

**Aufklärung molekularer Mechanismen beim Abbau von
Dextrinen und Hopfenbittersäuren im Zuge der
Bieralterung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Diplom-Lebensmittelchemiker Stefan Rakete
geboren am 05.04.1985 in Schkeuditz

Gutachter: 1. Prof. Dr. Marcus A. Glomb
2. Prof. Dr. Mirko Bunzel

Halle (Saale), 24.10.2014

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Marcus A. Glomb bedanken, der mir Möglichkeit gegeben hat, dieses sehr interessante Thema zu bearbeiten. Das entgegenbrachte Vertrauen und die fachliche Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, weiß ich überaus zu schätzen.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die angenehme Atmosphäre und die fachliche Hilfe während der letzten vier Jahre. Mein besonderer Dank gilt Robert Spanneberg, Thomas Heymann und Robert Berger für die Unterstützung, die schöne Zeit inner- und außerhalb des Labors und die stets offenen Ohren für fachliche Fragen.

Meinen Diplomanden Kay, Steffi, Robert und Alex, die durch ihren Einsatz einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben, bin ich ebenfalls zu Dank verpflichtet.

Für das ehrlich entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit, welches ich immer als sehr motivierend wahrgenommen habe, danke ich meiner gesamten Familie und meinen Freunden. Zum Schluss möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich in meinen Entscheidungen unterstützt und mir alle Freiheiten gegeben haben, meine Ziele zu verwirklichen.

Vorwort

Diese Arbeit entstand im Arbeitskreis für Lebensmittelchemie von Prof. Dr. Marcus A. Glomb am Institut für Chemie im Zeitraum von Juli 2010 bis Juni 2014 im Rahmen einer Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter. Die vorliegende Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt. Die Forschungsergebnisse wurden in einer international anerkannten Fachzeitschrift publiziert und sind als Publikation in die Dissertation eingefügt. Dort sind alle experimentellen Daten, die Ergebnisse und deren Diskussion nachzulesen. Das Augenmerk dieser Dissertation liegt in der Einordnung der Forschungsergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
2. Stand der Forschung	3
2.1. Sensorische Wahrnehmung von Bier.....	3
2.2. Allgemeine Veränderungen während der Alterung von Bier	5
2.3. Die Verwendung von Malz und Hopfen für die Herstellung von Bier.....	6
2.3.1. <i>Die Verwendung des Malzes.....</i>	6
2.3.2. <i>Die Verwendung des Hopfens.....</i>	14
3. Zielstellung	26
4. Zusammenfassung und Einordnung der Forschungsergebnisse	27
4.1. Entwicklung einer leistungsfähigen Methode zur Bestimmung von	
Dextrinen in Maische, Würze und Bier	27
4.2. Bedeutung des Maillard-induzierten Abbaus von Dextrinen auf die.....	
Alterung von Bier	30
4.3. Mechanistische Untersuchungen zur Bildung von kurzkettigen	
Carbonsäuren und Carbonsäureamiden aus Isohumulonen.....	35
5. Zusammenfassung der Dissertation	40
6. Summary	43
7. Literaturverzeichnis.....	46
8. Abbildungsverzeichnis	61
9. Tabellenverzeichnis.....	63
10. Anhang	64
Lebenslauf.....	V
Publikationsliste	VI
Eigenständigkeitserklärung	VII

Abkürzungsverzeichnis

1-NA	1-Naphthylamin
3-DG	3-Desoxyglucoson
3-DP	3-Desoxypentoson
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CMP	<i>N</i> -Carboxymethylprolin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	degree of polymerization
FLD	Fluoreszenzdetektion
FP	<i>N</i> -Formylprolin
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPAEC	high performance anion exchange chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
Jhd.	Jahrhundert
LC	liquid chromatography
MBA	3-Methylbuttersäure
MBT	3-Methylbut-2-en-1-thiol
MPA	4-Methyl-3-pentensäure
MS	mass spectrometry
n.Chr.	nach Christus
RP	reversed phase
UV/VIS	ultravioletes / sichtbares Licht
v.Chr.	vor Christus
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Bier ist eines der ältesten vom Menschen konsumierten Getränke. Schon 10.000 v.Chr. war den jungsteinzeitlichen Bewohnern Mesopotamiens ein bierähnliches Getränk bekannt.¹ Es entstand durch die spontane Vergärung eines Getreidebreis, der im Zuge der Brotherstellung anfiel. Über die Jahrtausende entwickelte sich Bier vom Grundnahrungsmittel zum beliebten Genussmittel unserer Zeit. In Deutschland stellt es mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 106,6 L (2013) das am häufigsten konsumierte alkoholische Getränk dar (vgl. Wein (2012): 20 L/Kopf).²

Das deutsche Reinheitsgebot von 1516 sieht lediglich drei Zutaten zur Herstellung von Bier vor: Wasser, Hopfen und Malz. Dennoch lassen sich mit diesen Rohstoffen eine große Zahl verschiedener Biere herstellen, die sich sowohl in ihrer sensorischen Wahrnehmung als auch in der chemischen Zusammensetzung unterscheiden. Diese Diversität liegt in der Beschaffenheit der oben genannten Rohstoffe begründet. Je nach Herkunft und Verarbeitung im Brauprozess ist das Aroma unterschiedlich ausgeprägt.

Zu Beginn der Bierproduktion steht das Malz. Im Allgemeinen wird dazu das Korn der Gerste verwendet. Andere Getreidesorten, z.B. Weizen oder Hirse, finden je nach Biertypus ebenfalls Verwendung. Durch die Keimung der Getreidekörner werden wichtige Enzyme aktiviert. Dieses sogenannte Grünmalz wird in einem weiteren Schritt durch Darren haltbar gemacht, es entsteht das Darrmalz. Je nach Intensität des Darrprozesses entstehen bereits wichtige Aroma- und Farbstoffe. Für die Herstellung der Würze wird das Darrmalz geschrotet und mit dem Brauwasser vermischt. Es kommt zur Verzuckerung der Stärke. Durch die Abtrennung der unlöslichen Getreidebestandteile wie z.B. der Spelzen, die sogenannte Läuterung, wird die Würze erhalten.

Zur Würze wird in einem Kochprozess der Hopfen in Form von Dolden, Pellets oder als Extrakt hinzugegeben. Die Zusammensetzung des Hopfens ist von fundamentaler Bedeutung für das Aroma des Bieres. Neben einer Vielzahl von Aromastoffen enthält Hopfen die Humulone, die während der Würzekochung in die Isohumulone umgewandelt werden und die gewünschte Bitterkeit des Bieres hervorrufen. Gleichzeitig kommt es während der Würzekochung zur Fällung von Proteinen und Polyphenolen, die als Trub entfernt werden.

Nach dem Abkühlen der Würze erfolgt die Vergärung der Kohlenhydrate durch den Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae*. Neben der Bildung von Alkohol findet während der Gärung die Bildung und Umwandlung von Aromastoffen statt. Nach dem Abschluss der Gärung wird

das Bier durch Filtration stabilisiert und unter CO₂-Atmosphäre zumeist in lichtstabile Braun- oder Grünflaschen abgefüllt.

Das einzigartige Aroma von Bier ist die Folge eines Zusammenspiels unzähliger chemischer Verbindungen diversen Ursprungs. Hier ist nicht nur die Zusammensetzung der verwendeten Rohstoffe von Bedeutung, sondern insbesondere deren Umwandlung in aromaaktive Verbindungen während der Herstellung und Lagerung. Obwohl Bier schon seit Jahrtausenden bekannt ist, begann die intensive wissenschaftliche Untersuchung alterungsabhängiger Veränderungen im Bier erst in den 60er-Jahren des 20. Jhd.³ Aufgrund der Inhaltsstoffe ist die Veränderung des Bieraromas durch eine Fülle von Reaktionen gekennzeichnet.⁴ Dabei zeigte sich, dass vor allem Sauerstoff, hohe Temperaturen und der Einfluss von Licht entscheidend an den aromaverändernden Prozessen während der Alterung beteiligt sind. Dank dieser Erkenntnisse und durch den technologischen Fortschritt konnte die Haltbarkeit von Bier in den letzten Jahrzehnten erheblich gesteigert werden.⁴

Durch die zunehmende Globalisierung des Biermarktes und den damit einhergehenden Transport- und Lagerzeiten ist dennoch ein fundamentales Verständnis der chemischen Abläufe und molekularen Mechanismen in abgefülltem Bier notwendig. Ein umfassendes Verständnis der Bieralterung hilft den Brauereien, die vom Verbraucher erwartete konstante Qualität des Bieres zu gewährleisten.

2. Stand der Forschung

In den folgenden Kapiteln soll der aktuelle Stand der Forschung in Bezug auf die molekularen Mechanismen während der Herstellung und Alterung von Bier dargestellt werden. Aufgrund der großen wirtschaftlichen Bedeutung beziehen sich die folgenden Kapitel, sofern nicht anders vermerkt, auf Bier Pilsener Art.

2.1. Sensorische Wahrnehmung von Bier

Das Aroma von Bier ist die Folge einer komplexen Mischung von unterschiedlichen chemischen Verbindungen. Meilgaard et al. erarbeiteten eine einheitliche Terminologie zur sensorischen Beschreibung von Bier (Abbildung 1).⁵ Es wurden dabei Begriffe für Geschmack („taste“) und Geruch bzw. Aroma („flavour“ bzw. „odour“) verwendet, welche sich zum Teil überschneiden. Generell lassen sich Aroma- und Geschmacksstoffe in flüchtige und nicht flüchtige Verbindungen unterteilen. Der Geruch von Pilsener Bier lässt sich sehr gut mit fruchtigen, blumigen sowie malzigen Noten beschreiben, wohingegen beim Geschmack ein bitterer bis leicht süßer Eindruck dominant ist.

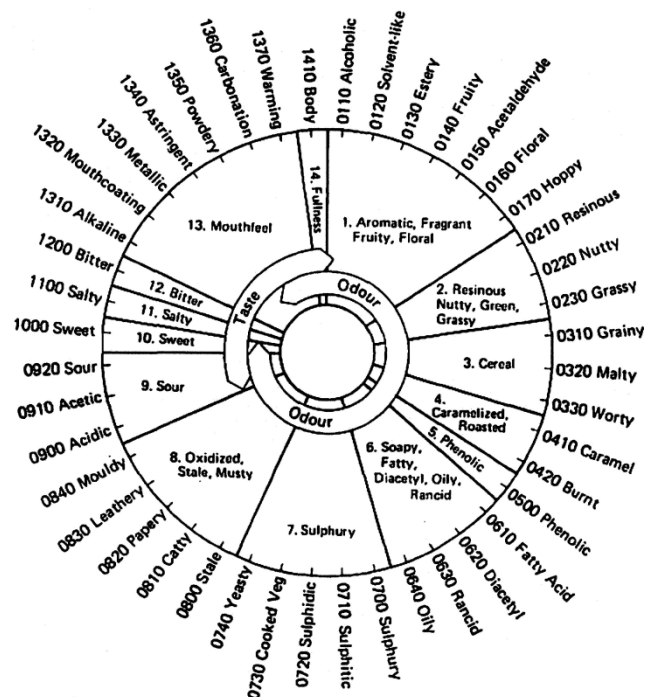


Abbildung 1: Möglichkeiten zur Beschreibung des Bieraromas (übernommen von Meilgaard et al.).⁴

Ob ein bestimmtes Aroma vom Verbraucher als angenehm empfunden wird, ist die Folge subjektiver Erfahrungen. So ist die Veränderung des Aromas während der Alterung von Bier keineswegs automatisch einer Verschlechterung oder einem Verderb gleichzusetzen. So konnten Stephenson und Bamforth zeigen, dass bei einer fehlenden Erwartungshaltung keine

signifikante Bevorzugung von frischem Bier erfolgte.⁶ Jedoch kann eine enttäuschte Erwartungshaltung durch ein vom frischen Produkt abweichendes Aroma eine negative Beurteilung des Verbrauchers nach sich ziehen. Daher sind Brauereien darauf bedacht, ein stets gleichbleibendes Produkt zu erzeugen, dass sich während der Lagerung möglichst nicht verändert.

Allein die Fraktion der flüchtigen Substanzen umfasst mehr als 600 verschiedene Verbindungen.⁷ Jedoch konnten Fritsch et al. in ihren Untersuchungen zeigen, dass das charakteristische Aroma von Pilsener Bier schon allein durch die 23 aktivsten Verbindungen reproduziert werden kann.⁸ Die Gruppe der im Bier vorhandenen Aromastoffe ist äußerst heterogen und umfasst unter anderem Carbonylverbindungen, heterocyclische Verbindungen, Monoterpenalkohole und Schwefelverbindungen. Ob eine Verbindung zum Aroma beiträgt, hängt zum einen davon ab, ob dessen Konzentration im Bier den Geruchsschwellenwert überschreitet. Zum anderen können Substanzen, die unterhalb ihres Geruchsschwellenwertes vorliegen, durch synergistische Effekte ebenfalls zum Aroma beitragen.⁹ Durch die Komplexität ist der Geruch des Bieres nicht alleine auf diskrete Strukturen zurückzuführen, sondern auf das Zusammenspiel aller aromaaktiven Verbindungen. Schon geringe Änderungen können deutliche Veränderungen des Aromas hervorrufen. Ein Beispiel sind die synergistischen Effekte, die bei Mischungen von Monoterpenalkoholen zu beobachten sind. Linalool, der bedeutendste Monoterpenalkohol in Bier und Leitstruktur für ein hopfiges Aroma, wird mit blumigen und fruchtigen Noten verbunden.¹⁰ Zugaben von geringen Mengen Geraniol bzw. Citronellol zu Linalool-reichem Bier führten zu einer deutlichen Verschiebung des Aromaprofils in Richtung eines zitrusartigen bzw. „grünen“ Eindrucks.¹¹

Der Geschmack von Bier umfasst weit weniger Nuancen als der Geruch und ist in weitaus geringerem Umfang erforscht. Die sogenannte Vollmundigkeit wird durch Kohlenhydrate, insbesondere durch Dextrine, den Alkoholgehalt und kolloide Teilchen, z.B. Proteine und Gerbstoffe, hervorgerufen.¹² Die Rezenz (Spritzigkeit) wird durch den pH-Wert und den CO₂-Gehalt beeinflusst.¹² Bei gehopften Bieren tritt ein starker Bittergeschmack in den Vordergrund. Die verantwortlichen Bitterrezeptoren konnten identifiziert werden und sprechen auf eine Vielzahl in Hopfen vorhandener Strukturen an.¹³ Die Anwesenheit von phenolischen Strukturen hat eine adstringierende Wirkung, die den Bittergeschmack der Hopfenbittersäuren überdecken kann.¹²

2.2. Allgemeine Veränderungen während der Alterung von Bier

Thermodynamisch betrachtet stellt abgefülltes Bier ein geschlossenes System dar, in dem zwar ein Energieaustausch, jedoch kein Stoffaustausch stattfinden kann. Dalglish hat ein Schema zu den Aromaveränderungen erstellt, ohne Anspruch auf eine allgemeine Gültigkeit zu erheben, da sehr viele Faktoren bei der Alterung von Bier ins Gewicht fallen (Abbildung 2).¹⁴ Das darauf aufbauende Schema von Zufall et al. unterscheidet sich davon nur in Details.¹⁵

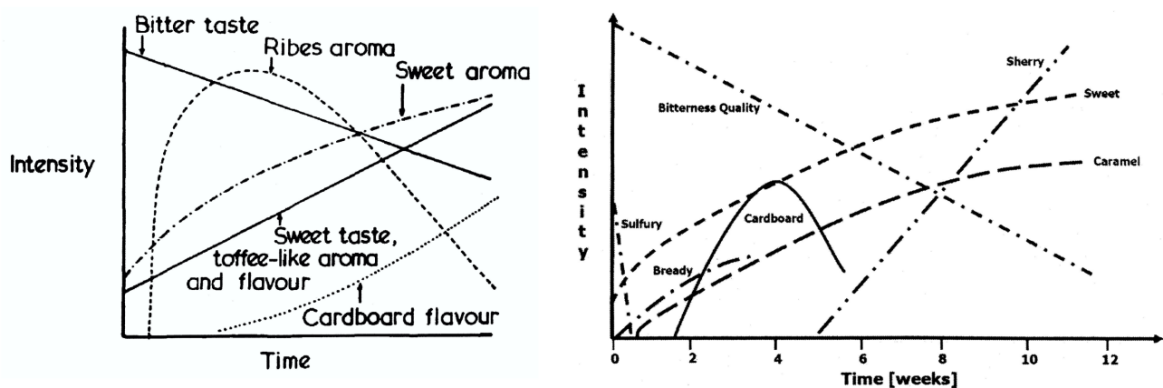


Abbildung 2: Beschreibung der Aromaveränderungen während der Alterung von Bier 1977 (links) und 2005 (rechts) in Abhängigkeit der Lagerungszeit (übernommen von Dalglish bzw. Zufall et al.).^{14,15}

Beiden gemein ist die Abnahme der Bitterkeit, bzw. der Bitterqualität, was auf den Abbau der Bittersäuren zurückzuführen ist.¹⁶ Der sogenannte „Cardboard“-Geruch wird mit der Bildung von (*E*)-2-Nonenal assoziiert, welches wahrscheinlich aus dem oxidativen Abbau von Fettsäuren entsteht.¹⁷ Der unangenehme, katzenurinartige „ribes“-Geruch wird mit der Bildung von 4-Mercapto-4-methyl-2-pentanon verbunden, wobei sich später herausstellte, dass die Ursache eine Kontamination der Gerste mit Mesityloxid, einem Bestandteil von Anstrichfarbe, war und der „ribes“-Geruch heute keine große Rolle mehr spielt.¹⁸ Dennoch tragen eine Reihe schwefelhaltiger Verbindungen zur Veränderung des Aromas während der Alterung bei.¹⁹ Süße, malzige und karamellartige oder auch sherryartige Aromen nehmen während der Alterung durch Prozesse im Sinne der Maillard-Reaktion zu (siehe Abschnitt: „Die Bedeutung der Maillard-Reaktion für das Bier“). Alterungsabhängige Trübungen des Bieres sind auf phenolische Strukturen und Proteine zurückzuführen.^{20,21} In diesem Zusammenhang werden außerdem β -Glucane und anorganische Materialien als Ursache für Trübungen diskutiert.^{22,23}

Alles in allem wird die Alterung von Bier durch viele Faktoren beeinflusst. Hohe Temperaturen und der Einfluss von Sauerstoff zählen zu den wichtigsten Ursachen für die Entwick-

lung von Fehlparomen.²⁴ Weiterhin führen Licht, die Rohstoffqualität oder Fehler im Brauprozess zu unerwünschten Veränderungen im Bier. Die Brauindustrie wirkt dem entgegen, in dem Bier unter nahezu vollständigem Sauerstoffausschluss abgefüllt wird und die Lagerung möglichst kühl, dunkel und in Braun- oder Grünglasflaschen erfolgt. Bier kann zusätzlich durch die Verwendung von technologischen Zusätzen wie Filtrationshilfsmitteln oder stabilisierender Zutaten, z.B. Ascorbinsäure oder Komplexbildner, haltbarer gemacht werden.^{4,25}

2.3. Die Verwendung von Malz und Hopfen für die Herstellung von Bier

Im Folgenden sollen zwei bedeutende Rohstoffe in Bezug auf ihre Bedeutung im Bier näher betrachtet werden, da sie den Forschungsschwerpunkt der vorliegenden Dissertation darstellen. Das Malz, oder im weitesten Sinne die Kohlenhydrate, und die Hopfeninhaltsstoffe. Dabei stehen neben den Prozessen während der Herstellung von Bier vor allem die chemischen Veränderungen während der Alterung im Mittelpunkt.

2.3.1. Die Verwendung des Malzes

Nach der Ernte der Gerste werden die Körner getrocknet, um deren Haltbarkeit zu erhöhen. Vor der Verwendung zur Herstellung von Bier müssen die Körner keimen, um die Bildung gersteneigener Enzyme anzuregen. Dazu werden sie geweicht, um den Wassergehalt auf etwa 43-48 % zu erhöhen. Die Keimung erfolgt anschließend bei 16 bis 18 °C, nach erfolgter Bildung des Würzelchens bei 11-13 °C.¹² In dieser Zeit gelangen die Gibbereline, die den Phytohormonen zuzuordnen sind, aus dem Embryo in die Aleuronschicht und bewirken die Aktivierung verschiedener Enzyme.²⁶ Gibbereline können auch künstlich dem Keimprozess zugesetzt werden. Dies ist in Deutschland jedoch verboten.²⁷

Die Zellwände, die das Endosperm umgeben, bestehen zu ca. 75 % aus β -Glucanen, 20 % Arabinoxylanen und 5 % Protein.²⁸ Diese werden während der Keimung durch β -Glucanasen und Arabinoxylanasen abgebaut, was sich durch die zunehmende Zerreiblichkeit des Mehlkörpers bemerkbar macht.¹² Dadurch kommt es zur Freisetzung der im Endosperm vorhandenen Reservestoffe, vor allem der Stärke. Zu den während der Keimung gebildeten stärkeabbauenden Enzymen gehören Amylasen und Grendextrinasen.¹² Während der Keimung beginnt auch der Abbau der Proteine, insbesondere der Hordeine, durch Proteasen zu Peptiden und freien Aminosäuren.²⁹ Durch die Spaltung von Disulfidbrücken können aus Hordein-Aggregaten lösliche Proteine (Albumine und Globuline) freigesetzt werden.³⁰ Die gekeimten Körner werden als Grünmalz bezeichnet.

Durch das Darren des Grünmalzes wird die Keimung gestoppt und die Lagerfähigkeit erhöht. Die Enzymaktivität bleibt dabei weitestgehend erhalten. Der enzymatische Abbau

der Zellwände und des Endosperms erhöht den Gehalt an niedermolekularen Kohlenhydraten und erliegt erst mit zunehmender Trocknung bzw. sinkender Wasseraktivität.³¹ In Modellexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der β -Glucanasen und α -Amylasen während des Darrens nahezu gleich bleibt und nur bei höheren Temperaturen und langen Erhitzungszeiten leicht abnimmt.³² Im Gegensatz dazu nimmt die Aktivität der Grenzdextrinasen und die diastatische Kraft, die die Fähigkeit Stärke zu verzuckern charakterisiert, anfangs leicht zu, um dann mit zunehmender Erhitzung stärker abzufallen.³²

Das Darren führt zur Ausbildung eines charakteristischen, als malzig beschriebenen Aromas. Fickert und Schieberle konnten die wichtigsten Aromastoffe in Gerstenmalz identifizieren.³³ Einige Beispiele sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Besonders flüchtige Verbindungen, z.B. Aldehyde, gehen während des Darrens z.T. wieder verloren.^{34,35} Viele dieser Verbindungen lassen sich auf die Maillard-Reaktion zurückführen, die im Kapitel „Die Bedeutung der Maillard-Reaktion für das Bier“ ausführlich beschrieben wird. Des Weiteren kommt es durch den Abbau von Carotenoiden, Polyphenolen und Lipiden zur Ausbildung wichtiger Aromastoffe.^{36–38} Der Einfluss des Darrens auf das Redoxpotential von Malz wird kontrovers diskutiert. Einerseits wird mit der Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten und der Freisetzung polyphenolischer Strukturen eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität verbunden.^{39–41} Dementgegen wird ein prooxidativer Einfluss von redoxaktiven Reduktionsstrukturen bei längeren Darrzeiten diskutiert, die aus ebenfalls aus der Maillard-Reaktion entstehen.^{42,43}

Tabelle 1: Zusammenfassung wichtiger Aromastoffe in Darrmalz.³³

Aromastoff	Geruchseindruck
3-Methylbutanal	malzig
1-Octen-3-on	pilzartig
Dimethyltrisulfid	schweflig
Methional	gekochte Kartoffeln
2-Methyl-3-(methylthio)furan	gekochtes Fleisch
(E,E)-2,4-Decadienal	fettig
β -Damascenon	fruchtig
Essigsäure	sauer
2- & 3-Methylbuttersäure	schweißartig
Maltol	karamellartig
Furaneol	karamellartig
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	würzig
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	würzig
Vanillin	vanilleartig

Neben der Bildung von Aromastoffen trägt das Darren zur Farbbildung bei. Höhere Temperaturen und längere Erhitzungszeiten führen zu dunklem Malz, wie es z.B. bei Schwarzbier

eingesetzt wird. Pilsener Malz ist meist sehr hell, da die Endtrocknung nur bei 82-85 °C erfolgt (vgl. dunkles Malz: 100-105 °C).²⁷ Die entstehenden Farbstoffe sind bis heute nicht im Einzelnen charakterisiert, da diese wiederum auf die Maillard-Reaktion zurückzuführen sind und das Produktspektrum äußerst heterogen ist. Für die Farbe von Malz werden höhermolekulare Melanoidine verantwortlich gemacht, die in hellem und, in deutlich größerem Umfang, in dunklem Malz entstehen.⁴⁴ Helles und dunkles Malz unterscheiden sich zudem in der Größenverteilung der Melanoidine. In hellem Malz wird die Farbe vor allem durch relativ niedermolekulare Verbindungen mit einem Molekulargewicht kleiner 10 kDa, in dunklem Malz durch hochmolekulare Strukturen mit mehr als 100 kDa verursacht.⁴⁵ Das gedarrte Grünmalz wird als Darmalz bezeichnet und wird vor der Verwendung zum Bierbrauen geschrotet.

Aus dem geschroteten Malz wird durch Zugabe von Wasser die Maische hergestellt. Das primäre Ziel des Maischenvorgangs ist die Verzuckerung der in der Gerste vorhandenen Stärke durch Amylasen und Grendextrinasen (Abbildung 3). Es sind mehrere Maischverfahren bekannt. Das Bekannteste ist das sogenannte Dreimaischverfahren.¹² Die α -Amylase führt zur Spaltung einer beliebigen α -1,4-verknüpften Glykosidbindung innerhalb des Stärkemoleküls, sodass es zur Bildung kleinerer Kohlenhydratketten (Dextrine) kommt. Die β -Amylasen spalten jeweils ein Maltosemolekül vom reduzierenden Ende der Stärke, sodass Maltose das dominierende Kohlenhydrat am Ende der Maische darstellt.⁴⁶

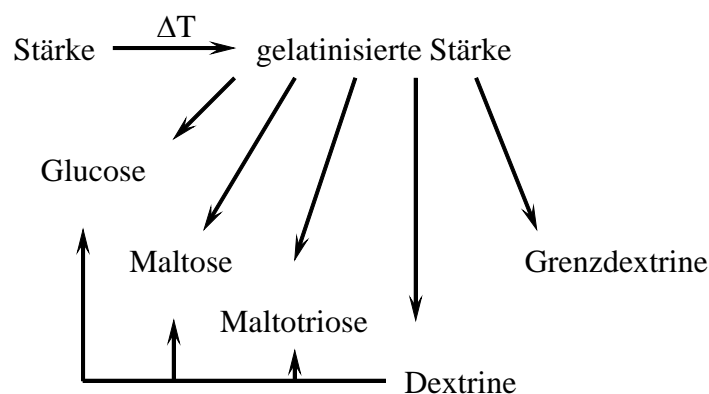


Abbildung 3: Bildung verschiedener Kohlenhydrate aus Stärke während des Maischens (modifiziert nach Brandam et al.).⁴⁷

Die Spezifität der β -Amylase für Dextrine, z.B. Maltotetraose, ist sehr gering, sodass diese sich allmählich in der Maische anreichern.¹² Die Grendextrinasen, die vor allem zu Beginn des Maischens aktiv sind, hydrolysieren die α -1,6-verknüpften Bindungen des Amylopektins.⁴⁸ Da die Grendextrinasen bei der vollen Aktivität der Amylasen nicht mehr aktiv sind, bilden Oligomere mit nicht hydrolysierten α -1,6-Verknüpfungen die sogenannten

Grenzdextrine. Andere Enzyme sind ebenfalls noch aktiv, so führen noch aktive β -Glucanasen zur Verbesserung der Ausbeute an vergärbaren Kohlenhydraten durch die Freisetzung von Stärke aus dem eingemaischtem Malz.⁴⁹

Neben dem Abbau der Kohlenhydrate verändert sich auch die Protein-Fraktion. Zum einen wird die Zunahme löslicher Proteine beschrieben⁵⁰ und zum anderen können die Hordeine Aggregate bilden, die während des Maischens ausfallen³⁰. Durch proteolytische Enzyme steigt der Gehalt freier Aminosäuren und sichert damit die Versorgung der Hefe mit diesen Nährstoffen während der Gärung.²⁹ Durch das Läutern der Maische, wobei Spelzen und andere unlösliche Bestandteile als Treber entfernt werden, wird die Würze erhalten. Das Kochen der Würze dient der vollständigen Desaktivierung der Enzyme, Intensivierung der Farbe, Bildung und Verlust von Aromastoffen sowie dem Einstellen auf einen definierten Stammwürzegehalt.¹² Ein Teil der löslichen Gerstenproteine koaguliert und wird zusammen mit den Proteinen und Gerbstoffen des Hopfens, der während des Würzekochens hinzugegeben wird, als Trub abgetrennt.⁵¹

Während der Gärung werden die vergärbaren Kohlenhydrate Glucose, Maltose und Maltotriose durch *Saccharomyces cerevisiae* zu Ethanol und Kohlendioxid abgebaut. Obwohl Glucose das bevorzugte Kohlenhydrat der Hefe ist, können Maltose und Maltotriose über Transportproteine in die Hefezelle gelangen und dort abgebaut werden.^{52,53} Dies ist für höhere Dextrine nicht möglich, sodass diese nahezu unverändert in das Bier übergehen und dort den wesentlichen Teil der Kohlenhydrate darstellen. Neben den Dextrinen befinden sich im Bier geringe Mengen verschiedener Pentosen, Hexosen und Abbauprodukte der β -Glucane und Arabinoxylane.^{54,55} Die nach der Würzekochung verbleibenden Proteine werden von den Hefen nicht abgebaut und gehen ebenfalls in das Bier über und beeinflussen die Bildung und Stabilität des Bierschaums.^{51,56} Der Gehalt an freien Aminosäuren im Bier ist sehr gering, da die Hefe diese zum Wachstum benötigt.²⁹ Eine Ausnahme stellt Prolin dar, da es nicht zur Transaminierung zur Verfügung steht und somit die mengenmäßig bedeutendste freie Aminosäure im Bier ist.⁵⁷

Während der Alterung von Bier entsteht eine Vielzahl an Strukturen, deren Ausgangsverbindungen aus dem Malz stammen (Tabelle 2).⁵⁸ Unter anderem ist die Bildung von Strecker-Aldehyden und heterocyclischen Verbindungen auf die Maillard-Reaktion zurückzuführen (vgl. Abschnitt „Die Bedeutung der Maillard-Reaktion für das Bier“). Weiterhin können durch die Oxidation von Lipiden des Malzes eine Reihe aromaaktiver Aldehyde entstehen.¹⁷ Unter diesen befindet sich das (*E*)-2-Nonenal, das für die Entstehung des

„cardboard“-Geruchs verantwortlich gemacht wird.⁵⁸ Die Bildung von (*E*)-2-Nonenal wird neben der Oxidation von Fettsäuren auf die Freisetzung aus bereits im Bier vorhandenen Vorstufen zurückgeführt. So wird die Isomerisierung von (*Z*)-3-Nonenal⁵⁹ und die Hydrolyse von (*E*)-2-Nonenal-Iminen⁶⁰ als Ursache für dessen Bildung diskutiert. Für β -Damascenon, einer weiteren wichtigen Alterungsverbindung im Bier, wird neben der Bildung aus Carotenoiden die Hydrolyse von glykosidisch gebundenem β -Damascenon vermutet.³⁶

Tabelle 2: Wichtige Aromastoffe, die bei der Alterung von Bier auf Malzinhaltstoffe zurückzuführen sind.⁵⁸

Lipidoxidation	Strecker-Abbau	weitere Maillard-Reaktionsprodukte	Carotenoid-Abbau
Hexanal	2-Methylpropanal	Hydroxymethylfurfural	β -Damascenon
(<i>E</i>)-2-Nonenal	2-Methylbutanal	Furfural	
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	3-Methylbutanal	Acetylfuran	
	Benzaldehyd	Furfurylethylether	
	Phenylacetaldehyd		
	Methional		

Die Bedeutung der Maillard-Reaktion für das Bier

Die Reaktionen von Kohlenhydraten in Lebensmitteln sind sehr gut untersucht. Vor allem in Gegenwart von Aminen, Aminosäuren oder Proteinen zeigen Kohlenhydrate ein spezielles Reaktionsverhalten, das von dem französischen Naturwissenschaftler Louis Camille Maillard Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals beobachtet wurde.⁶¹ Die ihm zu Ehren benannte Maillard-Reaktion umfasst ein weites Feld nichtenzymatischer Reaktionen, die für die Qualität von Lebensmittel von enormer Bedeutung sind. Obwohl das Produktspektrum z.T. dem der Karamellisierung ähnelt, ist sie aufgrund der notwendigen Aminolyse von dieser abzugrenzen.⁶² Die Maillard-Reaktion ist durch die Bildung farbiger Strukturen, Aroma- und Geschmacksstoffen, potentiell gesundheitsschädlicher Verbindungen sowie den Verlust essentieller Aminosäuren und die Modifikation von Proteinen gekennzeichnet.²⁷ Die Maillard-Reaktion ist nicht nur für Lebensmittel relevant, sondern hat auch in biologischen Systemen durch Modifikation von Proteinen und den damit einhergehenden Krankheitsbildern Bedeutung.^{63,64} Außerdem wird eine physiologische Wirkung bei der Aufnahme von Maillard-Reaktionsprodukten diskutiert.⁶⁵ Im Folgenden werden die chemischen Vorgänge der Maillard-Reaktion und ihre Bedeutung für das Bier näher betrachtet.

Zu Beginn der Maillard-Reaktion steht die Bildung einer 1-Amino-1-Desoxyketose, dem sogenannten Amadori-Produkt (Abbildung 4). Die Aminofunktionen in freien Aminosäuren oder Proteinen greifen nukleophil am Carbonylkohlenstoff einer Aldose an und bildet unter Wasserabspaltung ein Imin. Dieses wird durch die Amadori-Umlagerung in die 1-Amino-

1-Desoxyketose umgewandelt, die ein relativ stabiles Intermediat der Maillard-Reaktion darstellt.⁶⁶ Das analoge Heyns-Produkt entsteht aus der Reaktion von Ketosen mit Aminen.⁶⁷

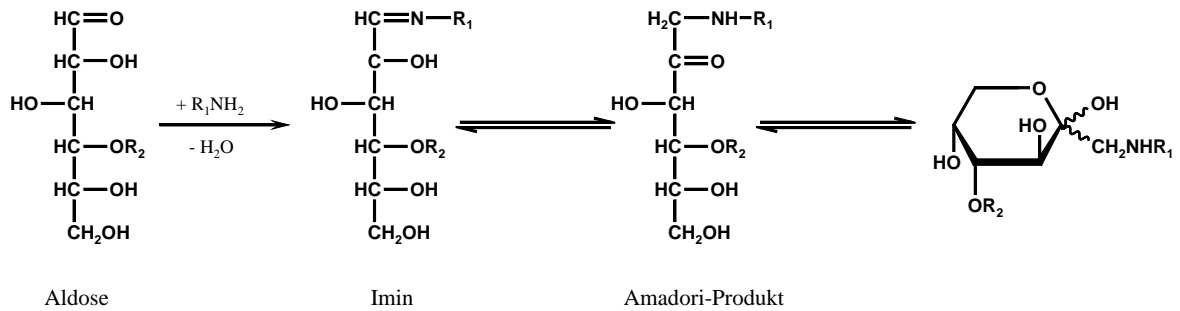


Abbildung 4: Bildung des Amadori-Produkts aus der Reaktion von Aminen (R_1 = Aminosäuren, Peptide, Proteine, etc.) und Aldosen (R_2 = Glucose, Maltose, etc.).

In der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion entstehen aus dem Amadori-Produkt eine Reihe neuer Verbindungen. Eine Auswahl der im Bier nachgewiesenen Maillard-Reaktionsprodukte ist in Abbildung 5 dargestellt. Das Amadori-Produkt (**I a**), das in wässriger Lösung in seiner stabilen Pyranose-Form vorliegt, konnte im Bier mit unterschiedlichen Aminosäureresten nachgewiesen werden.⁶⁸

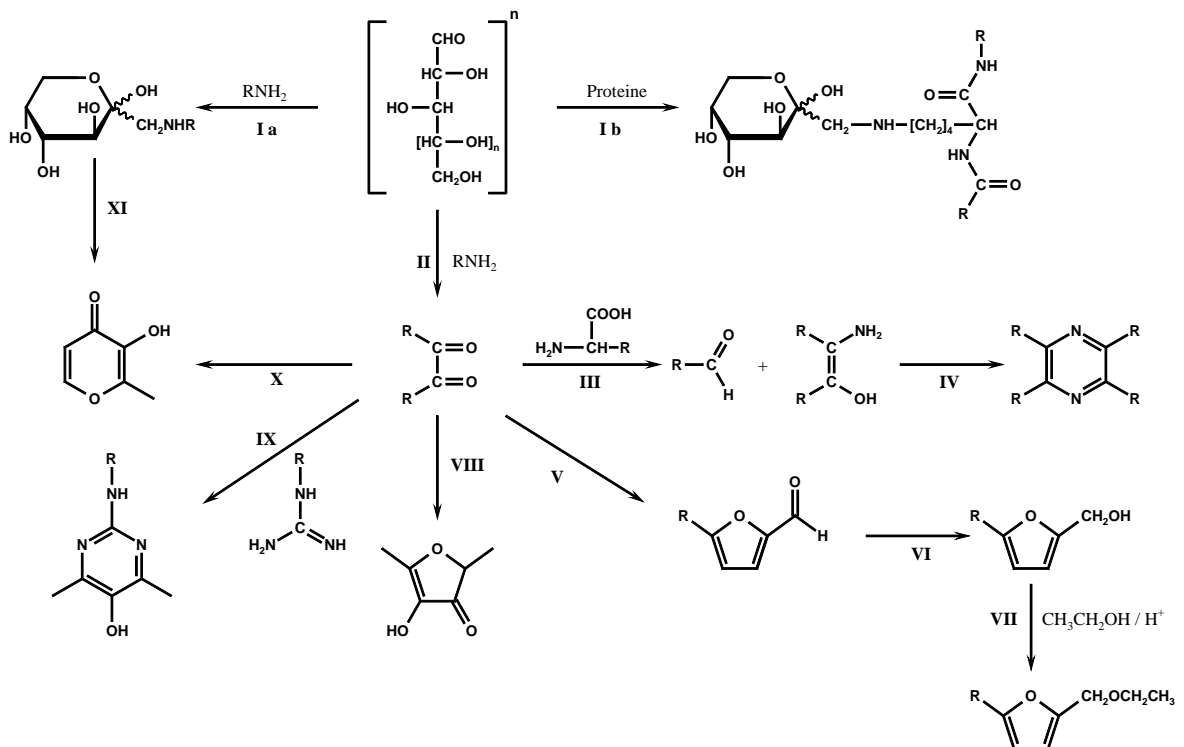


Abbildung 5: Zusammenfassung wichtiger, im Bier nachgewiesener Maillard-Reaktionsprodukte.

Insbesondere die α -Dicarbonylverbindungen sind von fundamentaler Bedeutung (**II**). Obwohl diese nur in geringen Mengen entstehen, gelten sie als Schlüsselverbindungen der Maillard-Reaktion.⁶⁹ Ihre Bildungswege sind sehr komplex. Sie werden z.B. direkt aus dem

Amadori-Produkt gebildet oder entstehen durch weitere Folgereaktionen. Eine Übersicht zu möglichen Fragmentierungsreaktionen von α -Dicarbonylverbindungen geben Smuda und Glomb.⁷⁰ Verschiedene α -Dicarbonylverbindungen wurden bereits mehrfach in Bier nachgewiesen und ihre Bedeutung für die Alterung von Bier ist unbestritten.⁷¹⁻⁷⁴ So konnten Bravo et al. zeigen, dass durch den Zusatz von Dicarbonyl-Abfangreagenzien das Auftreten alterungsabhängiger Aromaveränderungen verlangsamt wird.⁷¹ Doch nicht nur Kohlenhydrate können eine Quelle für α -Dicarbonylverbindungen darstellen, sondern auch hefe-eigene Stoffwechselprozesse und die Oxidation von Lipiden.^{75,76}

Die α -Dicarbonylverbindungen gehen eine Reihe weiterer Reaktionen ein, durch die Farb- und Aromastoffe entstehen. Vor allem die als Strecker-Abbau (Abbildung 6) bekannte Reaktion von Aminosäuren mit α -Dicarbonylverbindungen ist für die Aromabildung in Lebensmitteln von großer Bedeutung (III).⁷⁷ Sie führt zu einem um einen Kohlenstoff verkürzten Aldehyd. Wichtige Strecker-Aldehyde in Bier sind 3-Methylbutanal aus Leucin, 2-Methylbutanal aus Isoleucin, Methional aus Methionin und Phenylacetaldehyd aus Phenylalanin.³³

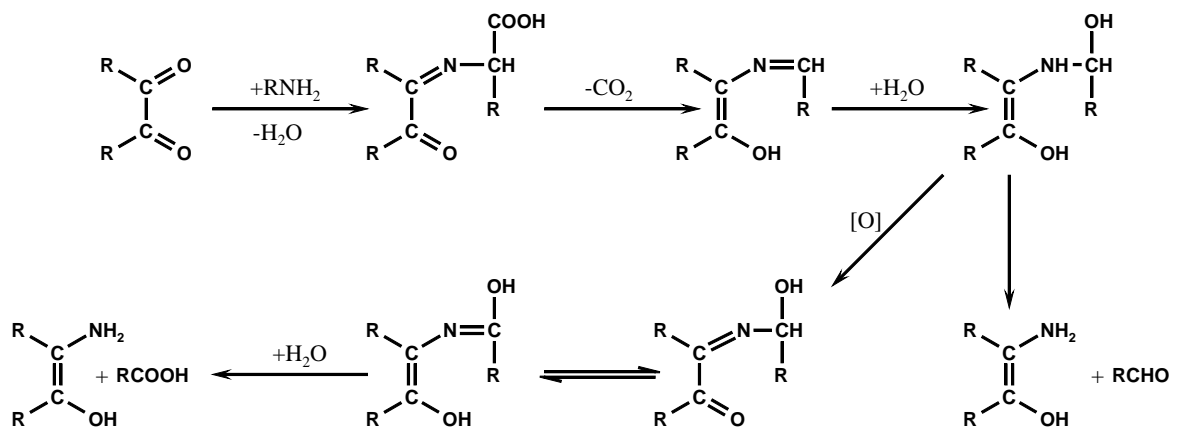


Abbildung 6: Bildung von Strecker-Aldehyden und Strecker-Säuren aus der Reaktion von α -Dicarbonylverbindungen mit primären Aminosäuren.

