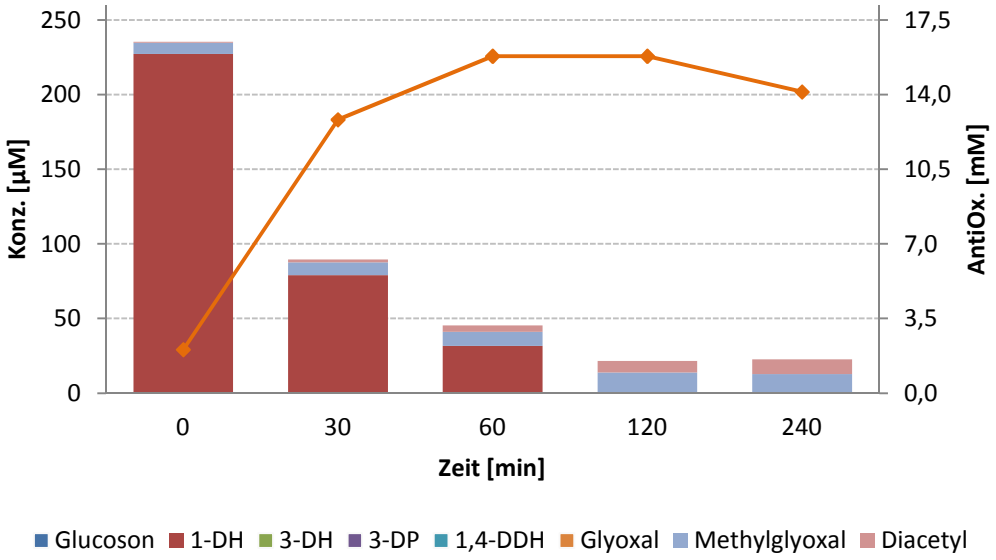


Abbildung 9-35: α-Dicarbonylverbindungen und antioxidative Werte (ESR, als Verbrauch DPPH in mM) im Modell 1-DH mit Ferulasäure (100 °C; pH 5,5).

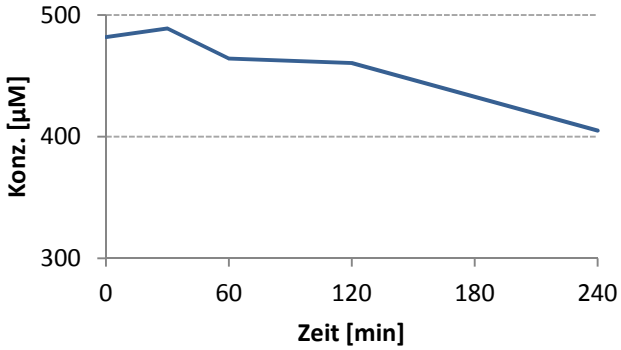


Abbildung 9-36: Konzentrationsverlauf von Ferulasäure der thermischen Behandlung einer entsprechenden Mischung mit 1-DH.

Auswertung der Reaktion Ferulasäure und 1-Desoxyhexosulose

Der Versuch wurde mit im Haus synthetisierten 1-DH als Reinsubstanz durchgeführt. Die vorhandene Menge reichte nur für einen Versuch in Einfachbestimmung aus. Zudem zeigte sich, dass das 1-DH in unbestimmt genauer Reinheit von nur ca. 35 % vorlag. Die nachfolgenden Aussagen sind daher als Trends zu sehen. Die vorhandenen Daten zeigen einen raschen Abbau des 1-DH, der praktisch vollständig innerhalb der ersten Stunde abläuft. Im selben Zeitraum findet ebenfalls ein im Vergleich zu den anderen durchgeführten Modellen ähnlich großer Abbau von Ferulasäure von 15 % innerhalb von vier Stunden statt. Die Abbaurate ist nicht äquimolar und gleichförmig zur Ferulasäure. Eine Korrelation zwischen beiden Substanzen ist daher nicht möglich.
Die antioxidative Aktivität als DPPH-Verbrauch ist beim Beginn der Reaktion bei höchster Konzentration von 1-DH am geringsten, steigt während der Abbauphase des 1-DH jedoch sehr stark an. Also scheinen Abbauprodukte gebildet zu werden, die eine größere antioxidative Aktivität besitzen als 1-DH selbst (siehe auch Abbildung 9-32 und Abbildung 9-33). Dies ist darüber hinaus auch an sich aufbauenden Peaks innerhalb der Chromatogramme (Peaks A, B, D, F Abbildung 9-37) zu erkennen.

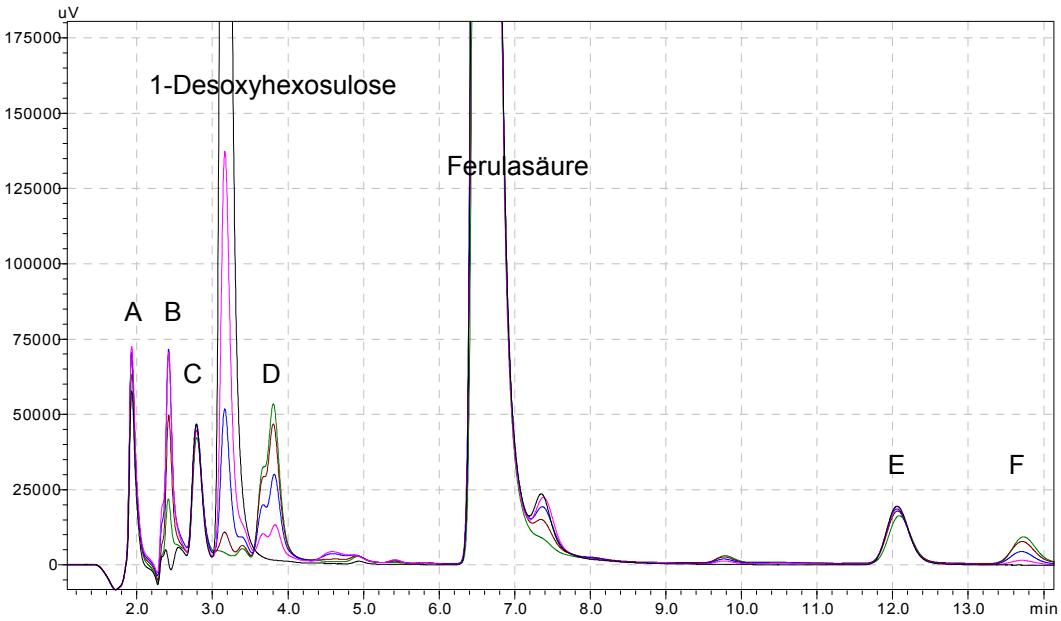


Abbildung 9-37: Überlagerung der Chromatogramme des Versuchs 1-DH mit Ferulasäure (325 nm; 100 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert): schwarz – 0 min, rosa – 30 min, blau – 60 min, braun – 120 min, grün – 240 min.

Nach Verbrauch von 1-DH sinkt die antioxidative Aktivität nur langsam wieder ab. Die antioxidative Aktivität nach Chapon zeigt nach 30 Minuten mit auftauchen der neuen Peaks einen kontinuierlichen Anstieg bis zum Ende des Versuchs (Abbildung 9-33).

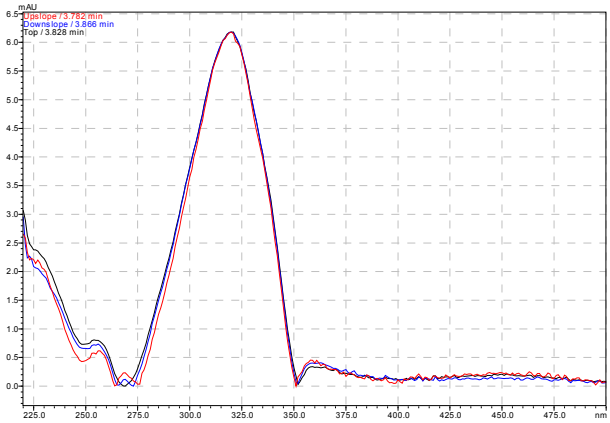


Abbildung 9-38: UV/Vis-Spektrum der Struktur bei ca. 3,8 Minuten (Peak D) im Chromatogramm Abbildung 9-37.

Die Art der neu entstehenden Verbindung bei etwa 3,8 Minuten ist schwer zu bestimmen. Die entstehenden Mengen (festgemacht an der auftretenden Fläche im Chromatogramm) korreliert gut mit dem Aufbau der antioxidativen Werte nach Chapon. In Abbildung 9-38 ist das UV/Vis-Spektrum der unbekannten Substanz dargestellt. Trotz des ausgeprägten Spektrums ist eine Interpretation nur schwer möglich, da die Absorptionsbreiten stark von der jeweils am Übergang beteiligten funktionellen Gruppe sowie von Lösungsmitteleinflüssen abhängen. Jedoch zeigt sich ein ausgeprägtes π-konjugiertes System durch das Maximum bei etwa 320 nm.
Eine Bestätigung für das Entstehen eines 1-DH-Ferulasäureesters kann nicht gefunden werden. Während des Versuchs entstehen einige neue Verbindungen, davon eine in größeren Mengen und mit strukturmerkmalen einer ungesättigten Struktur. Das Ansteigen des Verbrauchs an DPPH ist nicht sehr hoch im Vergleich zu den schon durchgeführten Versuchen. Weiterhin bleibt der Verbrauch von Ferulasäure unter den Erwartungen im Vergleich zur Abreaktion von 1-DH. Die unter Abbildung 6-9 dargestellten Folgereaktionen von 1-DH werden zu rasch ablaufen und entsprechende Produkte entstehen, die in diesem Versuch nicht analysiert wurden.

9.2.6 Untersuchung kommerzieller Biersorten

Als letztes soll untersucht werden, inwiefern die in den gesamten Versuchen untersuchten Verbindungen für das Endprodukt von Relevanz sind.
Um einen Einblick in die Zusammensetzung von realen Bierproben zu erhalten, werden kommerzielle Biere untersucht. Dabei werden die Parameter α-Dicarbonyle, Aldehyde und Ferulasäure bestimmt.

Ergebnisse kommerzielle Biersorten
Die Zusammenfassung der Werte sind in Tabelle 12-13 im Anhang aufgelistet.

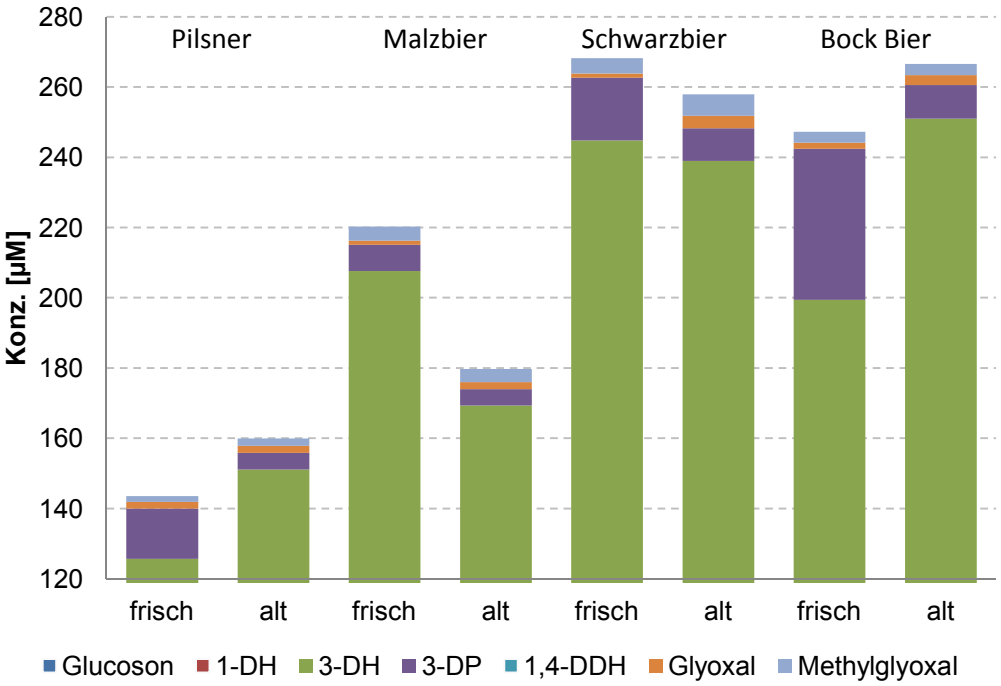


Abbildung 9-39: Ermittelte Gehalte der α-Dicarbonylverbindungen in vier Biersorten.

Das ermittelte α-Dicarbonylspektrum der fertigen Biere bestätigt die Ergebnisse der durchgeführten Versuche (Abbildung 9-39). Nach Abschluss des Brauprozesses bleiben die stabileren Verbindungen im Bier erhalten. 3-DH ist hier wieder die Verbindung mit der höchsten Konzentration. Glucoson und 1-DH sind nicht mehr nachweisbar. Die Größenordnungen und das Spektrum sind mit den Messungen der Sudhausarbeit und der Würzemodelle in Einklang zu bringen. Die ansteigenden Werte hin zu den dunkleren Bieren sind auf den höheren Einsatz dunklen Braumalzes oder Röstmalzes zurückzuführen. Die durchgeführten Modelluntersuchungen haben sich immer am Bier Pilsner Typ orientiert.

