

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik

Molekulare Charakterisierung von Schlüsselgeschmacksstoffen in
Whisky

Andrea Froschmeier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Thomas Hofmann

2. Prof. Dr. Peter Schieberle

Die Dissertation wurde am 29.05.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.11.2018 angenommen.

Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Hofmann bedanke ich mich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und für die jederzeit freundliche und konstruktive Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für molekulare Sensorik und Lebensmittelchemie für das gute Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung in vielen Bereichen des täglichen Arbeitens und die schöne Zeit in Freising.

Besonderer Dank gilt Dr. Timo Stark und Frau Sofie Lösch für die hervorragende Einarbeitung in die Eichenholzchemie. Andreas Dunkel gebührt mein Dank für die Erstellung zahlreicher Heat Maps und bei Stefan Klade möchte ich mich für die Unterstützung bei der Auswertung der sensorischen Daten bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Juliane Bojahr und Dr. Anne Brockhoff für die Unterstützung bei den Rezeptorstudien am DIfE in Potsdam.

Bei Dr. Veronika Mall möchte ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit im Whisky-Projekt und für Ihre Hilfe bei den GC-Messungen bedanken.

Für die Teilnahme an unzähligen sensorischen Untersuchungen möchte ich mich bei meinem ganzen Panel bedanken. Petra Schmid danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz während ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit bei der Isolierung der Markerverbindungen aus Eichenholz. Tina Schmittnägel danke ich ebenfalls für ihren Beitrag im Rahmen ihrer Forschungsarbeit.

Den NMR- und MS-Teams danke ich für ihre Zeit und ihrer Bereitschaft Messungen für andere durchzuführen und zu begleiten.

Dr. Timo Stark, Richard Hammerl und Maximilian Dietz gebührt Dank für die sorgfältige und gewissenhafte Durchsicht des Manuskriptes.

Ich möchte mich bei meiner besten Freundin Anastasia Farrenkopf bedanken, mit der ich schon so viele wichtige Lebensabschnitte von der Grundschule bis zur Promotion gemeinsam meistern durfte. Auch ein herzliches Dankeschön an meine langjährigen Freunde aus Ingolstadt und an die Münchener Lebensmittelchemiker für ihre Motivation und Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Mann und Wegbegleiter Manuel, der mich immer liebevoll unterstützt und mein privates Leben wahnsinnig bereichert.

Der größte Dank jedoch geht an meine Familie. Meine Eltern haben mich bei vielen Entscheidungen unterstützt, mir alles ermöglicht und waren immer für mich da.

Vorbemerkungen

Der praktische Teil meiner Arbeit wurde von Januar 2011 bis Oktober 2014 am Institut für molekulare Sensorik und Lebensmittelchemie der Technischen Universität München am Standort Freising unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Hofmann durchgeführt.

Ein Teil der Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Institut für Ernährung in Potsdam unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof.

Für
meine Familie
und
Manuel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Symbole.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Whisky.....	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Herstellungsprozess von Whisky.....	2
1.1.3 Sensorisch aktive Substanzen in Whisky.....	6
1.2 Ausbau von Spirituosen in Eichenholzfässern	11
1.3 Geschmackswahrnehmung.....	17
1.4 Analytik von Geschmacksstoffen.....	25
1.5 Ziel der Untersuchungen	29
2 Ergebnisse und Diskussion	30
2.1 Geschmacksprofilanalyse von Whiskyproben.....	30
2.2 Metabolomanalysen verschiedener Whiskys	31
2.2.1 UPLC-ESI-TOF-MS Analyse	31
2.2.2 Identifizierung von Whisky-Markerverbindungen	36
2.2.2.1 Markerverbindungen für den Schottischen Single Malt „SSM1“	36
2.2.2.2 Markerverbindungen für den Bourbon „AB2“	37
2.2.3 Isolierung von Referenzsubstanzen aus amerikanischem Eichenholz und Verifizierung von Bourbon-Markerverbindungen	37
2.2.3.1 Extraktion und Fraktionierung von amerikanischem Eichenholz.....	37
2.2.4 Diskussion	58
2.3 Aktivitätsorientierte Fraktionierung und Identifizierung geschmacksaktiver und geschmacksmodulierender Verbindungen in Whisky	61
2.3.1 Iterative Lösungsmittelfraktionierung.....	61
2.3.2 Lokalisierung und Identifizierung geschmacksaktiver Substanzen in der Diethylether Fraktion II.....	62
2.3.3 Screening nach süßmodulierenden Substanzen der Diethylether Fraktion II.....	65
2.3.4 Diskussion	72
2.4 Humansensorische und rezeptorbasierte Studien zu süßmodulierender Verbindungen.....	74

2.4.1	Humansensorische Untersuchungen von Whisky Komponenten bezüglich ihrer süßmodulierenden Eigenschaften	74
2.4.2	Studien zur Aktivierung des hTAS1R2/hTAS1R3-Süßrezeptors	78
2.4.3	Diskussion	90
2.5	Quantifizierung von Geschmacksstoffen in Whisky	92
2.5.1.1	Quantifizierung der Mineralstoffe.....	93
2.5.1.2	Quantifizierung der Säuren.....	94
2.5.1.3	Quantifizierung der Kohlenhydrate und Polyole	95
2.5.1.4	Quantifizierung der niedermolekularen Phenole	95
2.5.1.5	Quantifizierung der Fettsäuren und Fettsäureethylester	97
2.5.1.6	Quantifizierung der Bourbon-spezifischen Geschmacksstoffe.....	99
2.5.1.7	Quantifizierung der süßmodulierenden HMF-Derivate.....	100
2.5.2	Diskussion	101
2.6	Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge, Rekombinations- und Omissionsexperimente	105
2.6.1	Geschmacksschwellenwerte whiskyrelevanter Verbindungen aus der Literatur	105
2.6.2	Sensorische Charakterisierung weiterer whiskyrelevanter Verbindungen	107
2.6.3	Berechnung der „Dose-over-Threshold“-Faktoren	108
2.6.4	Rekombination- und Omissionsexperimente verschiedener Whiskys	111
2.6.5	Diskussion	114
2.7	Modellstudien zur Bildung von Ethoxymethylfurfural.....	116
2.8	Quantitative Studien von Holzextrakten mit unterschiedlichem Toastungsgrad	119
3	Experimenteller Teil.....	124
3.1	Untersuchungsmaterialien, Reagenzien und Materialien.....	124
3.1.1	Untersuchungsmaterialien.....	124
3.1.2	Reagenzien.....	125
3.1.3	Materialien	127
3.2	Isolierung der Bourbon-Markerverbindungen aus Eichenholzfraktionen	128
3.2.1	Herstellung und Fraktionierung von Eichenholzextrakten	128
3.2.2	Isolierung der Bourbon-Markerverbindungen aus HPLC Fraktionen	129
3.3	Saure Hydrolyse von Oaklacton Vorstufen	130
3.3.1	Saure Hydrolyse von Oaklacton-Galloylglucosid (1)	130
3.3.2	Saure Hydrolyse von Oaklacton-Glucosid (2)	130

3.3.3	Saure Hydrolyse von Oaklacton-Rutinosid (3)	131
3.4	Fraktionierung von Whisky	131
3.4.1	Iterative Lösungsmittelfraktionierung von Whisky	131
3.4.2	Chromatographische Trennung der Fraktion II mittels präparativer HPLC	132
3.5	Synthese von Referenzsubstanzen der HMF-Derivate	133
3.5.1	Umsetzung von HMF mit Alkoholen: Bildung von Ethern	133
3.5.2	Umsetzung von HMF mit Vanillinsäure: Bildung eines Phenolsäureesters	134
3.6	Quantitative Bestimmung von Whiskyinhaltsstoffen	134
3.6.1	Probenaufarbeitung für die Quantitativen Untersuchungen	134
3.6.2	Quantifizierung von Mineralstoffen in Whisky mittels HPIC	135
3.6.3	Quantifizierung von Kohlenhydraten und Polyolen in Whisky mittels HPIC	135
3.6.4	Quantifizierung von organischen Säuren in Whisky	136
3.6.5	Quantifizierung der niedermolekularen Phenole mittels LC-MS/MS	138
3.6.6	Quantifizierung von Fettsäuren in Whisky mittels LC-MS/MS	141
3.6.7	Quantifizierung von Fettsäureethylester in Whisky mittels LC-MS/MS	142
3.6.8	Quantifizierung von HMF-Derivaten in Whisky mittels LC-MS/MS	142
3.7	Modelstudien zur Bildung von EMF	145
3.7.1	Lagerungsstudien von HMF in Ethanol/Wasser-Gemischen	145
3.7.2	„Forced Aging“-Experimente mit Whisky	145
3.8	Sensorische Analysen	146
3.8.1	Schulung des Sensorikpanels	146
3.8.2	Durchführung von Profilsensoriken	148
3.8.3	Schwellenwertbestimmung	148
3.8.4	Dosis-Wirkungs-Beziehungen	149
3.8.5	Bestimmung der süßmodulierenden Eigenschaften	149
3.8.6	Time-Intensity-Tests	150
3.8.7	Rekombinationsexperimente	151
3.9	Zellexperimente mit hTAS1R-Süßrezeptoren	153
3.9.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	153
3.9.2	FLIPR-Calcium Imaging	154
3.10	Chromatographische Methoden	156
3.10.1	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie	156

3.10.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	157
3.10.3	Gaschromatographie	164
3.10.4	Hochleistungsionenchromatographie	164
3.11	Spektroskopische Methoden	167
3.11.1	HPLC-Massenspektrometrie	167
3.11.2	Hochauflösende Massenspektrometrie (TOF-MS).....	170
3.11.3	Kernresonanzspektroskopie	171
3.11.4	Circulardichroismus	172
3.12	Heatmapping, Datenanalyse und Visualisierung.....	172
4	Zusammenfassung	174
5	Literatur.....	176
6	Spekroskopische Daten.....	183

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AcMF	5-Acetoxymethylfurfural
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck)
BPI	Base Peak Intensity
BMF	5-n-Butoxymethylfurfural
CD	Circulardichroismus
CE	Collision Energy
COSY	Correlated Spectroscopy
CXP	Cell Exit Potential
d	Dublett
DAD	Diodenarraydetektor
dd	Dublett vom Dublett
DMSO	Dimethylsulfoxid
DoT	Dose over Threshold
DP	Declustering Potential
EMF	5-Ethoxymethylfurfural
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Verdampfungslichtstredetektor)
ESI	Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälber Serum)
FLIPR	Fluoreszenz Imaging Plate Reader
FSEE	Fettsäureethylester
GC	Gaschromatographie
GVA	Geschmacksverdünnungsanalyse
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPIC	High Performance Ion Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
iPMF	5-i-Propoxymethylfurfural
IS	Interner Standard
LC	Liquid Chromatography
2MBMF	5-(2-Methylbutoxy)methylfurfural
3MBMF	5-(3-Methylbutoxy)methylfurfural
MeOH	Methanol
MMF	5-Methoxymethylfurfural

MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie/ Massenspektrometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
nPMF	5-n-Propoxymethylfurfural
PhEMF	5-(2-Phenylethoxy)methylfurfural
qNMR	Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
RP	Reversed Phase
RSD	Relative Standard Deviation (relative Standardabweichung)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
t	Triplett
TIC	Total Ion Current (Totalionenstrom)
TOF	Time of Flight
TMS	Tetramethylsilan
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
Van	Vanillin
VanMF	Vanillinsäure-HMF-ester
VanVan	Vanillinsäurevanillat

Symbole

δ	Chemische Verschiebung [ppm]
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
J	Kopplungskonstante [Hz]
λ	Wellenlänge [nm]

1 Einleitung

1.1 Whisky

1.1.1 Allgemeines

Die US-Fachzeitschrift „Wine Spectator“ veröffentlichte im Jahr 2013 ein Ranking der Premium-Spirituosenmarken in der *Impact Databank*. Bereits unter den Top 25 befinden sich neun Whiskymarken, darunter fünf Schottische, zwei Amerikanische, ein Kanadischer sowie ein Irischer. Bedenkt man, dass im Anhang II der Spirituosenverordnung, VO (EG) Nr. 110/2008, 46 Kategorien verschiedener Spirituosen aufgelistet sind, so stellt sich die Frage, warum gerade Whisky solch eine große Beliebtheit erfährt. Dabei ist Whisky kein aktuelles Modegetränk, denn seine Herkunft geht zurück bis ins fünfte Jahrhundert nach Christus. Irische Mönche sollen die Kunst des Destillierens über Irland nach Schottland gebracht haben. Zu dieser Zeit entwickelte sich bereits die Bezeichnung des alkoholischen Getränks. Aus dem gälischen Wort „*uisge beatha*“, dies bedeutet „Wasser des Lebens“, leitete sich der heutige Name der Spirituose ab. Die Schreibweise „Whisky“ hat sich in Schottland und Kanada durchgesetzt. In Amerika und Irland wird „Whiskey“ verwendet (*Buglass, 2011*). 1494 wurde Whisky erstmals urkundlich in Steuerunterlagen zum Erwerb von Malz durch einen Mönch erwähnt (*Schneider, 2008*). Die irische Brennerei „Bushmills“ erhielt 1608 die erste offizielle Lizenz Whisky zu brennen. Die Zahl privater Brennereien in Irland und Schottland stieg seitdem fortlaufend an und durch das Wissen schottischer und irischer Auswanderer entwickelte sich auch in Nordamerika die Kunst der Whiskyherstellung, welche aber erst im Laufe des 19. Jahrhunderts industrielle Bedeutung erlangte.

Whisky ist eine Spirituose, die als Destillat aus einer Getreidemaische gewonnen und in Eichenholzfässern gelagert wird (*Pigott und Conner, 1997*). Die Produkthanforderungen sind rechtlich festgelegt und variieren in Abhängigkeit vom jeweiligen Herkunftsland. Es gibt viele Faktoren bei der Herstellung des Genussmittels, welche die unterschiedlichen Eigenschaften des Endproduktes beeinflussen. Die benötigten Rohstoffe sind Getreide, Hefe und Wasser. Durch Variation des verwendeten Getreides, der unterschiedlichen Behandlung des Malzes, der Anwendung traditioneller oder moderner Technologien und natürlich der unterschiedlichen Auswahl an Holzfässern kommt es bei Whisky zu einer sehr umfangreichen Sortenvielfalt. Die bedeutendsten Marktanteile besitzen Schottland und die USA, aber auch Irland, Kanada, Japan und Indien spielen eine große Rolle in der Produktion von Whisky. Eine Unterteilung der Whiskys erfolgt neben deren Herkunft auch nach der verwendeten Getreidesorte. Während die traditionellen Single Malts ausschließlich aus

Gerstenmalz gebraut werden, finden bei Grain Whisky Mischungen aus Gerstenmalz, Mais, Roggen oder Weizen Anwendung. Die Verwendung von ungemälztem Getreide war erst seit Erfindung eines kontinuierlichen Brennverfahrens ab 1827 möglich (Nicol, 1989). Im Folgenden wird genauer auf den Herstellungsprozess und die daraus resultierenden wertgebenden Inhaltsstoffe eingegangen.

1.1.2 Herstellungsprozess von Whisky

Grundsätzliche Prozessschritte in der Whiskyherstellung sind das Mälzen, Maischen, Vergären, Destillieren, Reifen und gegebenenfalls Verschneiden. Dabei bietet jeder Schritt die Möglichkeit von technischen Variationen.

Getreide ist die Grundzutat für die Whiskyproduktion. In der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe unterscheiden sich die verwendeten Getreidesorten (vgl. Tabelle 1) teilweise stark. In den USA wird Mais (*Zea mays*) bevorzugt in der Produktion alkoholischer Getränke verwendet. Er ist zu günstigen Preisen in großen Mengen verfügbar und besitzt zudem einen hohen Stärkegehalt.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Mais, Roggen, Gerste und Weizen; Daten aus Bronsky und Schumann 1989

Zusammensetzung in % bezogen auf die Trockenmasse	Mais	Roggen	Gerste	Weizen
Stärke	72	68	63 - 65	69
Zucker	2,6	0	2 - 3	0
Proteine	8	12,6	12	13,2
Rohfaser	2	2,4	5,4	2,6
Fett	3,9	1,7	1,9	1,9
Asche	1,2	1,1	2	1,9

Gesetzlichen Richtlinien des American Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms schreiben die Verwendung eines Maisanteils von mindestens 51 % für die Herstellung eines Bourbon Whiskeys vor (The Federal Standards of Identity for Distilled Spirits). Gerste (*Hordeum vulgare*) wurde bereits in der Steinzeit kultiviert. Sie enthält weniger Stärke als Mais, aber der hohe Enzymgehalt gemälzter Gerste bietet entscheidende Vorteile bei der Herstellung von Whisky (Bronsky und Schumann, 1989).

Das zur Whiskyherstellung benötigte Malz beziehen die Brennereien heute häufig von spezialisierten Mälzereien. Beim Mälzen wird das Getreidekorn durch Wasserzugabe zur Keimung angeregt, welche heute überwiegend in pneumatischen Mälzereien stattfindet (Bathgate und Cook, 1989). Die bei der Keimung aktivierten Enzyme, Hydrolasen wie zum Beispiel α -Amylase und Endopeptidasen, bauen Stärke und Proteine ab. Diese unlöslichen Reservestoffe im Mehlkörper werden in lösliche Stoffe abgebaut, welche der Keimling zum Wachsen benötigt. Die Enzymaktivität ist dabei entscheidend für die Qualität des Malzes. Eine weitere wichtige Aufgabe des Malzes ist die Bereitstellung einer ausreichenden Menge

an Stickstoffquellen, welche die zugesetzte Hefe beim späteren Fermentationsprozess benötigt. Wichtige Parameter während der Keimung müssen durchgehend kontrolliert werden, insbesondere eine optimale Feuchtigkeit, ausreichend Luftzufuhr und die Abführung von Kohlenstoffdioxid sowie von überschüssiger Atmungswärme sind von entscheidender Bedeutung (*Bathgate und Cook, 1989*). Durch das Darren wird der Keimungsvorgang nach etwa 5 Tagen gestoppt. Die Enzyminaktivierung erfolgt beispielsweise mittels Heißluftbehandlung. In Hinblick auf erhöhte Konzentrationen an Nitrosaminen bei direktem Kontakt und der Verwendung von Erdgas als Brennstoff, finden heute meist indirekte Verfahren Anwendung. Wichtig ist hierbei besonders die Temperatur so gering wie möglich zu halten und einen ausreichend hohen Luftstrom zu gewährleisten. Fügt man dem Trocknungsfeuer Torf hinzu, so erhält das Malz eine torfige, rauchige Geruchsnote. Bei der traditionellen Herstellung schottischer Whiskys in früherer Zeit war Torf ein lokal vorhandener Brennstoff, der aufgrund seiner Restfeuchte von 25 bis zu 60 % unter starker Rauchentwicklung verbrennt.

Nach dem Mahlen des Getreides erfolgt der Maischeprozess. Bei Single Malts wird die verwendete Gerste komplett gemälzt. Bei Grain Whisky wird nur ein Teil Gerstenmalz verwendet und daneben weiteres Getreide, das zuvor gekocht wurde, zugegeben. Das Kochen des nicht gemälzten Getreides bewirkt die Zerstörung der Zellwände und das Aufquellen der Stärke. Bei Zugabe des Malzmehls können die Enzyme α -, β -Amylase und Grendextrinase durch ihre hydrolytische Aktivität die Stärke in kleinere, fermentierbare Oligo- und Monosaccharide abbauen. Damit ein maximaler Grad der Stärkeverzuckerung erreicht werden kann, wird die Maische, anders als bei der Bierherstellung, nicht gekocht (*Palmer, 1989*). Bei der Verwendung von *mash tuns* im Batch-Verfahren werden beim Maischeprozess beispielsweise auf 5 Tonnen gemahlene Malz etwa 20 – 23 Tonnen Wasser gegeben. Die Temperatur der Maische soll zunächst bei 64 – 65°C liegen. Die Würze wird abgelassen und die zweite Wasserzugabe erfolgt bei 72 – 74°C. Die Temperatur der dritten Wasserzugabe beträgt 80 – 90°C. Das Maischen dauert zwischen 8 und 11 Stunden. Da das Wasser nach der letzten Zugabe weniger vergärbaren Zucker enthält als die zuvor abgelassene Würze, wird es nach dem Ablassen und Abkühlen auf 64 – 65°C meist nicht für die Fermentation, sondern wieder für die erste Wasserzugabe beim Maischeprozess eines neuen Batches verwendet (*Wilkin, 1989*).

Beim Vergären wird die verzuckerte Stärke mit Hilfe von Hefe in Ethanol und Kohlenstoffdioxid umgewandelt. Dies erfolgt bei amerikanischen Whiskys mit der gesamten Maische. Dagegen wird bei schottischen und irischen Whiskys, insbesondere bei Single Malts, die gefilterte Würze fermentiert. Die speziell für die Destillation gezüchteten Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae* sind enorm leistungsfähig und sehr tolerant bezüglich Temperatur, pH-Wert, Alkohol- und Zuckergehalt. Dieser Produktionsschritt dauert

zwischen zwei und vier Tagen. Das daraus resultierende *Whisky beer*, oder auch *wash* genannt, weist einen Alkoholgehalt von 8 – 10 % Vol. auf (Korhola et al., 1989).

Als nächster Schritt erfolgt nach der Fermentation die Destillation. Hierbei werden flüchtige von nichtflüchtigen Verbindungen unter Verwendung verschiedener Brennapparaturen getrennt. Bei der Herstellung traditioneller Single Malts kommen noch des Öfteren diskontinuierliche Pot-Still-Verfahren zum Einsatz. Grain Whiskys werden dagegen ausschließlich in kontinuierlichen Verfahren destilliert. Das so gewonnene, farblose und stechend riechende Destillat, auch *spirit* oder „Roh-Whisky“ genannt, wird meist auf einen Alkoholgehalt zwischen 60 und 70 % Vol. eingestellt, bevor es in Eichenholzfässer abgefüllt wird (Nicol, 1989; Panek und Boucher, 1989). Das frische Destillat ist sensorisch noch wenig ansprechend. Erst nach mehrjähriger Lagerung erhält das Produkt gelbe bis rotbraune Farbnuancen und das typische Aroma und Geschmacksprofil von Whisky.

Die Lagerung der gefüllten Fässer findet in mehrgeschossigen Lagerhäusern, sogenannten *warehouses*, statt. Während der Fassreifung lösen sich Holzbestandteile im Destillat, die folglich einen Einfluss auf dessen Aussehen, Geruch und Geschmack haben (Tanaka et al., 2010). Bei der Fassherstellung findet fast ausschließlich Eichenholz Verwendung. Dessen Porosität ermöglicht einen Gasaustausch während der Lagerung des Destillates. So kommt es jährlich zum Verlust von etwa 2 % des flüssigen Inhalts. Dies wird als *angels share* bezeichnet. Vergleicht man die Lagerung der verschiedenen Sorten, so gibt es wichtige Unterschiede in den verwendeten Fässern. Während Bourbon Whiskys gesetzlich in neuen amerikanischen Eichenfässern für mindestens zwei Jahre gelagert werden müssen, finden bei Scotch oft gebrauchte Fässer Anwendung. Aufgrund ihres sensorischen Einflusses auf das Destillat erfreuen sich vormals benutzte Bourbon- oder Sherryfässer großer Beliebtheit (Piggott et al., 2000). Manche Whiskys erhalten nach der eigentlichen Hauptlagerung eine weitere Lagerung in einem anderen Fass. Man spricht hier von einem *finish*. Verwendung finden dabei Fässer, die dem Whisky besondere Top-Noten verleihen, wie zum Beispiel gebrauchte Sherry-, Portwein-, Rum- oder Rotweinfässer.

Nach der Reifung des Whiskys wird dieser von Fassstärke oft auf Trinkstärke (40 - 46 % Vol.) rückverdünnt. Die Auswahl des hierzu verwendeten Wassers spielt eine wichtige Rolle, da es einen sensorischen Einfluss auf das finale Produkt haben kann. Zudem erfolgt bei vielen Herstellern das Verschneiden von mehreren Whiskys zu *Blends*, um so ein ausgewogenes und reproduzierbares Genussmittel zu generieren. Die Altersangabe auf dem Etikett bezieht sich dabei immer auf den jüngsten verwendeten Whisky. Vor der Abfüllung in Glasflaschen wird der Whisky meist nochmals filtriert, damit das Endprodukt weder Schwebstoffe noch Trübungen aufweist.

Zu den wichtigsten Whiskysorten auf dem Markt zählen schottische Single Malts und amerikanische Bourbons. Diese beiden Gattungen weisen in einigen Herstellungsschritten

deutliche Unterschiede auf. Schottischer Single Malt (Herstellungsübersicht vgl. Abbildung 1) wird aus reinem Gerstenmalz gewonnen und nur in einer Destillerie hergestellt. Die Bezeichnung Scotch Whisky darf nur vergeben werden, wenn die Spirituose in einer schottischen Brennerei aus Wasser und gemälzter Gerste zu einer Maische verarbeitet wurde. Das verwendete Malz wird oft über Torfrauch gedarrt und verleiht so dem Endprodukt ein rauchiges Aroma. Die Maische wird vor der Gärung filtriert und man erhält die Würze, die nach der Zugabe von Hefe als *wort* bezeichnet und in großen Holzbottichen gelagert wird. Nach Abschluss der Gärung spricht man von der sogenannten *wash*. Beim Brennen werden meist zwei hintereinander geschaltete kupferne Brennblasen, sogenannte *pot stills*, verwendet. Aufgrund der Verwendung dieser Destillationsapparaturen wird die Maische auch vor der Fermentation filtriert, denn übermäßig viele Feststoffe würden sonst an der Innenwand der *pot still* anbrennen. Das Zwischenprodukt nach der ersten Destillation, die sogenannten *low wines*, weist einen Alkoholgehalt von 20 - 25 % Vol. auf. Nach der zweiten Destillation erhöht sich der Alkoholgehalt auf 65 – 70 % Vol.

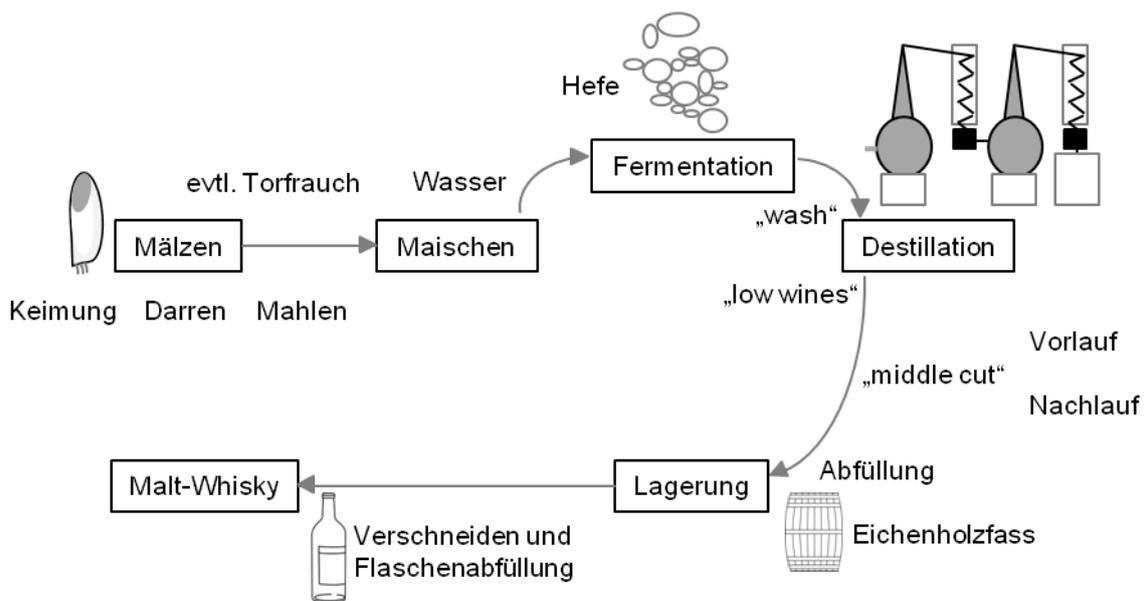


Abbildung 1: Übersichtsdiagramm der Herstellungsschritte von Whisky am Beispiel eines Single Malts

Das Destillat wird zeitlich in drei Abschnitten gesammelt. Zu Beginn destilliert der sogenannte Vorlauf über. Ab ca. 30 Minuten wird für etwa drei Stunden der *middle cut* gesammelt, gefolgt vom Nachlauf. Während der Vorlauf leichtflüchtige Verbindungen, wie Acetaldehyd, Ethylacetat und Methanol enthält, befinden sich im Nachlauf höhere Konzentrationen an Propanol, Isopropanol und weiteren Fuselalkoholen. Der *middle cut* wird für die Abfüllung in Fässern verwendet. Die Lagerung im Holzfass muss nach europäischem Gesetz mindestens drei Jahre erfolgen, beträgt in der Regel aber häufig mehr als acht Jahre, da sich eine längere Lagerzeit sensorisch positiv auf das Endprodukt auswirkt.

Amerikanischer Bourbon Whiskey wird aus einer vergorenen Maische mit mindestens 51 % Maisanteil gewonnen. Meist werden 73 % Mais, 15 % Roggen und 12 % Gerstenmalz verwendet. Bei der Fermentation wird die ganze Maische ohne Filtration zur Vergärung eingesetzt. Neben frischer Hefe wird dabei im *Sour-mash*-Verfahren auch ein hefehaltiger Rückstand aus der vorhergehenden Destillation zugesetzt. Nach der Gärung wird die Maische kontinuierlich über Kolonnenapparate destilliert. Die Alkoholstärke des Destillates darf 95 % Vol. nicht überschreiten. Die Lagerung erfolgt für mindestens zwei Jahre in neuen, ausgekohnten Eichenholzfässern. Als Holz findet ausschließlich das der amerikanischen Weißeiche (*Quercus alba*) Anwendung. Der Alkoholgehalt bei der Abfüllung darf maximal 62,5 % Vol. betragen (*The Federal Standards of Identity for Distilled Spirits*).

Die Betrachtung der unterschiedlichen Arten der Herstellung und Rohstoffe verdeutlicht die Diversität von Whiskys und verschafft eine erste Vorstellung über die Faktoren, die zu den Unterschieden in Geruch, Geschmack sowie ihrer chemischen Zusammensetzung beitragen.

1.1.3 Sensorisch aktive Substanzen in Whisky

Es gibt viele Untersuchungen zu den flüchtigen Verbindungen in Whisky. Unter Anwendung gaschromatographischer Methoden wurden so mehr als 300 flüchtige Substanzen in den verschiedenen Whiskysorten identifiziert. Betrachtet man die identifizierten Substanzklassen, so dominieren deutlich die Ester, gefolgt von Carbonylen, Alkoholen und Säuren (*Poisson und Schieberle, 2008 a*). Weiterhin wurde ausführlich untersucht, welche dieser flüchtigen Verbindungen einen Beitrag zum Aroma eines Whiskys leisten. *Poisson und Schieberle (2008 a+b)* gelang es mittels der Aromaextraktverdünnungsanalyse 45 geruchsaktive Verbindungen in Bourbon Whiskey zu identifizieren. Sein Geruch wurde gesamtheitlich als vanilleartig, malzig und fruchtig beschrieben. Rekombinationsexperimente zeigten, dass der Geruch eines Bourbon Whiskys bereits durch die in Tabelle 2 aufgeführten 26 Aromastoffe in ihren natürlichen Konzentrationsverhältnissen nachgestellt werden konnte. Die Strukturen wichtiger geruchsaktiver Verbindungen mit hohen Aromawerten sind in Abbildung 2 aufgeführt. Einen großen Einfluss auf die Fruchtigkeit von Bourbon Whiskey haben die Ethylester von 2-Methylbuttersäure, Buttersäure, Capronsäure und Caprylsäure. Die malzige Note wird zum Beispiel durch die Streckeraldehyde 3-Methylbutanal und 2-Methylpropanal hervorgerufen. Weitere wichtige Aromastoffe sind das vanilleartige 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Vanillin), das nach gekochtem Apfel riechende β -Damascenon und das kokosartige (3S,4S)-*cis*-Whiskylacton.