Durch die Oxidation des Enaminols und anschließender Hydrolyse kann die korrespondierende Strecker-Säure entstehen. Die Oxidation findet allerdings nur mit nicht zyklisierbaren α -Dicarbonylen statt, z.B. mit Methylglyoxal, nicht aber mit 3-Desoxyglucoson, da es bevorzugt in seiner Pyranose-Form vorliegt und somit weniger oxidationsanfällig ist.⁷⁸ Es wird zudem vermutet, dass der Strecker-Aldehyd auch direkt aus dem Amadori-Produkt gebildet werden kann.⁷⁹ Weiterhin können α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen Reaktionen eingehen, die dem Strecker-Abbau ähnlich sind.⁸⁰ Während der Alterung von Bier wird die Bildung von Strecker-Aldehyden mit der Ausbildung eines unerwünschten Aromas

verbunden.⁸¹ Aus den Enaminolen, die am Ende des Strecker-Abbaus stehen, können wiederum Pyrazine entstehen (IV)⁸², die im Malz potente Aromastoffe darstellen³³.

Die für die thermische Belastung von Lebensmitteln etablierten und mehrfach in Bier nachgewiesenen Parameter Furfural und Hydroxymethylfurfural (HMF) werden ebenfalls aus α -Dicarbonylen gebildet (V). Die entsprechenden 3-Desoxyosone bilden unter Wasserabspaltung die Furfural-Derivate (Abbildung 7). Diese Verbindungen haben aufgrund ihrer hohen Geruchsschwellenwerte zwar nur einen sehr geringen Einfluss auf das Aroma, korrelieren aber sehr gut mit der Bildung anderer Alterungsverbindungen.⁵⁸ 3-Desoxyglucoson (3-DG) ist der direkte Vorläufer zu HMF und ein bekanntes Abbauprodukt von Hexosen.⁸³ Im Bier ist 3-DG die dominierende α -Dicarbonylverbindung.⁷¹

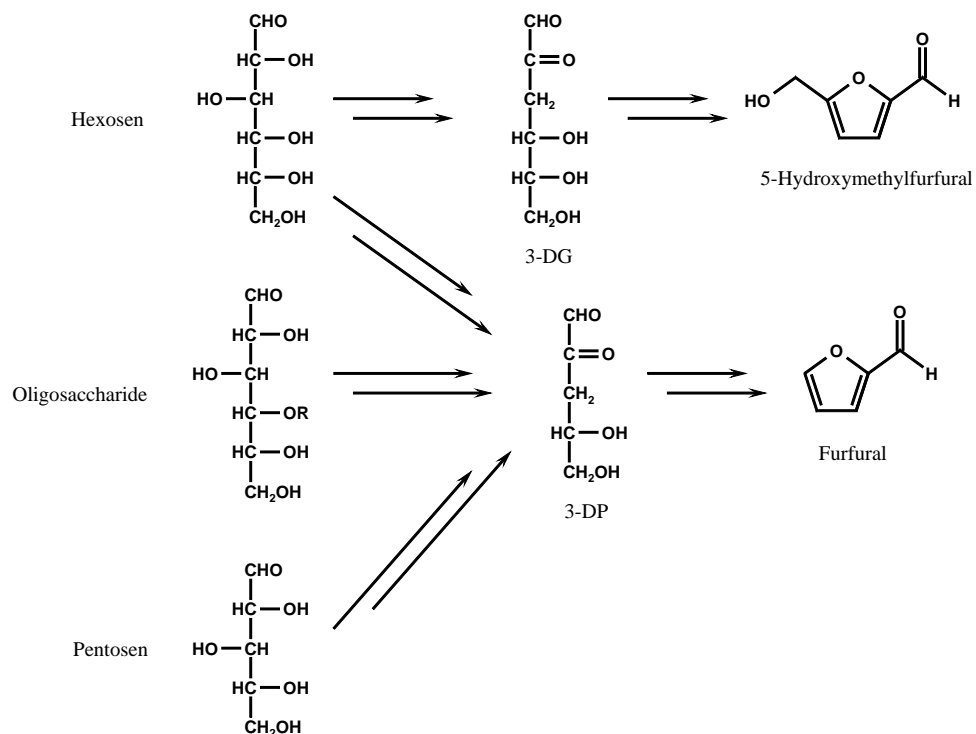


Abbildung 7: Bildung von Hydroxymethylfurfural und Furfural aus Kohlenhydraten über 3-Desoxyglucoson (3-DG) und 3-Desoxypentosen (3-DP).

3-Desoxypentosen (3-DP), der Vorläufer des Furfurals, wurde ebenfalls im Bier nachgewiesen und kann aus mehreren Vorläufern entstehen (vgl. Abbildung 7).⁷¹ Analog zum 3-DG aus Hexosen kann 3-DP aus Pentosen gebildet werden.⁸⁴ Weiterhin stellt das aus Glucose entstehende Glucoson einen Vorläufer für 3-DP dar.⁸⁵ Hollnagel und Kroh konnten 3-DP als eines der wichtigsten Dicarbonyle des Oligosaccharidabbaus identifizieren.⁸⁶ Als Precursoren werden das 1-Amino-1,4-didesoxyglucoson⁸⁶ bzw. das 4-Desoxyglucoson⁸⁷ vorgeschlagen. Im Gegensatz dazu konnten Smuda und Glomb eindeutig Maltoson in Maltose-Lysin-Inkubation als Vorläufer von 3-DP identifizieren.⁸⁸ Der zuletzt beschriebene

Weg läuft bevorzugt unter oxidativen Bedingungen ab. Ob Furfural während der Alterung von Bier oxidativ gebildet wird, ist nicht eindeutig geklärt. Vanderhaegen et al. fanden nur geringe Unterschiede zwischen normal und oxidativ gealtertem Bier.²⁴ Carneiro et al. machen dagegen die Oxidation von reduzierten Furfural-Vorstufen, z.B. Furfurylalkohol, für die Bildung von Furfural verantwortlich.⁸⁹ Bislang konnte dieser Bildungsweg jedoch nicht bestätigt werden. Während der Gärung wird Furfural durch die Hefe größtenteils zu Furfurylalkohol reduziert (**VI**) und kann unter sauren Bedingungen die Vorstufe für Furfurylethylether (**VII**), einer typischen Alterungsverbindung in Bier, darstellen.^{57,90} Neben Furfural und HMF entstehen aus Dicarbylen weitere für Bier relevante, aromaaktive Strukturen. Ein Beispiel ist das Acetylfuran aus dem 1,4-Didesoxyglucoson.⁹¹ Aus den 1-Desoxyosonen entstehen z.B. Furaneol (**VIII**) oder Norfuraneol²⁷, die als Aromastoffe in Malz und Bier identifiziert werden konnten.^{8,33} Maltol kann sowohl aus den 1-Desoxyosonen (**X**)²⁷ als auch aus dem Amadori-Produkt (**XI**)⁹² gebildet werden. Maltol stellt ebenfalls einen wichtigen Aromastoff in Malz und Bier dar.^{33,93}

Aus der Maillard-Reaktion entstehen viele mehr oder weniger stabile Verbindungen, zu denen auch die Melanoidine gezählt werden. In der Literatur wird die Bildung von Farbstoffen aus dem Amadori-Produkt⁹⁴, aus der Reaktion von α -Dicarbylen mit Aminosäuren⁹⁵, aus Reaktion des Amadori-Produkts mit α -Dicarbylen⁹⁶ und durch Reaktion von Aminosäuren mit Furanaldehyden^{97,98} beschrieben. Eine exakte strukturelle Aufklärung von Melanoidinen in Bier ist bisher noch nicht erfolgt.⁹⁹ Es ist bekannt, dass das Molekulargewicht der Melanoidine von der thermischen Belastung während des Darrens abhängt.^{44,45}

Weiterhin ist bekannt, dass die Maillard-Reaktion zur Modifizierung von Proteinen und Aminosäuren führt (Abbildung 5, **I b**). Aufgrund des relativ geringen Proteingehalts in Bier, spielen diese Mechanismen nur eine untergeordnete Rolle, sodass die Maillard-Reaktion für freie Aminosäuren eine größere Bedeutung hat. Zwar sind Maillard-induzierte Proteinmodifikationen bekannt, ihre Bedeutung für Bier ist allerdings unklar.^{100–103} Weiterhin gibt es kaum Untersuchungen zu Aminosäuremodifikationen im Bier. Die einzig bisher bekannte Struktur ist das Argpyrimidin (**IX**).¹⁰⁴

2.3.2. Die Verwendung des Hopfens

Die erste nachweisliche Verwendung von Hopfen ist auf das 8. Jhd. n. Chr. datiert.¹⁰⁵ Heute ist der Hopfen bei der Herstellung von Bier nicht mehr wegzudenken und übernimmt vielfältige Aufgaben. Er wird meist während der Würzekochung in Form getrockneter Dolden, als Pellets oder als CO₂-Extrakt zugegeben. Hopfen ist eine zweihäusige Kletter-

pflanze aus der Familie der Hanfgewächse, von der heutzutage fast ausschließlich die weiblichen Pflanzen der Spezies *Humulus lupulus L.* zur Bierherstellung verwendet werden.¹⁰⁶ In der Hopfendolde befinden sich die Drüsenhaare, die eine harzige Mischung aus ätherischen Ölen und Hopfenbittersäuren enthalten, das sogenannte Lupulin. Je nach Zusammensetzung kann zwischen Aroma- und Bitterhopfen unterschieden werden. Aromahopfen (3-6 % α -Säuren) zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an ätherischen Ölen aus, wohingegen beim Bitterhopfen ein sehr hoher Anteil an Bittersäuren zu finden ist (bis zu 18 % α -Säuren).¹⁰⁷ Die durchschnittliche Zusammensetzung von getrocknetem Hopfen ist in Tabelle 3 zu sehen.

Tabelle 3: Durchschnittliche Zusammensetzung von getrocknetem Hopfen.¹⁰⁸

Bestandteil	Gehalt [%/TM]
α -Säuren	2-17
β -Säuren	2-10
Aminosäuren	0,1
Asche	10
Cellulose/Lignin	40-50
Monosaccharide	2
Lipide und Fettsäuren	1-5
Pektine	2
Polyphenole	3-6
Proteine	15
Ätherische Öle	0,5-3
Wasser	8-12

Hopfen wird nicht nur wegen seines Aromas und der Bittere für die Herstellung von Bier genutzt, sondern er erfüllt zusätzlich zahlreiche technologische Aufgaben. Hierbei sind vor allem die im Hopfen enthaltenen Polyphenole hervorzuheben. Sie unterteilen sich in Proanthocyanidine (ca. 70 %), Flavonol-Glykoside (ca. 25 %) und Prenylflavonoide (ca. 5 %).¹⁰⁹ Die Zusammensetzung der Polyphenole ist sehr stark von der Varietät des Hopfens abhängig.^{110,111} Der Gehalt ausgewählter Polyphenole in Hopfen und Bier ist in Tabelle 4 angegeben. Die Polyphenole sorgen bei der Würzekochung für die Koagulation der Proteine. Dies wird neben der Bildung von schwerlöslichen Tannin-Protein-Komplexen vor allem auf die reduzierende Wirkung der Polyphenole zurückgeführt.¹² Diese sind in der Lage, Disulfidbrücken in Proteinen zu spalten. Die freien Thiolgruppen führen zur Bildung höhermolekularer Proteinagglomerate, die in der Würze nicht mehr löslich sind. Beim Abkühlen der Würze bilden sich dagegen vermehrt Tannin-Protein-Komplexe.¹² Der Verlust von Xanthohumol (vgl. Tabelle 4) wird durch Umwandlung in Isoxanthohumol bzw. durch Absorption an unlösliche Bestandteile verursacht.¹¹⁴ Im Bier können Polyphenole dagegen

bei der Lagerung zu unerwünschten Trübungen führen, weshalb sie vor der Abfüllung durch Filtration zu großen Teilen entfernt werden (vgl. Proanthocyanidine, Tabelle 4).^{115,116}

Tabelle 4: Gehalte ausgewählter Polyphenole in Hopfen und Bier.

	Hopfen	Bier [mg/L] ¹¹²
Prenylflavonoide	Pellets [%]¹¹³	
Xanthohumol	0,62 ^a	0,002-1,2
Isoxanthohumol	-	0,04-3,44
Proanthocyanidine	Poylphenolfraktion [%]¹¹⁰	
Catechin	17,6	0,2-5,4
Epicatechin	14,7	0,65-1,1
Gallocatechin	2,3	-
Proanthocyanidin B1	14,8	-
Proanthocyanidin B2	7,2	-
Proanthocyanidin B3	15,2	0-5
Proanthocyanidin B4	12,3	-

Die im abgefüllten Bier verbleibenden Polyphenole können durch ihre antioxidativen Eigenschaften zur Verbesserung der Lagerstabilität führen, da sie oxidative Abbaureaktionen verhindern.¹¹⁷ Die Polyphenole des Hopfens, insbesondere Xanthohumol, werden mit gesundheitsfördernden Eigenschaften in Verbindung gebracht.¹¹⁸ Weiterhin sind Bitter-säuren antimikrobiell wirksam und haben einen schaumstabilisierenden Effekt im Bier.¹¹⁹⁻¹²¹

Aromastoffe des Hopfens

Die Ausprägung des Hopfenaromas im Bier hängt sehr stark von der Herkunft des Hopfens ab.¹²² Als potente Aromastoffe sind Terpene, Terpenalkohole, kurzkettige Fettsäuren und Ester, Ketone und Aldehyde sowie Kohlenwasserstoffe zu nennen.^{27,123} In Hopfen konnten weit über einhundert flüchtige Verbindungen identifiziert werden, von denen viele ein fruchtiges, blumiges oder „grünes“ Aroma aufweisen (Tabelle 5).¹²³⁻¹²⁵ Nicht alle Aromastoffe des Hopfens gehen in das Bier über. Die sehr aromaaktiven ungesättigten Kohlenwasserstoffe, wie z.B. (*E,Z*)-1,3,5-Undecatrien, kommen zwar im Hopfen vor, können jedoch nicht im Bier nachgewiesen werden.^{27,123} Möglicherweise ist dies auf die geringe Wasserlöslichkeit oder Abbaureaktionen während der Bierherstellung zurückzuführen. Vergleichsuntersuchungen von gehopftem und ungehopftem Bier zeigen, dass vor allem Linalool und andere Terpenalkohole charakteristische Aromastoffe für gehopfte Biere sind.^{93,126} Die Zusammensetzung der Terpenalkohole verändert sich während der Herstellung von Bier. Insbesondere während der Gärung kommt es zu Umwandlungen, die das Aroma deutlich beeinflussen.¹¹ So kann Geraniol durch Hefe zu Citronellol reduziert und zusätzlich mit Essigsäure verestert werden.¹²⁷ Zusätzlich kann Geraniol bzw. Nerol zu Linalool

isomerisieren, wodurch die Dominanz von Linalool auf das Aroma von Bier zu erklären ist.¹²⁸

Tabelle 5: Zusammenfassung wichtiger Aromastoffe in frischen Hopfendolden.¹²³

Aromastoff	Geruchseindruck
2-Methylpropansäureethylester	fruchtig
2-Methylbutansäuremethylester	fruchtig
(Z)-3-Hexenal	grün
2-Methylbutansäureethylester	fruchtig
Methional	gekochte Kartoffeln
1-Octen-3-on	pilzartig
(Z)-1,5-Octadien-3-on	geranienartig
Myrcen	geranienartig
Linalool	blumig
Nonanal	zitrusartig
1,3(E),5(Z),9-Undecatetraen	zitrusartig
trans-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch

Neben den Terpenalkoholen sind die Ethylester kurzkettiger, verzweigter Fettsäuren in gehopften Bieren zu finden, die während der Gärung aus den freien Säuren entstehen.⁹³ Die Herkunft verzweigter Säuren ist im Hopfen selbst zu sehen.¹²⁹ Sie können aber auch aus dem Malz stammen.³³ Um ein intensiveres Aroma zu erzielen, kann Hopfen erst nach der Gärung zugegeben werden. Beim sogenannten „dry hopping“ oder dem „Hopfenstopfen“ gehen die Bittersäuren nicht in das Bier über. Vielmehr lösen sich besonders die ätherischen Öle, sodass ein starkes Hopfenaroma entsteht.^{130,131}

Bitterstoffe des Hopfens

Im Lupulin sind α -Säuren (Humulone) und β -Säuren (Lupulone) enthalten, die sich in mehrere Homologe unterteilen (Abbildung 8). Lupulone besitzen eine zusätzliche Prenylgruppe an Position 6. Sowohl die Humulone als auch die Lupulone unterliegen während des Brauprozesses Isomerisierungs- und Abbaureaktionen. Die Ausbeuten ausgewählter Hopfenbitterstoffe in Würze und Bier sind in Tabelle 6 dargestellt.

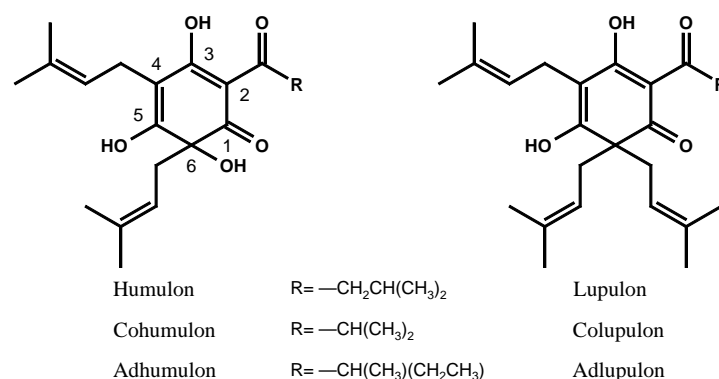


Abbildung 8: Die drei bedeutendsten Homologe der α -Säuren (Humulone) und β -Säuren (Lupulone).¹³²

98 % der in Hopfen vorhandenen Humulone werden durch die drei bedeutendsten Vertreter Humulon, Cohumulon und Adhumulon repräsentiert.¹³³ Humulone sind sehr schlecht wasserlöslich, da sie mit einem pK_s -Wert von ca. 5,1 unter biertypischen Bedingungen größtenteils protoniert vorliegen.¹³⁴ Die Löslichkeit nimmt erst mit höheren Temperaturen und steigenden pH-Werten zu.¹³⁵ Durch die daraus resultierenden vergleichsweise niedrigen Konzentrationen im Bier (vgl. Tabelle 6) und die ohnehin geringe Bitterkeit tragen Humulone kaum zum Bittergeschmack bei.^{136,137} Die Bittersäuren zeigen eine antioxidative Wirksamkeit und die Fähigkeit, Radikale einzufangen.^{138–141} Sowohl Humulone und Lupulone als auch die im Bier relevanten iso- α -Säuren (Isohumulone) werden mit vielfältigen bioaktiven Wirkungen assoziiert.¹⁴²

Tabelle 6: Ausbeuten ausgewählter Hopfenbitterstoffe am Ende der Würzekochung und im abgefüllten Bier. Die Ausbeuten beziehen sich auf die absolut eingesetzte Menge von Humulone bzw. Lupulonen.¹⁴³

Verbindung	Würze	Bier
Humulone	28 %	8,5 %
<i>cis</i> -Isohumulone	45 %	39 %
<i>trans</i> -Isohumulone	29 %	25 %
Hydroxy- und Hydroperoxy-Alloisohumulone	1,2 %	0,4 %
Lupulone	1,6 %	1,9 %
Hulupone	21 %	7 %
Hydroxytricyclolupone	8,6 %	2,0 %

Während der Würzekochung findet die für den Biergeschmack bedeutendste Reaktion der Humulone statt. Die dabei entstehenden diastereomeren *cis*- und *trans*-Isohumulone zeigen aufgrund des niedrigeren pK_s -Wertes eine höhere Wasserlöslichkeit. Zusätzlich besitzen diese Verbindungen eine intensivere Bitterkeit gegenüber den Humulonen, wodurch sie die Hauptbitterkomponente in Bier darstellen.^{134,136} Der Mechanismus der Isomerisierung ist in Abbildung 9 dargestellt. Nach Deprotonierung der Humulone wird die negative Ladung über das gesamte β,β' -Tricarbonylsystem verteilt. Durch Keto-Enol-Tautomerie kommt es am C4 zur Ausbildung eines Stereozentrums, welches später die Konfiguration der Isohumulone festlegt. Weiterhin liegt eine α -Hydroxycarbonylverbindung (Acyloin) vor, welche durch Verschiebung der Bindung zwischen C1 und C6 hin zu C5 im Sinne einer α -Keto-Umlagerung zum Cyclopentan-Grundkörper der Isohumulone reagiert.

Die absolute Konfiguration der Isohumulone ist seit Langem Gegenstand der Forschung. Die erste beschriebene Konfiguration von Alderweiweldt et al. aus dem Jahre 1965 sieht die Position 4 als variabel an.¹⁴⁶ De Keukeleire et al. vermuteten ebenfalls die variable Position am vierten Kohlenstoff des Isohumulon-Rings. Mit Hilfe der Horeau-Methode wurde die Konfiguration am C5 auf *S*, die am C4 auf *R* (*cis*-Isohumulone) bzw. auf *S* für (*trans*-

Isohumulone) festgelegt.¹⁴⁴ Die von Intelmann et al. gefundene 4*S*,5*S*-Konfiguration für *trans*-Isoadhumulon bestätigte die zuvor gefunden Konfiguration.¹⁴⁷ Die Röntgenkristallstrukturanalyse weist jedoch aufgrund der Abwesenheit eines Schweratoms sehr hohe Unsicherheiten auf. Urban et al. ist es gelungen, die absolute Struktur der Isohumulone durch Kristallisation verschiedener Isohumulon-Derivate in Gegenwart von (+)-Cinchonin und (-)-Cinchonidin eindeutig aufzuklären.¹⁴⁵ Im Gegensatz zu früheren Arbeiten identifizierten sie das C5-Atom in Isohumulonen als variable Position (vgl. Abbildung 9). Demzufolge ist die Konfiguration am C4 stets *S*, während sie sich am C5 in *S* (*trans*) bzw. *R* (*cis*) unterscheiden. Die entsprechende Position in den Humulonen (C4) ist dagegen nicht chiral. Die Isomerisierung folgt einer Kinetik erster Ordnung und hängt somit nur von der Ausgangskonzentration ab.¹⁴⁸

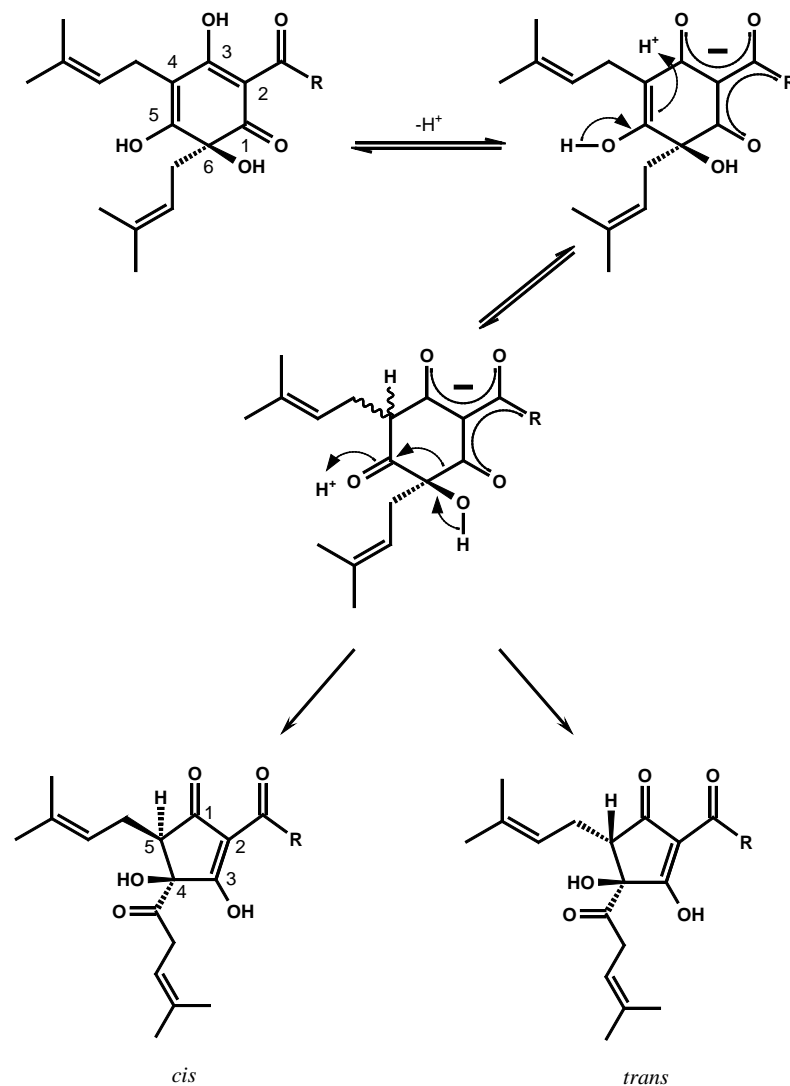


Abbildung 9: Isomerisierung von Humulonen zu den *cis* (4*S*, 5*R*)- und *trans* (4*S*, 5*S*)-Isohumulonen.^{144,145}

Die Ausbeute wird sehr stark von den Reaktionsbedingungen während der Würzekochung beeinflusst. Im realen Brauprozess wird etwa eine Ausbeute von ca. 40-60 % Isohumulonen, bezogen auf die eingesetzten Humulone, erreicht.¹² Dies ist unter anderem auf die geringe Löslichkeit der Humulone in der Würze zurückzuführen, da ein Teil der Humulone nicht in Lösung geht. Absorption an Trub und Hefe sowie Abbaureaktionen erniedrigen zusätzlich die Ausbeute. In Modellsystemen konnte dagegen höhere Ausbeuten erreicht werden, da hier keine Absorptionsphänomene auftraten.¹⁴⁸ Die Isomerierungsrate sowie das Verhältnis von *cis* zu *trans* ist von der Temperatur und der Erhitzungszeit abhängig. Die Ausbeute nimmt mit steigender Temperatur zu und gleichzeitig verschiebt sich das *cis/trans*-Verhältnis mit zunehmender Erhitzungsdauer in Richtung des *cis*-Isomers.¹⁴⁹ Demnach ist das *cis*-Isomer als das thermodynamisch stabilere Endprodukt zu betrachten, während das *trans*-Isomer mit einer geringeren Aktivierungsenergie hingegen kinetischer Kontrolle unterliegt. Höhere Temperaturen begünstigen allerdings Abbaureaktionen, die wiederum zu Ausbeuteverlusten führen.¹⁴⁸

Da die Isomerisierung mit steigenden pH-Werten zunimmt, wird die Bildung des Humulat-Anions als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt angesehen. Sowohl in Modellsystemen als auch in Würze konnte die Isomerisierungsrate mit zunehmenden pH-Wert deutlich gesteigert werden.¹⁵⁰ Der Zusatz bivalenter Kationen, insbesondere Magnesium, steigerte die Ausbeute in Modellversuchen deutlich. Dagegen führte die Zugabe dreiwertiger Ionen wie Al^{3+} oder Fe^{3+} aufgrund der Bildung schwerlöslicher Salze zu erheblichen Verlusten.^{150,151} Überraschenderweise bewirkte der Zusatz von Fe^{3+} zur Würze sehr hohen Ausbeuten von ca. 80 %.¹⁵⁰ Die Anwesenheit von Metallionen scheint die Aktivierungsenergie herabzusetzen, wodurch zusätzlich eine Verschiebung des *cis/trans*-Verhältnisses zugunsten des *cis*-Isomers erfolgt.¹⁵⁰

Neben der thermischen Isomerisierung existiert ein photochemischer Weg, Humulone in Isohumulone umzuwandeln. Die von Clarke und Hildebrandt gefundenen „Photoisohumulone“ wurde später als *trans*-Isohumulone identifiziert.¹⁵² Der Mechanismus der selektiven Photoisomerisierung wurde von De Keukeleire und Blondeel aufgeklärt.¹⁵³ Mit dieser Methode kann einfach und in hoher Ausbeute reines *trans*-Isohumulon gewonnen werden, da keine nennenswerten Nebenreaktionen auftreten.¹⁵⁴

Neben den Isohumulonen werden auch die sogenannten „reduzierten Bittersäuren“ als Zutat bei der Bierherstellung eingesetzt. Diese besitzen eine ähnliche Bitterkeit wie die Isohumulone, gelten aber als potentiell alterungsstabiler. In Deutschland sind sie nicht zur

Herstellung von Bier zugelassen. Deren Darstellung unterscheidet verschiedene Reduktionsstufen.¹³² Durch Hydrierung mit Wasserstoff werden die Tetrahydroisohumulone erhalten, deren Prenylgruppen reduziert sind. Die Reduktion mit Natriumborhydrid liefert die Dihydroisohumulone, bei denen die α -Ketolfunktion zu einem vicinalen Diol reduziert wird. Aus der Kombination beider Verfahren resultierten die Hexahydroisohumulone.

Die quantitativen Veränderungen der Isohumulone und ausgewählter Abbauprodukte während der Alterung von Bier sind in Tabelle 7 dargestellt. Im frischem Bier ist das Verhältnis von *cis*- zu *trans*-Isohumulonen typischerweise im Bereich von 2-3:1. Im Laufe der Alterung verändert sich dieses Verhältnis zugunsten der *cis*-Isohumulone (vgl. Tabelle 7). Die *trans*-Isohumulone haben bei 12°C eine Halbwertszeit von weniger als einem Jahr, wohingegen die *cis*-Isohumulone unter gleichen Bedingungen eine geschätzte Halbwertszeit von zehn Jahren besitzen und erst bei höheren Temperaturen verstärkt abgebaut werden.^{155,156} Ein Einfluss der gesättigten Seitenkette an C2 konnte dagegen nicht beobachtet werden.¹³³ Die höhere Reaktivität der *trans*-Isomere wird auf deren Stereochemie zurückgeführt. Da die beiden ungesättigten Seitenketten an C4 und C5 in einer Ebene liegen, entsteht ein Bereich mit erhöhter Elektronendichte, der die Anfälligkeit von *trans*-Isohumulonen gegenüber Oxidation und protonenkatalysierten Reaktionen erklärt.^{155,157} Eine Übersicht über einige der wichtigsten bisher beschriebenen Abbauprodukte von *trans*-Isohumulonen ist in Abbildung 10 zu sehen.

Tabelle 7: Veränderungen der Isohumulone und ausgewählter Isohumulon-Abbauprodukte während der Alterung von Bier (Konzentration in $\mu\text{mol/L}$). Die Nummerierung bezieht sich auf **Abbildung 10**.¹⁶

Verbindung	frisch	gealtert
<i>cis</i> -Isohumulone	75	62
<i>trans</i> -Isohumulone	27	8,4
trizyklische Abbauprodukte (III)	4,1	17,6
tetrazyklische Abbauprodukte (IV)	1,7	7,6
Hydroxy- und Hydroperoxy-Alloisohumulone (I)	0,9	1,8
Humulinsäuren (V)	1,2	2,3

Die Autoxidation *trans*-Isohumulonen führt zur Entstehung von Hydroperoxy- und Hydroxy-Alloisohumulonen (**I**) als primäre Oxidationsprodukte.¹⁵⁸ Dieser Abbau wurde auch für die *cis*-Isohumulone nachgewiesen. In geringem Umfang entstehen sie bereits während der Herstellung von Bier (vgl. Tabelle 6).¹⁴³ Diese Strukturen sind nicht stabil und unterliegen weiteren Abbaureaktionen. Aus Modellinkubationen von *trans*-Isohumulon konnten die heterocyclischen Verbindungen Tricyclohumulactol und Scorpiohumul (**II**) isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden.¹⁶ In welchem Ausmaß diese Verbindungen im Bier gebildet werden, ist bislang nicht geklärt. Der vorgeschlagene Bildungsmecha-

nismus geht ebenfalls von einer Oxidation der Prenoyl-Seitenkette aus. Die anschließende protonenkatalysierte Umlagerung mit Ringschluss ist aufgrund der Stereoisomerie spezifisch für die *trans*-Isomere. Des Weiteren sind die Humulinone bekannt, die zusätzlich an Position 4 im Ring der Isohumulone eine Hydroxyl-Gruppe aufweisen und durch Oxidation von Humulonen entstehen und im Bier nachgewiesen wurden.^{16,159} Etwa 10 % der Humulone werden während der Würzbereitung in die Humulinone umgewandelt.¹⁴³ Taniguchi et al. fanden in gealtertem Hopfen erhöhte Mengen der Humulinone sowie von deren Folgeprodukten, die Hydroxy-Allohumulinonen.¹⁶⁰ Daher ist bereits von einem Eintrag durch die Zugabe von Hopfen auszugehen.

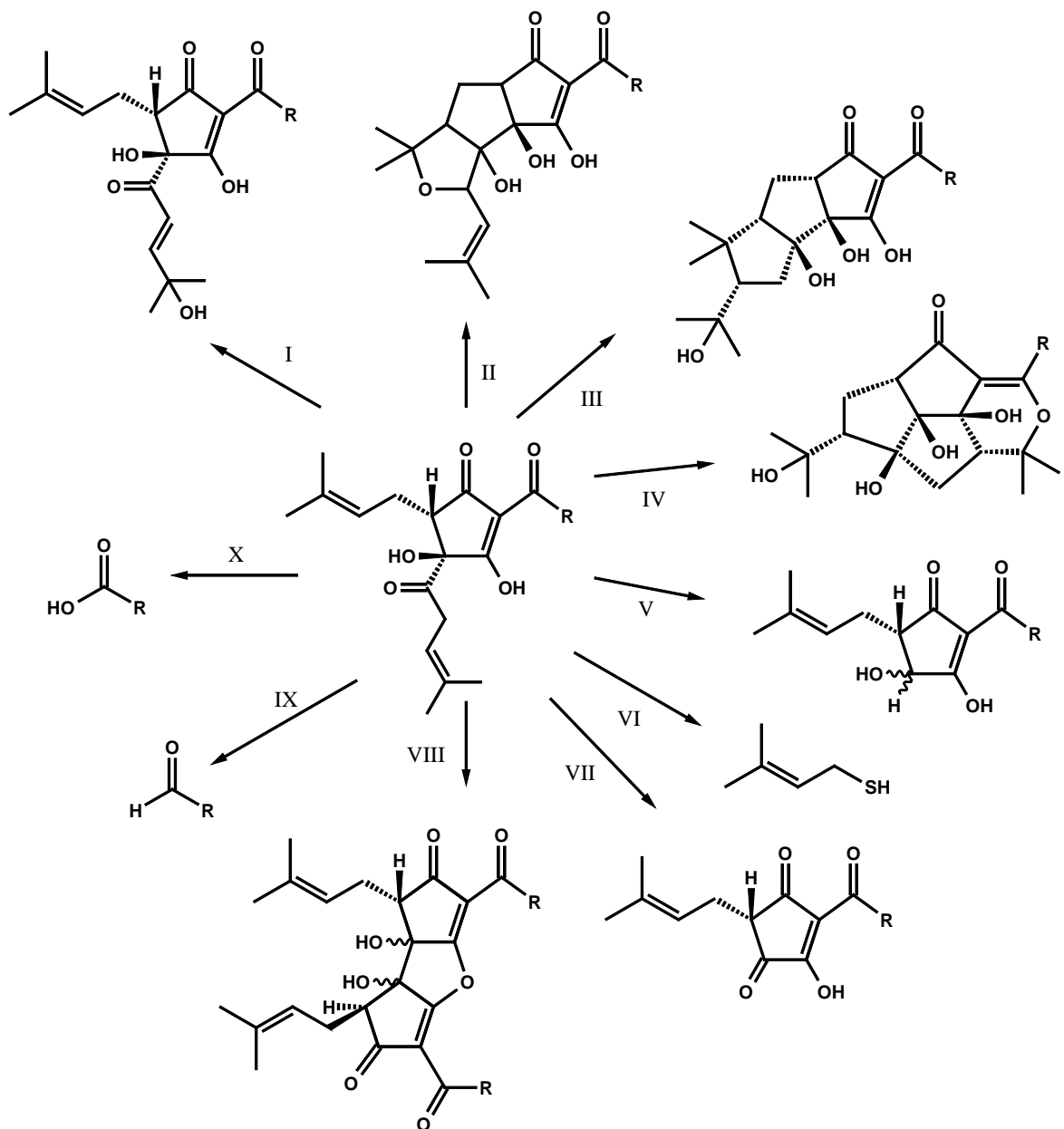


Abbildung 10: Zusammenfassung wichtiger Abbauprodukte der *trans*-Isohumulone.

Ausschließlich protonenkatalysiert verläuft die Bildung von tri- und tetrazyklischen Verbindungen, die ebenfalls spezifische Folgeprodukte der *trans*-Isohumulone darstellen (**III & IV**).^{147,157} Im gealtertem Bier sind sie die Hauptabbauprodukte der *trans*-Isohumulone (vgl. Tabelle 7) und weisen einen unangenehm bitteren, langanhaltenden Geschmack auf, der charakteristisch für die Veränderung des Bittergeschmacks während der Bieralterung ist.¹⁶ Die Humulinsäuren (**V**) entstehen unter anderem durch den alkalischen Abbau beider Isohumulon-Isomeren bzw. direkt aus den Humulonen.¹⁶¹ Auch während der Alterung von Bier nimmt deren Gehalt zu (vgl. Tabelle 7), wobei bevorzugt das *cis*-Isomer gebildet wird.¹⁶

Die Instabilität von Bier gegenüber Licht ist hinlänglich bekannt. Doch erst 1961 konnte das Phänomen des „Lichtgeschmacks“ auf eine konkrete Struktur, das 3-Methylbut-2-en-1-thiol (MBT), zurückgeführt werden (**VI**).¹⁶² MBT besitzt eine extrem niedrige Geruchsschwelle und einen für Thiole üblichen zwiebel- oder stinktierartigen Geruch.⁸ In Bestrahlungsversuchen bei 300 nm konnte die Dehydrohumulinsäure (**VII**) als ein Hauptprodukt identifiziert werden.¹⁶³ Im Bier konnte sie jedoch bislang nicht nachgewiesen werden. Der Verlust der Prenoyl-Seitenkette an C4 des *trans*-Isohumulons liefert den direkten Vorläufer für MBT. Burns et al. konnten mit Hilfe von ESR-Messungen (electron spin resonance) den in Abbildung 11 dargestellten Mechanismus postulieren.¹⁶⁴ Das β,β' -Tricarbonylssystem dient als Chromophor und wird durch die eingestrahlte Energie angeregt. Durch intramolekularen Energietransfer geht die Energie auf die α -Hydroxycarbonyl-Funktion über. Nach einer Typ I-Norrish-Spaltung entsteht ein Acyl-Radikal, welches Kohlenmonoxid abspaltet.^{164,165} Das 3-Methylbutyl-Radikal reagiert anschließend mit einem Sulfanylradikal, welches z.B. aus Cystein freigesetzt werden kann, zu MBT.

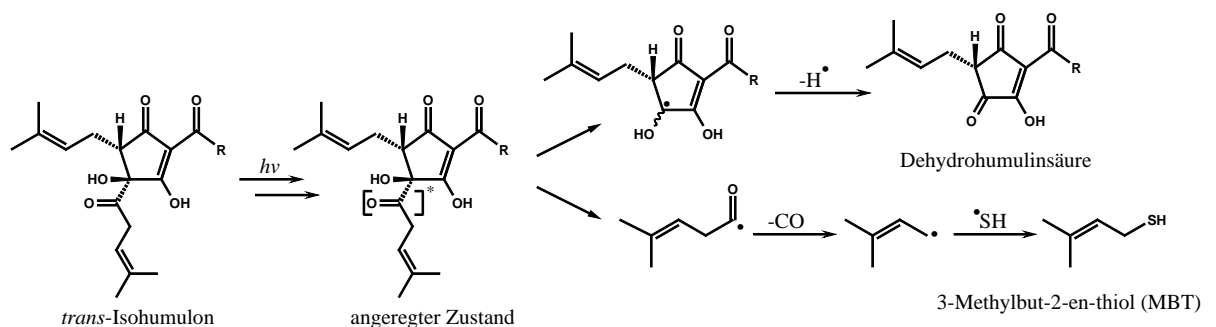


Abbildung 11: Bildung von 3-Methylbut-2-en-1-thiol (MBT) durch photooxidative Spaltung von *trans*-Isohumulonen.¹⁶⁴

Der Isohumulon-Grundkörper kann nach Abstraktion eines Wasserstoffatoms zur Dehydrohumulinsäure (**VII**) weiterreagieren bzw. mit einem gleichen Molekül dimerisieren

(VIII).¹⁶⁵ Heyerick et al. konnten zeigen, dass der angeregte Zustand des Isohumulons auch bei 440 nm auftritt, obwohl die Isohumulone in diesem Wellenlängenbereich eigentlich kein Licht absorbieren.¹⁶⁶ Riboflavin, in geringen Konzentrationen im Bier vorhanden, agiert als Photosensibilisator und überträgt die eingestrahlte Energie auf das Isohumulon. Um die Bildung des Lichtgeschmacks zu verhindern, werden verschiedene reduzierte Isohumulone bei der Bierherstellung eingesetzt.¹³² Jedoch zeigen Tetrahydroisohumulone (Prenylgruppen reduziert) ebenfalls die oben beschriebene Reaktion und es kommt zur Ausbildung eines Fehlgeruchs. Lediglich die Dihydroisohumulone (α -Ketolfunktion reduziert) zeigten sich gegenüber der photooxidativen Spaltung stabil.¹⁶⁶ Das zeigt, dass nicht nur MBT, dessen Bildung durch den Einsatz reduzierter Isohumulone verhindert wird, für den Lichtgeschmack verantwortlich gemacht werden kann. Neuere Studien zeigen, dass es bei der Bestrahlung von Bier zur Ausbildung weiterer schwefelhaltiger, aromaaktiver Strukturen kommt, die ein ähnliches Aroma wie MBT aufweisen.^{15,167}

Neben MBT sind weitere flüchtige Verbindungen bekannt, die beim Abbau der Isohumulone entstehen können. Hashimoto et al. fanden beim oxidativen Abbau von Isohumulonen eine Vielzahl unterschiedlicher Carbonylverbindungen, darunter die aus der gesättigten Seitenkette entstehenden verzweigten Aldehyde (IX).¹⁶⁸ Deren Bildung konnte bisher nicht mechanistisch abgesichert werden und scheint bei der Alterung von Bier keine Rolle zu spielen. De Clippeleer et al. konnten in gehopftem Bier keine signifikanten Unterschiede im Gehalt der entsprechenden Aldehyde im Vergleich zu ungehopftem Bier feststellen.¹⁶⁹ Neben den Aldehyden werden kurzkettige Fettsäuren aus der gesättigten (X) und ungesättigten Seitenkette mit dem Abbau der Bittersäuren assoziiert. Sie sind bereits im Hopfen vorhanden und ihr Gehalt nimmt während der Lagerung des Hopfens zu.^{129,170} Aus dem alkalischen Abbau von Isohumulonen konnte die 4-Methyl-3-pentensäure als Abbauprodukt isoliert und identifiziert werden.¹⁶¹ Wird gealterter Hopfen verwendet, finden sich im Bier ebenfalls höhere Gehalte dieser Fettsäuren.¹⁷¹ Williams & Wagner fanden zudem einen positiven Zusammenhang zwischen der Hopfung von Bier und der Zunahme der gesättigten Fettsäuren während der Lagerung.¹⁷²

Die Chemie der Lupulone unterscheidet sich erheblich von der der Humulone. Aufgrund der zusätzlichen Prenyl-Gruppe an Position 6 (Abbildung 8) findet keine Isomerisierung statt. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit sind im Bier nur Spuren an Lupulone zu finden und tragen wie die Humulone nicht zur Bitterkeit von Bier bei (vgl. Tabelle 6).^{16,136} Die Lupulone unterliegen ebenfalls Abbaureaktionen, die besonders unter oxidativen Bedingungen stattfinden. Ein Auszug der wichtigsten Abbauprodukte der β -Säuren ist in

Abbildung 12 zu sehen. Die Hulupone (**I**) gehen aus dem oxidativen Abbau der Lupulone hervor und sind in etwa halb so bitter wie die Isohumulone.^{136,173} Haseleu et al. konnten zeigen, dass während der Würzekochung etwa 21 % der Lupulone zu Huluponen umgewandelt werden und ca. 7 % tatsächlich im Bier zu finden sind, da sie relativ gut wasserlöslich sind (vgl. Tabelle 6).¹⁴³

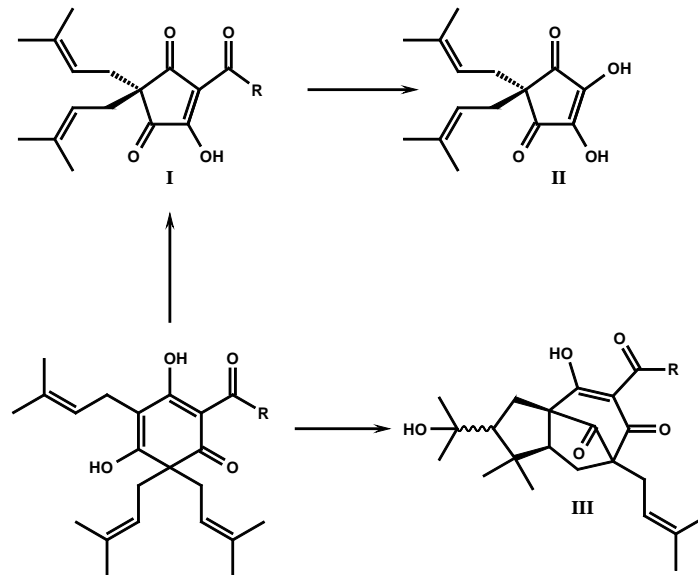


Abbildung 12: Zusammenfassung wichtiger Abbauprodukte der Lupulone.