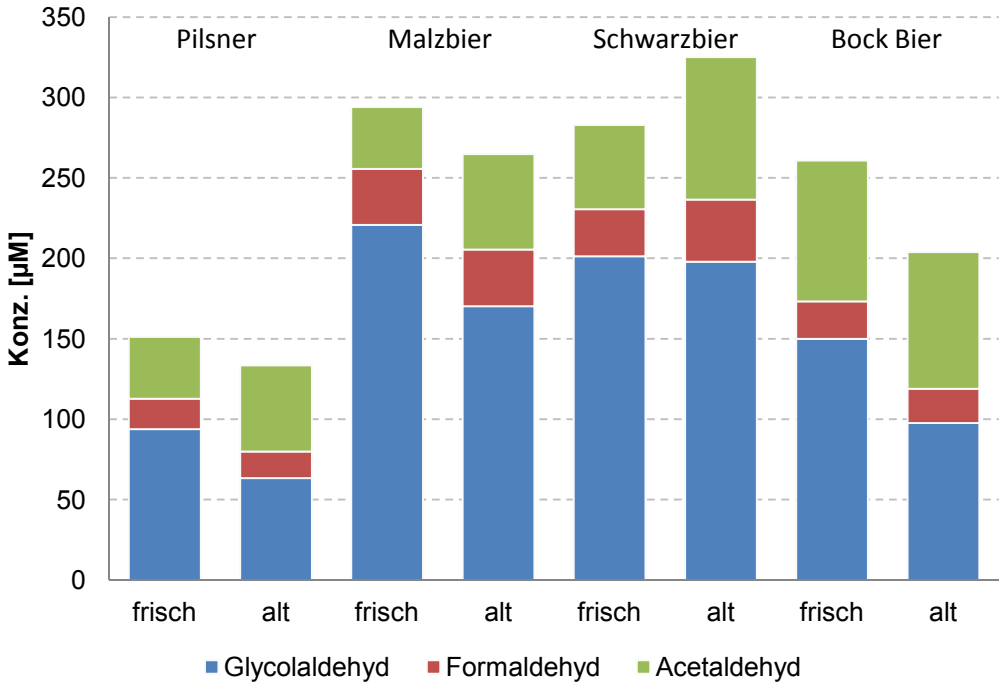


Abbildung 9-40: Ermittelte Gehalte der Aldehyde in den vier Biersorten Pilsner, Malzbier, Schwarzbier und Bock Bier.

Die ermittelten Aldehydwerte zeigen erhöhte Werte bei den Bieren mit stärker geröstetem Malz (Abbildung 9-40). Eine klare Unterscheidung zwischen frischem und gealtertem Bier ist nicht möglich. Die sehr hohen Formaldehydwerte, die während des Brauprozesses aufgetreten sind, sind weitestgehend abgebaut. Die gefundenen erhöhten Acetaldehydwerte sind durch den Hefemetabolismus während der Vergärung erklärlich.

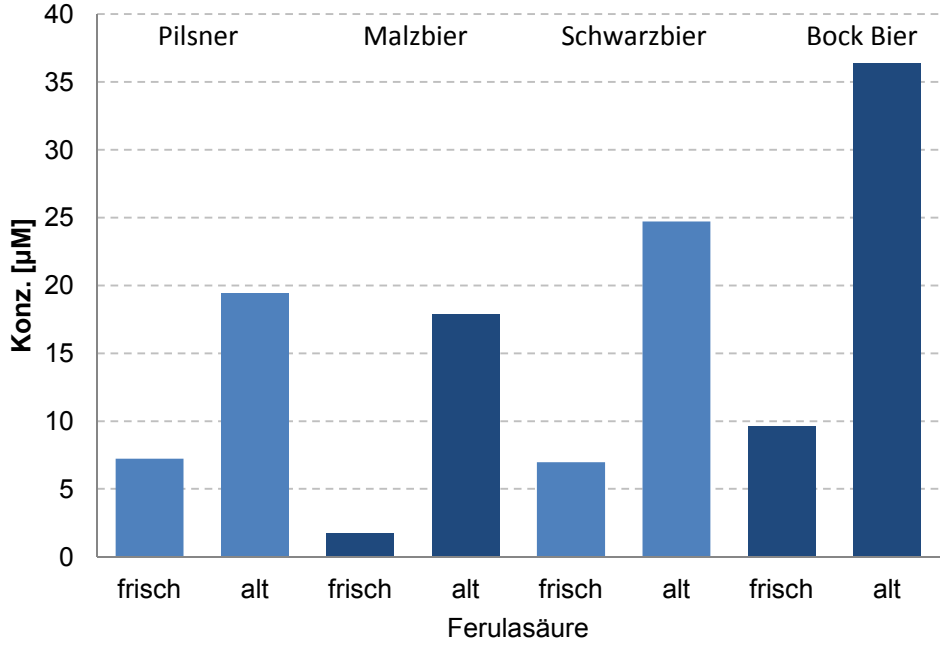


Abbildung 9-41: Ermittelte Gehalte freier Ferulasäure in den vier Biersorten Pilsner, Malzbier, Schwarzbier und Bock Bier.

Der bestimmte Ferulasäuregehalt im Pilsner Bier (Abbildung 9-41) entspricht dem von Sud 1 und 2 (Abbildung 9-15). Im Laufe der Lagerung wird noch einmal so viel Ferulasäure freigesetzt, wie zu Beginn im frischen Bier vorliegt. Die eingesetzte HPLC-Schnellmethode ist nur in der Lage freie Ferulasäure in der Biermatrix zu bestimmen. Es ist wahrscheinlich, dass im Laufe der Lagerung aus an Arabinoxylanen estergebundene Ferulasäure freigesetzt wird, die den Anstieg der ermittelten Konzentrationen erklärt [45].
Im Malzbier sind ähnliche Mengen wie im Bier gebraut nach Pilsner Art zu finden. Mit steigendem Röstgrad des Schwarzbieres und Bock Bieres steigert sich der Ferulasäuregehalt stärker als bei den Pilsner Typen. Dabei ist die Ausgangskonzentration der frischen Biere recht ähnlich.

9.2.7 Diskussion der Modelluntersuchungen

Die erarbeiteten Modellsysteme sollten die vereinfachte Matrix während der Würzebereitung nachstellen [54]. Die Aussagen der gewonnenen Ergebnisse lassen Rückschlüsse über die gebildeten α-Dicarbonylverbindungen aus den gewählten Ausgangskomponenten zu. Zunächst wurden Versuche mit standardisierter Würzezusammensetzung unter Variation der Aminosäuren durchgeführt. Bei allen Modellen wird dabei das α-Dicarbonyl 3-DH durch Abbau der Kohlenhydratkomponenten hauptsächlich über 1,2-Enolisierung des Amadori-Produktes gebildet. Der Reaktionsweg über die 2,3-Enolisierung zur Bildung von 1-DH spielt praktisch keine Rolle, so dass erst nach langem Erhitzen Spuren dieser Verbindung zu finden sind. Die hohe Reaktivität von 1-DH verhindert weiterhin eine genaue Bestimmung bei niedrigen Konzentrationen, da die Abreaktion schneller abläuft als die Abfangreaktion mit *o*PDA [102, 107, 108]. 3-DP wird nur in geringen Mengen gebildet [28] und auch die Zugabe von Ferulasäure hat praktisch keinen Einfluss auf die Bildung.
Vergleicht man die verwendeten Aminosäuren, so lassen sich keine großen Unterschiede im Spektrum der α-Dicarbonylverbindungen feststellen. In den Modellen mit L-Threonin werden am wenigsten und L-Phenylalanin am meiste α-Dicarbonylverbindungen gebildet. Glucoson wird unter den gegebenen Bedingungen nur in geringen, aber eindeutigen Mengen gebildet. Unter Idealbedingungen radikalisch-oxidativ bei neutral-basischen pH-Werten und Temperaturen um 80 °C sind in den durchgeführten Modellen nicht unerhebliche Mengen quantifizierbar [30, 31].
Methylglyoxal und Diacetyl spielen als Hauptspaltprodukte der α-Dicarbonylverbindungen nur eine untergeordnete Rolle in den Modellen. Nur Glyoxal ist mengenmäßig interessant. Dieses steht mit Glyoxal-Monoimin und letztlich über reduktive Schritte auch mit Glycolaldehyd-Imin im Gleichgewicht, was wichtig für die Bildung von Dialkyl-Pyrazin-Radikal-Kationen ist, einem bedeutenden Precursor für die Bräunung [32, 33].
Da zwischen Glycolaldehyd und Glyoxal ein Redoxgleichgewicht herrscht, sollten unter Einfluss von reduktiven Verbindungen Glycolaldehyd nachweisbar sein. In den Modellen mit L-Glycin und L-Phenylalanin ist jedoch kein Glycolaldehyd nachweisbar. Dafür sind die gefundenen Mengen Glyoxal höher als in den Modellen mit L-Methionin und L-Threonin, in welchem Glycolaldehyd nachweisbar war.
Zieht man die Bräunung der Modelle heran (Abbildung 9-23 Seite 94), kann die Farbentwicklung nicht eindeutig auf die vier Aminosäuren zurückgeführt werden, wobei die gemessenen Absorptionswerte zu niedrig sind, um die auftretenden Schwankungen nicht durch methodische Schwankungen zu erklären. Ein erhöhter Gehalt von Glycolaldehyd zeigt in den durchgeführten Versuchen keine verstärkte Bräunung an.
Der Tabelle 9-17 ist der Einfluss der Einzelkomponenten (Aminosäure und Ferulasäure) auf die Modelle bezüglich Glucoson, 1-DH und 3-DH zu entnehmen. Deutlich ist der positive Einfluss der Aminosäuren auf die Bildung von 3-DH zu erkennen. Wie unter Abschnitt 6.3.1 dargelegt, wirken die Aminosäuren katalytisch auf den Abbau von Kohlenhydraten [101, 107, 108]. Außer bei der Aminosäure L-Prolin wird die Menge 3-DH durch Zugabe von L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin oder L-Threonin verdrei- bis vervierfacht.
Etwas differenzierter ist in der Übersicht die Bildung von 1-DH zu betrachten. Ein positiver Einfluss ist auf die Bildung bei Anwesenheit von Ferulasäure zu erkennen. Ohne Ferulasäure praktisch nicht bestimmbar, wird 1-DH durch Zugabe der

phenolischen Verbindung in nachweisbaren Mengen gebildet. Ein partieller Einfluss von Phenolsäuren auf die Bildung von Maillardprodukten wird von Peterson *et al.* beschrieben, welche als Ursache die Beeinflussung radikalischer Intermediate der Maillard-Reaktion nannten [110]. Nur beim Grundmodell und mit L-Prolin ist kein 1-DH auch im Beisein von Ferulasäure bestimmbar.
Bei Glucoson ist das Gesamtbild am komplexesten. Am meisten gebildet beim Grundmodell, scheint hier der oxidative Weg aus dem 1,2-Enaminol abzulaufen [32]. Bei Anwesenheit einer Aminosäure ist die Bildung von Glucoson gehemmt, wobei die Reduzierung der Werte von Glucoson nach 120 Minuten bei jeder Aminosäure verschieden stark ausgeprägt ist. L-Methionin hat den stärksten hemmenden Effekt und L-Threonin praktisch keinen.
Bei einem Gesamtvergleich kann für die Modelle mit L-Methionin und L-Threonin eine etwas geringere Aktivität als die Modelle mit L-Phenylalanin und L-Prolin gezeigt werden. L-Threonin mit seiner zusätzlichen Hydroxylgruppe bzw. Hydroxyaminosäuren allgemein führen wegen Nebenreaktionen durch den nucleophilen Charakter zur Verlangsamung der Maillard-Reaktion. L-Methionin als schwefelhaltige Aminosäure wirkt ebenfalls durch die nucleophilen Eigenschaften hemmend.
Abbildung 9-25 Seite 99 zeigt den veränderten Reaktionsverlauf der ermittelten α-Dicarbonylverbindungen der Modelle bei Anwesenheit von Ferulasäure. Glucoson wird in deutlich bestimmbaren Mengen in allen vier Modellen mit L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin oder L-Threonin gebildet. Weiterhin wird im Gegensatz zu den Modellen ohne Ferulasäure, 1-DH in messbaren Mengen gebildet. Die weiteren α-Dicarbonylverbindungen 3-DH, 3-DP, 1,4-DDH, Glyoxal und Methylglyoxal zeigen eine ähnliche Verteilung wie schon in den Modellen ohne Ferulasäure.
Die gebildeten Mengen der Aldehyde (Abbildung 9-26 Seite 98) lassen sich mit den Ergebnissen der Sudhausarbeit vergleichen. Am meisten wird Formaldehyd gebildet, gefolgt von Acetaldehyd. Die hohen Aldehydwerte des Modells mit L-Threonin sind durch die besonderen Eigenschaften von L-Threonin mit der zusätzlichen Hydroxylgruppe zu erklären. Yaylayan *et al.* haben den thermischen Abbau von L-Threonin untersucht und fanden Acetaldehyd durch Retro-Aldol-Spaltung [113].
Bei den Versuchen mit Ferulasäure ändert sich die Verteilung der gebildeten Aldehyde drastisch. Die Werte des Modells L-Threonin liegen nun mengenmäßig im Bereich der anderen Modelle. Formaldehyd ist kaum mehr bestimmbar und es wird mehr Acetaldehyd sowie Glycolaldehyd gebildet. Die Auswirkungen die Ferulasäure insbesondere auf die nachweisbare Menge gebildeten Formaldehyds zeigt, sind nicht in den realen Proben der Sudhausarbeit wiederzufinden. Obgleich dort nicht unerhebliche Mengen der Phenolcarbonsäure vorkommen, betragen die ermittelten Konzentrationen von Ferulasäure nur etwa ein Fünftel der Modelle.
In Abbildung 9-28 Seite 99 ist die bei 420 nm gemessene Bräunung der vier Aminosäuren L-Glycin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Threonin mit Ferulasäure dargestellt. Die gezeigten Verläufe in Abbildung 9-28 sind denen der Versuche ohne Ferulasäure in Abbildung 9-24 praktisch gleich, wobei der Unterschied des Anstiegs der Bräunungsintensität nur gering ist. Letzteres zeigt sich auch in den Werten von 3-DH, da die Verbindung als Indikator für die Bräunung herangezogen werden kann [100]. Bei allen Modellen mit Aminosäuren, bei An- oder Abwesenheit von Ferulasäure, sind die gebildeten Mengen 3-DH analog zum Bräunungsverlauf sehr ähnlich.
Für ein besseres Verständnis des Einflusses der Ferulasäure wurden Versuche nur mit D-Glukose und Ferulasäure durchgeführt. Die gemessenen α-Dicarbonylkonzentrationen sind durch die höhere Ausgangskonzentration von D-Glukose und einer höheren Reaktionstemperatur deutlich größer als in den bisherigen Modellen. Die Mengenverteilung der einzelnen α-Dicarbonylverbindungen ist dabei

anders als in den Würzemodellen und erreicht nach 30 Minuten das Maximum, wobei 3-DH den Hauptanteil ausmacht. Glucoson ist nur bis 30 Minuten Reaktionszeit überhaupt bestimmbar. 1-DH wird hingegen über dem gesamten Versuchszeitraum mit relativ konstanten Werten gebildet. Methylglyoxal wird in nicht unerheblichen Mengen von 50–100 µM gefunden. Die antioxidative Aktivität der Lösung steigt während des Versuchs kontinuierlich an. Wird der Versuch in Anwesenheit von Ferulasäure wiederholt, so ist ein hemmender Effekt auf die Bildung von α-Dicarbonylverbindungen erkennbar. 3-DH stellt wieder die Hauptverbindung dar, jedoch werden maximal zwei Drittel der Werte des vorherigen Versuchs erreicht. Der Gesamtwert und anteilig 3-DH erreichen wieder bei 30 Minuten das Maximum. Glucoson und 1-DH sind kaum und nur innerhalb der ersten 30 Minuten bestimmbar. Die antioxidative Aktivität steigt gleichförmig, jedoch beschleunigt und erreicht fast den doppelten Wert als im Versuch nur mit D-Glukose. Die Ferulasäure wird stetig bis 120 Minuten Reaktionszeit abgebaut und stagniert im Anschluss.