Tabelle 2: 26 Schlüsselaromastoffe des Bourbon Whiskey nach *Poisson und Schieberle* (2008 a+b)

Verbindung	Geruchsqualität	Aromawert*
Ethanol	alkoholisch	12690
Ethyl-(S)-2-methylbutanoat	fruchtig	138
3-Methylbutanal	malzig	122
4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd	vanilleartig	97
β -Damascenon	nach gekochten Äpfeln	79
Ethylhexanoat	fruchtig	67
Ethylbutanoat	fruchtig	58
Ethyl-octanoat	fruchtig	57
2-Methylpropanal	malzig	39
(3S,4S)-cis-Whiskylacton	kokosartig	37
(E,E)-2,4-decadienal	fettig	35
4-Allyl-2-methoxyphenol	nelkenartig	34
Ethyl-3-methylbutanoat	fruchtig	33
Ethyl-2-methylpropanoat	fruchtig	30
1,1-Diethoxyethan	fruchtig	21
3-Methylbutanol	malzig	19
2-Phenylethylacetat	blumig	18
(E)-2-Nonenal	grün	16
2,3-Butandion	buttrig	12
3-Methylbutylacetat	fruchtig	11
4-Ethyl-2-methoxyphenol	phenolisch	9
γ -Nonalacton	kokosartig	6
2-Methoxyphenol	phenolisch	6
2-Phenylethanol	blumig	5
(E,Z)-2,6-Nonadienal	grün	3
trans-Ethylcinnamat	fruchtig	2

* Aromawert: berechnet aus der Konzentration dividiert durch die Geruchsschwellen in Wasser/Ethanol (6/4; v/v)

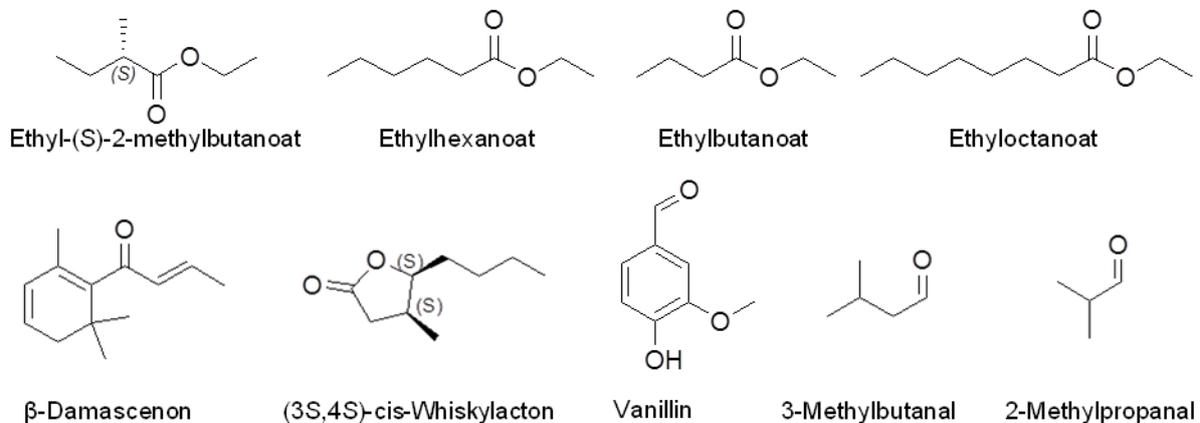


Abbildung 2: Strukturen einiger Schlüsselaromastoffe in Bourbon Whiskey, in Anlehnung an *Poisson und Schieberle* (2008 a & b);

Wissenschaftliche Studien zu sensorisch relevanten Verbindungen in Whisky legten ihren Fokus meist auf die flüchtigen, aromaaktiven Bestandteile. Bezüglich geschmacksaktiver Verbindungen in Whisky findet man deutlich weniger Veröffentlichungen. Eine sehr wichtige Rolle beim Geschmack der Spirituose spielt hier das Ethanol. Dieses verursacht ein Brennen und eine gewisse Süße. Durch Berechnung der Quotienten aus Konzentration und Geschmacksschwellenwert, den *Dose-over-Threshold*-Faktoren (DoT-Faktoren), kann ein direkter Beitrag einer Verbindung zum Gesamtgeschmack ermittelt werden. *Glabasnia* (2007) bestimmte DoT-Faktoren für Ethanol in Bourbon und zeigten, dass es sowohl für die Süße (DoT = 13,7) wie auch für das Brennen (DoT = 6,9) eine hohe Bedeutung hat. Außerdem tragen organische Säuren, wie Essigsäure und niedermolekulare Phenole zum sauren und adstringierenden Geschmack von Whisky bei. Zu den adstringierenden, niedermolekularen Phenolen gehören aromatische Aldehyde und Säuren, wie beispielsweise Vanillin, Syringaldehyd, Vanillinsäure oder Sinapinsäure (*Clyne et al.*, 1993). *Glabasnia* (2007) identifizierte die wichtigsten niedermolekularen phenolischen Verbindungen im Bourbon Whiskey, ermittelte ihre DoT-Faktoren und damit ihren direkten Beitrag zum Gesamtgeschmack (Tabelle 3). Unter den gelisteten adstringierenden Verbindungen zeigt nur die Ellagsäure Konzentrationen oberhalb des Schwellenwertes (DoT > 1). Der Beitrag der Aldehyde und Säuren zum Geschmack von Whisky wird nicht völlig ausgeschlossen, wie *Maga* (1984) anhand synergistischer Effekte dieser Inhaltsstoffe in 40 % Ethanol zeigte.

Tabelle 3: Konzentration, Geschmacksschwellenwert und DoT-Faktoren der wichtigsten adstringierenden niedermolekularen Phenole eines Bourbon Whiskys nach *Glabasnia* (2007)

Verbindung	Konzentration [mg/l]	Schwellenwert [mg/l]	DoT-Faktor*
Ellagsäure	12,7	2,0	6,4
Gallussäure	11,0	49,6	0,2
Syringaldehyd	12,5	60,2	0,2
Coniferylaldehyd	5,2	32,8	0,2
Sinapaldehyd	8,4	66,8	0,1
Syringinsäure	6,1	52,1	0,1
Vanillinsäure	5,3	52,9	0,1
Gentisinsäure	1,4	18,9	<0,1
Vanillin	5,1	126,0	<0,1
Kaffeesäure	0,47	12,8	<0,1
4-Hydroxybenzoesäure	1,48	92,4	<0,1
Gallussäureethylester	0,64	36,8	<0,1
Gallussäuremethylester	0,45	42,9	<0,1
Sinapinsäure	0,16	17,1	<0,1
Protocatechusäure	0,30	31,9	<0,1

*Dose-over-Threshold-Faktor: berechnet aus der Konzentration dividiert durch die Geschmacksschwellenwerte in Wasser/Ethanol (80/20; v/v)

Lignane, wie zum Beispiel das Lyoniresinol (*Koga et al.*, 2007), und Coumarine, wie das Scopoletin und Umbelliferon (*Baldwin et al.*, 1967; *Féernandez Izquierdo et al.*, 2000), sind bekannte nichtflüchtigen Inhaltsstoffe, aber ihr geschmacklicher Beitrag zur Spirituose wurde noch nicht beurteilt. *Reid et al.* (1993) wiesen in verschiedenen schottischen Whiskys längerkettige Fettsäuren nach, zu deren Einfluss auf den Geschmack der Spirituose keine Daten vorliegen.

Betrachtet man den Einfluss der einzelnen Herstellungsschritte auf das Aroma und den Geschmack des Endproduktes, so haben die Schritte vor der Destillation hauptsächlich Einfluss auf die flüchtigen Whiskybestandteile. Während des Darrens bei der Malzherstellung werden aromaaktive Streckeraldehyde, Pyrrole und Furane infolge der im Korn ablaufenden Maillard-Reaktion freigesetzt. Wird bei diesem Herstellungsschritt Torf als Feuerungsmittel eingesetzt, so sind auch rauchig riechende Phenole im späteren Destillat vorhanden. Weiterhin beeinflussen Oxidationsprodukte von ungesättigten Fettsäuren, zum Beispiel der Linolsäure, das Aromaprofil (*Tressl et al.*, 1979). Die aus der Gerste stammenden Fettsäuren werden von der Lipoxygenase in Verbindung mit Sauerstoff zu Hydroperoxiden oxidiert. Hydroperoxidlyasen spalten daraufhin die gebildeten Präkursoren und Aldehyde, wie die grün riechenden (*E*)-2-Nonenal und 2,4-Decadienal, werden gebildet (*Poisson und Schieberle*, 2008 a).

Diese Aldehyde, wie auch die Streckeraldehyde werden auch während des Maischens generiert (*Vocke*, 2008). Der genaue Bildungsweg des nach gekochtem Apfel riechenden β -Damascenon ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist jedoch, dass es beim Erhitzen der Maische aus Vorstufen entsteht (*Vocke*, 2008).

Während der Gärung wird nicht nur das bereits erwähnte Ethanol gebildet. Sie ist auch Quelle für höhere Alkohole, Fettsäuren und Ester. Höhere Alkohole, auch Fuselalkohole genannt, werden aus Kohlenhydraten und freien Aminosäuren während der Aminosäurebiosynthese und deren Katabolismus gebildet. 1-Propanol wird in Verbindung mit dem Anabolismus und dem Katabolismus von Threonin gebildet, Isobutanol aus Valin, 2-Methyl-1-butanol aus Isoleucin und 3-Methyl-1-butanol aus Leucin (Abbildung 3).

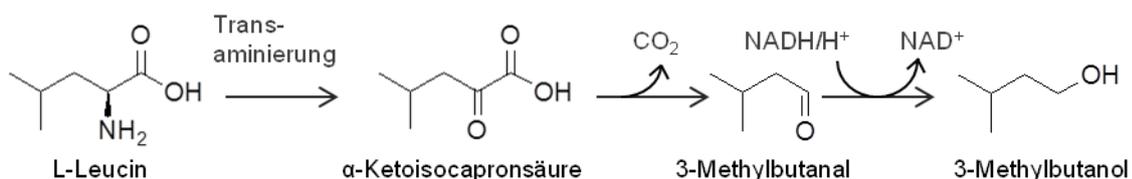


Abbildung 3: Abbau der Aminosäure L-Leucin zu 3-Methyl-1-butanol während der Gärung über den Ehrlich-Weg

Während der Fermentation kommt es auch zur Bildung von Essigsäureestern durch die Hefeenzyme Alkohol-acetyltransferase und Esterasen. Außerdem ist die Hefe verantwortlich für die Biosynthese von Fettsäuren und deren Ethylester. Deren Bildungsrate ist abhängig von der Temperatur, der Luftzufuhr und dem verwendeten Hefestamm (*Karhola et al.*, 1989). Eine sehr hohe Konzentration des buttrigen Diacetyls im Whisky lässt darauf schließen, dass dieses nicht nur im Rahmen des Hefemetabolismus generiert wurde, sondern zudem eine mikrobielle Kontamination der Maische mit Milchsäurebakterien vorliegt.

Durch die Destillation erhält man einerseits eine Aufkonzentrierung von gewissen Aromastoffen, wohingegen die Konzentrationen anderer währenddessen reduziert werden (*Nicol*, 1989). Es kommt zur Konzentrationszunahme von Aldehyden durch die Autoxidation von Linolsäure. Ethyl-2-methylbutanoat, (*E*)- β -Damascenon, Ethylbutanoat und Ethyl-2-methylpropanoat werden während des Brennens ebenfalls angereichert. Das in den Brennapparaturen verwendete Kupfer katalysiert die Esterbildung und verringert die Konzentration an schwefelhaltigen Verbindungen. Durch Diskriminierung während der Destillation nehmen die Mengen an 2-Phenylethanol, 3-(Methylthio)-propanal, 3-(Methylthio)-propanol und Vanillin im Vergleich von *wash* zu *spirit* ab (*Vocke*, 2008).

Die Reifung des Whiskys im Holzfass ist ein wichtiger Schritt für die sensorische Qualität des Endproduktes. Ursprünglich wurde das Fass als reines Aufbewahrungsgefäß benutzt, aber durch Bekanntwerden dessen Bedeutung für Geschmack und Geruch der darin gelagerten Spirituose, gewann es zunehmend an Wichtigkeit. Während der Lagerung des farblosen, unangenehm riechenden und brennend scharfen Destillates beeinflussen chemische und physikalische Vorgänge seine organoleptischen Eigenschaften zum Positiven. Folgende Veränderungen finden statt: Holzinhaltstoffe werden direkt aus der Fassoberfläche extrahiert, Holzmakromoleküle werden durch Hitzeeinwirkung während der Fassherstellung abgebaut und migrieren anschließend ins Destillat, gelöste Holzinhaltstoffe sowie Bestandteile des Destillates reagieren miteinander, Holzbestandteile und Destillatbestandteile reagieren jeweils untereinander und flüchtige Verbindungen evaporieren teilweise (*Nishimura und Matsuyama*, 1989). Aufgrund des Ligninabbaus gelangen die phenolsichen Aldehyde, wie zum Beispiel Syringaldehyd, Vanillin und Coniferylaldehyd in das Destillat. Werden die Fässer zuvor Temperaturen über 200°C ausgesetzt, kommt es zur Bildung von Methoxy- und Dimethoxyphenolen sowie von Methyl- und Ethylphenolen (*Mosedale und Puech*, 1998). Furfural, HMF und Essigsäure werden beim Polysaccharidabbau freigesetzt (*Caldeira et al.*, 2006). Durch die Oxidation von Ethanol werden Acetaldehyd und Essigsäure generiert (*Reazin*, 1981). Abhängig von pH-Wert und Ethanolkonzentration kommt es während der Reifung zur Acetalbildung und das fruchtig riechende 1,1-Diethoxyethan gelangt in die Spirituose. *Nishimura und Matsuyama* (1989) beschrieben die Abnahme von Schwefelverbindungen während der Lagerung. *Vocke* (2008) studierte die Veränderungen

der geruchsaktiven Verbindungen während der Reifung und stellte beim Vergleich der Inhaltsstoffe eines Bourbons, der jeweils nach 5- und nach 14-monatiger Lagerung analysiert wurde, fest, dass die Konzentrationen an Vanillin, *cis*- und *trans*-Whiskylacton sowie Eugenol zunahmen.

1.2 Ausbau von Spirituosen in Eichenholzfässern

Viele Spirituosen werden in Eichenholzfässern gelagert und erhalten erst durch ihre Reifung darin ihren typischen Charakter. Berühmte Vertreter hierfür sind neben Whisky auch Brandy und Rum. Es gibt mehrere Gründe dafür, warum Eichenholz im Vergleich zu anderen Hölzern bei der Fassherstellung bevorzugt verwendet wird. Es ist sehr stabil und weist dennoch eine gewisse Biegsamkeit auf. So ist seine Verarbeitung zu einem soliden Fass möglich. Es ist undurchlässig für Flüssigkeiten, zeigt aber dennoch eine gewisse Porosität, was einen Gasaustausch ermöglicht (Masson *et al.*, 1994). Neben den Vorteilen bei der Fassherstellung sind es sensorische Gründe, die für die Verwendung von Eichenholz sprechen. So hat die Lagerung positiven Einfluss auf die Farbe, die Klarheit und das Aroma des Destillats (Masson *et al.*, 1994; Puech *et al.*, 1999). Vergleicht man Eichenholz mit anderen Holzsorten, wie zum Beispiel Nadelholz, so besitzt Eichenholz keine Harzkanäle und folglich kommt es nicht zu ungewollten negativen Einflüssen durch Holzbestandteile.

Die Gattung *Quercus* umfasst mehr als 200 Arten, von denen drei die wichtigste Rolle bei der Fassherstellung spielen (Nishimura und Matsuyama, 1989). Die Stieleiche (*Quercus robur*) und die Traubeneiche (*Quercus petraea*) werden auch als französische Eichen bezeichnet. Die Weißeiche (*Quercus alba*) ist auch als amerikanische Eiche bekannt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung haben sie auch einen unterschiedlichen organoleptischen Einfluss auf das jeweils darin gelagerte alkoholische Getränk. Französische Eiche ist bekannt für einen hohen Gehalt an Tannine und Extraktstoffe, während Amerikanische Eiche mehr Aromavorstufen und weniger Polyphenole beinhaltet (Masson *et al.*, 1995). Die amerikanische Eiche wächst sehr schnell und kann bereits im Alter von 80 Jahren gefällt und zur Herstellung von Fässern verwendet werden, während europäische Eichen zum Teil erst ab einem Alter von 200 Jahren gefällt werden.

Wirft man einen Blick auf die Zusammensetzung von Eichenkernholz, so ist der Großteil der Bestandteile unlöslich, wie die Gerüstsubstanzen Cellulose, Hemicellulose oder Lignin. Der prozentuale Anteil an Cellulose in Holz beträgt in etwa 45 %, der Ligninanteil entspricht etwa 23 – 32 % und etwa 22 – 25 % des Kernholzes sind Hemicellulosen (Fengel und Wegener, 1984). Die mengenmäßig dominierende Cellulose besteht ausschließlich aus 1,4-verknüpften β -D-Glucose-Einheiten. Hemicellulose ist ein Sammelbegriff für polymere Kohlenhydrate, diese bestehen aus Xylose, Arabinose, Galactose, Mannose und Uronsäuren. Die Gerüstsubstanz Lignin ist ein komplexes dreidimensional vernetztes

Polymer, bestehend aus drei Phenylpropaneinheiten: Coniferyl-, Sinapyl- und p-Cumarylalkohol.

Die löslichen Verbindungen des Kernholzes betragen zwischen 3 und 10 %. Hierzu gehören flüchtige Verbindungen, phenolische Säuren und Aldehyde, Tannine, Zucker, nichtflüchtige organische Säuren, Steroide und anorganische Verbindungen (*Glabasnia und Hofmann, 2006*).

Frisches Holz enthält noch zwischen 40 und 60 % Feuchtigkeit und muss vor seiner Verwendung im Fassbau getrocknet werden (*Martinez et al., 2008*). In Europa wird das Holz bis zu drei Jahre unverarbeitet gelagert. In den USA werden zum schnelleren Entzug der Feuchtigkeit meist Trockenöfen eingesetzt. Ein konstanter Wassergehalt ist entscheidend für die Stabilität der Fässer, denn es mindert das Risiko für spätere Risse in den Dauben (*Martinez et al., 2008*). Während der Trocknung verändert sich auch die stoffliche Zusammensetzung des Holzes. Der Gehalt an wasserlöslichen Polyphenolen, wie den Ellagtanninen, nimmt ab. Gründe hierfür sind neben physikalischen und chemischen Vorgängen, wie dem Auswaschen durch Regen oder oxidativem Abbau, auch enzymatische Aktivität bei Pilzbefall. Die Konzentrationen an phenolischen Aldehyden und deren korrespondierenden Säuren, wie Vanillin und Vanillinsäure, oder Syringaldehyd und Syringinsäure, nehmen im Laufe des Trocknungsprozesses durch die Degradation des Lignins zu (*Martinez et al., 2008*). Verschiedene klimatische Einflussfaktoren, die geographische Lage oder die Eichenart, sind für die jeweilige Zusammensetzung des Holzes nach der Trocknung verantwortlich.

Für den Fassbau werden aus dem Holz zunächst Dauben zugeschnitten und diese anschließend zu Fässern geformt. Zur besseren Verarbeitung werden sie von Innen angekohlt. In der europäischen Praxis werden die Fässer dabei über offener Flamme an der Innenseite erhitzt (*Mosedale und Puech, 1998*). Dieser Prozess des Ankohlens wird auch als Toasten bezeichnet. Je nach Dauer der Hitzeeinwirkung unterscheidet man verschiedene Toastungsgrade. Bei Temperaturen zwischen 120 und 200°C spricht man von *light* bei einer Behandlung von 25 – 30 Minuten, von *medium* bei 30 – 35 Minuten und von *heavy* bei 35 – 40 Minuten (*Mosedale und Puech, 1998; Chatonnet et al., 1999*). Amerikanische Hersteller verwenden zunächst Wasserdampf, damit die Dauben biegsamer werden und formen dann die Fässer. Anschließend erfolgt das für die Bourbon-Produktion erforderliche Auskohlen (*Charring*) des Fasses, bei dem die Fassinnenseite etwa 15 – 45 Sekunden mit Gasbrennern ausgebrannt wird (*Mosedale und Puech, 1998*).

Während dieses Herstellungsschrittes finden aufgrund der sehr hohen Temperaturen, welche auf das Material einwirken, die stärksten Veränderungen der Holzzusammensetzung statt (*Sarni et al., 1990*). Der Grad des Abbaus verschiedener Holzsubstanzen und der damit verbundenen Bildung neuer Verbindungen ist abhängig von Dauer und Temperatur der

Behandlung. Eine Übersicht der stofflichen Veränderung der Holzzusammensetzung gibt Abbildung 4.

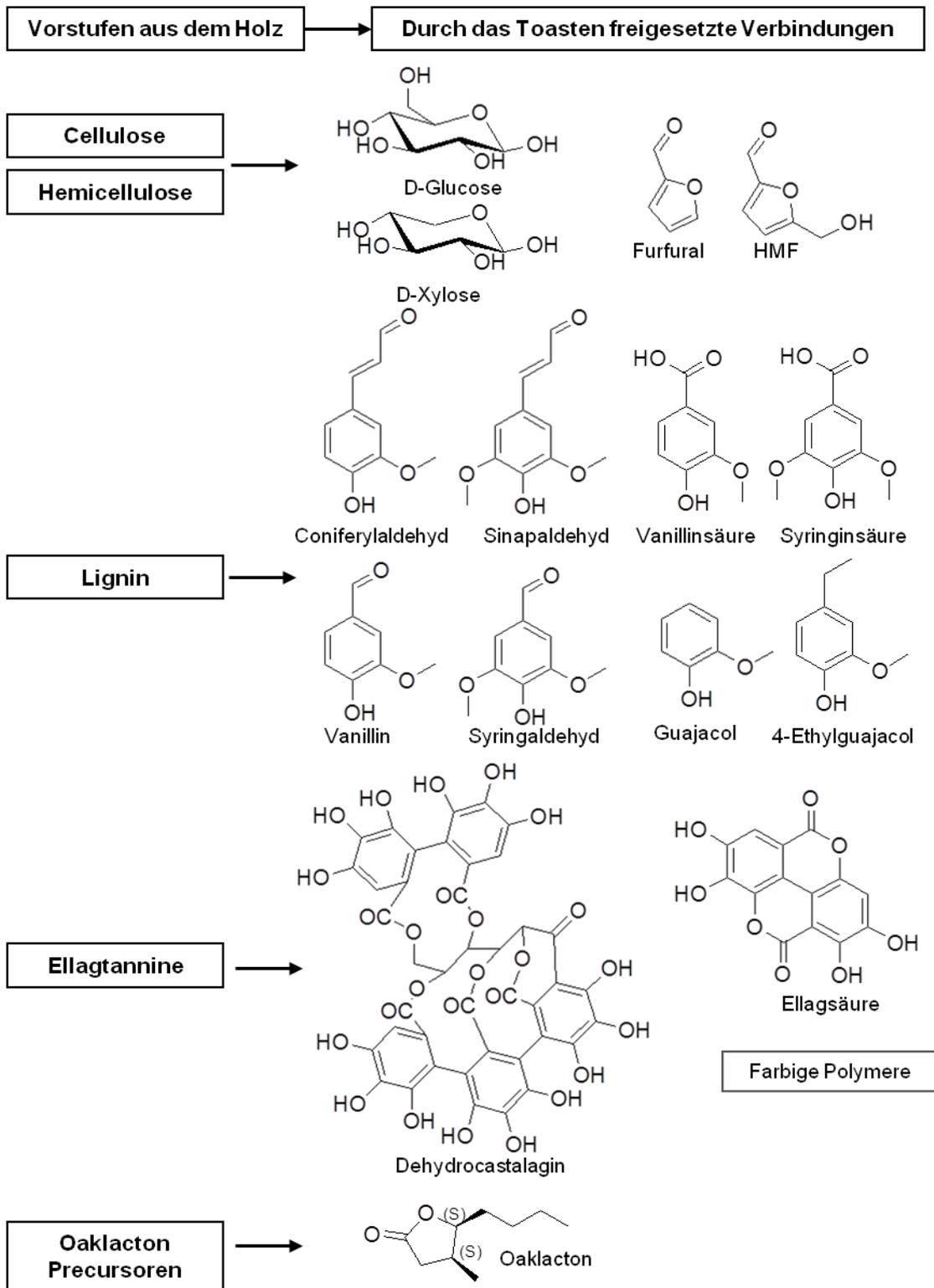


Abbildung 4: Übersicht zur stofflichen Veränderung von Holzbestandteilen während des Toastungsprozesses

Bei Hemicellulosen handelt es sich um thermolabile Polymere. Durch Hitzeeinwirkung kommt es zur Bildung von Hexosen, Pentosen und kurzkettigen Polysacchariden. Die Monosaccharide werden weiter zu Furan-Derivaten, wie Furfural oder 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), umgesetzt (*Mosedale und Puech, 1998*). *Caldeira et al. (2006)* zeigte die temperaturabhängige Bildung von Furfural, Methylfurfural, HMF und Essigsäure in verschiedenen Eichensorten und vermutete, dass die Polysaccharide Cellulose und Hemicellulose als Vorläufermoleküle dienen.

Hohe Temperaturen haben eine Depolymerisation des Lignin-Gerüsts zur Folge. Die Aryl-Etherbindungen werden dabei gespalten und phenolische Aldehyde und Säuren freigesetzt (*Mosedale und Puech, 1998*). In einem Temperaturbereich von 120°C bis 165°C nimmt die Konzentration an Zimtaldehyd-, Benzaldehyd- sowie Benzoesäurederivaten zu. Bei höheren Temperaturen werden genannte Aldehyde und Säuren durch Thermolyse abgebaut und die für angebranntes Holz charakteristischen phenolischen Komponenten (Guajacol, Dimethoxyphenole, Kresole) vermehrt gebildet (*Sarni et al., 1990; Cadahía et al., 2001*).

Doussot et al. (2002) stellte bei der Untersuchung der Zusammensetzung von nicht getoasteter im Vergleich zu getoasteter französischer Eiche fest, dass Ellagtannine einen Abbau um 90 % unter Akkumulation von Ellagsäure erfuhren. *Glabasnia (2007)* gelang die Identifizierung der Abbauprodukte Dehydrocastalagin und Desoxyvescalagin aus den im Eichenholz dominierenden monomeren Ellagtanninen Castalagin und Vescalagin. Außerdem entstehen beim Toastungsprozess farbige Polymerstrukturen, die eine wichtige Rolle für den Geschmack und die Farbe eines Bourbon Whiskeys einnehmen (*Glabasnia, 2007*).

Die kokosartig riechenden *cis*- und *trans*-Isomere des β -Methyl- γ -octalactons werden in der Literatur auch als Oak-, Quercus- oder Whiskylacton bezeichnet. Trotz der zum Teil falsch zugeordneten Isomere in ersten wissenschaftlichen Publikationen (*Masuda und Nishimura, 1971; Maga, 1989*) zeigten die Daten von *Masuda und Nishimura (1981 a)* sowie von *Günther und Mosandl (1987)*, dass in Eichenholz das *cis*-(3*S*,4*S*)-Whiskylacton in höheren Mengen, als das *trans*-(3*S*,4*R*)-Whiskylacton vorkommt. Außerdem konnten *Günther und Mosandl (1987)* nachweisen, dass die jeweiligen Enantiomere *cis*-(3*R*,4*R*)- und *trans*-(3*R*,4*S*)-Whiskylacton nicht natürlich vorkommen. Der Vergleich der Konzentrationen an *cis*-(3*S*,4*S*)- und *trans*-(3*S*,4*R*)-Oaklactonen in Extrakten von getoastetem und ungetoastetem Holz zeigte, dass diese durch die Hitzebehandlung zunehmen (*Maga, 1989*). Folglich war anzunehmen, dass es nichtflüchtige Vorstufen dieser Verbindungen gibt. *Tanaka und Kuono (1996)* identifizierten (3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-O- β -D-glucopyranosyloctansäure und (3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-O-(6'-O-galloyl)- β -D-glucopyranosyloctansäure im Holz der Zapfennuss als Präkursoren des Oaklactons. Diese beiden Strukturen wurden schließlich auch in Eichenholz nachgewiesen (*Masson et al., 2000*). *Hayasaka et al. (2007)* identifizierte neben den beiden beschriebenen Vorstufen außerdem

das Oaklacton-Gallat. Die Strukturen der drei identifizierten Oaklacton-Präkursoren sind in Abbildung 5 dargestellt. Als möglicher vierter Präkursor wurde das Oaklacton-Rutinosid vermutet, konnte jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Mit Hilfe synthetisierter Referenzsubstanzen zeigte *Hayasaka et al.* (2007) mittels LC-MS/MS Experimenten, dass auch das *trans*-Oaklacton-Glucosid in Eichenholz vorkommt, jedoch in deutlich geringeren Mengen als dessen *cis*-Isomer. Die biologische Funktion der Lactone und ihrer Präkursormoleküle sowie deren Biosynthese sind noch unklar. Vergleicht man die Zusammensetzung von Splint- und Kernholz, so wies Letzteres höhere Konzentrationen an Vorstufen und Oaklactonen auf (*Maga*, 1989; *Tanaka und Kuono*, 1996). Die Vermutung von *Maga* (1989), dass Lipide bei der Biosynthese eine Rolle spielen könnten, beruhte darauf, dass auch deren Konzentrationen im Kernholz höher waren als im Splintholz. Als Bildungsweg wurde die Lipidoxidation vorgeschlagen.

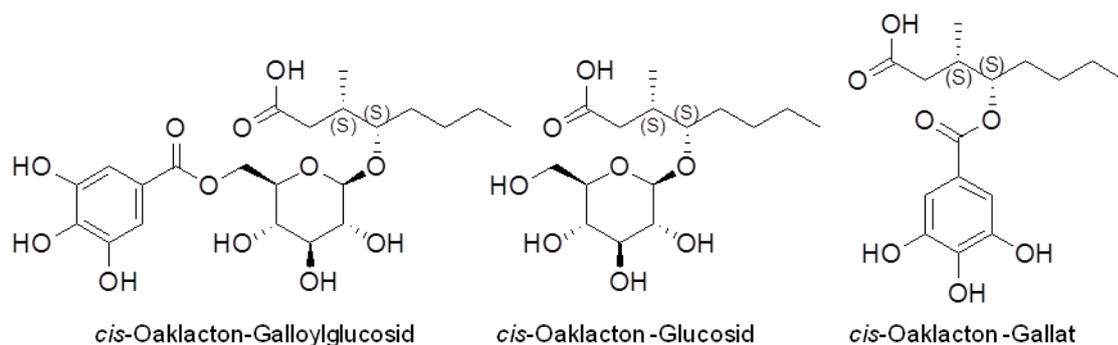


Abbildung 5: In Eichenholz identifizierte Oaklacton-Präkursoren

Die im Eichenholz enthaltenen bzw. durch die Hitzebehandlung entstandenen löslichen Verbindungen können während der Fasslagerung aus dem Holz extrahiert werden, in die Spirituose übergehen und mit anderen Inhaltsstoffen reagieren. *Glabasnia* (2007) gelang die Identifizierung von Ethanol-Addukte der Ellagtannine. Abbildung 6 zeigt die Strukturen der in Eichenholz dominierenden Ellagtannine Castalagin und Vescalagin, sowie deren Ethanol-Addukte Ethoxydehydrocastalagin Hemiketal, Ethoxydehydrovescalagin Hemiketal, Diethoxydehydrovescalagin Ketal und 33-O-Ethylvescalagin.

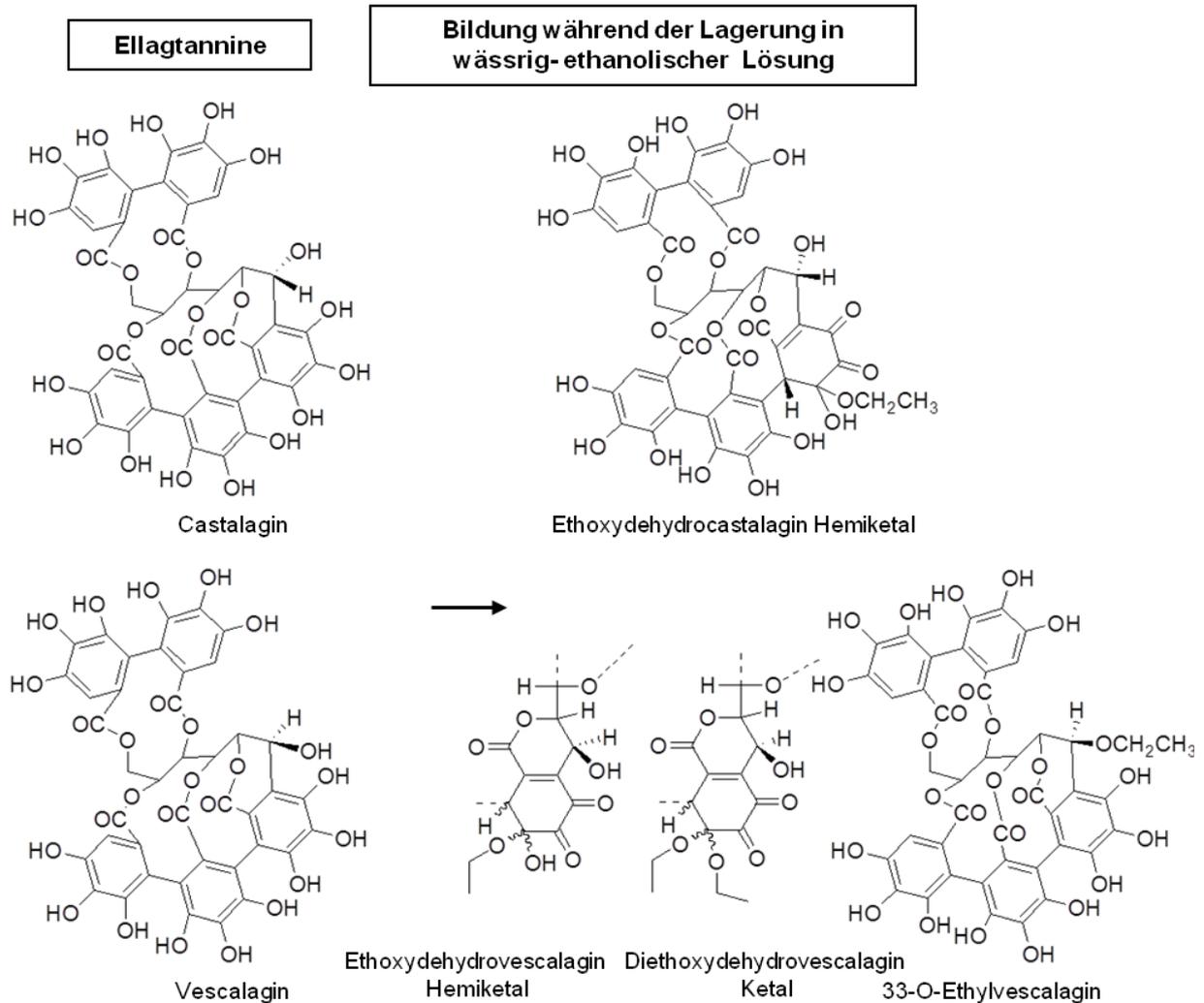


Abbildung 6: Übersicht zur stofflichen Veränderung der in Eichenholz dominierenden Ellagannine Castalagin und Vescalagin während der Lagerung in wässrig-ethanolischer Lösung

Das Auskohlen, bringt neben dem Abbau der eben erwähnten Verbindungen weitere Vorteile mit sich. Die dadurch gebildete Aktivkohleschicht entzieht dem Destillat während der Lagerung unerwünschte Aromastoffe, wie die Schwefelverbindungen Dimethylsulfid und Dimethyldisulfid (*Masuda und Nishimura, 1981 b*). Die physikalische Zersetzung der Holzoberfläche ermöglicht es dem Destillat außerdem, tiefer in das Holz einzudringen (*Mosedale und Puech, 1998*). Die Extraktmenge ist von der Größe des Fasses abhängig. Größere Fässer besitzen, bezogen auf das Inhaltsvolumen, eine kleinere spezifische Oberfläche und darin gelagerte Spirituosen benötigen daher eine längere Lagerungsdauer. Die vier meistverwendeten Fasstypen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Bei der Lagerung von Schottischen Whiskys werden zumeist gebrauchte Fässer verwendet, die zuvor für die Lagerung von Bourbon, Sherry oder Wein benutzt wurden. Um bereits gebrauchte Bourbon Fässer für die erneute Fasslagerung zu regenerieren, werden diese oft vor der Wiederbefüllung nochmals ausgekohlt (*Reid et al., 1993*). Die Historie eines Fasses

spielt eine wichtige Rolle und beeinflusst die Zusammensetzung der Extraktstoffe. Je öfter ein Fass wieder befüllt wird, desto stärker sinken die Anteile an flüchtigen und nichtflüchtigen Säuren, Ester und Tannine. Desweiteren ist eine Abnahme der Farbigkeit zu beobachten (*Nishimura und Matsuyama, 1989*).