Aus der Oxidation der Hulupone geht die Hulupinsäure (**II**) hervor. Dieser Abbauweg ist jedoch nur von geringer Bedeutung, sodass nur geringe Mengen im Bier zu finden sind.¹⁶ Ein weiterer wichtiger Abbauweg führt zur Bildung der Tricyclolupone, von denen nur die Hydroxytricyclolupone (**III**) im Bier von Bedeutung sind.^{174,175} Die Ausbeute der Hydroxytricyclolupone aus den Lupulone beträgt etwa 9 %, ca. 2 % gehen in das Bier über (vgl. Tabelle 6).¹⁴³ Das die Abbauprodukte der Lupulone zum Bittergeschmack beitragen, konnte durch Zugabe eines gealterten Lupulon-Extraktes zu Bier gezeigt werden.¹⁷⁶

3. Zielstellung

Die molekularen Vorgänge, die während der Alterung von Bier ablaufen, sind bis heute in ihrer Gesamtheit noch nicht abschließend aufgeklärt. Doch gerade bei der mit der Globalisierung des Biermarktes einhergehenden Zunahme der Transport- und Lagerzeiten von abgefülltem Bier ist ein fundamentales Verständnis der komplexen Reaktionen unabdingbar. Denn die chemischen Veränderungen während der Alterung von Bier korrelieren mit der Ausbildung eines unerwünschten Aromas und führen somit zu einer verringerten Akzeptanz des Verbrauchers. Vor allem die Dextrine und die Hopfenbittersäuren sind wichtige Reaktionspartner für alterungsabhängige Prozesse. Die in dieser Dissertation präsentierten Ergebnisse sollen zu einem tieferen Verständnis der Bieralterung beitragen.

Ein Ziel vorliegender Arbeit war es, den Einfluss von niedermolekularen Dextrinen im Kontext der Bieralterung aufzuklären. Bis heute wurde der Abbau dieser Kohlenhydrate unter Maillard-Bedingungen nur in sehr geringem Maße untersucht. Nach Entwicklung einer geeigneten Methode zur Bestimmung der im Bier relevanten Kohlenhydrate wurden Dextrine in Gegenwart der Aminosäuren L-Prolin und L-Lysin in Modellsystemen umgesetzt. Für mechanistische Aussagen wurde der Einfluss des pH-Wertes sowie oxidativer Bedingungen auf die Bildung reaktiver und stabiler Folgeprodukte untersucht. Dabei stand neben der Aufklärung von Prolin-Aminosäuremodifikation die noch nicht beschriebene Bildung von Furfural aus Dextrinen im Fokus. Um die Relevanz der mechanischen Untersuchungen auf die Alterung von Bier zu übertragen, wurden Bierproben einer forcierten Alterung unter definierten Bedingungen unterzogen und anschließend analysiert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit bezog sich auf den Abbau von Hopfenbittersäuren und der Bildung von kurzkettigen Carbonsäuren. Dieser Zusammenhang konnte bereits nachgewiesen werden, ein abschließender Reaktionsmechanismus fehlt jedoch. Um Hinweise auf die Reaktionsbedingungen zu erhalten, die zur Bildung der Carbonsäuren führen, wurde die Reaktivität isolierter Hopfenbittersäuren in mechanistischen Experimenten untersucht. Zusätzlich sollten potentielle Abbauprodukte sowie Aminosäuremodifikation aus der Reaktion mit Prolin identifiziert und charakterisiert werden.

4. Zusammenfassung und Einordnung der Forschungsergebnisse

4.1. Entwicklung einer leistungsfähigen Methode zur Bestimmung von Dextrinen in Maische, Würze und Bier

Oligomere Kohlenhydrate, die sogenannten Dextrine, sind eine Hauptkomponente im Bier. In der Literatur wird bereits eine Vielzahl unterschiedlichster Methoden zur Bestimmung von Kohlenhydraten beschrieben. Diese unterscheiden sich prinzipiell darin, ob eine Derivatisierung stattfindet oder nicht.

Eine der bedeutendsten Methoden, die ohne Derivatisierung auskommt, ist die Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie (HPAEC), meist gekoppelt mit gepulst-amprometrischer Detektion. Diese Methode macht sich die leichte Acidität von Kohlenhydraten zunutze, sodass bei basischen Eluenten, z.B. einer 0,5 M NaOH-Lösung, eine Auftrennung mit einer Anionenaustauschersäule möglich ist.¹⁷⁷ Diese Methodik wurde bereits erfolgreich für die Bestimmung von Kohlenhydraten im Brauprozess angewendet.^{31,178} Trotz der guten Trennleistung und Empfindlichkeit weist die HPAEC Nachteile auf. Durch die hohe Salzfracht im Eluenten ist sie nicht unmittelbar zur Kombination mit der Massenspektrometrie geeignet, sondern das Laufmittel muss separat über eine Membran entsalzt werden.¹⁷⁹ Ohne die massenspektrometrische Detektion können keine Aussagen zur Struktur unbekannter Verbindungen gemacht werden, sodass authentische Standards zur Identifizierung notwendig sind. Dies ist bei höhermolekularen Dextrinen oft nicht der Fall. Zudem muss beachtet werden, dass die Empfindlichkeit mit zunehmendem Polymerisierungsgrad abnimmt und stark vom Gradienten abhängig ist.¹⁸⁰ Alternativ können Kohlenhydrate durch direkte Injektion in ein Massenspektrometer untersucht werden.^{181,182} Allerdings können so keine Isomeren voneinander unterschieden werden und es besteht die Gefahr, dass bereits in der Ionenquelle eine Fragmentierung stattfindet und die Analyse falsch positive Ergebnisse liefert.

Durch die Derivatisierung von Kohlenhydraten werden deren Eigenschaften erheblich verändert.¹⁸³ Durch das Einführen von Chromo- oder Fluorophoren kann auf gebräuchliche UV/VIS- oder Fluoreszenz-Detektoren zurückgegriffen werden. Je nach Beschaffenheit der eingeführten Gruppe ergeben sich andere Möglichkeiten der chromatographischen Trennung wie z.B. die Elektrophorese oder die *reversed phase* HPLC (RP-HPLC). Während es für die Elektrophorese bereits Derivatisierungsreagenzien für den Nachweis von Dextrinen gibt, existieren für die RP-HPLC bisher nur Protokolle für Mono- und Disaccharide.^{184,185} Daher war es das Ziel, ein geeignetes Derivatierungsreagenz für die Quali- und Quantifizierung von

Oligosacchariden in Maische, Würze und Bier mittels RP-HPLC zu finden. Die detaillierte Beschreibung und Diskussion der experimentellen Vorgehensweise und der Ergebnisse ist in der Veröffentlichung „*A Novel Approach for the Quantitation of Carbohydrates in Mash, Wort, and Beer with RP-HPLC Using 1-Naphthylamine for Precolumn Derivatization*“ (Anhang A) zu finden.¹⁸⁶

Viele Derivatisierungsreagenzien basieren auf dem Prinzip der reduktiven Aminierung (Abbildung 13). Das verwendete 1-Naphtylamin (1-NA) besitzt eine gute Löslichkeit in Wasser/DMSO-Mischungen und weist fluoreszierende Eigenschaften auf. Zu der getrockneten Probe wurden jeweils 50 μL einer 1 M NaCNBH_3 -Lösung in DMSO und einer 0,2 M 1-NA-Lösung zugegeben (15 % Essigsäure/DMSO; 1:1). Die Derivatisierung erfolgte bei 40 °C für 24 Stunden. Als Standards standen 11 bierrelevante Kohlenhydrate zur Verfügung, darunter drei Pentosen, D-Glucose, die α -1,4-verknüpften Dextrine Maltose bis Maltotriose sowie das α -1,6-verknüpfte Disaccharid Isomaltose (vgl. Tabelle 8).

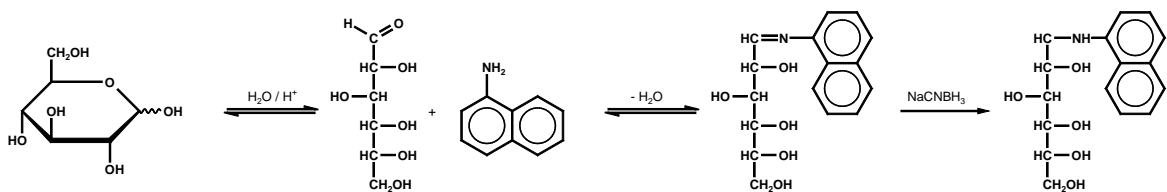


Abbildung 13: Reduktive Aminierung von D-Glucose mit 1-Naphtylamin.

Wird Ameisensäure als Laufmitteladditiv verwendet, eluierten einige Kohlenhydrate gleichzeitig mit dem Derivatisierungsreagenz und konnten somit nicht mittels Fluoreszenz-Detektion bestimmt werden. Basische Amine können durch die Zugabe von Ionenpaarreagenzien ihr Retentionsverhalten ändern.¹⁸⁷ Durch die Zugabe von Heptafluorbuttersäure zum Laufmittel konnte die Elution von 1-NA so stark verzögert werden, dass es die Bestimmung der derivatisierten Kohlenhydrate nicht beeinflusste. Erstaunlicherweise hatte das Ionenpaarreagenz keinerlei Einfluss auf die Retention der Kohlenhydrate, was wahrscheinlich auf den polaren Rest bzw. dessen sterischen Einfluss zurückzuführen ist. Die verschiedenen Kohlenhydrate konnten auf einer RP C18-Säule sehr gut voneinander getrennt werden (Abbildung 14). Lediglich L-Arabinose und D-Xylose sowie Maltotriose und Isomaltose konnten nicht vollständig voneinander getrennt werden. Durch Massenspektrometrie war jedoch eine vollständige Differenzierung von Maltotriose und Isomaltose möglich. Da alle derivatisierten Kohlenhydrate den gleichen molaren Fluoreszenz-Response besitzen, kann der Gehalt von Verbindungen bestimmt werden, für die kein Standard zur Verfügung steht. Die Validierung der Methode ergab eine sehr niedrige Nachweisgrenze von ca. 1 μM , sowie

sehr gute Wiederfindungen im Bereich von 91-109 % für die HPLC-FLD. Mittels LC-MS² konnten für Mono- und Disaccharide sogar noch niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden. Da dabei aber die Empfindlichkeit mit steigender Kettenlänge deutlich abnimmt, erfolgte die Quantifizierung der Kohlenhydrate in den Proben mittels Fluoreszenz-Detektion.

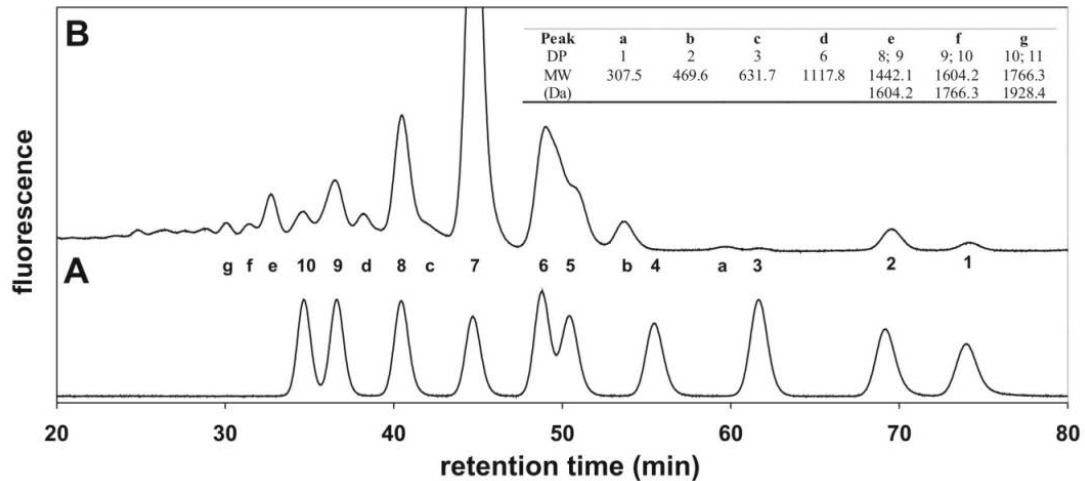


Abbildung 14: HPLC-FLD-Chromatogramme von Bier (**B**) und eines 0,1 M Kohlenhydrat-Standardmix (**A**). Die Beschriftung der Peaks (**1-10**) ist entsprechend der Tabelle 8. Der Polymerisierungsgrad (DP, degree of polymerization) der unbekannt Peaks (**a-g**) ist oben rechts in der Abbildung zu finden (übernommen aus Rakete & Glomb).¹⁸⁶

Durch die Massenspektrometrie wurden im Bier Kohlenhydrate mit bis zu 16 Glucose-Einheiten identifiziert. Darüber hinaus konnte der Polymerisierungsgrad unbekannter Signale bestimmt werden (Abbildung 14, **a-g**). Neben den linearen Dextrinen existieren weitere Isomere. Die Art der glycosidischen Bindung dieser Verbindungen kann durch die Massenspektrometrie nicht eindeutig ermittelt werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei den unbekannt Peaks um die sogenannten Grenzdextrine, also Kohlenhydrate, die am nicht reduzierenden Ende eine α -1,6-verknüpfte Glucose-Einheit aufweisen, sonst aber α -1,4-verknüpfte sind und während der Maischebereitung entstehen.¹²

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Kohlenhydratanalyse in Maische, Würze und Bier zusammengefasst. Während der Maische bilden sich aus der Stärke vor allem Glucose, Maltose und Maltotriose. Die ebenfalls entstehenden Dextrine mit vier oder mehr Glucose-Einheiten werden während der Maische nicht weiter abgebaut, da α - und β -Amylasen nur eine sehr geringe Aktivität für die Spaltung niedermolekularer Dextrine aufweisen.¹² Die Reduktion des Kohlenhydratgehalts von der Maische zur Würze ist auf das Auswaschen des Trebers und der damit verbundenen Verdünnung zurückzuführen.

Tabelle 8: Kohlenhydratgehalte [g/L] in Maische, Würze und Bier durch Bestimmung mit HPLC-FLD nach Derivatisierung mit 1-Naphthylamin.¹⁸⁶

Kohlenhydrat	Maische	Würze	Bier
D-Ribose (1)	0,1	0,1	0,04
L-Arabinose/D-Xylose (2)	0,3	0,2	0,08
D-Glucose (3)	16,5	9,2	0,03
Maltose (4)	80	41,3	0,07
Maltotriose (5)	9,3	7,8	0,7
Isomaltose (6)	0,6	0,4	0,9
Maltotetraose (7)	10,1	5,5	5,1
Maltopentaose (8)	3,8	2,6	2,6
Maltohexaose (9)	2,7	1,6	1,7
Maltoheptaose (10)	1,2	0,9	1,0

Im fertigen Bier ändert sich das Bild sehr stark. Maltose und Glucose sind nur noch in Spuren nachweisbar, da sie fast vollständig von der Hefe verstoffwechselt werden. Pentosen können ebenfalls als Substrat dienen. Dieser Prozess läuft jedoch in Gegenwart von Glucose deutlich langsamer ab.¹⁸⁸ Maltotriose wird nur zu ca. 90 % umgesetzt, da hier Transportproteine den limitierenden Faktor für die Resorption darstellen.⁵² Im Gegensatz dazu verbleiben Oligomere mit mehr als drei Glucose-Einheiten in nahezu unveränderter Konzentration im Bier. Offensichtlich findet hier keine Verstoffwechslung durch die Hefe statt, sodass die Ursache kohlenhydratabhängiger Reaktionen während der Alterung von Bier vor allem in höhermolekularen Dextrinen zu sehen ist. Diese stellen damit den Gegenstand der folgenden Untersuchungen dar.

4.2. Bedeutung des Maillard-induzierten Abbaus von Dextrinen auf die Alterung von Bier

Während der Abbau von Monosacchariden unter Maillard-Bedingungen schon in großem Umfang untersucht wurde, existieren für Oligosaccharide nur wenige Studien. Lediglich die Reaktivität von Maltose, Maltotriose, und Lactose wurde bisher in mechanistischen Experimenten betrachtet.⁸⁶⁻⁸⁸ Zu Maltotetraose, dem dominierenden Kohlenhydrat in Bier (vgl. Tabelle 8), bzw. dessen folgenden Homologen existieren in der Literatur noch keine entsprechenden Daten. Um den Abbau oligomerer Kohlenhydrate zu untersuchen, wurden Dextrine mit bis zu sieben Glucoseeinheiten in Gegenwart von Prolin und Lysin inkubiert. Die Bestimmung reaktiver Intermediate und stabiler Endprodukte in Modellversuchen und im Bier ermöglicht einen umfassenden Überblick zu den Veränderungen während der Bieralterung.

Furfural und Hydroxymethylfurfural (HMF) sind geeignete Marker für die thermische Belastung von Bier bzw. dessen Lagerung.^{24,89,189-191} Der direkte Vorläufer von HMF ist das

3-Desoxyglucoson (3-DG), welches bereits als dominierende α -Dicarbonyl-Verbindung in Bier identifiziert werden konnte.^{71,73} Der Bildungsweg von Furfural ist noch nicht eindeutig geklärt. Einerseits wird die Oxidation von Furfurylalkohol diskutiert.⁸⁹ Andererseits werden in der Literatur Pentosen als Vorläufer angesehen.¹⁷ Der direkte Vorläufer zu Furfural, 3-Desoxypentosen (3-DP), kann zwar im Laufe der Maillard-Reaktion auf nicht oxidativem Weg aus Pentosen gebildet werden. Diese Kohlenhydrate spielen im abgefüllten Bier jedoch kaum eine Rolle (vgl. Tabelle 8).¹⁸⁶ 3-DP wurde allerdings beim Abbau von Oligosacchariden unter Maillard-Bedingungen als ein wichtiges α -Dicarbonyl nachgewiesen.^{86,88} In diesem Zusammenhang wurde das oxidativ gebildete Maltoson als Vorläufer für 3-DP in Maltose-Lysin-Inkubationen identifiziert.⁸⁸ Somit ist eine oxidative Bildung von Furfural aus Oligosacchariden während der Alterung von Bier als sehr wahrscheinlich anzusehen. Ein entsprechender Reaktionsmechanismus sowie die detaillierte Beschreibung und Diskussion der experimentellen Vorgehensweise und der Ergebnisse sind in der Veröffentlichung „*Investigations on the Maillard Reaction of Dextrins during Aging of Pilsner Type Beer*“ (Anhang C) zu finden.¹⁹²

Ein weiteres Augenmerk der vorliegenden Veröffentlichung lag auf der Identifizierung von Aminosäuremodifikation in Bier. Bislang wurde einzig Argpyrimidin im Bier nachgewiesen.¹⁰⁴ In diesem Zusammenhang sind ferner zwei Lysinmodifikationen bekannt, die jedoch nur in Bierretentat in sehr geringen Mengen nachgewiesen wurden.¹⁹³ Die untersuchten Parameter der Modellinkubation umfassten die Veränderungen des Kohlenhydratprofils, die Bestimmung von bis zu 21 α -Dicarbonylverbindungen, die Alterungs- bzw. Erhitzungsparameter Furfural und HMF sowie je zwei Lysin- und Prolinmodifikationen. Im Folgenden wird die Bildung von Furfural und der Prolin-Aminosäuremodifikationen eingehend diskutiert.

Aus den Modellinkubationen geht hervor, dass die Gehalte der α -Dicarbonyle bei neutralen pH-Werten und der Gegenwart von Lysin am höchsten sind. Ein niedriger pH-Wert führt zur Protonierung der Aminosäuren und somit zu geringerer Reaktivität im Sinne der Maillard-Reaktion.¹⁹⁴ Zusätzlich weist Lysin eine höhere Aktivität auf, da die ϵ -Aminofunktion ein vergleichsweise stärkeres Nucleophil darstellt. Weiterhin erfordert der Abbau des Prolin-Amadori-Produkts mehr Energie als der von primären Aminosäuren.¹⁹⁵ Eine Ausnahme bildet 3-DG, das unabhängig von der verwendeten Aminosäure bevorzugt bei niedrigen pH-Werten, also säurekatalysiert, gebildet wird. Die Ergebnisse der Modellinkubationen bestätigen überwiegend die beobachteten Veränderungen des Alterungsversuchs.

Unter der Annahme, dass Furfural aus 3-DP entsteht, welches wiederum aus dem Oxyoson entsteht, wird in Anlehnung an den Abbau von Maltose der in Abbildung 15 dargestellte Mechanismus postuliert.⁸⁸

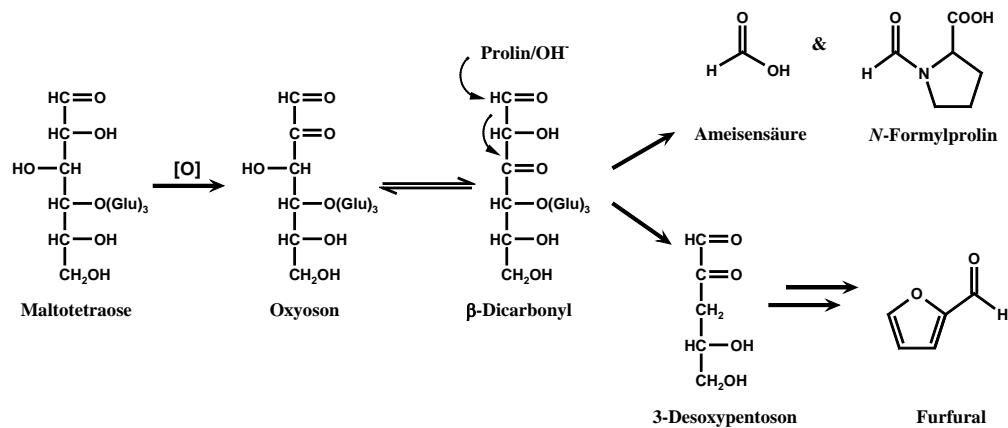


Abbildung 15: Postulierte Bildung von Furfural unter oxidativen Bedingungen aus dem Abbau von Maltotetraose in Anlehnung an Smuda et al..⁸⁸

Die Oxidation von Maltotetraose ergibt das Oxyoson, welches zum β -Dicarbonyl tautomerisiert. Anschließend greifen Nucleophile wie das Hydroxidion oder Prolin am C1 des β -Dicarbonyls an. Die hydrolytische β -Dicarbonylsplaltung führt zur Bildung von Ameisensäure bzw. Formylprolin (FP) sowie zu einem intermediären C5-Zucker, der nun an Position 3 mit Maltotriose glykosidisch verknüpft ist. Durch die β -Eliminierung von Maltotriose entsteht 3-DP, welches nach Zyklisierung und Wasserabspaltung zu Furfural reagiert.

In Abbildung 16 ist die Bildung der oben genannten Abbauprodukte bei anaeroben und aeroben Bedingungen zu sehen. Die Bildung von Ameisensäure und FP zeigt einen ähnlichen Verlauf. Dadurch kann auf einen identischen Bildungsmechanismus geschlossen werden. Dass Ameisensäure in höheren molaren Ausbeuten entsteht, ist auf die bessere Nucleophilie des Hydroxidions zurückzuführen. Die verstärkte Bildung unter aeroben Bedingungen bestätigt den in Abbildung 15 dargestellten Mechanismus. Aus den Kurven ist zu entnehmen, dass sowohl Ameisensäure als auch FP in größerem Ausmaß auch durch nicht näher charakterisierte anaerobe Reaktionen entstehen. 3-DP zeigt dagegen eine deutliche Sauerstoffabhängigkeit und wird aus Oligosacchariden fast ausschließlich oxidativ gebildet. Dies gilt auch für Furfural, dessen Bildung unter diesen Bedingungen einen ähnlichen Verlauf wie 3-DP aufweist.

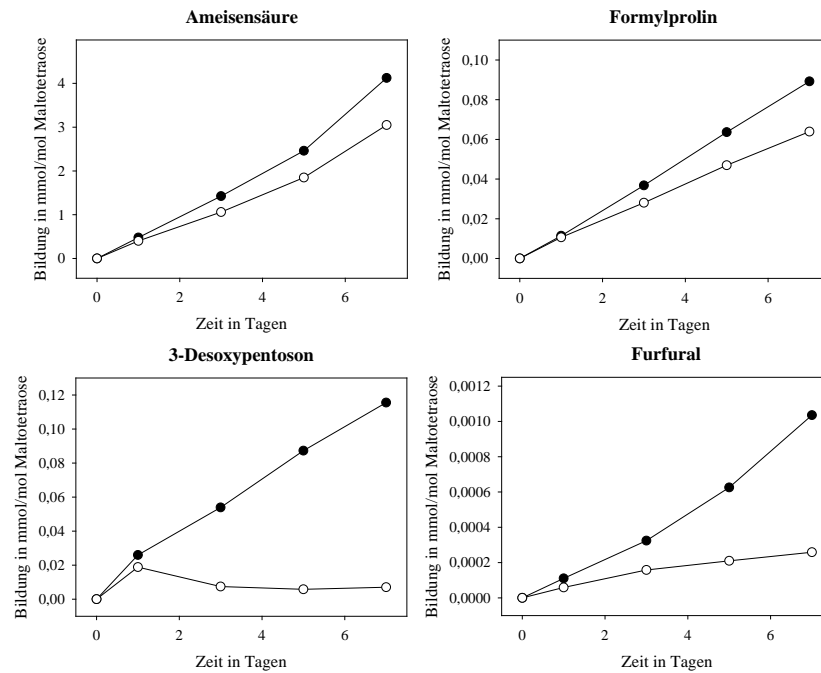


Abbildung 16: Bildungskurven von wichtiger Abbauprodukte von Maltotetraose in Gegenwart von Prolin bei pH=7 unter aeroben (geschlossene Symbole) und anaeroben (offene Symbole) Bedingungen.¹⁹²

Ob diese Ergebnisse auf Bier übertragbar sind, wurde in einem Alterungsexperiment untersucht. Neben einem original verschlossenen Bier wurden Bierproben zusätzlich oxidativem Stress ausgesetzt, indem der Gasraum über der Flüssigkeit mit Luft gespült und die Flasche anschließend wieder verschlossen wurde. Das Bier wurde anschließend für zwei Wochen bei 50°C forciert gealtert. Die Ergebnisse für 3-DP, FP und Furfural sind in Abbildung 17 dargestellt.

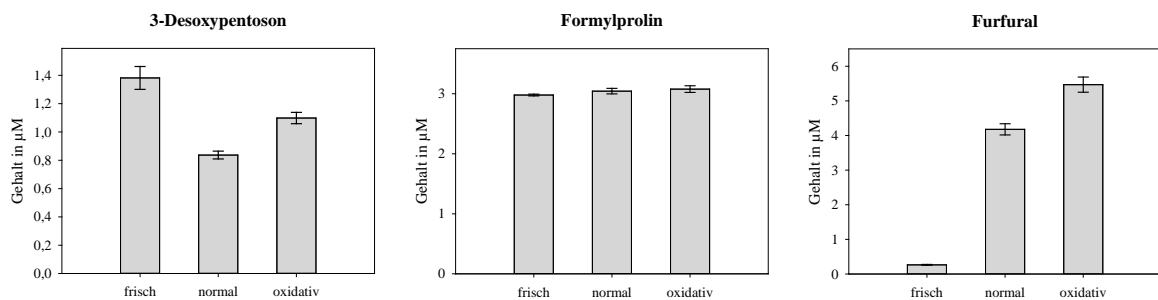


Abbildung 17: Gehalte von 3-Desoxypentosen, Formylprolin und Furfural in frischem, normal und oxidativ gealtertem Bier (Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, n=3).¹⁹²

Während der Alterung nahm der Gehalt von 3-DP ab. Das ist auf die hohe Reaktivität der α -Dicarbonyl zurückzuführen. Parallel zum Abbau findet auch eine Neubildung von 3-DP statt. Der Gehalt in oxidativ belastetem Bier ist signifikant gegenüber dem normal gealterten Bier erhöht. Dieser Unterschied ist mit dem im Modellversuch gezeigtem oxidativen Abbau von Oligosacchariden zu erklären. Die Gehalte von FP unterscheiden sich hingegen kaum, da bereits in frischen Bier große Mengen zu finden sind. Zwar nimmt FP leicht zu, eignet

sich aber nicht als Marker für die thermische Belastung bzw. den oxidativen Stress bei der Bieralterung. Der Gehalt von Furfural nimmt dagegen um das 20-fache zu und weist ebenfalls eine bevorzugte Bildung unter oxidativen Bedingungen auf. Die Stoffmengenbilanz von 3-DP und Furfural zeigt, dass das entstehende Furfural nicht allein aus dem im frischen Bier vorhandenen 3-DP stammen kann ($1,4 \mu\text{M}$ vs. $5,5 \mu\text{M}$). Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass durch den Abbau der Dextrine kontinuierlich neues 3-DP gebildet werden muss, welches wiederum zu Furfural führt.

Neben FP konnte *N*-Carboxymethylprolin (CMP) als weitere Aminosäuremodifikation in Modellinkubationen und im Bier identifiziert werden. Die Bildung erfolgt analog zu dem in Lebensmitteln bereits gut untersuchten *N*^c-Carboxymethyllysin, welches bereits als Marker der Maillard-Reaktion und für die thermische Belastung von Lebensmitteln etabliert ist.^{27,196} Diese Lysinmodifikation kann direkt durch die oxidative Fragmentierung des Amadori-Produkts bzw. aus der Reaktion mit Glyoxal bzw. Glykolaldehyd entstehen.^{197,198} Da Prolin die dominierende Aminosäure in Bier darstellt, ist die Bildung von CMP während der Alterung von Bier als wahrscheinlich anzusehen. In Modellinkubationen wurde CMP fast ausschließlich unter oxidativen Bedingungen gebildet (Abbildung 18, **A**). Dies deutet auf vergleichbare Mechanismen hin, die auch für die Bildung von *N*^c-Carboxymethyllysin verantwortlich sind. Im Bier entstehen durch oxidativen Stress ebenfalls signifikant höhere Mengen CMP als in den normal gealterten Proben (Abbildung 18, **B**).

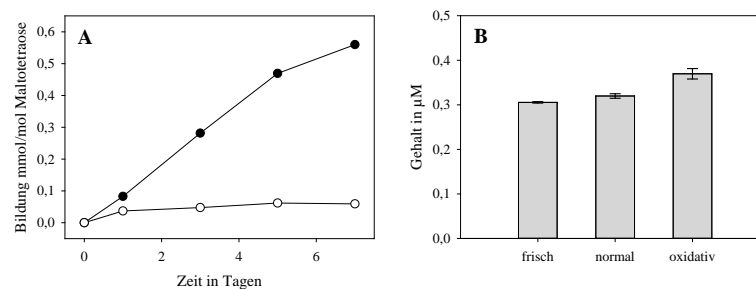


Abbildung 18: Bildung von *N*-Carboxymethylprolin in Modellinkubation von Maltotetraose in Gegenwart von Prolin (A, pH=7, aerob: offene Symbole, anaerob: geschlossene Symbole) und während der Alterung von Bier (B).¹⁹²

Durch die Modellinkubation und den Alterungsversuchs konnten wichtige Intermediate des Abbaus von Dextrinen identifiziert werden, die zu maßgeblichen Veränderungen der Zusammensetzung während der Bieralterung führen. Weiterhin konnte der eindeutige Beweis erbracht werden, dass die Bildung des etablierten Alterungsmarkers Furfural durch oxidative Bedingungen gefördert wird. Zwei neue Prolin-Aminosäuremodifikationen wurden erstmals

in Bier als stabile Abbauprodukte von Dextrinen im Bier identifiziert. Davon eignet sich allein CMP als Marker für oxidativen Stress.

4.3. Mechanistische Untersuchungen zur Bildung von kurzkettigen Carbonsäuren und Carbonsäureamiden aus Isohumulonen

Die in dieser Arbeit im Fokus stehenden verzweigten Carbonsäuren aus der gesättigten Seitenkette der Isohumulone sowie die 4-Methyl-3-pentensäure wurden bereits in Hopfen und Bier identifiziert.^{161,170,172} Williams und Wagner konnten zudem feststellen, dass die Säuren unter oxidativen Bedingungen gebildet werden und gehopfte Biere höhere Konzentrationen im Zuge der Alterung aufweisen.¹⁷² Jedoch wurde noch kein Reaktionsmechanismus präsentiert, der die Entstehung aus den Isohumulonen zufriedenstellend beschreibt.

Isohumulone stellen strukturell betrachtet β -Dicarbonylverbindungen dar. Deren Reaktionsverhalten wurde bereits in anderen Lebensmitteln mit der Entstehung von kurzkettigen Carbonsäuren in Zusammenhang gebracht. So konnten Davidek et al. beweisen, dass Essigsäure eines der Hauptabbauprodukte des 1-Desoxyglucosons, einem reaktiven Intermediat der Maillard-Reaktion, ist.¹⁹⁹ Dieser Mechanismus ist in Abbildung 19 dargestellt. Nach der Enolisierung des 1-Desoxyglucosons in die β -Dicarbonylform kommt es zum nukleophilen Angriff eines Hydroxid-Ions an Position 2 und somit zur Spaltung zwischen Position 2 und 3. Als Gegenstück zur Essigsäure entsteht D-Erythrose. Das Prinzip der hydrolytischen β -Dicarbonylspaltung lässt sich auch auf andere Nukleophile übertragen. Smuda et al. konnten die Bildung von *N*^ε-Acetyllysin (Essigsäureamid) aus 1-Desoxyglucoson nachweisen und schlossen auf einen Bildungsweg analog dem der Essigsäure.²⁰⁰

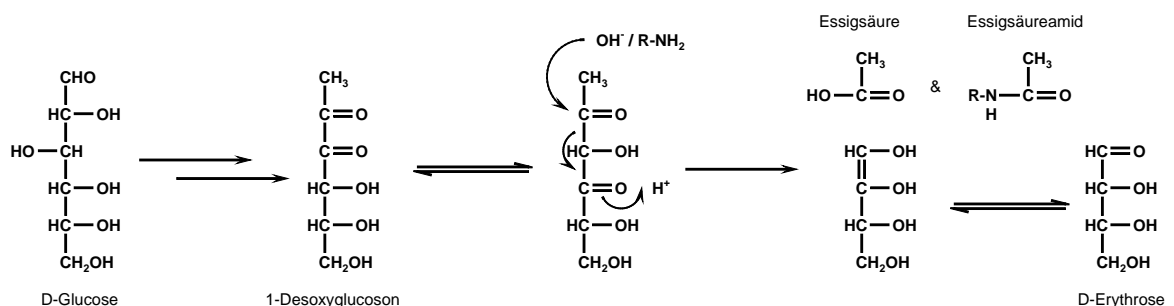


Abbildung 19: Bildung von Essigsäure und Essigsäureamid durch β -Dicarbonylspaltung aus 1-Desoxyglucoson nach Davidek et al. und Smuda et al..^{199,200}

Die Bildung der Carbonsäureamide ist demnach ein sehr starker Hinweis darauf, dass eine hydrolytische β -Dicarbonylspaltung vorliegt. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, ob die Bildung von kurzkettigen Carbonsäuren aus Isohumulonen auf diesem Weg erfolgt. Die detaillierte Beschreibung und Diskussion der experimentellen Vorgehens-

weise und der Ergebnisse sind in der Veröffentlichung „*Oxidation of Isohumulones Induces the Formation of Carboxylic Acids by Hydrolytic Cleavage*“ (Anhang B) zu finden.²⁰¹

Für die Modellversuche wurde *n*-Humulon aus Hopfenextrakt isoliert und zu *trans*-Isohumulon isomerisiert. Nach Aufreinigung wurde reines *trans*-Isohumulon in Gegenwart von L-Prolin inkubiert. Um mechanistische Aussagen zu erhalten, wurden die Inkubationen bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Zum einen wurde der pH-Wert variiert (pH 5, pH 7), zum anderen wurden die Inkubation unter aeroben und anaeroben Konditionen durchgeführt. Die Proben wurden bis zu 21 Tage bei 50 °C inkubiert. Die untersuchten Parameter umfassten die Bestimmung des in der Inkubation verbliebenen *trans*-Isohumulons, der freien Carbonsäuren 3-Methylbuttersäure (MBA) und 4-Methyl-3-pentensäure (MPA), die den Säuren entsprechenden Prolin-Amide *N*-3-Methylbutyrylprolinamid (MBA-Amid) und *N*-4-Methyl-3-pentenylprolinamid (MPA-Amid) und die Isohumulon-Abbauprodukte *trans*-Humulinsäure und 4-Hydroxy-*trans*-alloisohumulon. Die Standardsubstanzen wurden durch unabhängige Synthesen dargestellt bzw. aus *trans*-Isohumulon-Inkubationen isoliert. Die Zeit-Umsatz-Kurven von *trans*-Isohumulon, MBA, MBA-Amid und MPA sind in Abbildung 20 zu sehen.

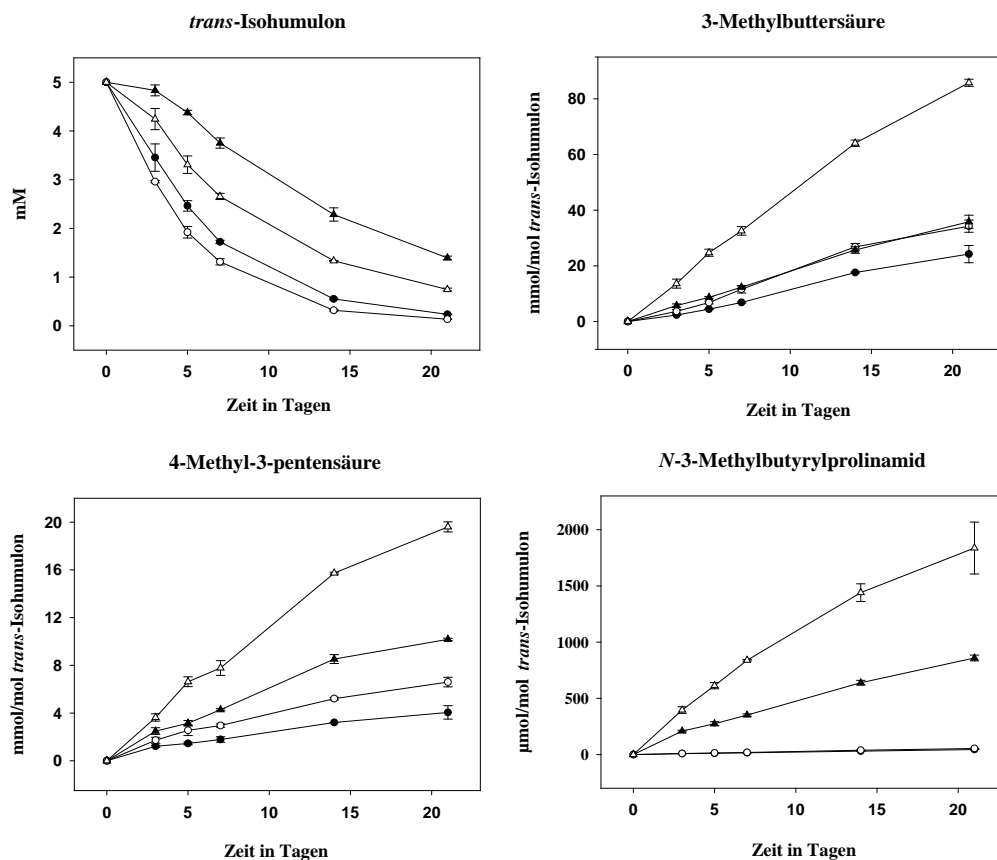


Abbildung 20: Verlauf des Abbaus von *trans*-Isohumulon und der Bildung von 3-Methylbuttersäure (MBA), 4-Methyl-3-pentensäure (MPA) und *N*-3-Methylbutyrylprolinamid (MBA-Amid) bei pH= 7 (oxidativ \triangle , nicht oxidativ \blacktriangle) und pH= 5 (oxidativ \circ , nicht oxidativ \bullet).²⁰¹

trans-Isohumulon wurde bei pH = 5 am stärksten abgebaut, wobei der oxidative Einfluss gering ist. Bei neutralem pH-Wert hingegen ist der Abbau unter aeroben Bedingungen deutlich bevorzugt. Bei der Bildung der Carbonsäuren wurden sowohl bei MBA als auch bei MPA die höchsten Gehalte bei pH = 7 und oxidativen Bedingungen nachgewiesen. MBA stellt mit rund 86 mmol/mol *trans*-Isohumulon (8,6 mol-%) ein Hauptabbauprodukt von *trans*-Isohumulon dar. Auch unter leicht sauren Bedingungen werden noch große Mengen MBA gebildet (3,4 mol-%). Für MPA liegen die Gehalte deutlich niedriger und erreichen maximal 2 mol-%. Die entsprechenden Amide wurden in erheblich geringeren Mengen nachgewiesen (maximal 0,2 mol-% für MBA-Amid), was auf die geringere Nucleophilie von Prolin im Vergleich zum Hydroxidion zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz sind die Amide für mechanistische Aussagen von großer Bedeutung. So sind die Konzentrationsverhältnisse zwischen oxidativen und nicht oxidativen Bedingungen von MBA und MBA-Amid in den neutralen Inkubationen nahezu identisch, wodurch auf den gleichen Bildungsmechanismus geschlossen werden kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Carbonsäuren bevorzugt mit steigendem pH-Wert und unter oxidativen Bedingungen gebildet werden. Zur Erklärung können drei mögliche Reaktionsmechanismen postuliert werden: ein rein oxidativer Mechanismus, ein rein hydrolytischer Mechanismus und eine Kombination aus Oxidation und Hydrolyse. Der rein oxidative Weg kann durch die Bildung der Carbonsäureamide ausgeschlossen werden. Gegen einen rein hydrolytischen Mechanismus spricht die Tatsache, dass die Carbonylaktivität der gesättigten Substituenten, aus denen MBA entsteht, gering sein sollte. Isohumulone sind organische Säuren mit einem pK_s -Wert von 3,23 und unter den gewählten Bedingungen nahezu vollständig deprotoniert.¹³⁴ Die resultierende Ladungsverteilung über das β,β' -Tricarbonylsystems von *trans*-Isohumulon und die damit verbundene Verringerung der Carbonylaktivität hemmt den Angriff eines Nucleophils und spricht somit gegen die verstärkte Bildung von Carbonsäuren bei neutralen Bedingungen im Sinne einer hydrolytischen β -Dicarbonylsplaltung.