Der Abbau der Ferulasäure ist durch, während der thermischen Behandlung gebildete, Radikale zu erklären. Diese degradieren die Ferulasäure stufenweise zu einfacheren phenolischen Verbindungen wie Vanilin oder Guajacol, welche nicht bestimmt wurden [46].

Die antioxidativen Aktivität der Versuche zeigt deutlich eine lineare Steigerung des DPPH-Verbrauchs bei Anwesenheit von Ferulasäure. Dies widerspricht somit der Vermutung einer gewissen antioxidativen Kapazität unter den gegebenen Bedingungen für die bestimmten α-Dicarbonylverbindungen Glucoson und 1-DH. Beide haben ihr Konzentrationsmaximum bei etwa 30 Minuten und sinken danach kontinuierlich ab. Die Vermutung liegt also nahe, dass andere Verbindungen mit antioxidativen Eigenschaften aus den α-Dicarbonylverbindungen entstehen, zum Beispiel sich über die Zeit kontinuierlich aufbauende Melanoidinstrukturen [29], die mit ihrem konjugierten Doppelbindungssystem radikalfangende Eigenschaften besitzen.

Zum Abschluss erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen von α-Dicarbonylverbindungen, Ferulasäure und Aldehyden im frischen und gealterterten kommerziellen Bier, was die Rolle der bestimmten Analyten im fertigen Produkt Bier zeigen soll. Nach Abschluss des Brauprozesses bleiben die stabileren Verbindungen im Bier erhalten. 3-DH ist hier wieder die Verbindung mit der höchsten Konzentration. Glucoson und 1-DH sind nicht mehr nachweisbar (Abbildung 9-39 Seite 110). Die Größenordnungen und das Spektrum sind mit den Ergebnissen der Sudhausarbeit und Würzemodelle in Einklang zu bringen.

Die ermittelten Aldehydwerte zeigen erhöhte Werte bei den Bieren mit stärker geröstetem Malz (Abbildung 9-40 Seite 111). Eine klare Unterscheidung zwischen frischem und gealtertem Bier ist nicht möglich. Die sehr hohen Formaldehydgehalte, die während des Brauprozesses aufgetreten sind, sind weitestgehend abgebaut. Die gefundenen erhöhten Mengen Acetaldehyd sind durch den Hefemetabolismus während der Vergärung erklärlich.

Der bestimmte Ferulasäuregehalt im Pilsner Bier entspricht dem von Sud 1 und 2. Im Laufe der Lagerung wird noch einmal so viel Ferulasäure freigesetzt, wie zu Beginn im frischen Bier vorliegt. Die eingesetzte HPLC-Schnellmethode dient nur zur Bestimmung freier Ferulasäure in der Biermatrix. Wahrscheinlich ist, dass im Laufe der Lagerung aus an Arabinoxylanen estergebundene Ferulasäure freigesetzt wird, die den Anstieg der ermittelten Konzentrationen erklärt [45].

10 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von während der Maillard-Reaktion gebildeten Reduktonstrukturen auf das antioxidative Potential einer Würzelösung nachzuweisen. Dazu wurden zwei Sude während der Sudhausarbeit des Brauprozesses beprobt und hinsichtlich stofflicher Zusammensetzung und radikal-chemischer Eigenschaften untersucht. Bestimmt wurden α-Dicarbonylverbindungen, ausgewählte Aldehyde und Ferulasäure sowie für die radikalischen Eigenschaften das EAP als Maß für radikalfangende Eigenschaften, die Reducing Activity als Maß für den Gehalt an reduzierenden Substanzen und der T-Wert als Maß für die Anzahl an gebildeten Radikalen.
Für die antioxidativen Parameter ist der Beginn des Kochens bzw. die Hopfengabe kurz nach Beginn des Kochens der interessanteste Zeitpunkt, da an diesen Punkten das EAP deutlich und sprunghaft erhöht wird. Während des Maischens praktisch nicht bestimmbar, wird das EAP erst mit Beginn des Kochens aufgebaut und steigert sich kurz nach der Hopfengabe nochmals deutlich. Zum selben Zeitpunkt findet ebenfalls eine extrem starke Radikalgenerierung statt und in beiden untersuchten Suden wird das gerade gewonnene EAP wieder stark auf ein Niveau abgebaut, das trotzdem noch höher liegt, als vor Beginn des Kochens. Das Absinken des EAP erfolgt beim Sud 2 stärker und scheint auf einen negativen Einfluss des Caramalzes hinzudeuten, was ebenfalls durch den wesentlich höheren T-Wert bei der Hopfengabe deutlich wird.
Die Reducing Activity als Maß für die Aktivität von reduzierenden Substanzen wie der Reduktone lässt nur wenige Aussagen zu. Da die Menge an gebildeten Reduktonen in der Summe gesehen nahezu konstant ist, spiegelt sich dies auch in der Reducing Activity wider und macht gegenüber den anderen antioxidativen Parametern EAP und T-Werte deutlich, dass diese hier praktisch keinen Einfluss auf das Redoxsystem der Würze besitzen. Dies trifft darüber hinaus auf die Ferulasäure zu, da sich die Werte während der Sudhausarbeit ebenfalls kaum ändern. Sud 1 bildet etwas mehr Reduktone und besitzt auch die etwas größere Reducing Activity.
Für einen genaueren Einblick wurden Versuche mit einzelnen Aminosäuren mit und ohne Ferulasäure durchgeführt. Dabei kann festgehalten werden, dass Ferulasäure einen Einfluss auf das Maillard-Reaktionssystem besitzt. Vor allem wird die Bildung von 1-DH durch die Phenolsäure erhöht und auch bei Glucoson ist ein geringer positiver Effekt zu erkennen. Der Einfluss auf die Reduktonstrukturen ist von der Zugabe von Ferulasäure stärker beeinflusst als der Einfluss der unterschiedlichen Aminosäuren. Dabei ist nicht der katalytische Einfluss an sich gemeint, sondern der Unterschied der einzelnen Aminosäuren auf die Reduktongenerierung. Einzig L-Arginin bildet vor allem mehr 3-DH als die anderen Aminosäuren.
Besonders deutlich tritt ein Effekt bei der Menge gebildeten Formaldehyds auf. In Gegenwart von Ferulasäure wird diese merklich reduziert. Hinsichtlich der antioxidativen Aktivität lassen sich keine eindeutigen Aussagen treffen, weil die ermittelten Werte nicht auswertbar waren. Daher wurde ein einfacheres Modell bei drastischeren Bedingungen durchgeführt und untersucht: D-Glukose bei 150 °C. Betrachtet man die antioxidative Aktivität des Versuchs, zeigt sich diesmal ein linearer Anstieg über die Reaktionszeit. Eine Steigerung des DPPH-Verbrauchs ist bei Anwesenheit von Ferulasäure ersichtlich. Vergleicht man letzteren Trend mit den entsprechenden ermittelten Mengen an α-Dicarbonylverbindungen, so zeigt sich dort kein linearer paralleler Verlauf. Unter den gegebenen Bedingungen widerspricht dies

somit der Vermutung einer antioxidativen Kapazität für die bestimmten reduktiven α-Dicarbonylverbindungen Glucoson und 1-DH. Beide haben ihr Konzentrationsmaximum bei etwa 30 Minuten und sinken danach kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu steigt der lineare Trend der antioxidativen Aktivität weiter an. Also liegt die Vermutung nahe, dass andere Verbindungen mit antioxidativen Eigenschaften entstehen, zum Beispiel sich über die Zeit kontinuierlich aufbauende Melanoidinstrukturen, die mit ihrem konjugierten Doppelbindungssystem radikalfangende Eigenschaften besitzen. Inwiefern sich Ferulasäure in dieses System integriert, ist offen. Jedoch scheint eine komplexe Interaktion zwischen der α-Dicarbonylbildung und Ferulasäure sowie den antioxidativen Eigenschaften trotzdem zu existieren. Daher wurde ergänzend ein Versuch mit im Haus synthetisierten 1-DH als Reinsubstanz und Ferulasäure durchgeführt. Dabei sollen die Eigenschaften einer potentiell entstehenden Verbindung einen Anstieg des antioxidativen Potentials bewirken. Da, wie schon gezeigt, während des Brauprozesses große Mengen Ferulasäure vorliegen sowie Reduktone entstehen, ist die Reaktion beider miteinander denkbar. Die ermittelten Ergebnisse zeigen einen raschen Abbau des 1-DH, der praktisch vollständig innerhalb der ersten Stunde abläuft. Im selben Zeitraum findet ebenfalls ein im Vergleich zu den anderen durchgeführten Modellen ähnlich großer Abbau von Ferulasäure von 15 % innerhalb von vier Stunden statt. Die Abbaurate ist nicht äquimolar und gleichförmig zur Ferulasäure. Eine Korrelation zwischen beiden Substanzen ist daher nicht möglich. Die antioxidative Aktivität als Verbrauch an DPPH ist beim Beginn der Reaktion bei höchster 1-DH Konzentration am geringsten, steigt während der Abbauphase des 1-DH jedoch sehr stark an. Also scheinen eher Abbauprodukte wie Hydroxymaltol, Furan-3-on oder Fureanol, eine höhere antioxidative Aktivität besitzen als 1-DH selbst. Nach Verbrauch von 1-DH sinkt die antioxidative Aktivität langsam wieder ab. Dieser Trend wurde bei den D-Glukose Modellversuchen nicht beobachtet. Die antioxidative Aktivität nach Chapon zeigt nach 30 Minuten mit auftauchen der neuen Peaks einen kontinuierlichen Anstieg bis zum Ende des Versuchs.

Insgesamt scheinen sich damit die reduktiven Eigenschaften von 1-DH und Glucoson bezogen auf das System Bier nicht zu bestätigen. Wenn die Reduktone Auswirkungen auf die antioxidativen Charakteristika von Würze besitzen, so konnten sie in dieser Arbeit nicht direkt nachgewiesen werden. Vielmehr sind die Produkte aus den α-Dicarbonylverbindungen offensichtlich wesentlich interessantere Verbindungen.

11 Anhang – Verbrauchsmaterialien/Abbildungen/Spektren

Tabelle 11-1: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkungen
1 mL Gewindeflaschen	Wicom	klar, 10 mm Schraubgewinde
Einmalspritzen 1 mL	Braun	Omnifix-F
Eppendorfgefäß	Carl Roth	1,5 mL
Filter hart	Schleicher&Schüll	Rundfilter, 110 mm, Nr. 1575
Filter mittel	Sartorius	Rundfilter, gerade, 3 hw, 110 mm
Fritten	Restek	Resprep, 6 mL
Gewinde-Verschlusskappen	Wicom	10 mm, PP, schwarz, mit eingelegtem Septum (Teflon/Silikon)
Mikroeinsätze	Amchro	0,2 mL, Klarglas, flacher Boden
Mikropipetten 200–1000 µL	Carl Roth	Biohit Proline
Mikropipetten 50–200 µL	Carl Roth	Biohit Proline
Mikropipetten 5–50 µL	Carl Roth	Biohit Proline
Paraffin-Folie	Pechiney	M
Pasteurpipetten	Brand	Glas, 230 mm
Pipettenspitzen 100–1000 µL	Carl Roth	Universal Standard
Pipettenspitzen 1–200 µL	Carl Roth	Universal Standard
RP-C18 Phase	J. T. Baker	Bakerbond polar plus C18
SPE-Kartusche	Supelclean	6 mL, LC-8
SPE-Kartusche	J. T. Baker	Bakerbond C18 (7020-03)
SPME Fiber	Supelco	65µm PDMS/DVB
Spritzenfilter	Rotilabo	RC 0,45 µm
Zentrifugengläser	Carl Roth	Polypropylen

Tabelle 11-2: Sonstige Geräte

Bezeichnung	Hersteller	
Alpha-I-5	Christ	Gefriertrocknung
Analysenwaage	Mettler Toledo	Labstyle 204
Gefriertrocknung	Christ	Alpha-I-5
Laborzentrifuge	Hermle	Z320
Magnetrührer	Variomag	Mono
Membranpumpe	VacuuBrand	RZ-2
Mikroliterzentrifuge	Hermle	Z233MK
Photometer (für Bräunung)	Pharmacia LKB	Novaspec II
Photometer (für Chapon)	Shimadzu	UV-1650 PC
Rotationsverdampfer	Büchi	Rotavapor RE-111
SPE-Vakuumkammer		J. T. Baker
SPME Fiber holder	Supelco	
Tiefkühlschrank		
Trockenschrank	Heraeus	T6030
Ultraschallbad	Elma Transonic	T460/H
Wasserbad	Büchi	B-461

Tabelle 11-3: HPLC-DAD Anlage (Shimadzu Prominence®)

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
CBM-20A	Kommunikation	Shimadzu
CTO-6A	Säulenofen	Shimadzu
DGU-20AS	Degasser	Shimadzu
LC Solution V 1.22	Software	Shimadzu
LC-20AD	Pumpe	Shimadzu
SIL-10AF	Autosampler	Shimadzu
SPD-M20A	DAD	Shimadzu

Tabelle 11-4: HPLC- Anlage zur semipräparativen Gewinnung von Bittersäuren

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
AS-950	Autosampler	Jasco
DG-2080-53	Degaser	Jasco
Gynkosoft	EDV	Gynkotek
L-5025	Säulenofen	Merck
PU-980	Pumpe	Jasco
UV-970	UV-Detektor	Jasco

Tabelle 11-5: Geräte- und Parameter für die Bestimmung von Carbonylverbindungen als PFBOA-Derivate