Tabelle 4: Die vier meistverwendeten Fasstypen zur Reifung von Whisky nach *Nishimura und Matsuyama (1989)*;

Bezeichnung der Fässer für die Reifung von Whisky	Volumen [Liter]	Beschreibung, Eigenschaften
American barrels	180	Aus Weißeiche; neu: für die Lagerung von Bourbon; gebraucht: Lagerung von Scotch
Hogsheads	250	Aus wieder zusammengebauten gebrauchten Bourbon Dauben
Butts	480 – 520	lange, schmale Form ehemalige Sherryfässer
Puncheons	480 – 520	kurze, runde Form

1.3 Geschmackswahrnehmung

Im physiologischen Sinn ist Geschmack nur die über die gustatorischen Sensoren vermittelte Empfindung bei der Nahrungsaufnahme (*Rhener und Daniel, 2010*). Dabei spielt die Geschmackswahrnehmung neben Geruchs- und Tastempfindungen eine entscheidende Rolle. Sie erfolgt in erster Linie im Mundraum und hilft uns dabei zu entscheiden, ob die aufgenommene Nahrung dem Körper Energie und essentielle Metabolite liefert, oder ob sie potentielle Gefahren mit sich bringt. Die fünf Grundgeschmacksqualitäten, zu denen süß, salzig, bitter, sauer und umami gezählt werden, bieten die Möglichkeit die entscheidenden Nahrungsbestandteile zu erkennen und zwischen ihnen zu unterscheiden. Süße, salzige und umami-schmeckende Speisen weisen auf ernährungsphysiologisch wertvolle Eigenschaften hin und bewirken eine Affinität. Süße weist auf einen hohen Energiewert hin, Salzigkeit auf einen hohen Gehalt an Mineralstoffen und Umamigeschmack auf eine aminosäurereiche Nahrung. Sauer und bitter wahrgenommene Nahrungsmittel wirken aversiv. So werden auch viele Giftstoffe vom Menschen als bitter wahrgenommen, wodurch ihre Aufnahme verhindert werden soll. Um den Säure-Base-Haushalt des Körpers nicht zu stark zu beeinträchtigen und den Menschen vor unreifen oder vergorenen Speisen zu schützen, werden sehr stark saure Lebensmittel und Getränke als unangenehm empfunden (*Chandrashekar et al., 2006; Hatt 2007*). Beteiligt bei der Wahrnehmung des Geschmacks sind spezialisierte Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche der Sinneszellen befinden. Aufgrund von neu identifizierten Rezeptoren wird nun der fettige Geschmack, als eine weitere Geschmacksqualität diskutiert (*Galindo et al., 2012; Running et al., 2015*). Rezeptoren sind Membranproteine an den Geschmackssinneszellen und spezifisch für eine Geschmacksrichtung. Eine Vielzahl an Geschmackssinneszellen sind neben Basal- und Trägerzellen Bestandteile der

Geschmacksknospen, welche zum Beispiel in den Wänden und Gräben der Geschmackspapillen auf der Zunge lokalisiert sind (*Chandrashekar et al., 2006*). Neben der Zunge wurden Knospen auch auf dem Gaumensegel, dem Kehldeckel und der hinteren Rachenwand gefunden. Aktiviert eine Verbindung den Rezeptor, kommt es durch dessen Bindung zur Auslösung einer Signalkaskade, Synapsen werden aktiviert und Nervenfasern angeregt. Das Signal wird zum Hirnstamm geleitet und dort verarbeitet (*Lindemann, 2001*). Die Wahrnehmung von salzig und sauer erfolgt ionotrop über Liganden-aktivierende Proteinkanalkomplexe. Süß, bitter und umami werden metabotrop über G-Protein gekoppelte Rezeptoren wahrgenommen.

Beim Salzgeschmack spielen spezielle Amilorid-sensitive Natriumkanäle, die *epithelial sodium channels* (ENaC), eine wichtige Rolle. Ob diese alleine für die Salzwahrnehmung verantwortlich sind, wurde in den letzten Jahren vermehrt in Frage gestellt und die Existenz sowie die Beteiligung von weiteren Rezeptoren, wie dem Vanilloidrezeptor (TRPV1; TRP: *transient receptor potential channel*) (*Treesukosol et al., 2007*) oder dem Ionenkanal TRPML3 (*Moyer et al., 2009*), werden diskutiert. Bei beiden Möglichkeiten handelt es sich um Amilorid-unsensitive Rezeptoren. Zu den wichtigsten salzig schmeckenden Verbindungen zählt Natriumchlorid, aber auch weitere Ionen anorganischer Salze rufen Salzigkeit hervor.

Die Wahrnehmung des Sauergeschmacks erfolgt ähnlich wie die des Salzgeschmacks ionotrop. Auch hier ist die genaue Vermittlung bisher noch unzureichend geklärt und wird kontrovers diskutiert. Die Beteiligung eines Ionenkanals der TRP-Familie wird dabei vermehrt in den Vordergrund gestellt. Studien zeigen, dass ein Heterodimer der PKD Unterfamilie (*polycystic kidney disease*), PKD2L1 und PKD1L3, für die Detektion des sauren Geschmacks verantwortlich ist (*Huang et al., 2006*). Organische Säuren sind in zahlreichen Lebensmitteln und Getränken, wie Aceto Balsamico, Rotwein oder Fruchtsäften, für den sauren Geschmack verantwortlich. Wichtige saure Verbindungen sind zum Beispiel Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure oder Weinsäure.

Die metabotrope Geschmackswahrnehmung bitterer, umami-schmeckender und süßer Substanzen erfolgt zwar mit unterschiedlichen Rezeptoren, aber es handelt sich bei allen um heptahelikale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR: *G protein-coupled receptors*). Sie sind in der Lage externe Stimuli in intrazelluläre Signale zu übersetzen. Der Mechanismus ist dabei der gleiche und in Abbildung 7 am Beispiel des Süßrezeptors dargestellt. Geeignete Liganden binden am Rezeptor durch den Ausbau von Wasserstoffbrücken, Ionenpaaren oder hydrophoben Wechselwirkungen. Die Bindung an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der TAS1R- oder der TAS2R-Familie (TAS: *taste receptor family*) hat eine Aktivierung der heterotrimeren Guanosin triphosphat-bindenden Proteine zur Folge. Daraufhin kommt es zur Freisetzung der G $\beta\gamma$ Untereinheiten und der anschließenden Stimulierung der

Phospholipase-C β 2 (PLC- β 2). Die Aktivierung dieses Enzyms hat die Hydrolyse des membrangebundenen Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphates (PIP₂) zur Folge, wodurch Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) gebildet werden. IP₃ induziert schließlich durch Bindung am spezifischen IP₃-Rezeptor (IP₃R) die Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Cytosol. Dies bewirkt eine Depolarisierung der Zelle durch Öffnen der Kationenkanäle TRPM5. Schließlich kommt es zur Ausschüttung von ATP. Die Signalweitergabe erfolgt durch diesen Neurotransmitter über die präsynaptischen Zellen der Geschmacksknospen und den afferenten Nervenfasern zum Gehirn (*Chandrashekar et al., 2006; Chaudari und Roper, 2010*).

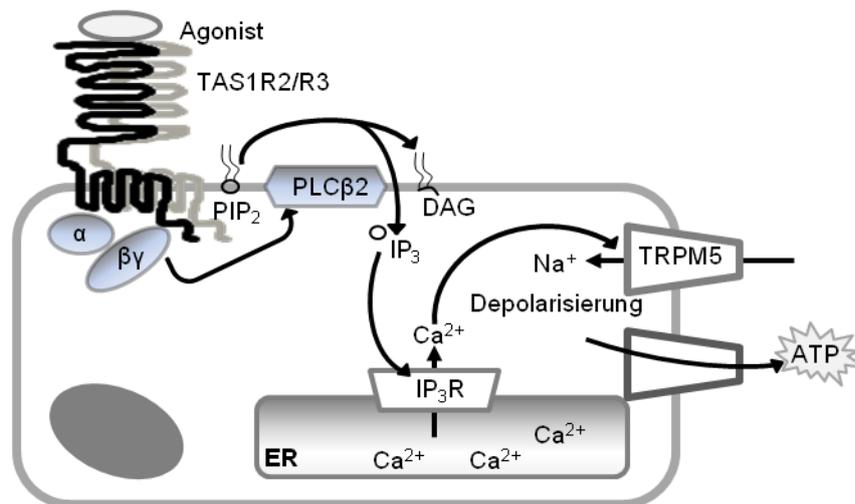


Abbildung 7: Signalkaskade der Süßrezeptoraktivierung; PLC β 2 = Phospholipase-C β 2, PIP₂ = Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat; IP₃ = Inositol-1,4,5-triphosphat; ER = endoplasmatisches Retikulum (Abbildung in Anlehnung an *Chaudari und Roper, 2010*).

Der bittere Geschmack wird beim Menschen von rund 25 funktionellen Rezeptoren der Familie hTAS2R vermittelt (*Chandrashekar et al., 2000*). Weiterhin sind 11 Pseudogene als Teil der hTAS2R-Genfamilie bekannt (*Go et al., 2005*). Der Einfluss von Heterodimerisierung auf die Funktion von Bitterrezeptoren konnte anders als bei TAS1-Rezeptoren nicht gezeigt werden (*Kuhn et al., 2004*). Das Ligandenspektrum der TAS2R-Vertreter ist sehr breit gefächert. Chemisch betrachtet findet man Bitterstoffe in vielen Substanzklassen wieder. Lebensmittelrelevante Beispiele hierfür sind die Alkaloide Coffein und Chinin, die Aminosäure L-Leucin, das Diketopiperazin *cis*-cyclo(L-Val-L-Pro), das Sesquiterpenlacton Absinthin, die β -Säure Lupulon, das Polyacetylen Falcarindiol, das Polyphenol (-)-Epicatechin, das Saponin Protodioscin oder das Steviolglycosid Rebaudioside A (*Dawid und Hofmann, 2014; Hellfritsch et al., 2012; Meyerhof, 2010; Hufnagel und Hofmann, 2008 b; Toelstede und Hofmann, 2008; Stark und Hofmann, 2005 b; Czepa und Hofmann, 2004*). Genetische Variabilität und Polymorphismen innerhalb der Gene der hTAS2Rs beeinflussen die individuelle Bitterwahrnehmung (*Meyerhof et al., 2011*). Gerade bei Erwachsenen

bewirken nicht alle bitteren Nahrungsmitteln eine aversive Reaktion. So befinden sich besonders im Bereich der Genussmittel einige Produkte, die speziell aufgrund ihrer Bitterkeit sehr hohe Beliebtheit erfahren. Beispiele hierfür sind Kaffee, Schokolade und alkoholische Getränke.

Rezeptoren der Familie hTAS1R sind dimere GPCRs der Klasse C. Sie besitzen neben dem heptahelikalen Transmembranbereich (7-TM), anders als die TAS2R, einen längeren, extrazellulären N-terminalen Bereich. Dieser formt eine Struktur, die aufgrund ihrer zangenähnlichen Form auch als *venus flytrap* Domäne (VFT) bezeichnet wird. Die VFT Domäne ist über ein Bindungsstück, auch als cysteinreiche Domäne (CRD) bezeichnet, mit der Transmembrandomäne verbunden. Diese Rezeptoren besitzen eine Vielzahl an möglichen Liganden-Bindungsstellen auf den verschiedenen Domänen. Dies ist am Beispiel des Süßrezeptors in Abbildung 8 veranschaulicht. Die Bindungsstellen der Bitterrezeptoren liegen im Vergleich dazu ausschließlich im Transmembranbereich, was den unpolaren Charakter vieler Liganden der hTAS2R-Familie erklärt (Chaudari und Roper, 2010).

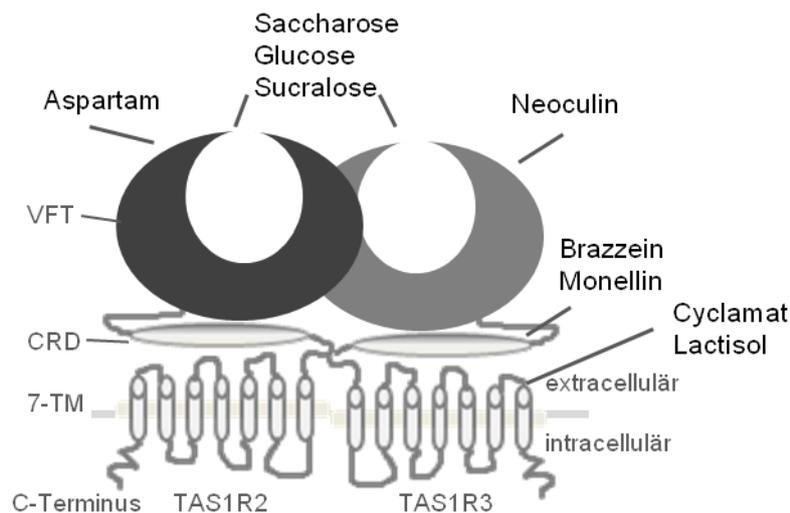


Abbildung 8: Venus Flytrap Süßrezeptor mit verschiedenen Agonisten und deren Bindungsstellen; VFT = *venus flytrap* Domäne, CRD = cysteinreiche Domäne, 7-TM = heptahelikalen Transmembrandomäne (Abbildung in Anlehnung an Behrens et al., 2011).

Das Rezeptorheterodimer hTAS1R1/R3 ermöglicht die Wahrnehmung von umami-artig schmeckenden Verbindungen. Dabei erwies sich die TAS1R1-Untereinheit als Schlüsselement für die Bindung der Aminosäure L-Glutamat. Die Bindungsstelle des L-Glutamats wurde an der Scharnierregion der *venus flytrap* Domäne identifiziert (Zhang et al., 2008). Über das Vorhandensein weiterer Umamirezeptoren wird seit einer Studie mit TAS1R3-Knockout Mäusen diskutiert. Als weitere Rezeptoren stehen vor allem metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) im Fokus der Wissenschaft (Yasumatsu et al., 2009). Neben Glutaminsäure schmecken auch die Aminosäuren L-Asparaginsäure, L-Glutamin und L-Asparagin umami (Toelstede und Hofmann, 2008). Weitere Umami-Geschmackstoffe sind

beispielsweise Bernsteinsäure (Ney, 1971), Morelid (Rotzoll et al., 2005) oder Strombin (Starkenmann et al., 2009).

Süße wird durch Aktivierung der heterodimeren Kombination aus hTAS1R2/R3 wahrgenommen. Statt TAS1R1 besitzt der Süßrezeptor im Unterschied zum Umamirezeptor die TAS1R2-Untereinheit. Die TAS1R3-Untereinheit ist bei beiden Rezeptoren gleich. Es wurden bereits mehrere Bindungsstellen für strukturell stark divergierende Agonisten lokalisiert (vgl. Abbildung 8). Mono- und Disaccharide, wie Glucose oder Saccharose (vgl. Abbildung 9), binden an den Bereichen der *venus flytrap* Domänen beider Rezeptoruntereinheiten. Die Bindungsstelle des Süßstoffs Aspartam (vgl. Abbildung 9) befindet sich nur an der *venus flytrap* Domäne der TAS1R2-Untereinheit, während die des süßschmeckenden Proteins Neoculin an der TAS1R3-Untereinheit lokalisiert ist. Andere süße Proteine, wie das Brazzein oder das Monellin binden an der cysteinreichen Region. Die Transmembrandomäne des TAS1R3 spielt bei der Aktivierung durch Cyclamat (vgl. Abbildung 9) eine wichtige Rolle. An dieser Bindungsstelle interagiert außerdem der Süßinhibitor Lactisol (Behrens et al., 2011). Trotz der rechtlichen Zulassung einiger künstlicher Süßstoffe, ist die Akzeptanz natürlicher Süßungsmittel bei den Verbrauchern deutlich höher. So sind die Isolierung und Identifizierung von weiteren Süßstoffen aus Pflanzenextrakten in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Neben den bereits erwähnten süßen Proteinen wurden eine Vielzahl süßschmeckender Terpenoide und Phenole beschrieben (Behrens et al., 2011). Eine Auswahl an süßschmeckenden Verbindungen ist in Abbildung 9 dargestellt.

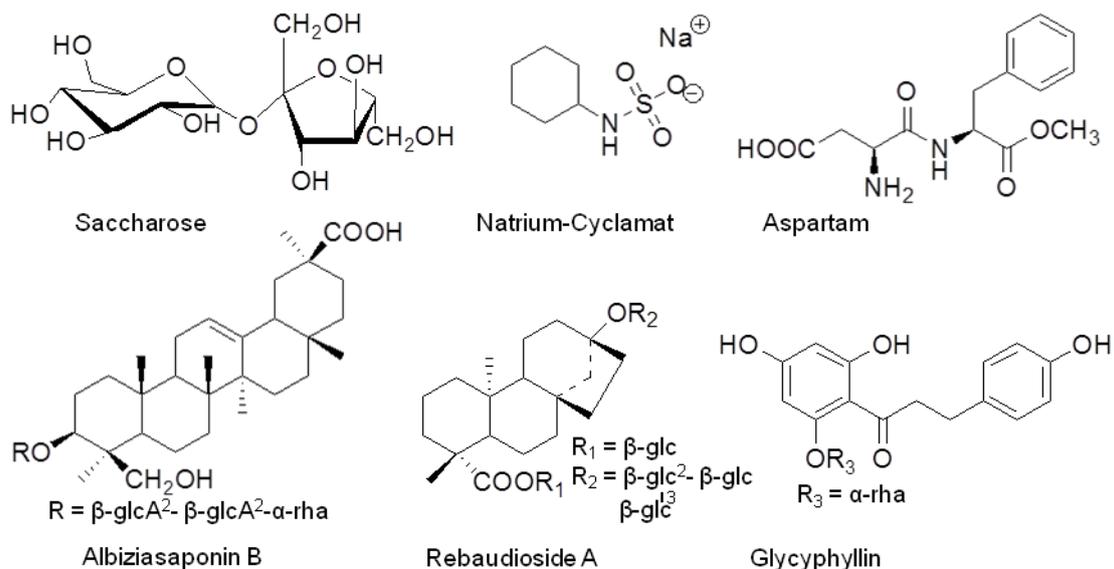


Abbildung 9: Ausgewählte süß-schmeckende Verbindungen.

Die Bevölkerung ist bestrebt die Aufnahme kalorienreicher Kohlenhydrate zu reduzieren, ohne dabei auf den angenehm süßen Geschmack verzichten zu müssen. Das Interesse an

positiven allosterischen Modulatoren ist dabei zunehmend in den Fokus von Industrie und Forschung geraten. Sie sind in der Lage unangenehme Geschmackseindrücke, wie Bitterkeit, zu maskieren oder zu reduzieren. Außerdem optimieren und verstärken sie die positiv empfundene Süße. Dabei handelt es sich um Substanzen, die selbst nicht süß schmecken oder gänzlich geschmacklos sind. Eine Vielzahl solcher Modulatoren wurde bereits für die Umami-Detektion beschrieben. Sie sind in der Lage zum Beispiel nahe der *venus flytrap* Domäne am jeweiligen Rezeptor zu binden und eine geschlossene und aktive Form der Bindung des Agonisten zu stabilisieren. Sie beeinflussen somit die Bindungsaffinität der direkten Agonisten ohne selbst den Rezeptor zu aktivieren. Ein bekannter Modulator des L-Glutamats ist die Verbindung Inosin-5'-monophosphat, wie *Zhang et al.* (2008) anhand von Rezeptormodellierungs-Experimenten zeigte. *Festring und Hofmann* (2010) identifizierten mittels geschmacksorientierter Fraktionierungstechniken von Hefeextrakten (S)-N²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat als Verstärker des umami-Geschmacks von L-Glutamat und fanden aufgrund dieser Kenntnisse weitere modifizierte Guanosin-5'-monophosphatderivate mit geschmacksverstärkenden Eigenschaften.

Ottinger et al. (2003) identifizierte ein geschmacksverstärkendes Maillard-Produkt, das Alapyridain (vgl. Abbildung 10), das sowohl süß- als auch umami-verstärkende Eigenschaften zeigt. *Britton et al.* (1999) beschrieben 2,4-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Verstärker der Süße von Aspartam. Süßgeschmacksverstärkende Eigenschaften können auch bei polyhydroxylierten Benzamiden, wie zum Beispiel dem 2,4,6-Trihydroxy-N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)benzamid (tHVBA; vgl. Abbildung 10) beobachtet werden (*Ley et al.*, 2008). *Servant et al.* (2010) entdeckte synthetische Verbindungen (z.B. ADTP = 4-Amino-5,6-dimethylthieno[2,3-D]pyrimidin-2(1H)-on; vgl. Abbildung 10) mit süßverstärkenden Eigenschaften in Anwendung mit Sucralose. *Zhang et al.* (2010) zeigten, dass diese Verbindungen eine Stabilisierung der geschlossenen Form der *venus flytrap* Domäne des TAS1R2-Untereinheit ermöglichen. Strukturell dem ADTP sehr ähnlich ist der von *Shigemura et al.* (2010) veröffentlichte Süßverstärker ADBT (3-[(4-Amino-2,2-dioxido-1H-2,1,3-benzothiadiazin-5-yl)oxy]-2,2-dimethyl-N-propylpropanamid; vgl. Abbildung 10). Dieser verstärkte jedoch die Süße von Saccharose. *Hillman et al.* (2012) gelang es mittels aktivitätsorientierter Fraktionierungstechniken 5-Acetoxy-methylfurfural (AcMF; vgl. Abbildung 10) als natürlichen Süßmodulator in Aceto Balsamico zu identifizieren. Dieser Essigsäureester des 5-Hydroxymethylfurfurals (HMF) ist für die typisch langanhaltende Süße des Essigs ausschlaggebend. Humansensorische Untersuchungen zeigten, dass die Verbindung selbst nicht als süß wahrgenommen wurde, diese aber in der Lage war, die Süße einer 4%-igen Saccharose Lösung signifikant zu verstärken. Die durchgeführten zellbasierten Rezeptorstudien zu dieser Verbindung zeigten dagegen eine direkte

Aktivierung des TAS1R2/R3 und lediglich eine additive Verstärkung bei gleichzeitiger Gabe von Saccharose.

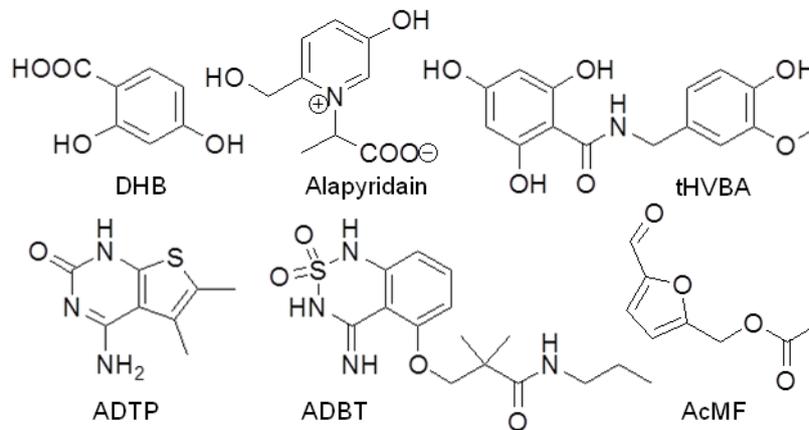


Abbildung 10: aus der Literatur bekannte Süßgeschmacksverstärker; DHB = 2,4-Dihydroxybenzoesäure, tHVBA = 2,4,6-Trihydroxy-N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)benzamid, ADTP = 4-Amino-5,6-dimethylthieno[2,3-D]pyrimidin-2(1H)-on, ADBT = 3-[(4-Amino-2,2-dioxido-1H-2,1,3-benzothiazin-5-yl)oxy]-2,2-dimethyl-N-propylpropanamid, AcMF = 5-Acetoxyethylfurfural;

In den letzten Jahren gelang es aufzuzeigen, dass bei der Fettwahrnehmung auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beteiligt sind. Zuvor nahm man an, sie sei ein reines Zusammenspiel von somatosensorischer und gustatorischer Wahrnehmung (*Chaudari und Roper, 2010*). Das heißt Textur, Geruchswahrnehmung und postprandiale Reize seien dabei maßgeblich beteiligt. Der Rezeptor GPR 120 wurde in humanen Geschmacksknospen und in weiterem Gewebe des Epithels identifiziert (*Galindo et al., 2012*). Es konnte in Knockout-Versuchen bei Mäusen gezeigt werden, dass dieser Rezeptor, zusammen mit GPR 40, für die Präferenz langkettiger Fettsäuren eine wichtige Rolle spielt (*Cartoni et al., 2010*).

Neben den fünf Grundgeschmacksqualitäten und der Fettigkeit tragen adstringierende, scharfe, prickelnde, kühlend schmeckende, als tingling und kokumi wahrgenommene Substanzen zum sensorischen Gesamteindruck von Nahrungsmitteln bei.

Adstringenz wird als raues und austrocknendes Gefühl im Mundraum wahrgenommen. Besonders bekannt ist es bei polyphenolreichen Nahrungsmitteln, wie unreifen Früchten, Tee, Kakao und Rotwein. Die Grundlagen bezüglich neuraler Zusammenhänge und dem genauen Mechanismus dieser Geschmackswahrnehmung sind noch nicht geklärt. Die Literatur beschäftigt sich ausführlich mit der taktilen Empfindung der Adstringenz und diskutiert hierbei besonders deren Ursache in präzipitierten Speichelproteinen, die folglich die Gleitfähigkeit des Speichels herabsetzen (*Hagerman et al., 1998; Kallithraka et al., 1998; Jöbstl et al., 2004*). Mechanorezeptoren werden schließlich durch erhöhte Reibung im Mundraum stimuliert. Polyphenole wurden bezüglich ihres Wirkmechanismus in der Vergangenheit bereits genauer untersucht. Je nach Polarität konnten zwei

Bindungsmechanismen zum Speichelprotein identifiziert werden (*Hagerman et al.*, 1998). Einerseits werden Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet, zum anderen finden hydrophobe Wechselwirkungen statt. Besonders prolinreiche Speichelproteine sind in der Lage, Polyphenole zu präzipitieren. Neben der taktilen Wahrnehmung der Adstringenz muss es noch weitere Mechanismen geben, denn wie *Schwarz und Hofmann* (2008) zeigten, gibt es adstringierende Substanzen, die Speichelproteine weder komplexieren noch ausfällen. Auch bei der Untersuchung von Kernextrakten unreifer und reifer Trauben stellen *Ferrer-Gallego et al.* (2012) kontroverse Ergebnisse bezüglich sensorisch wahrnehmbarer Adstringenz und der Proteinbindung fest. *Schöbel et al.* (2014) stellte die Vermutung auf, dass Adstringenz nicht ausschließlich von Mechanosensoren vermittelt werde, sondern auch chemosensorische Mechanismen sich daran beteiligen. Anhand von Studien an dissoziierten Ganglien des *Nervus trigeminus* (TG) aus Mäusen zeigten sie, dass Neuronen verstärkt durch Verbindungen mit Galloyl-Resten aktiviert wurden. Dies traf auch bei getesteten Weinpolymerfraktionen zu. So wurde über spezifische Galloyl-Rezeptoren auf Neuronen des TG diskutiert. Einige adstringierende Verbindungen werden auch als bitter wahrgenommen und aktivieren dann auch Bitterrezeptoren (*Soares et al.*, 2013). Weiterhin wird die Qualität der Adstringenz unterteilt in eine „aufrauende“ - ausgelöst zum Beispiel durch Flavan-3-ole - und eine „samtige weiche“, die bei der sensorischen Bewertung von Flavonol-glycosiden wahrgenommen wird (*Scharbert et al.*, 2004; *Hufnagel und Hofmann*, 2008).

Adstringenz wird von chemisch sehr unterschiedlichen Substanzklassen hervorgerufen. Die Strukturen einiger adstringierender Metabolite sind in

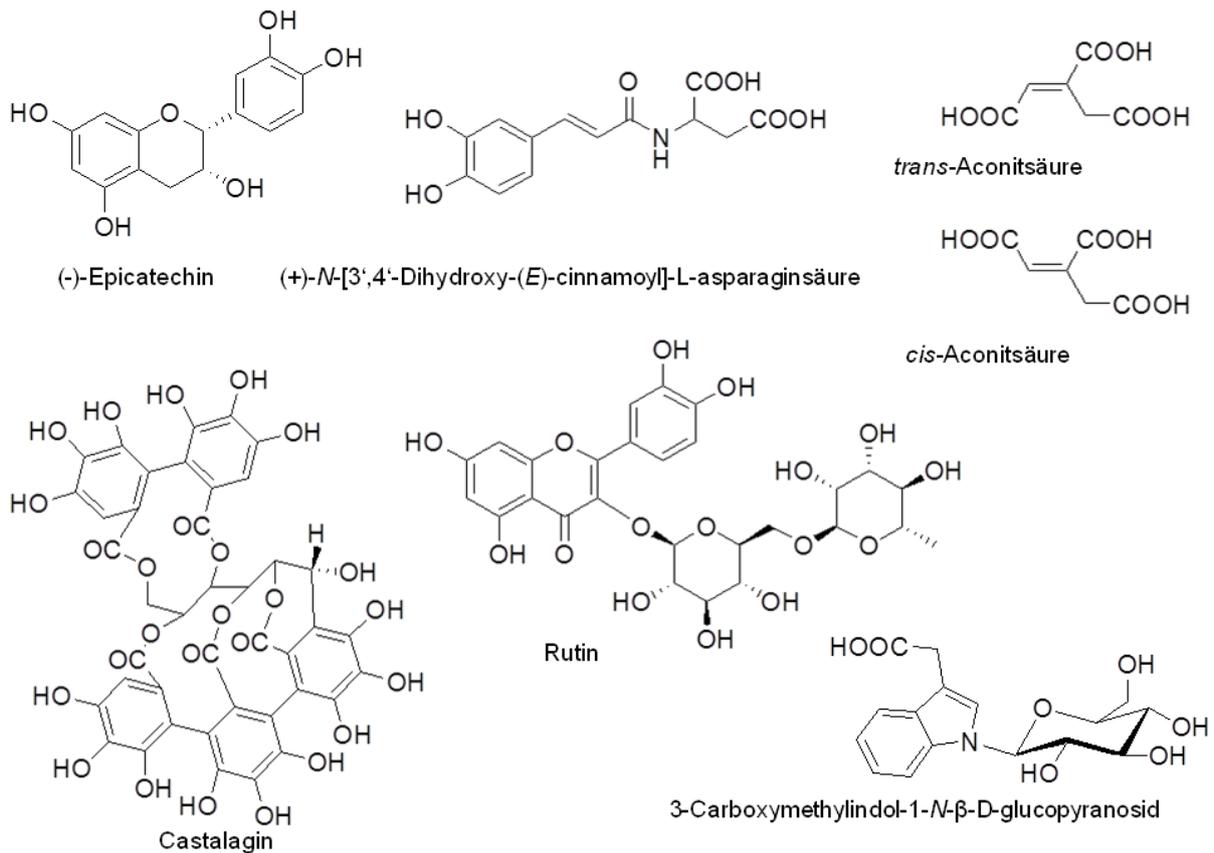


Abbildung 11 dargestellt.

Polyphenole gehören zu den wichtigsten Vertretern, aber auch Aluminiumsalze sowie organische und anorganische Säuren rufen das austrocknende Mundgefühl hervor. Bei der Identifizierung geschmacksaktiver Schlüsselverbindungen in Lebensmitteln wurde bereits eine Vielzahl an adstringierenden Substanzen beschrieben. Bei schwarzem Tee liefert Rutin mit einer sehr niedrigen Geschmacksschwelle (0,001 $\mu\text{mol/l}$) einen wichtigen Beitrag zur Adstringenz (Scharbert et al., 2004). Auch gerösteter Kakao wird als stark adstringierend empfunden, neben (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und Procyanidin-Oligomeren wurden darin adstringierende *N*-Phenylpropenoyl-L-Aminosäuren identifiziert, so zum Beispiel (+)-*N*-[3',4'-Dihydroxy-(*E*)-cinnamoyl]-L-Asparaginsäure (Stark et al., 2005; Stark und Hofmann, 2005 a). Ellagtantine, wie das Castalagin, leisten einen Beitrag zur Adstringenz eichenfassgelagerter Lebensmittel, wie zum Beispiel Rotwein und traditionellem Aceto Balsamico di Modena (Glabasnia und Hofmann, 2006; Hillman et al., 2012). Neben vielen Polyphenolen sind *cis*- und *trans*-Aconitsäure als adstringende Inhaltsstoffe in rotem Johannisbeersaft (Schwarz und Hofmann, 2007), aber auch in Rotwein enthalten (Hufnagel et al., 2008 b). Schwarz und Hofmann (2007) beschrieben außerdem den adstringierenden Geschmack von 3-Carboxymethylindol-1-*N*- β -D-glucopyranosid und dessen Beitrag zur Adstringenz in rotem Johannisbeersaft.