Auf Grundlage der Ergebnisse wird daher der in Abbildung 21 dargestellte kombinierte Mechanismus postuliert, der die erhöhten Konzentrationen der Carbonsäuren unter oxidativen Bedingungen berücksichtigt. Das bei neutralem pH-Wert vorliegende Humulat-Ion ist sehr elektronenreich und somit oxidationsempfindlich. Die metallkatalysierte Oxidation führt zu einem am zentralen Kohlenstoffatom lokalisierten Radikal, welches bereits von Huavere et al. beschrieben wurde.²⁰² Die Anlagerung von Triplett-Sauerstoff führt, analog zum Mechanismus der Autoxidation von Lipiden, zum Peroxyradikal, welches nach Abstraktion

eines Wasserstoffatoms zum Hydroperoxid reagiert. Die im Sinne einer Fenton-Reaktion folgende Spaltung des Hydroperoxids liefert das Alkoxyradikal, welches nach einer erneuten Wasserstoffabstraktion zum Alkohol wird. Dieses zentral substituierte *trans*-Isohumulon-Derivat hat die Fähigkeit zur Enolisierung verloren, was eine gesteigerte Carbonylaktivität zur Folge hat. Die hydrolytische β -Dicarbonylspaltung nach Angriff eines Nukleophils am Carbonyl-Kohlenstoff der Seitenketten liefert MBA (**2a**) und MPA (**3a**) im Falle des Hydroxidions bzw. die entsprechenden Carbonsäureamide im Falle von Prolin.

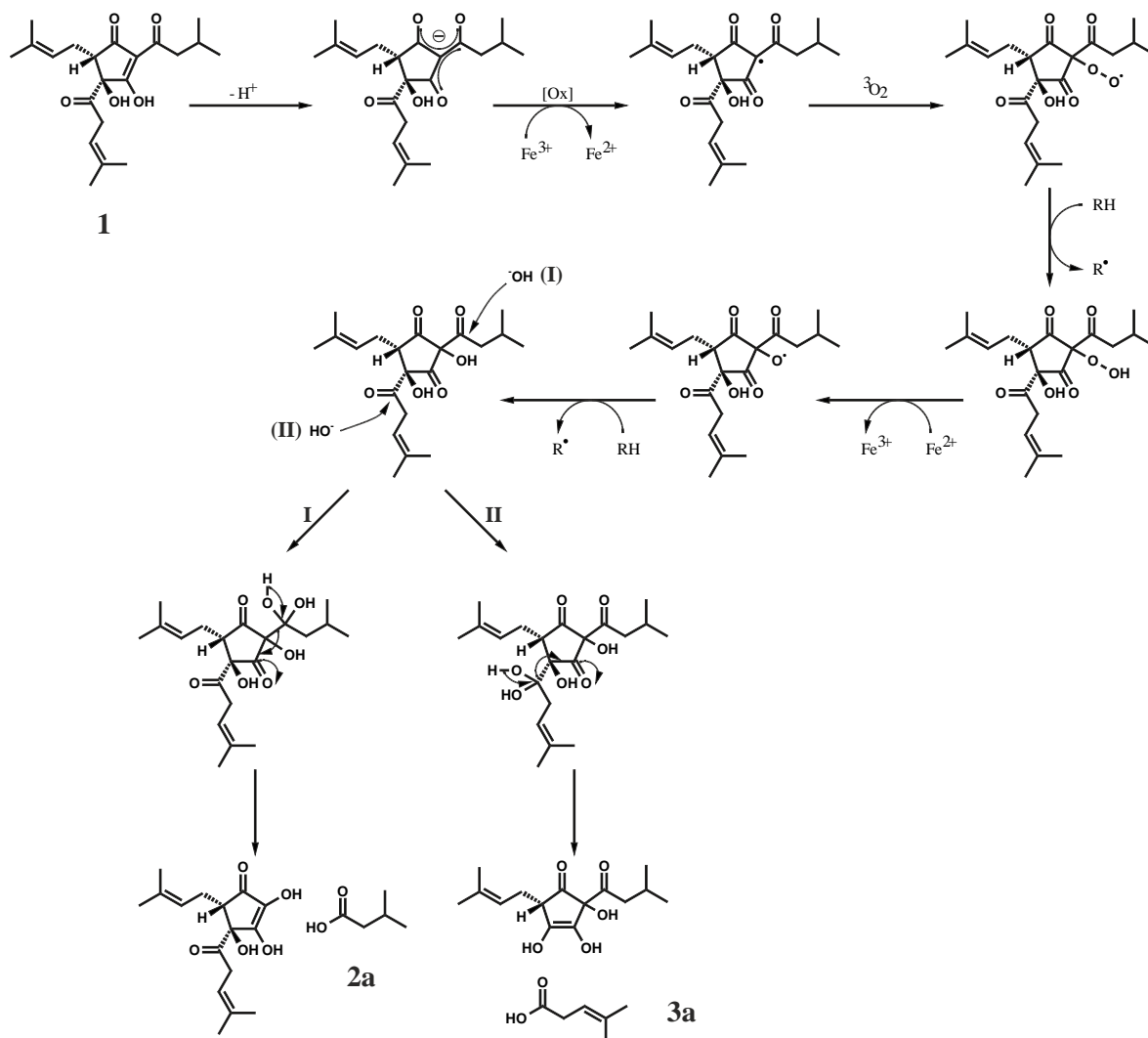


Abbildung 21: Postulierter Mechanismus zur Bildung von 3-Methylbuttersäure (**2a**) und 4-Methyl-3-pentensäure (**3a**) aus *trans*-Isohumulon (**1**) durch hydrolytische β -Dicarbonylspaltung (**I** & **II**) nach Oxidation des Isohumulon-Ringes (übernommen aus Rakete et al.).²⁰¹

Ein Nachweis der zugehörigen Fragmentierungsgegenstücke und des damit eindeutigen Beweises des vorgeschlagenen Mechanismus steht aufgrund deren Reaktivität und vermuteten Instabilität noch aus. So ist das postulierte Gegenstück zu MBA eine Reduktonstruktur und ebenfalls sehr oxidationsempfindlich. Um den vorgeschlagenen Mechanismus der

hydrolytischen β -Dicarbonylsplaltung zu stärken, wurde ein Stabilisotopen-Experiment durchgeführt. Dabei wurde das normale Wasser durch H_2^{18}O ausgetauscht. Liegt ein hydrolytischer Mechanismus vor, müsste das schwere Sauerstoff-Isotop in die Carbonsäuren eingebaut werden. Bei einem oxidativen Weg ist dagegen kein Einbau zu erwarten. Tatsächlich ließ sich in der Inkubation mit H_2^{18}O zu 90 % die „schwere“ Säure finden. Die restlichen 10 % können durch den Einbau von molekularem Sauerstoff auf bisher nicht beschriebenen Wegen erklärt werden. Zusammen mit dem Nachweis der Amide untermauert das Stabilisotopen-Experiment den postulierten Mechanismus als Kombination von Oxidation und Hydrolyse. Dass der oben beschriebene Abbau im Brauprozess bzw. bei der Alterung von Bier eine Rolle spielt, wurde durch die Identifizierung der Prolinamide in Pilsener Bier bestätigt.

Anhand dieser Ergebnisse konnte ein plausibler Mechanismus vorgelegt werden, der die Bildung von aromaaktiven, kurzkettigen Carbonsäuren aus Isohumulonen erklärt. Der tatsächliche Einfluss dieses Abbauweges kann noch nicht abschließend bewertet werden, da die Säuren auch durch den Abbau von Aminosäuren entstehen können. Da die thermische und oxidative Belastung während der Würzekochung sehr stark ist, entstehen hier möglicherweise größere Mengen der Carbonsäuren, die während der Gärung verestert werden. Diese Ester wurden bereits spezifisch für gehopfte Biere nachgewiesen.⁹³ Durch die Bildung der Amide konnte gezeigt werden, dass auch andere Nucleophile als das Hydroxidion mit Isohumulonen reagieren können. So kann z.B. durch den Angriff von schwefelhaltigen Nucleophilen die Bildung des im Bier vorkommenden *S*-Methylthioisovalerat erklärt werden.¹²⁶

5. Zusammenfassung der Dissertation

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Reaktionen, die während der Alterung von Bier stattfinden. Bier ist ein komplexes Lebensmittel, das während thermischer Belastung und langer Lagerzeit erheblichen chemischen und sensorischen Veränderungen unterliegt. Da der frische Eindruck von Bier so lange wie möglich gewährleistet sein soll, stellen diese Reaktionen für Brauereien ein großes Problem dar. Es ist daher essentiell, die der Bieralterung zugrundeliegenden chemischen Reaktionen zu verstehen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Abbau der im Bier nachweisbaren Kohlenhydrate, der Dextrine, zu charakterisieren. Des Weiteren lag der Fokus dieser Dissertation auf der Untersuchung der Reaktivität von Hopfenbittersäuren.

Da die Analytik von Dextrinen eine spezielle Instrumentierung erfordert, sollte eine alternative Methode entwickelt werden, die sowohl eine einfache Aufarbeitung und die Anwendung der weit verbreiteten *reversed phase* HPLC beinhaltet. Weiterhin musste das Analyseverfahren empfindlich genug sein, um die Zielstrukturen im Spurenbereich sicher nachweisen zu können. Durch die reduktive Aminierung mit 1-Naphthylamin konnte die Polarität der Dextrine so weit verändert werden, dass eine Trennung von Kohlenhydraten mit bis zu sieben Glucose-Einheiten möglich war. Die Verwendung von Heptafluorbuttersäure als Ionenpaarreagenz im Laufmittel erlaubte die Verwendung eines Fluoreszenz-Detektors, da es das Derivatierungsreagenz aus dem Elutionsbereich der Dextrine verschiebt. Neben der empfindlichen Fluoreszenz-Detektion wurde die Massenspektrometrie zur Charakterisierung unbekannter Dextrine genutzt. Auf diese Weise wurden Kohlenhydrate mit bis zu 16 Glucose-Einheiten im Bier nachgewiesen. Nach der Validierung der Methode wurde sie erfolgreich für die Charakterisierung und Veränderung des Kohlenhydratprofils während des Brauprozesses angewendet. Es zeigte sich, dass im fertigen Bier fast ausschließlich Dextrine mit vier oder mehr Glucose-Einheiten nachweisbar waren und diese Verbindungen als Edukte für die Maillard-Reaktion, also der Reaktion von Kohlenhydraten mit Aminokomponenten, angesehen werden können. Aus der Erforschung der Bieralterung ist bekannt, dass die Maillard-Reaktion einen signifikanten Einfluss auf die Veränderungen in gealtertem Bier hat.

Die Reaktivität von Dextrinen wurde jedoch im Zusammenhang mit der Bieralterung nur in geringem Umfang untersucht. Zur Aufklärung des Reaktionsverhaltens dieser Kohlenhydrate wurden Modellinkubationen und gealtertes Bier eingehend untersucht. Die Dextrine Maltotetraose bis Maltoheptaose wurden in Gegenwart von Prolin inkubiert. Diese Aminosäure

stellt im Sinne der Maillard-Reaktionen den wichtigsten Reaktionspartner im Bier dar. Zusätzlich wurde der Einfluss von Lysin untersucht, um eine weitere für Lebensmittel bedeutende Aminosäure zu berücksichtigen. Für mechanistische Aussagen wurden die Inkubationen bei neutralen und bierähnlichen sowie oxidativen und nicht oxidativen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse aus den Modellinkubationen wurden mit denen aus einer forcierten Alterung von Bier verglichen. Neben den Kohlenhydraten wurden bis zu 21 α -Dicarbonylverbindungen, vier Aminosäuremodifikation, von denen die Prolin-Modifikationen neuartig sind, sowie die Alterungs- und Erhitzungsparameter Furfural und Hydroxymethylfurfural im Bier und Modellsystem bestimmt.

Wie zu erwarten, wurden die Dextrine bei niedrigen pH-Werten deutlich langsamer abgebaut, da die Reaktivität der Aminofunktion abnimmt. Auch die Bildung der α -Dicarbonyle war bei höheren pH-Werten begünstigt. Eine Ausnahme bildete das 3-Desoxyglucoson, das aus Dextrinen fast ausschließlich und unabhängig von der anwesenden Aminosäure unter leicht sauren Bedingungen und auf nicht oxidativem Wege gebildet wurde. Dies gilt somit auch für das daraus entstehende Folgeprodukt Hydroxymethylfurfural. Im Gegensatz dazu bildete sich der Vorgänger von Furfural, das 3-Desoxypentosen, bevorzugt aminkatalysiert und unter oxidativen Bedingungen. Furfural selbst zeigte eine vergleichbare Abhängigkeit. Somit geht die Bildung von Furfural im Bier nicht wie bisher angenommen von Pentosen aus, sondern wird durch den aminkatalysierten oxidativen Abbau von Dextrinen verursacht. Der Reaktionsmechanismus wurde in einem Alterungsversuch mit Bier bestätigt. Weiterhin wurden zwei bisher nicht beschriebene Prolin-Aminosäuremodifikationen in den Modellinkubationen und im Bier nachgewiesen. Davon eignet sich *N*-Carboxymethylprolin als Marker für oxidativen Belastung, da es sowohl in den Modellinkubationen als auch im Bier bei aeroben Bedingungen gebildet wird.

Die Bildung von kurzkettigen verzweigten Fettsäuren aus Isohumulonen, vor allem unter oxidativen Bedingungen, wurde bereits in der Literatur beschrieben. Jedoch konnte bisher kein Mechanismus zu deren Bildung vorgelegt werden. Isohumulone sind β -Dicarbonylverbindungen und zeigen das gleiche Reaktionsverhalten, wie es bereits bei den reaktiven Intermediaten der Maillard-Reaktion bekannt ist. Innerhalb dieser komplexen Reaktionsfolge wurde die Bildung von Carbonsäuren durch hydrolytische β -Dicarbonylsplaltung nachgewiesen. In diesem Zusammenhang ist die amininduzierte Bildung der entsprechenden Carbonsäureamide ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Carbonsäuren durch hydrolytische β -Dicarbonylsplaltung gebildet werden.

In Modellversuchen wurde isoliertes *trans*-Isohumulon in Gegenwart von Prolin inkubiert. Die aus den Seitenketten des *trans*-Isohumulon stammenden verzweigten Carbonsäuren 3-Methylbuttersäure und 4-Methyl-3-pentensäure wurden vor allem bei höheren pH-Werten und unter oxidativen Bedingungen gebildet. Ein rein oxidativer Mechanismus wurde durch die Bildung der Carbonsäureamide ausgeschlossen. Die Bildung der Carbonsäureamide zeigte zudem die gleiche oxidative Abhängigkeit wie die Säuren. Beide Strukturen werden also durch die gleichen Mechanismen gebildet. In dem Stabilisotopenexperiment mit $^{18}\text{H}_2\text{O}$ wurde der schwere Sauerstoff fast vollständig in die Carbonsäuren eingebaut. Der finale Schritt der Spaltung muss daher hydrolytisch erfolgen. Die durch Enolisierung verringerte Carbonylaktivität des *trans*-Isohumulons bei höheren pH-Werten spricht jedoch gegen einen rein hydrolytischen Mechanismus. Aufgrund der Ergebnisse geht der in dieser Dissertation postulierte Mechanismus zunächst von einer Oxidation des Isohumulonringes aus. Dadurch geht die Fähigkeit zur Enolisierung verloren und die Carbonylaktivität der Seitenketten wird erhöht. Die anschließende hydrolytische β -Dicarbonylspaltung liefert die Carbonsäuren und deren Amide. Der Nachweis der Carbonsäureamide in Bier zeigt zusätzlich, dass diese Reaktion im Brauprozess relevant ist.

Die grundlegenden Erkenntnisse der vorliegenden Dissertation erweitern das bisherige Wissen zur Bieralterung. Es wurde gezeigt, dass der Abbau von Dextrinen und Hopfenbittersäuren entscheidend bei Veränderungen der chemischen Zusammensetzung von Bier beteiligt ist. Das Verständnis der dafür verantwortlichen Reaktionen soll den Brauereien helfen, die Stabilität von Bier weiter zu verbessern.

6. Summary

This Ph.D. thesis deals with the role of important beer ingredients during the aging of beer. Beer is a very complex beverage which undergoes several chemical and sensoric changes due to thermal induced stress and prolonged storage. These alterations may lead to off-flavors and reduced consumer acceptance. Thus, beer aging is of major concern for the brewing industry. The fundamental understanding of the reactions occurring during the storage of beer is critical to improve its shelf-life stability. Therefore the reactivity of beer relevant carbohydrates, in particular dextrans, and hop bitter acids was studied in detail within this thesis.

To analyze the carbohydrate profile during the production of beer a powerful HPLC method was developed. The reductive amination of carbohydrates with 1-naphthylamine allowed the analysis of dextrans on commonly used reversed phase HPLC coupled to sensitive fluorescence detection or mass spectrometry, respectively. The elution of 1-naphthylamine was delayed by the ion pair reagent heptafluorobutyric acid. Therefore, it did not interfere with the target analytes. All used carbohydrates were quantitated in mash, wort and beer. Additionally, the application of mass spectrometry provides structural information of unknown carbohydrates. Dextrans with up to 16 glucose units were identified in beer. Glucose, maltose and maltotriose were the dominant carbohydrates in mash and wort. However, only traces were found in bottled beer. In contrast, dextrans with four or more glucose units were identified as the major carbohydrates in bottled beer. It is well known that the Maillard reaction has a significant impact on the aging of beer. Consequently, dextrans must be evaluated as the major source of Maillard related reactions in bottled beer.

As dextrans are the main carbohydrates in Pilsner type beer their actual influence during the aging of beer is still a matter of concern. In contrast to monosaccharides the reactivity of oligosaccharides under Maillard conditions has rarely been investigated. To enlighten the reaction behavior individual dextrans were incubated in the presence of proline. This amino acid is the most relevant reactant for Maillard reactions in beer. Lysine was also reacted as this amino acid is relevant for other foods. In parallel a forced beer aging experiment was performed and compared to the model incubations. The determination of reactive intermediates and stable endproducts delivered an in-depth view into the chemical changes during beer aging.

Generally the degradation of carbohydrates was preferred at higher pH values. However, 3-deoxyglucosone was the only α -dicarbonyl generated in model incubations preferentially

at low pH. 3-Deoxyglucosone and therefore its follow-up product hydroxymethylfurfural must be formed by acid catalyzed nonoxidative mechanisms. The origin of furfural during the aging of beer remains still unclear. Pentoses are an accepted source of furfural, even though they are of low relevance to beer as these carbohydrates were only found in low concentrations. The direct precursor 3-deoxypentosone is indeed a follow-up product of pentose. However, recent studies revealed oligosaccharides as a major source of 3-deoxypentosone. In the model incubations 3-deoxypentosone was confirmed as an important α -dicarbonyl compound from dextrans. It was generated exclusively under oxidative conditions. Furfural showed the same dependency. This behavior was also confirmed in the forced aging experiment. Conclusively, dextrans must be considered to be the major source of furfural in beer and other carbohydrate related degradation reactions. Additionally, two novel proline derived amino acid modification were identified and quantitated in beer. *N*-Carboxymethylproline responded strongly to oxygen in model incubations and beer and is therefore suggested as a novel marker for thermal and oxidative stress in beer.

The formation of branched carboxylic acids was related to the degradation of isohumulones. However, no reaction mechanism was presented so far. Isohumulones are β -dicarbonyl compounds. These structures are already known in the context of Maillard reaction. In this reaction cascade β -dicarbonyl compounds generate carboxylic acids via hydrolytic β -dicarbonyl cleavage. Furthermore, the parallel identification of the respective carboxylic acid amides is a strong support for the hydrolytic β -dicarbonyl cleavage.

For an insight into the degradation mechanisms *trans*-isohumulone was incubated in the presence of proline. The carboxylic acids 3-methylbutyric acid and 4-methyl-3-pentenoic acid were generated preferably under oxidative conditions and increasing pH. The formation of carboxylic acid amides excluded a purely oxidative mechanism. The formation of amides showed also the same dependence on oxygen. Therefore, a similar reaction mechanism must be assumed for both, carboxylic acids and amides. A stable isotope experiment with H_2^{18}O revealed an almost complete incorporation of ^{18}O into the carboxylic acids. Thus, the last step of fragmentation has to be hydrolytic. However, the low reactivity of the isohumulone side chain at neutral pH contradicts the preferred formation of carboxylic acids under these conditions. On the basis of these results a mechanism combining oxidation and hydrolysis was proposed. The oxidation of the isohumulone ring structure increases the reactivity of the β -dicarbonyl structure. Subsequent hydrolytic β -dicarbonyl cleavage gives the carboxylic acid and their respective amides. The identification of the carboxylic acid amides in beer underpinned the importance of this mechanism for beer brewing.

The fundamental results of this thesis expand the knowledge on beer aging. It has been demonstrated that the degradation of dextrins and hop bitter acids significantly influences the changes in the composition of beer during aging. The understanding of the involved reaction mechanisms will help the brewing industry to improve the shelf-life stability of beer.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Hornsey, I. S. *A history of beer and brewing*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2003**.
- (2) Statista, Bierkonsum in Deutschland, *de.statista.com*, **2014**.
- (3) Engan, S. Some changes in beer flavour during ageing, *Journal of the Institute of Brewing*. **1969**, *75*, pp. 371–376.
- (4) Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. The chemistry of beer aging – a critical review, *Food Chemistry*. **2006**, *95*, pp. 357–381.
- (5) Meilgaard, M. C.; Dalglish, C. E.; Clapperton, J. F. Beer flavour terminology 1, *Journal of the Institute of Brewing*. **1979**, *85*, pp. 38–42.
- (6) Stephenson, W. H.; Bamforth, C. W. The Impact of Lightstruck and Stale Character in Beers on their Perceived Quality: A Consumer Study, *Journal of the Institute of Brewing*. **2002**, *108*, pp. 406–409.
- (7) Maarse, H. *Volatile compounds in foods and beverages*; CRC Press: New York, **1991**.
- (8) Fritsch, H. T.; Schieberle, P. Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a Bavarian Pilsner-type beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, pp. 7544–7551.
- (9) Miyazawa, T.; Gallagher, M.; Preti, G.; Wise, P. M. Synergistic mixture interactions in detection of perithreshold odors by humans, *Chemical Senses*. **2008**, *33*, pp. 363–369.
- (10) Kaltner, D.; Steinhaus, M.; Mitter, W.; Biendl, M.; Schieberle, P. (R)-Linalool as key flavour for hop aroma in beer and its behaviour during beer staling, *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. **2003**, *56*, pp. 192–196.
- (11) Takoi, K.; Koie, K.; Itoga, Y.; Katayama, Y.; Shimase, M.; Nakayama, Y.; Watari, J. Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, *58*, pp. 5050–5058.
- (12) Narziss, L.; Back, W. *Abriss der Bierbrauerei*, 7. Auflage.; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.
- (13) Intelmann, D.; Batram, C.; Kuhn, C.; Haseleu, G.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Three TAS2R Bitter Taste Receptors Mediate the Psychophysical Responses to Bitter Compounds of Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer, *Chemosensory Perception*. **2009**, *2*, pp. 118–132.
- (14) Dalglish, C. E. Flavour Stability, *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*. **1977**, pp. 623–659.
- (15) Zufall, C.; Racioppi, G.; Gasparri, M.; Franquiz, J. Flavour stability and ageing characteristics of light-stable beers. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*. **2005**, pp. 68.

-
- (16) Intelmann, D.; Haseleu, G.; Dunkel, A.; Lagemann, A.; Stephan, A.; Hofmann, T. Comprehensive Sensomics Analysis of Hop-Derived Bitter Compounds during Storage of Beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, *59*, pp. 1939–1953.
- (17) Baert, J. J.; De Clippeleer, J.; Hughes, P. S.; De Cooman, L.; Aerts, G. On the Origin of Free and Bound Staling Aldehydes in Beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, *60*, pp. 11449–11472.
- (18) Vermeulen, C.; Lejeune, I.; Tran, T. T. H.; Collin, S. Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*, pp. 5061–5068.
- (19) Tran, T. T. H.; Nizet, S.; Gros, J.; Collin, S. Occurrence of the ribes odorant 3-sulfanyl-3-methylbutyl formate in aged beers, *Flavour and Fragrance Journal*. **2013**, *28*, pp. 174–179.
- (20) Siebert, K. J.; Carrasco, A.; Lynn, P. Y. Formation of Protein–Polyphenol Haze in Beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, *44*, pp. 1997–2005.
- (21) Steiner, E.; Arendt, E. K.; Gastl, M.; Becker, T. Influence of the malting parameters on the haze formation of beer after filtration, *European Food Research and Technology*. **2011**, *233*, pp. 587–597.
- (22) Speers, R. A.; Jin, Y.-L.; Paulson, A. T.; Stewart, R. J. Effects of β -Glucan, Shearing and Environmental Factors on the Turbidity of Wort and Beer, *Journal of the Institute of Brewing*. **2003**, *109*, pp. 236–244.
- (23) Steiner, E.; Becker, T.; Gastl, M. Turbidity and Haze Formation in Beer - Insights and Overview, *Journal of the Institute of Brewing*. **2010**, *116*, pp. 360–368.
- (24) Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Coghe, S.; Verstrepen, K. J.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, *51*, pp. 6782–6790.
- (25) Bamforth C.W. Brewing and brewing research: past, present and future, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, *80*, pp. 1371–1378.
- (26) O'Brien, R.; Fowkes, N.; Bassom, A. P. Models for gibberellic acid transport and enzyme production and transport in the aleurone layer of barley, *Journal of Theoretical Biology*. **2010**, *267*, pp. 15–21.
- (27) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6. Auflage; Springer: Berlin, **2008**.
- (28) Fincher, G. B. Morphology and chemical composition of barley endosperm cell walls, *Journal of the Institute of Brewing*. **1975**, *81*, pp. 116–122.
- (29) Fontana, M.; Buiatti, S. Amino Acids in Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*; Academic Press: San Diego, **2009**, pp. 273–284.
- (30) Celus, I.; Brijs, K.; Delcour, J. A. The effects of malting and mashing on barley protein extractability, *Journal of Cereal Science*. **2006**, *44*, pp. 203–211.

-
- (31) Allosio-Ouarnier, N.; Quemener, B.; Bertrand, D.; Boivin, P. Application of High Performance Anion Exchange Chromatography to the Study of Carbohydrate Changes in Barley During Malting, *Journal of the Institute of Brewing*. **2000**, *106*, pp. 45–52.
- (32) Hämäläinen, J. J.; Reinikainen, P. A Simulation Model for Malt Enzyme Activities in Kilning, *Journal of the Institute of Brewing*. **2007**, *113*, pp. 159–167.
- (33) Fickert, B.; Schieberle, P. Identification of the key odorants in barley malt (caramalt) using GC/MS techniques and odour dilution analyses, *Nahrung*. **1998**, *42*, pp. 371–375.
- (34) Dong, L.; Piao, Y.; Zhang, X.; Zhao, C.; Hou, Y.; Shi, Z. Analysis of volatile compounds from a malting process using headspace solid-phase micro-extraction and GC–MS, *Food Research International*. **2013**, *51*, pp. 783–789.
- (35) Yahya, H.; Linforth, Robert S T; Cook, D. J. Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: a time course study, *Food Chemistry*. **2014**, *145*, pp. 378–387.
- (36) Chevance, F.; Guyot-Declerck, C.; Dupont, J.; Collin, S. Investigation of the β -Damascenone Level in Fresh and Aged Commercial Beers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, *50*, pp. 3818–3821.
- (37) Tressl, R.; Renner, R.; Apetz, M. Flüchtige phenolische Verbindungen in Bier, Rauchbier und Sherry, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. **1976**, *162*, pp. 115–122.
- (38) Drost, B. W.; van den Berg, R.; Freijee, F.; van der Welde, E.G.; Hollemans, M. Flavor Stability, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **1990**, *48*, pp. 124–132.
- (39) Samaras, T. S.; Camburn, P. A.; Chandra, S. X.; Gordon, M. H.; Ames, J. M. Antioxidant properties of kilned and roasted malts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, pp. 8068–8074.
- (40) Woffenden, H. M.; Ames, J. M.; Chandra, S. Relationships between Antioxidant Activity, Color, and Flavor Compounds of Crystal Malt Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, *49*, pp. 5524–5530.
- (41) Carvalho, D. O.; Correia, E.; Lopes, L.; Guido, L. F. Further insights into the role of melanoidins on the antioxidant potential of barley malt, *Food Chemistry*. **2014**, *160*, pp. 127–133.
- (42) Hoff, S.; Lund, M. N.; Petersen, M. A.; Jespersen, B. M.; Andersen, M. L. Influence of malt roasting on the oxidative stability of sweet wort, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, *60*, pp. 5652–5659.
- (43) Kunz, T.; Strähmel, A.; Cortes, N.; Kroh, L.; Methner, F. Influence of Intermediate Maillard Reaction Products with Enediol Structure on the Oxidative Stability of Beverages, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **2013**, *71*, pp. 114–123.
- (44) Coghe, S.; Gheeraert, B.; Michiels, A.; Delvaux, F. R. Development of Maillard Reaction Related Characteristics During Malt Roasting, *Journal of the Institute of Brewing*. **2006**, *112*, pp. 148–156.

-
- (45) Coghe, S.; Adriaenssens, B.; Leonard, S.; Delvaux, F. R. Fractionation of Colored Maillard Reaction Products from Dark Specialty Malts, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **2004**, *62*, pp. 79–86.
- (46) Briggs, D. E. *Brewing. Science and practice*; CRC Press; Cambridge, England, **2004**.
- (47) Brandam, C.; Meyer, X. M.; Proth, J.; Strehaiano, P.; Pingaud, H. An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing, *Biochemical Engineering Journal*. **2003**, *13*, pp. 43–52.
- (48) Stenholm, K.; Home, S. A New Approach to Limit Dextrinase and its Role in Mashing, *Journal of the Institute of Brewing*. **1999**, *105*, pp. 205–210.
- (49) Scheffler, A.; Bamforth, C. W. Exogenous β -glucanases and pentosanases and their impact on mashing, *Enzyme and Microbial Technology*. **2005**, *36*, pp. 813–817.
- (50) Osman, A. M.; Coverdale, S. M.; Onley-Watson, K.; Bell, D.; Healy, P. The Gel Filtration Chromatographic-Profiles of Proteins and Peptides of Wort and Beer: Effects of Processing - Malting, Mashing, Kettle Boiling, Fermentation and Filtering, *Journal of the Institute of Brewing*. **2003**, *109*, pp. 41–50.
- (51) Didier, M.; Bénédicte, B. Soluble Proteins of Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*; Academic Press: San Diego, **2009**, pp. 265–271.
- (52) Zastrow, C. R.; Hollatz, C.; de Araujo, P S; Stambuk, B. U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **2001**, *27*, pp. 34–38.
- (53) Ernandes, J. R.; D'Amore, T.; Russell, I.; Stewart, G. G. Regulation of glucose and maltose transport in strains of *Saccharomyces*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **1992**, *9*, pp. 127–130.
- (54) Ferreira, I. M. P. L. V. O. Beer Carbohydrates. *Beer in Health and Disease Prevention*; Academic Press: San Diego, **2009**, pp. 291–298.
- (55) Kanauchi, M.; Ishikura, W.; Bamforth, C. W. β -Glucans and Pentosans and their Degradation Products in Commercial Beers, *Journal of the Institute of Brewing*. **2011**, *117*, pp. 120–124.
- (56) Jones, E. W. Three proteolytic systems in the yeast *saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*. **1991**, *266*, pp. 7963–7966.
- (57) Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verstrepen, K. J.; Delvaux, F. R.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. Influence of the Brewing Process on Furfuryl Ethyl Ether Formation during Beer Aging, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, *52*, pp. 6755–6764.
- (58) Saison, D.; De Schutter, David P.; Uyttenhove, B.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds, *Food Chemistry*. **2009**, *114*, pp. 1206–1215.
- (59) Sakuma, S.; Kowaka, M. Flavor Characteristics of cis-3-Nonenal in Beer, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **1994**, *52*, pp. 37–41.

-
- (60) Lermusieau, G.; Noel, S.; Liegeois, C.; Collin, S. Nonoxidative Mechanism for Development of trans-2-Nonenal in Beer, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **1999**, *57*, pp. 29–33.
- (61) Maillard, L. C. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. **1912**, *154*, pp. 66–68.
- (62) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Formation of α -dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. **1998**, *207*, pp. 50–54.
- (63) Ramasamy, R.; Vannucci, S. J.; Yan, Shirley Shi Du; Herold, K.; Yan, S. F.; Schmidt, A. M. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation, *Glycobiology*. **2005**, *15*, pp. 16–28.
- (64) Nagaraj, R. H.; Linetsky, M.; Stitt, A. W. The pathogenic role of Maillard reaction in the aging eye, *Amino Acids*. **2012**, *42*, pp. 1205–1220.
- (65) Tessier, F. J.; Birlouez-Aragon, I. Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies, *Amino Acids*. **2012**, *42*, pp. 1119–1131.
- (66) Hodge, J. E. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1953**, *1*, pp. 928–943.
- (67) Heyns, K.; Paulsen, H.; Eichstedt, R.; Rolle, M. Über die Gewinnung von 2-Amino-Aldosen Durch Umlagerung von Ketosylaminen, *Chemische Berichte*. **1957**, *90*, pp. 2039–2049.
- (68) Meitinger, M.; Hartmann, S.; Schieberle, P. Development of stable isotope dilution assays for the quantitation of Amadori compounds in foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**, *62*, pp. 5020–5027.
- (69) Ledl, F.; Schleicher, E. Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin, *Angewandte Chemie*. **1990**, *102*, pp. 597–626.
- (70) Smuda, M.; Glomb, M. A. Fragmentation pathways during Maillard-induced carbohydrate degradation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, *61*, pp. 10198–10208.
- (71) Bravo, A.; Herrera, J. C.; Scherer, E.; Ju-Nam, Y.; Rübsam, H.; Madrid, J.; Zufall, C.; Rangel-Aldao, R. Formation of α -Dicarbonyl Compounds in Beer during Storage of Pilsner, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, *56*, pp. 4134–4144.
- (72) Moreira, N.; Meireles, S.; Brandão, T.; de Pinho, Paula Guedes Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers, *Talanta*. **2013**, *117*, pp. 523–531.
- (73) Degen, J.; Hellwig, M.; Henle, T. 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, *60*, pp. 7071–7079.
- (74) Yamaguchi, M.; Ishida, J.; Xuan, Z. X.; Nakamura, A.; Yoshitake, T. Determination of Glyoxal, Methylglyoxal, Diacetyl, and 2, 3-Pentanedione in Fermented Foods by High-

- Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *Journal of Liquid Chromatography*. **1994**, *17*, pp. 203–211.
- (75) Martins, A. M. T. B. S.; Cordeiro, C. A. A.; Ponces Freire, A. M. J. In situ analysis of methylglyoxal metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*. **2001**, *499*, pp. 41–44.
- (76) Niyati-Shirkhodaee, F.; Shibamoto, T. Gas chromatographic analysis of glyoxal and methylglyoxal formed from lipids and related compounds upon ultraviolet irradiation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1993**, *41*, pp. 227–230.
- (77) Rizzi, G. P. The Strecker Degradation of Amino Acids: Newer Avenues for Flavor Formation, *Food Reviews International*. **2008**, *24*, pp. 416–435.
- (78) Hofmann, T.; Münch, P.; Schieberle, P. Quantitative Model Studies on the Formation of Aroma-Active Aldehydes and Acids by Strecker-Type Reactions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, *48*, pp. 434–440.
- (79) Cremer, D. R.; Vollenbroeker, M.; Eichner, K. Investigation of the formation of Strecker aldehydes from the reaction of Amadori rearrangement products with α -amino acids in low moisture model systems, *European Food Research and Technology*. **2000**, *211*, pp. 400–403.
- (80) Hidalgo, F. J.; Zamora, R. Strecker-type degradation produced by the lipid oxidation products 4,5-epoxy-2-alkenals, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, *52*, pp. 7126–7131.
- (81) Soares da Costa, M; Gonçalves, C.; Ferreira, A.; Ibsen, C.; Guedes de Pinho, P; Silva Ferreira, A C Further insights into the role of methional and phenylacetaldehyde in lager beer flavor stability, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, *52*, pp. 7911–7917.
- (82) Shu, C.-K. Pyrazine Formation from Serine and Threonine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, *47*, pp. 4332–4335.
- (83) Antal, M. J.; Mok, W. S.; Richards, G. N. Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from d-fructose and sucrose, *Carbohydrate Research*. **1990**, *199*, pp. 91–109.
- (84) Antal, M. J.; Leesomboon, T.; Mok, W. S.; Richards, G. N. Mechanism of formation of 2-furaldehyde from d-xylose, *Carbohydrate Research*. **1991**, *217*, pp. 71–85.
- (85) Gobert, J.; Glomb, M. A. Degradation of Glucose: Reinvestigation of Reactive α -Dicarbonyl Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, *57*, pp. 8591–8597.
- (86) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. 3-Deoxypentosulose: An α -Dicarbonyl Compound Predominating in Nonenzymatic Browning of Oligosaccharides in Aqueous Solution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, *50*, pp. 1659–1664.
- (87) Mavric, E.; Henle, T. Isolation and identification of 3,4-dideoxypentosulose as specific degradation product of oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages, *European Food Research and Technology*. **2006**, *223*, pp. 803–810.

-
- (88) Smuda, M.; Glomb, M. A. Novel Insights into the Maillard Catalyzed Degradation of Maltose, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, *59*, pp. 13254–13264.
- (89) Carneiro, J. R.; Guido, L. F.; Almeida, P. J.; Rodrigues, J. A.; Barros, A. A. The impact of sulphur dioxide and oxygen on the behaviour of 2-furaldehyde in beer: an industrial approach, *International Journal of Food Science and Technology*. **2006**, *41*, pp. 545–552.
- (90) Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Daenen, L.; Verstrepen, K. J.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. Furfuryl ethyl ether: important aging flavor and a new marker for the storage conditions of beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, *52*, pp. 1661–1668.
- (91) De Schutter, David P; Saison, D.; Delvaux, F.; Derdelinckx, G.; Rock, J.-M.; Neven, H.; Delvaux, F. R. Characterization of volatiles in unhopped wort, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, *56*, pp. 246–254.
- (92) Mori, M.; Ito, K. Effects of pH on the Formation of Volatile Products in Non-Enzymatic Browning of Maltose, *Food Science and Technology Research*. **2004**, *10*, pp. 60–64.
- (93) Kishimoto, T.; Wanikawa, A.; Kono, K.; Shibata, K. Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*, pp. 8855–8861.
- (94) Cämmerer, B.; Jalyschko, W.; Kroh, L. W. Intact Carbohydrate Structures as Part of the Melanoidin Skeleton, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, *50*, pp. 2083–2087.
- (95) Hofmann, T. Identification of Novel Colored Compounds Containing Pyrrole and Pyrrolinone Structures Formed by Maillard Reactions of Pentoses and Primary Amino Acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1998**, *46*, pp. 3902–3911.
- (96) Knerr, T.; Lerche, H.; Pischetsrieder, M.; Severin, T. Formation of a Novel Colored Product during the Maillard Reaction of d -Glucose, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, *49*, pp. 1966–1970.
- (97) Nikolov, P. Y.; Yaylayan, V. A. Reversible and covalent binding of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) with lysine and selected amino acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, *59*, pp. 6099–6107.
- (98) Murata, M.; Totsuka, H.; Ono, H. Browning of furfural and amino acids, and a novel yellow compound, furpilate, formed from lysine and furfural, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **2007**, *71*, pp. 1717–1723.
- (99) Kuntcheva, M. J.; Obretenov, T. D. Isolation and characterization of melanoidins from beer, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. **1996**, *202*, pp. 238–243.
- (100) Jégou, S.; Douliez, J.-P.; Mollé, D.; Boivin, P.; Marion, D. Evidence of the Glycation and Denaturation of LTP1 during the Malting and Brewing Process, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, *49*, pp. 4942–4949.

-
- (101) Laštovičková, M.; Mazanec, K.; Benkovská, D.; Bobál'ová, J. Utilization of the Linear Mode of MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Study of Glycation During the Malting Process, *Journal of the Institute of Brewing*. **2010**, *116*, pp. 245–250.
- (102) Petry-Podgórska, I.; Žídková, J.; Flodrová, D.; Bobálová, J. 2D-HPLC and MALDI-TOF/TOF analysis of barley proteins glycated during brewing, *Journal of Chromatography B*. **2010**, *878*, pp. 3143–3148.
- (103) Bobálová, J.; Petry-Podgórska, I.; Laštovičková, M.; Chmelík, J. Monitoring of malting process by characterization of glycation of barley protein Z, *European Food Research and Technology*. **2010**, *230*, pp. 665–673.
- (104) Glomb, M. A.; Rösch, D.; Nagaraj, R. H. N δ -(5-Hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine-2-yl)-L-ornithine, a Novel Methylglyoxal–Arginine Modification in Beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, *49*, pp. 366–372.
- (105) Edwardson, J. R. Hops—Their botany, history, production and utilization, *Economic Botany*. **1952**, *6*, pp. 160–175.
- (106) Barth, H. J.; Klinke, C.; Schmidt, C. *Der grosse Hopfenatlas. Geschichte und Geographie einer Kulturpflanze*; Hans Carl Fachverlag: Nürnberg, **1994**.
- (107) Verhagen, L. C., Ed. *Comprehensive Natural Products II. Beer Flavor*; Elsevier: Amsterdam, **2010**.
- (108) Benitez, J. L.; Forster, A.; De Keukeleire, D.; Moir, M.; Sharpe, F. R.; Verhagen, L. C. *Hops and hop products. Manual of good practice*; Hans Carl Fachverlag: Nürnberg, **1997**.
- (109) Aerts, G.; De Cooman, L.; De Rouck, G.; Goiris, K. Use of hop polyphenols in beer, Patent US 2007/0254063 A1, **2007**.
- (110) Li, H.-J.; Deinzer, M. L. Structural identification and distribution of proanthocyanidins in 13 different hops, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*, pp. 4048–4056.
- (111) Stevens, J. F.; Taylor, A. W.; Nickerson, G. B.; Ivancic, M.; Henning, J.; Haunold, A.; Deinzer, M. L. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol, *Phytochemistry*. **2000**, *53*, pp. 759–775.
- (112) Gerhäuser, C. Phenolic Beer Compounds to Prevent Cancer. *Beer in Health and Disease Prevention*; Academic Press: San Diego, **2009**, pp. 669–684.
- (113) Magalhães, P. J.; Guido, L. F.; Cruz, J. M.; Barros, A. A. Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *29th International Symposium on Capillary Chromatography*. **2007**, *1150*, pp. 295–301.
- (114) Magalhães, P. J.; Dostalek, P.; Cruz, J. M.; Guido, L. F.; Barros, A. A. The Impact of a Xanthohumol-Enriched Hop Product on the Behavior of Xanthohumol and Isoxanthohumol in Pale and Dark Beers: A Pilot Scale Approach, *Journal of the Institute of Brewing*. **2008**, *114*, pp. 246–256.