Gerät		Hersteller
GC	Trace GC2000 Series	ThermoQuest CE INSTRUMENTS
GC-Parameter	Injektion: flow 1 mL/min, 260 °C, splitless 1 min Temperaturprogramm: 50 °C für 4 min, 7 °C/min auf 340 °C, 5 min halten	
MS	Trace MS DSQ	ThermoQuest FINNIGAN
MS-Parameter	Source 200 °C; Transferline 250 °C; scan m/z = 40-550	
Autosampler	AS2000	ThermoQuest
Autosampler-Parameter	1 µL Probe, 1 µL Air Gap	
Kapillarsäule	BPX5 30 m x 0,25 mm ID x 0,5 µm	SGE Analytical Science
Trägergas	Helium 5.0 (99,999 %)	Linde AG

Tabelle 11-6: Geräte und Parameter für die ESR-Messungen

Gerät	Parameter	Einstellung	Einheit
Magnetech MiniScope MS100	B_0	3393,3	Gs
	Sweep	99,23	mGs
	Sweep time	15	S
	Modulation	2000	Hz
	MW alten	7	db
	Gain	200	

Tabelle 11-7: Übersicht α-Dicarbonyle

Name	systematischer Name	CAS	M [g/mol]	t_r HPLC (± 1) [min]
Glucoson	D-Arabino-2-hexosulose	26345-59-5	178,14	10
	1-Desoxyhexosulose		162,14	14
	3-Desoxyhexosulose	4084-27-9	162,14	17
	3-Desoxypentosulose		132,12	20
	1,4-Didesoxyhexosulose		146,14	27
Glyoxal	Oxalaldehyd	107-22-2	58,04	30
	1,4-Didesoxypentosulose		114,19	31
Methylglyoxal	2-Oxopropanal	78-98-8	72,06	33
Diacetyl	2,3-Butandion	431-03-8	86,09	34
	2,3-Diphenylchinoxalin	1684-14-6	282,35	40

Carbonyl-DNPH Mix 1 (Supelco)	Konzentration [mg/L]	Molmasse [g/mol]
Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	224,17
Aceton-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	238,20
Acrolein-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	236,18
Benzaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	286,24
2-Butanon-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	252,23
Butyraldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	252,23
Crotonaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	250,21
Formaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon	40	210,15
Hexaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	280,28
Methacrolein-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	250,21
Propionaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	238,20
p-Tolualdehyd 2,4-dinitrophenylhydrazon	20	300,27
Valeraldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon	20	266,25

Tabelle 11-8: Zusammenfassung Aldehyd-DNPH Derivate

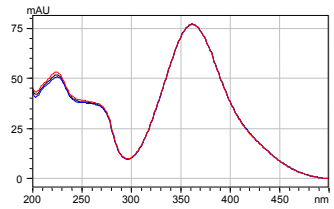
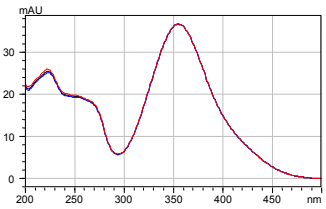
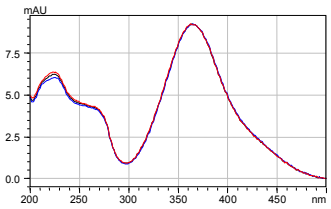
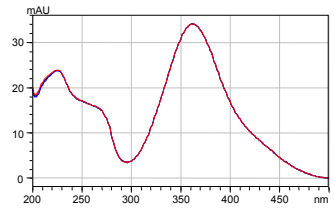
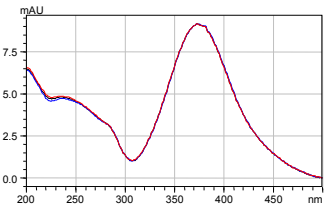
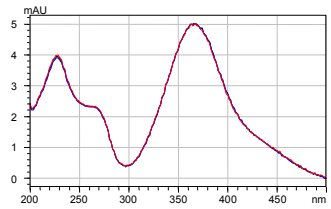
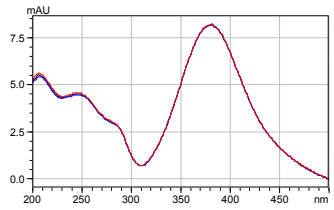
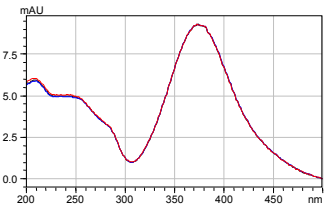
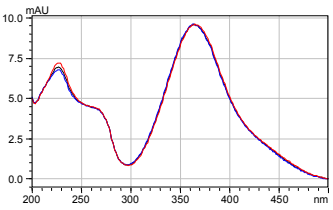
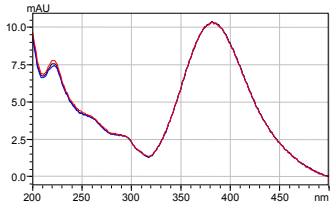
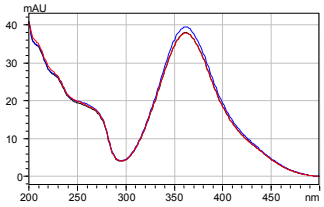
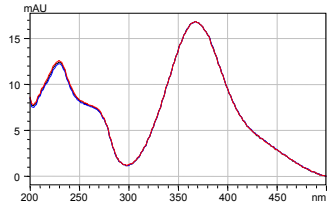
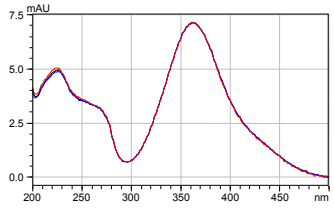
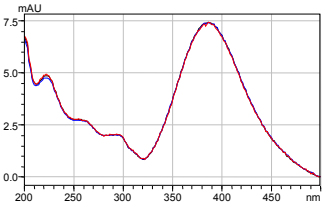
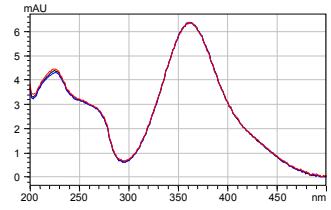
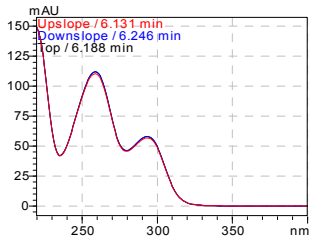
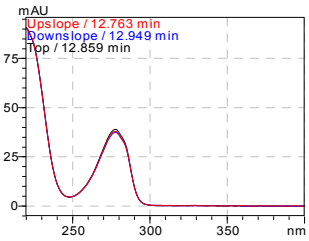
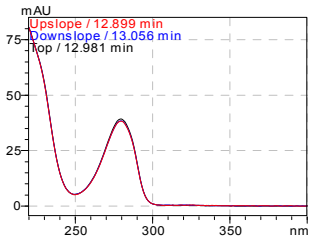
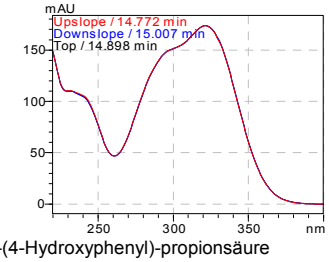
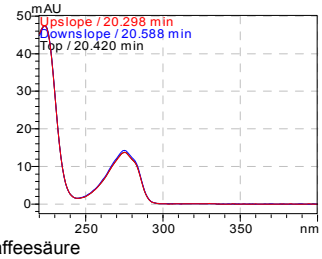
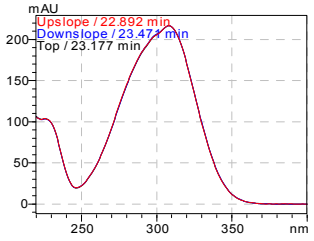
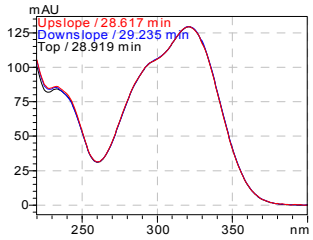
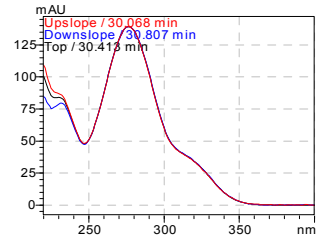
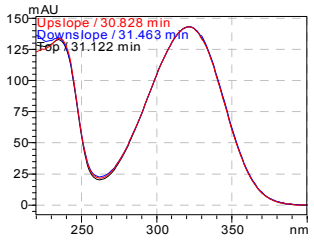
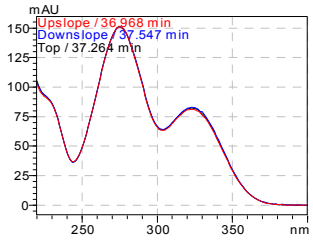
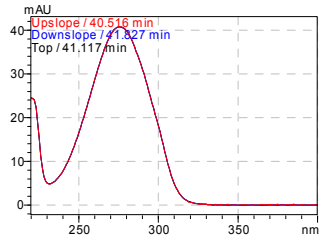
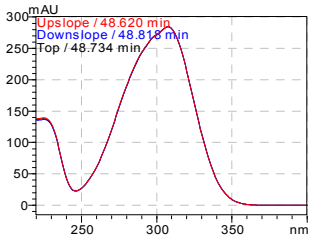
 Glykolaldehyd-2,4-DNPH t_r = 7,0 min M = 240,17 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 60,05 g/mol)	 Formaldehyd-2,4-DNPH t_r = 10,3 min M = 210,15 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 30,03 g/mol)	 Acetaldehyd-2,4-DNPH t_r = 14,3 min M = 224,17 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 44,05 g/mol)
 Propionaldehyd-2,4-DNPH t_r = 16,1 min M = 238,20 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 58,08 g/mol)	 Acroleinaldehyd-2,4-DNPH t_r = 18,2 min M = 236,18 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 56,06 g/mol)	 Acetonaldehyd-2,4-DNPH t_r = 18,4 min M = 238,20 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 58,08 g/mol)
 Crotonaldehyd-2,4-DNPH t_r = 22,2 min M = 250,21 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 70,09 g/mol)	 Methacrolein-2,4-DNPH t_r = 23,2 min M = 250,21 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 70,09 g/mol)	 2-Butanon/Butyraldehyd-2,4-DNPH t_r = 23,6 min M = 252,23 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 72,11 g/mol)
 Benzaldehyd-2,4-DNPH t_r = 26,2 min M = 286,25 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 106,13 g/mol)	 Phenylacetaldehyd-2,4-DNPH t_r = 26,2 min M = 300,27 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 120,15 g/mol)	 Cyclohexanon-2,4-DNPH t_r = 26,9 min M = 278,23 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 98,15 g/mol)
 Valeraldehyd-2,4-DNPH t_r = 27,3 min M = 266,25 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 86,13 g/mol)	 *p*-Tolualdehyd-2,4-DNPH t_r = 29,1 min M = 300,27 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 120,15 g/mol)	 Hexaldehyd-2,4-DNPH t_r = 30,5 min M = 280,28 g/mol ($M_{Aldehyd}$ = 100,16 g/mol)

Tabelle 11-9: Phenolcarbonsäuren, Retentionszeiten und UV-Spektren

 3,4-Dihydroxybenzoesäure t_r = 6,2 min	 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-oxo-propionsre. t_r = 12,9 min	 Hydroxykaffeesäure t_r = 13,0 min
 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure t_r = 14,9 min	 Kaffeesäure t_r = 20,4 min	 *p*-Cumarsäure t_r = 23,2 min
 Ferulasäure t_r = 28,9 min	 *m*-Cumarsäure t_r = 30,4 min	 Sinapinsäure t_r = 31,1 min
 *o*-Cumarsäure t_r = 37,3 min	 Zimtsäure t_r = 41,1 min	 4-Methoxyzimtsäure t_r = 48,7 min

12 Wertetabellen

Tabelle 12-1: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM und GM + FS [µM]

Substanz/ Zeit [min]	0	10	30	60	120	240
Glucoson	u. B.	3,68 ± 0,63	13,55 ± 0,4	23,41 ± 1,66	27,23 ± 0	13,65 ± 1,04
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DH	0,88 ± 0,14	1,87 ± 0,7	5,21 ± 1,84	7,44 ± 7,6	30,64	10,49 ± 12,54
3-DP	u. B.	0,32	1,96 ± 0,52	3,48 ± 3,37	11,28	3,73 ± 4,03
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	0,29 ± 0,29	0,73 ± 0,73	3,05 ± 3,05	3,62 ± 3,62	3,33 ± 3,33	0,29 ± 0,29
Methylglyoxal	1,14 ± 0,5	0,65 ± 0,1	1,33 ± 0,3	2,21 ± 2,17	5,61	2,75 ± 3,24
Diacetyl	u. B.	0,12 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,39 ± 0,32	0,47	0,18 ± 0,07

Substanz/ Zeit [min]	0	10	30	60	120	240
Glucoson	u. B.	13,03 ± 1,17	22,93 ± 5,96	26,48 ± 5,43	25,52 ± 5,86	20,3 ± 0,33
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DH	0,96 ± 0,91	1,4 ± 0,89	2,39 ± 2,15	4,93 ± 5,88	10,47 ± 13,58	11,97 ± 15,81
3-DP	u. B.	0,58 ± 0,18	1,72 ± 1,05	3,59 ± 2,59	4,8 ± 4,22	4,41 ± 4,28
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Methylglyoxal	0,59 ± 0,53	0,81 ± 0,78	0,89 ± 0,61	1,38 ± 1,23	2,48 ± 1,98	1,19 ± 0,49
Diacetyl	1,47 ± 1,94	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0	0,19 ± 0,04	0,08 ± 0,09	0,35 ± 0,3

Tabelle 12-2: α-Dicarbonyl- und Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Gly und GM + Gly + FS [µM]