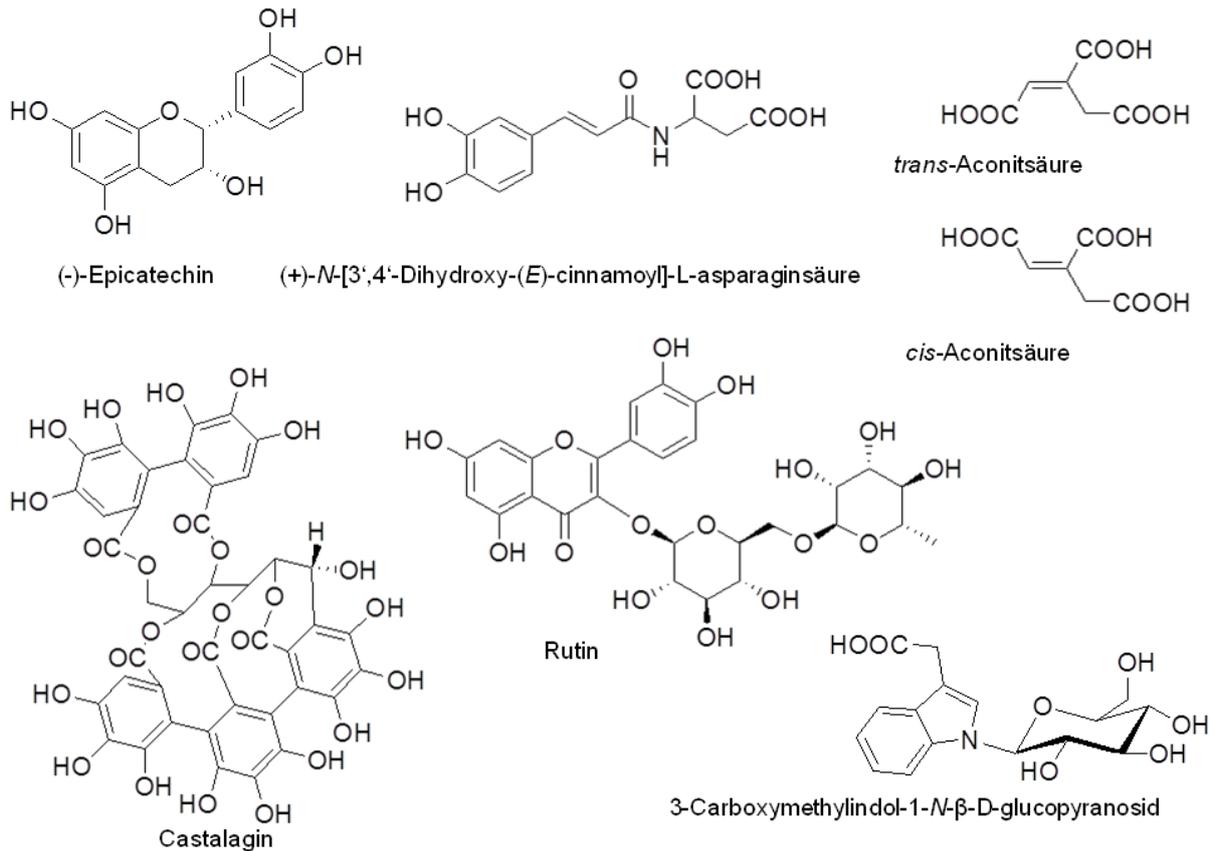


Abbildung 11: Beispiele adstringierender Verbindungen aus der Literatur

1.4 Analytik von Geschmacksstoffen

Im Bereich der molekularen Sensorik werden stets neue sensorisch aktive Verbindungen identifiziert und charakterisiert. Eine weitere Untersuchung auf Rezeptorebene ermöglicht außerdem tiefere Einblicke in den genauen Wirkmechanismus beim Schmecken. Zur Lokalisierung unbekannter Sensometaboliten in komplexen Lebensmitteln können verschiedene Konzepte angewendet werden. Zunächst sollte man zwischen zwei Herangehensweisen unterscheiden, einem zielorientierten und einem ungerichteten Ansatz. Beide verfolgen das Ziel, neue und für das Sensometabolom eines Lebensmittels wichtige Analyten aufzuzeigen.

Bei dem zielorientierten Ansatz wird neben der Analyse von bekannten Geschmackstoffen auch die aktivitätsorientierte Fraktionierung herangezogen. Geschmacksaktive Verbindungen werden dabei zunächst vollständig aus der Lebensmittelmatrix extrahiert. Eine erste grobe Fraktionierung des Extraktes nach Polarität oder Molekülgröße hilft bei der Lokalisierung geschmacksaktiver Verbindungen. Hierbei finden oft iterative Lösungsmittelfraktionierung, Festphasenextraktion, Gelpermeationschromatographie oder Ultrafiltration Anwendung. Die daraus resultierenden, meist immer noch sehr komplex zusammengesetzten Fraktionen werden chromatographisch weiter aufgetrennt und mit Hilfe der

Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) nach *Frank et al.* (2001) auf geschmacksaktive Verbindungen hin untersucht. Neben vielen sensorisch irrelevanten Inhaltsstoffen können mittels GVA Schlüsselgeschmacksstoffe lokalisiert und identifiziert werden. Diese Methode wurde in der Vergangenheit bereits erfolgreich bei der Identifizierung wertgebender Sensometabolite in verschiedensten Lebensmittel angewendet. So auch bei schwarzem Tee (*Scharbert et al.*, 2004), Kakaopulver (*Stark et al.*, 2005), geröstetem Kaffee (*Frank et al.*, 2006), Rotwein (*Hufnagel und Hofmann*, 2008 a), Aceto Balsamico (*Hillmann et al.*, 2012) sowie auch bei Whisky (*Glabasnia*, 2007). Erst kürzlich veröffentlichte *Pickrahn et al.* (2014) die Anwendung der GVA bei der Identifizierung von Geschmacksstoffen in Anis unter der Verwendung von vollautomatisierter zweidimensionaler HPLC. Eine eindeutige Identifizierung erfolgt nach Isolierung, Synthese oder dem Vergleich mit Referenzverbindungen unter Verwendung instrumentell-analytischer Messtechniken. Neben Massenspektrometrie, UV/VIS-Spektroskopie und CD-Spektroskopie spielt hier die NMR-Spektroskopie eine wichtige Rolle. Nach der Identifizierung werden die Metabolite sensorisch charakterisiert und Geschmacksschwellenwerte ermittelt. Außerdem ist es notwendig, alle identifizierten Sensometaboliten zu quantifizieren, um akkurate Konzentrationen zu erhalten und den tatsächlichen Geschmacksbeitrag der einzelnen Verbindungen zu bestimmen. Die Anwendung der Stabilisotopenverdünnungsanalyse hilft dabei, den Einfluss von Matrixeffekten zu minimieren. In Kombination mit den Schwellenwerten erhält man nun anhand der bestimmten Konzentrationen Auskunft über den Geschmacksbeitrag. Hierfür wird der Quotient aus Konzentration und Schwellenwert gebildet. Dieser berechnete Faktor wird „Dose-over-Threshold-Faktor“, kurz „DoT-Faktor“ genannt (*Scharbert und Hofmann*, 2005). Ein DoT-Faktor > 1 bedeutet somit, dass eine Verbindung in Konzentrationen oberhalb des Schwellenwertes vorliegt und von einem direkten Geschmacksbeitrag auszugehen ist. Synergistische und additive Effekte können jedoch dafür ausschlaggebend sein, dass auch Verbindungen mit einem DoT < 1 eine wichtige Rolle beim Gesamtgeschmack spielen können. Mit Hilfe der quantitativen Daten der identifizierten Geschmacksstoffe können Rekombinations- und Omissionsexperimente durchgeführt werden. Vergleicht man solche Voll- oder Teilrekombinate mit dem authentischen Lebensmittel, kann zum einen überprüft werden, ob alle wichtigen Geschmacksstoffe identifiziert wurden und zum anderen, welche Substanzen keinen Beitrag leisten. Zeigt die Quantifizierung der Geschmacksstoffe Varianzen in den Gehalten innerhalb verschiedener Sorten eines Lebensmittels auf, so kann festgestellt werden, ob die Geschmacksunterschiede der Sorten auf diese Unterschiede der Gehalte zurück zu führen sind. Folglich ermöglicht dieser gerichtete Ansatz, Aussagen über kausale Interaktionen zu treffen.

Bei der ungerichteten Vorgehensweise wird zunächst nicht nach definierten geschmacksaktiven Substanzen gesucht, sondern der Fokus liegt darauf, bei unterschiedlich schmeckenden Proben eines Lebensmittels diejenigen Verbindungen zu identifizieren, die sich in den zu untersuchenden Proben qualitativ oder quantitativ unterscheiden. Bei diesem Ansatz bedient man sich dem Instrument der multivariaten Statistik. Die verschiedenen Sorten werden zunächst mit identischen Analysemethoden vermessen, die parallel möglichst viele Verbindungen detektieren können und nicht nur zuvor festgelegte Metabolite erfassen. Geeignet hierfür sind zum Beispiel massenspektrometrische Methoden in Verbindung mit Gaschromatographie oder Flüssigchromatographie, NMR- oder UV/VIS-Spektroskopie. Je mehr Analyten detektiert werden, desto größer ist die Aussagekraft. So sollte eine Methode gewählt werden, bei der möglichst viele Substanzen erfasst werden können. Substanzen werden bei dieser Vorgehensweise in den unterschiedlichen Proben relativ quantifiziert. Absolute Konzentrationen werden hierbei zwar nicht ermittelt, jedoch ist es möglich, die Analyten mit größtem Beitrag zur Varianz der Proben ohne großen instrumentell-analytischen Aufwand herauszuarbeiten. Als Hilfsmittel dienen hier multivariate Verfahren, wie beispielsweise die Hauptkomponentenanalyse (PCA). Es gelingt so, die für detektierbare stoffliche Unterschiede verantwortlichen Markerverbindungen und korrelative Zusammenhänge der analysierten Proben zu ermitteln. Einen Anhaltspunkt für ihre Identifizierung liefert dann zum Beispiel die ermittelte Summenformel, Fragmente und der teilweise mögliche Datenabgleich mit Datenbanken.

Um erfolgreich die Schlüsselgeschmacksstoffe eines Lebensmittels zu erfassen, ist es von Vorteil, beide Ansätze parallel zu verwenden. So gelingt es Metabolite zu erfassen, die zum einen durch ihre biologische Funktionalität gezielt analysiert werden und solche, denen zum anderen durch Auswertung statistischer Datenanalysen eine wichtige Rolle zugeschrieben wird.

Bei der Charakterisierung sensorischer Eigenschaften ist der Zusammenhang zwischen Konzentration und Geschmacksintensität von Interesse. Der DoT-Faktor beschreibt eine lineare Korrelation zwischen Konzentration und Schwellenwert. Additive, synergistische oder suppressive Effekte werden bei DoT-Faktoren nicht berücksichtigt. Um den Beitrag einer Verbindung zur Intensität einer Geschmacksqualität zu ermitteln, eignet sich die Aufnahme von Dosis-Wirkungs-Kurven (*Stark und Hofmann, 2005 b*). Außerdem kann die Geschmackswahrnehmung nach ihrem zeitlichen Verlauf in Time-Intensity-Tests beschrieben werden (*Larson-Powers und Pangborn, 1978*). Dabei erfolgt die Aufzeichnung der wahrgenommenen Geschmacksintensität, beispielsweise von süßen Verbindungen, kontinuierlich von Beginn der Wahrnehmung an bis zum vollständigen Abklingen. Diese Methode ermöglicht es, die veränderte Süßwahrnehmung z.B. beim Einsatz von Süßmodulatoren aufzuzeigen.

Die Korrelation humansensorischer mit rezeptorbasierten Daten liefert weitere wichtige Informationen über Sensometaboliten. Automatisierte *In-Vitro*-Messungen sind besonders dazu geeignet, mit relativ geringem Aufwand neuartige geschmacksaktive Verbindungen mittels *High-Throughput-Screenings* zu identifizieren. So gelang es in den letzten Jahren, die Ergebnisse humansensorischer Untersuchungen von Bierbitterstoffen (*Intelmann et al.*, 2009), GMP-Amiden (*Festring et al.*, 2011), Steviolglykosiden (*Hellfritsch et al.*, 2012), Furan-, Thiophen- und Pyrrol-Derivaten (*Hillmann et al.*, 2012) und von Amiden generiert durch Lactonaminolyse (*Süß et al.*, 2013) mit Daten aus zellbasierten Rezeptorstudien zu verifizieren.

1.5 Ziel der Untersuchungen

Weltweit ist Whisky wegen seines attraktiven Aromas und typischen Geschmacksprofils als Genussmittel sehr beliebt. Unterschiedliche Rohstoffe, Herstellungsverfahren sowie Reifungsfaktoren beeinflussen die sensorischen Ausprägungen von Whisky, die bislang weitgehend empirisch optimiert wurden. Eine systematische Optimierung des süßlichen, adstringierenden und typisch brennenden Geschmacksprofils von Whisky ist aufgrund mangelnder Kenntnisse der Schlüsselgeschmacksstoffe bislang nicht möglich. Als Ziel der Arbeit sollten daher die den typischen Geschmack von amerikanischem Bourbon Whiskey und schottischem Single Malt Whisky ursächlich prägenden Verbindungen zu identifizieren, zu quantifizieren und funktional zu charakterisieren.

Mittels einer holistischen Metabolomprofilierung sollen zunächst durch UPLC-TOF-MS charakteristische Unterschiede verschiedener Whiskysorten aus molekularer Ebene herausgearbeitet werden und typische Markermoleküle identifiziert werden. Anhand einer aktivitätsorientierten Fraktionierung sollen dann geschmacksaktive und geschmacksmodulierende Inhaltsstoffe lokalisiert, mittels LC-MS und 1D/2D-NMR in deren chemischen Struktur aufgeklärt und anschließend in deren sensorischen Beitrag charakterisiert werden. Rekombinations- und Omissionsexperimente sollen einerseits die Vollständigkeit der bestimmten Sensometaboliten und andererseits den Beitrag verschiedener Verbindungen zum Gesamtgeschmack validieren. Identifizierte Geschmacksmodulatoren sollen dabei mittels humaner Time-Intensity-Tests und *In-Vitro*-Assays funktional untersucht werden. Anhand von Modellstudien sollen zudem die Mechanismen der Bildung von geschmacklich relevanten Modulatoren aufgeklärt werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Geschmacksprofilanalyse von Whiskyproben

Um erste Einblicke in die geschmacklichen Eigenschaften von Whisky zu erlangen, wurden zwei ausgewählte Whiskys einer Geschmacksprofilanalyse unterzogen (vgl. Abbildung 12). Bei den beiden Whiskys handelte es sich um einen amerikanischen Bourbon (AB3) sowie um einen schottischen Single Malt (SSM2). Die Untersuchungen wurden an Whiskys durchgeführt, die nach Lyophilisation in einer 20 %-igen ethanolischen Lösung aufgenommen wurden. Als Referenzmaterial diente eine 20 %-ige ethanolischen Lösung (Referenz). Mit dieser Vorgehensweise war es möglich den Alkoholgehalt aller verkosteten Lösungen gleich einzustellen und ihn auf 20 % zu reduzieren, um eine differenzierte Geschmackswahrnehmung zu ermöglichen. Die Qualitäten der einzelnen Geschmacksattribute wurden dazu von den Sensorikteilnehmern auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr deutlich wahrnehmbar) bewertet.

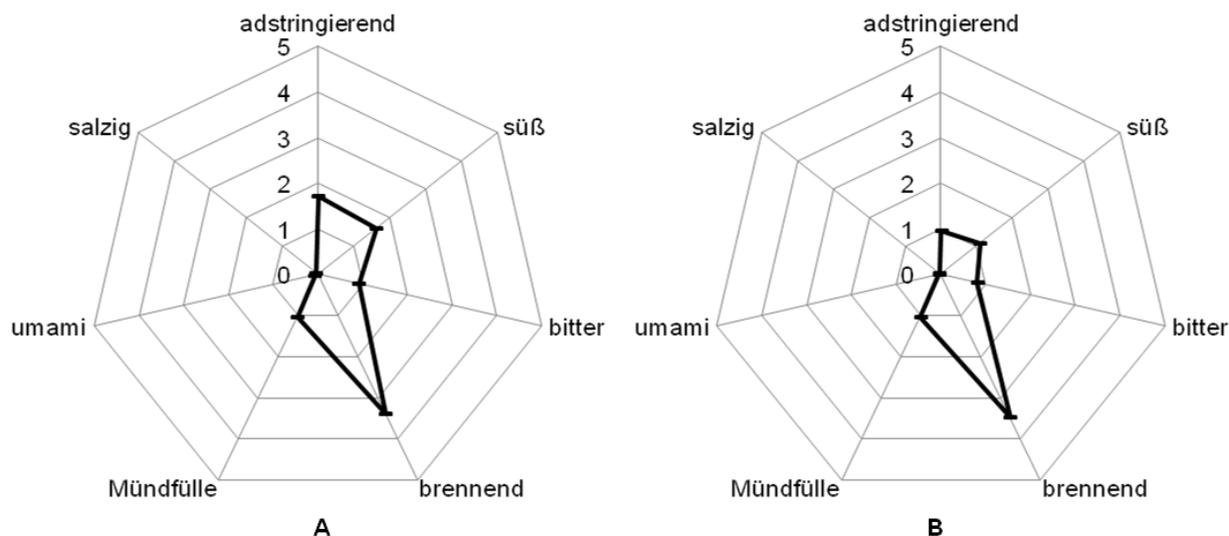


Abbildung 12: Geschmacksprofile ethanolischer Lösungen der Lyophilisate von Whisky AB3 (A) und SSM1 (B).

Beide Proben wurden als sehr stark brennend beschrieben (3,4 -3,5). Ließ das Brennen nach, zeichnete sich Whisky AB3 (Abbildung 12, A) durch seinen süßen Geschmack (1,6) aus. Die wahrgenommene Mundfülle wurde mäßig intensiv bewertet (1,0). Bitterkeit wurde etwas weniger stark wahrgenommen (0,9). Umami-Geschmack und Salzigkeit waren nicht detektierbar. Auf der Zunge blieb für einen längeren Zeitraum nach dem Abschlucken ein deutlich adstringierendes Mundgefühl (1,7) zurück. Im Gegensatz dazu wies die Referenz eine geringere Süße (1,0), Mundfülle (0,7), Bitterkeit (0,6) und Adstringenz (0,5) auf. Whisky SSM1 (Abbildung 12, B) zeigte einen mäßig stark ausgeprägten süßen Geschmack (1,1). Die wahrgenommene Mundfülle (1,0), Bitterkeit (0,8) und Adstringenz (1,0) wurden geringer

als bei Whisky AB3 und stärker als bei der Referenz bewertet. Umami-Geschmack und Salzigkeit waren bei beiden Proben nicht detektierbar.

2.2 Metabolomanalysen verschiedener Whiskys

Um den sensorisch beobachteten Intensitätsunterschied von Adstringenz und Süße verschiedener Whiskysorten auf molekularer Ebene zu klären, wurde ein ungerichtetes *Metabolic Profiling* durchgeführt. Die zur Analyse herangezogenen Whiskys sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Whiskyproben

Whisky	Bezeichnung	Beschreibung (Mindestlagerzeit; Ethanolgehalt)
Jack Daniel's	AB1	Tennessee Sour Mash Whiskey, 3-4 Jahre, 40 % Vol.
Jim Beam	AB2	Bourbon Whisky, 4 Jahre, 40 % Vol.
Woodford Reserve	AB3	Bourbon Whiskey, 43,2 % Vol.
Bowmore	SSM1	Islay Single Malt Whisky, 11 Jahre, 40 % Vol.
Glenfiddich	SSM2	Single Malt Whisky, 12 Jahre, 40 % Vol.
Glendronach	SSM3	Single Malt Whisky, Virgin Oak Finish, 14 Jahre, 46 % Vol.
Johnnie Walker	SB1	Blended Scotch Whisky, 40 % Vol.
Chivas Regal	SB2	Blended Scotch Whisky, 12 Jahre, 40 % Vol.

AB = amerikanischer Bourbon; SSM = schottischer Single Malt; SB = schottischer Blend;

2.2.1 UPLC-ESI-TOF-MS Analyse

Die instrumentelle Analyse der unterschiedlichen Whiskysorten erfolgte mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Flugzeitmassenspektrometer (UPLC-ESI-TOF-MS) (Abbildung 13). Dieses Verfahren wurde gewählt, da es eine schnelle chromatographische Auftrennung (10 Minuten pro Messung) bot und die akkuraten Massen detektierter Metabolite mit entsprechender Retentionszeit erfasst wurden. Die Messungen lieferten eine große Datenmenge. Die abgebildeten Chromatogramme ermöglichen eine grobe Übersicht zum Vergleich der Whiskyproben. Viele Analyten waren zwar in allen Proben qualitativ nachweisbar, unterschieden sich aber zum Teil sehr deutlich in ihren Intensitäten.

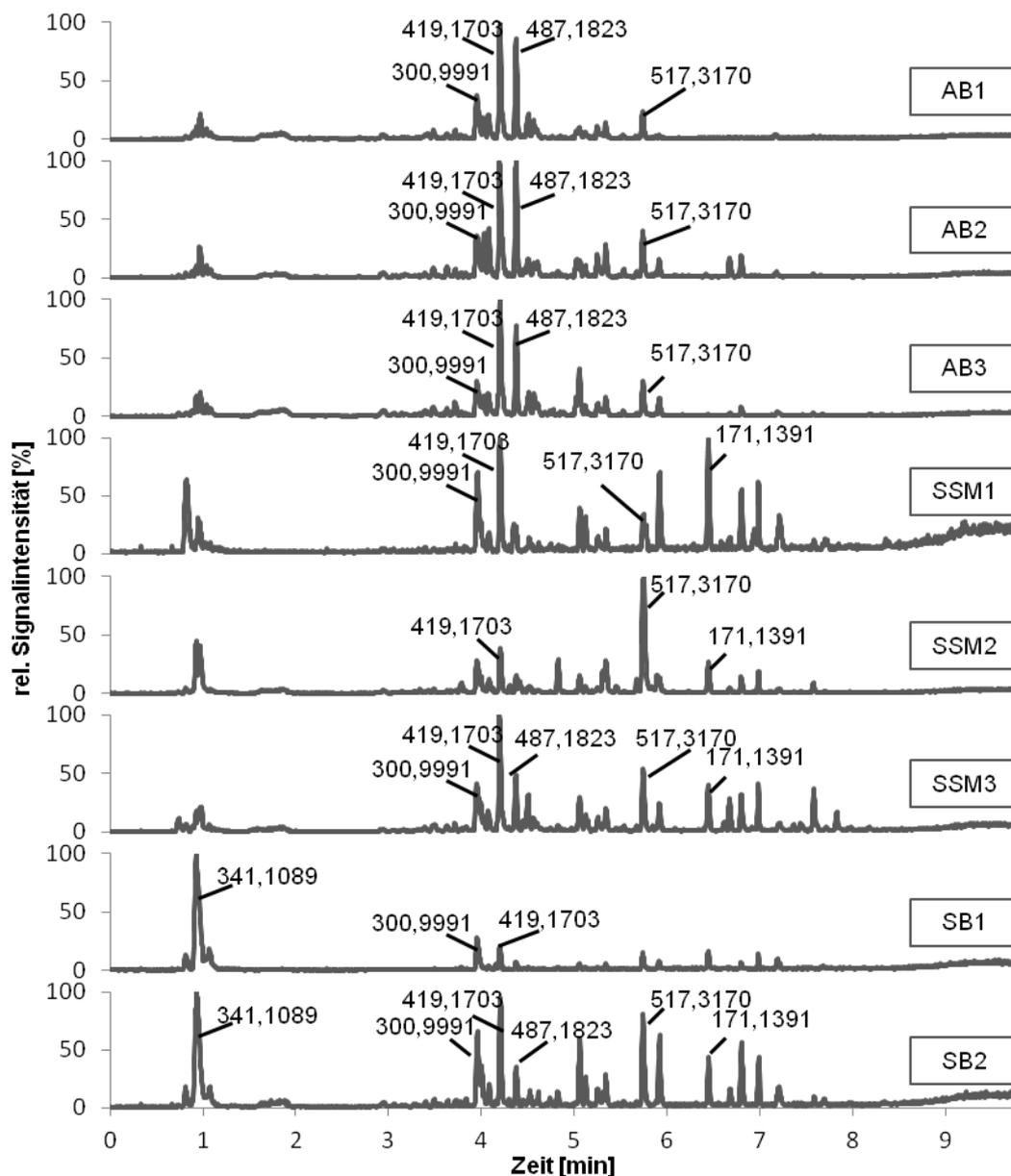


Abbildung 13: UPLC-ESI-TOF-MS Chromatogramme (BPI, ESI neg) der analysierten Whiskyproben; die akkuraten Massen ausgewählter Molekülonen sind dargestellt.

Zur Auswertung und Interpretation der mittels UPLC-ESI-TOF-MS generierten Messdaten wird eine multivariate Datenanalyse herangezogen. Diese ermöglicht eine gezielte Datenreduktion, um relevante Informationen besser herausarbeiten zu können. Dabei werden Daten mit gleichem Informationsgehalt meist zusammengefasst, Information von Nicht-Information (Rauschen) getrennt und Faktoren bestimmt um eine maximale Varianz der Ausgangsdaten zu erreichen. Die Hauptkomponenten vereinfachen den durch die Variablen aufgespannten multidimensionalen Raum und stellen ein Koordinatensystem dar, in das die Ursprungsdaten transformiert werden müssen (Kessler, 2007).

Die in Abbildung 14 dargestellte PCA wurde mit Hilfe der Marker Lynx™ Software berechnet und mittels EZinfo erstellt. Grundlage hierfür waren die UPLC-ESI-TOF-MS-Daten von acht unterschiedlichen Whiskyproben. Jede Probe wurde hierfür jeweils fünfmal injiziert. Die dabei generierten Daten wurden so verarbeitet, dass daraus eine Matrix aus exakter Massen, Retentionszeiten und Intensitäten gebildet wurde. Die Positionierung einer Probe im Koordinatensystem ergibt sich im Zusammenspiel der Einflüsse aller detektierten Faktoren dieser Probe auf die Varianz der Whiskys.

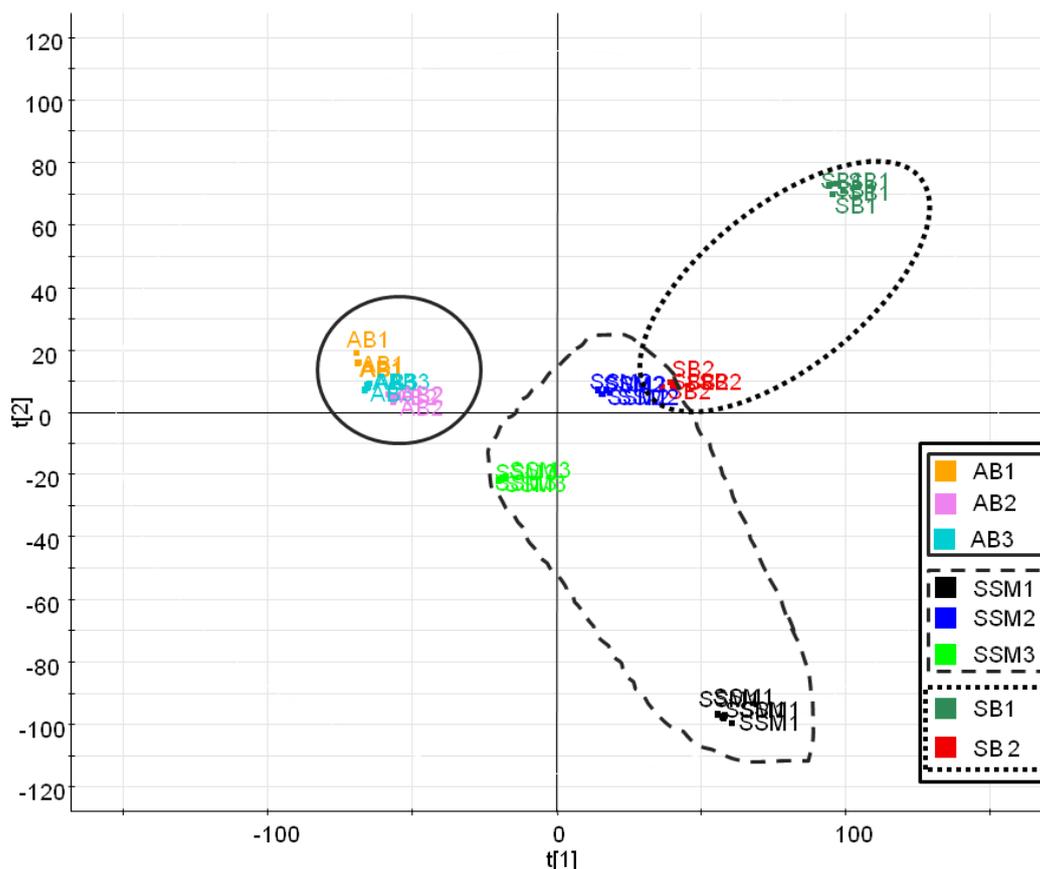


Abbildung 14: PCA der Whiskyproben nach deren Analyse mittels UPLC-ESI-TOF-MS (ESI neg, Full-Scan-Analyse 50 - 1200 Da, Resolution Mode), dargestellt im Scores Plot (t_1/t_2), prozessiert mit Marker Lynx™ Software und erstellt mit EZinfo; amerikanische Bourbon Whiskys (AM1-3, durchgezogene Rahmenlinie), schottische Single Malts (SSM1-3, gestrichelte Rahmenlinie) und schottische Blends (SB1-2, gepunktete Rahmenlinie); jede Probe wurde mehrfach injiziert (n=5).

Die Ergebnisse zeigen, dass alle fünf technischen Replikate gut übereinander liegen und eine gute Reproduzierbarkeit der Analytik gegeben ist. Die Hauptkomponentenanalyse veranschaulicht, dass die drei Bourbon Whiskys (AB1-3) eine geringe Varianz der ersten Hauptkomponente und damit eine große Ähnlichkeiten im Metabolom zeigen. Im Vergleich der Bourbon Whiskys zu den schottischen Whiskys (SSM1-3, SB1-2) liegen deutlich größere Unterschiede vor, was durch ihre verstreute Positionierung im Koordinatensystem erkennbar ist. Neben der unterschiedlichen geographischen Herkunft differenzieren sich die

analysierten Whiskey-Proben auch in ihren Rohstoffen und Herstellungsprozessen. Die schottischen Whiskys (SSM1-3, SB1-2) zeigen auch untereinander größere Varianzen in den ersten beiden Hauptkomponenten.

Um zu veranschaulichen welche Verbindungen für die Unterschiede verantwortlich sind, können jeweils zwei Whiskyproben in einem S-Plot einander gegenübergestellt werden. Die UPLC-ESI-TOF-MS Datensätze wurden so auch für die Erstellung von S-Plots herangezogen. Ein S-Plot visualisiert die *Loadings* der OPLS-DA (*orthogonal partial least squares - discriminant analysis*) und hilft bei der Identifizierung mutmaßlicher Biomarker. Dabei handelte es sich um statistisch signifikante und möglicherweise auch um sensorisch interessante Metabolite. Jeweils repräsentiert durch ihre exakten Massen und dazugehörigen Retentionszeiten, konnten solche Verbindungen, im Folgenden als „Marker“ bezeichnet, durch Datenbankenabgleich, Literaturrecherche und durch Absicherung mit Referenzsubstanzen identifiziert werden. Der in Abbildung 15 dargestellte S-Plot bezieht sich auf die Daten zweier unterschiedlicher Whiskysorten.

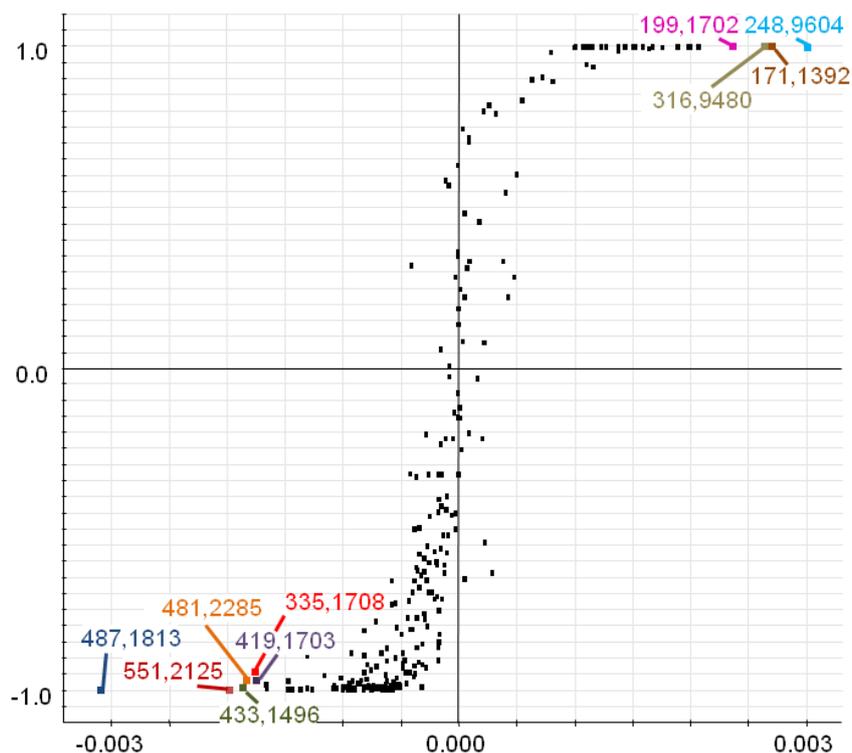


Abbildung 15: S-Plot der Whiskyproben AB2 (-1) vs. SSM1 (+1) nach deren Analyse mittels UPLC-ESI-TOF-MS (ESI neg, Full-Scan-Analyse 50 - 1200 Da, Resolution Mode); dargestellt mit den gemessenen exakten Massen ausgewählter Molekülonen.

Ein Bourbon (AB2; -1) wurde dabei einem Single Malt (SSM1; +1) gegenübergestellt. Als Marker für eine Whiskysorte zeichnen sich Metabolite aus, die einen großen Beitrag zum Unterschied der Sorten leisten (x -Achse $\hat{=}$ Magnitude) und eine hohe Zuverlässigkeit zeigen

(y-Achse \triangleq Reliabilität). Analyten am jeweiligen Ende der S-Kurve zeigen somit die höchsten Beträge von x- und y-Werten und werden als statistisch signifikant eingeordnet.

Als signifikante Marker für AB2 (-) erwiesen sich Metabolite mit m/z 487,1813, m/z 551,2125, m/z 433,1495, m/z 481,2285, m/z 419,1703 und m/z 335,1708 (Modus: ESI⁻). Für SSM1 (1) zeigten sich Verbindungen mit m/z 248,9604, m/z 171,1392, m/z 316,9480 und m/z 199,1702 (Modus: ESI⁻) als signifikante Marker.

Anhand der mittels TOF-MS gemessenen und berechneten akkuraten Massen wurden mögliche Summenformeln ermittelt und diese mit Verbindungen abgeglichen, die bereits in der Literatur für Whisky oder holzgelagerter Spirituosen beschrieben wurden (vgl. Tabelle 6 und Tabelle 7). Für eine eindeutige Identifizierung der Metabolite wurden Referenzsubstanzen herangezogen (vgl. hierzu Abschnitt 2.2.2).