- (115) Aron, P. M.; Schellhammer, T. H. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability, *Journal of the Institute of Brewing*. **2010**, *116*, pp. 369–380.
- (116) Rehmanji, M.; Gopal, C.; Mola, A. Beer Stabilization Technology-Clearly a Matter of Choice, *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas*. **2005**, *42*, pp. 332–338.
- (117) Mikyska, A.; Hrabak, M.; Haskova, D.; Srogl, J. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability, *Journal of the Institute of Brewing*. **2002**, *108*, pp. 78–85.
- (118) Gerhäuser, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents, *Cancer Chemoprevention*. **2005**, *41*, pp. 1941–1954.
- (119) Haas, G. J.; Barsoumian, R. Antimicrobial activity of hop resins, *Journal of Food Protection*. **1994**, *57*, pp. 59–61.
- (120) Evans, D. E.; Finn, J. E. C.; Robinson, L. H.; Eglinton, J. K.; Sheehy, M.; Stewart, D. C. The Effects of Hop- α -Acids and Proline-Specific Endoprotease (PSEP) Treatments on the Foam Quality of Beer, *Journal of the Institute of Brewing*. **2011**, *117*, pp. 335–342.
- (121) Kunimune, T.; Shellhammer, T. H. Foam-stabilizing effects and cling formation patterns of iso-alpha-acids and reduced iso-alpha-acids in lager beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, *56*, pp. 8629–8634.
- (122) Inui, T.; Tsuchiya, F.; Ishimaru, M.; Oka, K.; Komura, H. Different beers with different hops. Relevant compounds for their aroma characteristics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, *61*, pp. 4758–4764.
- (123) Steinhaus, M.; Schieberle, P. Comparison of the Most Odor-Active Compounds in Fresh and Dried Hop Cones (*Humulus lupulus* L. Variety Spalter Select) Based on GC-Olfactometry and Odor Dilution Techniques, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, *48*, pp. 1776–1783.
- (124) Sharpe, F. R.; Laws, D. R. J. The essential oil of hops, a review, *Journal of the Institute of Brewing*. **1981**, *87*, pp. 96–107.
- (125) van Opstaele, F.; Praet, T.; Aerts, G.; Cooman, L. de Characterization of novel single-variety oxygenated sesquiterpenoid hop oil fractions via headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, *61*, pp. 10555–10564.
- (126) Lermusieau, G.; Bulens, M.; Collin, S. Use of GC-Olfactometry to Identify the Hop Aromatic Compounds in Beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, *49*, pp. 3867–3874.
- (127) King, A. J.; Dickinson, J. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*, *Yeast*. **2000**, *16*, pp. 499–506.
- (128) King, A. J.; Dickinson, J. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts, *FEMS Yeast Research*. **2003**, *3*, pp. 53–62.

- (129) Tressl, R.; Friese, L.; Fendesack, F.; Kruger, E. Free fatty-acids in hops - rapid method to determine variety and shelf-life, *Monatsschrift für Brauerei*. **1978**, *31*, pp. 83–85.
- (130) Haley, J.; Peppard, T. L. Differences in utilisation of the essential oil of hops during the production of dry-hopped and late-hopped beers, *Journal of the Institute of Brewing*. **1983**, *89*, pp. 87–91.
- (131) Van Opstaele, F.; De Rouck, G.; De Clippeleer, J.; Aerts, G.; De Cooman, L. Analytical and Sensory Assessment of Hoppy Aroma and Bitterness of Conventionally Hopped and Advanced Hopped Pilsner Beers, *Journal of the Institute of Brewing*. **2010**, *116*, pp. 445–458.
- (132) De Keukeleire, D. Fundamentals of beer and hop chemistry, *Química Nova*. **2000**, *23*, pp. 108–112.
- (133) Intelmann, D.; Haseleu, G.; Hofmann, T. LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, *57*, pp. 1172–1182.
- (134) Simpson, W. J. Ionization behaviour of hop compounds and hop-derived compounds, *Journal of the Institute of Brewing*. **1993**, *99*, pp. 317–326.
- (135) Spetsig, L.-O.; Bjerrum, J.; Lundén, R.; Prydz, H. Electrolytic Constants and Solubilities of Humulinic Acid, Humulone, and Lupulone, *Acta Chemica Scandinavia*. **1955**, *9*, pp. 1421–1424.
- (136) Palamand, S. R.; Aldenhoff, J. M. Bitter tasting compounds of beer. Chemistry and taste properties of some hop resin compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1973**, *21*, pp. 535–543.
- (137) Fritsch, A.; Shellhammer, T.H. Alpha-Acids Do Not Contribute Bitterness to Lager Beer, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **2007**, *65*, pp. 26-28.
- (138) de Almeida, Natália E C; Homem-de-Mello, P.; De Keukeleire, D.; Cardoso, D. R. Reactivity of beer bitter acids toward the 1-hydroxyethyl radical as probed by spin-trapping electron paramagnetic resonance (EPR) and electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, *59*, pp. 4183–4191.
- (139) Gorjanović, S.; Pastor, F. T.; Vasić, R.; Novaković, M.; Simonović, M.; Milić, S.; Sužnjević, D. Electrochemical versus spectrophotometric assessment of antioxidant activity of hop (*Humulus lupulus* L.) products and individual compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, *61*, pp. 9089–9096.
- (140) Wietstock, P. C.; Shellhammer, T. H. Chelating Properties and Hydroxyl-scavenging Activities of Hop alpha- and Iso-alpha-acids, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **2011**, *69*, pp. 133–138.
- (141) de Almeida, Natália E C; do Nascimento, Eduardo S P; Cardoso, D. R. On the reaction of lupulones, hops β -acids, with 1-hydroxyethyl radical, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, *60*, pp. 10649–10656.

- (142) Van Cleemput, M.; Cattoor, K.; De Bosscher, K.; Haegeman, G.; De Keukeleire, D.; Heyerick, A. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds, *Journal of Natural Products*. **2009**, *72*, pp. 1220–1230.
- (143) Haseleu, G.; Lagemann, A.; Stephan, A.; Intelmann, D.; Dunkel, A.; Hofmann, T. Quantitative sensomics profiling of hop-derived bitter compounds throughout a full-scale beer manufacturing process, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, *58*, pp. 7930–7939.
- (144) De Keukeleire, D.; Verzele, M. The absolute configuration of the isohumulones and the humulinic acids, *Tetrahedron*. **1971**, *27*, pp. 4939–4945.
- (145) Urban, J.; Dahlberg, C. J.; Carroll, B. J.; Kaminsky, W. Absolute configuration of beer's bitter compounds, *Angewandte Chemie*. **2013**, *52*, pp. 1553–1555.
- (146) Alderweireldt, F.; Verzele, M.; Anteunis, M.; Dierckens, J. The isomerization products of humulone, *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*. **1965**, *74*, pp. 29–40.
- (147) Intelmann, D.; Kummerlöwe, G.; Haseleu, G.; Desmer, N.; Schulze, K.; Fröhlich, R.; Frank, O.; Luy, B.; Hofmann, T. Structures of storage-induced transformation products of the beer's bitter principles, revealed by sophisticated NMR spectroscopic and LC-MS techniques, *Chemistry*. **2009**, *15*, pp. 13047–13058.
- (148) Malowicki, M. G.; Shellhammer, T. H. Isomerization and degradation kinetics of hop (*Humulus lupulus*) acids in a model wort-boiling system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, pp. 4434–4439.
- (149) Jaskula, B.; Kafarski, P.; Aerts, G.; De Cooman, L. A kinetic study on the isomerization of hop α -acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, *56*, pp. 6408–6415.
- (150) Jaskula, B.; Aerts, G.; De Cooman, L. Potential impact of medium characteristics on the isomerisation of hop α -acids in wort and buffer model systems, *Food Chemistry*. **2010**, *123*, pp. 1219–1226.
- (151) Lance, D. G.; White, A. W.; Hildebrand, R. P.; Clarke, B. J. The effect of heat on metal humulate and isohumulate salts, *Journal of the Institute of Brewing*. **1975**, *81*, pp. 364–367.
- (152) Clarke, B. J.; Hildebrand, R. P. The isomerization of humulone: I Isolation of photoisohumulone, *Journal of the Institute of Brewing*. **1964**, *71*, pp. 26–36.
- (153) De Keukeleire, D.; Blondeel, G. M. The mechanism of the regio- and stereospecific photorearrangement of humulone to the beer bitter component trans isohumulone, *Tetrahedron Letters*. **1979**, *20*, pp. 1343–1346.
- (154) Sharpe, F. R.; Ormrod, I. H. L. Fast isomerisation of humulone by photo-reaction: preparation of an HPLC standard, *Journal of the Institute of Brewing*. **1991**, *97*, pp. 33–37.
- (155) De Cooman, L.; Aerts, G.; Overmeire, H.; De Keukeleire, D. Alterations of the profiles of iso- α -acids during beer ageing, marked instability of trans-iso- α -acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso- α -acids, *Journal of the Institute of Brewing*. **2000**, *106*, pp. 169–178.

- (156) King, B. M.; Duineveld, C. A. A Changes in bitterness as beer ages naturally, *Food Quality and Preference*. **1999**, *10*, pp. 315–324.
- (157) Intelmann, D.; Demmer, O.; Desmer, N.; Hofmann, T. O-18 Stable Isotope Labeling, Quantitative Model Experiments, and Molecular Dynamics Simulation Studies on the Trans-Specific Degradation of the Bitter Tasting Iso-alpha-acids of Beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, *57*, pp. 11014–11023.
- (158) Intelmann, D.; Hofmann, T. On the autoxidation of bitter-tasting iso-alpha-acids in beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, *58*, pp. 5059–5067.
- (159) Shoolery, J. N.; Verzele, M.; Alderweireldt, F. On the structure of humulinone, *Tetrahedron*. **1960**, *9*, pp. 271–274.
- (160) Taniguchi, Y.; Matsukura, Y.; Ozaki, H.; Nishimura, K.; Shindo, K. Identification and quantification of the oxidation products derived from α -acids and β -acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, *61*, pp. 3121–3130.
- (161) Clarke, B. J.; Hildebrand, R. P. The isomerization of Humulone: III. The degradation of isohumulone, *Journal of the Institute of Brewing*. **1967**, *73*, pp. 282–293.
- (162) Obata, Y.; Koshika, M.; Tanaka, H. ‘Sunlight’ Flavour of Beer, *Nature*. **1961**, *190*, pp. 635–636.
- (163) Bondeel, Georges M. A.; De Keukeleire, D.; Verzele, M. The photolysis of trans-isohumulone to dehydrohumulinic acid, a key route to the development of sunstruck flavour in beer, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*. **1987**, p. 2715.
- (164) Burns, C. S.; Heyerick, A.; De Keukeleire, D.; Forbes, M. D. E. Mechanism for formation of the lightstruck flavor in beer revealed by time-resolved electron paramagnetic resonance, *Chemistry*. **2001**, *7*, pp. 4553–4561.
- (165) Heyerick, A.; Zhao, Y.; Sandra, P.; Huvaere, K.; Roelens, F.; De Keukeleire, D. Photolysis of hop-derived trans-iso- α -acids and trans-tetrahydroiso- α -acids: product identification in relation to the lightstruck flavour of beer, *Photochemical and Photobiological Sciences*. **2003**, *2*, p. 306.
- (166) Heyerick, A.; Huvaere, K.; De Keukeleire, D.; Forbes, Malcolm D E Fate of flavins in sensitized photodegradation of isohumulones and reduced derivatives: studies on formation of radicals via EPR combined with detailed product analyses, *Photochemical and Photobiological Sciences*. **2005**, *4*, pp. 412–419.
- (167) Gros, J.; Collin, S. Identification of a new light-struck off-flavour in “light-stable” beers, *Cerevisia*. **2012**, *37*, pp. 10–14.
- (168) Hashimoto, N.; Eshima, T. Oxidative-Degradation of Isohumulones in Relation to Flavor Stability of Beer, *Journal of the Institute of Brewing*. **1979**, *85*, pp. 136–140.
- (169) De Clippeleer, J.; De Rouck, G.; De Cooman, L.; Aerts, G. Influence of the Hopping Technology on the Storage-induced Appearance of Staling Aldehydes in Beer, *Journal of the Institute of Brewing*. **2010**, *116*, pp. 381–398.

- (170) Green, C. P. The volatile water-soluble fraction of hop oil. I. Formation by the oxidation of soft resins, *Journal of the Institute of Brewing*. **1970**, 76, pp. 36–40.
- (171) Culik, J.; Horak, T.; Slaby, M.; Cejka, P.; Olsovska, J. Determination of short chain fatty acids isomers, the sensory active products of hops aging, in beer, *Kvasny Prumysl.* **2013**, 59, pp. 86–90.
- (172) Williams, R. S.; Wagner, H. P. Contribution of hop bitter substances to beer staling mechanisms, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **1979**, 37, pp. 13–19.
- (173) Regan, J. P.; Elvidge, J. A. Chemistry of hop constituents. Part XXXIII Reactions of β -acids, *Journal of the Institute of Brewing*. **1969**, 75, pp. 10–14.
- (174) Haseleu, G.; Intelmann, D.; Hofmann, T. Identification and RP-HPLC-ESI-MS/MS quantitation of bitter-tasting beta-acid transformation products in beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57, pp. 7480–7489.
- (175) Haseleu, G.; Intelmann, D.; Hofmann, T. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling, *Food Chemistry*. **2009**, 116, pp. 71–81.
- (176) Krofta, K.; Vrabcova, S.; Mikyska, A.; Jurkova, M. The Effect of Hop Beta Acids Oxidation Products on Beer Bitterness, *Kvasny Prumysl.* **2013**, 59, pp. 306–312.
- (177) Corradini, C.; Cavazza, A.; Bignardi, C. High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. **2012**, 2012, pp. 1–13.
- (178) Arfelli, G.; Sartini, E. Characterisation of brewpub beer carbohydrates using high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection, *Food Chemistry*. **2014**, 142, pp. 152–158.
- (179) Bruggink, C.; Maurer, R.; Herrmann, H.; Cavalli, S.; Hoefler, F. Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. **2005**, 1085, pp. 104–109.
- (180) Corradini, C.; Lantano, C.; Cavazza, A. Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2013**, 405, pp. 4591–4605.
- (181) Mauri, P.; Minoggio, M.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Pietta, P. Analysis of saccharides in beer samples by flow injection with electrospray mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2002**, 16, pp. 743–748.
- (182) Borromei, C.; Cavazza, A.; Merusi, C.; Corradini, C. Characterization and quantitation of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides in fermented milks by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Journal of Separation Science*. **2009**, 32, pp. 3635–3642.
- (183) Harvey, D. J. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*. **2011**, 879, pp. 1196–1225.

- (184) Lamari, F. N.; Kuhn, R.; Karamanos, N. K. Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis, *Journal of Chromatography B*. **2003**, 793, pp. 15–36.
- (185) O’Shea, M. G.; Samuel, M. S.; Konik, C. M.; Morell, M. K. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation, *Carbohydrate Research*. **1998**, 307, pp. 1–12.
- (186) Rakete, S.; Glomb, M. A. A novel approach for the quantitation of carbohydrates in mash, wort, and beer with RP-HPLC using 1-naphthylamine for precolumn derivatization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, 61, pp. 3828–3833.
- (187) Piraud, M.; Vianey-Saban, C.; Petritis, K.; Elfakir, C.; Steghens, J.-P.; Bouchu, D. Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2005**, 19, pp. 1587–1602.
- (188) Subtil, T.; Boles, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology for Biofuels*. **2012**, 5, p. 14.
- (189) Madigan, D.; Perez, A.; Clements, M. Furanic aldehyde analysis by HPLC as a method to determine heat-induced flavor damage to beer, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **1998**, pp. 146–151.
- (190) Li, M.; Yang, Z.; Yang, M.; Shan, L.; Dong, J. Determination of Furfural in Beer by High Performance Liquid Chromatography with Solid Phase Extraction, *Journal of the Institute of Brewing*. **2009**, pp. 226–231.
- (191) Varmuza, K.; Steiner, I.; Glinsner, T.; Klein, H. Chemometric evaluation of concentration profiles from compounds relevant in beer ageing, *European Food Research and Technology*. **2002**, 215, pp. 235–239.
- (192) Rakete, S.; Klaus, A.; Glomb, M. A. Investigations on the Maillard Reaction of Dextrins during Aging of Pilsner Type Beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**.
- (193) Hellwig, M.; Henle, T. Quantification of the Maillard reaction product 6-(2-formyl-1-pyrrolyl)-L-norleucine (formyl-line) in food, *European Food Research and Technology*. **2012**, 235, pp. 99–106.
- (194) Martins, S. I.; Van Boekel, Martinus A.J.S. Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction pathways: influences of pH and reactant initial concentrations, *Food Chemistry*. **2005**, 92, pp. 437–448.
- (195) Zhang, P.-J.; Zhao, Z.-G.; Yu, S.-J.; He, S.-Z. Degradation of N-(1-Deoxy-d-xylulos-1-yl)glycine and N-(1-Deoxy-d-xylulos-1-yl)proline using thermal treatment, *International Journal of Food Science and Technology*. **2012**, 47, pp. 475–481.

-
- (196) Hull, G. L.; Woodside, J. V.; Ames, J. M.; Cuskelly, G. J. N ϵ -(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet, *Food Chemistry*. **2012**, *131*, pp. 170–174.
- (197) Dunn, J. A.; Ahmed, M. U.; Murtjahaw, M. H.; Richardson, J. M.; Walla, M. D.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Reaction of Ascorbate with Lysine and Protein under Autoxidizing Conditions - Formation of N-epsilon-(Carboxymethyl)lysine by Reaction between Lysine and Products of Autoxidation of Ascorbate, *Biochemistry*. **1990**, *29*, pp. 10964–10970.
- (198) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction., *Journal of Biological Chemistry*. **1995**, pp. 10017–10026.
- (199) Davidek, T.; Devaud, S.; Robert, F.; Blank, I. Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: Isotope labeling studies on the formation of acetic acid by a hydrolytic beta-dicarbonyl cleavage mechanism, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, *54*, pp. 6667–6676.
- (200) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-Deoxy- d - erythro -hexo-2,3-diulose in the Presence of Lysine Leads to Formation of Carboxylic Acid Amides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, *58*, pp. 6458–6464.
- (201) Rakete, S.; Berger, R.; Böhme, S.; Glomb, M. A. Oxidation of Isohumulones Induces the Formation of Carboxylic Acids by Hydrolytic Cleavage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**, *62*, pp. 7541–7549.
- (202) Huvaere, K.; Andersen, M. L.; Olsen, K.; Skibsted, L. H.; Heyerick, A.; De Keukeleire, D. Radicaloid-type oxidative decomposition of beer bittering agents revealed, *Chemistry*. **2003**, *9*, pp. 4693–4699.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Möglichkeiten zur Beschreibung des Bieraromas (übernommen von Meilgaard et al.).....	3
Abbildung 2:	Beschreibung der Aromaveränderungen während der Alterung von Bier 1977 (links) und 2005 (rechts) in Abhängigkeit der Lagerungszeit (übernommen von Dalglish bzw. Zufall et al.).....	5
Abbildung 3:	Bildung verschiedener Kohlenhydrate aus Stärke während des Maischens (modifiziert nach Brandam et al.).....	8
Abbildung 4:	Bildung des Amadori-Produkts aus der Reaktion von Aminen (R_1 = Aminosäuren, Peptide, Proteine, etc.) und Aldosen (R_2 = Glucose, Maltose, etc.).	11
Abbildung 5:	Zusammenfassung wichtiger, im Bier nachgewiesener Maillard-Reaktionsprodukte.	11
Abbildung 6:	Bildung von Strecker-Aldehyden und Strecker-Säuren aus der Reaktion von α -Dicarbonylverbindungen mit primären Aminosäuren.....	12
Abbildung 7:	Bildung von Hydroxymethylfurfural und Furfural aus Kohlenhydraten über 3-Desoxyglucoson (3-DG) und 3-Desoxypentoson (3-DP).....	13
Abbildung 8:	Die drei bedeutendsten Homologe der α -Säuren (Humulone) und β -Säuren (Lupulone).	17
Abbildung 9:	Isomerisierung von Humulonen zu den <i>cis</i> (4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)- und <i>trans</i> (4 <i>S</i> , 5 <i>S</i>)-Isohumulonen.....	19
Abbildung 10:	Zusammenfassung wichtiger Abbauprodukte der <i>trans</i> -Isohumulone.	22
Abbildung 11:	Bildung von 3-Methylbut-2-en-1-thiol (MBT) durch photooxidative Spaltung von <i>trans</i> -Isohumulonen.	23
Abbildung 12:	Zusammenfassung wichtiger Abbauprodukte der Lupulone.	25
Abbildung 13:	Reduktive Aminierung von D-Glucose mit 1-Naphthylamin.	28
Abbildung 14:	HPLC-FLD-Chromatogramme von Bier (B) und eines 0,1 M Kohlenhydrat-Standardmix (A). Die Beschriftung der Peaks (1-10) ist entsprechend der Tabelle 5. Der Polymerisierungsgrad (DP, degree of polymerization) der unbekanntenen Peaks (a-g) ist oben rechts in der Abbildung zu finden (übernommen aus Rakete & Glomb).	29
Abbildung 15:	Postulierte Bildung von Furfural unter oxidativen Bedingungen aus dem Abbau von Maltotetraose in Anlehnung an Smuda et al.	32
Abbildung 16:	Bildungskurven von wichtiger Abbauprodukte von Maltotetraose in Gegenwart von Prolin bei pH=7 unter aeroben (geschlossene Symbole) und anaeroben (offene Symbole) Bedingungen.....	33

-
- Abbildung 17: Gehalte von 3-Desoxypentosen, Formylprolin und Furfural in frischem, normal und oxidativ gealtertem Bier (Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, n=3)..... 33
- Abbildung 18: Bildung von *N*-Carboxymethylprolin in Modellinkubation von Maltotetraose in Gegenwart von Prolin(A, pH=7, aerob: offene Symbole, anaerob: geschlossene Symbole) und während der Alterung von Bier (B)..... 34
- Abbildung 19: Bildung von Essigsäure und Essigsäureamid durch β -Dicarbonylsplaltung aus 1-Desoxyglucoson nach Davidek et al. und Smuda et al.. 35
- Abbildung 20: Verlauf des Abbaus von *trans*-Isohumulon und der Bildung von 3-Methylbuttersäure (MBA), 4-Methyl-3-pentensäure (MPA) und *N*-3-Methylbutyrylprolinamid (MBA-Amid) bei pH= 7 (oxidativ Δ , nicht oxidativ \blacktriangle) und pH= 5 (oxidativ \circ , nicht oxidativ \bullet)..... 36
- Abbildung 21: Postulierter Mechanismus zur Bildung von 3-Methylbuttersäure (2a) und 4-Methyl-3-pentensäure (3a) aus *trans*-Isohumulon (1) durch hydrolytische β -Dicarbonylsplaltung (I & II) nach Oxidation des Isohumulon-Ringes (übernommen aus Rakete et al.). 38

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung wichtiger Aromastoffe in Darrmalz.....	7
Tabelle 2: Wichtige Aromastoffe, die bei der Alterung von Bier auf Malzinhaltstoffe zurückzuführen sind.....	10
Tabelle 3: Durchschnittliche Zusammensetzung von getrocknetem Hopfen.	15
Tabelle 4: Gehalte ausgewählter Polyphenole in Hopfen und Bier.	16
Tabelle 5: Zusammenfassung wichtiger Aromastoffe in frischen Hopfendolden.	17
Tabelle 6: Ausbeuten ausgewählter Hopfenbitterstoffe am Ende der Würzekochung und im abgefüllten Bier. Die Ausbeuten beziehen sich auf die absolut eingesetzte Menge von Humulone bzw. Lupolonen.....	18
Tabelle 7: Veränderungen der Isohumulone und ausgewählter Isohumulon-Abbau-produkte während der Alterung von Bier (Konzentration in $\mu\text{mol/L}$). Die Nummerierung bezieht sich auf Abbildung 10..	21
Tabelle 8: Kohlenhydratgehalte [g/L] in Maische, Würze und Bier durch Bestimmung mit HPLC-FLD nach Derivatisierung mit 1-Naphthylamin.	30

10. Anhang

Publikation A

Rakete, S., Glomb, M. A. A Novel Approach for the Quantitation of Carbohydrates in Mash, Wort, and Beer with RP-HPLC Using 1-Naphthylamine for Precolumn Derivatization *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61, 3828-3833.

Publikation B

Rakete, S., Berger, R., Boehme, S., Glomb, M. A. Oxidation of Isohumulones Induces the Formation of Carboxylic Acids by Hydrolytic Cleavage *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62, 7541-7549.

Publikation C

Rakete, S., Klaus, A., Glomb, M. A. Investigations on the Maillard Reaction of Dextrins during Aging of Pilsner Type Beer *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**.

A Novel Approach for the Quantitation of Carbohydrates in Mash, Wort, and Beer with RP-HPLC Using 1-Naphthylamine for Precolumn Derivatization

Stefan Rakete and Marcus A. Glomb*

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Straße 2, 06120 Halle/Saale, Germany

ABSTRACT: A novel universal method for the determination of reducing mono-, di-, and oligosaccharides in complex matrices on RP-HPLC using 1-naphthylamine for precolumn derivatization with sodium cyanoborhydride was established to study changes in the carbohydrate profile during beer brewing. Fluorescence and mass spectrometric detection enabled very sensitive analyses of beer-relevant carbohydrates. Mass spectrometry additionally allowed the identification of the molecular weight and thereby the degree of polymerization of unknown carbohydrates. Thus, carbohydrates with up to 16 glucose units were detected. Comparison demonstrated that the novel method was superior to fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). The results proved the HPLC method clearly to be more powerful in regard to sensitivity and resolution. Analogous to FACE, this method was designated fluorophore-assisted carbohydrate HPLC (FAC-HPLC).

KEYWORDS: carbohydrate analysis, beer, FACE, HPLC-FLD, reductive amination, precolumn derivatization

INTRODUCTION

The composition of beer is very complex. Carbohydrates represent a major part of the substances occurring in bottled beer. They are associated with the nutrition, taste, and physical properties of beer. The degradation of barley malt starch and of other carbohydrate polymers by inherent enzymes during mashing leads to an enormous diversity of carbohydrates in beer. The resulting spectrum strongly depends on enzyme activity and process control.¹ Major carbohydrates are glucose, maltose, and maltotriose. In addition, noticeable amounts of higher molecular carbohydrates are found. Further insights into the qualitative and quantitative nature of nonfermentable carbohydrates during beer brewing are highly desirable, for example, due to their influence on the generation of off-flavors derived from Maillard reactions. Up to now numerous methods for the determination of carbohydrates in diverse matrices have been published. In general, the analytical approach can be divided in two groups without and with derivatization.

The analyses of carbohydrates are related to several problems due to their polar and nonchromophoric character.² To overcome these difficulties high-performance anion exchange chromatography (HPAEC) coupled to pulsed amperometric detection (PAD) is one of the most frequently used methods.³ HPAEC uses high-pH eluents (e.g., 0.5 M sodium hydroxide solution) to achieve a good resolution of mono- and oligosaccharides. By definition, HPAEC-PAD provides no structural information and, thus, is limited to the availability of reference standards. Coupling to mass spectrometry is complicated due to heavy salt loads in eluents and requires, for example, online desalting.⁴ Moreover, high pH can trigger artifacts by epimerization or degradation.³ In addition, carbohydrates are not efficiently ionized by electron spray ionization.² Alternatively, native carbohydrates can be determined by using alkali metal adducts for direct flow injection mass spectrometry.⁵ Besides the problem of potential ion

source fragmentation, especially for oligomers, this method lacks chromatographic separation and cannot distinguish carbohydrate isomers, such as maltose and isomaltose.

In contrast, derivatization is a convenient alternative to overcome the above problems. Different derivatization agents are known for liquid chromatography, electrophoresis, or mass spectrometry.⁶ A special form of gel electrophoresis is fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE).⁷ A charged fluorophore tag is introduced to the carbohydrate and enables separation on polyacrylamide gels. An additional method of choice is the modification of carbohydrates with nonpolar molecules. In this case derivatization diminishes the very polar character of native carbohydrates for better separation of especially large carbohydrates in reversed phase HPLC and often improves the efficiency of UV/fluorescence detection and mass spectrometric ionization.^{8,9} In the literature only a very few such methods have been published, limited to the analyses of selected mono- or disaccharides.^{10–13}

In this paper, we present a novel method for the simultaneous determination of reducing mono-, di-, and oligosaccharides in mash, wort, and beer on common RP-HPLC systems coupled to fluorescence detection and mass spectrometry. 1-Naphthylamine as the labeling agent provided a sufficient separation but also a tremendous increase in fluorescence activity and sensitivity for mass spectrometry. The method was then used to monitor the change of carbohydrate profiles at different stages of the brewing process. The performance of the new method was compared to that of FACE.

Received: January 30, 2013

Revised: March 28, 2013

Accepted: March 30, 2013

Published: April 11, 2013



MATERIAL AND METHODS

Materials. Carbohydrate reference compounds had the highest available grade. 1-Naphthylamine and sodium cyanoborohydride were purum, and 7-amino-1,3-naphthalenedisulfonic acid monopotassium salt monohydrate was for fluorescence analyses. Methanol was of HPLC grade. All chemicals were provided by Sigma-Aldrich (Munich, Germany), except maltotetraose (Boehringer, Mannheim, Germany).

Brewery Samples. Samples were drawn at different stages in the beer brewing process at the Hasseröder Brewery/Wernigerode, Germany. The samples were frozen immediately on site.

Sample Preparation. Frozen mash samples were defrosted and transferred to a centrifuge tube. Tubes were centrifuged for 5 min at room temperature. The supernatant was filtered through a folded paper filter. Wort and beer samples were defrosted and filtered directly. Mash and wort filtrates were diluted 10-fold to ensure excess of derivatization agent. One hundred microliters of the samples was transferred in a threaded culture tube and dried in a Speed Vac concentrator (Savant SPD121P, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) prior to derivatization.

Preparation of Carbohydrate Standards. The used standards are listed in Table 3. For identification, 0.1 mM solutions were prepared for each carbohydrate. One hundred microliters was transferred in a threaded culture tube and Speed Vac dried. For quantitation, a 0.1 mM mixed standard solution containing 10 carbohydrates in equimolar concentrations was prepared. For calibration, 10–250 μL of this stock solution was transferred in a threaded culture tube and Speed Vac dried, representing 0.01–0.25 mM in relation to the samples.

Derivatization. For carbohydrate labeling prior to HPLC analyses, a 0.2 M solution of 1-naphthylamine in 15% acetic acid and DMSO (50:50, v/v) was prepared. For electrophoreses, a 0.2 M solution of 7-amino-1,3-naphthalenedisulfonic acid monopotassium salt monohydrate in 15% acetic acid was used. Fifty microliters of the respective solution and 50 μL of a 1 M sodium cyanoborohydride solution in DMSO were added to the dried samples. The tubes were capped, vortexed vigorously, and incubated for 24 h at 40 °C.

HPLC-FLD (Fluorescence Detection) Analyses. The derivatized samples were diluted with eluent B to concentrations appropriate for detection (Table 2). Eluents were water (A) and a mixture of methanol and demineralized water (70:30, v/v; B). Heptafluoric butyric acid (0.6 mL/L) was added to both eluents as ion pair reagent. Analyses were carried out on a Waters HPLC system consisting of a Waters 600-MS pump, a Waters 470 fluorescence detector, and a Waters 712 WISP autosampler (injection volume = 10 μL ; Waters Corp., Milford, MA, USA). Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (Knauer, Eurospher 100-5 C18, 250 \times 4.0 mm, Berlin, Germany) using a flow rate of 1 mL min⁻¹ at 20 °C (Jetstream 2 column oven, Jasco, Groß-Umstadt, Germany). The excitation was adjusted to 318 nm and the emission to 440 nm. The separation started at 65:35 (A:B). After 75 min, B was raised to 100% in 5 min to flush the column for 15 min. Within 5 min the composition of the eluents was changed to starting conditions and equilibrated for 15 min prior to injection of the next analysis. All samples were prepared at least three times. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined according to DIN 32645. Recovery rates for beer samples were generated by standard addition, precisely by increasing concentrations of the reference compounds by factors of 0.5, 1, and 2 compared to original values. The recovery rates for individual derivatized carbohydrates were as follows: 1, 91%; 2, 97%; 3, 93%; 4, 97%; 5, 109%; 6, 91%; 7, 91%; 8, 94%; 9, 92%; 10, 99%.

LC-MS/MS Analyses. Sample preparation was according to FLD analysis. Analyses were performed on a Jasco HPLC system (AS2057plus and PU-2080plus). The LC system was connected directly to the probe of the mass spectrometer. The mass analyses were performed using an Applied Biosystems API 4000 quadrupole instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an API source using an electrospray ionization (ESI) interface. The LC system was connected directly to the probe of the mass

spectrometer. Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. For electrospray ionization in positive mode the following specifications are used: sprayer capillary voltage, 4.5 kV; nebulizing gas flow, 60 mL/min; heating gas, 50 mL/min at 500 °C; and curtain gas, 50 mL/min. For multiple reaction monitoring (MRM), declustering potential (DP), collision energy (CE), and cell exit potential (CXP) were optimized by syringe injection of available reference standards (Table 1). For identification of unknown carbohydrates Q1MI (multiple ions)

Table 1. Mass Spectrometric Parameters for Derivatized Carbohydrates (MRM Mode)

	mass (amu)		DP	CE	CXP
	Q1	Q3			
ribose/arabinose/xylose	278.3	156.2	31	30	27
glucose	308.3	156.2	75	32	27
maltose/isomaltose	470.4	308.3	71	27	20
maltotriose	632.5	308.3	72	35	18
maltotetraose	794.5	308.3	100	45	17
maltopentaose	956.6	308.4	108	56	17
malthexaose	1118.7	308.4	125	70	16
malthheptaose	1280.9	308.5	93	81	17

mass spectra were performed by calculating the nominal masses for the derivatized high polymeric dextrans (DP > 8).

FACE. Derivatized samples were adjusted to 1 mL with an aqueous solution of 62.5 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride and 20% glycerol. Separation was carried out on an acrylamide gel (20%) with 3.3% cross-linkage. Two microliters of the sample solution was transferred to the gel. The gel buffer consisted of an aqueous solution (pH 8.5) of 89 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, and 8 mM urea. Prior to analyses, 0.75 mm thick gels were prepared with the Mini-Protein Tetra Cell system (Bio-Rad, Munich, Germany). Electrophoreses were performed in buffer solution (25 mM TRIS, 129 mM glycine). Evaluation of the gels was done on a photodocumentary station (Bio-Rad) by fluorescence detection. All samples were prepared at least two times. The LOD and LOQ were determined according to DIN 32645 (Table 2).

Table 2. Validation Data of HPLC-FLD versus FACE Analysis

	FA-HPLC-FLD	FACE
LOD (μM)	1.2	110
LOQ (μM)	3.8	313
calibration (μM)	5–250	100–1500
linearity (R^2)	0.995–0.999	0.893–0.995
recovery rates (%)	91–109	nd
CV (%)	<5	up to 50

Mass Spectra of Derivatized Carbohydrate References. Mass spectra were generated from HPLC runs in full scan mode (m/z 100–2000) by injection of individual derivatized reference compounds.

Ribose: t_R 64.8 min; m/z 300.4 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 27%), 278.5 (45), 260.4 (12), 242.4 (13), 170.5 (61), 168.6 (26), 156.4 (100), 144.3 (91), 143.3 (86), 129.3 (54).

Xylose: t_R 60.8 min; m/z 300.4 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 25%), 278.5 (28), 260.4 (16), 242.4 (11), 170.5 (44), 168.6 (21), 156.4 (100), 144.3 (69), 143.3 (71), 129.3 (47).

Glucose: t_R 54.5 min; m/z 330.5 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 28%), 308.4 (51), 290.5 (31), 272.5 (7), 170.6 (36), 168.4 (13), 156.3 (100), 144.3 (49), 143.3 (37), 129.3 (30).

Maltose: t_R 49.1 min; m/z 492.6 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 19%), 470.6 (35), 452.6 (2), 308.5 (100), 290.6 (13), 156.4 (6), 144.3 (4).

Isomaltose: t_R 43.2 min; m/z 492.6 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 23%), 470.6 (36), 452.6 (1), 308.5 (100), 290.6 (11), 156.4 (4), 144.3 (2).

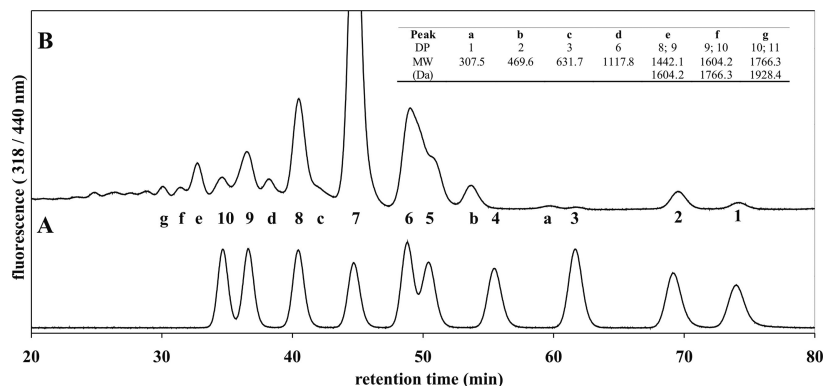


Figure 1. HPLC-FLD chromatogram of beer (B) and a 0.1 mM carbohydrate mix standard solution (A). The numbering is according to Table 3. Molecular weight (MW) and the degree of polymerization (DP) of unknown peaks (a–g) are given in the inset and were verified by mass spectrometry.

Maltotriose: t_R 44.7 min; m/z 670.8 ($[M + K]^+$, 1%), 654.7 (21), 632.7 (100), 614.8 (1), 470.5 (2), 308.5 (75), 290.6 (3).

Maltotetraose: t_R 39.7 min; m/z 832.8 ($[M + K]^+$, 2%), 816.9 (21), 794.8 (100), 470.5 (2), 308.5 (9), 144.4 (2).

Maltopentaose: t_R 36.0 min; m/z 994.8 ($[M + K]^+$, 3%), 978.8 (41), 956.9 (100), 632.5 (9), 470.7 (4), 308.6 (17), 290.3 (2).

Maltohexaose: t_R 32.7 min; m/z 1141.0 ($[M + Na]^+$, 60%), 1119.0 (100), 794.9 (51), 632.7 (43), 470.5 (26), 308.5 (89).

Maltoheptaose: t_R 30.9 min; m/z 1303.0 ($[M + Na]^+$, 31%), 1281.1 (73), 995.9 (14), 956.8 (64), 794.8 (100), 65246 (39), 632.7 (87), 470.6 (27), 308.5 (99).

RESULTS AND DISCUSSION

HPLC Separation. 1-Naphthylamine (NA) was chosen as derivatization agent due to its fluorescence activity and nonpolar character. Nevertheless, NA is still soluble in DMSO/acetic acid mixtures and therefore suitable for derivatization of carbohydrates in aqueous matrices. For separation, several chromatographic parameters were optimized. Due to the ion pair reagent heptafluoric butyric acid (HFBA) NA was strongly retained (after 80 min) and did not interfere with target analytes. Ion pair reagents were recently used to increase retention of basic amines in reversed phase chromatography, for example, amino acids.¹⁴ Surprisingly, tagged carbohydrates apparently did not interact with HFBA. This was verified in the absence of HFBA using formic acid as eluent additive, which resulted in no significant changes of retention times, except for NA (around 30 min). It can be assumed that the polar carbohydrate residue prevents interaction with HFBA. This is in contrast to Roberts et al., who described a significant effect of ion pair reagents on retention times of both primary and secondary amines.¹⁵

The optimized parameters provided a satisfying separation for all derivatized reference compounds used (Figure 1). The size of the carbohydrate residue and thus increasing polarity correlated negatively with retention time, clearly shown by the elution order of linear dextrans (4, 5–10). In addition, with increasing polarity HPLC resolution decreased. Nevertheless, peaks at early retention times of beer sample chromatograms indicated the occurrence of several carbohydrates (Figure 1, a–g). They remained unknown due to the absence of reference compounds. Next to molecule size, stereoconfiguration had an important impact on separation. For example, ribose (1) was separated from xylose and arabinose. Unfortunately, it was not

possible to chromatographically separate the latter (2). Isomaltose (6) eluted earlier than maltose (4), indicating that the glycosidic bond position influences retention properties. Constitutional isomers can also be separated by HPAEC.¹⁶ Thus, maltotriose and isomaltose were not completely separated. The method was validated for all available reference substances using HPLC-FLD (Table 2).

Mass Spectrometry. All LC-MS/MS experiments were performed with electron spray ionization in positive mode (ESI⁺-MS). The fragmentation pattern for derivatized maltotetraose is given in Figure 2. Besides the protonated molecule $[M$

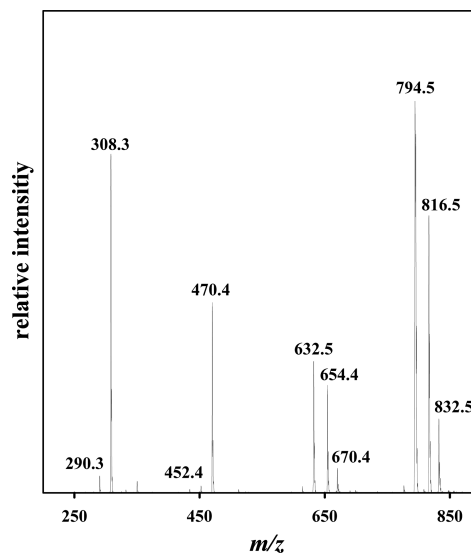


Figure 2. ESI⁺ spectra of maltotetraose after derivatization with 1-naphthylamine ($[M + H]^+ = m/z$ 794.5).