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glucoson	u. B.	16,51 ± 1,16	16,87 ± 1,68	15,76 ± 1,5	14,08 ± 0,36
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DH	u. B.	18,95 ± 1,27	40,96 ± 1,24	58,53 ± 0,24	102,57 ± 1,58
3-DP	u. B.	1,26 ± 0,22	3,49 ± 0,07	4,59 ± 0,42	6 ± 1,3
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	0,08 ± 0,22	0,73 ± 0,6
Glyoxal	u. B.	16,41 ± 1,31	25,65 ± 1,38	30,45 ± 2,73	6,17 ± 0,3
Methylglyoxal	u. B.	2,45 ± 0,32	4,56 ± 0,16	5,86 ± 0,49	5,43 ± 0,81
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glucoson	u. B.	8,19 ± 0,43	8,04 ± 0,43	8,06 ± 0,81	7,7 ± 0,08
1-DH	u. B.	6,92 ± 0,36	8,89 ± 0,2	9,96 ± 0,48	13,16 ± 0,66
3-DH	u. B.	13,63 ± 1,03	31,58 ± 0,9	43,73 ± 2,74	75,92 ± 4
3-DP	u. B.	1,97 ± 0,09	2,8 ± 0,12	3,37 ± 0,2	3,48 ± 0,07
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	9,47 ± 0,56	15,64 ± 0,5	20,81 ± 1,66	24,36 ± 0,52
Methylglyoxal	u. B.	12,55 ± 0,23	20,37 ± 0,2	29,11 ± 1,96	45,46 ± 1,18
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glycolaldehyd	n. B.	n. B.	n. B.	n. B.	n. B.
Formaldehyd	n. B.	12,26 ± 1,44	22,32 ± 2,96	29,65 ± 2,31	52,42 ± 7,2
Acetaldehyd	n. B.	8,37 ± 0,61	8,03 ± 0,39	6,19 ± 0,29	6,92 ± 0,93

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glycolaldehyd	n. B.	10,15 ± 1,52	10,84 ± 4,19	6,69 ± 1,08	5,06 ± 0,51
Formaldehyd	n. B.	n. B.	n. B.	0,87 ± 0,15	0,7 ± 0,03
Acetaldehyd	n. B.	26,15 ± 3,27	8,47 ± 2,29	60,79 ± 20,79	28,97 ± 7,83

Tabelle 12-3: α-Dicarbonyl- und Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Met und GM + Met + FS [µM]

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glucoson	u. B.	6,3 ± 0,7	8,99 ± 1,13	5,49 ± 2,17	5,38 ± 0,76
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	2,44 ± 1,21
3-DH	u. B.	16,22 ± 0,93	40,91 ± 3,19	54,19 ± 6	113,7 ± 4,07
3-DP	u. B.	u. B.	1,49 ± 0,36	2,94 ± 0,48	5,72 ± 0,98
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	6,6 ± 1,31	12,42 ± 0,99	13,07 ± 4,11	13,93 ± 2,85
Methylglyoxal	u. B.	u. B.	0,05 ± 0,06	0,78 ± 0,2	3,53 ± 0,23
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glucoson	u. B.	17,56 ± 0,62	16,37 ± 1,07	12,18 ± 6,31	16,78 ± 0,92
1-DH	u. B.	9,18 ± 0,27	10,34 ± 0,57	11,02 ± 0,21	13,33 ± 0,48
3-DH	u. B.	17,82 ± 0,73	40,11 ± 1,77	59,8 ± 1,53	114,07 ± 3,45
3-DP	u. B.	2,08 ± 0,11	4,03 ± 0,09	4,16 ± 1,31	5,35 ± 0,16
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	u. B.	10,74 ± 0,67	7,96 ± 5,94	12,06 ± 1,12
Methylglyoxal	u. B.	u. B.	2,44 ± 0,18	2,72 ± 0,39	6,39 ± 1,25
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glycolaldehyd	n. B.	5,17 ± 0,17	4,66 ± 0,26	7,49 ± 0,28	5,38 ± 0,07
Formaldehyd	n. B.	13,67 ± 1,01	26,76 ± 5,52	10,44 ± 1,34	39,82 ± 4,02
Acetaldehyd	n. B.	5,32 ± 0,43	2,99 ± 0,13	6,74 ± 0,99	1,18 ± 0,08

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glycolaldehyd	14,21 ± 2,8	10,09 ± 0,25	10,96 ± 0,52	10,32 ± 1,27	9,62 ± 1,41
Formaldehyd	6,79 ± 0,46	6,36 ± 0,3	6,77 ± 0,8	6,62 ± 0,06	6,64 ± 0,06
Acetaldehyd	50,11 ± 6,71	27,27 ± 6,84	76,61 ± 12,18	38,6 ± 1,15	30,77 ± 2,18

Tabelle 12-4: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle GM + Phe, GM + Phe + FS und GM + Phe + FS10x [µM]

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glucoson	u. B.	12,2 ± 5,49	17,14 ± 2,72	7,66 ± 1,56	15,32 ± 2,14
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	1,99 ± 0,18
3-DH	u. B.	15,49 ± 0,98	36,48 ± 0,56	42,68 ± 11	98,97 ± 1,83
3-DP	u. B.	1,86 ± 0,36	4,38 ± 0,47	5,94 ± 0,25	9,41 ± 0,5
1,4-DDH	u. B.	u. B.	0,37 ± 0,04	0,23	0,19 ± 0,17
Glyoxal	u. B.	11,32 ± 4,43	23,76 ± 1,68	17,84 ± 3,33	33,98 ± 3,46
Methylglyoxal	u. B.	1,66 ± 0	2,75 ± 0	4,02 ± 0,34	5,47 ± 0,71
Diacetyl	u. B.	u. B.	2,3	23,2	7,4

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glucoson	u. B.	19,27 ± 3,6	17,62 ± 0,3	19,33 ± 1,88	21,92 ± 2,67
1-DH	u. B.	11,69 ± 1,84	6,99 ± 1,4	7,53 ± 0,84	11,36 ± 0,38
3-DH	u. B.	14,54 ± 0,81	34,73 ± 2,5	57,3 ± 1,7	119,16 ± 5,05
3-DP	u. B.	u. B.	1,09 ± 0,9	1,96 ± 0,24	5,42 ± 0,52
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	10,81 ± 1,92	15,5 ± 3,78	21,68 ± 0,41	27,92 ± 3,89
Methylglyoxal	u. B.	u. B.	u. B.	1,26 ± 0,76	3,93 ± 1,7
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glucoson	u. B.	17,94 ± 0,2	18,87 ± 1,65	18,99 ± 1,81	14,9 ± 2,31
1-DH	u. B.	u. B.	3,86 ± 0	4,28 ± 0,08	6,93 ± 0,36
3-DH	u. B.	15,59 ± 0,87	34,31 ± 0,85	53,56 ± 1,17	103,41 ± 5,26
3-DP	u. B.	3,2 ± 0,12	4,5 ± 0,16	6,1 ± 0,56	8,29 ± 0,24
1,4-DDH	u. B.	1,9 ± 0,05	2,46 ± 0,16	3,23 ± 0,19	4,84 ± 0,2
Glyoxal	u. B.	13,04 ± 0,29	20,18 ± 1,74	25,81 ± 3,12	28,13 ± 2,7
Methylglyoxal	u. B.	3,26 ± 0,28	3,61 ± 0,2	5,08 ± 0,14	7,48 ± 0,55
Diacetyl	u. B.	17,94 ± 0,2	18,87 ± 1,65	18,99 ± 1,81	14,9 ± 2,31

Tabelle 12-5: Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Phe, GM + Phe + FS und GM + Phe + FS10x [µM]

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glycolaldehyd	n. B.	n. B.	n. B.	n. B.	5,62 ± 0,55
Formaldehyd	n. B.	17,26 ± 0,47	27,14 ± 1,33	45,91 ± 3,39	66,34 ± 3,42
Acetaldehyd	n. B.	10,51 ± 0,83	10,99 ± 0,37	11,16 ± 0,23	5,64 ± 0,59

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glycolaldehyd	n. B.	7,39 ± 0,22	8,26 ± 0,39	7,62 ± 0,94	6,92 ± 1,02
Formaldehyd	n. B.	0,29 ± 0,01	0,69 ± 0,08	0,55 ± 0,01	0,56 ± 0,01
Acetaldehyd	n. B.	24,53 ± 6,15	73,89 ± 11,74	35,87 ± 1,07	28,03 ± 1,98

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glycolaldehyd	n. B.	6,62 ± 0,14	6,98 ± 0,49	6,36 ± 0,33	5,8 ± 0,01
Formaldehyd	n. B.	2,17 ± 0,08	7,68 ± 2,83	3,58 ± 0,96	2,24 ± 0,04
Acetaldehyd	n. B.	11,87 ± 3,3	25,97 ± 7,16	11,15 ± 2,73	2,82 ± 0,09

Tabelle 12-6: α-Dicarbonyl- und Aldehydkonzentrationen der Modelle GM + Thr und GM + Thr + FS [µM]

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glucoson	u. B.	7,73 ± 1,17	10,65 ± 1,1	8,54 ± 2,06	12,57 ± 2,19
1-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	3,71 ± 0,1
3-DH	u. B.	11,99 ± 0,37	27,71 ± 0,15	39,43 ± 3,5	81,1 ± 0,96
3-DP	u. B.	1,44 ± 0,1	2,78 ± 0,3	4,18 ± 0,31	6,31 ± 1,01
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	0,14 ± 0,05
Glyoxal	u. B.	1,53 ± 0,27	4,64 ± 0,64	4,53 ± 1,65	8,34 ± 2,27
Methylglyoxal	u. B.	u. B.	1,01 ± 0,4	5,09 ± 0,44	3,82 ± 0,64
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glucoson	u. B.	17,65 ± 1,05	21,12 ± 1,75	21,47 ± 1,96	24,54 ± 5,19
1-DH	u. B.	8,28 ± 0,25	9,59 ± 0,92	11,24 ± 0,9	17,98 ± 0,64
3-DH	u. B.	16,32 ± 1,29	37,45 ± 2,67	58,01 ± 3,5	112,28 ± 2,63
3-DP	u. B.	2,39 ± 0,03	4,06 ± 0,49	6,95 ± 0,67	11,95 ± 1,42
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	u. B.	9,05 ± 0,46	3,74 ± 0,89	6,37 ± 1,09	10,99 ± 4,31
Methylglyoxal	u. B.	2,55 ± 0,25	0,42 ± 0,08	1,95 ± 0,22	4,01 ± 1,42
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glycolaldehyd	n. B.	38,47 ± 7,3	46,38 ± 8,18	42,65 ± 6,83	53,15 ± 3,62
Formaldehyd	n. B.	98,71 ± 9,48	85,62 ± 4,02	139,39 ± 56,8	103,67 ± 11,29
Acetaldehyd	n. B.	66,59 ± 8,54	62,57 ± 6,77	79,16 ± 9,77	69,96 ± 5,73

Substanz/ Zeit [min]	0	20	40	60	120
Glycolaldehyd	n. B.	7,89 ± 0,39	7,77 ± 1,58	7,21 ± 0,23	6,27 ± 0,38
Formaldehyd	n. B.	0,66 ± 0,05	0,22 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,04 ± 0
Acetaldehyd	n. B.	40,51 ± 6,72	76,36 ± 22,59	39,82 ± 8,22	29,81 ± 0,98

Tabelle 12-7: α-Dicarbonylkonzentrationen der Modelle gleicher Aminosäuremolaritäten GM + Gly/Met/Phe/Thr/Arg + FS [µM] (Einzelmessung)

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glucoson	u. B.	11,18	9,73	13,82
1-DH	3,58	9,86	13,18	24,49
3-DH	3,56	41,87	75,92	115,57
3-DP	u. B.	5,3	3,51	4,75
1,4-DDH	u. B.	u. B.	0,6	1,19
Glyoxal	u. B.	27,1	27,5	34,63
Methylglyoxal	u. B.	7,8	5,73	10,41
Diacetyl	u. B.	u. B.	1,08	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glucoson	u. B.	13,85	12,2	12,38
1-DH	3,86	11,02	15,5	23,8
3-DH	1,15	52,56	106,74	174,18
3-DP	u. B.	4,46	6,03	7,88
1,4-DDH	u. B.	2,08	2,18	3,45
Glyoxal	u. B.	14,75	15,1	15,24
Methylglyoxal	u. B.	3,15	4,82	6,05
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glucoson	u. B.	13,97	16,71	18,67
1-DH	3,55	11,72	17,93	31,97
3-DH	3,62	49,13	106,77	165,67
3-DP	u. B.	6,47	7,71	8,74
1,4-DDH	u. B.	3,03	0,66	1,46
Glyoxal	u. B.	27,53	31,17	34,46
Methylglyoxal	u. B.	7,23	5,4	7,68
Diacetyl	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glucoson	u. B.	19,1	20,03	20,15
1-DH	3,85	13,67	20,97	40,95
3-DH	3,55	53,54	113,85	192,72
3-DP	u. B.	6,87	7,08	7,97
1,4-DDH	u. B.	3,07	0,78	1,74
Glyoxal	u. B.	12,89	10,48	22,45
Methylglyoxal	u. B.	7,49	6,13	11,05
Diacetyl	u. B.	3,96	3,32	u. B.