Tabelle 6: Markerverbindungen für AB2, akkurate und exakte Massen der Molekülionen (ESI⁻), berechnete Summenformeln und aus der Literatur beschriebene passende Metabolite;

akkurate Masse des Molekülions [m/z]	Berechnete Summenformel	exakte Masse [m/z]	Vorgeschlagener Metabolit	Literatur
487,1813	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₂	487,1816	Oaklacton galloylglucosid	<i>Hayasaka et al.</i> (2007)
551,2125	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₂	551,2129	Lyoniresinol xylosid	<i>Ogawa und Ogihara</i> (1976)
433,1495	C ₂₂ H ₂₆ O ₉	433,1499	Ciwujiatone; <i>in Whisky/Eiche unbekanntes Neolignan</i>	<i>Chen et al.</i> (2012)
481,2285	C ₂₁ H ₃₈ O ₁₂	481,2285	Oaklacton rutinosid	<i>Hayasaka et al.</i> (2007)
419,1703	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	419,1706	Lyoniresinol	<i>Dada et al.</i> (1989)
335,1708	C ₁₅ H ₂₈ O ₈	335,1706	Oaklacton glucosid	<i>Hayasaka et al.</i> (2007)

Tabelle 7: Markerverbindungen für SSM1, akkurate und exakte Massen der Molekülionen (ESI⁻), berechnete Summenformeln und aus der Literatur beschriebene passende Metabolite;

akkurate Masse des Molekülions [m/z]	Berechnete Summenformel	exakte Masse [m/z]	Vorgeschlagener Metabolit	Literatur
248,9604	n. b.*	-	-	-
171,1392	C ₁₀ H ₁₉ O ₂	171,1385	Decansäure	<i>Reid et al.</i> (1993)
316,9480	n. b.*	-	-	-
199,1702	C ₁₂ H ₂₃ O ₂	199,1698	Dodecansäure	<i>Reid et al.</i> (1993)

*n. b. = es wurden keine sinnvollen Summenformeln für vorliegende akkurate Masse bestimmt

2.2.2 Identifizierung von Whisky-Markerverbindungen

Wie bereits beschrieben, wurden auf Grundlage der S-Plots Metabolite mit den stärksten Unterschieden in ihrer relativen Signalintensität als Markerverbindungen bezeichnet. Anhand ihrer akkuraten Massen konnten mögliche Summenformeln ermittelt werden und ein Abgleich dieser mit in der Literatur für Whisky oder holzgelagerter Spirituosen beschriebenen Substanzen erfolgen. Waren solche Verbindungen kommerziell erhältlich, fand ihre Identifizierung durch Vergleich der Fragmentierung und mittels Cochromatographie statt. Nicht käuflich erwerbliche Metabolite mussten zunächst isoliert werden, um eine Verifizierung durchzuführen.

2.2.2.1 Markerverbindungen für den Schottischen Single Malt „SSM1“

Bezüglich der aus dem S-Plot „AB2 vs. SSM1“ (vgl. Abbildung 15) resultierenden Markerverbindungen für SSM1 (+1) stimmten die berechneten Summenformeln zweier Metabolite mit denen von Fettsäuren überein. Die Molekülonen m/z 171,1392 (Modus: ESI⁻, Summenformel: C₁₀H₂₀O₂) und m/z 199,1702 (Modus: ESI⁻, Summenformel: C₁₂H₂₄O₂) deuteten auf Caprinsäure und Laurinsäure hin. Um ihre Identität zu verifizieren, wurden beide Referenzverbindungen analog den Whiskys mittels UPLC-ESI-TOF-MS aufgetrennt (vgl. Abbildung 16) und zeigten neben den gleichen Molekülonen auch die gleichen Retentionszeiten.

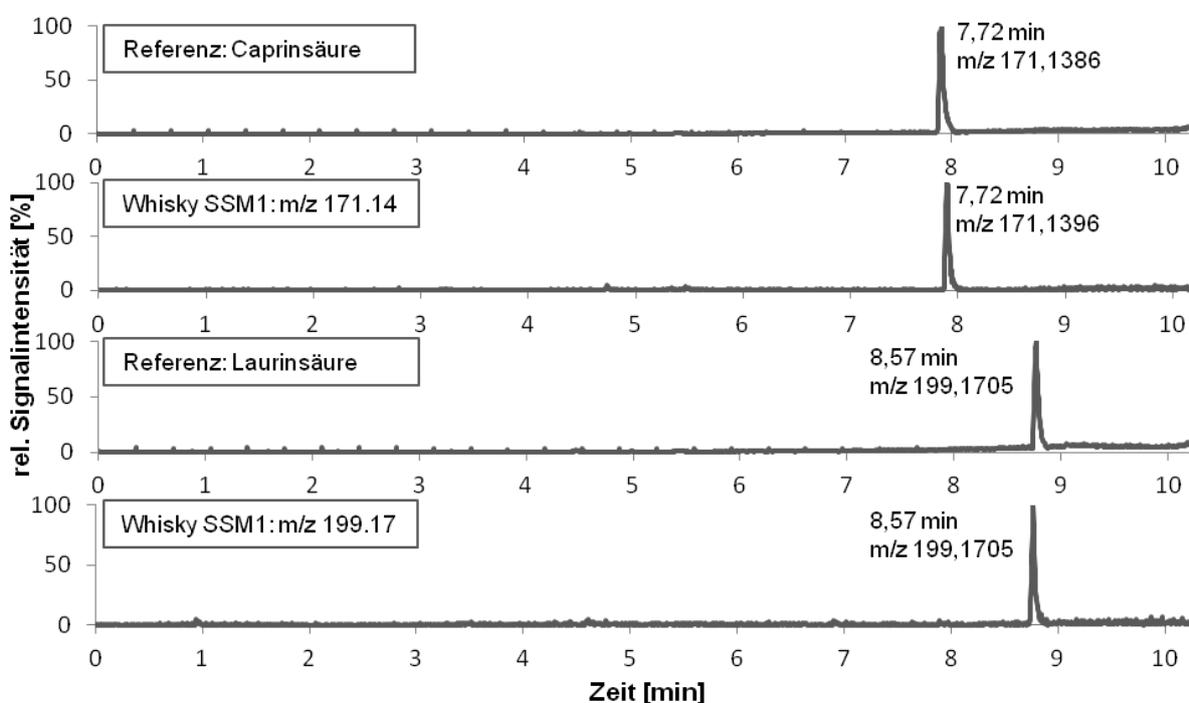


Abbildung 16: Identifizierung der Fettsäuren Caprinsäure und Laurinsäure in der Whiskyprobe SSM1 mittels UPLC-ESI-TOF-MS (ESI neg); dargestellt sind die relativen Signalintensitäten ausgewählter Molekülonen.

Durch Cochromatographie erfolgte die eindeutige Bestätigung, da nur die Peakflächen der jeweiligen Marker zunahmen und keine weiteren Peaks auftraten. Die mittelkettigen Fettsäuren Caprin- und Laurinsäure wurden somit als Markerverbindungen für SSM1 im Vergleich zu AB2 identifiziert. Bekanntlich werden Fettsäuren während des Fermentationsprozesses gebildet und können während des Brennvorgangs in das Destillat verschleppt werden.

2.2.2.2 Markerverbindungen für den Bourbon „AB2“

Neben Markerverbindungen für den Single Malt wurden einige auch für den Bourbon „AB2“ aus dem S-Plot (Abbildung 15) ermittelt. Der Vergleich der berechneten Summenformeln mit bereits aus der Literatur bekannten Whisky- oder Holzbestandteilen ist in Tabelle 6 aufgeführt. Bei dreien dieser Metabolite (m/z 487,1813; m/z 481,2285; m/z 335,1708; Modus: ESI⁻) stimmten die berechneten Summenformeln mit Verbindungen überein, die in der Literatur (vgl. *Hayasaka et al.*, 2007) als Oaklacton-Präkursoren bezeichnet wurden. Weitere Summenformeln von Markerverbindungen (m/z 419,1703; m/z 551,2125; m/z 433,1495; Modus: ESI⁻) kongruieren mit Lignanen und Neolignanen (*Dada et al.*, 1989; *Ogawa und Ogihara*, 1976; *Chen et al.*, 2012). Aufgrund fehlender Referenzsubstanzen wurden diese Verbindungen zur eindeutigen Identifizierung zunächst isoliert (vgl. 2.2.3).

2.2.3 Isolierung von Referenzsubstanzen aus amerikanischem Eichenholz und Verifizierung von Bourbon-Markerverbindungen

Da die mutmaßlichen Markerverbindungen für AB2 nicht käuflich erwerblich waren, war deren Isolierung notwendig. Im Hinblick auf größere Substanzausbeuten wurde hierzu amerikanisches Eichenholz herangezogen. Bei den vermuteten Metaboliten handelte es sich um nichtflüchtige Verbindungen, die bereits in Eichenholz beschrieben wurden und während der Lagerung aus dem Holzfass in den Whisky migriert sein mussten.

2.2.3.1 Extraktion und Fraktionierung von amerikanischem Eichenholz

Holz der Amerikanischen Weißeiche, *Quercus alba*, wurde als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Bourbon-Markerverbindungen gewählt. Aus dem Holzmehl dieser Eichenart wurde zunächst ein Ethanol-Wasser-Extrakt (60/40 (v/v), pH=4,5) generiert (vgl. 3.2.1).

Aufgrund der bereits vermuteten Substanzstrukturen von Lignanen, Neolignanen und Oaklacton-Präkursoren (vgl. 2.2.2.2) wurden stark unpolare Verbindungen nach Lyophilisation vom Ethanol-Wasser-Extrakt abgetrennt. Hierzu wurde mit einem Ethylacetat/n-Hexan-Gemisch (1/9 (v/v)) extrahiert (EH-Extrakt). Der daraus resultierende Rückstand wurde nochmals nach seiner Polarität aufgetrennt, indem er nach Trocknung mit Methanol extrahiert wurde. Neben dem so erzeugten Methanol-Extrakt (M) verblieb ein sehr

polarer, gut wasserlöslicher Rückstand (W). Die Auftrennung der so generierten Fraktionen EH, M und W des Ethanol-Wasser-Extraktes mittels analytischer HPLC-ELSD (vgl. Abbildung 17) verdeutlichte dessen Verteilung nach Polarität. Alle Fraktionen wurden außerdem mittels UPLC-ESI-TOF-MS analog der Whiskyproben (vgl. 2.2.1) analysiert und folglich gelang es die Markermetabolite m/z 487,1820, m/z 551,2128 und m/z 419,1707 in Fraktion M zu lokalisieren (Chromatogramme nicht dargestellt).

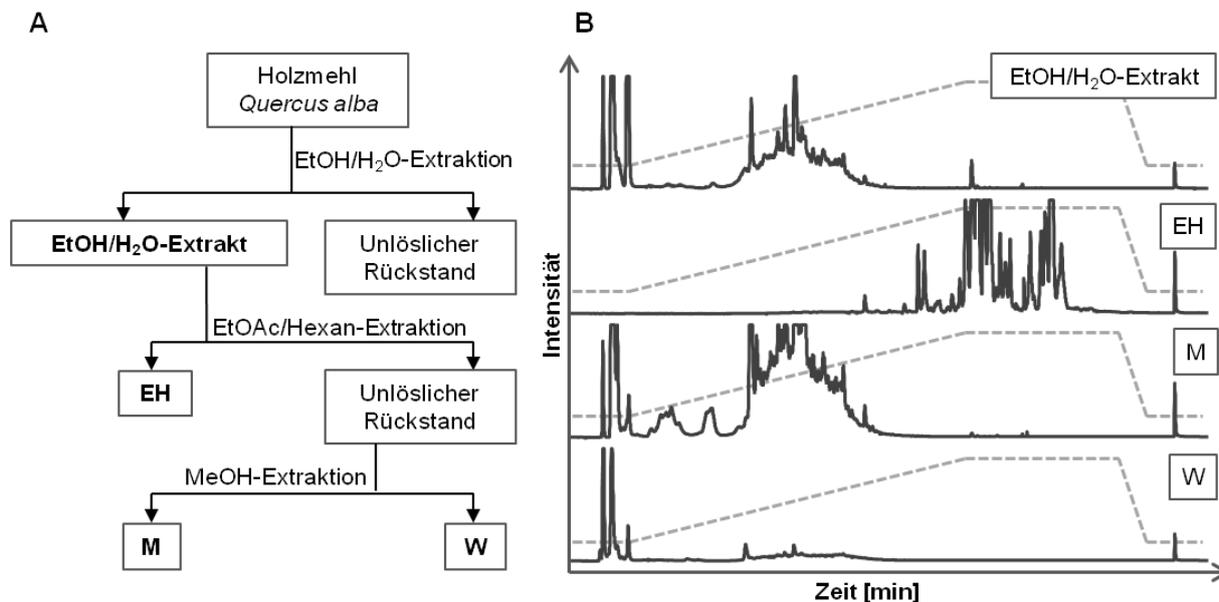


Abbildung 17: A: Extraktionsschema zur Generierung der Fraktionen; B: HPLC-ELSD Chromatogramme des Ethanol-Wasser-Extraktes (EtOH/H₂O) und dessen Fraktionen EH, M und W (Gain 12; Gradient A 3.2; % B dargestellt in grau gestrichelter Linie);

Die Markermetabolite m/z 487,1820, m/z 551,2128 und m/z 419,1707 wurden aus der Eichenholzfraktion M isoliert. Hierzu wurde dieser mittels *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) an RP-18-Material aufgetrennt. Die Trennung erfolgte unter Gradientenelution mit 0,1 %-iger Ameisensäure und Methanol bei einer Flussrate von 40 ml/min, wobei die Elutionskraft mit zunehmendem Methanolanteil des Elutionsmittels anstieg. Das Eluat wurde in sieben Subfraktionen, M1 – 7, unterteilt, wie in Abbildung 18 zu sehen ist.

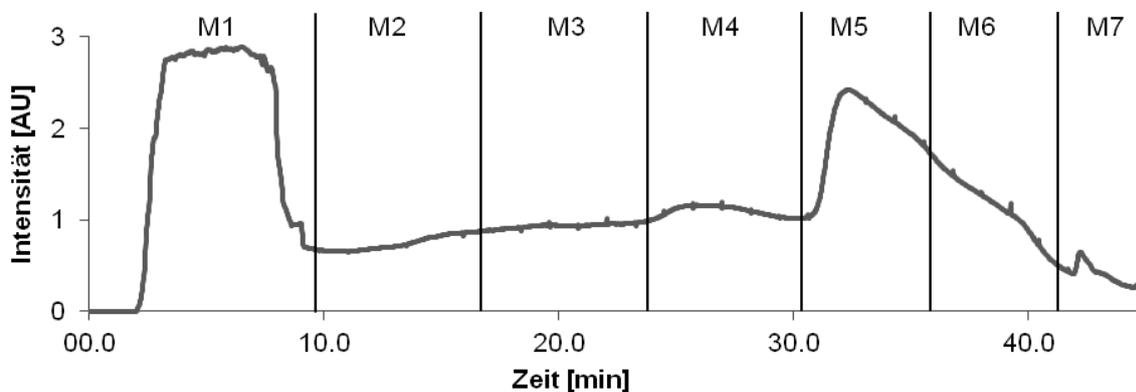


Abbildung 18: MPLC Chromatogramm von M ($\lambda = 254$ nm; Gradient A 3.2.1.3) und die Unterteilung in sieben Subfraktionen M1 – 7.

Jede dieser Fraktionen wurde erneut mittels UPLC-ESI-TOF-MS auf ihre Zusammensetzung und die Anwesenheit von Bourbon-Markerverbindungen analysiert. Ein Teil der gesuchten Metabolite (m/z 487,1820; m/z 551,2128; m/z 419,1707; Modus: ESI⁻) konnte in den Fraktionen M4 und M5 identifiziert werden (Abbildung 19).

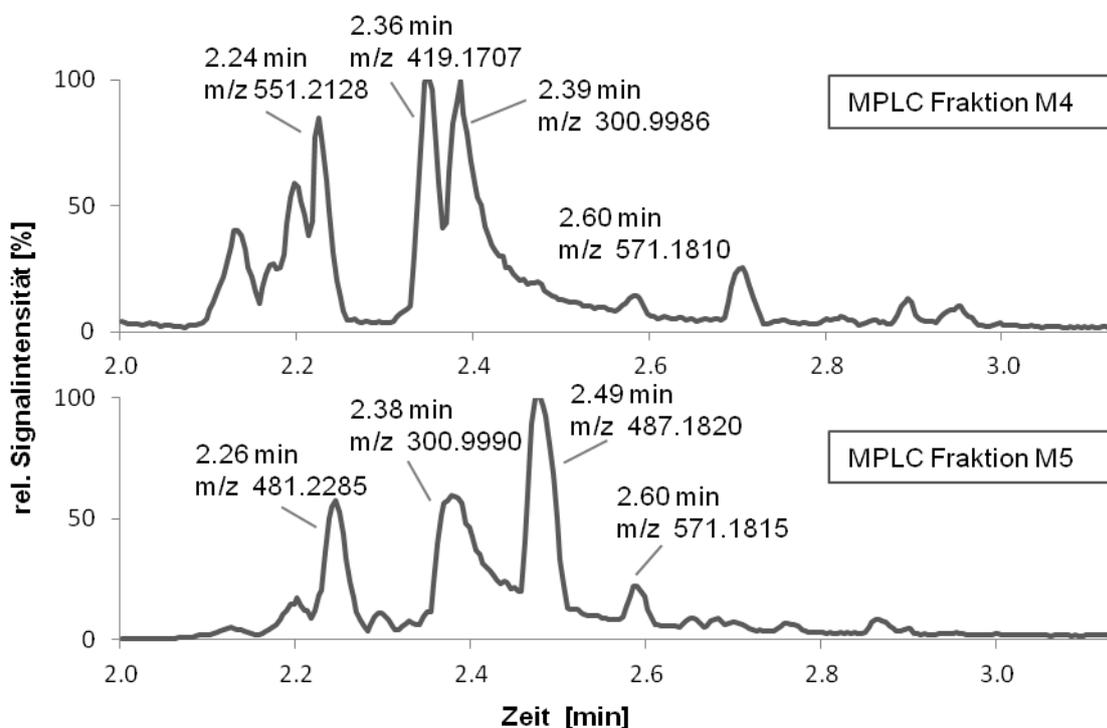


Abbildung 19: UPLC-ESI-TOF-MS-Chromatogramme (BPI, ESI⁻) der MPLC Fraktionen M4 und 5; dargestellt sind die relativen Signalintensitäten einer jeden Probe mit ausgewählten Molekülonen.

Die noch sehr komplex zusammengesetzten MPLC Fraktionen M4 und M5 wurden mittels präparativer HPLC an Phenyl-Hexyl-Material weiter aufgetrennt. Das Eluat von Fraktion M4 wurde in 15 Subfraktionen unterteilt, dargestellt in Abbildung 20.

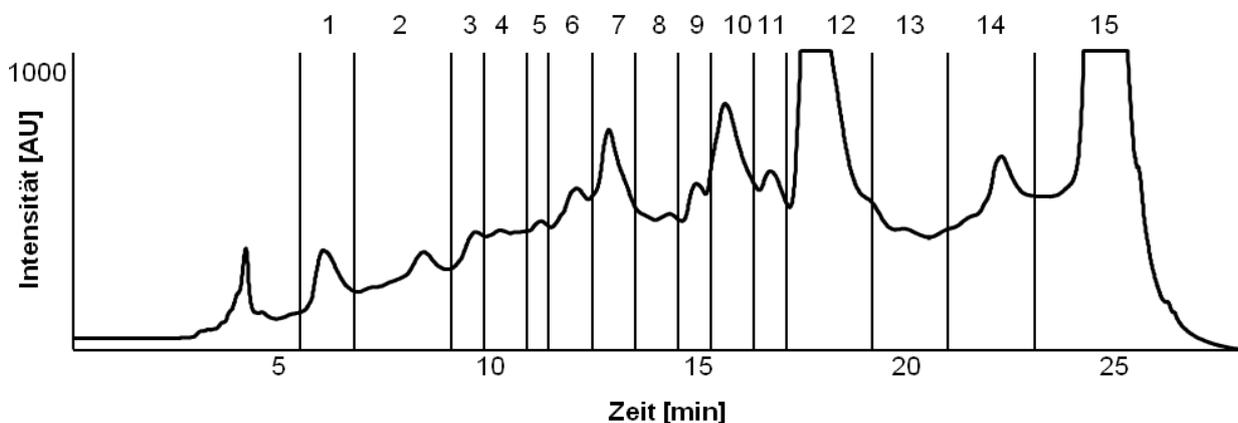


Abbildung 20: Präparatives HPLC-Chromatogramm der MPLC-Fraktion M4 ($\lambda = 220$; Gradient A 3.10.2.3) und deren Unterteilung in 15 Subfraktionen.

Fraktion M5 wurde mittels präparativer HPLC in 14 Subfraktionen unterteilt, dargestellt in Abbildung 21. Die 29 resultierenden präparativen HPLC Fraktionen wurden auf ihre Zusammensetzung mittels UPLC-ESI-TOF-MS analysiert und zur Isolierung der Markerverbindungen von AB2 (vgl. Abbildung 15) herangezogen.

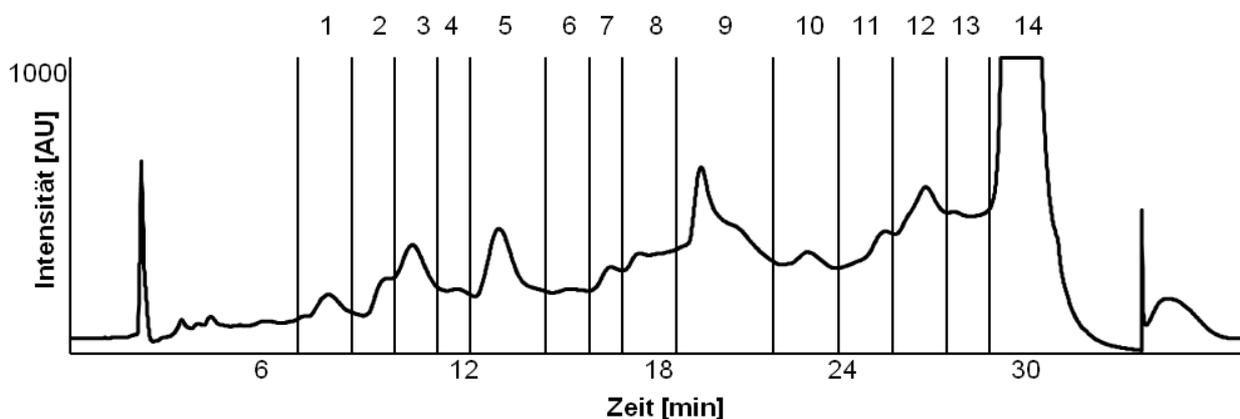


Abbildung 21: Präparatives HPLC-Chromatogramm der MPLC-Fraktion M5 ($\lambda = 220$; Gradient A 3.10.2.3) und deren Unterteilung in 14 Subfraktionen.

Isolierung des Markers m/z 487,1813

Das Molekülion m/z 487,1813 (Modus: ESI) zeichnete sich mit dem größten Beitrag zum Unterschied der Whiskys AB2 und SSM1 als signifikanter Marker mit sehr hoher Zuverlässigkeit aus. Der Abgleich der mithilfe der akkuraten Masse bestimmten Summenformel mit literaturbekannten Whisky- bzw. Holzbestandteilen ergab eine Übereinstimmung mit 3-Methyl-4-O-(6'-O-galloyl)- β -D-glucopyranosyloctansäure (**1**), einem Vorläufermolekül des geruchsaktiven Oaklactons (*Tanaka und Kuono, 1996*). Die Summenformeln von zwei weiteren Markersubstanzen, m/z 335,1710 und m/z 481,2285 (Modus: ESI), wiesen auf die Oaklacton-Vorstufen Oaklacton-Glucosid (**2**) und Oaklacton-Rutinosid (**3**) hin (*Hayasaka et al., 2007*).

Diese drei Metabolite (vgl. Abbildung 22) wurden aus den präparativen HPLC Fraktionen des Eichenholzextraktes in reiner Form isoliert, um sie eindeutig zu identifizieren. Ihre Strukturen wurden mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie analysiert.

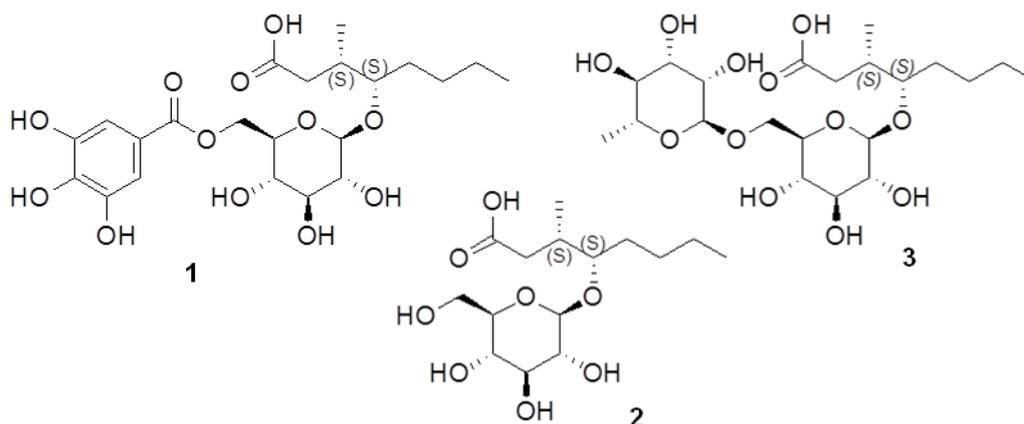


Abbildung 22: Strukturformeln von *cis*-Oaklacton-Galloylglucosid ((3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-*O*-(6'-*O*-galloyl)- β -*D*-glucopyranosyloctansäure) (1) isoliert aus Fraktion M5-9, von *cis*-Oaklacton-Glucosid ((3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-*O*- β -*D*-glucopyranosyloctansäure) (2) isoliert aus Fraktion M5-4 und *cis*-Oaklacton-Rutinosid ((3*S*,4*S*)-4-(6-*O*-(6-Deoxy- α -*L*-mannopyranosyl)-*D*-glucopyranosyloxy)-3-methyl-octansäure) (3) isoliert aus Fraktion M5-1.

cis-Oaklacton-Galloylglucosid (1)

Die Analyse der präparativen HPLC Fraktionen mittels UPLC-ESI-TOF-MS ergab, dass die Zielverbindung neben weiteren Substanzen in der HPLC-Fraktion M5-9 enthalten war. Daher wurde die Fraktion M5-9 mittels semipräparativer HPLC an RP-18-Säulenmaterial rechromatographiert, wodurch *cis*-Oaklacton-Galloylglucosid (1) mit einem Pseudomolekülion von m/z 487 (Modus: ESI) isoliert wurde (Gradient E 3.10.2.2). Im MS² Spektrum bestätigt das Fragmentierungsmuster Oaklacton-Glucosid (335 Da) und Gallussäure (169 Da) als Strukturbausteine (Abbildung 23). Vergleicht man die Fragmentationen mit Daten aus der Literatur von *Hayasaka et al.* (2007), so stimmen diese überein.

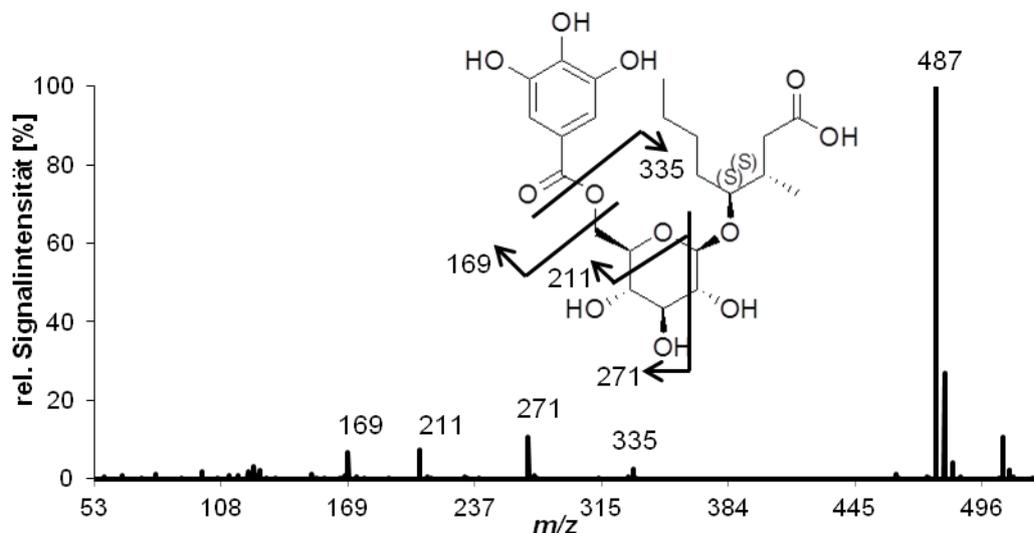


Abbildung 23: Fragmentierung des Oaklacton-Galloylglucosids im MS/MS-Spektrum (ESI neg) mit Pseudomolekülion m/z 487 und den Fragmentionen m/z 335, 271, 211 und 169.

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der untersuchten Substanz (vgl. Abschnitt 6) stimmen mit den veröffentlichten Daten von (3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-*O*-(6'-*O*-galloyl)- β -D-glucopyranosyloctansäure überein (Tanaka und Kuono, 1996; Masson et al., 2000). Die Kreuzsignale im HMBC-Spektrum liefern über die Long-range-Kopplungen Informationen über die Verknüpfung der Strukturbausteine. Der Ausschnitt des HMBC-Spektrums (Abbildung 24) zeigt die Korrelationen zwischen den Protonen H-C(6') und dem Kohlenstoffatom C(1'') sowie zwischen dem Proton H-C(1') und Kohlenstoffatom C(4). Das Dublett bei der chemischen Verschiebung von $\delta = 4,33$ ppm, das dem anomeren Proton H-C(1') zuzuordnen ist, bestätigt mit der dazugehörigen Kopplungskonstante von $^3J(\text{H,H}) = 7,8$ Hz, dass der Glucoserest in β -Konformation vorliegt. Überlagerungen der Protonensignale im Bereich von 3,50 – 3,61 ppm und 2,12 - 2,25 ppm verhindern die Bestimmung der absoluten Stereochemie an den Positionen C(4) und C(3), da eine exakte Bestimmung der Kopplungskonstanten nicht möglich war.

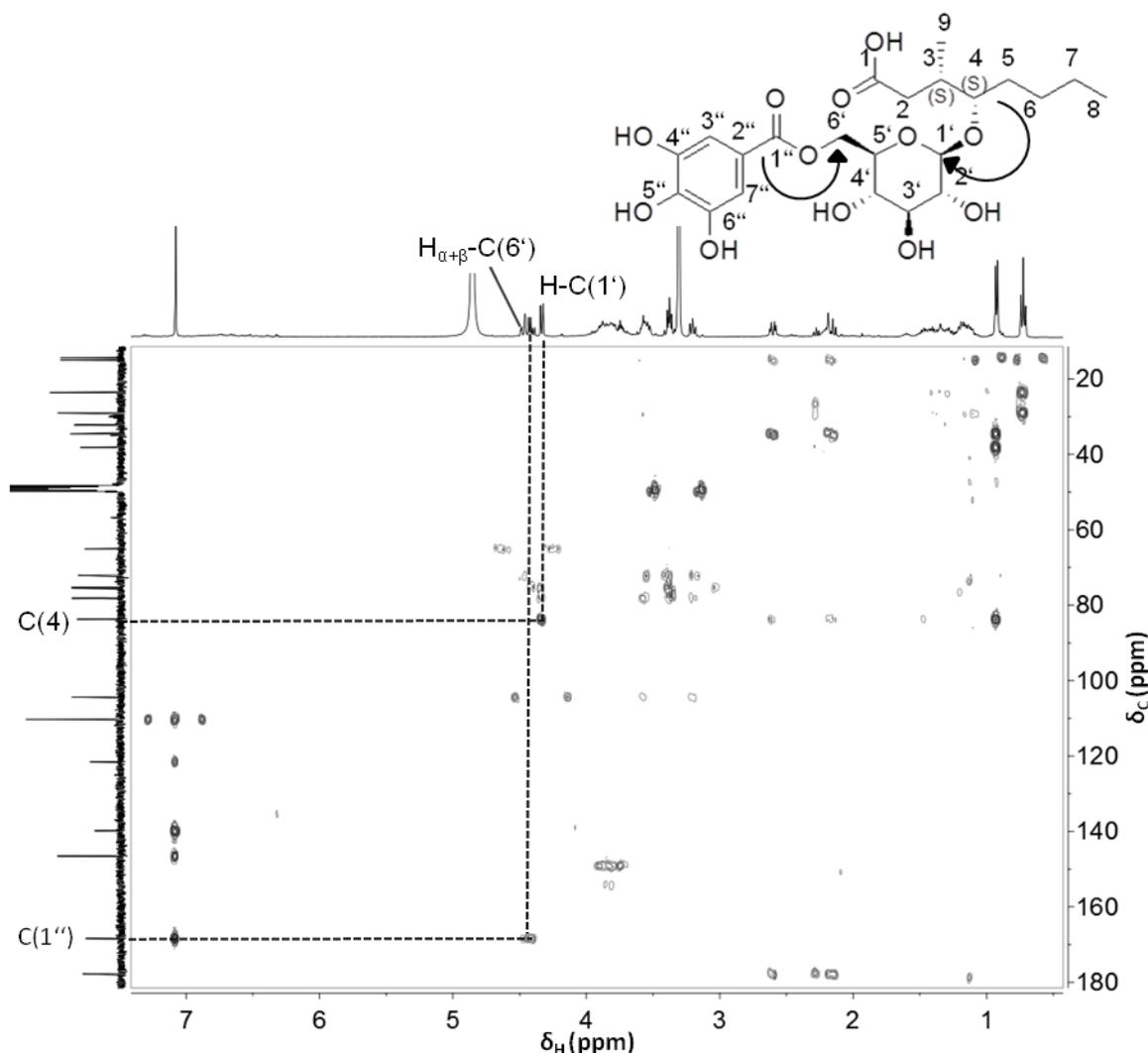


Abbildung 24: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum (500/125 MHz, 300 K, Methanol- d_4) von (3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-*O*-(6'-*O*-galloyl)- β -D-glucopyranosyloctansäure (1); mit den $^3J(\text{C,H})$ -Kopplungen, die die Verknüpfungen des Gallussäurerestes und des Glucoserestes zeigen.

Zur Aufklärung der absoluten Stereochemie der Oaklacton Präkursoren, wurde jeweils das aromaaktive Oaklacton mittels saurer Hydrolyse freigesetzt (vgl. Abbildung 25). Das Lacton wurde aus dem Reaktionsansatz extrahiert und nach Aufkonzentrierung mittels GC-MS aufgetrennt und detektiert. Referenzsubstanzen von *cis*- und *trans*-Oaklacton standen zur eindeutigen Identifizierung zur Verfügung.

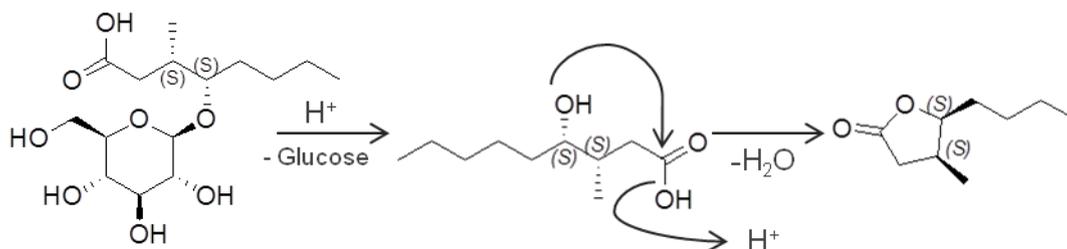


Abbildung 25: Beispiel für die Freisetzung des *cis*-(3S,4S)-Oaklactons (rechts) aus dem Vorläufermolekül Oaklacton-Glucosid (links) mittels saurer Hydrolyse.