+ $H]^+$ at 794.5 Da sodium (+23 Da) and potassium (+39 Da) adducts were found. These adducts were stable and showed only minor fragmentation and were not used for mass spectrometric analysis. The modification with NA enhanced the sensitivity by a factor of approximately 100 compared to native carbohydrates (ESI⁺-MS). In contrast, the deprotonated

Table 3. Concentrations (Grams per Liter) of Carbohydrates at Selected Stages of Brewing for HPLC-FLD and FACE

carbohydrate	start of mash		end of mash		wort		bottled beer	
	FA-HPLC	FACE	FA-HPLC	FACE	FA-HPLC	FACE	FA-HPLC	FACE
ribose (1)	0.03	nd	0.1	nd	0.1	nd	0.04	nd
arabinose/xylose (2)	0.08	nd	0.3	nd	0.2	nd	0.08	nd
glucose (3)	3.82	3.1	16.5	26	9.2	12.3	0.03	0.1
maltose (4)	4.45	2.8	80	40	41.3	47.1	0.07	0.2
maltotriose (5)	0.61	nd	9.3	20	7.8	32.7	0.7	1.0
isomaltose (6)	0.75	nd	0.6	nd	0.4	nd	0.9	1.4
maltotetraose (7)	0.41	nd	10.1	9.1	5.5	11.4	5.1	4.3
maltopentaose (8)	0.22	nd	3.8	5.0	2.6	6.9	2.6	6.0
maltohexaose (9)	0.16	nd	2.7	4.8	1.6	6.9	1.7	2.6
maltoheptaose (10)	0.16	nd	1.2	2.7	0.9	4.3	1.0	2.4

molecule $[M - H]^-$ (ESI⁻-MS) showed a thousandfold lower intensity than ESI⁻-MS. Heptafluorobutyric acid adducts were also not found for ESI⁻-MS. Nonetheless, Saarnio et al. used ESI⁻-MS in combination with alkaline eluents for native carbohydrates.¹⁷ $[M + H]^+$ -MS/MS experiments revealed losses of glucose units (-162, -180, and -342 Da), which were prevalent and typical for all derivatized oligosaccharides. These fragmentations were used to develop a sensitive MRM method. However, with increasing carbohydrate residue, sensitivity decreased; for example, the LOD for maltotetraose was 10 μ M compared with 1 μ M for HPLC-FLD. Thus, for quantitation the HPLC-FLD was used.

According to the literature the cleavage can occur on both sides of the O-glycosidic bond.¹⁸ Still, ESI⁻-MS analyses did not reveal the character of the glycosidic bond or the stereo configuration; for example, maltose and isomaltose showed the same fragmentation pattern. In contrast, Zhu et al. were able to distinguish structurally similar carbohydrates via ESI⁻-MS.¹⁹ Nonetheless, the degree of polymerization (DP) could be assigned to unknown peaks in beer (Figure 1, a–g) on the basis of mass spectrometry. The occurrence of oligosaccharides with up to 16 glucose units was confirmed. In contrast to HPLC-FLD analyses, mass spectrometry showed two peaks for carbohydrates up to 11 glucose units. For carbohydrates with a DP > 11 only single peaks were detected, although the peak shape suggested two substances. It is likely that these two peaks for each DP represent linear dextrans and limit dextrans of the same molecular weight, respectively.

Apparently, oligosaccharides are prone to ion source fragmentation. MRM experiments of a mixture of reference compounds showed for maltotetraose the same mass transitions that were expected for maltose; that is, attempts to reduce ion source fragmentation did not lead to complete disappearance of this phenomenon. Thus, without chromatographic separation, mass spectrometry analyses could lead to false interpretation of DPs.

Carbohydrate Profiles of Mash, Wort, and Beer Samples. With the new method the carbohydrate profiles at different stages of the brewing process were examined. Table 3 gives the concentrations of carbohydrates at the main technological steps of lager type beer brewing. Ground malt contained predominantly glucose and maltose. It also contains sucrose in concentrations up to 2% in dry matter.²⁰ Sucrose could not be determined by the present method due to its nonreducing character. As expected, glucose, maltose, and maltotriose were the main starch degradation products in mash, representing almost 90% of the determined carbohydrates. The concentrations of dextrans maltotetraose (DP 4) to maltohep-

taose (DP 7) were almost equal at the beginning of brewing. During mashing maltotetraose showed the strongest increase within the higher molecular dextrans. This must be explained by the weak activity of α - and β -amylases to cleave low molecular weight dextrans.²¹ Therefore, an increasing amount of DP 4 in relation to DP 7 in lautered mash was observed. Amylopectin contains only minor amounts of α -1,6-glycosidic linkages (every 15–30 glucose units), and the degradation leads to limit dextrans. Therefore, isomaltose as a representative of limit dextrans was found only in low concentrations of 0.6 g/L. The occurrence of additional high molecular weight limit dextrans was not definitely proved due to the absence of reference compounds. It is likely that high molecular weight limit dextrans are formed and degraded simultaneously in the brewing process. Mass spectrometric analyses revealed carbohydrates of the same molecular weight like linear dextrans and therefore gave evidence for their occurrence.

During the passage of mash to wort all carbohydrate concentrations decreased due to washing out of the druff with water. During wort boiling only minor decreases of carbohydrates were found (data not shown). After fermentation, maltotetraose was confirmed as the dominating dextrin in bottled beer. In contrast, glucose, maltose, and maltotriose were almost completely metabolized by yeast.²² Whereas maltotriose concentrations in bottled beer are relatively high, only traces of maltose and glucose were detected. For maltose and maltotriose, transport proteins are recognized as the limiting factor for their absorption into yeast cells.²² In contrast, dextrans with four or more glucose units are not utilized and remain in equal concentrations in bottled beer as in wort. Pentoses are also utilized by yeast, but in the presence of glucose, pentose degradation is significantly decreased.²³ Thus, pentose concentrations were only partially reduced during fermentation.

Comparison of HPLC-FLD versus FACE. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) allowed simultaneous analyses of 10 samples in a short time. This is an advantage compared to long HPLC runs. An image of a FACE gel is given in Figure 3. For glucose to maltoheptaose sufficient resolution was achieved. Unfortunately, the pentoses could not be separated from the derivatization agent and, thus, were not quantitated. Despite the rapid separation times and the possibility of multiple samples on one gel, the preparative effort of FACE was unequally extensive compared to HPLC-FLD. Comparative quantitative data from brewing samples based on HPLC-FLD and FACE are given in Table 3. On the one hand, the results, especially for bottled beer or dextrans with DP > 3, were in comparable ranges. On the other hand,

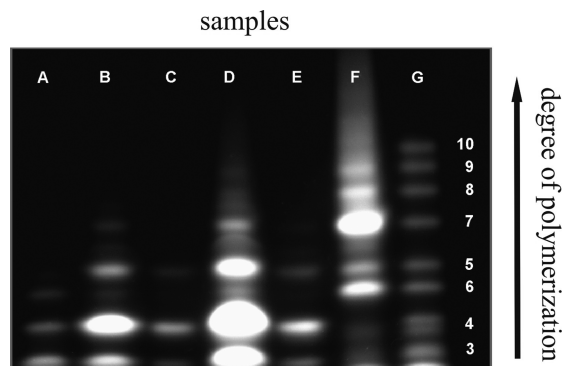


Figure 3. FACE electropherogram of selected brewing stages (A–G): (A) mash, start; (B) mash, end (1:100); (C) mash, end (1:1000); (D) wort (1:10); (E) wort (1:100); (F) beer; (G) 1 mM mixed standard solution. The numbers in parentheses indicate dilution. Carbohydrates (3–10) refer to Table 3.

clear differences in absolute values for certain carbohydrates were observed, for example, for maltose, at the end of mashing, showing twice the concentration for HPLC-FLD compared to FACE. Furthermore, the sensitivity of FACE was relatively poor. The lowest concentration detectable was 100 μM , which was 100-fold above the LOD of HPLC-FLD. Nonetheless, the sensitivity was sufficient for most samples (cf. mash/start). On the basis of the present results FACE must be evaluated as inferior to the novel HPLC-FLD method (Table 2). Variation coefficients up to 50% revealed a lack of precision of FACE, which must be explained by relative diffuse spot areas, but especially by a weak resolution, producing rather semi-quantitative results. This became most evident in the region of high polymeric carbohydrates. With HPLC-FLD, in particular with MS coupling, single peaks were detected regardless of retention time.

In conclusion, we developed a sensitive and simple method for the determination of several reducing carbohydrates during the brewing process based on HPLC separation and precolumn derivatization. Widely available reversed phase columns coupled to fluorescence detectors or mass spectrometers have clear advantages compared to previously used methods. The direct combination with mass spectrometry combines high sensitivity with information on the DP. We showed that this method provides a sufficient resolution for the present task. Furthermore, we verified the occurrence of high molecular weight carbohydrate isomers in beer. However, the novel method opens many opportunities for the determination of carbohydrates in complex matrices also found in other foods. The unique precolumn derivatization enables carbohydrate analyses without the necessity of special instrumentation. Due to the introduction of 1-naphthylamine, we call this method fluorophore-assisted carbohydrate HPLC (FAC-HPLC).

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: ++049-345-5525784. E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Hasseröder Brewery (Wernigerode/Germany) for the opportunity of direct access to the production facilities during sampling.

■ REFERENCES

- (1) MacGregor, A. W.; Bazin, S. L.; Macri, L. J.; Babb, J. V. Modelling the contribution of α -amylase, β -amylase and limit dextrinase to starch degradation during mashing. *J. Cereal Sci.* **1999**, *29*, 161–169.
- (2) Lamari, F. N.; Kuhn, R.; Karamanos, N. K. Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *J. Chromatogr., B* **2003**, *793*, 15–36.
- (3) Lee, Y. C. High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Anal. Biochem.* **1990**, *189*, 151–162.
- (4) Bruggink, C.; Poorthuis, B. H. M.; Deelder, A. M.; Wuhler, M. Analysis of urinary oligosaccharides in lysosomal storage disorders by capillary high-performance anion-exchange chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1671–1683.
- (5) Mauri, P.; Minoggio, M.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Pietta, P. Analysis of saccharides in beer samples by flow injection with electrospray mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 743–748.
- (6) Harvey, D. J. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J. Chromatogr., B* **2011**, *879*, 1196–1225.
- (7) O'Shea, M. G.; Samuel, M. S.; Konik, C. M.; Morell, M. K. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation. *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 1–12.
- (8) Ding, C. X.; Wang, L. Y.; Tian, C. L.; Li, Y. L.; Sun, Z. W.; Wang, H. L.; Suo, Y. R.; You, J. M. LC-DAD-ESI-MS characterization of carbohydrates using a new labeling reagent. *Chromatographia* **2008**, *68*, 893–902.
- (9) Unterrieser, I.; Mischnick, P. Labeling of oligosaccharides for quantitative mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 68–75.
- (10) Fischer, K.; Wacht, M.; Meyer, A. Simultaneous and sensitive HPLC determination of mono- and disaccharides, uronic acids, and amino sugars after derivatization by reductive amination. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **2003**, *31*, 134–144.
- (11) Fu, D. T.; O'Neill, R. A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid-chromatography. *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 377–384.
- (12) Yodoshi, M.; Tani, A.; Ohta, Y.; Suzuki, S. Optimized conditions for high-performance liquid chromatography analysis of oligosaccharides using 7-amino-4-methylcoumarin as a reductive amination reagent. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1203*, 137–145.
- (13) Vinogradov, E.; Bock, K. Structural determination of some new oligosaccharides and analysis of the branching pattern of isomaltoligosaccharides from beer. *Carbohydr. Res.* **1998**, *309*, 57–64.
- (14) Piraud, M.; Vianey-Saban, C.; Petritis, K.; Elfakir, C.; Steghens, J. P.; Bouchu, D. Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1587–1602.
- (15) Roberts, J. M.; Diaz, A. R.; Fortin, D. T.; Friedle, J. M.; Piper, S. D. Influence of the Hofmeister series on the retention of amines in reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4927–4932.
- (16) Koizumi, K.; Kubota, Y.; Tanimoto, T.; Okada, Y. High-performance anion-exchange chromatography of homogeneous D-gluco-oligosaccharides and D-gluco-polysaccharides (polymerization degree-greater-than-or-equal-to-50) with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr.* **1989**, *464*, 365–373.
- (17) Saarnio, K.; Teinila, K.; Aurela, M.; Timonen, H.; Hillamo, R. High-performance anion-exchange chromatography-mass spectrometry method for determination of levoglucosan, mannosan, and

galactosan in atmospheric fine particulate matter. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 2253–2264.

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

(19) Zhu, A. P.; Romero, R.; Huang, J. B.; Clark, A.; Petty, H. R. Maltooligosaccharides from JEG-3 trophoblast-like cells exhibit immunoregulatory properties. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2011**, *65*, 54–64.

(20) Allosio-Ouarnier, N.; Quemener, B.; Bertrand, D.; Boivin, P. Application of high performance anion exchange chromatography to the study of carbohydrate changes in barley during malting. *J. Inst. Brew.* **2000**, *106*, 45–52.

(21) Narziß, L. *Abriss der Bierbrauerei*, 7th ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005.

(22) Zastrow, C. R.; Hollatz, C.; de Araujo, P. S.; Stambuk, B. U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 34–38.

(23) Subtil, T.; Boles, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*.

Oxidation of Isohumulones Induces the Formation of Carboxylic Acids by Hydrolytic Cleavage

Stefan Rakete, Robert Berger, Steffi Böhme, and Marcus A. Glomb*

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Straße 2, 06120 Halle/Saale, Germany

ABSTRACT: The degradation of isohumulones in mechanistic experiments was investigated. Incubation of *trans*-isohumulone in the presence of L-proline led to the formation of carboxylic acids and their corresponding proline amides. In the context of isohumulones unknown amides were verified first in model incubations and then in beer for the first time by comparison with authentic reference standards via LC-MS analyses. Carboxylic acids and amides were formed preferably under oxidative conditions and increasing pH. Stable isotope experiments excluded the incorporation of molecular oxygen into carboxylic acids, strongly indicating a hydrolytic mechanism via β -dicarbonyl cleavage. The proposed mechanism includes oxidation and thereby incorporation of molecular oxygen to the isohumulone ring structure followed by hydrolytic cleavage leading to acids and amides.

KEYWORDS: hop bitter acids, isohumulones, carboxylic acids, carboxylic acid amides, β -dicarbonyl cleavage, amino acid modifications, beer

■ INTRODUCTION

Beer is one of the most popular beverages worldwide due to its unique flavor. The particular flavor is the result of a tremendous number of volatile and nonvolatile substances. The nature and reactivity of these substances are important subjects to the scientific community. Both raw materials and chemical alterations are responsible for the final flavor composition. Although chemical reactions occurring in bottled beer generally are of no risk to human health, they are often related to the generation of negatively perceived flavors. Vanderhaegen et al. published a review on aging-related reactions in beer.¹ Especially hop-based flavor compounds, in particular bitter acids, are of great interest to researchers. During wort boiling the α -acids (humulones) are isomerized to *iso*- α -acids (isohumulones), the main bitter compounds in beer, resulting in a *trans/cis* mixture for each α -acid. The *trans/cis* ratio is typically around 0.4 due to the higher thermodynamic stability of the *cis* isomer and depends on various parameters, such as pH and temperature.² Upon beer aging the *trans* isomers are depleted significantly more quickly.^{3,4} De Cooman et al. assumed a higher electron density leading to an increased susceptibility toward oxidative degradation.³ In contrast, Intelmann et al. showed the formation of polycyclic compounds under nonoxidative conditions exclusively from *trans-iso*- α -acids and related them to a harsh, lingering bitter taste.^{4,5} Furthermore, various oxidation products of the intact *iso*- α -acid structure were identified.^{6,7} The formation of volatile, aroma active substances from *iso*- α -acids is of major concern. In the case of the so-called light-struck flavor, a photo-oxidative mechanism was presented.⁸ Also, the hop-originated precursor 3-methyl-2-buten-1-ol is known to generate onion-like off-flavors.⁹ Hashimoto and Eshima found evidence for the formation of staling aldehydes from the alkanoyl side chain by oxidative degradation of *iso*- α -acids.¹⁰ However, the formation of these aldehydes by *iso*- α -acid degradation was

not supported by mechanistic investigations and seems to play only a minor role in beer aging.¹¹

The formation of carboxylic acids from *iso*- α -acids was reported under oxidative conditions, apparently also from the alkanoyl and alkenoyl side chain.^{12–14} No mechanism for their formation is given in the literature. As a matter of fact, *iso*- α -acids can also be recognized as β -dicarbonyl structures and may show the same reactions as other β -dicarbonyls mentioned in the literature. In this context Davidek et al. showed that acetic acid is the main cleavage product from 1-deoxyglucosone formed by hydrolytic β -dicarbonyl cleavage in Maillard reaction systems.¹⁵ Today, hydrolytic β -dicarbonyl cleavage is considered to be one of the major degradation pathways for carbohydrates.^{16,17}

The scope of the present work was to elucidate the molecular mechanisms leading to flavor active carboxylic acids from degradation of *iso*- α -acids. The formation of these acids was studied under defined conditions. As a strong proof for hydrolytic β -dicarbonyl cleavage the corresponding carboxylic acid amides from the reaction with amines were found in such incubations.¹⁸ This included the syntheses of authentic reference compounds to unambiguously verify these amides. Thus, the interaction of *iso*- α -acids and amines was established for the first time in a mechanistic experiment. In particular, *trans*-isohumulone, the most relevant *trans-iso*- α -acid in beer, was incubated in the presence of L-proline, which represents approximately 50% of the total free amino acids in beer.¹⁹

■ MATERIAL AND METHODS

Chemicals. Chemicals of the highest available grade were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) unless otherwise indicated.

Received: April 16, 2014

Revised: July 3, 2014

Accepted: July 5, 2014

Acetonitrile and methanol (HPLC gradient grade) were purchased from VWR (Darmstadt, Germany). Silica gel for column chromatography (0.06–0.2 mm) was obtained from Roth (Karlsruhe, Germany). Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol- d_4 (CD_3OD) and trichloromethane- d ($CDCl_3$) were purchased from Armar Chemicals (Döttingen, Switzerland). 4-Methyl-2-pentenoic acid and isovaleryl chloride were obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). The hop extract was kindly provided by the Hasseröder brewery (Wernigerode, Germany).

4-Methyl-3-pentenoic Acid. 4-Methyl-3-pentenoic acid was prepared according to the literature with some modifications.²⁰ One milliliter of 4-methyl-2-pentenoic acid (8.4 mmol) was dissolved in 20 mL of 6 M potassium hydroxide solution and heated to 105 °C for 48 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was acidified to pH 1 with 2 M hydrochloric acid and extracted three times with dichloromethane (30 mL). The combined organic layers were dried with sodium sulfate, and the solvent was removed under reduced pressure to afford a mixture of the target compound and the educt as a colorless liquid (90% 4-methyl-3-pentenoic acid, determined by gas chromatography as its trimethylsilyl derivative and NMR). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ 1.65 (s, 3H), 1.79 (d, 3H, $^4J = 0.9$ Hz), 3.08 (d, 2H, $^3J = 7.2$ Hz), 5.30 (m, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ 18.1, 25.8, 33.6, 115.2, 136.5, 178.3.

General Method for the Preparation of *N*-Acyl-L-proline Derivatives. The preparation was based on a method described in the literature with some modifications.²¹ One equivalent of L-proline was suspended with 1.1 equiv of triethylamine in 10 mL of dry dichloromethane. The mixture was flushed with argon and cooled to 0 °C. Then 1 equiv of carboxylic acid chloride dissolved in 5 mL of dry dichloromethane was added dropwise. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 15 h. After completion, the reaction mixture was washed two times with 15 mL of 1 M hydrochloric acid. The aqueous phase was re-extracted with 25 mL of dichloromethane. The combined organic layers were dried with sodium sulfate, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified using flash chromatography (silica gel 60, *n*-hexane/acetone/trifluoroacetic acid 66:33:1). Fractions containing the desired product (TLC (silica gel 60, *n*-hexane/acetone/trifluoroacetic acid 66:33:1); detection, mixture of ninhydrin and *p*-toluenesulfonic acid (1%, 3%) in isopropanol) were collected and concentrated in vacuo.

***N*-Isovaleryl-L-proline (3-Methylbutyric Acid Proline Amide).** Six hundred and thirty-three milligrams of L-proline (5.5 mmol), 837 μ L of triethylamine (6 mmol), and 671 μ L of isobutyryl chloride (5.5 mmol) were used according to the general procedure. The product (TLC, R_f 0.31) was yielded as a yellowish oil (98%) from which the *trans* derivative was precipitated as colorless crystals at room temperature. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, *trans* derivative), δ 0.97–0.99 (2d, 6H, $^3J = 6.4$ Hz), 1.85–2.35 (m, 7H), 3.45–3.68 (m, 2H), 4.54–4.59 (m, 1H), 11.00 (s br, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, *trans* derivative), δ 22.6, 22.7, 24.8, 25.7, 43.2, 48.0, 59.6, 173.9, 174.4; HR-MS, m/z 198.1135 (found), m/z 198.1135 (calcd for $C_{10}H_{17}NO_3$ [$M - H$] $^-$).

***N*-4-Methyl-3-pentenoyl-L-proline (4-Methyl-3-pentenoic Acid Proline Amide).** One milliliter of 4-methyl-3-pentenoic acid (7.6 mmol) was dissolved in 1 mL of thionyl chloride (13.8 mmol) and refluxed for 2 h. Excess thionyl chloride was removed under reduced pressure. The product, 967 mg of L-proline (8.4 mmol), and 1.25 mL of triethylamine (9 mmol) were used according to the general procedure. The product (TLC, R_f 0.31) was yielded as a brown oil (74%). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, *trans* derivative), δ 1.63 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.88–2.17 (m, 2H), 2.18–2.35 (m, 2H), 3.10 (d, 2H, $^3J = 6.5$ Hz), 3.38–3.68 (m, 2H), 4.48–4.57 (m, 1H), 5.23 (t, 1H, $^3J = 6.3$ Hz), 10.30 (s br, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, *trans* derivative), δ 18.2, 24.8, 25.7, 28.4, 34.5, 47.8, 59.7, 115.2, 136.3, 173.7, 174.2; HR-MS, m/z 210.1135 (found), m/z 210.1136 (calcd for $C_{11}H_{17}NO_3$ [$M - H$] $^-$).

Preparation of *n*-Humulone and *trans*-Isohumulone. A mixture of α -acids was obtained by multilayer coil countercurrent chromatography (MLCCC) using *n*-hexane, methanol, and water as tertiary system (10:8.2, v/v/v). The crude MLCCC product was

further purified by preparative HPLC as described below (water/methanol (25:75, v/v)) to give pure humulone. To obtain *trans*-isohumulone, humulone was isomerized by using a modified literature protocol.²² One gram of pure humulone was dissolved in 250 mL of methanol and flushed with argon before the isomerization was begun. The solution was radiated with a mercury-vapor lamp until the educt was completely vanished (monitored by HPLC). After removal of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by preparative HPLC as described below (water/methanol (50:50, v/v)) to yield *trans*-isohumulone with a purity of 98% (HPLC-DAD). Structure was confirmed by NMR experiments (1H , ^{13}C ; CD_3OD) in accordance with literature data.²³

Preparation of *trans*-Humulinic Acid. Pure humulone was converted into *trans*- and *cis*-humulinic acid by using a modified literature protocol.²⁴ Humulone was stirred in 2 M aqueous sodium hydroxide at 95 °C for 2 h to give a mixture of *trans*- and *cis*-humulinic acid (89:11). After acidification with hydrochloric acid, the solution was extracted with diethyl ether and concentrated under reduced pressure. The individual isomers were isolated by preparative HPLC as described below (water/methanol (65:35, v/v)) to yield pure *trans*-humulinic acid. NMR spectra (1H , ^{13}C ; CD_3OD) were in line with the literature.^{24,25}

Preparation of Hydroxy-*trans*-alloysohumulone. Pure *trans*-isohumulone was incubated in 0.1 M phosphate buffer at pH 7 after the addition of 10% vol ethanol for 1 week at 50 °C. After acidification with hydrochloric acid, the incubation was extracted with ethyl acetate, dried over sodium sulfate, and concentrated in vacuo. The crude extract was further processed by preparative HPLC (water/methanol (80:20, v/v)) to give hydroxy-*trans*-alloysohumulone with a purity of 95% (HPLC-DAD). NMR spectra (1H , ^{13}C ; CD_3OD) were in line with the literature.⁶

MLCCC. The MLCCC system (Ito, multilayer separator-extractor model, P. C. Inc., Potomac, MD, USA) was equipped with a constant-flow pump (Waters 510, Waters Corp., Milford, MA, USA) and a Jasco UV-2075 detector (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) operating at 250 nm. Eluted liquids were collected in fractions of 16 mL with a fraction collector (LKB Ultracrac 7000). Chromatograms were recorded on a plotter (Servogor 200). The multilayer coil was prepared from a 1.6 mm inner diameter polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing. The total capacity was 270 mL. The MLCCC was run at a revolution speed of 790 rpm and a flow rate of the mobile phase of 2 mL/min in head-to-tail modus. Separation was performed by using binary solvent systems (upper phase as stationary phase and lower phase as mobile phase). The sample was dissolved in a 1:1 mixture of upper and lower phase (10 mL) and injected into the system. The collected fractions were dried for further processing.

Preparative HPLC-UV. A Besta HD 2-200 pump (Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 20 mL/min. Elution of material was monitored by a UV detector (Jasco UV-2075). Detection wavelength for α -acids, iso- α -acids, and *trans*-humulinic acid was set at 270 and 250 nm for hydroxy-*trans*-alloysohumulone. Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (KNAUER, Berlin, Germany; Eurospher-100-10 C18, 250 \times 20 mm, 10 μ m). All target substances were separated isocratically with mixtures of water and methanol containing 0.2% formic acid. The fractions containing target material were combined and dried under reduced pressure.

***trans*-Isohumulone Incubation Setup.** Individual iso- α -acids were incubated in 0.1 M ethanolic phosphate buffer (10% vol. ethanol) at two different pH values (5 and 7) with 25 mM L-proline for up to 21 days at 50 °C. The final iso- α -acids concentration was 5 mM. The incubations were performed under aerated and deaerated conditions. Deaerated conditions were achieved by adding diethylenetriaminepentaacetic acid (1 mM), degassing the buffer with helium, and flushing the residual headspace with argon. All samples were prepared in triplicate.

Incubation of *trans*-Isohumulone with $H_2^{18}O$. The buffer (300 μ L) described above (aerated, pH 7) was lyophilized and redissolved with 270 μ L of $H_2^{18}O$ (97 atom % ^{18}O). Thirty microliters of an ethanolic *trans*-isohumulone solution (50 mM) was added to meet the

conditions described above. Samples were incubated for 21 days at 50 °C.

Analytical HPLC-UV for Determination of Residual Iso- α -acid Levels. Analyses were performed on a Jasco HPLC system (PU-2089plus, AS-2055plus, UV-2075plus; Gross-Umstadt, Germany). Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (KNAUER; Eurospher 100-5 C18, 250 × 4.0 mm, 5 μ m) using a flow rate of 1 mL/min at 20 °C. The mobile phase used consisted of eluent A (water, 20 mg/L DTPA, 0.2% formic acid) and eluent B (acetonitrile/water (90:10, v/v), 0.2% formic acid). The incubation solutions were diluted with methanol and injected at 50% B. After 20 min, B was raised to 100% within 5 min (held for 5 min) and returned to starting conditions within 2 min (held for 8 min). The detection wavelength was set at 270 nm.

Extraction and Derivatization of Carboxylic Acids from Iso- α -acid Incubations. First, all of the samples (200 μ L) were spiked with 100 μ L of aqueous butyric acid solution (0.1 mM) as internal standard. After acidification with concentrated hydrochloric acid (25 μ L), the precipitate was removed by centrifugation. An aliquot of the supernatant (200 μ L) was saturated with sodium chloride and extracted with 300 μ L of toluene. Two hundred microliters of the organic layer was dried with sodium sulfate. An aliquot was then derivatized with an equal volume of hexamethyldisilazane at 50 °C for 3 h prior to GC-MS analysis. External calibration samples were prepared in the same manner.

GC-LCI-MS Determination of Carboxylic Acid Trimethylsilyl Derivatives. One microliter of the samples described above was injected to a Thermo Finnigan Trace GC Ultra coupled to a Thermo Trace DSQ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Separation was carried out on a DB-5MS GC column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Helium 5.0 was used as carrier gas in constant flow mode (linear velocity = 28 cm/s, flow = 1 mL/min). The split flow was set at 20 mL/min. Injector and transfer lines were heated to 220 and 250 °C, respectively. The oven program was as follows: 40 °C (1 min), 4 °C/min to 100 °C (0 min), 20 °C/min to 270 °C (10 min). LCI mass spectra were obtained at 70 eV (source, 190 °C; emission current, 50 μ A) in SIM mode using methanol as reagent gas. The retention times and SIM parameters for the silylated acid derivatives were as follows: butyric acid at 7.7 min (m/z 161), isovaleric acid at 9.2 min (m/z 175), and 4-methyl-3-pentenoic acid at 14.3 min (m/z 187).

LC-MS/MS Analyses of Humulinic Acid and Hydroxy-*trans*-alloisohumulone. Analyses were performed on a Jasco HPLC system (AS2057plus and PU-2080plus). Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (KNAUER; Eurospher 100-5 C18, 250 × 4.6 mm) using a flow rate of 1 mL/min at 25 °C. The mobile phase used consisted of eluent A (30 mM ammonium formate buffer, pH 5.5) and eluent B (methanol). For analyses of incubations, samples were diluted with methanol (1:1). The respective samples (20 μ L) were injected to the LC system at 25% B. After 10 min, B was raised to 30% within 12 min and then to 70% within 3 min (held for 5 min) and returned to starting conditions within 1 min (held 5 min). The LC system was connected to the probe of the mass spectrometer. The mass analyses were performed using an Applied Biosystems API 4000 quadrupole instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an API source using an electrospray ionization (ESI) interface. Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. For electrospray ionization in negative mode the following specifications were used: sprayer capillary voltage, -4.5 kV; nebulizing gas flow, 50 mL/min; heating gas, 60 mL/min at 500 °C; and curtain gas, 40 mL/min. For multiple reaction monitoring (MRM), declustering potential (DP), collision energy (CE), and cell exit potential (CXP) were optimized by syringe injection of reference compounds. Quantitation was based on matrix-assisted calibration. The LC-MS/MS parameters are given in Table 1A.

LC-MS/MS Analyses of Amides. Analyses were performed on a Jasco HPLC system (AS2057plus and PU-2080plus). Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (Vydac 218TP54, RP18, 5 μ m 250 × 4.6 mm; Hesperia, CA, USA) using a flow rate of 1 mL/min at 25 °C. The mobile phase used consisted of

Table 1. Mass Spectrometer Parameters for Quantitation (MRM Mode)

	t_R (min)	mass (amu)		DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
		Q1	Q3			
A						
<i>trans</i> -humulinic acid	21.2	265.1	154.9	-75	-30	-24
hydroxy- <i>trans</i> -alloisohumulone	23.5	377.1	195.2	-90	-41	-16
B						
3-methylbutyric acid proline amide	22.0	200.2	116.1	50	20	6
4-methyl-3-pentenoic acid proline amide	24.7	212.1	116.2	56	25	10

eluent A (water, 1.2 mL/L heptafluorobutyric acid) and eluent B (methanol/water (70:30, v/v), 1.2 mL/L heptafluorobutyric acid). For analyses the samples were diluted with methanol (1:1) and injected to the LC system at 20% B. After 10 min, B was raised to 70% within 20 min and then to 100% within 2 min (held for 13 min) and returned to starting conditions within 5 min for equilibration (10 min). The LC system was connected to the probe of the mass spectrometer. The mass analyses were performed using an Applied Biosystems API 4000 quadrupole instrument equipped with an API source using an electrospray ionization (ESI) interface. Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. For electrospray ionization in positive mode the following specifications were used: sprayer capillary voltage, 4 kV; nebulizing gas flow, 70 mL/min; heating gas, 70 mL/min at 500 °C; and curtain gas, 50 mL/min. For MRM, declustering potential (DP), collision energy (CE), and cell exit potential (CXP) were optimized by syringe injection of reference compounds. Quantitation was based on matrix-assisted calibration. The LC-MS/MS parameters are given in Table 1B. Proline amides were extracted from Pilsener type beer after acidification to pH 2 with hydrochloric acid by means of solid phase extraction (Bakerbond C₁₈ Polar Plus; Avantor, Deventer, The Netherlands). After elution with methanol, the extract was concentrated and redissolved in methanol/water (7:3, v/v). The crude extract was filtered and fractionated by analytical HPLC runs with the setup described above to isolate 3-methylbutyric acid proline amide. Fractions were collected by an automated fraction collector (1 min/fraction; CHF122SB, Advantec, Japan). Fractions containing the desired amide were dried and redissolved in a mixture of methanol and water (1:1) for LC-MS analysis. MS² spectra were generated by using the parameters described above (collision energy = 19 eV). The same experiment was performed with the authentic reference compound.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). NMR spectra were recorded on a Varian VXR 400 spectrometer operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C or on a Varian Unity Inova 500 instrument operating at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C, respectively. Chemical shifts are given relative to external SiMe₄.

Accurate Mass Determination (HR-MS). The high-resolution positive ion ESI mass spectra (HR-MS) were obtained from a Bruker Apex III Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an Infinity cell, a 7.0 T superconducting magnet (Bruker, Karlsruhe, Germany), a radio frequency (RF)-only hexapole ion guide, and an external electrospray ion source (Apollo; Agilent, off-axis spray). Nitrogen was used as drying gas at 150 °C. The samples were dissolved in methanol, and the solutions were introduced continuously via a syringe pump at a flow rate of 120 μ L/h. The data were acquired with 256K data points and zero filled to 1024K by averaging 32 scans.

RESULTS

Preparation of N-Acyl-L-proline Derivatives. For the analyses of the amino acid amides authentic reference material was necessary. In the case of proline the synthesis led to *cis*- and *trans*-configured amides due to the partial double character of

the amide moiety. In this context the *trans* isomer is considered to be the thermodynamically more stable species, which was confirmed by the performed syntheses.^{26,27} The proline-originated α -methine proton was used as a probe for the *cis/trans* ratio (1:5.7–6.5, Figure 1). The crystals precipitated from

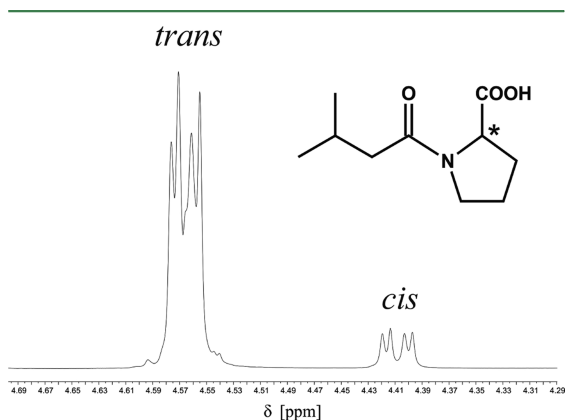


Figure 1. 3-Methylbutyric acid proline amide ^1H NMR spectra (excerpt) showing the α -methine proton of the *trans* (4.57 ppm) and *cis* (4.41 ppm) isomer.

3-methylbutyric acid proline amide were identified as the *trans* derivative by crystal structure analysis (data not shown). Interestingly, redissolution of *trans* crystals in deuterated chloroform, followed by NMR analysis, resulted in the reconstitution of the isomeric ratio stated above. Furthermore, the isomers could not be distinguished by LC-MS analyses.

Determination of Carboxylic Acids in Incubations. For quantitation the carboxylic acids had to be separated from the matrix. Residual *trans*-isohumulone led to artifacts during derivatization with hexamethyldisilazane and thus had to be removed by precipitation through acidification with hydrochloric acid. The carboxylic acids were extracted from the isohumulone-free supernatant (verified by HPLC-UV) with toluene. Butyric acid was used as internal standard because it cannot be formed from *trans*-isohumulone. The optimized workup provided a minimization of matrix effects and led to reproducible results.

Formation of *trans*-Isohumulone Degradation Products. *trans*-Isohumulone was incubated from 3 to 21 days at two different pH values under aerated and deaerated conditions. An overview of the substances analyzed in incubations is given in Figure 2.

Figure 3 (1) shows the degradation of *trans*-isohumulone. At acidic pH values it was almost completely vanished after 3 weeks (up to 97% degradation), although slightly more slowly at deaerated conditions (95%). On the contrary, relatively high amounts of unaltered *trans*-isohumulone were remained at pH 7, at which 72% was degraded in deaerated samples and 85% under oxidative conditions.

Along with the degradation of *trans*-isohumulone, the levels of 3-methylbutyric acid (MBA) increased over the incubation time in all incubation setups, preferably at neutral and aerated conditions with concentrations up to 86 mmol/mol *trans*-isohumulone (Figure 3, 2a). The concentrations found in deaerated samples (35 mmol/mol) were approximately 3 times lower. At pH 5 the highest concentrations were also observed under oxidative conditions (34 mmol/mol), that is, about one-

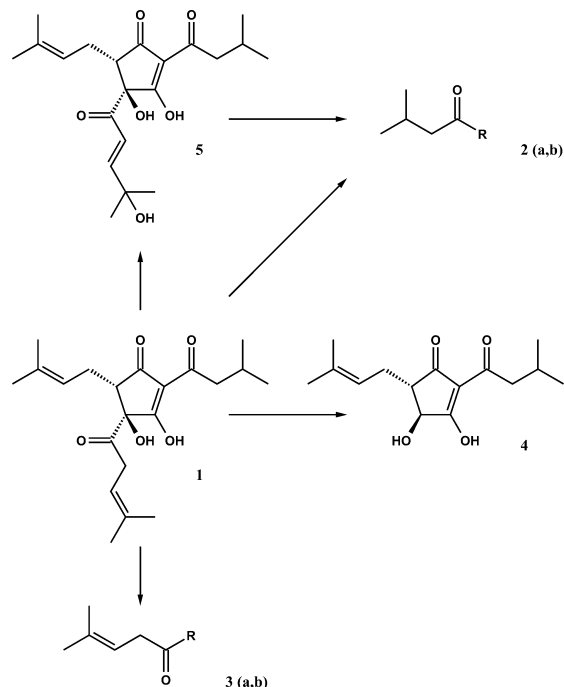


Figure 2. Overview of the structures analyzed in *trans*-isohumulone (1) incubations: 3-methylbutyric acid (2a, R = OH), 3-methylbutyric acid proline amide (2b, R = L-proline), 4-methyl-3-pentenoic acid (3a, R = OH), 4-methyl-3-pentenoic acid proline amide (3b, R = L-proline), *trans*-humulinic acid (4), hydroxy-*trans*-alloisohumulone (5).

third of the level determined at pH 7. A pH of 5 and deaeration led to concentrations of 24 mmol/mol after 3 weeks. The results for the formation of 4-methyl-3-pentenoic acid (MPA) (Figure 3, 3a) revealed an almost identical pattern as seen for MBA. However, MPA levels were about 4–6 times lower compared to MBA concentrations. Again, the maximum was found at pH 7 and oxidative conditions (20 mmol/mol), whereas under deaeration half as much MPA was formed (10 mmol/mol). At pH 5 the levels were about 3 times lower after 3 weeks (4.1 mmol/mol for deaerated vs 6.6 mmol/mol for aerated samples). The carboxylic acids in the stable isotope experiment with H_2^{18}O were analyzed analogously to the regular incubations. The incorporation of ^{18}O was monitored by analyzing additionally the $[\text{M} + 2]$ molecular ion. For pH 7 and oxidative conditions about 90% of both carboxylic acids incorporated ^{18}O . As an example, the SIM chromatograms for the unlabeled (m/z 175) and labeled (m/z 177) MBA are given in Figure 4. Additional incubations were also performed without proline. However, there were no significant differences in the levels of carboxylic acids (data not shown).

On the basis of isolated authentic reference compounds, *trans*-humulinic acid and hydroxy-*trans*-alloisohumulone were also quantitated in the incubations. *trans*-Humulinic acid was preferentially formed at a pH of 7 under deaerated conditions (Figure 3, 4; 11.6 mmol/mol after 3 weeks). Oxidative conditions led to levels up to 9.4 mmol/mol at the same pH. In contrast, in acidic incubations *trans*-humulinic levels were significantly higher at oxidative conditions (4.9 vs 3.0 mmol/mol in deaerated incubations). Hydroxy-*trans*-alloisohumulone had its maximum for pH 5 and oxidative conditions after 3 days

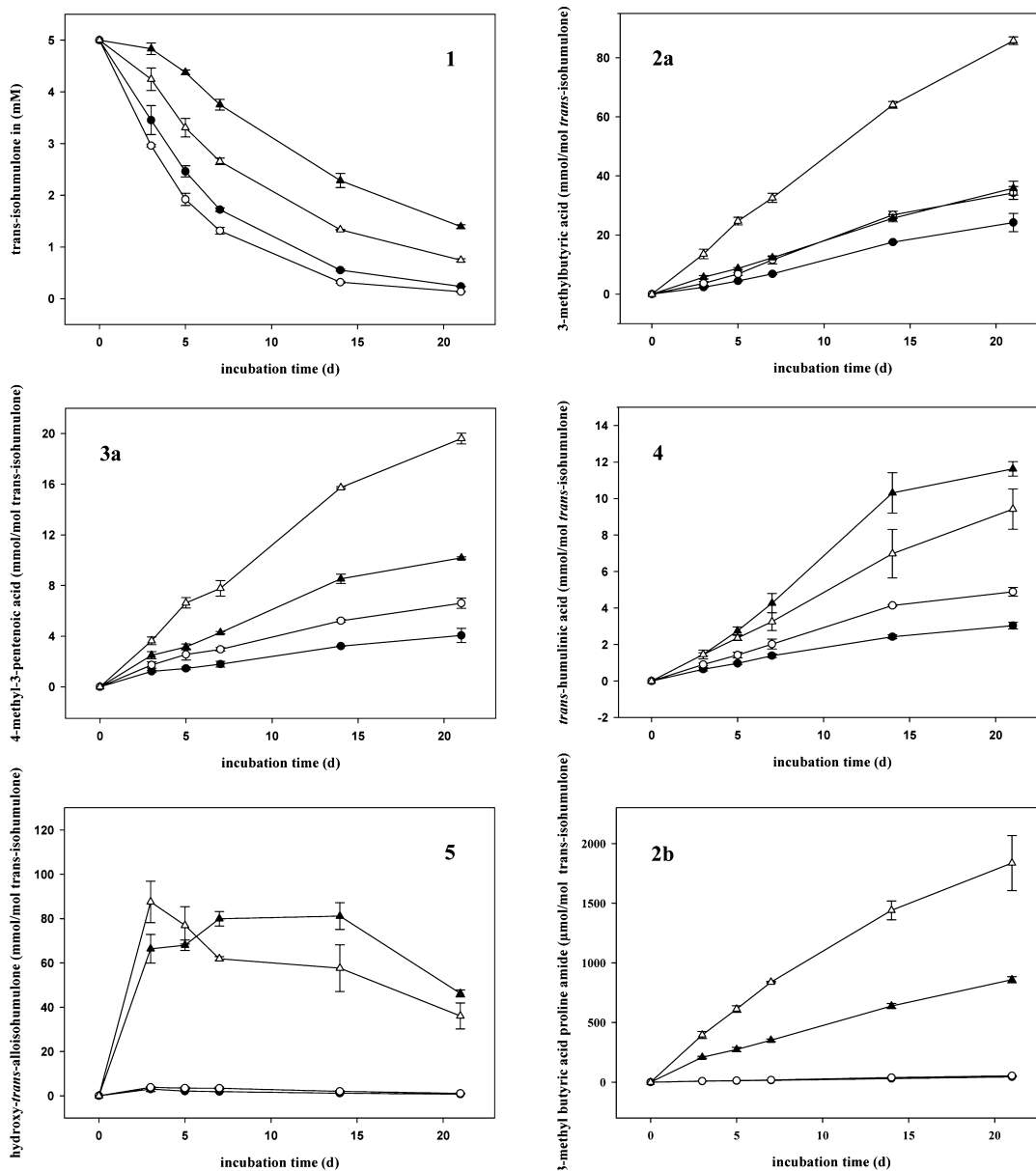


Figure 3. Degradation of *trans*-isohumulone (1) and formation of 3-methylbutyric acid (2a), 4-methyl-3-pentenoic acid (3a), *trans*-humulinic acid (4), hydroxy-*trans*-alloisohumulone (5), and 3-methylbutyric acid proline amide (2b) at pH 7 (aerated, Δ ; deaerated, \blacktriangle) and pH 5 (aerated, \circ ; deaerated, \bullet).