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glucoson	u. B.	15,79	20,84	19,7
1-DH	4,03	9,9	15,17	27,49
3-DH	1,44	338,57	359,38	321,01
3-DP	u. B.	6,56	11,84	13,41
1,4-DDH	u. B.	u. B.	8,1	8,7
Glyoxal	u. B.	27,92	25,84	13,69
Methylglyoxal	u. B.	8,71	11,14	10,86
Diacetyl	u. B.	5,24	5,91	7,68

Tabelle 12-8: Konzentrationsverlauf von α-Dicarbonylverbindungen und Ferulasäure [µM]; ESR-Daten als Verbrauch DPPH [mM] sowie Chapon-Daten als Menge gebildetes Eisen (II) [µM] im Modell 1-DH und Ferulasäure (100 °C; pH 5,5)

Zeit [min]	1-DH	Methylglyoxal	Diacetyl	FS	DPPH	Chapon
0	227,50	7,55	0,56	481,81	2,05	86,94
30	79,30	8,62	1,82	488,81	12,83	84,78
60	31,78	9,52	4,29	464,20	15,81	102,60
120	u. B.	14,08	7,69	460,37	15,81	130,68
240	u. B.	12,95	9,99	404,84	14,14	179,82

Tabelle 12-9: Aldehydkonzentrationen der Modelle gleicher Aminosäuremolaritäten GM + Gly/Met/Phe/Thr/Arg + FS [µM] (Einzelmessung)

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glycolaldehyd	15,06	15,96	15,11	16,33
Formaldehyd	15,93	10,39	21,02	11,8
Acetaldehyd	48,57	18,67	59,8	24,09

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glycolaldehyd	15,23	15,08	13,44	13,85
Formaldehyd	14,3	14,34	19,88	14,93
Acetaldehyd	26,44	11,76	32,8	15,04

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glycolaldehyd	16,74	14,46	13,2	16,16
Formaldehyd	21,54	31	25,84	18,27
Acetaldehyd	23,19	16,32	18,94	26,88

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glycolaldehyd	15,39	15,86	18,25	18,74
Formaldehyd	19,11	12,04	7,7	6,74
Acetaldehyd	32,3	21,62	18,89	13,12

Substanz/ Zeit [min]	0	60	120	240
Glycolaldehyd	14,46	44,93	35,26	27,05
Formaldehyd	1,45	61,65	45,61	126,16
Acetaldehyd		7,43	13,26	

Tabelle 12-10: Ferulasäurekonzentrationen in µM der Versuche GM + FS, GM + Pro + FS (100 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert); Glc + FS (150 °C; pH 5,5; phosphatgepuffert)

Zeit [min]	GM + FS	GM + FS + Pro	Glc + FS
0	43,8 ± 2,0	48,1 ± 1,1	438,4 ± 36,2
10	42,1 ± 0,1	44,6 ± 0,4	385,8 ± 9,1
30	41,4 ± 1,8	45,9 ± 0,2	296,9 ± 10,8
60	40,9 ± 1,0	43,5 ± 0,8	213,1 ± 16,3
120	38,1 ± 1,0	41,7 ± 0,2	71,2 ± 15,1
240	36,8 ± 0,1	41,0 ± 0,5	59,8 ± 10,4

Tabelle 12-11: ESR-Daten der Modelle Glc (150 °C), Glc + FS (150 °C), FS (100 °C), 1-DH + FS (100 °C) als Verbrauch DPPH in mol/L; (alle bei pH 5,5; phosphatgepuffert)

Zeit [min]	Glc+FS	Glc	FS	1-DH + FS
0	0,0129 ± 0,0024	0,003	0,0070 ± 0,0004	0,002046
10	0,0140 ± 0,0010	0,0065 ± 0,0021	0,0059 ± 0,0001	-
30	0,0308 ± 0,0006	0,0125 ± 0,0007	0,0047 ± 0,0002	0,012834
60	0,0510 ± 0,0057	0,0270 ± 0,0071	0,0042 ± 0,0003	0,015810
120	0,0833 ± 0,0249	0,0565 ± 0,0035	0,0037 ± 0,0002	0,015810
240	0,2015 ± 0,0403	0,1100 ± 0,0283	0,0030 ± 0,0001	0,014136
360	-	0,1650 ± 0,0071	-	-
480	-	0,2250 ± 0,0354	-	-

Tabelle 12-12: Chapon-Daten der Modelle: Glc (150 °C), Glc + FS (150 °C), FS (100 °C), 1-DH + FS (100 °C) in mM; (alle bei pH 5,5; phosphatgepuffert)

Zeit [min]	Glc+FS	Glc	FS	1-DH+FS
0	0,13 ± 0,03	0	-	0,09
10	0,26 ± 0,02	0,16 ± 0,01	-	0,00
30	0,75 ± 0,12	0,68 ± 0,10	-	0,08
60	1,51 ± 0,13	2,00 ± 0,08	-	0,10
120	3,61 ± 0,14	3,72 ± 0,09	-	0,13
240	6,49 ± 0,38	6,55 ± 0,14	-	0,18

Tabelle 12-13: Konzentration [µM] von α-Dicarbonylen, Aldehyden und Ferulasäure der Biersorten Pilsner, Malzbier, Schwarzbier sowie Bock Bier

	Pilsner		Malzbier	
	frisch	alt	frisch	alt
1-DH	0,27 ± 0,02	0,98 ± 0,12	0,74 ± 0,17	1,48 ± 0,17
1-DP	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DP	14,32 ± 0,39	4,77 ± 0,55	7,47 ± 0,52	4,67 ± 0,22
Diacetyl	3,54 ± 1,04	1,02 ± 0,62	1,05 ± 0,22	1,52 ± 0,18
Glucoson	u. B.	u. B.	42,81 ± 1,79	u. B.
Glyoxal	1,84 ± 0,08	1,94 ± 0,11	1,21 ± 0,16	2,04 ± 0,13
Methylglyoxal	1,71 ± 0,02	2,13 ± 0,15	3,95 ± 0,19	3,67 ± 0,83
Summe	147,21 ± 1,95	161,07 ± 2,14	264,21 ± 6,69	181,31 ± 5,68
Acetaldehyd	38,40 ± 3,41	53,43 ± 1,74	38,36 ± 0,54	59,34 ± 7,49
Aceton	2,06 ± 0,04	2,25 ± 0,76	1,00 ± 0,03	u. B.
Acrolein	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Benzaldehyd	u. B.	8,82 ± 1,18	u. B.	7,39 ± 0,54
Crotonaldehyd	u. B.	9,29 ± 0,33	u. B.	8,97 ± 0,41
Formaldehyd	18,87 ± 1,65	16,48 ± 1,21	34,81 ± 1,48	35,2 ± 2,25
Glycolaldehyd	94,09 ± 2,37	63,61 ± 5,00	221,01 ± 2,41	170,49 ± 23,51
Hexaldehyd	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Methacrolein	7,27 ± 0,15	7,30 ± 0,22	9,78 ± 0,1	7,5 ± 0,42
Phenylacetaldehyd	1,58 ± 0,31	10,35 ± 2,55	7,91 ± 0,65	12,57 ± 3,21
Propionaldehyd	u. B.	22,41 ± 4,91	u. B.	13,81 ± 1,77
Summe	162,27 ± 7,93	193,94 ± 17,9	312,87 ± 5,21	315,27 ± 39,6
Ferulasäure	7,22 ± 0,02	19,45 ± 0,03	1,75 ± 0,08	17,85 ± 0,07

	Schwarzbier		Bock Bier	
	frisch	alt	frisch	alt
1-DH	7,83 ± 0,53	2,54 ± 0,14	0,95 ± 0,14	0,99 ± 0,12
1-DP	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
1,4-DDH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DH	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
3-DP	17,88 ± 0,39	9,29 ± 0,43	42,95 ± 0,85	9,55 ± 0,56
Diacetyl	2,47 ± 0,31	2,12 ± 0,15	2,6 ± 0,24	2,71 ± 0,08
Glucoson	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Glyoxal	1,12 ± 0,12	3,59 ± 0,38	1,74 ± 0,09	2,88 ± 0,44
Methylglyoxal	4,37 ± 0,28	6,05 ± 0,53	3,07 ± 0,16	3,16 ± 0,30
Summe	270,75 ± 4,1	260,1 ± 6,85	249,9 ± 3,39	269,39 ± 16,88
Acetaldehyd	52,40 ± 0,75	88,61 ± 1,62	87,52 ± 5,95	85,03 ± 1,58
Aceton	2,63 ± 0,07	3,35 ± 0,52	7,10 ± 0,88	2,36 ± 0,36
Acrolein	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Benzaldehyd	u. B.	9,05 ± 0,74	u. B.	7,24 ± 0,14
Crotonaldehyd	u. B.	9,78 ± 0,35	u. B.	9,15 ± 0,2
Formaldehyd	29,37 ± 1,06	38,56 ± 0,9	23,36 ± 1,13	21,38 ± 2,26
Glycolaldehyd	201,38 ± 1,16	198,18 ± 8,82	150,08 ± 2,91	97,7 ± 17,17
Hexaldehyd	u. B.	u. B.	u. B.	u. B.
Methacrolein	9,57 ± 0,17	8,30 ± 0,25	11,01 ± 0,96	7,03 ± 0,27
Phenylacetaldehyd	9,12 ± 1	19,94 ± 1,21	17,53 ± 3,93	12,16 ± 0,55
Propionaldehyd	u. B.	20,45 ± 1,99	u. B.	15,39 ± 2,15
Summe	304,47 ± 4,21	396,22 ± 16,4	296,6 ± 15,76	257,44 ± 24,68
Ferulasäure	6,98 ± 0,12	24,71 ± 0,06	9,64 ± 0,01	36,39 ± 0,09

Tabelle 12-14: Definition der Probenahmepunkte von Sud 1 und Sud 2

Nummer	Zeit [min]	Probenahmepunkt
#1	0	Einmaischen
#2	9	vor der 1. Rast
#3	39	nach der 1. Rast
#4	45	vor der 2. Rast
#5	65	vorm Läutern
#6	146	Vorderwürze
#7	275	Pfanne Voll
#8	289	Kochbeginn
#9	294	nach Hopfen
#10	319	30 min Kochen
#11	349	60 min Kochende
#12	419	nach Whirl
#13	430	Anstellwürze

Tabelle 12-15: Gehalte der α-Dicarbonylverbindungen an den Probenahmepunkten der Sudhausarbeit von Sud 1 (alle Werte in µM und nicht extraktbereinigt)

Proben-nahme-punkt	Zeit [min]	Extrakt [%]	Glucoson	1-DH	3-DH	3-DP	Glyoxal	Methyl-glyoxal	Diacetyl
#1	0	14,81	11,5 ± 1,9	11,4 ± 0,6	82,5 ± 1,7	12,1 ± 0,3	26,0 ± 0,8	2,8 ± 0,3	1,4
#2	9	18,12	10,3 ± 5,5	12,0 ± 1,1	85,4 ± 8,3	9,5 ± 0,5	9,9 ± 1,0	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1
#3	39	18,30	9,3 ± 3,0	12,4 ± 1,0	90,8 ± 3,1	9,3 ± 0,2	8,4 ± 1,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,5
#4	45	18,73	9,8 ± 1,1	13,8 ± 0,4	86,0 ± 1,9	8,1 ± 0,4	8,2 ± 1,0	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,5
#5	65	18,85	10,9 ± 3,5	16,3 ± 2,7	89,3 ± 2,7	7,9 ± 0,3	7,2 ± 1,0	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,7
#6	146	16,57	11,6 ± 0,1	14,8 ± 0,5	75,1 ± 1,0	5,8 ± 0,3	6,4 ± 0,6	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1
#7	275	10,95	10,0 ± 0,1	9,4 ± 0,4	50,5 ± 0,2	3,6 ± 0,3	12,7 ± 6,2	0,5	1,5
#8	289	11,06	10,8 ± 0,5	12,3 ± 0,5	60,1 ± 0,6	4,3 ± 0,2	1,7 ± 0,8	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,2
#9	294	11,10	11,6 ± 1,4	18,2 ± 0,3	76,7 ± 0,6	5,7 ± 0,2	1,7 ± 0,6	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,5
#10	319	11,34	10,2 ± 1,7	25 ± 0,6	108,1 ± 1,1	5,3 ± 0,3	1,8 ± 0,7	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1
#11	349	14,48	8,1 ± 0,3	29,7 ± 0,8	131,4 ± 1,9	4,7 ± 0,1	1,6 ± 0,5	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,3
#12	419	11,53	8,2 ± 0,7	28,8 ± 0,6	144,4 ± 0,6	4,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,2 ± 0,2
#13	430	11,51	6,1 ± 2,7	27,9 ± 1,6	144,3 ± 0,6	3,9 ± 0,2	1,9 ± 0,4	2,0 ± 0,1	1,2

Tabelle 12-16: Gehalte der α-Dicarbonylverbindungen an den Probenahmepunkten der Sudhausarbeit von Sud 2 (alle Werte in µM und nicht extraktbereinigt)

Proben-nahme-punkt	Zeit [min]	Extrakt [%]	Glucoson	1-DH	3-DH	3-DP	Glyoxal	Methyl-glyoxal	Diacetyl
#1	0	-	-	-	-	-	-	-	-
#2	9	17,14	6,7 ± 0,5	2,2 ± 0,6	82,1 ± 1,7	5,8 ± 0	1,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1 ± 0,1
#3	39	17,22	7,3 ± 0,5	2,4 ± 0,3	83,2 ± 1,7	5,7 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1 ± 0,1
#4	45	17,93	7,6 ± 1,2	3,4 ± 0,3	85 ± 2,6	5,6 ± 0,6	1,6 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1 ± 0,1
#5	65	17,23	8,5 ± 0,2	3,6 ± 0,3	83 ± 2,6	5,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1 ± 0,1	1 ± 0
#6	146	16,49	13,9 ± 0,9	8,4 ± 0,4	81,4 ± 0,9	5,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1
#7	275	11,38	9,2 ± 1,1	4,1 ± 1,3	55 ± 0,7	4,3 ± 0,2	1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0
#8	289	11,90	12 ± 0,5	5,5 ± 1,1	70 ± 1,1	5,4 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0
#9	294	11,95	11,5 ± 0,4	8,5 ± 1,2	85,6 ± 3,5	6,4 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0	0,8 ± 0,1
#10	319	12,05	10,5 ± 2,8	11,4 ± 1,4	113,7 ± 2,7	7,3 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1
#11	349	12,05	6,9 ± 0,3	10,6 ± 0,9	137,5 ± 1,9	8,4 ± 0,4	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
#12	419	11,53	9,8 ± 0,9	10 ± 0,2	146,9 ± 0,2	9,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,8 ± 0
#13	430	11,52	7,7 ± 1,4	9,8 ± 1,6	144 ± 1,7	9,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0

Tabelle 12-17: Gehalte von Aldehyden und Werte der ESR-Messungen an den Probenahmepunkten der Sudhausarbeit von Sud 1 (nicht extraktbereinigt; falls nicht anders angegeben, alle Werte in µM)

Proben-nahme-punkt	GA	FA	AA	FS	E420	DPPH-Reducing Activity	EAP-Wert [min]	ESR t=240min
#1	21,51	313,11	43,36	6,61	0,315	-	-	-
#2	24,89	94,76	62,26	9,18	0,434	17	1	280000
#3	22,53	165,70	66,62	9,43	0,393	24	1	220000
#4	20,26	165,36	61,60	8,80	0,411	25	1	215000
#5	17,32	252,74	36,27	9,78	0,333	25	16	180000
#6	17,98	190,98	42,23	8,43	0,224	34	16	200000
#7	20,61	67,18	43,18	3,65	0,160	17	17	150000
#8	16,06	87,69	33,39	5,56	0,240	23	39	580000
#9	11,41	72,06	23,45	6,55	0,369	27	56	180000
#10	14,88	123,41	32,79	6,57	0,272	18	48	310000
#11	17,76	91,91	41,17	6,90	0,255	30	46	380000
#12	17,75	123,95	41,34	7,03	0,297	22	36	310000
#13	17,06	117,50	36,90	7,56	0,321	17	27	520000