Der Vergleich der GC-MS-Chromatogramme in Abbildung 26 verdeutlicht, dass es sich bei dem Vorläufermolekül um (3S,4S)-3-Methyl-4-O-(6'-O-galloyl)- β -D-gluco-pyranosyloctansäure handelt, da das freigesetzte Oaklacton (B) die gleiche Retentionszeit wie Referenzverbindung von *cis*-Oaklacton (A) von 21,5 min hat und bei der Hydrolyse keine Inversion der Konfiguration stattfindet (Masson *et al.*, 2001). Anhand der Massenspektren wird außerdem bestätigt, dass die freigesetzte Verbindung (C) das gleiche Fragmentierungsmuster wie das *cis*-Oaklacton (D) aufweist.

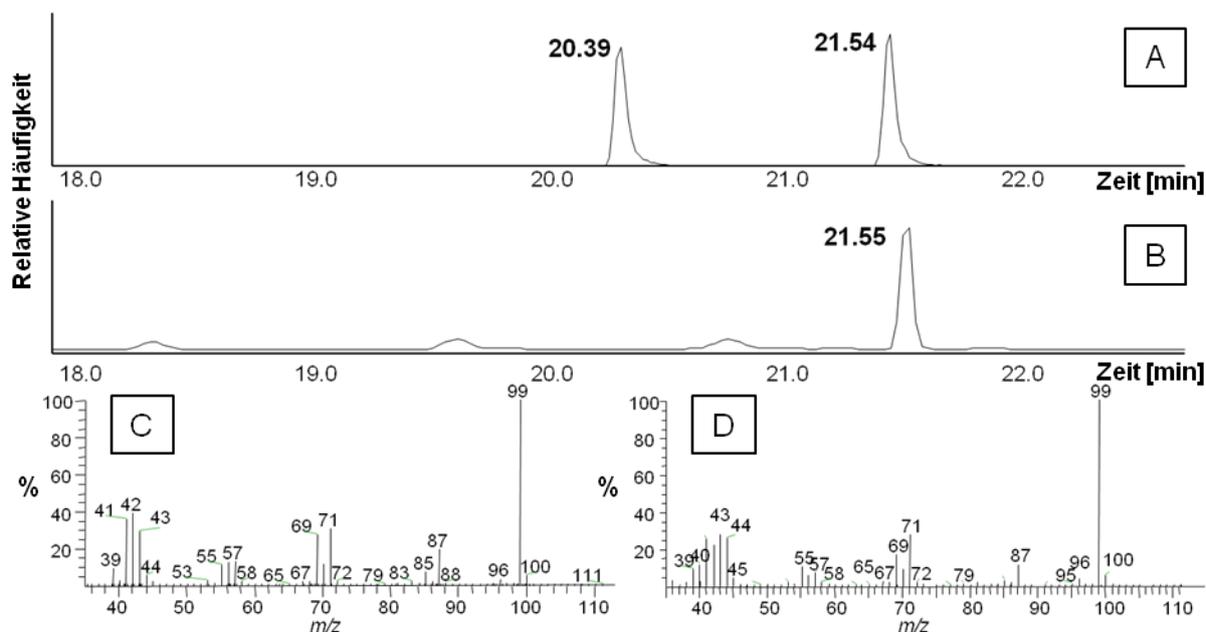


Abbildung 26: TIC-GC-MS-EI-Chromatogramme (Gradient 3.10.3 A) des Isomerengemisches der Referenzen *trans*-Oaklacton (20,39 min) und *cis*-Oaklacton (21,54 min) (A) und der nach saurer Hydrolyse von Oaklacton galloylglucosid freigesetzten Verbindung (21,55 min) (B). Extrahierte Massenspektren von dem nach Hydrolyse freigesetztem *cis*-Oaklacton (C) und der Referenzsubstanz (D).

cis-Oaklacton-Glucosid (2)

Mittels UPLC-ESI-TOF-MS wurde der Bourbonmarker mit dem Pseudomolekülion m/z 335,1710 (Modus: ESI⁻) in Fraktion M5-4 lokalisiert. Zur Isolierung von *cis*-Oaklacton-Glucosid (2) wurde diese Fraktion, die neben der Zielverbindung weitere Substanzen enthielt, mittels semipräparativer HPLC an RP-18-Säulenmaterial rechromatographiert (Gradient F 3.10.2.2). Vergleicht man die Fragmentationen im MS² (Abbildung 27) mit Daten aus der Literatur von *Hayasaka et al.* (2007), so stimmen diese überein.

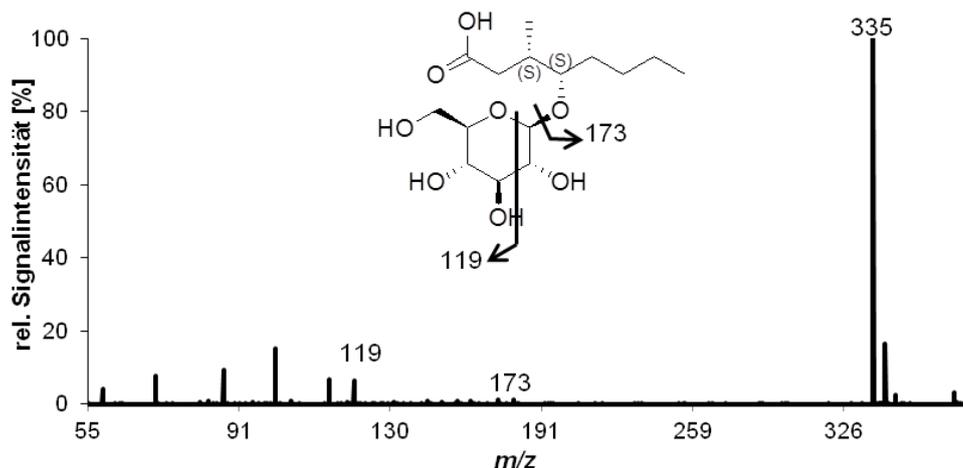


Abbildung 27: Fragmentierung des Oaklacton-Glucosids (2) im MS/MS-Spektrum (ESI neg) mit Pseudomolekülion m/z 335 und den Fragmentionen m/z 173 und 119.

¹H- und ¹³C-NMR-Daten (vgl. 6) der isolierten Reinsubstanz stimmen mit den Literaturdaten von (3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-*O*-β-D-glucopyranosyloctansäure überein (*Tanaka und Kuono*, 1996). Abbildung 28 zeigt einen Ausschnitt des Protonenspektrums. Das Dublett bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 4,33$ ppm ist dem anomeren Proton H-C(1') zuzuordnen. Die dazugehörige Kopplungskonstante von $^3J(\text{H,H}) = 7,8$ Hz deutet darauf hin, dass der Glucoserest in β-Konformation vorliegt.

Der dargestellte Ausschnitt des HMBC-Spektrums in Abbildung 29 zeigt das Kreuzsignal zwischen dem Proton H-C(1') und dem Kohlenstoffatom C(4) und verifiziert die O-glykosidische Bindung zwischen der β-D-Glucose-Einheit und der 3-Methyl-4-hydroxyoctansäure an Position C(4).

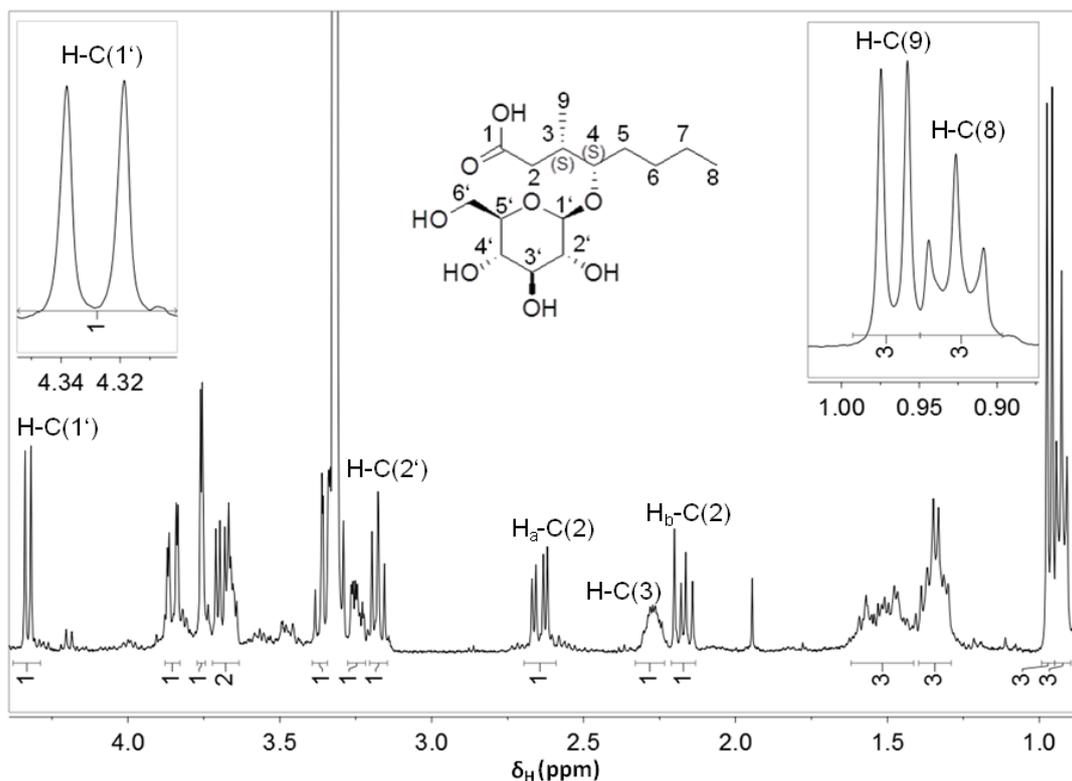


Abbildung 28: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von (3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-*O*- β -D-glucopyranosyloctansäure (2) (500 MHz, 300 K, Methanol- d_4) mit Vergrößerungen der Protonensignale bei 0,93 ppm (t), 0,97 ppm (d) und 4,33 ppm (d).

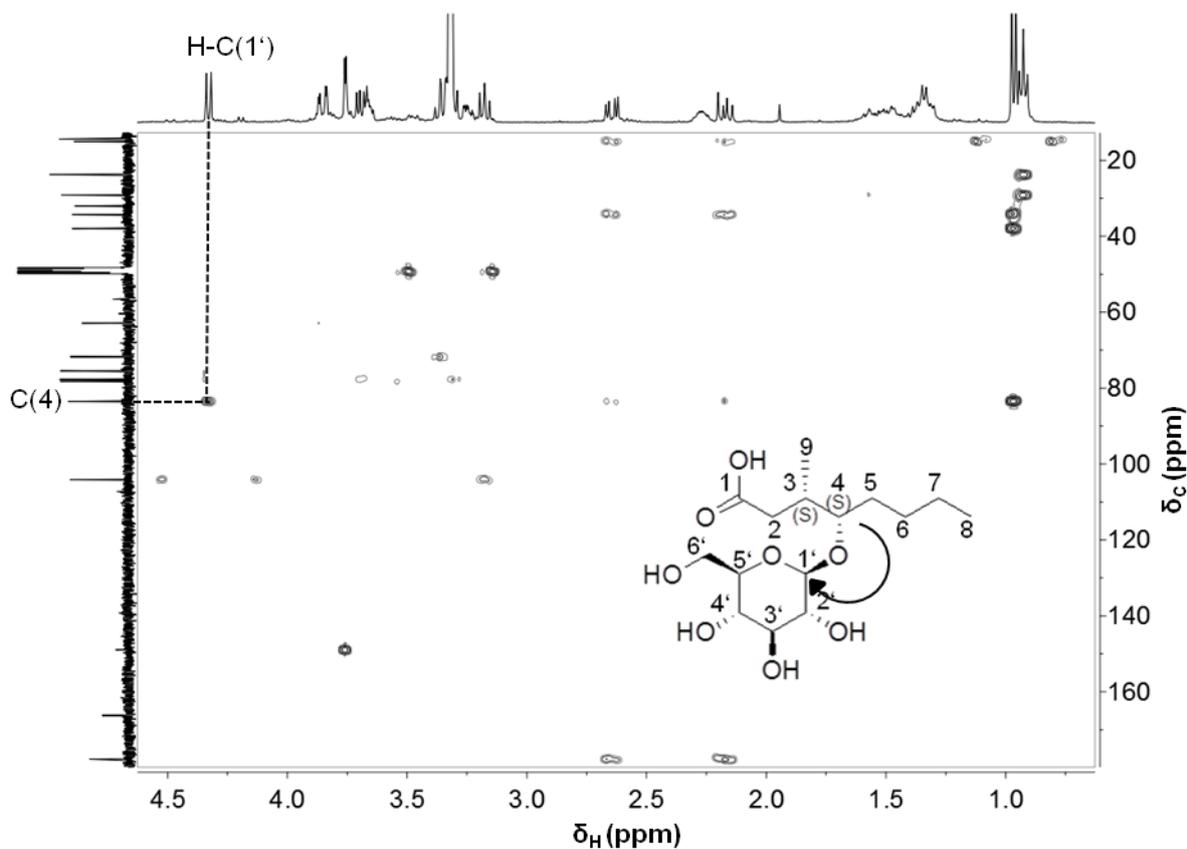


Abbildung 29: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von (3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-*O*- β -D-glucopyranosyloctansäure (2) (500/125 MHz, 300 K, Methanol- d_4).

Die relative Stereochemie der Protonen an den Positionen C(3) und C(4) konnte anhand der aufgenommenen NMR-Spektren nicht bestimmt werden, da die Multipllett-Struktur zu komplex zum Auslesen der Kopplungskonstanten war. Die Analyse mittels GC-MS nach saurer Hydrolyse des isolierten Oaklacton-Glucosids konnte Aufschluss über die Stereochemie des gebildeten Oaklactons geben. Der Vergleich mit den Referenzverbindungen, *cis*- und *trans*-Oaklacton, ermöglichte eine eindeutige Aussage über die Stereochemie der Verbindung. Somit bestätigen die GC-MS-Chromatogramme, dargestellt in Abbildung 30, die Freisetzung von *cis*-Oaklacton nach saurer Hydrolyse und (3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-*O*- β -D-glucopyranosyloctansäure (2) kann als Markerverbindung eindeutig identifiziert werden.

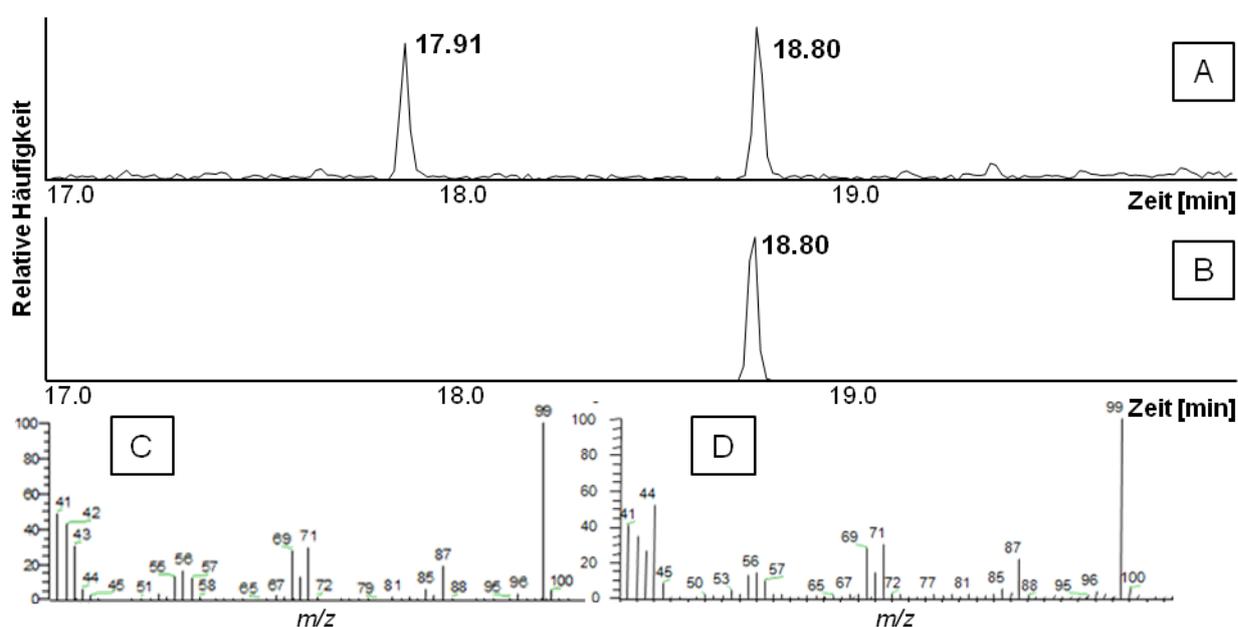


Abbildung 30: TIC-GC-MS-EI-Chromatogramme (Gradient 3.10.3 B) des Isomerengemisches der Referenzen *trans*-Oaklacton (17,91 min) und *cis*-Oaklacton (18,80 min) (A) und der nach saurer Hydrolyse von Oaklacton-Glucosid freigesetzten Verbindung (18,80 min) (B). Extrahierte Massenspektren von dem nach Hydrolyse freigesetztem Oaklacton (C) und der Referenzsubstanz (D).

cis-Oaklacton-Rutinosid (3)

In Fraktion M5-1 wurde mittels UPLC-ESI-TOF-MS der Bourbonmarker mit dem Pseudomolekülion m/z 481,2285 (Modus: ESI) lokalisiert. Um *cis*-Oaklacton-Rutinosid (3) in reiner Form als Referenzsubstanz zu isolieren, wurde Fraktion M5-1 mittels semipräparativer HPLC rechromatographiert (Gradient G 3.10.2.2). Die Fragmentationen im MS^2 (Abbildung 31) sind in Übereinstimmung mit den postulierten Daten von *Hayasaka et al.* (2007).

Abbildung 32 zeigt einen Ausschnitt des Protonenspektrums der isolierten Substanz. Von wichtiger Bedeutung für die Struktur sind die Kopplungskonstanten der Signale bei δ 5,51

($^3J(\text{H,H}) = 1,4 \text{ Hz}$) und $4,97 \text{ ppm}$ ($^3J(\text{H,H}) = 7,7 \text{ Hz}$), die den Protonen H-C(1'') und H-C(1') zuzuordnen sind. Sie bestätigen die α -Konformation der Rhamnose-Untereinheit (H-C(1'')) und die β -Konformation des Glucose-Bausteins (H-C(1')).

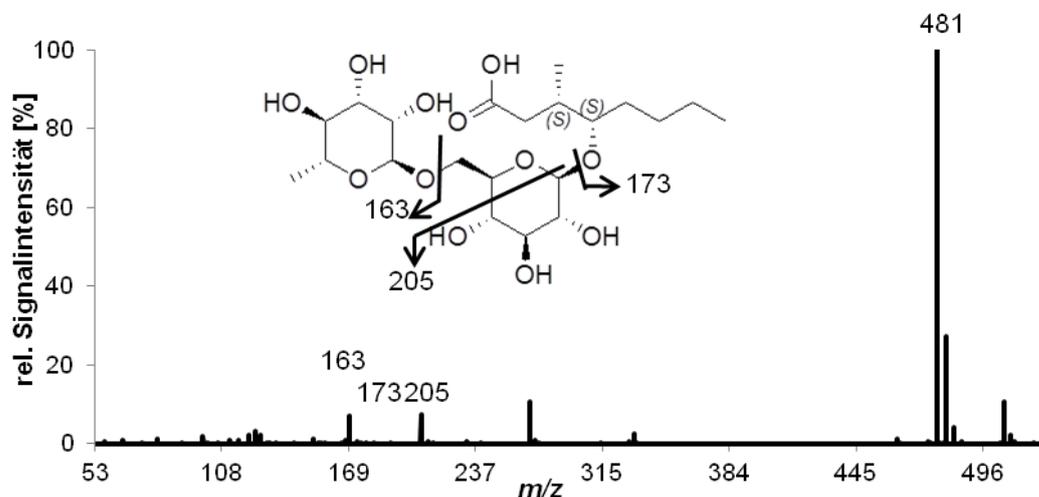


Abbildung 31: Fragmentierung des Oaklacton rutosids (3) im MS/MS-Spektrum (ESI neg) mit Pseudomolekülion m/z 481 und den Fragmentationen m/z 205, 173, und 163.

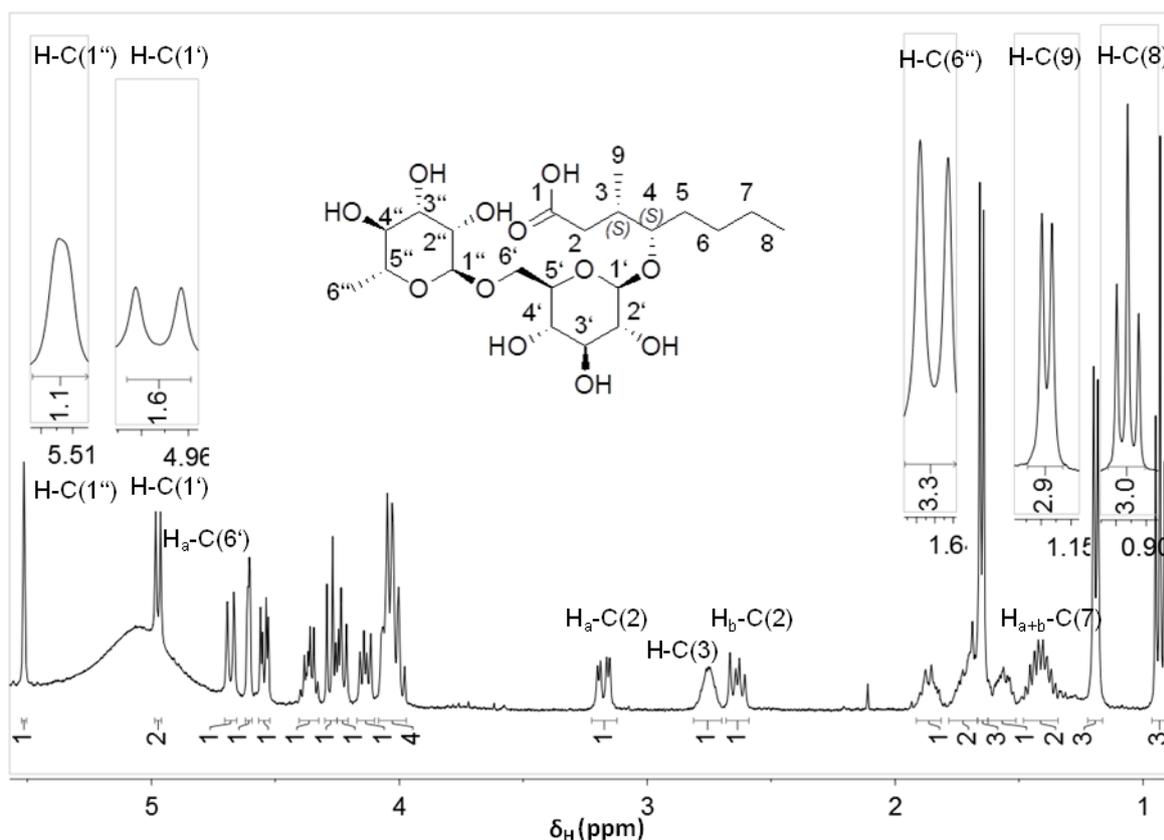


Abbildung 32: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von (3S,4S)-4-(6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyloxy)-3-methyl-octansäure (3) (500 MHz, 300 K, Pyridin- d_5) mit Vergrößerungen der Protonensignale bei 0,93 ppm (t), 1,19 ppm (d), 1,65 ppm (d), 4,97 ppm (d) und 5,51 ppm (d).

Die Kreuzsignale im HMBC-Spektrum (vgl. Abbildung 33) des Protons H-C(1') mit dem Kohlenstoffatom C(4) und der Protonen H-C(6') mit dem Kohlenstoffatom C(1'') bestätigen die 1'-O-glykosidische Verknüpfungen des Glucoserestes mit C(4) der 3-Methyl-4-hydroxy-octansäure und der 6'→1''-O-glykosidische Verknüpfungen mit der Rhamnose.

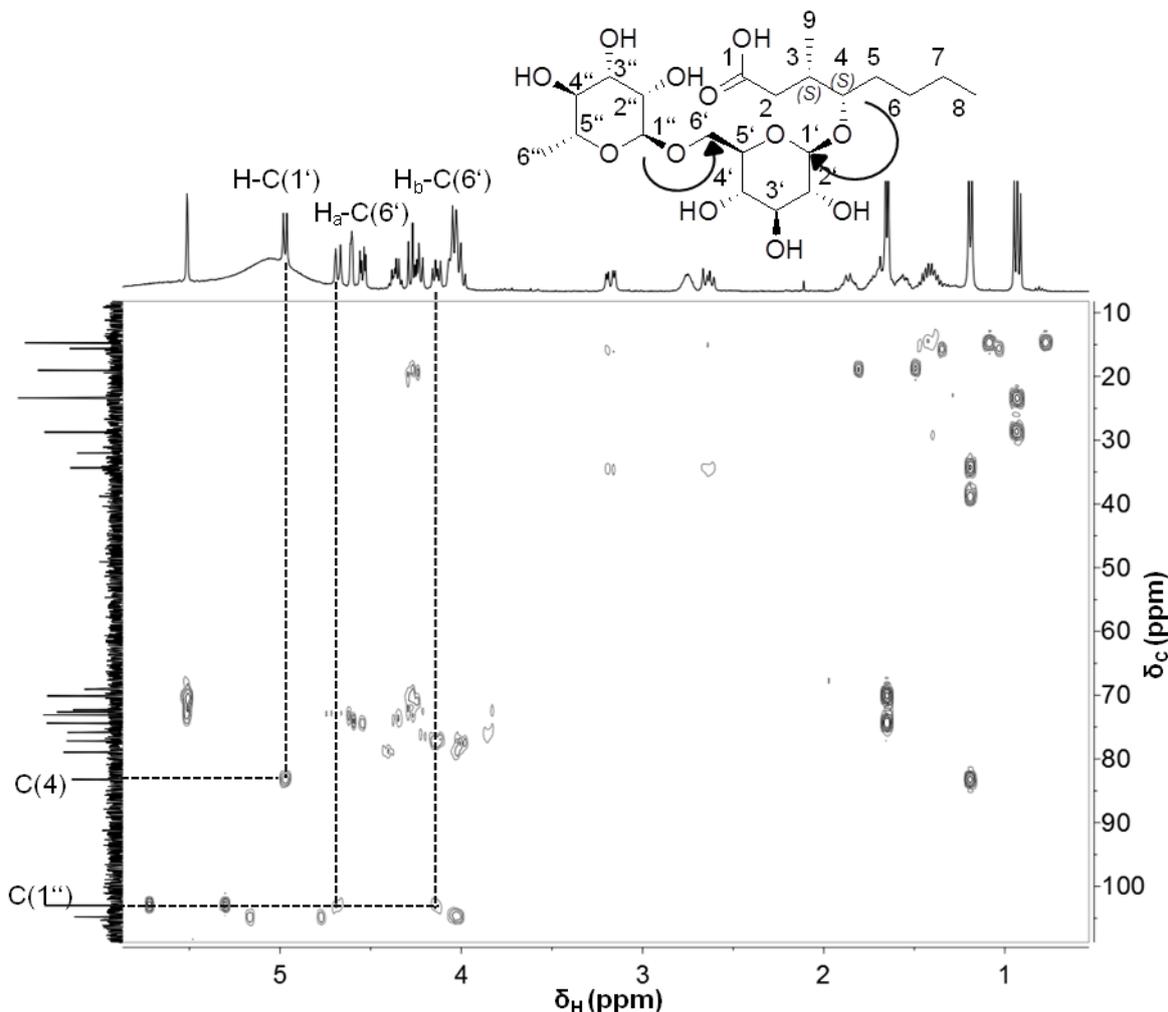


Abbildung 33: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von (3*S*,4*S*)-4-(6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyloxy)-3-methyl-octansäure (3) (500/125 MHz, 300 K, Pyridin- d_5); mit den $^3J(C,H)$ -Kopplungen, die die Verknüpfungen des Rhamnose- und des Glucoserestes aufzeigen.

Zur Absicherung der absoluten Stereochemie wurde das flüchtige Lacton des Oaklacton-Rutinosids durch saure Hydrolyse freigesetzt, aus dem Reaktionsansatz mit Dichlormethan extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Der Vergleich der Retentionszeiten des Hydrolyseprodukts mit den Referenzsubstanzen (3*S*,4*S*)- und (3*S*,4*R*)-Oaklacton ermöglichte eindeutige Rückschlüsse auf die Molekülstruktur, da das *cis*-Isomer aus dem Präkursor-Molekül freigesetzt wurde. Bei der Markersubstanz handelt es sich folglich um (3*S*,4*S*)-4-(6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyloxy)-3-methyl-octansäure.

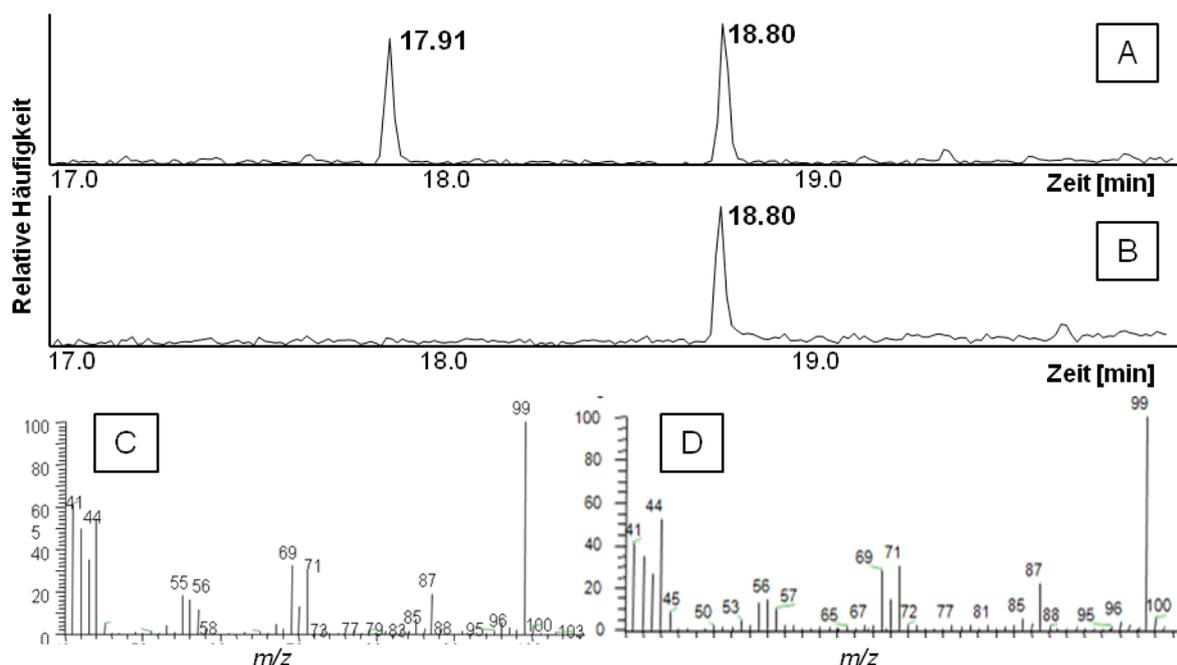


Abbildung 34: TIC-GC-MS-EI-Chromatogramme (Gradient 3.10.3 B) des Isomerengemisches der Referenzen *trans*-Oaklacton (17,91 min) und *cis*-Oaklacton (18,80 min) (A) und des nach saurer Hydrolyse von Oaklacton-Rutinosid freigesetzten Verbindung (18,80 min) (B). Extrahierte Massenspektren von dem nach Hydrolyse freigesetztem Oaklacton (C) und der Referenzsubstanz (D).

Identifizierung der Markermetabolite m/z 419,1703 und m/z 551,2128

Weitere Markerverbindungen des Bourbon AB2 konnten aufgrund ihrer berechneten Summenformeln der Stoffklasse der Lignane und Neolignane zugeordnet werden. So wurde eine Übereinstimmung mit Lyoniresinol (**4**) durch Vergleich der akkuraten Masse und der berechneten Summenformel mit Daten aus der Literatur festgestellt (m/z 419,1703; Modus: ESI⁻). Dieses Syringyl-Lignan wurde bereits aus *Quercus petraea* isoliert (Dada et al., 1989). Nabeta et al. (1987) beschrieben die Verbindung als Hauptpolyphenol in Brandy, während es Koga et al. (2007) und Fujieda et al. (2008) auch in Whisky nachweisen konnte. Weiterhin wurden auch Derivate dieses Tetrahydronaphtalen-Lignans identifiziert. Zum einen handelte es sich dabei um Glykoside des Lyoniresinols wie z.B. (+)-Lyoniresinol-9'-O- β -D-glucosid (**7**), Lyonisid (**5**) und Nudiposid (**6**), zum anderen um Ester wie z.B. (+)-Lyoniresinol-9-O-gallat (**8**) (Marchal et al., 2014; Dada et al., 1989; Miyamura et al., 1983; Ogawa und Ogihara, 1976). Die Metabolite (**4** – **8**, vgl. Abbildung 35) wurden mittels präparativer HPLC aus dem Eichenholzextrakt in reiner Form isoliert, um sie eindeutig identifizieren zu können. Die Strukturen wurden mittels hochauflösender Massenspektrometrie, NMR- und CD-Spektroskopie verifiziert.