(3.9 mmol/mol) and then started slowly to decrease to a final level of 1.1 mmol/mol (Figure 3, 5). The curve for deaerated incubation was similar, although concentrations were slightly lower (maximum, 3.0 mmol/mol; 0.7 mmol/mol after 3 weeks). At pH 7 levels of hydroxy-*trans*-alloisohumulone were considerably higher. The maximum at aerated conditions was reached after 3 days at 87 mmol/mol. Thereafter, the level decreased to 36 mmol/mol within 3 weeks. At nonoxidative conditions the maximum was reached after 2 weeks at 80 mmol/mol and decreased to 46 mmol/mol afterward.

In parallel to the carboxylic acids, the analogous *L*-proline amides were found in the incubations. The results for 3-methylbutyric acid amide (MBA amide) are given in Figure 3 (2b). Whereas for pH 7 relatively high concentrations of MBA amide were found (up to 1800 μ mol/mol), about 50 times lower compared to MBA itself, only minor amounts (up to 54 μ mol/mol) were found at pH 5. The ratio of the MBA amide levels between aeration and deaeration at pH 7 were almost identical to the ratio found for the analogous acid (2.4 to 2.1). In contrast, 4-methyl-3-pentenoic acid proline amide (MPA amide) reached a plateau after 3 days regardless of the presence

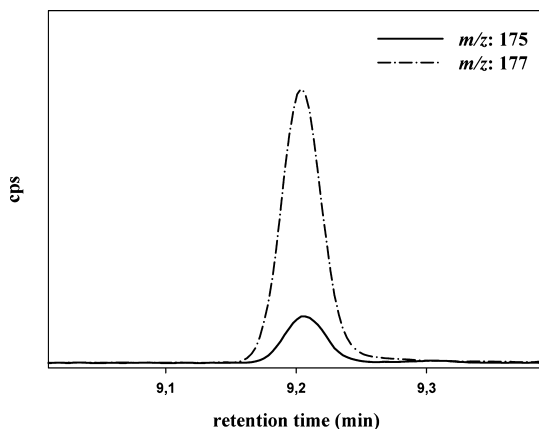


Figure 4. GC-LCI-MS chromatogram (SIM) of unlabeled (m/z 175; $[M + H]^+$) and labeled (m/z 177; $[M + H]^+$) 3-methylbutyric acid from *trans*-isohumulone incubation with $H_2^{18}O$. The ratio of 1:9 (unlabeled vs labeled) was calculated on the basis of the peak areas.

of oxygen and remained constant at levels around $170 \mu\text{mol/mol}$ at pH 7. An additional experiment showed that MPA amide was stable at these conditions. Analogous to MBA amide, MPA amide levels at pH 5 were extremely low ($1.8 \mu\text{mol/mol}$). MBA amide was also verified in beer by LC-MS/MS experiments (Figure 5). Although the spectrum of the isolate

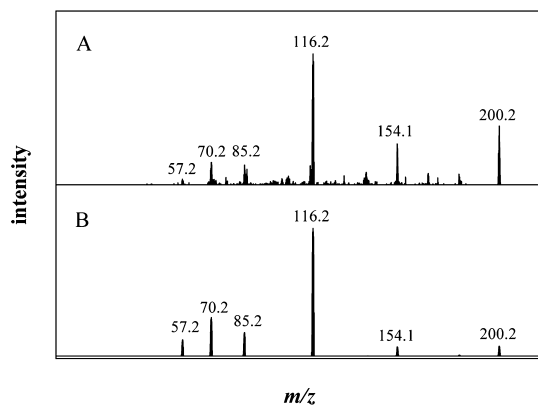


Figure 5. MS² of 3-methylbutyric acid proline amide (**2b**) isolated from beer (A) and synthesized reference standard (B) (product ion scan of m/z 200.2, collision energy of 19 eV).

(A) was much less intense, the fragmentation pattern was virtually identical to that of the authentic standard (B). For MPA amide, only traces were found in beer.

DISCUSSION

For the first time the degradation of *trans*-isohumulone in the presence of L-proline was thoroughly investigated in a model experiment. The clear impact of pH and oxidative conditions on the formation of carboxylic acids provided insights into the molecular mechanisms. In general, oxidative and hydrolytic reactions increased with higher pH. The question was whether the formation of carboxylic acids is based on hydrolytic or oxidative mechanisms or even a combination of both. Strong

evidence for a hydrolytic cleavage was the formation of carboxylic acid amides. The nucleophilic L-proline nitrogen can react analogously to water or hydroxide, respectively. Obviously because of its weaker nucleophilicity compared to water, the amounts of the amides remain low. However, from a mechanistic point of view their formation is very important. As MBA amide was preferentially formed at oxidative conditions and the ratio between aerated and deaerated conditions was almost equal to that of the free acids, an identical mechanism must be assumed. To strengthen the postulated hydrolytic mechanism a stable isotope experiment with $H_2^{18}O$ was performed, revealing the incorporation of approximately 90% ^{18}O into the carboxylic acids, which supported the proposed hydrolytic cleavage. Incorporation of ^{18}O into free carboxylic acids was excluded by incubation of MBA and MPA with $H_2^{18}O$, resulting in no enrichment of the heavy isotope into the acids at these conditions. The remaining 10% must be explained by incorporation of molecular oxygen by yet unknown pathways, presumably including reactive oxygen species as intermediates. Thus, the difference in the formation of MBA under aeration versus deaeration is mainly not caused by the incorporation of molecular oxygen to the acid. Obviously there is an upstream oxidation step promoting the hydrolytic cleavage of *trans*-isohumulone.

trans-Isohumulone is a β -dicarbonyl structure and also a carboxylic acid with a pK_a of 3.23 and is almost completely deprotonated at pH 5 and entirely at pH 7.²⁸ Because of the β,β' -tricarbonyl system a negative charge after deprotonation is distributed over seven atoms. Thus, the anticipated carbonyl activity at the alkenoic side chain is limited in deprotonated isohumulones and does not support the preferred generation of carboxylic acid by hydrolytic β -dicarbonyl cleavage at neutral pH. Considering the given hydrolytic cleavage at oxidative conditions, we therefore postulate the mechanism shown in Figure 6.

After deprotonation, the isohumulate ion is oxidized via a one-electron oxidation, according to Huavere et al., giving a carbon-centered *trans*-isohumulone radical.²⁹ Reaction with molecular oxygen leads to the formation of the corresponding hydroperoxy radical. After abstraction of hydrogen, the hydroperoxide undergoes a Fenton-like redox reaction to form the alkoxy radical and subsequently the alcohol after a second abstraction of hydrogen. The now oxidized isohumulone has lost its ability to enolize, which comes along with a significantly increased carbonyl activity. Nucleophilic attack of water or L-proline at the carbonyl function at the alkenoic or alkenoic side chain then gives the free carboxylic acid or the carboxylic acid amide based on β -dicarbonyl cleavage, respectively. The difference between the concentrations of MBA and MPA is likely caused by lower reactivity of the alkenoic side chain compared to the β,β' -tricarbonyl system, a potential steric hindrance due to the prenyl side chain at the C5 of the isohumulone and the coinciding oxidation to hydroxy-*trans*-alloisohumulone. Hydrolytic cleavage of the latter would give 4-hydroxy-4-methyl-2-pentenoic acid.

The identification of the remaining cleavage products with intact ring structure would have been unambiguous proof for the present mechanism. Unfortunately, it was not possible to isolate these compounds. In contrast to the carboxylic acids and their amides, which represent stable reaction endproducts, the remaining isohumulone structures must be evaluated as highly reactive and thus can be further degraded. For instance, the cleavage of MBA gives a reductone structure, which is highly

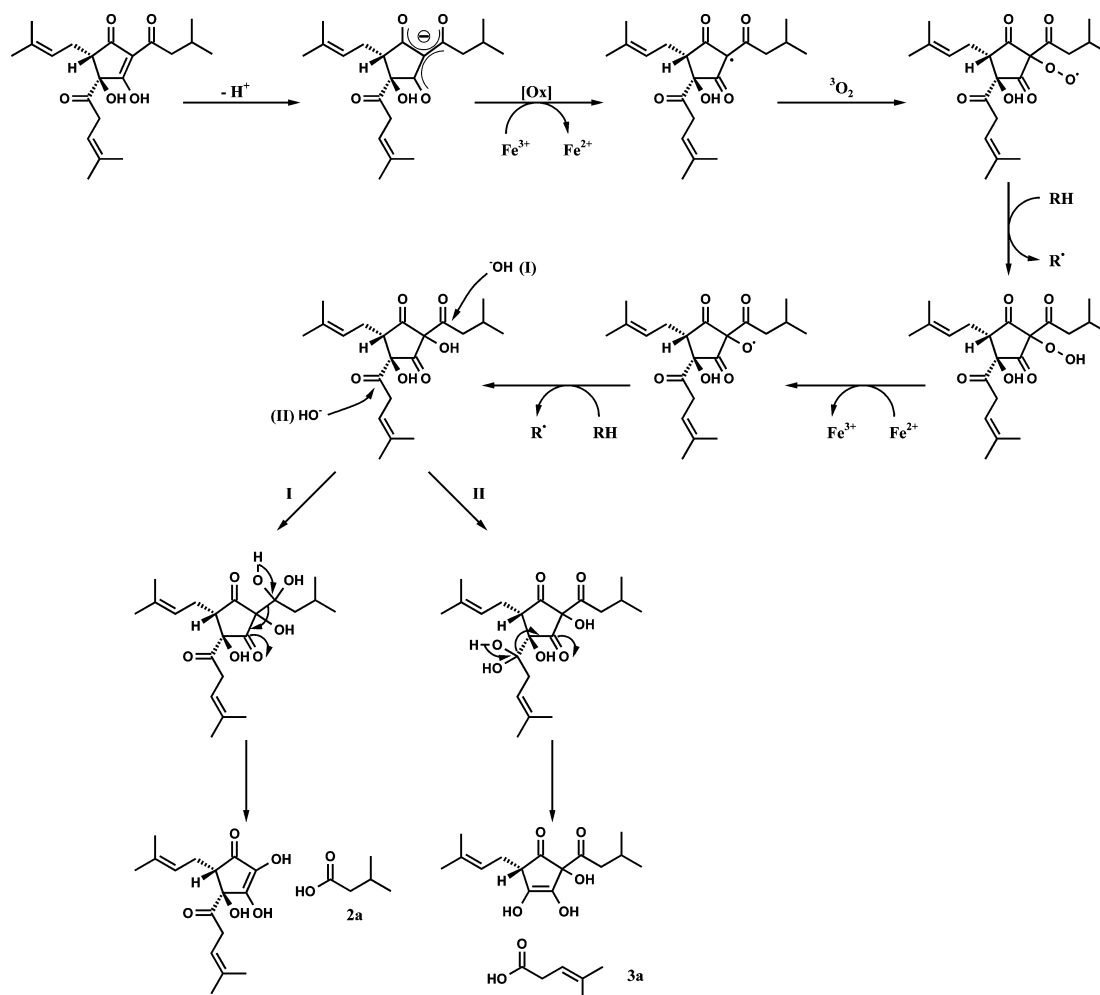


Figure 6. Proposed mechanism leading to the formation of 3-methylbutyric acid (2a) and 4-methyl-3-pentenoic acid (3a) from *trans*-isohumulone (1) by hydrolytic β -dicarbonyl cleavage after oxidation of the isohumulone ring structure.

susceptible to oxidation. This would also entail a loss or change of chromophoric properties to withdraw the products from the given detection systems. Therefore, in the present work, only *trans*-humulinic acid and hydroxy-*trans*-alloisohumulone were monitored as degradation products of *trans*-isohumulone.

Humulinic acids are known to form under harsh alkaline treatment. Here, we were able to detect *trans*-humulinic acid under mild conditions, preferably at pH 7. This per se nonoxidized structure must be formed by direct hydrolysis of the alkenoic side chain, which is not part of the tricarbonyl system and maintains its carbonyl activity. *trans*-Humulinic acid appeared to be stable under oxidative conditions and was not degraded significantly in an independent incubation (data not shown). Interestingly, higher amounts of *trans*-humulinic acid were generated at pH 7 under deaeration than in aerated incubations. This is reasonable considering the oxidation of *trans*-isohumulone according to above proposed mechanism leading to MBA and MPA. However, at pH 5 the picture is reversed and may be the result of a suppression of the initial oxidative step. Nevertheless, from our experiments the

hydrolytic cleavage is evident at least for the alkenoic chain without previous oxidation. This is further supported by the fact that the levels of *trans*-humulinic acid and MPA were almost equal at pH 5, whereas MPA levels were significantly higher than *trans*-humulinic concentrations at pH 7 on the contrary. Obviously the oxidation of *trans*-isohumulone decreases the yield of *trans*-humulinic acid.

As a major degradation product under oxidative conditions at pH 7, 4-hydroxy-*trans*-alloisohumulone was isolated and analyzed in incubations. Together with its precursor, 4-hydroperoxy-*trans*-alloisohumulone, it has already been described by Intelmann et al.⁶ The structure was relatively unstable and degraded after reaching a maximum more quickly under aerated conditions. In support, independent incubations of hydroxy-*trans*-alloisohumulone indeed revealed the formation of significant amounts of MBA, most likely according to our proposed mechanism (data not shown). We therefore must assume that MBA is not generated by only one precursor structure. As an alternative mechanism for the degradation of

hydroxy-*trans*-alloisohumulone, Intelmann et al. assumed the formation of polycyclic compounds.⁴

In conclusion, we present a novel degradation mechanism that comprehensively explains the so far unknown formation of carboxylic acids from isohumulones. Stable isotope experiments with H₂¹⁸O as well as the generation of carboxylic acid amides unambiguously revealed a dominant hydrolytic mechanism. We showed that this reaction is relevant to brewing by the verification of MBA amide in beer. The lacking fragmentation counterparts and other reactive intermediates are subjects of current research. The actual influence of carboxylic acids derived from hops on the staling flavor of beer still has to be clarified. Nevertheless, our results are in good agreement with Williams and Wagner, who found increased levels of fatty acids during beer aging caused by the addition of hops.¹⁴ Alternatively, MBA can also be formed by Strecker degradation of leucine, and molecular mechanisms may not be distinguishable in the aging of beer. It is very likely that the hydrolytic cleavage of isohumulones is also occurring during wort boiling after the addition of hops. High temperatures and exposure to oxygen would support the hydrolytic cleavage of isohumulones based on the proposed mechanism. Consequently, the formation of carboxylic acids from isohumulones at this stage would also promote the so-called staling esters during fermentation or beer storage. As we proved for L-proline, other nucleophiles besides water are able to react with isohumulones. Thus, also sulfur-containing substances may lead to potent odor-active compounds, such as S-methylthio-sovalerate.³⁰

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(M.A.G.) Phone: ++049-345-5525784. E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle, Germany, for recording NMR spectra and Dr. J. Schmidt from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany, for performing accurate mass determination.

REFERENCES

- (1) Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.* **2006**, *95*, 357–381.
- (2) Jaskuła, B.; Kafarski, P.; Aerts, G.; de Cooman, L. A kinetic study on the isomerization of hop α -acids. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6408–6415.
- (3) de Cooman, L.; Aerts, G.; Overmeire, H.; de Keukeleire, D. Alterations of the profiles of iso- α -acids during beer ageing, marked instability of *trans*-iso- α -acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso- α -acids. *J. I. Brewing.* **2000**, *106*, 169–178.
- (4) Intelmann, D.; Haseleu, G.; Dunkel, A.; Lagemann, A.; Stephan, A.; Hofmann, T. Comprehensive sensomics analysis of hop-derived bitter compounds during storage of beer. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1939–1953.
- (5) Intelmann, D.; Demmer, O.; Desmer, N.; Hofmann, T. O-18 stable isotope labeling, quantitative model experiments, and molecular dynamics simulation studies on the *trans*-specific degradation of the bitter tasting iso- α -acids of beer. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11014–11023.
- (6) Intelmann, D.; Hofmann, T. On the autoxidation of bitter-tasting iso- α -acids in beer. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5059–5067.
- (7) Taniguchi, Y.; Matsukura, Y.; Ozaki, H.; Nishimura, K.; Shindo, K. Identification and quantification of the oxidation products derived from α -acids and β -acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3121–3130.
- (8) Burns, C. S.; Heyerick, A.; de Keukeleire, D.; Forbes, M. D. E. Mechanism for formation of the lightstruck flavor in beer revealed by time-resolved electron paramagnetic resonance. *Chem.–Eur. J.* **2001**, *7*, 4553–4561.
- (9) Vermeulen, C.; Lejeune, I.; Tran, T. T. H.; Collin, S. Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5061–5068.
- (10) Hashimoto, N.; Eshima, T. Oxidative-degradation of isohumulones in relation to flavor stability of beer. *J. Inst. Brew.* **1979**, *85*, 136–140.
- (11) de Clippeleer, J.; de Rouck, G.; de Cooman, L.; Aerts, G. Influence of the hopping technology on the storage-induced appearance of staling aldehydes in beer. *J. Inst. Brew.* **2010**, *116*, 381–398.
- (12) Green, C. P. The volatile water-soluble fraction of hop oil. I. Formation by the oxidation of soft resins. *J. Inst. Brew.* **1970**, *76*, 36–40.
- (13) Clarke, B. J.; Hildebrand, R. P. The isomerization of humulone II. Preparation of reference compounds. *J. Inst. Brew.* **1967**, *73*, 60–70.
- (14) Williams, R. S.; Wagner, H. P. Contribution of hop bitter substances to beer staling mechanisms. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1979**, *37*, 13–19.
- (15) Davidek, T.; Devaud, S.; Robert, F.; Blank, I. Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: isotope labeling studies on the formation of acetic acid by a hydrolytic β -dicarbonyl cleavage mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6667–6676.
- (16) Voigt, M.; Glomb, M. A. Reactivity of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose: a key intermediate in the Maillard chemistry of hexoses. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4765–4770.
- (17) Smuda, M.; Glomb, M. A. Novel insights into the Maillard catalyzed degradation of maltose. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 13254–13264.
- (18) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose in the presence of lysine leads to formation of carboxylic acid amides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6458–6464.
- (19) Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verstrepen, K. J.; Delvaux, F. R.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. Influence of the brewing process on furfuryl ethyl ether formation during beer aging. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6755–6764.
- (20) Caspi, E.; Varma, K. R. Synthesis of (–)-(3S)- and (+)-(3R)-4-methyl-3D₁-pentan-1-ols and (–)-(3S)- and (+)-(3R)-3D₁-isocaproic acids. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 2181–2188.
- (21) Kim, B. H.; Lee, H. B.; Hwang, J. K.; Kim, Y. G. Asymmetric induction in the conjugate addition of thioacetic acid to methacrylamides with chiral auxiliaries. *Tetrahedron Asym.* **2005**, *16*, 1215–1220.
- (22) Sharpe, F. R.; Ormrod, I. H. L. Fast isomerization of humulone by photo-reaction – preparation of an HPLC standard. *J. Inst. Brew.* **1991**, *97*, 33–37.
- (23) Intelmann, D.; Haseleu, G.; Hofmann, T. LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1172–1182.
- (24) Tynan, P. J. T.; Murrrough, I. M.; Byrne, J. Preparation, purification and separation by high-performance liquid-chromatography of humulinic acids, dehydrohumulinic acids, and hulupones. *J. Inst. Brew.* **1990**, *96*, 137–141.
- (25) Borremans, F.; Depotter, M.; Dekeukeleire, D. C-13 NMR-spectroscopy of hop bitter substances. *Magn. Reson. Chem.* **1975**, *7*, 415–417.
- (26) Nishihara, H.; Nishihara, K.; Uefuji, T.; Sakota, N. Conformation and circular dichroism of several N-acyl-L-prolines. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 553–555.

(27) Pauling, L.; Corey, R. B. Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds – 2 new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1951**, *37*, 729–740.

(28) Simpson, W. J. Ionization behavior of hop compounds and hop-derived compounds. *J. Inst. Brew.* **1993**, *99*, 317–326.

(29) Huvaere, K.; Andersen, M. L.; Olsen, K.; Skibsted, L. H.; Heyerick, A.; de Keukeleire, D. Radicaloid-type oxidative decomposition of beer bittering agents revealed. *Chem.–Eur. J.* **2003**, *9*, 4693–4699.

(30) Lermusieau, G.; Bulens, M.; Collin, S. Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3867–3874.

Article

**Investigations on the Maillard Reaction of
Dextrins during Aging of Pilsner Type Beer**

Stefan Rakete, Alexander Klaus, and Marcus A. Glomb

J. Agric. Food Chem., **Just Accepted Manuscript** • Publication Date (Web): 13 Sep 2014Downloaded from <http://pubs.acs.org> on September 15, 2014**Just Accepted**

“Just Accepted” manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides “Just Accepted” as a free service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. “Just Accepted” manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. “Just Accepted” manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are accessible to all readers and citable by the Digital Object Identifier (DOI®). “Just Accepted” is an optional service offered to authors. Therefore, the “Just Accepted” Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the “Just Accepted” Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these “Just Accepted” manuscripts.

1 **Investigations on the Maillard Reaction of Dextrins during Aging of Pilsner**
2 **Type Beer**

3

4

Stefan Rakete, Alexander Klaus and Marcus A. Glomb*

5

6 Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg,

7 Kurt-Mothes-Straße 2, 06120 Halle/Saale, Germany

8

9 * To whom correspondence should be addressed. Phone: ++049-345-5525784.

10 E-Mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de

11

12 **Abstract**

13 Although Maillard reaction plays a pivotal role during preparation of food, only few
14 investigations concerning the role of carbohydrate degradation in beer aging have been
15 carried out. The formation of Maillard specific precursor structures and their follow-up
16 products during degradation of low molecular carbohydrate dextrins in the presence of proline
17 and lysine was studied in model incubations and in beer. 21 α -Dicarbonyl compounds were
18 identified and quantitated as reactive intermediates. The oxidative formation of
19 3-deoxypentosone as the precursor of furfural from oligosaccharides was verified.
20 *N*-Carboxymethylproline and *N*-formyl proline were established as novel proline derived
21 Maillard advanced glycation endproducts. Formation of *N*-carboxymethylproline and furfural
22 responded considerably to the presence of oxygen and was positively correlated to aging of
23 Pilsner type beer. The present study delivers an in-depth view on the mechanisms behind the
24 formation of beer relevant aging parameters.

25

26 **KEYWORDS:** *beer aging, Maillard reaction, dextrins, α -dicarbonyl compounds, furfural,*
27 *hydroxymethylfurfural, proline advanced glycation endproducts*

28

29 Introduction

30 The quality of beer is associated with its flavor and appearance. Globalization of the food
31 market entails significant longer transport and storage times. During aging of beer changes in
32 color and the formation of off-flavors can change the consumer's perception of the product.
33 Thus, the formation of undesired flavor active compounds represents the primary problem of
34 post-production changes. Although detailed studies on chemical alteration of beer have been
35 carried out, beer aging remains a very complex and still not completely understood
36 phenomenon.^{1,2} In the course of the Maillard reaction a variety of these age-related
37 parameters can be formed by carbohydrate degradation. As previous research has been
38 focused mainly on the degradation of mono- and disaccharides, information regarding the
39 degradation of oligosaccharides in beer is rare. Furthermore mono- and disaccharides
40 represent only a small part of carbohydrates present in bottled pilsner beer, where especially
41 low molecular weight dextrans are dominant.³

42 It is widely accepted that α -dicarbonyl compounds play a major role in carbohydrate
43 degradation and therefore should be important inducers of flavor deterioration (e.g. Strecker
44 degradation) in beer. 3-Deoxyglucosone leading to hydroxymethylfurfural (HMF) was
45 reported to be the predominant α -dicarbonyl in beer.⁴ Along with HMF, furfural is a
46 well-known aging parameter. Both increase with thermal treatment in beer production as well
47 as during prolonged shelf-life.⁵⁻⁸ Up to now, it is not entirely clear whether the formation of
48 furfural involves oxygen dependent mechanisms. Smuda et al. were able to identify maltosone
49 as an immediate precursor of 3-deoxypentosone in maltose-lysine incubations.⁹ This indicates
50 that di- and oligosaccharides may play an important role in the formation of these well-
51 established aging parameters.

52 Along with the high variety of intermediate and end products, protein and amino acid
53 modifications can occur and are known as advanced glycation endproducts (AGEs). These
54 alterations, caused by Maillard processes, reduce the nutritional quality by withdrawal of
55 carbohydrates and amino acids. Argpyrimidine, an arginine derived advanced glycation
56 endproduct, is so far the only in beer isolated compound resulting from the reaction with
57 methylglyoxal.¹⁰ As proline is the most relevant free amino acid in beer, research revealed a
58 variety of compounds containing the intact pyrrolidine ring but always with loss of the
59 carboxylic function.¹¹⁻¹³

60 The aim of the present study was to elucidate the relevance of specific Maillard processes for
61 beer aging. Special emphasis was placed on the determination of key intermediates and stable
62 end-products. Insights to reaction pathways were gained from model incubations. 21

63 α -dicarbonyls, furfural and HMF were monitored in model incubations and also quantitated in
64 fresh and aged beer. Furthermore, two novel proline derived AGEs were established which
65 may play an important role during beer aging.

66 **Materials and Methods**

67 **Materials.** All chemicals were provided by Sigma-Aldrich (Munich/Steinheim, Germany)
68 unless otherwise indicated. The following chemicals of the highest available analytical grade
69 were used: 2-methyl quinoxaline, L-proline, 2,3-dimethyl quinoxaline, glucose, maltose
70 monohydrate ($\geq 99\%$), maltotetraose ($\geq 95\%$), maltopentaose ($\geq 95\%$), maltohexaose
71 ($\geq 93\%$), maltoheptaose ($\geq 94\%$), 1-naphthylamine, N^{α} -*t*-BOC-lysine, N^{ϵ} -formyl-L-lysine,
72 *N*-formyl-L-proline, *ortho*-phenylenediamine (OPD), quinoxaline (Q), 2-quinoxalinol, sodium
73 cyanoborohydride, D₂O, methanol (HPLC gr., VWR Chemicals, Darmstadt, Germany), TLC
74 plates, dipotassium hydrogen phosphate trihydrate, potassium dihydrogen phosphate,
75 dimethyl sulfoxide, diethylenetriaminepentaacetic acid (Merck, Darmstadt, Germany),
76 heptafluorobutyric acid (ACROS Organics, Geel, Belgium), formic acid (Grüssing GmbH,
77 Filsum, Germany), CDCl₃ (ARMAR Chemicals, Leipzig/Döttingen, Germany),
78 hydroxymethylfurfural (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany). N^{ϵ} -carboxymethyl-L-lysine was
79 synthesized according to literature.¹⁴ Quinoxaline reference standards (maltosone-Q,
80 threosone-Q, 1-deoxypentosone-Q, 3-deoxymaltosone-Q, 3,4-dideoxypentosone-Q, 4-deoxy-
81 glucosone-Q, 1,4-dideoxyglucosone-Q, 1,5-dideoxymaltosone-4-ene-Q, 3-deoxy-
82 galactosone-Q, 5,6-dihydroxy-2,3-dioxohexanal-Q, 1-deoxymaltosone-Q,
83 3-deoxyglucosone-Q, glucosone-Q, 1-deoxyglucosone-Q, 3-deoxypentosone-Q, 1-deoxy-
84 theosone-Q, 3-deoxythreosone-Q) were isolated and characterized in previous work.^{9,15}

85 **Beer Samples.** For the present study eleven commercially available Pilsner type beer
86 samples were obtained. Analyses of the fresh beer samples were carried out in duplicate.
87 Aging was conducted for one beer sample under aerated and deaerated conditions at 50 °C for
88 two weeks. Aeration was achieved by opening the bottles, flushing the headspace shortly with
89 air, and capping it again. Samples from the aging experiment were analyzed in triplicate.
90 Aliquots were taken directly after cooling down. Samples were degassed by filtration for
91 further processing.

92 ***N*-(Furan-2-ylmethyl)-naphthalene-1-amine (Furfural-N).** One mmol furfural was
93 dissolved in 50 mL water. A mixture of 2 mmol 1-naphthylamine in 25 mL 15 % acetic acid
94 and dimethyl sulfoxide (50:50, v/v) and a solution of 5 mmol sodium cyanoborohydride in
95 25 mL water were added. The reaction mixture was stirred over night at 40 °C. The reaction
96 mixture was extracted twice with 100 mL hexane and the organic phase was concentrated
97 under vacuum. The crude product was further purified by column chromatography (silica gel
98 60, hexane-acetone 8:1). Fractions containing Furfural-N (TLC (silica gel): R_f 0.4, hexane-
99 acetone (8:1), UV detection) were concentrated under vacuum to obtain the compound as a

100 brownish oil. (0.9 mmol, 87 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.51 (s, 2H), 6.34
101 (dd, $^3J=3.2$, $^4J=0.8$ Hz, 1H), 6.38 (dd, $^3J=3.2$, $^3J=1.8$ Hz, 1H), 6.73 (d, $^3J=7.5$ Hz, 1H), 7.31 (d,
102 $^3J=8.5$ Hz 1H), 7.38 (pt, $^3J=7.5$ Hz, $^3J=8.5$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $^3J=1.8$ Hz, $^4J=0.8$ Hz, 1H), 7.50
103 – 7.45 (m, 2H), 7.86 – 7.81 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 41.9, 105.1,
104 107.4, 110.6, 118.3, 120.1, 123.7, 124.9, 125.9, 126.6, 128.8, 134.4, 142.2, 142.9, 152.6.
105 HR-MS: m/z 224.1070 (found); m/z 224.1070 (calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$).

106 **5-(Naphthalene-1-aminomethyl)-2-furanmethanol (HMF-N)**. The synthesis of HMF-N
107 was carried out as described above. One mmol hydroxymethylfurfural was used as the educt.
108 The crude product was extracted with 100 mL CHCl_3 , concentrated under vacuum and
109 purified by column chromatography (silica gel 60 using hexane-acetone 5:2). Fractions HMF-
110 N (TLC (silica gel): R_f 0.26, hexane-acetone (5:2), UV detection) were concentrated under
111 vacuum to obtain the compound as white crystals (0.7 mmol, 70 %). ^1H NMR (500 MHz,
112 CDCl_3) δ [ppm] = 4.46 (s, 2H), 4.57 (s, 2H), 6.23 (d, $^3J=3.2$ Hz, 1H), 6.25 (d, $^3J=3.2$ Hz,
113 1H), 6.70 (dd, $^3J=7.5$, $^4J=0.8$ Hz, 1H), 7.29 (d, $^3J=8.5$, 1H), 7.35 (pt, $^3J=8.5$, $^3J=7.5$ Hz 1H),
114 7.44 – 7.41 (m, 1H), 7.48 – 7.45 (m, 1H), 7.81 – 7.79 (m, 1H), 7.85 – 7.82 (m, 1H). ^{13}C NMR
115 (125 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 41.9, 57.5, 105.2, 108.3, 108.8, 118.4, 120.1, 123.8, 125.0,
116 125.9, 126.5, 128.8, 134.4, 142.8, 152.5, 153.8. HR-MS: m/z 254.1176 (found); m/z 254.1176
117 (calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$).

118 **N-Carboxymethyl-L-proline (CMP)**. CMP was synthesized according to the literature
119 with some modifications.¹⁶ Twenty mmol chloroacetic acid were cooled to -18 °C and stirred
120 under argon atmosphere. To this 2.5 g potassium hydroxide dissolved in 10 mL water were
121 added dropwise. Twenty mmol L-proline and 1.2 g potassium hydroxide were dissolved in
122 5 mL water and added dropwise to the reaction mixture. The solution was then heated to
123 80 °C and the temperature was held for 4 hours. Within this time 0.28 g potassium hydroxide
124 in 5 mL water were added dropwise. The reaction mixture was cooled down and neutralized
125 with 6 M hydrochloric acid. CMP was extracted from the reaction mixture with a strong anion
126 exchanger (Amberlite[®] IRA-410, Sigma-Aldrich, Munich/Steinheim, Germany). After elution
127 with 1 M hydrochloric acid the solution was dried and the crude product was further purified
128 by column chromatography (cellulose, *n*-butanol-acetic acid-water 20:3:5). The fractions
129 containing CMP (TLC (cellulose), R_f 0.28, same solvent, detection with bromocresol green)
130 were concentrated under vacuum, redissolved in water and lyophilized to give CMP as a
131 white powder (5.9 mmol, 30 %). ^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1.84 (m, H), 1.97 (m,
132 2H), 2.30 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 3.88 (d, 1H, $^2J=16.7$ Hz), 4.08 (d, 1H,
133 $^2J=16.7$ Hz), 4.16 (dd, 1H, $^3J=6.1$ Hz; $^3J=6.3$ Hz). ^{13}C NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 22.7,

134 28.2, 54.5, 54.7, 65.8, 168.7, 171.1. HR-MS: m/z 172.0613 (found); m/z 172.0615 (calculated
135 for $C_7H_{10}NO_4$ [M - H]).

136 **Incubation of Carbohydrates.** In general, incubations were conducted in 0.1 M phosphate
137 buffer at two different pH (pH 5 and pH 7) and 50 °C for up to 7 days. Maltose, maltotetraose,
138 maltopentaose, maltohexaose and maltoheptaose (42 mM) were incubated individually with
139 either *N*^α-t-BOC-lysine (42 mM) or L-proline (42 mM). Incubations were performed under
140 aerated and deaerated conditions. Deaeration was achieved by degassing of the buffer with
141 helium, addition of 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid and using minimum headspace
142 volumina during incubation. Samples of maltotetraose were prepared in triplicate and
143 incubated up to 7 days, the rest in duplicate for 7 days, respectively. Data for all target
144 analytes showed coefficients of variation < 5 %.

145 **Enzymatic Assay of Formic Acid.** For the quantitation of formic acid in maltotetraose
146 incubations an enzyme test-kit obtained from R-Biopharm AG (Darmstadt, Germany) was
147 used.

148 **Analytical HPLC-FLD (Fluorescence Detection) for Carbohydrates.** Derivatization of
149 carbohydrates was carried out following the method of Rakete and Glomb.³ The derivatized
150 samples were diluted with eluent B to concentrations appropriate for detection. Eluents were
151 water (A) and a mixture of methanol and demineralized water (7:3, v/v; B).
152 Heptafluorobutyric acid (0.6 mL/L) was added to both eluents as ion pair reagent. Analyses
153 were carried out on a Waters HPLC system consisting of a Waters 600-MS pump, a Waters
154 470 fluorescence detector, and a Waters 712 WISP autosampler (Waters Corp., Milford, MA,
155 USA). Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (Knauer,
156 Eurospher 100-5 C18, 250 × 4.6 mm, 5 μm, Berlin, Germany) using a flow rate of
157 1 mL min⁻¹ at 20 °C (Jetstream 2 column oven, Jasco, Groß-Umstadt, Germany). The
158 wavelength of excitation and emission was adjusted to 318 nm and 440 nm, respectively. The
159 separation started at 65:35 (A: B). After 75 min, B was raised to 100 % in 5 min to flush the
160 column for 15 min. Within 5 min the composition of the eluents was changed to starting
161 conditions and equilibrated for 15 min prior to injection of the next analysis.

162 **Analytical HPLC-MS².** A Jasco PU-2080 Plus quaternary gradient pump with degasser
163 and a Jasco AS-2057 Plus autosampler (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) were used.
164 Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (KNAUER,
165 Eurospher 100-5 C18, 250×4.6 mm, 5 μm, Berlin, Germany) using a flow rate of 1 mL min⁻¹.
166 The mass analyses were performed using an Applied Biosystems API 4000 quadrupole
167 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an API source using

168 an electrospray ionization (ESI) interface in the positive mode. The LC system was connected
169 directly to the probe of the mass spectrometer. Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas.
170 All compounds were analyzed by scheduled multiple reaction monitoring (sMRM).
171 Quantitation was based on the standard addition method. More precisely, increasing
172 concentrations of authentic reference compounds were added to aliquots of the sample (50:50,
173 v/v). A regression of response versus concentration was used to determine the concentration
174 of the analyte in the sample. Calibration with this method resolves potential matrix
175 interferences.

176 *α -Dicarbonyl Compounds.* Sample aliquots were reincubated with *o*-phenylenediamine
177 (OPD, 5 mM) for 5 hours at 25 °C. OPD was added at the time of sampling to avoid artifacts.
178 The derivatized samples were diluted with water to concentrations appropriate for detection.
179 The mobile phase used consisted of water (solvent A) and methanol/water (7:3 (v/v), solvent
180 B). To both solvents (A and B), 0.6 mL/L heptafluorobutyric acid (HFBA) was added.
181 Chromatographic parameters were according to Henning et al.¹⁷ Elution of quinoxalines
182 (1-deoxymaltosone-Q at 8.3 min, maltosone-Q at 8.7 min, glucosone-Q at 9.8 min,
183 1-deoxyglucosone-Q at 12.0 min, 3-deoxymaltosone-Q at 11.1 min, threosone-Q at 14.5 min,
184 1,5-dideoxymaltosone-4-ene-Q at 11.4 min, 4-deoxyglucosone-Q at 13.6 min,
185 3-deoxyglucosone-Q at 13.9 min, glyoxylic acid-Q at 17.1 min, 1-deoxypentosone-Q at
186 17.3 min, 3-deoxypentosone-Q at 16.7 min, 3-deoxygalactosone at 14.4 min,
187 5,6-dihydroxy-2,3-dioxohexanal-Q (1) at 17.4 min, 5,6-dihydroxy-2,3-dioxohexanal-Q (2) at
188 18.3 min, 1,4-dideoxyglucosone-Q at 18.4 min, 3-deoxythreosone-Q at 18.8 min,
189 1-deoxythreosone-Q at 19.3 min, glyoxal-Q at 20.6 min, 3,4-dideoxypentosone-Q at 20.0 min,
190 methylglyoxal-Q at 22.1 min, and diacetyl-Q at 23.4 min) was monitored by mass
191 spectrometry. The optimized parameters for mass spectrometry as well as limits of detection
192 and quantitation for all compounds monitored were according to previous work.⁹

193 *AGEs.* Prior to injection into the HPLC-MS² system, solutions were diluted to appropriate
194 concentrations with water. For deprotection of the *N*^α-BOC protection group an equal volume
195 6 M hydrochloric acid was added to the sample and kept at room temperature for 30 min. The
196 mobile phase used consisted of water (solvent A) and methanol/water (7:3 (v/v), solvent B).
197 To both solvents (A and B), 1.2 mL/L HFBA was added. Samples were injected at 1 % B,
198 gradient then changed to 20 % B within 15 min and to 100 % B after 2 min (held 8 min).
199 Then gradient was changed to 1% B within 2 min and held for 7 min. The optimized
200 parameters for mass spectrometry and retention times are shown in **Table 1**.

201 *Furfural and Hydroxymethylfurfural*. Derivatization of furfural and hydroxymethylfurfural
202 was carried out analogous to carbohydrate derivatization.³ However, samples were
203 reincubated for only 1 h at 20 °C and diluted to appropriate concentrations with methanol
204 prior to injection into the HPLC-MS² system. The mobile phase used consisted of water
205 (solvent A) and methanol/water (7:3 (v/v), solvent B). To both solvents (A and B), 0.8 mL/L
206 formic acid was added. Samples were injected at 90 % B, gradient then changed to 100 % B
207 within 10 min and held for 15 min. Then the mobile phase was changed to 90% B within
208 1 min and equilibrated for 7 min prior to injection of the next analysis. The optimized
209 parameters for mass spectrometry and retention times are shown in **Table 1**.

210 **Identification of *N*-Formyl Proline (FP) and *N*-Carboxymethylproline (CMP) in Beer.**

211 Filtrated beer was subjected to several analytical HPLC runs as mentioned above. Fractions
212 containing FP and CMP were combined and dried in a vacuum concentrator (Savant Speed-
213 Vac Plus SC 110 A combined with a Vapor Trap RVT 400, Thermo Fisher Scientific GmbH,
214 Dreieich, Germany). The residue was dissolved in water and injected into the HPLC-MS²
215 system performing a CID experiment. The fragmentation spectra of the authentic references
216 were obtained with the same parameters (declustering potential (DP), collision cell exit
217 potential (CXP)) as in **Table 1**. Parameters for collision energy (CE) were as followed: FP:
218 19 eV; CMP: 21 eV).

219 **Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR).** ¹H and ¹³C NMR spectra were
220 recorded on a Varian Unity Inova 500 instrument operating at 500 MHz for ¹H and 125 MHz
221 for ¹³C. SiMe₄ was used as a reference for calibrating the chemical shift.

222 **High Resolution Mass Determination (HR-MS).** The positive and negative ion high
223 resolution ESI mass spectra were obtained from a Orbitrap Elite mass spectrometer
224 (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with an HESI electrospray ion source
225 (spray voltage 4 kV; capillary temperature 275 °C, source heater temperature 40 °C; FTMS
226 resolution > 30.000). Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. The sample solutions
227 were introduced continuously via a 500 µL Hamilton syringe pump with a flow rate of
228 5 µL min⁻¹. The data were evaluated by the Xcalibur software 2.7 SP1.

229

230 **Results and Discussion**

231 Since dextrins represent the predominant carbohydrates and proline is the most relevant free
232 amino acid in beer they are the major source for Maillard induced carbohydrate degradation.
233 The formation of α -dicarbonyl compounds, furfural and hydroxymethylfurfural (HMF) has
234 been previously studied in beer and numerous model incubations. Nevertheless, this is the
235 first time mechanistic investigations of amine induced degradation of dextrins up to
236 maltoheptaose were performed and compared directly to changes during beer aging.
237 Maltotetraose as the major carbohydrate in beer was investigated in more detail. The
238 formation of Maillard reaction products derived from maltose and dextrins in the presence of
239 proline and lysine was followed in a defined aqueous model system under aerated and
240 deaerated conditions at pH 7 and pH 5. To compare results to previous findings of Smuda et
241 al., especially the formation of α -dicarbonyls, incubations were also performed in the
242 presence of *N*^α-t-BOC-lysine, later referred to as lysine.⁹ All parameters were also monitored
243 in eleven fresh and commercially available Pilsner type beers as well as in two artificially
244 aged beers of which one was additionally exposed to oxidative stress. Though beer normally
245 is not exposed to temperatures above 30 °C, the aging experiment conducted at 50 °C
246 delivered conclusive results and was comparable to other aging procedures found in the
247 literature. However, reaction kinetics may differ in comparison to lower temperatures.