MG: Methylglyoxal; GA: Glycolaldehyd; FA: Formaldehyd; AA: Acetaldehyd; FS: Ferulasäure

Tabelle 12-18: Gehalte von Aldehyden und Werte der ESR-Messungen an den Probenahmepunkten der Sudhausarbeit von Sud 2 (nicht extraktbereinigt; falls nicht anders angegeben, alle Werte in µM)

Proben-nahme-punkt	GA	FA	AA	FS	E420	DPPH-Reducing Activity	EAP-Wert [min]	ESR t=600min
#1	-	-	-	-	-	-	-	-
#2	111,70	403,32	12,33	6,88	-	24	0	218883
#3	105,46	361,17	9,30	6,43	-	19	0	205167
#4	108,86	392,10	13,00	6,66	-	22	0	187756
#5	113,97	431,14	19,71	6,25	-	20	0	194524
#6	107,13	495,14	13,92	6,21	-	28	0	234801
#7	109,11	512,56	14,22	5,10	-	16	30	211122
#8	115,40	681,69	30,02	5,69	-	13	31	1556230
#9	129,21	513,59	19,87	6,03	-	20	20	346843
#10	103,58	905,85	40,81	6,35	-	25	12	750115
#11	126,11	684,79	30,98	6,33	-	22	15	1006430
#12	114,37	772,94	24,42	6,14	-	15	35	60156
#13	106,48	826,94	28,18	5,74	-	15	29	998648

Tabelle 12-19: Werte der Zuckermessungen von Sud 1 während der Sudhausarbeit in µM (ermittelt vom Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Brauwesen)

Proben-nahme-punkt	Fruktose	Glukose	Saccharose	Maltose	Maltotriose
#1	8729	75143	21114	207240	21869
#2	-	-	-	-	-
#3	4830	73609	24170	281499	31089
#4	-	-	-	-	-
#5	2661	76541	25628	281856	38214
#6	-	-	-	-	-
#7	3421	42862	13258	157946	22859
#8	-	-	-	-	-
#9	3670	42680	13267	160196	23058
#10	-	-	-	-	-
#11	-	-	-	-	-
#12	-	-	-	-	-
#13	4496	43662	14370	166439	24547

Tabelle 12-20: Werte der Zuckermessungen von Sud 2 während der Sudhausarbeit in µM (ermittelt vom Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Brauwesen)

Proben-nahme-punkt	Fruktose	Glukose	Saccharose	Maltose	Maltotriose
#1	-	-	-	-	-
#2	5081	57076	19549	253823	37361
#3	-	-	-	-	-
#4	-	-	-	-	-
#5	5726	57818	18866	248638	37936
#6	-	-	-	-	-
#7	-	-	-	-	-
#8	4240	36063	12219	160672	25892
#9	3593	41082	12516	169517	27177
#10	-	-	-	-	-
#11	4394	38855	13192	171585	26886
#12	-	-	-	-	-
#13	4207	36582	11860	161419	25533

13 Literaturverzeichnis

[1] Narziß, L. & Mueck, E. (1986). The behavior of free long chain fatty acids during wort boiling and wort treatment Correction of. *Monatsschrift fuer Brauwissenschaft, 39* (7), 252 - 257.

[2] Meyer, A. H. (2007). *Lebensmittelrecht Band II.* München: C.H. Beck.

[3] Kunze, W. (2007). *Technologie Brauer und Mälzer.* Berlin: VLB Berlin.

[4] Anil Batra; Karl Mann; Manfred V. Singer (2010). *Alkohol und Tabak.* : Georg Thieme Verlag.

[5] Dr. J. Erhardt (2013). *Ernährungsinformationssystem der Universität Hohenheim*.

[6] Narziß, L. & Back, W. (2009). *Die Brauerei: Die Technologie der Würzebereitung.* Weinheim: Wiley-VCH.

[7] Narziß, L. (2004). *Abriss der Bierbrauerei.* Weinheim: Wiley-VCH.

[8] Brewer, J. D. & Fenton, M. S. (1980). The formation of sulphur dioxide during fermentation. *Proceedings of the 16th Convention, The Institute of Brewing*, 155 - 164.

[9] Ryder, D. S., Power, J. & Siebel, R. E. (1989). A question of flavor stability and instability. *Proceedings of the Convention, The Institute of Brewing*, 336 - 391.

[10] Narziss, L., Miedaner, H., Graf, H., Eichhorn, P. & Lustig, S. (1993). Technological approach to improve flavor stability. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quaterly, 30*, 48 - 53.

[11] Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S. & Koshino, S. (1991b). Role of active oxygens on deterioration of beer flavor. *Eur. Brew. Conv. Proc. 23rd Cong.*, 433 - 440.

[12] Fieser, L. F. & Fieser, M. (1952). Aldehydes and Ketones. *Textbook of Organic Chemistry*, 197 - 198.

[13] Nordiöv, H. (1985). Formation of sulphur dioxide during beer fermentation. *Proceedings of the 20th European Brewery Convention (Helsinki)*, 291 - 298.

[14] Nordiov, H. & Winell, B. (1993). Beer flavor stabilization by interaction between bisulfite and *trans*-2-nonenal. *Proceedings of the 19th European Brewery Convention (London)*, 271 - 278.

[15] Kaneda, H., Takashio, M., Osawa, T. & Kawakishi, S. (1996). Behaviour of sulfites during fermentation and storage of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 54*, 115 - 120.

[16] Chapon, L., Chapon, S. & Djeuga, N. (1981). Free sulfites in beers-Kinetic studies. *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 40*, 31 - 39.

[17] Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S. & Kamimura, M. (1990). Effect of Free Radicals on Haze Formation in Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38*, 1909 - 1912.

[18] Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F. & Delvaux, F. R. (2007). Variability in the Release of Free and Bound Hydroxycinnamic Acids from Diverse Malted Barley (Hordeum vulgare L.) Cultivars during Wort Production. *J. Agric. Food Chem., 55*, 11002 - 11010.

[19] Packer, J., Slater, T. & Willson, R. (1979). Direct observation of free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature, 278*, 737 - 738.

[20] Glomb, M. & Voigt, M. (2009). Reactivity of 1-deoxy-D-erthro-hexo-2,3-diulose: A key intermediate in the Maillard chemistry of hexoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57* (11), 4765 - 4770.

[21] Kanzler, C., Haas, P. T. & Kroh, L. W. (2014). Antioxidant Capacity of 1-Deoxy-D-*erythro*-hexo-2,3-diulose and D-*arabino*-hexo-2-ulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62* (13), 2837-2844.

[22] Kaneda, H., Kano, Y., Koshino, S. & Ohya-Nishiguchi, H. (1992). Behavior and role of iron ions in beer deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40* (11), 2102.

[23] Zufall, C. & Tyrell, T. (2008). The Influence of Heavy Metal Ions on Beer Flavour Stability. *Journal of the Institute of Brewing, 114* (2), 134 - 142.

[24] Hans, C. (1997). *EBC Technology and Engineering Forum.* : Getränke-Fachverlag.

[25] Brauhaus Hopfezopfe (2005). Berechnungen zur Herstellung eines Kleinsudes. *„Brauerei-Forum“ 6/96,* 90-94

[26] Vanderhaegen, B., Delvaux, P., Daenen, L., Verachtert, H. & Delvaux, F. R. (2007). Aging characteristics of different beer types. *Food chemistry, 103*, 404-412.

[27] Hollnagel, A. & Kroh, L. W. (1998). Formation of a-dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung A, 207*, 50 - 54.

[28] Hollnagel, A. & Kroh, L. W. (2000). Degradation of Oligosaccharides in Nonenzymatic Browning by Formation of a-Dicarbonyl Compounds via a "Peeling Off" Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48* (12), 6219 - 6226.

[29] Caemmerer, B., Jalyschko, W. & Kroh, L. W. (2002). Intact Carbohydrate Structures as Part of the Melanoidin Skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50* (7), 2083 - 2087.

[30] Liedke, R. & Eichner, K. (1998). Bildung von D-Arabino-Hexosulose beim Abbau von Amadori-Verbindungen in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen. *Lebensmittelchemie, 53*, 18 - 19.

[31] Barth, I. (2006). *Beiträge zur Chemie der Osone in der nichtenzymatischen Bräunung.* Berlin.

[32] Hofmann, T., Bors, W. & Stettmaier, K. (1999). Studies on Radical Intermediates in the Early Stage of the Nonenzymatic Browning Reaction of Carbohydrates and Amino Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*, 379 - 390.

[33] Hayashi, T., Mase, S. & Namiki, M. (1985). Formation of the N,N'-Dialkylpyrazine Cation Radical from Glyoxal Dialkylimine produced on Reaction of a Sugar with an Amine or Amino Acid. *Agricultural and Biological Chemistry, 49*, 3131 - 3137.

[34] Hayashi, T., Mase, S. & Namiki, M. (1986). Formation of Three-Carbon Sugar Fragment at an Early Stage of the Browning Reaction of Sugar with Amines or Amino Acids. *Agricultural and Biological Chemistry, 50*, 1959 - 1986.

[35] Caemmerer, B., Wedzicha, B. L. & Kroh, L. W. (1999). Nonenzymatic browning reactions of retro-aldol degradation products of carbohydrates. *European Food Research and Technology, 209* (3), 261 - 265.

[36] Kramhoeller, B., Pischetsrieder, M. & Severin, T. (1993). Maillard reactions of lactose and maltose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41* (3), 347 - 351.

[37] Rechner, A., Spencer, J., Kuhnle, G., Hahn, U. & Rice-Evans, C. (2001). Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Biology and Medicine, 30*, 1213 - 1222.

[38] Foley, S., Navaratnam, S., McGarvey, D., Land, E., Truscott, T. & Rice-Evans, C. (1999). Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radical Biology and Medicine, 26*, 1202 - 1208.

[39] Croft, K. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences, 854*, 435 - 442.

[40] Zupfer, J. M., Churchill, K. E., Rasmusson, D. C. & Fulcher, R. G. (1998). Variation in Ferulic Acid Concentration among Diverse Barley Cultivars Measured by HPLC and Microspectrophotometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46* (4), 1350 - 1354.

[41] Pussayanawin, V., Wetzel, D. L. & Fulcher, R. G. (1988). Fluorescence detection and measurement of ferulic acid in wheat milling fractions by microscopy and HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36* (3), 515 - 520.

[42] Hernanz, D., Nunez, V., Sancho, A. I., Faulds, C. B., Williamson, G., Bartolomé, B. & Gómez-Cordovés, C. (2001). Hydroxycinnamic Acids and Ferulic Acid Dehydrodimers in Barley and Processed Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49* (10), 4884 - 4888.

[43] Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J., Guittet, E. & Rolando, C. (1985). Ether Linkage between Phenolic Acids and Lignin Fractions from Wheat Straw. *Phytochemistry, 24*, 1359 - 1362.

[44] McMurrough, I., Madigan, D., Donnellyk, D., Hurley, J., Doyle, A., Hennigan, G. & McNulty, N. (1996). Control of Ferulic Acid and 4-Vinyl Guaiacol in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing, 102* (5), 327 - 332.

[45] Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F. & Delvaux, F. R. (2007). Variability in the Release of Free and Bound Hydroxycinnamic Acids from Diverse Malted Barley (Hordeum vulgare L.) Cultivars during Wort Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55* (26), 11002 - 11010.

[46] Fiddler, W., Parker, W., Wasserman, A. & Doerr, R. (1967). Thermal decomposition of Ferulic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 15* (5), 757 - 761.

[47] Fukumoto, L. R. & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48* (8), 3597 - 3604.

[48] Castelluccio, C., Paganga, G., Melikian, N., Bolwell, G., Pridham, J., Sampson, J. & Rice-Evans, C. (1995). Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters, 368*, 188 - 192.

[49] Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M. & Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47* (4), 1453 - 1459.

[50] Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A. & Butterfield, D. A. (2002). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxyl radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure–activity studies. *Journal of Nutritional Biochemistry, 13*, 273 - 281.

[51] Yeomans, V. (2002). *Einfluss von Antioxidantien auf die Oxidation von Low Density Lipoproteinen (LDL).* .

[52] Bourne, L. & Rice-Evans, C. (1997). The effect of the phenolic antioxidant ferulic acid on the oxidation of low density lipoprotein depends on the pro-oxidant used. *Free Radical Research, 27* (3), 337 - 344.

[53] Trabelsi, S. K., Tahar, N. B., Trabelsi, B. & Abdelhedi, R. (2005). Electrochemical oxidation of ferulic acid in aqueous solutions at gold oxide and lead dioxide electrodes. *Journal of Applied Electrochemistry, 35*, 967 - 973.

[54] Hashimoto, N. & Kuroiwa, Y. (1975). Proposed Pathways for the Formation of Volatile Aldehydes during Storage of Bottled Beer. *ASBC Proceedings, 33* (3), 104 - 111.

[55] Damm, E. & Kringstad, H. (1964). Volatile carbonyl compounds in barley and malts. *Journal of the Institute of Brewing, 70* (1), 38 - 42.

[56] Fickert, B. & Schieberle, P. (1998). Identification of the key odorants in barley malt (caramalt) using GC/MS techniques and odour dilution analyses. *Nahrung, 42* (6), 371 - 375.

[57] Farley, D. R. & Nursten, H. E. (1980). Volatile Flavour Components of Malt Extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 31*, 386 - 396.

[58] Preuß, T. (2001). *Technologische Maßnahmen zur Erzielung malzaromatischer dunkler Biere hoher Geschmacksstabilität nach Charakterisierung der Schlüsselaromastoffe in ausgewählten dunklen Bieren.*

[59] Coghe, S., Martens, E., D'Hollander, H., Dirinck, P. & Delvaux, F. R. (2004). Sensory and Instrumental Flavour Analysis of Wort Brewed with Dark Specialty Malts. *Journal of the Institute of Brewing, 110* (2), 94 - 103.

[60] Lermusieau, G., Noël, S., Liégeois, C. & Collin, S. (1999). Nonoxidative Mechanism for Development of trans-2-Nonenal in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 57* (1), 29 - 33.