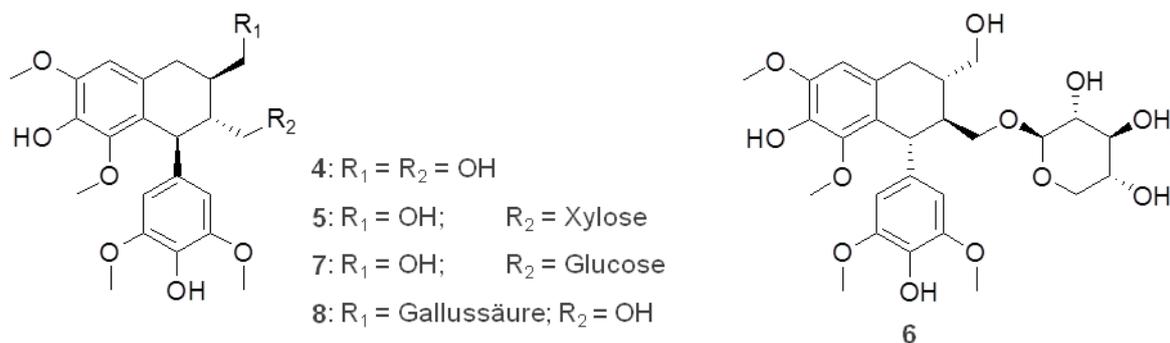


Abbildung 35: Strukturübersicht der identifizierten Derivate des (+)-Lyoniresinols (4), isoliert aus Fraktion M5-5, Lyonisid (5) und Nudiposid (6) isoliert aus Fraktion M4-10, (+)-Lyoniresinol-9'-O- β -D-glucosid (7) isoliert aus Fraktion M4-7 und (+)-Lyoniresinol-9-O-gallat (8) isoliert aus Fraktion M5-12.

Lyoniresinol (4)

Zur Isolierung des Markers Lyoniresinol (4) wurden die HPLC-Fractionen M4-12 und M5-5 mittels semipräparativer HPLC rechromatographiert (Gradient A 3.10.2.2). ¹H- und ¹³C-NMR-Daten (vgl. Abschnitt 6) stimmten mit den Daten aus der Literatur (*Li und Seeram, 2010; Rahmann et al., 2007; Dadá et al., 1989; Vecchiatti et al., 1979*) überein. Der dargestellte Ausschnitt des HMBC-Spektrums in Abbildung 36 zeigt die ³J-Kopplungen zwischen den Protonen H-C(2'), H-C(6') und H-C(9') mit dem Kohlenstoffatom C(7'). Außerdem ist die ²J-Kopplung von H-C(8') zu C(7') zu sehen und graphisch hervorgehoben. Eine Bestimmung der relativen Stereochemie an den drei Chiralitätszentren C(8), C(8') und C(7') war mit Hilfe der vorliegenden NMR-Spektren aufgrund komplexer, sich überlappender Multipllett-Strukturen nicht möglich. Um weitere Einblicke in die Stereochemie der vorliegenden Markerverbindung zu erhalten, wurde die CD-Spektroskopie herangezogen. Die CD-spektroskopischen Daten (vgl. Abbildung 37 und Tabelle 8) der isolierten Substanz stimmten mit denen der Literatur für (+)-Lyoniresinol überein (*Dadá et al., 1989*). Es sind zwei Maxima bei 244 und 271 nm sowie ein Minimum bei 287 nm zu erkennen. Die Positionen C(8) und C(8') sind (*R*)-konfiguriert, während Position C(7') (*S*)-konfiguriert vorliegt.

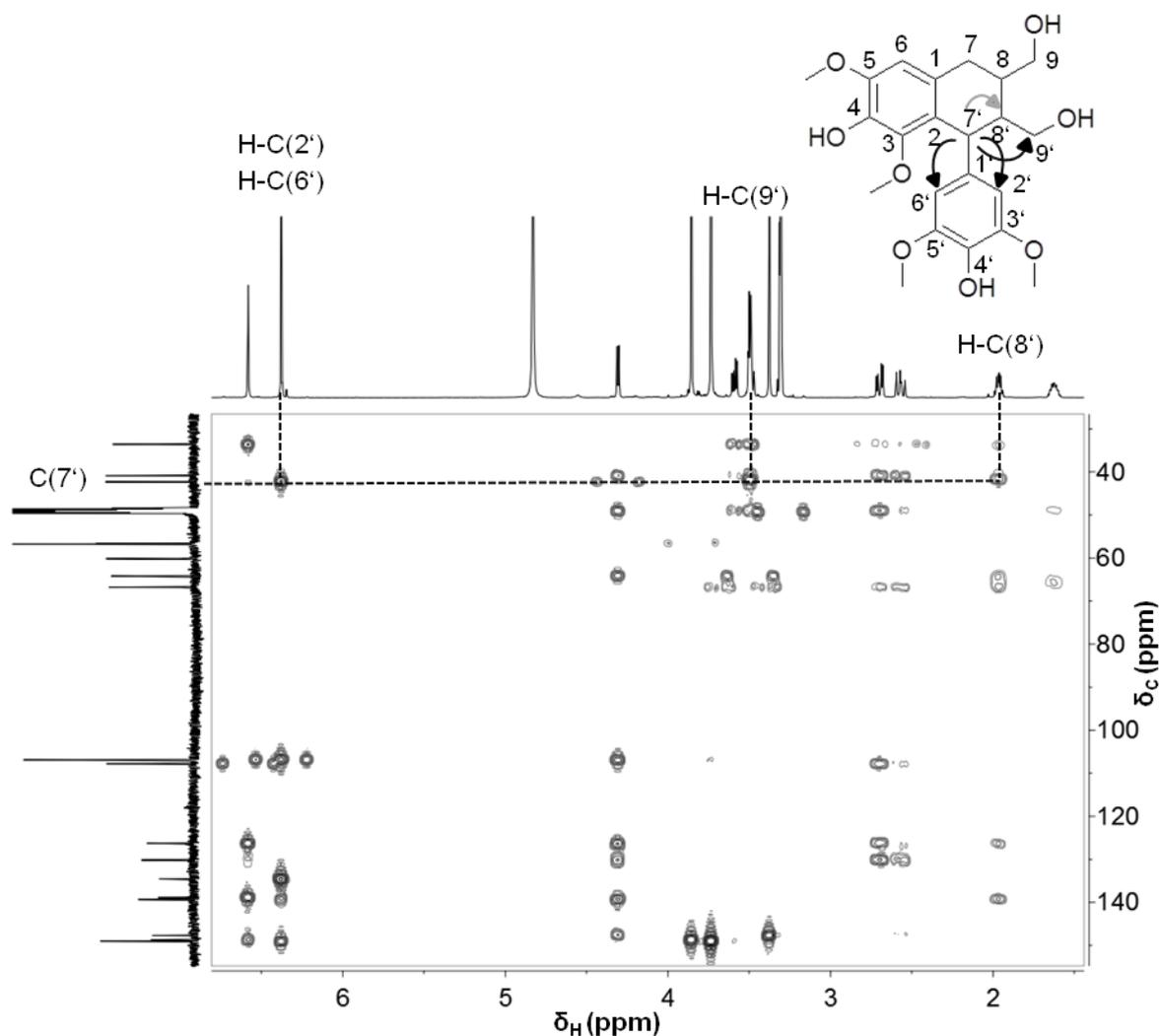


Abbildung 36: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Lyoniresinol (4) (500/125 MHz, 300 K, Methanol-d₄); mit den ²J(C,H)- und ³J(C,H)-Kopplungen der Position C(7').

Tabelle 8: Vergleich der CD-spektroskopischen Daten der eigenen Messung von (+)-Lyoniresinol (in MeOH) mit den Werten der Literatur (*Dada et al.*, 1989).

	Dada et al. (1989)	Eigene Messung
Konzentration [mM]	2,38 x 10 ⁻⁴	2,38 x 10 ⁻³
[θ] ²⁵ [deg*cm ² /mol (nm)]	- 396 (285)	- 2600 (287)
	+ 1650 (274)	+ 9900 (271)
	+ 6732 (244)	+ 35400 (244)

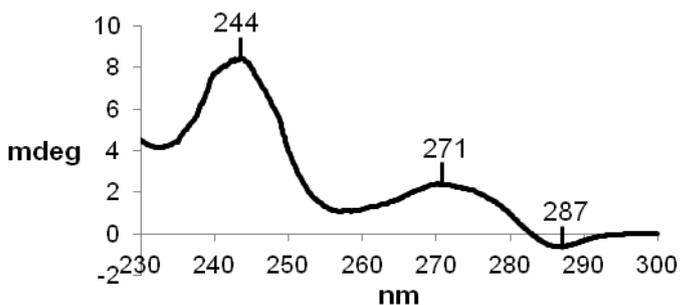


Abbildung 37: gemessenes CD-Spektrum von Lyoniresinol (4) (MeOH, vgl. 3.11.4).

Lyonisid (5) und Nudiposid (6)

Die diastereomeren Verbindungen Lyonisid (5) und Nudiposid (6) mit dem Pseudomolekülion m/z 551,2125 (Modus: ESI) konnten aus Fraktion M4-10 isoliert werden. Eine semipräparative Rechromatographie mittels HPLC (Gradient B 3.10.2.2) ermöglichte eine Separierung der Isomere, deren Fragmentierungsmuster im Massenspektrometer keine Unterschiede aufwiesen (vgl. Abbildung 38). Das Fragmention m/z 419 weist auf Lyoniresinol als Strukturbaustein hin, da dieses durch Abspaltung eines Pentoserestes (132 Da) gebildet wird und bestätigt die vermutete Struktur eines Lyoniresinol-Glykosids. ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (Daten vgl. 6) verifizieren Lyoniresinol als Strukturbaustein. Die Kopplungskonstante $^3J(\text{H,H}) = 7,6$ Hz des Dubletts bei δ 4,23 ppm (H-C1'') aus dem ^1H -Spektrum (vgl. Abbildung 39) gibt den Hinweis auf eine glycosidisch gebundene Pentose in β -Konformation. Der Abgleich der NMR-Signale der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit Literaturdaten zeigt eine Übereinstimmung für beide Metabolite (Marchal *et al.*, 2014).

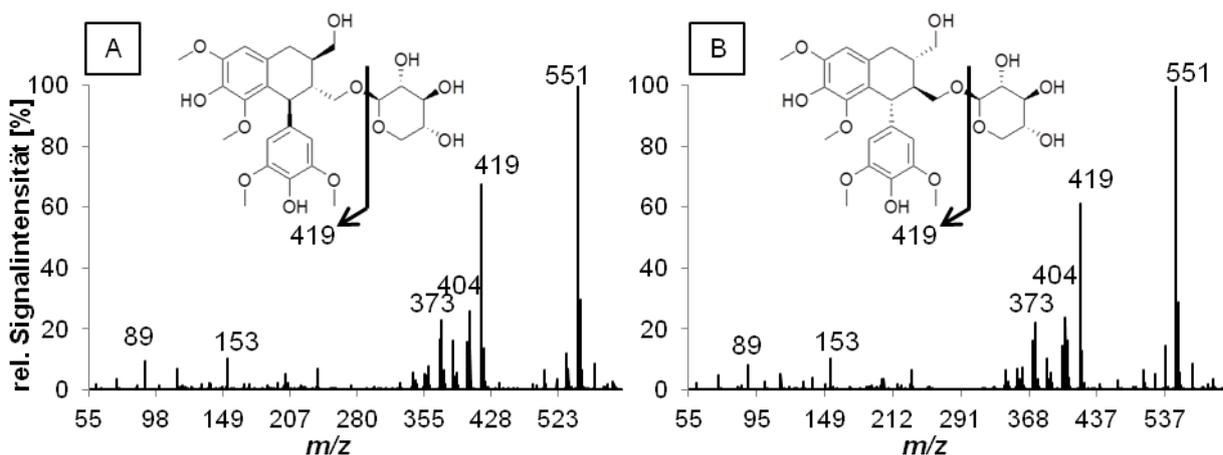


Abbildung 38: Fragmentierung des Lyonisids (5) (A) und des Nudiposids (6) (B) im MS/MS-Spektrum (ESI neg) mit dem Pseudomolekülion m/z 551 und dem Hauptfragmention m/z 419.

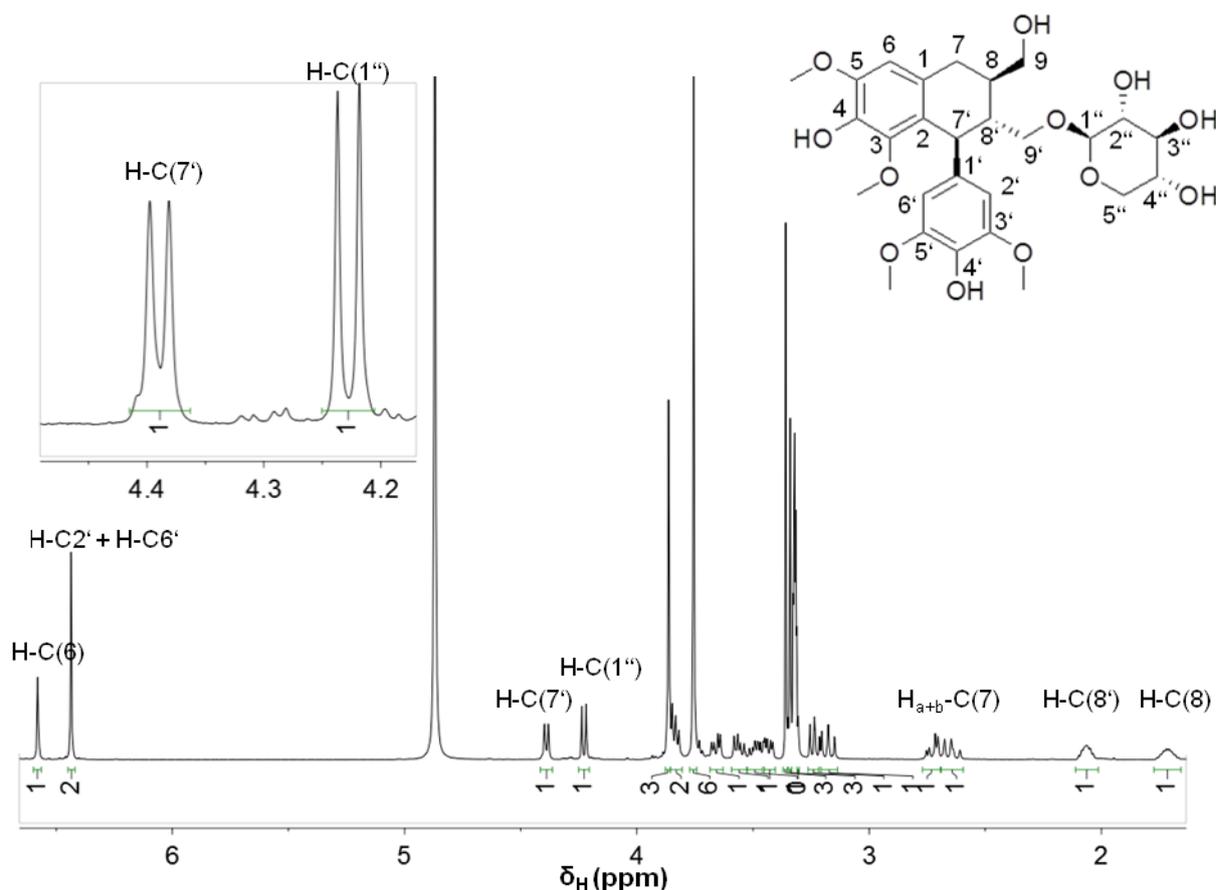


Abbildung 39: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von Lyonisid (**5**) (400 MHz, 298 K, Methanol-d₄) mit Vergrößerungen der Protonensignale bei δ 4,23 ppm (d) und 4,39 ppm (d).

Um die Position zu bestätigen, an welcher die Pentose am Lyoniresinol-Rest gebunden ist, zeigt der in Abbildung 40 dargestellte Ausschnitt des HMBC-Spektrums des Lyonisids die Korrelationen zwischen den Wasserstoffatomen H-C(1'') und H-C(7') mit dem Kohlenstoffatom C(9'). Nudiposid weist die gleiche Verknüpfung auf (nicht graphisch dargestellt). Abbildung 41 zeigt die generierten CD-Spektren der beiden Verbindungen mit dem Molekülion *m/z* 551.2125. Die Daten stimmen mit den in der Literatur von *Ogawa und Ogihara* (1976) beschriebenen Verbindungen Lyonisid und Nudiposid überein. Sie illustrieren anhand der spiegelbildlichen Spektren deutlich den Unterschied der Diastereomere in ihren enantiomeren Aglykonen. Die beiden CD-Spektren zeigen analog dem Lyoniresinol zwei Maxima bei 244 und 273 nm sowie ein Minimum bei 287 nm (Abbildung 41). Bei Lyonisid (**5**), das (+)-Lyoniresinol als Strukturbaustein enthält, sind die Positionen C(8) und C(8') (*R*-konfiguriert, während Position C(7') (*S*-konfiguriert vorliegt. Dagegen ist beim Nudiposid (**6**) die Xylose 1''-O-glykosidisch an (-)-Lyoniresinol gebunden und die Positionen C(8) und C(8') (*S*-konfiguriert sowie Position C(7') (*R*-konfiguriert.

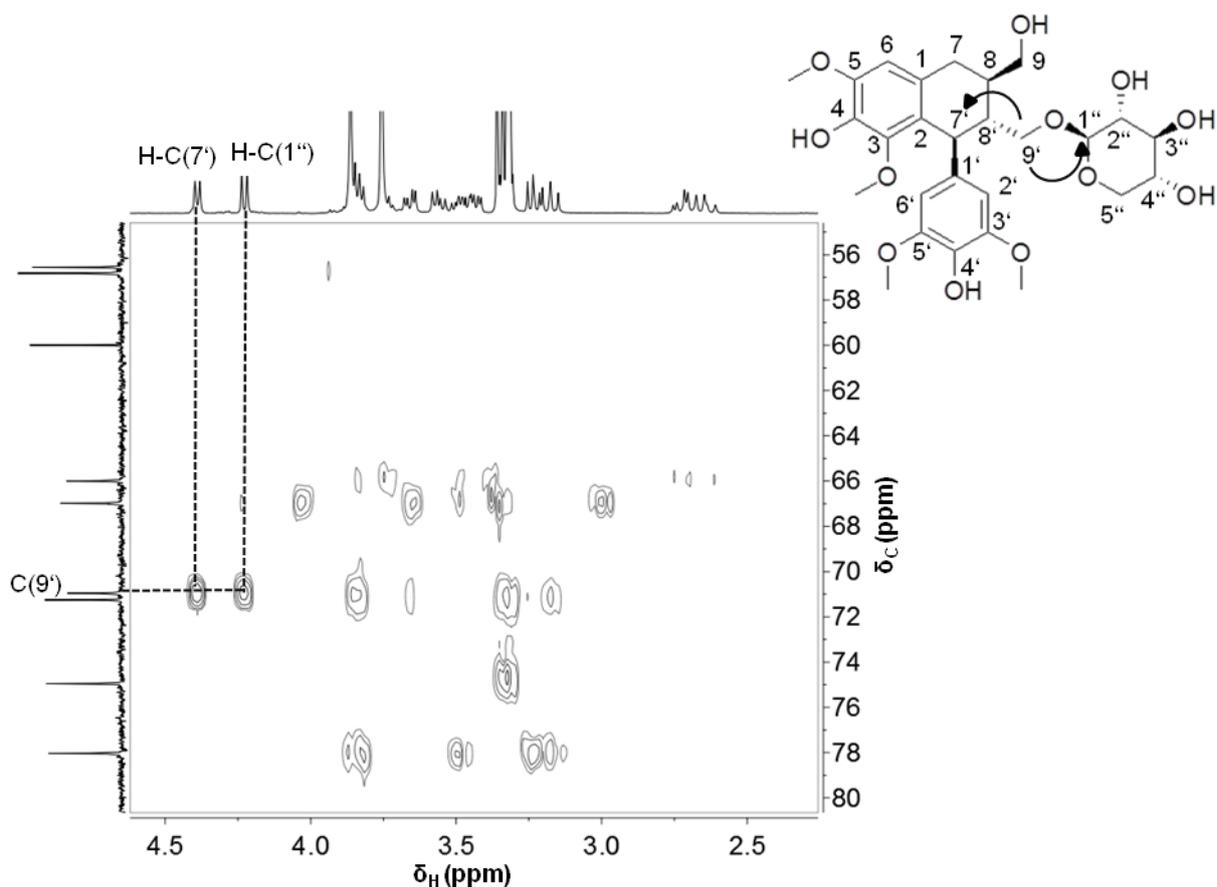


Abbildung 40: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Lyonisid (5) (400 MHz, 298 K, Methanol- d_4); mit den $^3J(C,H)$ -Kopplungen, die die Verknüpfungen des Xyloserestes an C(9'') aufzeigen.

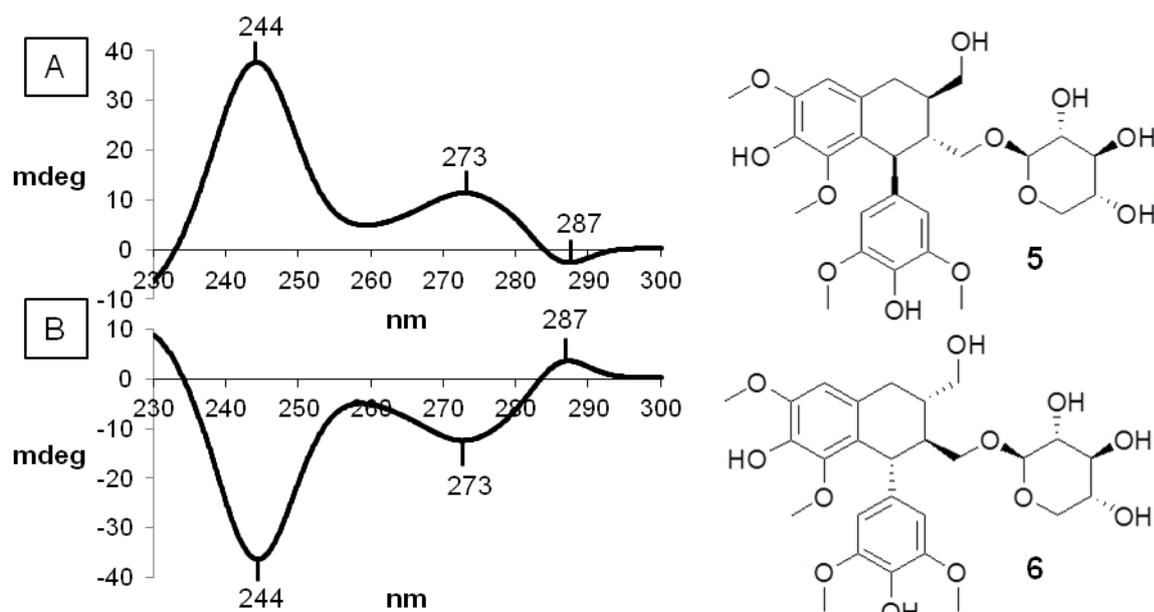


Abbildung 41: CD-Spektren von Lyonisid (5) (A) und Nudiposid (6) (B) (MeOH; vgl. 3.11.4)

(+)-Lyoniresinol-9'-O- β -D-glucosid (7)

Eine weiteres Lyoniresinolglykosid mit dem Pseudomolekülion m/z 581,2235 (Modus: ESI⁻) konnte aus HPLC-Fraktion M4-7 isoliert werden. Eine Rechromatographie an RP-18-Material erfolgte mittels semipräparativer HPLC (Gradient C 3.10.2.2). Das Fragmentierungsmuster, dargestellt in Abbildung 42, zeigt nach der Abspaltung von 162 Da ein Fragmentation mit m/z 419 (Modus: ESI⁻) und verweist auf Lyoniresinol als Teil der Molekülstruktur. Die Abspaltung von 162 Da deutet auf den Verlust einer Hexose-Einheit hin. In der Literatur (*Marchal et al.*, 2014, *Miyamura et al.* 1983, *Dadá et al.* 1989) ist diese Verbindung bereits beschrieben und der Abgleich der NMR-Daten (vgl. 6) bestätigt die Molekülstruktur von Lyoniresinol-9'-O- β -D-glucosid. Neben den Signalen des Aglycons Lyoniresinol können die zusätzlichen Signale der β -D-Glucose eindeutig zugeordnet werden. Die Verknüpfung des Zuckers mit Lyoniresinol ist analog der Marker Lyonisid (**5**) bzw. Nudiposid (**6**) an Position C(9').

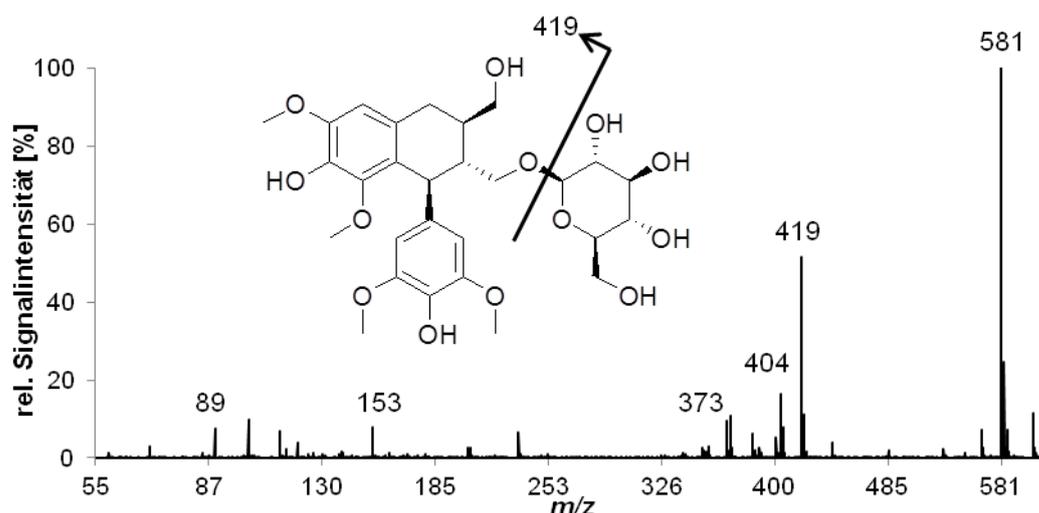


Abbildung 42: Fragmentierung des (+)-Lyoniresinol-9'-O- β -D-glucosids (7) im MS/MS-Spektrum (ESI neg) mit Pseudomolekülion m/z 581 und dem Fragmention m/z 419.

Zur Klärung der absoluten Stereochemie an den Positionen C(7'), C(8') und C(9') wurden CD-Experimenten durchgeführt. Die generierten Daten (vgl. Abbildung 43) zeigen vergleichbare Extrema bei 244, 273 und 287 nm von (+)-Lyoniresinol (**4**) (vgl. Abbildung 37) und von Lyonisid (**5**) (vgl. Abbildung 41). Die Positionen C(8) und C(8') liegen (*R*)-konfiguriert vor, während Position C(7') (*S*)-konfiguriert ist. Die isolierte Substanz konnte somit als (+)-Lyoniresinol-9'-O- β -D-glucosid identifiziert werden.

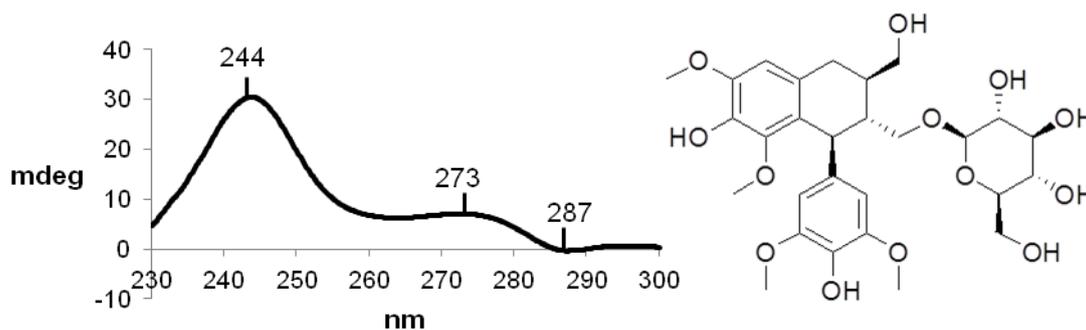


Abbildung 43: CD-Spektrum von (+)-Lyoniresinol-9'-O-β-D-glucosid (7) (MeOH; vgl. 3.11.4)

(+)-Lyoniresinol-9-O-gallat (8)

Neben den Glykosiden des Lyoniresinols gelang es auch einen Ester dieses Lignans mit dem Pseudomolekülion m/z 571,1815 (Modus: ESI⁻) aus den HPLC-Fractionen zu isolieren. Hierzu wurde Fraktion M5-12 nochmals mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt (Gradient D 3.10.2.2). Die Verifizierung der Molekülstruktur erfolgte anhand von MS-, NMR- und CD-Experimenten. Das Fragmentierungsmuster, dargestellt in Abbildung 44, zeigt ein Fragmentierung mit m/z 169 (ESI_{neg}), das, wie auch von *Marchal et al.* (2014) beschrieben, auf die Anwesenheit eines Gallussäurerestes hinweist.

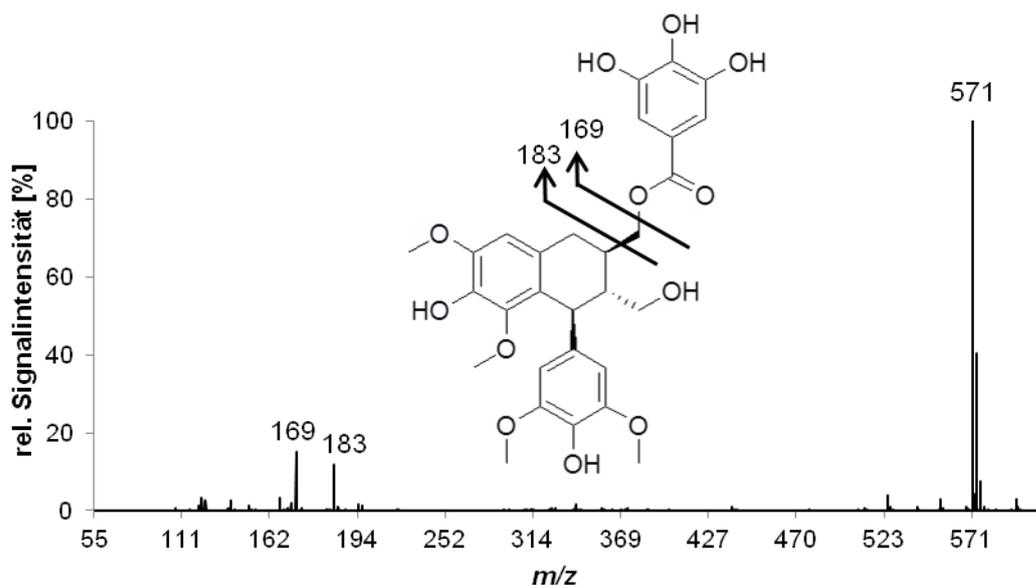


Abbildung 44: Fragmentierung des (+)-Lyoniresinol-9-O-gallats (8) im MS/MS-Spektrum (ESI^{neg}) mit Pseudomolekülion m/z 571 und den Fragmentionen m/z 169 und 183.

Vergleicht man die chemischen Verschiebungen der Protonen- und Kohlenstoff-Signale in den 1D-NMR-Spektren (vgl. 6) dieses Esters mit den Daten des Lyoniresinols (4), so kann Letzteres als Strukturbestandteil bestätigt werden. Zur Bestimmung der Hydroxyl-Gruppe, an der die Gallussäure verestert ist, wird das HMBC-Spektrum betrachtet. Abbildung 45 zeigt

den Ausschnitt des HMBC-Spektrums, der bestätigt, dass die Gallussäure mit der Hydroxyl-Gruppe an C(9) des Lyoniresinols verestert ist.

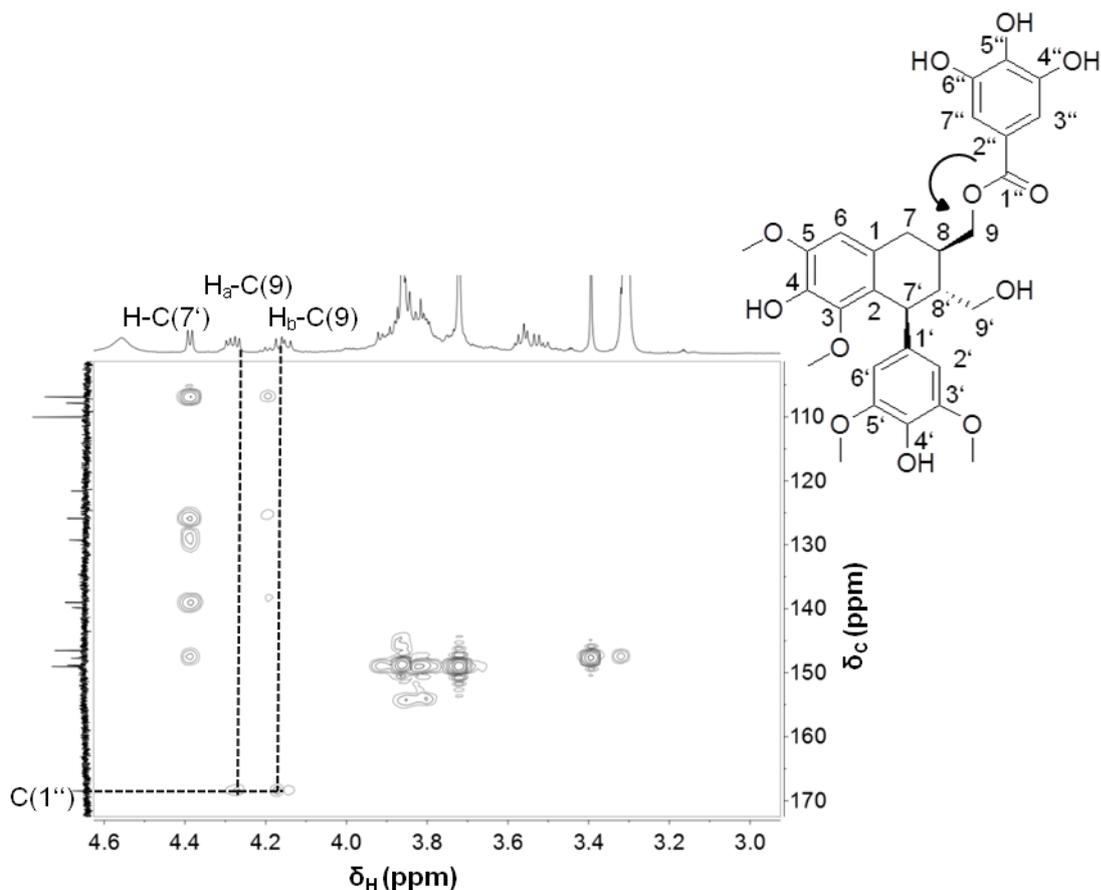


Abbildung 45: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Lyoniresinol-9-O-gallat (**8**) (500/125 MHz, 300 K, Methanol- d_4) mit den $^3J(C,H)$ -Kopplungen, die die Verknüpfungen des Gallussäurerestes an C(9) aufzeigen.