248 **Changes in the Carbohydrate Profile.** The breakdown of dextrins was studied in model
249 incubations. As shown in **Table 2**, formation of glucose, maltose (Mal) and maltotriose (M3)
250 during incubation of maltotetraose (M4) with proline at pH 7 and pH 5, revealed significant
251 higher amounts of M3 vs Mal and glucose. Levels of glucose, Mal and M3 were throughout
252 higher under aerated than deaerated conditions. The degradation of higher molecular dextrins
253 maltopentaose (M5), maltohexaose (M6) and maltoheptaose (M7) showed a similar
254 depolymerization down to glucose (data not shown). The results for lysine were quite similar
255 (supplementary information). The change in the carbohydrate profile during aging of beer is
256 given in **Table 3**. Unfortunately, M3 could not be separated from isomaltose and, thus, was
257 not quantitated in beer. Levels of M4 to M7 slightly decreased during aging but showed no
258 significant change between fresh and aged beer. In agreement with the model incubations,
259 much higher amounts for glucose and Mal were found in aged samples. The ratio of glucose
260 to Mal was two to one detected in fresh samples. Mal increased ninefold during aging,
261 glucose only twofold. In contrast to the model incubations the impact of aeration on the
262 degradation and formation of carbohydrates was negligible in beer samples.

263 **Formation of α -Dicarbonyl Compounds.** The α -dicarbonyls were trapped post incubation
264 with *o*-phenylenediamine as their corresponding quinoxalines following an established
265 method.⁹ The concentrations of the α -dicarbonyls formed during the degradation of all used
266 carbohydrates in the presence of proline at pH 7 are summarized in **Table 4**. In general,
267 formation of α -dicarbonyl compounds monitored during model incubations of maltotetraose
268 to maltoheptaose were in good agreement to the results found for maltose.⁹ However in
269 contrast to Smuda and Glomb, only ten α -dicarbonyls were identified in oligosaccharide
270 incubations. Levels of 1-deoxyglucosone, threosone and 1-deoxypentosone were under the
271 limit of quantitation or detection, respectively. These α -dicarbonyls are formed by glucose
272 degradation in maltose incubations, which only has a minor impact in oligosaccharide
273 incubations. As expected, the maltose derived α -dicarbonyls 1-deoxymaltosone,
274 3-deoxymaltosone, 1,5-dideoxymaltosone-4-ene and maltosone were only quantitated in
275 maltose incubations and, thus, are not listed. For higher oligosaccharides reference
276 compounds with the complete carbon backbone are not available.

277 Formation of α -dicarbonyls in the presence of lysine at pH 7 was up to ten times higher
278 compared to proline incubations, showing the same response to oxidative conditions.
279 Obviously, lysine represents a better nucleophile than proline. Moreover, the degradation of
280 the Amadori product of proline may require more activation energy.¹⁸ As proline represents
281 the most abundant free amino acid in beer, data of lysine incubations are given in the
282 supplementary information. When the experiments were conducted at pH 5 some
283 α -dicarbonyls could not be quantitated. However, most α -dicarbonyls showed a similar
284 response to oxidative conditions but at much lower concentrations (factor 3 to 10). The effect
285 of pH value has been shown to have significant impact on reaction rates and mechanistic
286 pathways of the Maillard reaction.¹⁹ Due to protonation of amino functions the reaction rate
287 decreases with decreasing pH. Nevertheless, at the approximate pH of beer (4 to 5),
288 α -dicarbonyls are still formed and degraded during aging at 50 °C while their absolute
289 concentrations remain relatively low. Thus, we decided to only show the results for pH 7,
290 with one exception. Interestingly, 3-deoxyglucosone and 3-deoxygalactosone showed higher
291 amounts at pH 5. 3-Deoxygalactosone had its maximum even after three days and decreased
292 afterwards (**Table 5**). Moreover, 3-deoxyglucosone was formed at approximately equal
293 concentrations in incubations containing either lysine or proline, strongly suggesting an acid-
294 base catalyzed formation pathway involving dextrans in addition to the amine induced
295 degradation of glucose. 3-Deoxyglucosone along with 3-deoxygalactosone were also the
296 predominant α -dicarbonyls detected in beer. Formation of 3-deoxygalactosone by

297 epimerization of 3-deoxyglucosone was previously described in literature.^{20,21} Analogously,
298 3-deoxyglucosone and 3-deoxygalactosone may also be formed from 3-deoxyosones derived
299 from carbohydrate degradation of dextrans. This should be subject of future investigations
300 since 3-deoxyglucosone and 3-deoxygalactosone represent the direct precursors of HMF. At
301 either pH, some α -dicarbonyls also showed a strong influence of the degree of
302 polymerization, in particular glyoxal and glyoxylic acid. Most other α -dicarbonyls also
303 increased, but to a much lesser extent. This must be caused by the quality of the leaving group
304 which obviously improves with increasing degree of polymerization. Alternatively,
305 continuous depolymerization of dextrans down to glucose may also generate new sources for
306 α -dicarbonyls, but has to be estimated to be only of minor importance.

307 In general, the results of model incubations at pH 7 were in support of the changes observed
308 during beer aging. The α -dicarbonyls determined in beer are given in **Table 6**. Contrary to the
309 model incubations, 21 α -dicarbonyls were found in beer. It is noteworthy that, based on
310 preparation of mash and wort, glucose and maltose derived α -dicarbonyls are indeed present
311 in fresh beer. Especially, α -dicarbonyls generated in the presence of oxygen e.g. maltosone,
312 glucosone, 3-deoxypentosone and 3-deoxythreosone were in good agreement. About half of
313 the α -dicarbonyls measured in fresh samples decreased during aging. Especially
314 3-deoxyglucosone and 3-deoxygalactosone as well as 3-deoxypentosone and
315 1-deoxyglucosone showed considerably lower amounts after thermal processing. Others
316 occurred at larger quantities compared to their concentrations measured in fresh beer.
317 Vanderhaegen et al. reported an impact on the formation of Maillard reaction products in the
318 presence of oxygen.⁶ However, due to the respective beer matrix it is rather difficult to predict
319 the behavior of highly reactive intermediates such as α -dicarbonyls. Bravo et al. demonstrated
320 the extent of α -dicarbonyl formation and their effect on flavor deterioration during extended
321 shelf life.⁴ In particular, they depicted that a variety of these compounds are already
322 preformed during preparation of beer and therefore found in the final product while both
323 formation and degradation still continues during shelf life. Levels detected for
324 3-deoxypentosone, 3-deoxyglucosone, 1-deoxypentosone, 1-deoxyglucosone, methylglyoxal
325 and diacetyl in fresh beer were in good agreement to their results.

326 Formation of α -dicarbonyls was studied in detail in incubations of M4 with proline at pH 7.
327 Levels of methylglyoxal were almost identical under aerated and deaerated conditions (0.041
328 vs. 0.038 mmol/mol M4, **Figure 1**). Methylglyoxal also increased slightly during beer aging
329 revealing a negligible effect of aeration. Glyoxal showed an eighteenfold higher concentration
330 under aeration (7.3 vs. 0.38 mmol/mol M4) in model incubations and increased from maltose

331 to maltoheptaose. During beer aging glyoxal levels decreased, but significantly responded to
332 aeration. Glyoxylic acid was found only in small quantities under aeration
333 (0.005 mmol/mol M4) and considerably increased with increasing degree of polymerization.
334 In contrast to the findings of Smuda et al. for maltose degradation, glyoxylic acid revealed
335 significantly higher amounts under aeration from dextrans. This supports the findings of
336 Velisek et al., who described glyoxylic acid as an oxidation product of glyoxal.²² This
337 hypothesis is further facilitated by the fact that concentrations of glyoxylic acid increased with
338 levels of glyoxal at approximately the same rate from maltose to maltoheptaose. Glyoxylic
339 acid was not quantitated in fresh beer or during aging. However, this may be explained by
340 reaction of glyoxylic acid with other compounds in beer and also by its extremely low levels
341 of formation as shown in model incubations. Levels of diacetyl doubled under nonoxidative
342 conditions (0.012 vs. 0.027 mmol/mol M4) in model incubations. In contrast, diacetyl levels
343 in beer behaved different and revealed higher amounts under aeration during aging. This
344 suggests other chemical pathways like the oxidation of 2,3-butandiole or acetoin to be of
345 major importance. Threosone, which was not detectable in dextrin incubations, was identified
346 in beer and responded to aeration.

347 Investigations on α -dicarbonyls with a backbone consisting of four and five carbon atoms
348 are shown in **Figure 2**. Only small amounts of 1-deoxythreosone were found in model
349 incubations and showed only minor differences between aeration and deaeration. Levels also
350 hardly changed during beer aging. 3-Deoxythreosone revealed a strong response to aeration
351 (0.070 mmol/mol M4). Under deaeration levels measured were at the limit of quantitation. A
352 similar picture was found for the beer aging experiment, where 3-deoxythreosone levels
353 increased especially under aeration. Levels of 3-deoxypentosone, the precursor of furfural,
354 responded considerably to aerated conditions (0.116 vs. 0.007 mmol/mol M4). Though
355 3-deoxypentosone decreased during beer aging, levels in aerated beer were significantly
356 higher. 3,4-Dideoxypentosone increased under deaerated conditions (0.056 mmol/mol M4),
357 whereas amounts formed under aeration remained low (0.009 mmol/mol M4). In contrast,
358 3,4-dideoxypentosone was only found in traces in beer. This may be explained by the high
359 reactivity of the structure itself, or more likely, of its unknown precursor. Mavric et al. are so
360 far the only authors proposing a possible mechanism considering 4-deoxyglucosone as the
361 educt.²³ 1-Deoxypentosone represents a specific fragmentation product of glucose, hence, we
362 were able to detect small amounts in fresh beer and only traces after thermal induced stress.¹⁵

363 Formation of α -dicarbonyl compounds with a backbone consisting of six carbon atoms is
364 shown in **Figure 3**. 5,6-Dihydroxy-2,3-dioxohexanal, 4-deoxyglucosone and

365 1,4-dideoxyglucosone were already mentioned as specific degradation products of
366 oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkage.^{23–25} 5,6-Dihydroxy-2,3-dioxohexanal was found
367 to be lower under aeration than deaeration. Based on its structure, 5,6-dihydroxy-
368 2,3-dioxohexanal is prone to further fragmentation explaining the low amounts detected in
369 beer. Levels of 4-deoxyglucosone were slightly higher under deaerated conditions in model
370 incubations (0.4 vs. 0.5 mmol/mol M4). During beer aging, 4-deoxyglucosone decreased and
371 displayed a lower concentration in aerated samples which is rather contrary to model
372 incubations and must be explained by oxidative degradation. In incubations formation of
373 1,4-dideoxyglucosone responded considerably to nonoxidative conditions and was found to be
374 low under aeration (0.011 vs. 0.030 mmol/mol M4). Contrary to the findings of Bravo et al.
375 only small amounts of 1,4-dideoxyglucosone were found in beer and slightly decreased during
376 beer aging. Glucosone responded strongly to the aeration of beer and increased during aging
377 whilst levels were found to be lower in normal aged beer.

378 For the first time maltosone, 1-deoxymaltosone, 3-deoxymaltosone and
379 1,5-dideoxymaltosone-4-ene were quantitated as specific Mal derived degradation products in
380 beer. As their concentrations remained below the limit of detection during incubation of
381 maltotetraose and higher molecular weight dextrans, they refer solely to the Maillard
382 chemistry of Mal.⁹ 1,5-Dideoxymaltosone-4-ene, amongst other α -dicarbonyls, was previously
383 identified by Bravo et al. in beer.⁴ It is again important to note that these degradation products
384 of maltose are already formed during mash preparation and wort boiling, reflecting the high
385 concentrations of Mal in mash and wort. During aging, Mal was formed in relatively high
386 amounts by depolymerization of oligomeric dextrans suggesting a net increase in the
387 formation of α -dicarbonyls mentioned above. This is supported by the accumulation of
388 3-deoxymaltosone as a relatively stable intermediate. On the other hand concentrations of
389 maltosone and 1,5-dideoxymaltosone-4-ene remained almost unchanged during beer aging and
390 1-deoxymaltosone was even degraded significantly. These results must be explained by the
391 high reactivity of these compounds as their degradation exceeds their formation.

392 **Formation of Furfural and other Follow-up Products.** Beside the formation of
393 α -dicarbonyls a range of other Maillard reaction products was analyzed in model incubations
394 (Table 7) and beer (Table 6). Formation of furfural with 3-deoxypentose as the immediate
395 precursor is well described for pentose and hexose degradation in literature.^{26,27} Furthermore,
396 3-deoxypentose has been described as a predominating α -dicarbonyl derived from the
397 degradation of oligosaccharides.²⁸ However, more recent studies strongly suggest the
398 formation of 3-deoxypentose via hydrolytic β -dicarbonyl cleavage of oxyosones.^{9,15}

399 Furthermore, amine induced cleavage leading to amides may also be of importance.²⁵
400 Consequently 3-deoxypentosone and therefore furfural should also be formed by oxidative
401 degradation of dextrans as shown in **Figure 4**. The oxidation of dextrans leads to oxyosones.
402 The nucleophilic cleavage of the 1,3-tautomer at the C1 position leads to formation of formic
403 acid as well as of *N*-formyl proline (FP). The emerging 1,2-enediol will immediately cleave
404 off substituents at position 3 to give 3-deoxypentosone and subsequently after cyclization and
405 dehydration furfural. As described above the preferred formation of 3-deoxypentosone and
406 depolymerization of dextrans under aerated conditions supported the given mechanism. In
407 further accordance to this mechanism furfural was found in much higher concentrations in
408 aerated M4 incubations (1.04 $\mu\text{mol/mol}$ vs. 0.25 $\mu\text{mol/mol}$ M4). The results for M4/lysine
409 incubations were quite similar (supplementary information). Levels of furfural detected in
410 fresh beer were in accordance with literature.²⁹ Furfural increased up to twentyfold ($0.26 \pm$
411 $0.01 \mu\text{M}$, fresh vs. $4.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$, deaerated vs. $5.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$, aerated) after thermal processing
412 of beer, exceeding the degradation of 3-deoxypentosone (decreased by 20 to 40 %) and
413 therefore suggesting a simultaneous net increase of 3-deoxypentosone. Again in line with the
414 mechanism shown in **Figure 4** concentrations of furfural were significantly higher under
415 aeration than deaeration and strongly suggested a major participation of Maillard mechanisms
416 in the formation of furfural during beer aging. As counterparts of the hydrolytic β -dicarbonyl
417 cleavage shown in **Figure 4**, formic acid and FP must be found in the aerated model
418 incubations, too. Indeed, both structures were formed in higher yields under aerated
419 conditions (4.1 vs. 3.0 mmol/mol M4 and 0.89 vs. 0.64 mmol/mol M4, respectively) showing
420 almost the same ratio between deaerated and aerated conditions (**Table 7**). This supports the
421 proposed parallel mechanism of formation by hydrolytic β -dicarbonyl cleavage. Interestingly,
422 formation also occurred under deaeration which must be explained by fragmentation of other
423 reactive intermediates. Levels of formic acid were significantly higher than FP because the
424 hydroxide ion represents a better nucleophile compared to proline. Unfortunately, the
425 sensitivity of the formic acid enzyme assay was not sufficient for the determination in
426 incubations at pH 5. FP levels at pH 5 were about 20 times lower compared to pH 7,
427 nevertheless, showing the same ratio between aeration and deaeration. Formation of FP
428 increased from Mal to M7 and displayed an increasing deviation between aerated and
429 deaerated conditions (data not shown). Levels of FP in beer ($2.98 \pm 0.01 \mu\text{M}$, fresh vs. $3.04 \pm$
430 $0.04 \mu\text{M}$, deaerated vs. $3.08 \pm 0.06 \mu\text{M}$, aerated) showed no noticeable changes during aging.
431 Thus, FP must be primarily generated during beer production before bottling. FP was also
432 confirmed in beer by MS² spectra (supplementary information). The lysine analogue

433 *N*^ε-formyl lysine (FL) was also determined in model incubations displaying an almost similar
434 behavior compared to FP (supplementary information). As lysine levels in beer are very low
435 FL was not detectable in beer samples.³⁰

436 HMF was already found in relatively high amounts in non-incubated solutions of M4 and
437 decreased during incubation. This is most likely caused by impurities of the used
438 carbohydrates, where HMF could be generated during the preparation of the carbohydrates
439 and then degraded during incubation. Levels of HMF detected in fresh beer were in
440 accordance with literature.²⁹ During aging levels of HMF increased tenfold ($2.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$,
441 fresh vs. $19.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$, deaerated vs. $21 \pm 2 \mu\text{M}$, aerated). As implied above, epimerization
442 of 3-deoxyglucosone to 3-deoxygalactosone may impair the formation of HMF. Instead, the
443 strong increase of HMF supports a high formation and degradation rate from both,
444 3-deoxyglucosone and 3-deoxygalactosone, regardless from the presence of oxygen during
445 thermal processing of beer.

446 *N*^ε-Carboxymethyllysine (CML) is one of the most commonly identified AGEs in
447 foodstuffs.³¹ However analogously to FP *N*-carboxymethylproline (CMP) must be regarded as
448 more important in the context of beer. Similar to the formation of CML, CMP can be formed
449 by oxidative fragmentation of the proline Amadori compound or by reaction with glyoxal and
450 glycolaldehyde.^{14,32} This was confirmed as CMP was almost exclusively generated under
451 oxidative conditions in model incubations (0.560 vs. 0.059 mmol/mol M4). At pH 5 relatively
452 high levels of CMP were still found (0.170 vs. 0.049 mmol/mol M4). In contrast to FP, the
453 accumulation of CMP responded considerably to aging of beer and the impact of oxidative
454 stress. CMP was also confirmed in beer by MS² spectra (supplementary information). The
455 results of incubations of M4 with lysine showed a very similar behavior of CML to CMP
456 (supplementary information). However, CML was not detectable in beer samples reflecting
457 again the low lysine concentrations in beer.³⁰

458 In conclusion, we were able to identify significant changes in the formation of Maillard
459 specific compounds involving oxygen dependent mechanisms. Dextrins were shown to be the
460 major source for α -dicarbonyl formation in bottled beer. As shown by the rapid formation of
461 furfural and HMF during forced beer aging, α -dicarbonyls are still formed at high rates at low
462 pH values. In contrast to HMF, formation of furfural was unequivocally enhanced under
463 oxidative conditions from dextrin degradation. The underlying mechanism of hydrolytic β -
464 dicarbonyl cleavage also entailed the established formation of formic acid and FP. On the
465 other hand, the formation of CMP must be attributed to the oxidative fragmentation of the
466 proline Amadori product. In a first attempt to assess the importance of the novel proline

467 AGEs CMP and FP, solely CMP must be recommended as a marker for oxidative stress in
468 beer. Thus, these results will now allow a better evaluation of the chemical processes during
469 processing and aging of beer.

470

471 **Acknowledgement.** We thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle,
472 Germany, for recording NMR spectra and Dr. J. Schmidt from the Leibniz Institute of Plant
473 Biochemistry, Halle, Germany, for performing accurate mass determination.

474

475 **Supporting Information.** Supporting Information Available: Additional results for model
476 incubations and mass spectrometry. This material is available free of charge via the Internet at
477 <http://pubs.acs.org>.

478 REFERENCES

- 479 (1) De Schutter, D. The Chemistry of Aging Beer. In *Beer in Health and Disease Prevention*,
480 2009, pp. 374–388.
- 481 (2) Baert, J. J.; De Clippeleer, J.; Hughes, P. S.; De Cooman, L.; Aerts, G. On the Origin of
482 Free and Bound Staling Aldehydes in Beer, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, pp. 11449–
483 11472.
- 484 (3) Rakete, S.; Glomb, M. A. A Novel Approach for the Quantitation of Carbohydrates in
485 Mash, Wort, and Beer with RP-HPLC Using 1-Naphthylamine for Precolumn
486 Derivatization, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, pp. 3828–3833.
- 487 (4) Bravo, A.; Herrera, J. C.; Scherer, E.; Ju-Nam, Y.; Rüksam, H.; Madrid, J.; Zufall, C.;
488 Rangel-Aldao, R. Formation of α -Dicarbonyl Compounds in Beer during Storage of Pilsner,
489 *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, pp. 4134–4144.
- 490 (5) Madigan, D.; Perez, A.; Clements, M. Furanic aldehyde analysis by HPLC as a method to
491 determine heat-induced flavor damage to beer., *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1998**, pp. 146–151.
- 492 (6) Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Coghe, S.; Verstrepren, K. J.; Verachtert, H.; Derdelinckx,
493 G. Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer, *J.*
494 *Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, pp. 6782–6790.
- 495 (7) Carneiro, J. R.; Guido, L. F.; Almeida, P. J.; Rodrigues, J. A.; Barros, A. A. The impact of
496 sulphur dioxide and oxygen on the behaviour of 2-furaldehyde in beer: an industrial
497 approach, *Int. J. Food Sci. Technol.* **2006**, *41*, pp. 545–552.
- 498 (8) Varmuza, K.; Steiner, I.; Glinsner, T.; Klein, H. Chemometric evaluation of concentration
499 profiles from compounds relevant in beer ageing, *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*,
500 pp. 235–239.
- 501 (9) Smuda, M.; Glomb, M. A. Novel Insights into the Maillard Catalyzed Degradation of
502 Maltose, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, pp. 13254–13264.
- 503 (10) Glomb, M. A.; Rösch, D.; Nagaraj, R. H. N δ -(5-Hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine-2-yl)-
504 l-ornithine, a Novel Methylglyoxal–Arginine Modification in Beer, *J. Agric. Food Chem.*
505 **2001**, *49*, pp. 366–372.
- 506 (11) Tressl, R.; Helak, B.; Koeppler, H.; Rewicki, D. Formation of 2-(1-pyrrolidinyl)-2-
507 cyclopentenones and cyclopent(b)azepin-8(1H)-ones as proline specific Maillard products,
508 *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, pp. 1132–1137.

- 509 (12) Tressl, R.; Helak, B.; Kersten, E.; Rewicki, D. Formation of proline- and hydroxyproline-
510 specific Maillard products from [1-13C]glucose, *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, pp. 547–
511 553.
- 512 (13) Tressl, R.; Rewicki, D.; Helak, B.; Kamperschroer, H. Formation of pyrrolidines and
513 piperidines on heating L-proline with reducing sugars, *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*,
514 pp. 924–928.
- 515 (14) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and
516 glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction., *J. Biol. Chem.* **1995**,
517 pp. 10017–10026.
- 518 (15) Gobert, J.; Glomb, M. A. Degradation of Glucose: Reinvestigation of Reactive α -
519 Dicarbonyl Compounds, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, pp. 8591–8597.
- 520 (16) Tribet, M.; Covelo, B.; Sicilia-Zafra, A. G.; Navarrete-Casas, R.; Choquesillo-Lazarte,
521 D.; González-Pérez, J. M.; Castiñeiras, A.; Niclós-Gutiérrez, J. Ternary copper(II)
522 complexes with N-carboxymethyl-L-prolinato(2-) ion and imidazole or creatinine: A
523 comparative study of the interligand interactions influencing the molecular recognition and
524 stability, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, pp. 1424–1432.
- 525 (17) Henning, C.; Liehr, K.; Girndt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Extending the Spectrum of
526 α -Dicarbonyl Compounds in Vivo, *J. Biol. Chem.* **2014**.
- 527 (18) Zhang, P.-J.; Zhao, Z.-G.; Yu, S.-J.; He, S.-Z. Degradation of N-(1-Deoxy-d-xylulos-1-
528 yl)glycine and N-(1-Deoxy-d-xylulos-1-yl)proline using thermal treatment, *Int. J. Food Sci.*
529 *Technol.* **2012**, *47*, pp. 475–481.
- 530 (19) Martins, S. I.; Van Boekel, M.A.J.S. Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction
531 pathways: influences of pH and reactant initial concentrations, *Food Chem.* **2005**, *92*,
532 pp. 437–448.
- 533 (20) Hellwig, M.; Degen, J.; Henle, T. 3-Deoxygalactosone, a “New” 1,2-Dicarbonyl
534 Compound in Milk Products, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, pp. 10752–10760.
- 535 (21) Degen, J.; Hellwig, M.; Henle, T. 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed
536 Foods, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, pp. 7071–7079.
- 537 (22) Velisek, J.; Davidek, J.; Pokorny, J.; Grundova, K.; Janicek, G. Reactions of Glyoxal
538 with Glycine. II. Influence of Reaction Conditions on the Course of Reaction., *Z. Lebensm.-*
539 *Unters. Forsch.* **1972**, pp. 323–329.

- 540 (23) Mavric, E.; Henle, T. Isolation and identification of 3,4-dideoxypentosulose as specific
541 degradation product of oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages, *Eur. Food Res.*
542 *Technol.* **2006**, *223*, pp. 803–810.
- 543 (24) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Degradation of Oligosaccharides in Nonenzymatic Browning
544 by Formation of α -Dicarbonyl Compounds via a “Peeling Off” Mechanism, *J. Agric. Food*
545 *Chem.* **2000**, *48*, pp. 6219–6226.
- 546 (25) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-Deoxy- d - erythro -hexo-2,3-
547 diulose in the Presence of Lysine Leads to Formation of Carboxylic Acid Amides, *J. Agric.*
548 *Food Chem.* **2010**, *58*, pp. 6458–6464.
- 549 (26) Antal, M. J.; Leesomboon, T.; Mok, W. S.; Richards, G. N. Mechanism of formation of
550 2-furaldehyde from d-xylose, *Carbohydr. Res.* **1991**, *217*, pp. 71–85.
- 551 (27) Ahmad, T.; Kenne, L.; Olsson, K.; Theander, O. The formation of 2-furaldehyde and
552 formic acid from pentoses in slightly acidic deuterium oxide studied by ¹H NMR
553 spectroscopy, *Carbohydr. Res.* **1995**, *276*, pp. 309–320.
- 554 (28) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. 3-Deoxypentosulose: An α -Dicarbonyl Compound
555 Predominating in Nonenzymatic Browning of Oligosaccharides in Aqueous Solution, *J.*
556 *Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, pp. 1659–1664.
- 557 (29) Li, M.; Yang, Z.; Yang, M.; Shan, L.; Dong, J. Determination of Furfural in Beer by
558 HighPerformance Liquid Chromatography with SolidPhase Extraction, *J. Inst. Brew.* **2009**,
559 pp. 226–231.
- 560 (30) Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verstrepen, K. J.; Delvaux, F. R.; Verachtert, H.;
561 Derdelinckx, G. Influence of the Brewing Process on Furfuryl Ethyl Ether Formation during
562 Beer Aging, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, pp. 6755–6764.
- 563 (31) Hull, G. L.; Woodside, J. V.; Ames, J. M.; Cuskelly, G. J. N ϵ -(carboxymethyl)lysine
564 content of foods commonly consumed in a Western style diet, *Food Chem.* **2012**, *131*,
565 pp. 170–174.
- 566 (32) Dunn, J. A.; Ahmed, M. U.; Murtjahaw, M. H.; Richardson, J. M.; Walla, M. D.; Thorpe,
567 S. R.; Baynes, J. W. Reaction of Ascorbate with Lysine and Protein under Autoxidizing
568 Conditions - Formation of N-epsilon-(Carboxymethyl)lysine by Reaction between Lysine
569 and Products of Autoxidation of Ascorbate, *Biochem.* **1990**, *29*, pp. 10964–10970.
- 570

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Formation of C₂-C₄ α -dicarbonyl compounds in maltotetraose/ proline incubations at pH 7 under aerated (closed symbols) and deaerated (open symbols) conditions: methylglyoxal (\blacktriangledown), glyoxal (\bullet), glyoxylic acid (\blacksquare), diacetyl (\blacklozenge)

Figure 2: Formation of C₄-C₅ α -dicarbonyl compounds in maltotetraose/ proline incubations at pH 7 under aerated (closed symbols) and deaerated (open symbols) conditions: 1-deoxythreosone (\bullet), 3-deoxythreosone (\blacktriangledown), 3-deoxypentosone (\blacksquare), 3,4-dideoxypentosone (\blacklozenge).

Figure 3: Formation of C₆ α -dicarbonyl compounds in maltotetraose/ proline incubations at pH 7 under aerated (closed symbols) and deaerated (open symbols) conditions: 5,6-dihydroxy-2,3-dioxohexanal (\blacksquare), 4-deoxyglucosone (\bullet), 1,4-dideoxyglucosone (\blacktriangledown).

Figure 4: The oxidation of oligosaccharides leads to the formation of formic acid, *N*-formyl proline and 3-deoxypentosone by hydrolytic β -dicarbonyl cleavage of the oxosone. 3-Deoxypentose gives furfural after cyclization and dehydration.

TABLES

Table 1: Mass spectrometric parameters for AGEs, and derivatized furfural (furfural-N) and hydroxymethylfurfural (HMF-N) (MRM-Mode, DP: declustering potential, CE: collision energy, CXP: cell exit potential).

	mass (amu)		retention			
	Q1	Q3	time (min)	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
<i>N</i> -formyl-lysine (FL)	175.1	112.1	11.6	40	20	13
<i>N</i> -carboxymethyl-lysine (CML)	205.1	130.2	8.4	50	17	9
<i>N</i> ^ε -formyl-proline (FP)	144.1	98.1	14.8	45	32	11
<i>N</i> ^ε -carboxymethyl-proline (CMP)	174.2	128.1	4.9	35	41	11
furfural-N	224.2	53.1	13.6	86	55	8
HMF-N	254.3	111.1	8.0	83	35	14

Table 2: Formation of glucose, maltose and maltotriose during degradation of maltotetraose (M4) with proline in mmol/mol M4 after 7 d at aerated (a) and deaerated (d) conditions.

pH	glucose		maltose		maltotriose	
	a	d	a	d	a	d
7	0.19	0.09	0.25	0.08	0.71	0.42
5	0.18	0.09	0.25	0.08	0.68	0.27

Table 3: Changes in the carbohydrate profile of beer during forced aging (mmol/L).

	fresh	deaerated	aerated
maltoheptaose	0.77	0.78	0.78
maltohexaose	1.04	1.01	0.98
maltopentaose	1.67	1.61	1.59
maltotetraose	7.1	7.0	6.9
maltose	0.03	0.33	0.31
glucose	0.07	0.14	0.14

Table 4: Formation of α -dicarbonyls (mmol/mol carbohydrate) during degradation of maltose (Mal), maltotetraose (M4), maltopentaose (M5), maltohexaose (M6) and maltoheptaose (M7) with proline under aeration (a) and deaeration (d) (pH 7, 7 d).

	Mal		M4		M5		M6		M7	
	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d
glyoxal	4.3	0.28	7.3	0.38	8.85	0.48	10.0	0.7	13.59	0.6
methylglyoxal	0.041	0.039	0.041	0.038	0.048	0.047	0.048	0.052	0.057	0.057
glyoxylic acid	<LOQ	<LOQ	0.005	<LOQ	0.011	<LOQ	0.016	<LOQ	0.027	<LOQ
diacetyl	0.013	0.033	0.012	0.027	0.012	0.034	0.014	0.038	0.014	0.038
1-deoxythreosone	0.004	0.003	0.005	0.004	0.005	0.004	0.005	0.005	0.006	0.006
3-deoxythreosone	0.091	0.001	0.070	0.001	0.062	0.001	0.062	0.001	0.072	0.001
3-deoxypentosone	0.107	0.007	0.116	0.007	0.124	0.012	0.139	0.018	0.140	0.015
3,4-dideoxy-pentosone	0.005	0.04	0.009	0.056	0.027	0.098	0.016	0.086	0.006	0.080
5,6-dihydroxy-2,3-dioxohexanal	0.001	0.003	0.001	0.004	0.002	0.006	0.002	0.007	0.002	0.007
4-deoxyglucosone	0.2	0.3	0.4	0.5	0.4	0.6	0.4	0.4	0.3	0.6

LOQ, limit of quantification

Table 5: Comparison of 3-deoxyglucosone and 3-deoxygalactosone (each mmol/mol maltotetraose) formed during incubations of maltotetraose (M4) with proline (pro) or lysine (lys) at pH 5 and 7.

	pH	3-deoxyglucosone		3-deoxygalactosone	
		aerated	deaerated	aerated	deaerated
pro	7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
pro	5	0.025 ^a	0.023 ^a	0.041 ^a	0.039 ^a
lys	7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
lys	5	0.021 ^a	0.028 ^a	0.037 ^b	0.038 ^b

^a at 7 d, ^b at 3 d, LOQ: limit of quantitation

Table 6: Concentrations of α -dicarbonyls, furfural, HMF and AGEs determined in beer.

	range ^a (μM)	forced aging experiment (μM) ^b		
		fresh	deaerated	aerated
glyoxal	5 – 8	5.2 \pm 0.3	4.3 \pm 0.1*	4.98 \pm 0.05*
methylglyoxal	1.7 – 3.5	1.73 \pm 0.09	1.9 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1
glyoxylic acid	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
diacetyl	1 – 8	0.602 \pm 0.005	0.849 \pm 0.004*	1.09 \pm 0.053*
threosone	0.05 – 0.20	0.2 \pm 0.004	0.107 \pm 0.004*	0.175 \pm 0.003*
3-deoxythreosone	0.05 – 0.56	0.049 \pm 0.002	0.081 \pm 0.001*	0.17 \pm 0.02*
1-deoxythreosone	0.10 – 0.37	0.104 \pm 0.004	0.120 \pm 0.003	0.109 \pm 0.004
3,4-dideoxypentosone	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1-deoxypentosone	0.28 – 0.63	0.28 \pm 0.03	< LOQ	< LOQ
3-deoxypentosone	1 – 6	1.38 \pm 0.08	0.84 \pm 0.03*	1.1 \pm 0.04*
glucosone	0.3 – 0.7	0.67 \pm 0.02	0.51 \pm 0.01*	0.80 \pm 0.08*
1-deoxyglucosone	3 – 11	3.4 \pm 0.1 \pm 0.1	0.46 \pm 0.008	0.46 \pm 0.01
3-deoxyglucosone	50 – 100	48.6 \pm 0.7	36.6 \pm 0.6	40 \pm 3
1,4-dideoxyglucosone	0.7 – 0.25	0.066 \pm 0.008	0.049 \pm 0.001	0.052 \pm 0.003
5,6-dihydroxy-2,3-dioxohexanal	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
4-deoxyglucosone	0.3 – 1.5	0.36 \pm 0.07	0.03 \pm 0.01	0.12 \pm 0.05
3-deoxygalactosone	20 – 80	28 \pm 1	18.6 \pm 0.7	21 \pm 1
1-deoxymaltosone	2 – 8	4.4 \pm 0.2	2.47 \pm 0.07	2.7 \pm 0.1
3-deoxymaltosone	3 – 12	3 \pm 0.1	5.2 \pm 0.2	5.3 \pm 0.2
maltosone	0.24 – 0.5	0.321 \pm 0.007	0.227 \pm 0.001*	0.343 \pm 0.005*
1,5-dideoxymaltosone-4-ene	0.4 – 4.2	0.37 \pm 0.01	0.34 \pm 0.04	0.4 \pm 0.02
N-formyl proline (FP)	1.8 – 4.4	2.98 \pm 0.01	3.04 \pm 0.04	3.08 \pm 0.06
N-carboxymethylproline (CMP)	0.21 – 0.59	0.305 \pm 0.001	0.310 \pm 0.002*	0.37 \pm 0.01*
furfural	0.2 – 0.4	0.26 \pm 0.01	4.2 \pm 0.2*	5.5 \pm 0.2*
hydroxymethylfurfural (HMF)	2 – 5	2.2 \pm 0.1	19.3 \pm 0.3	21 \pm 2

^a 11 fresh samples, replicate analyses $n = 2$. ^b 1 sample \pm S.D., replicate analyses $n = 3$. * Values marked showed a significant difference between deaerated and aerated samples with $p < 0.05$. LOQ, limit of quantitation

Table 7: Levels of furfural ($\mu\text{mol/mol}$ maltotetraose), *N*-formyl proline (FP), *N*-carboxymethylproline (CMP) and formic acid concentrations (each mmol/mol maltotetraose) in incubation mixtures of maltotetraose (M4) with proline at pH 7 and pH 5 (7 d).

	pH 7		pH 5	
	aerated	deaerated	aerated	deaerated
furfural	1.04	0.25	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
FP	0.089	0.064	0.004	0.003
formic acid	4.1	3.0	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
CMP	0.560	0.059	0.170	0.049

n.a., not analyzed

FIGURE GRAPHICS

Figure 1

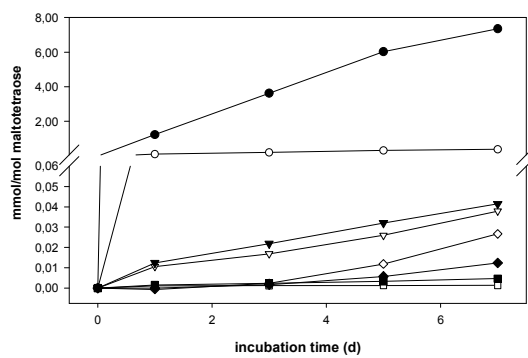


Figure 2

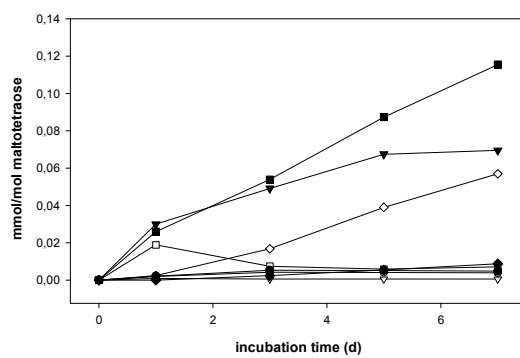


Figure 3

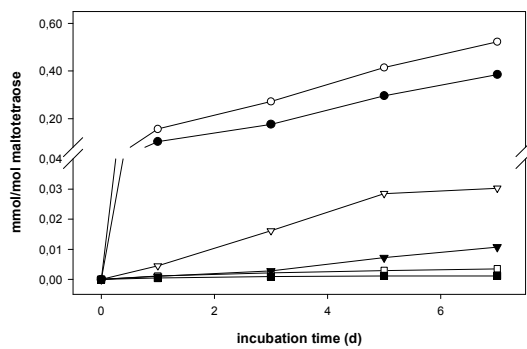
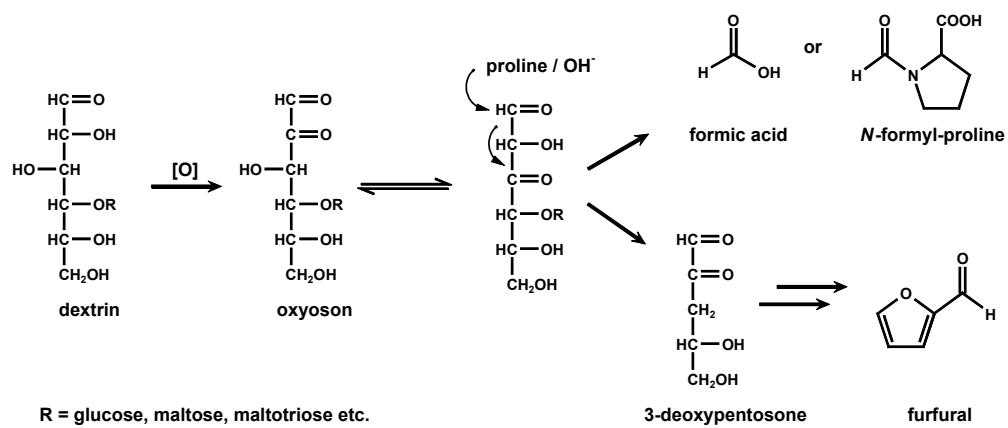
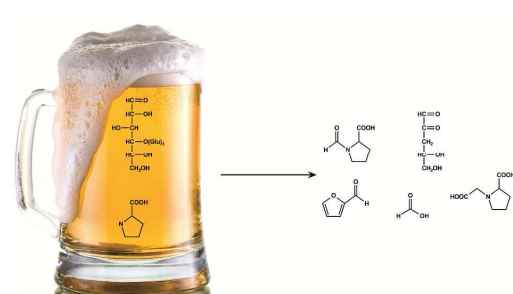


Figure 4



TOC graphic



Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 05. April 1985 in Schkeuditz / Sachsen

Familienstand: ledig, keine Kinder

Berufstätigkeit:

07/2010 bis 06/2014 Institut für Chemie – Lebensmittelchemie, Martin-Luther-Univ.
Halle, wiss. Mitarbeiter im Arbeitskreis von Prof. Dr. Glomb

05/2010 Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ, Leipzig
wiss. Hilfskraft im Arbeitskreis Prof. Dr. Goss

Studium

10/2005 bis 04/2010 Diplomstudium Lebensmittelchemie, Martin-Luther-Universität
Halle

Schulische Ausbildung

09/1995 bis 06/2004 Georg-Cantor-Gymnasium, Halle (Allgemeine Hochschulreife)

09/1991 bis 08/1995 Grundschule „Am Ludwigsfeld“, Halle

Publikationsliste

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Rakete, S., Glomb, M. A. A Novel Approach for the Quantitation of Carbohydrates in Mash, Wort, and Beer with RP-HPLC Using 1-Naphthylamine for Precolumn Derivatization *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61, 3828-3833

Rakete, S., Berger, R., Boehme, S., Glomb, M. A. Oxidation of Isohumulones Induces the Formation of Carboxylic Acids by Hydrolytic Cleavage *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62, 7541-7549

Rakete, S., Klaus, A., Glomb, M. A. Investigations on the Maillard Reaction of Dextrins during Aging of Pilsner Type Beer *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**

Tagungsvorträge

Rakete, S., Glomb, M. A. Bestimmung von Kohlenhydraten in Maische, Würze und Bier
21. Arbeitstagung des Regionalverbands Südost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh, 25.-26.03.2011, Halle

Rakete, S., Berger., R., Glomb, M. A. Bildung flüchtiger Carbonsäuren aus Isohumulonen
23. Arbeitstagung des Regionalverbands Südost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh, 14.-15.03.2013, Dresden

Rakete, S., Klaus, A., Glomb, M. A. Bestimmung alterungsrelevanter Dextrinbauprodukte in Bier
24. Arbeitstagung des Regionalverbands Südost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh, 25.-26.03.2014, Halle

Posterbeiträge

Rakete, S., Glomb, M. A. Dextrine in Maische, Würze und Bier
40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12.-14.09.2011, Halle

Rakete, S., Berger., R., Glomb, M. A. Amininduzierter Abbau von Isohumulonen
42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16.-18.09.2013, Braunschweig

Klaus, A., **Rakete, S.**, Glomb, M. A. Bestimmung alterungsrelevanter Dextrinabbau-
produkte in Bier
43. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 22.-24.09.2014, Gießen

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation „Aufklärung molekularer Mechanismen beim Abbau von Dextrinen und Hopfenbittersäuren im Zuge der Bieralterung“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

.....

Datum, Unterschrift