[61] Coghe, S., Vanderhaegen, B., Pelgrims, B., Basteyns, V. & Delvaux, F. R. (2003). Characterization of dark specialty malts: new insights in colour evaluation and pro- antioxidative activity. *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 61* (3), 125 - 132.

[62] Cortés, N., Kunz, T., Furukawa Suárez, A., Hughes, P. & Methner, F. (2010). Development and Correlation Between the Organic Radical Concentration in Different Malt Types and Oxidative Beer Stability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 68* (2), 107 - 113.

[63] Kikuzaki, M. K. & Nakatani, N. (2002). Antioxidant activity of chemical components from Sage (Salvia officinalis L.) and Thyme (Thymus vulgaris L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 1845 - 1851.

[64] Navas, M. J. & Jimenez, A. M. (1999). Chemiluminescent Methods in Alcoholic Beverage Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47* (1), 183 - 189.

[65] Kaneda, H., Kobayashi, N., Tsuchiya, Y., Munekata, M. & Koshino, S. (1994a). Some applications of chemiluminescence analysis to brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem., 52* (4), 163 - 168.

[66] Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S. & Koshino, S. (1991b). Role of active oxygens on deterioration of beer flavor. *Eur. Brew. Conv. Proc. 23rd Cong.*, 433 - 440.

[67] García Sánchez, F., Navas Díaz, A. & González García, J. A. (1995). Study of the enhanced chemiluminescence from the luminol-horseradish peroxidase-hydrogen peroxide-p-coumaric acid system at very short times: stopped flow selective determination of p-coumaric acid in beers. *Anal. Chim. Acta, 310*, 399 - 406.

[68] Kobayashi, N., Kaneda, H., Kano, Y. & Koshino, S. (1993a). Determination of fatty acid hydroperoxides produced during the production of wort. *J. Inst. Brew., 99*, 143 - 146.

[69] Puppo, Alain ; Halliwell, Barry. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. 249 (1988) S. 185 - 190

[70] Aruoma, Okezie I. ; Halliwell, Barry. Superoxide-dependent and ascorbat-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *In: Biochem J.* 241 (1987) S. 273 - 278

[71] Sugimoto, H. & Sawyer, D. T. (1984). Iron(II)-Induced Activation of Hydrogen Peroxide to Ferryl Ion (FeO^{2+}) and Singlet Oxygen ($_1O^2$) in Acetonitrile: Monoxygenations, Dehydrogenations, and Dioxygenations of Organic Substrates. *Journal of the American Chemical Society, 106*, 4283 - 4285.

[72] Kunz, T., Stephan, A., Methner, F., Kappl, R. & Hüttermann, J. (2002). Grundlegendes zur Elektronenspinresonanz (ESR) und Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen oxidativer Bierstabilität und dem SO2-Gehalt. *Monatsschrift für Brauwissenschaft, 55*, 140 - 153.

[73] Ashoor, S. H. & Zent, B. J. (1984). Maillard Browning of Common Amino Acids and Sugars. *Journal of Food Science, 49*, 1206 - 1207.

[74] Ajandouz, E. H. & Puigserver, A. (1999). Nonenzymatic Browning Reaction of Essential Amino Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*, 1786 - 1793.

[75] Lamberts, L., Pombouts, I. & Delcour, J. A. (2008). Study of nonenzymatic browning in α-amino acid and γ-aminobutyric acid/sugar model systems. *Food Chemistry, 111*, 738 - 744.

[76] Laroque, D., Inisan, C., Berger, C., Vouland, E., Dufosse, L. & Guerard, F. (2008). Kinetic study on the Maillard Reaction: Consideration of sugar reactivity. *Food Chemistry, 111*, 1032 - 1042.

[77] Hollnagel, A. & Kroh, L. W. (2000). Degradation of Oligosaccharides in Nonenzymatic Browning by Formation of a-Dicarbonyl Compounds via a"Peeling Off" Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48* (12), 6219 - 6226.

[78] Thornalley, P. J., Langborg, A. & Minhas, H. S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J., 344* (1), 109 - 116.

[79] Glomb, M. A. & Tschirnich, R. (2001). Detection of alpha-Dicarbonyl Compounds in Maillard Reaction Systems and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49* (11), 5543 - 5550.

[80] Bravo, A., Herrera, J. C., Scherer, E., Ju-Nam, Y., Rübsam, H., Madrid, J., Zufall, C. & Rangel-Aldao, R. (2008). Formation of alpha-Dicarbonyl Compounds in Beer during Storage of Pilsner. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56* (11), 4134 - 4144.

[81] Lo Coco, F., Valentini, C., Novelli, V. & Ceccon, L. (1995). Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. *Analytica Chimica Acta, 306* (1), 57 - 64.

[82] Lawrence, J. & Iyengar, J. (1983). The determination of formaldehyde in beer and soft drinks by HPLC of the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative. *International journal of environmental analytical chemistry, 15* (1), 47 - 52.

[83] Zhou, X., Huang, G., Civerolo, K. & Schwab, J. (2009). Measurement of Atmospheric Hydroxyacetone, Glycolaldehyde, and Formaldehyde. *Environmental Science und Technology, 43* (8), 2753 - 2759.

[84] Dong, J. & Moldoveanu, S. C. (2004). Gas chromatography-mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography, A, 1027* (1-2), 25 - 35.

[85] Pawliszyn, J. (1997). *Solid phase microextraction: theory and practise.* New York: Wiley-VCH.

[86] Cordis, G. R., Das, D. K. & Riedel, W. (1998). High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazin derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. *Journal of Chromatography A, 798*, 117 - 123.

[87] Stafiej, A., Pyrzynska, K., Ranz, A. & Lankmayr, E. (2006). Screening and optimization of derivatization in heating block for the determination of aliphatic aldehydes by HPLC. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 69*, 15 - 24.

[88] Takeda, K., Katoh, S., Nakatani, N. & Sakugawa, H. (2006). Rapid and highly sensitive determination of low-molecular-weight carbonyl compounds in drinking water and natural water by preconcentration HPLC with 2,4-Dinitrophenylhydrazine. *Analytical Science, 22*, 1509 - 1514.

[89] Martos, P. & Pawliszyn, J. (1998). Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Analytical Chemistry, 70*, 2311 - 2320.

[90] Ojala, M., Kotiaho, T., Siirila, J. & Sihvonen, M. (1994). Analysis of aldehydes and ketones from beer as o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine derivatives. *Talanta, 41*, 1297 - 1309.

[91] Stashenko, E. E., Puertas, M. A., Salgar, W., Delgado, W. & Martínez, J. R. (2000). Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *Journal of Chromatography A, 886*, 175 - 181.

[92] Schmarr, H., Sang, W., Ganß, S., Fischer, U., Köpp, B., Schulz, C. & Potouridis, T. (2008). Analysis of aldehydes via HS-SPME with on fiber derivization to their o-PFB-oxime derivatives and comprehensive 2D-GC-MS. *Journal of Separation Science, 31*, 3458 - 3465.

[93] Vesely, P., Lusk, L., Basarova, G., Seabrooks, J. & Ryder, D. (2003). Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*, 6941 - 6944.

[94] Chapon, L., Louis, C. & Chapon, S. (1949). Estimation du pouvoir réducteur des bières par le complexe fer-dipyridyle. *Brewery Convention (*pp. 307 - 322). Amsterdam.
[95] Uchida, M., Suga, S. & Ono, M. (1996). Improvement for Oxidative Flavour Stability of Beer - Rapid Prediction Method for Beer Stability by Electron Spin Resonance Spectroskopy. *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 54*, 205 - 211.
[96] Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S. & Kamada, K. (1989). The role of free radicals in beer oxidation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 47*, 49 - 53.
[97] Methner, F. & Kunz, T. (2006). A new "EAP-determination" method for beer and other beverages using ESR spetroscopy. *Brauwelt International, 24*, 210 - 211.
[98] Pou, S., Ramos, C. L., Gladwell, T., Renks, E., Centra, M., Young, D., Cohen, M. S. & Rosen, G. M. (1994). A Kinetic Approach to the Selection of a Sensitive Spin Trapping System for the Detection of Hydroxyl Radical. *Analytical Biochemistry, 217* (1), 76 - 83.
[99] Roussev, M. (2003). *Nichtenzymatische Bräungsreaktionen von D-Glucose und D-Fructose - Bildung und Nachweis von a-Dicarbonylverbindungen in Modellsystemen und Lebensmitteln.* .
[100] Fiedler, T. (2006). *Beitrag zur Chemie von a-Dicarbonylverbindungen in der MAILLARD-REAKTION von Saccharose unter der Bildung von Melanoidinen.* .
[101] Narziß, L. (2004). *Abriss der Bierbrauerei.* Weinheim: Wiley-VCH.
[102] Ledl, F. & Schleicher, E. (1990). Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper - neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angewandte Chemie, 102*, 597 - 626.
[103] Lawrence J. F.; Iyengar, & Iyengar, J. R. (1983). The determination of formaldehyde in beer and soft drinks by HPLC of the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 15* (1), 47 - 52.
[104] Geiger, E. & Piendl, A. (1976). Technological Factors in the formation of acetaldehyde during fermentation. *Master Brewers Association of The Americas: Technical quarterly, 13*, 51 - 63.
[105] Yaylayan, V. A. & Keyhani, A. (2001). Carbohydrate and amino acid degradation pathways in L-methionine/D-[13C]glucose model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49* (2), 800 - 803.
[106] Kaneda, H., Osawa, T., Kawakishi, S., Munekata, M. & Koshino, S. (1994). Contribution of carbonyl-bisulfite adducts to beer stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42* (11), 228 - 2432.
[107] Hodge, J. E. (1967). Origin of Flavor in Foods. Nonenzymatic Browning Reactions. *Chemistry and Physiology of Flavors*, 465 - 491.
[108] Martins, S. I. F. S. & van Boekel, M. A. J. S. (2003). Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-d-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. Part I—Reaction mechanism. *Carbohydrate Research, 338* (16), 1651 - 1663.
[109] Yaylayan, V. A. & Wnorowski, A. (2001). *274 Food Flavors and Chemistry.* Royal Society of Chemistry.
[110] Peterson, D. G. & Noda, Y. (2007). *Role of phenolic reactions on Maillard reaction flavors.*
[111] Wang, Y. (2000). *Effects of naturally occurring phenolic compounds on the formation of Maillard aroma.*
[112] Samaras, T., Camburn, P., Chandra, S., Gordon, M. & Ames, J. (2005a). Antioxidant Properties of Kilned and Roasted Malts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53* (12), 8068 - 8074.
[113] Yaylayan, V. A. & Wnorowski, A. (2001). *274 Food Flavors and Chemistry.* Royal Society of Chemistry.

Veröffentlichungen

Posterbeiträge:

Bamberg, T.; Strähmel, A. und Kroh, L.W.
„Einfluss von Ferulasäure auf das Dicarbonyl- und Aldehydspektrum von Maisch Modellen“
39. Deutscher Lebensmittelchemikertag Stuttgart-Hohenheim, 20.-22. Sep. 2010, Tagungsband

Fessel, A.; Strähmel, A. und Kroh, L.W.
„Modellreaktionen zur Bildung von α-Dicarbonylverbindungen in Bier“
39. Deutscher Lebensmittelchemikertag Stuttgart-Hohenheim, 20.-22. Sep. 2010, Tagungsband

Burchhardt, C.; Strähmel, A. und Kroh, L.W.
„Selektive Bestimmung aromaaktiver Aldehyde mit der HS-SPME-GC/MS“
39. Deutscher Lebensmittelchemikertag Stuttgart-Hohenheim, 20.-22. Sep. 2010, Tagungsband

Hildebrand, A.; Strähmel, A. und Kroh, L.W.
„Chapon Assay–Bestimmung antioxidativer Aktivitäten“
39. Deutscher Lebensmittelchemikertag Stuttgart-Hohenheim, 20.-22. Sep. 2010, Tagungsband

Schibilsky, S.; Strähmel, A. und Kroh, L.W.
„Bestimmung von Ferulasäure in frischen und gelagerten Bieren“
39. Deutscher Lebensmittelchemikertag Stuttgart-Hohenheim, 20.-22. Sep. 2010, Tagungsband

Schwarz, K.; Strähmel, A. und Kroh, L.W.
„Bestimmung von Kohlenhydraten mittels GC/MS“
39. Deutscher Lebensmittelchemikertag Stuttgart-Hohenheim, 20.-22. Sep. 2010, Tagungsband

Vorträge:

Strähmel, A. und Kroh, L.W. (2008). α-Dicarbonylverbindungen als Präkursoren der Bildung von Strecker-Aldehyden. *Regionalverbandstagung Nord/Nord-Ost*, Braunschweig, 02. April 2008

Strähmel, A. und Kroh, L.W. (2010). Präkursoren ausgewählter Aromastoffe in Bier. *LChG Jahrestagung Regionalverbände Nord/Nord-Ost,* Hamburg, 26. März 2010

Strähmel, A. und Kroh, L.W. (2011). Einfluss von Reductonen auf die oxidative Stabilität von Bier. *40. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2011,* Halle, 12.–14. September 2011

Publikationen:

Kunz, T.; Strähmel, A.; Cortés, N.; Kroh, L.W. & Methner, F.-J. (2013). Influence of Intermediate Maillard Reaction Products with Enediol Structure on the Oxidative Stability of Beverages. *ASBC Journal, 71* (3), 114–123

Kunz, T.; Strähmel, A.; Cortés, N.; Hense, W.; Kroh, L.W. & Methner, F.-J. (2010). Pro- and antioxidative effects of the Maillard reaction products in malt on the oxidative beer stability. *73rd ASBC Annual Meeting Brewing Summit*, 65

Pressemitteilungen

Strähmel, A.; Kroh, L.W.; Hartwig, A.; Rohn, S. & Mörsel, T. (2007). Warum schmeckt uns der Schoko-Weihnachtsmann? Lebensmittelchemiker der TU Berlin erforschen Schokoladengenuss. *TU Berlin-newsportal*, 17.12.2007

Strähmel, A.; Kroh, L:W: (2008). Weihnachtsmänner–Richtige Kerle! *ÖKO-TEST Ausgabe 12/2008*, 21.11.2008

Strähmel, A.; Kroh, L.W. (2009). „Von der bitteren Bohne zur süßen Versuchung–Schokolade wissenschaftlich betrachtet". *SWR2 Wissen*, 09.12.2009

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzen Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben worden sind. Weiter erkläre ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Berlin,

Arno Strähmel