Die absolute Stereochemie der chiralen Kohlenstoffatome von Lyoniresinol-9-O-gallat wird mit Hilfe von CD-Spektroskopie bestimmt. Das Spektrum in Abbildung 46 zeigt im Vergleich mit den Messungen der vorangegangenen Lyoniresinolderivate (vgl. Abbildung 37, Abbildung 41 und Abbildung 43), dass es sich um (+)-Lyoniresinol-9-O-gallat (**8**) handelt, da die Positionen C(8) und C(8') (*R*)-konfiguriert und C(7') (*S*)-konfiguriert vorliegen.

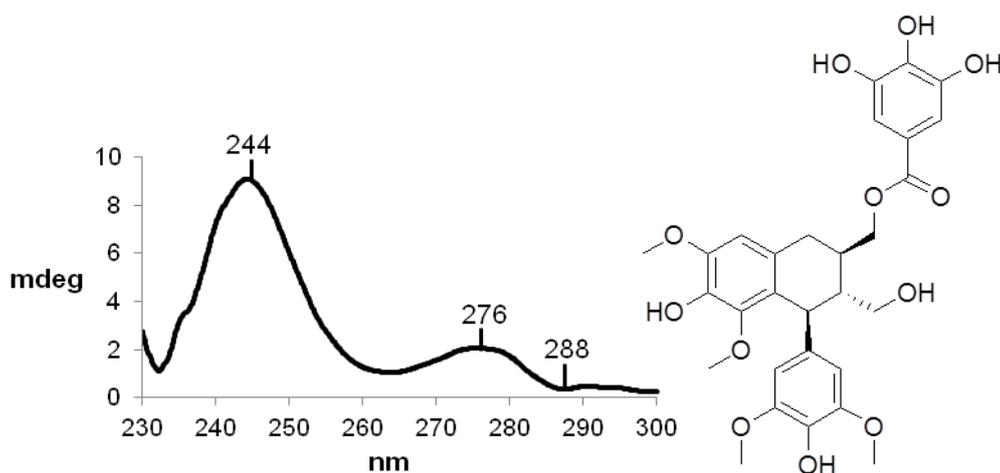


Abbildung 46: CD-Spektrum von (+)-Lyoniresinol-9-O-gallat (8) (MeOH; vgl. 3.11.4)

2.2.4 Diskussion

Um die sensorisch beobachteten Unterschiede verschiedener Whiskysorten auf molekularer Ebene zu klären, wurde ein *Metabolic Profiling* durchgeführt. Diese ungerichtete Metabolomanalyse mittels UPLC-ESI-TOF-MS ermöglichte eine umfangreiche Erfassung von Metaboliten, eine ergebnisoffene Analyse und die Herausarbeitung bisher unbekannter Sortenunterschiede von acht verschiedenen Whiskyproben auf molekularer Ebene. Mittels multivariater Datenanalyse gelang es, Sortenunterschiede in Form von Markerverbindungen herauszuarbeiten. Wie die Hauptkomponentenanalyse zeigte, wies das Metabolom der drei analysierten Bourbon Whiskys AB1 – 3 große Ähnlichkeit auf. Stärkere Unterschiede in ihrer Zusammensetzung wurden dagegen beim Vergleich der Bourbons mit dem schottischen Single Malt SSM1 und dem schottischen Blend SB1 deutlich.

Es gelang, die wichtigsten statistisch signifikanten Metabolite für die Proben AB2 im Vergleich zu SSM1 zu identifizieren. Datenbankabgleiche und Literaturrecherchen auf Grundlage der gemessenen akkuraten Massen und der daraus berechneten Summenformeln lieferten wichtige Hinweise für die Identifizierung. Eine Absicherung der Strukturen durch Vergleich der Retentionszeiten war nur mit Hilfe von Referenzsubstanzen möglich. Die signifikanten Marker für SSM1 mit m/z 171,1392 und m/z 199,1702 konnten folglich durch Abgleich mit Referenzmaterial eindeutig als Caprin- und Laurinsäure identifiziert werden. Sie wurden in den analysierten Whiskyproben quantitativ ermittelt (vgl. 2.5.1.5).

Fettsäuren sind bekannte Bestandteile von Whisky. Ihre Bildung erfolgt im Rahmen des Hefemetabolismus während der Gärung. Sie gehen teilweise während des Brennvorgangs in das Destillat über. Das Filtern der *wash* vor der Destillation könnte somit den Gehalt an Fettsäuren im Endprodukt beeinflussen. Dies ist bei der Verwendung von *pot stills* der Fall.

Reid et al. (1993) analysierten 14 Whiskys mittels Pyrolyse-GC/MS, die in einer Destillerie aus dem gleichen Destillat jedoch mit unterschiedlichen Lagerungsbedingungen hergestellt wurden. Unter Verwendung multivariater Datenanalyse konnten sie zeigen, dass die Pyrolysespektren der Whiskys mit geringer Lagerzeit die typischen Massenfragmente von Fettsäuren (C_{10} , C_{12} , C_{14} und C_{16}) aufweisen und die Konzentration dieser Metabolite von Destillat/Fass-Interaktionen abhängig sein müssen. *Mosedale und Puech* (1998) beschrieben Fettsäurederivate zusammen mit Glycerin als typische Metabolite in Whiskys minderer Qualität. Da Whiskys vor ihrer Abfüllung auf meist 40 % Vol. mit Wasser verdünnt werden, können unerwünschte Trübungen, verursacht durch Sterole und Fettsäuren, auftreten. Um dies zu verhindern führen manche Hersteller Kaltfiltrationen durch und entfernen dabei neben Sterolen auch mittel- und langkettige Fettsäuren aus dem Endprodukt. Zu beiden Proben, AB2 und SSM1, gibt es keine genauen Angaben bezüglich einer Kältefiltration, jedoch könnten die niedrigen Gehalte dadurch erklärt werden und sie finden bei der Bourbon-Herstellung oft Anwendung. Von Probe AB2 ist bekannt, dass bei der Fermentation das *Sour-mash*-Verfahren verwendet wird und somit neben frischer Hefe auch ein hefehaltiger Rückstand aus der vorhergehenden Destillation zugesetzt wird. Weitere Unterschiede bei der Herstellung eines Bourbons und eines Single Malts liegen im verwendeten Getreide. Bei der Herstellung des Single Malts wird ausschließlich Gerstenmalz eingesetzt. Im Gegensatz dazu besteht die Getreidemischung bei Bourbons aus Mais (mindestens 50 %), Roggen und Gerstenmalz. *Nykänen et al.* (1968) konnten jedoch durch Studien der Fettsäuren in Spirituosen aus unterschiedlichen Rohstoffen zeigen, dass der verwendete Hefestamm und die Fermentationsbedingungen einen größeren Einfluss auf die gebildeten Verbindungen hatten, als die verwendeten Rohstoffe.

Als signifikante Marker für AB2 erwiesen sich im S-Plot die Metabolite mit den Molekülionen m/z 487,1813, m/z 551,2125, m/z 433,1495, m/z 481,2285, m/z 419,1703 und m/z 335,1708. Die Literaturrecherche auf Grundlage der aus den akkuraten Masse/Ladungsverhältnissen berechneten Summenformeln lieferte Hinweise darauf, dass es sich dabei um Oaklacton-Präkursoren und Lignane handelte. Sie wurden zum Teil bereits in holzgelagerten alkoholischen Getränken beschrieben. Da es sich dabei um kommerziell nicht erhältliche Substanzen handelt, wurden sie zunächst aus Holz isoliert um ihre Struktur anschließend verifizieren zu können.

Für die präparative Isolierung der Bourbon-Markerverbindungen wurde zunächst ein Ethanol-Wasser-Extrakt aus nicht getoastetem Holz der Gattung *Quercus alba* generiert und dieser nach Lyophilisation nochmals mit Ethylacetat/n-Hexan (9/1 (v/v)) sowie mit Methanol extrahiert. Die Markerverbindungen wurden im Methanolextrakt identifiziert, worauf dieser mittels MPLC an RP-18-Material fraktioniert wurde. Nach Lokalisierung der Zielanalyten in den MPLC-Fraktionen M4 und M5, folgte eine chromatographische Auftrennung der beiden

Fractionen mittels präparativer HPLC. Die reinen Verbindungen konnten nach Rechromatographie im semipräparativen Maßstab gewonnen werden.

Strukturanalytische Untersuchungen und der Vergleich der daraus resultierenden spektroskopischen Daten mit Literaturangaben (*Hayasaka et al.*, 2007; *Dada et al.*, 1989; *Ogawa und Ogihara*, 1976; *Marchal et al.*, 2014) führten zur Identifizierung von acht Verbindungen. Von den drei Oaklacton-Präkursoren, (3S,4S)-3-Methyl-4-O-(6'-O-galloyl)- β -D-glucopyranosyloctansäure (**1**), (3S,4S)-3-Methyl-4-O- β -D-glucopyranosyloctansäure (**2**) und (3S,4S)-4-(6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)-D-glucopyranosyloxy)-3-methyl-octansäure (**3**), wurde letzteres im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal mittels NMR-spektroskopischer Methoden charakterisiert und somit eindeutig verifiziert. Außerdem konnten die Strukturen des Lignans Lyoniresinol (**4**) und dessen Glykoside Lyonisid (**5**), Nudiposid (**6**), (+)-Lyoniresinol-9'-O- β -D-glucosid (**7**), sowie des Esters (+)-Lyoniresinol-9-O-gallat (**8**) bestätigt werden.

Untersuchungen bezüglich der geschmacklichen Relevanz der Oaklacton-Präkursoren in Whiskys wurden bis dato nicht durchgeführt. Diese Metabolite waren meist aufgrund ihrer Rolle als potentielle Vorstufen der aromaaktiven Oak- bzw. Whiskylactone von Interesse. *Wilkinson et al.* (2013) zeigten anhand von quantitativen Untersuchungen verschiedener Holzproben und deren Lagerversuche mit Modellweinen, dass Oaklactone zum einen durch thermal bedingten Abbau während des Toastens und zum anderen durch langsame saure Hydrolyse während der Reifung nach Extraktion aus dem Fass in den Wein aus den Glyko-Konjugaten gebildet werden können.

Lignane gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Während bekannt ist, dass Lignin als Polymer aus Phenylpropan-Einheiten der mechanischen Festigung einer Pflanze dient, ist die biologische Funktion der Lignane in den Pflanzen nicht vollständig geklärt. Aufgrund ihrer antimikrobiellen, antimykotischen und antioxidativen Eigenschaften dienen sie vermutlich der Abwehr von Schädlingen und Krankheiten (*Marchal et al.*, 2014). Die Wissenschaftler um *Marchal et al.* (2014) stellten einen Beitrag der Lignane aus Eichenholz zum bitteren Geschmack von Wein fest und ermittelten dabei auch den Geschmacksschwellenwert für Lyoniresinol (**4**) in Weißwein mit 1,5 mg/l. Daneben führten sie auch sensorische Experimente mit den Glykosiden **5**, **6** und **7**, sowie mit dem Ester **8** durch. Daten bezüglich Whiskys liegen dazu nicht vor.

Quantitative Untersuchungen der Markerverbindungen, deren sensorische Charakterisierung und Rekombinationsexperimente sollen im Folgenden ihre geschmackliche Relevanz in Whisky genauer beleuchten.

2.3 Aktivitätsorientierte Fraktionierung und Identifizierung geschmacksaktiver und geschmacksmodulierender Verbindungen in Whisky

2.3.1 Iterative Lösungsmittelfraktionierung

Um erste Einblicke in die Polarität der geschmacksaktiven Verbindungen des Whiskys zu erhalten, wurde der Whisky „AB1“ mittels iterativer Lösungsmittlextraktion nach aufsteigender Polarität fraktioniert (Abbildung 47). Nach Entfernung der leicht-flüchtigen Whisky-Bestandteile durch Vakuumdestillation, wurde der wässrige Rückstand iterativ mit Pentan, Diethylether und Ethylacetat extrahiert. So wurden 4 Fraktionen generiert, deren Ausbeute nach Lyophilisation ermittelt wurden (vgl. Tabelle 9).

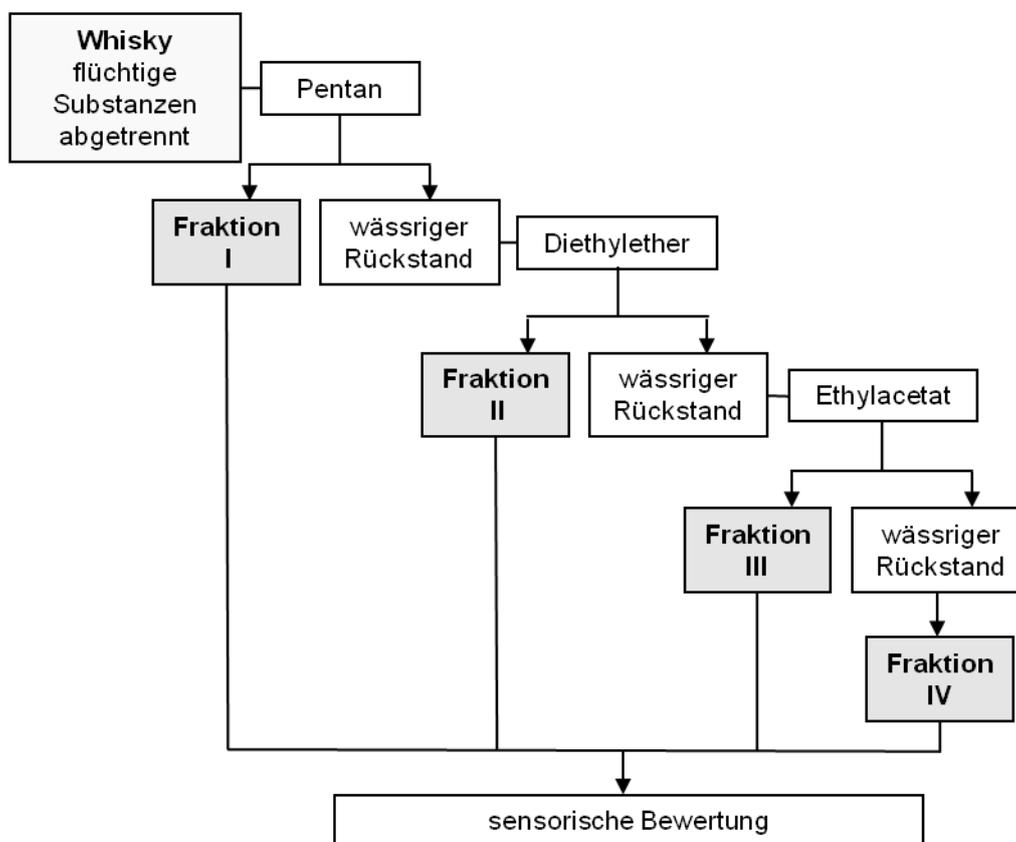


Abbildung 47: Schema der iterativen Lösungsmittlextraktion von Whisky „AB1“

Tabelle 9: Ausbeuten der Whisky Fraktionen I – IV und die in einer Profilsensorik ermittelten Intensitäten der Adstringenz, des Brennens und der Süße auf einer Skala von 1 - 5.

Fraktion	Ausbeute [mg]	Prozentualer Anteil [%]	Intensität der Adstringenz	Intensität des Brennens	Intensität der Süße
I	37.7	6.8	1,2	1,9	1,2
II	148.0	26.5	1,0	2,0	1,4
III	103.2	18.5	1,1	2,6	1,1
IV	269.2	48.2	1,3	1,9	1,1

Die aus Whisky „AB1“ gewonnenen Fraktionen I – IV wurden in einer Mischung aus Wasser und Ethanol (Ethanol/Sensorikwasser (20/80; v/v)) in ihren natürlichen Verhältnissen gelöst und sensorisch bewertet (vgl. Abbildung 48). Als Referenz für die Geschmacksprofile diente eine 20-%-ige ethanolische Lösung in Sensorikwasser. Aufgrund des langanhaltenden adstringierenden Eindrucks wurde die Bewertung im Half-Mouth-Test nach *Scharbert et al.* (2004) durchgeführt. Betrachtet man die Bewertung der Adstringenz, so wurden alle Fraktionen im Vergleich zur Referenz als stärker adstringierend empfunden. Der brennende Eindruck der Fraktionen I, II und IV wurde im Vergleich zur Referenz als weniger stark beurteilt. Die Bewertung der wahrgenommenen Süße hob Fraktion II (Süße: 1,4) hervor, die signifikant süßer als die Referenzlösung (Süße: 0,9) beurteilt wurde ($\alpha < 0,001$). Fraktion I (Süße: 1,2) wurde im Vergleich zu Fraktion II etwas weniger intensiv, aber dennoch als signifikant süßer als die Referenz bewertet ($\alpha < 0,01$).

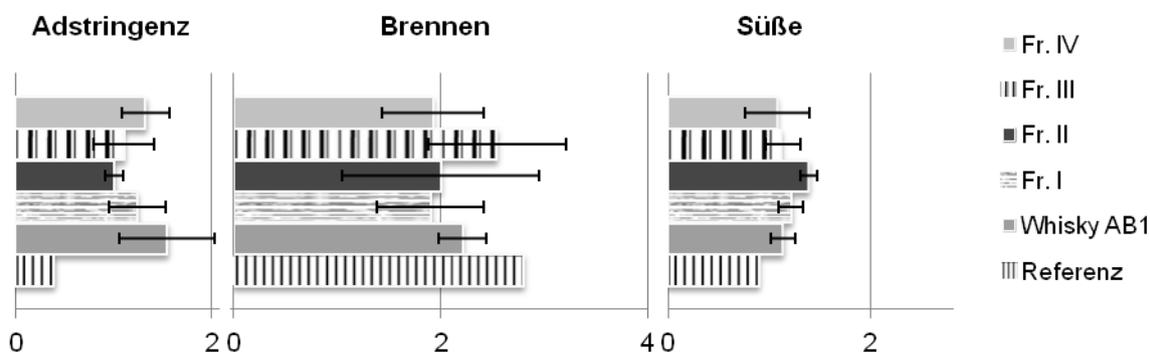


Abbildung 48: Geschmacksprofile ethanolerischer Lösungen (EtOH/Wasser (20/80; v/v); pH = 4,5) von der Referenzlösung, Whisky AB1, Fraktionen I, II, III und IV.

2.3.2 Lokalisierung und Identifizierung geschmacksaktiver Substanzen in der Diethylether Fraktion II

Ein Aliquot der Fraktion II wurde mittels präparativer HPLC aufgetrennt und das Eluat dabei in 12 Subfraktionen unterteilt (vgl. Abbildung 49). Diese Subfraktionen, II-1 bis -12, wurden nach Lyophilisation jeweils im gleichen Volumen einer alkoholischen Lösung (Ethanol/Sensorikwasser (2/98; v/v)) aufgenommen. Im Anschluss wurde jede Fraktion stufenweise eins plus eins mit der gleichen ethanolischen Lösung (Ethanol/Sensorikwasser (2/98; v/v)) verdünnt und in aufsteigenden Konzentrationen geschulten Sensorikteilnehmern zur Verkostung gereicht. Somit konnten die Geschmacksqualität der jeweiligen Fraktion und der Wahrnehmungsschwellenwert im Duo-Test bestimmt werden. Die Verdünnungsstufe, bei der ein Geschmacksunterschied zwischen der verdünnten Fraktion und dem Blindwert gerade noch signifikant wahrnehmbar war, wurde als Geschmacksverdünnungsfaktor (GV-Faktor) festgelegt. Folglich legt der GV-Faktor für diese 12 HPLC-Fraktionen eine Rangordnung bezüglich ihrer relativen Geschmacksintensitäten fest.

Abbildung 49 veranschaulicht, dass Fraktion II-10 mit einem GV-Faktor von 64 die höchste Geschmacksaktivität bezüglich Adstringenz aufweist, gefolgt von den Fraktionen II-7, -8, -9, -11 und -12, die jeweils einen GV-Faktor von 32 zeigen. Mit Hilfe der Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) nach *Frank et al.* (2001) gelang es, geschmacksaktive Fraktionen des Whiskys zu lokalisieren.

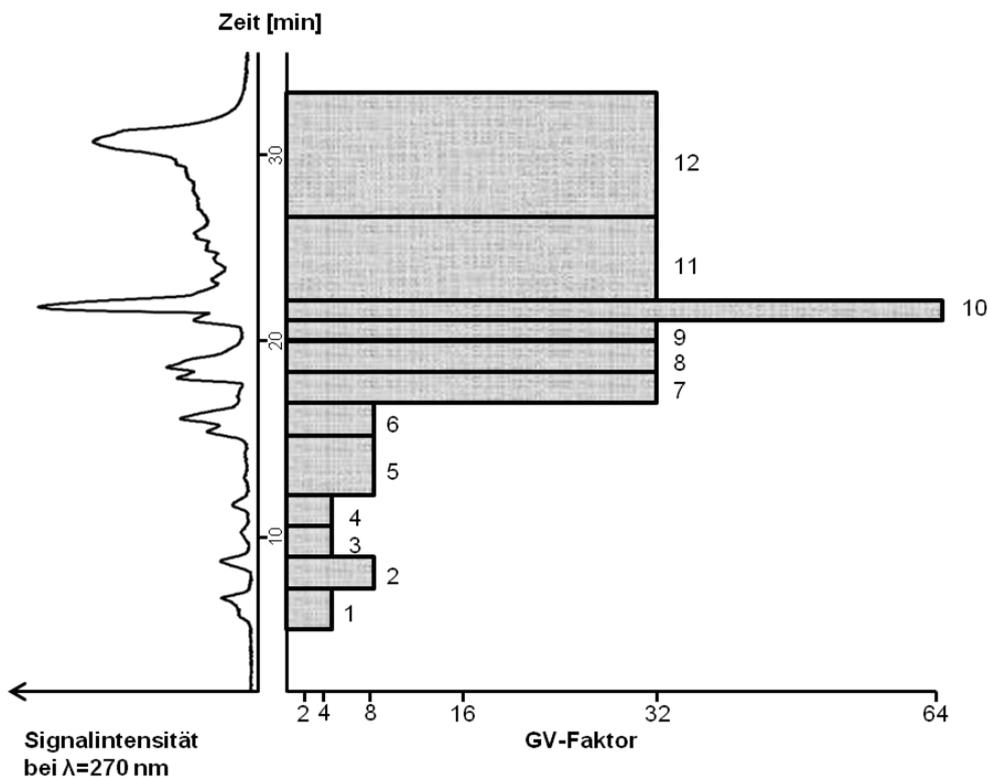


Abbildung 49: HPLC-Chromatogramm (links) und Geschmacksverdünnungs-(GV)-Chromatogramm (rechts) der Fraktion II von AB1 ($\lambda = 270$ nm; Gradient C 3.10.2.3)

Alle zwölf Subfraktionen wurden bezüglich ihrer Zusammensetzung genauer analysiert (vgl. Abbildung 50 und Tabelle 10). In den Fraktionen II-1 – 9 konnten vorrangig niedermolekulare Phenole identifiziert werden, die bereits in Whisky bekannt sind (*Glabasnia*, 2007). Diese beschriebenen Komponenten wurden gezielt in den Subfraktionen von Fraktion II mittels LC-MS/MS identifiziert (Tabelle 10). Neben den bekannten Substanzen konnten nun auch Bourbon-Markerverbindungen mittels UPLC-ESI-TOF-MS identifiziert werden, wie zum Beispiel Lyoniresinol (**4**) in Fraktion II-9 und *cis*-Oaklacton-Galloylglucosid (**1**) in Fraktion II-10, der Fraktion mit höchstem GV-Faktor. In den Fraktionen II-10 bis -12 konnten neben der strukturell beschriebenen Ellagsäure weitere, noch unbekannte Verbindungen detektiert werden.

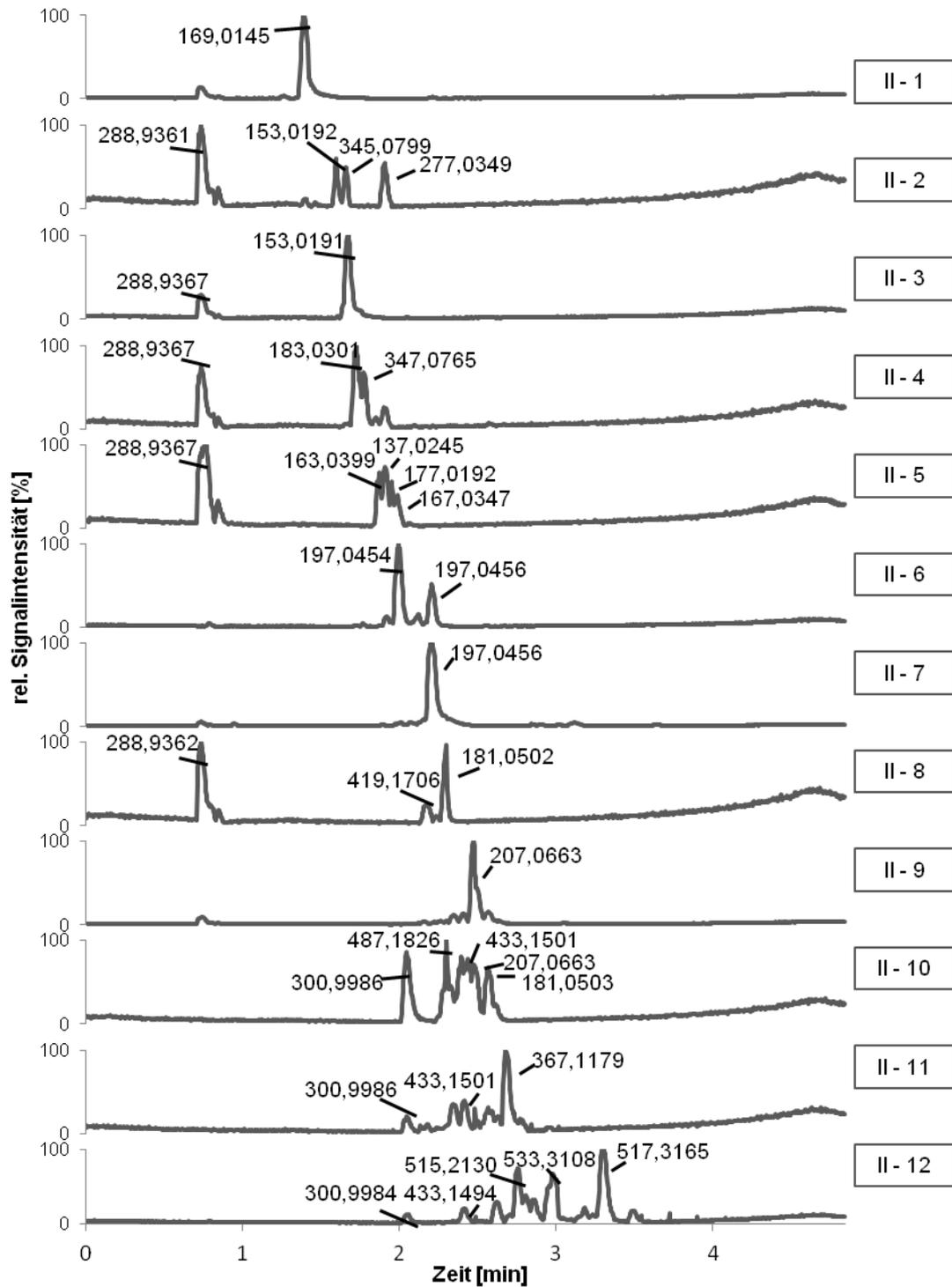


Abbildung 50: UPLC-ESI-TOF-MS Chromatogramme (BPI, ESI neg) der Whisky-Fractionen II-1 bis -12; die Intensitäten einer jeden Probe sind normalisiert und ausgewählte Molekülionen dargestellt.

Tabelle 10: Identifizierung geschmacksaktiver Verbindungen in II-1 – 12 mittels UPLC-ESI-TOF-MS (ESI neg) und LC-MS/MS (ESI pos und neg)

Fraktion II	Gemessene exakte Masse der Molekülonen	Berechnete Summenformel	Gezielte Identifizierung mittels LC-MS/MS	Verbindung
-1	169,0145	C ₇ H ₆ O ₅	+	Gallussäure
-2/-3	153,0192	C ₇ H ₆ O ₄	+	Protocatechusäure
-2/-3	-	-	+	HMF
-3	-	-	+	Furan-2-carbonsäure
-4	183,0299	C ₈ H ₈ O ₅	+	Gallussäuremethylester
-5	137,0245	C ₇ H ₆ O ₃	+	4-Hydroxybenzoesäure
-5	167,0349	C ₈ H ₈ O ₄	+	Vanillinsäure
-6	-	-	+	Gentisinsäure
-6	-	-	+	4-Hydroxybenzaldehyd
-6	197,0458	C ₉ H ₁₀ O ₅	+	Syringinsäure
-6/-7	197,0456	C ₉ H ₁₀ O ₅	+	Gallussäureethylester
-7	-	-	+	Vanillin
-8	419,1706	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	+	Lyoniresinol (4)
-8	181,0502	C ₉ H ₁₀ O ₄	+	Syringaldehyd
-9	-	-	+	Coniferylaldehyd
-9/-10	207,0662	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	+	Sinapaldehyd
-10	487,1826	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₂	+	Oaklacton galloylglucosid (1)
-10/-11/-12	300,9984	C ₁₄ H ₆ O ₈	+	Ellagsäure

2.3.3 Screening nach süßmodulierenden Substanzen der Diethylether Fraktion II

Die Daten der Profilsensoriken (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 48) zeigten, dass Whisky und im Speziellen Fraktion II süßer als die Referenz bewertet wurden, obwohl sie den gleichen Gehalt an Alkohol aufwiesen. Vergleicht man den Einfluss der bereits in Whisky bekannten süßen Verbindungen, wie zum Beispiel der Monosaccharide, so leisten diese in ihren nativen Konzentrationen keinen Beitrag zum Süßgeschmack (*Glabasnia*, 2007). Die Fraktionen II-1 bis -12 wurden zum Screening nach potentiellen süßmodulierenden Verbindungen analog der Fraktionen für die GVA (Abbildung 49) mittels präparativer HPLC gewonnen. Um semivolatile Verbindungen nicht zu verlieren, wurden Lösungsmittelreste nicht durch Lyophilisation, sondern durch Festphasenextraktion vollständig entfernt. Als sensorischer Test für das Screening nach süßmodulierenden Fraktionen wurde der Duo-Trio-Test in einer 4-%-igen Saccharose-Matrix angewendet. Die Ergebnisse sind Abbildung 51 zu sehen. Während vier Fraktionen (II-1, -2, -3, und -6) keine süßmodulierenden Eigenschaften aufwiesen, schienen drei Fraktionen (II-4, -11 und -12) den Süßgeschmack der 4-%-igen Saccharose-Lösung deutlich zu verringern. Bei drei Fraktionen (II-5, -8 und -10) war

dagegen eine signifikant länger anhaltende Süßwahrnehmung zu verzeichnen. Die Fraktionen II-7 und -9 wurden häufiger als süßer bewertet, das α -Level war jedoch größer als 0,2.

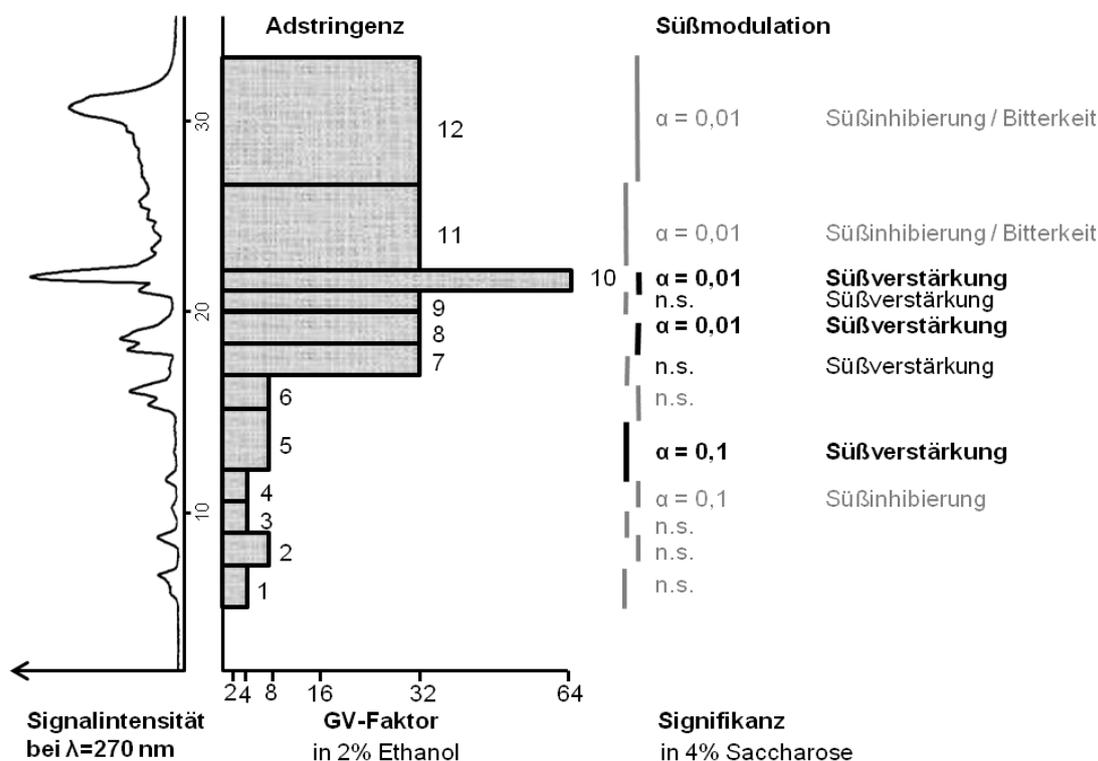


Abbildung 51: HPLC-Chromatogramm (links) und Geschmacksverdünnungs-(GV)-Chromatogramm (Mitte) der Fraktion II von AB1 ($\lambda = 270$ nm; Gradient C 3.10.2.3) mit den süßmodulierenden Eigenschaften (rechts) der Fraktionen II-1 bis -12 (n.s. = nicht signifikant).

Das Screening der Fraktionen II-1 bis -12 mittels UPLC-ESI-TOF-MS und LC-MS/MS (vgl. Tabelle 10) zeigte bereits, dass 4-Hydroxybenzoesäure, Syringaldehyd und Sinapaldehyd Bestandteile der Fraktionen II-5, -8 bzw. -10 waren. Die drei Fraktionen riefen im sensorischen Test auf Süßmodulation eine signifikant länger anhaltende Süße hervor. Fraktionen II-7 und -9, in denen Vanillin, Sinapaldehyd und Coniferylaldehyd identifiziert wurden, zeigten zwar keine signifikante Verstärkung der Süße ($\alpha > 0,2$), jedoch war ein Trend in diese Richtung zu verzeichnen. Bekannt ist, dass 2,4-Dihydroxybenzoesäure (DHB) Süße von Aspartam verstärkt (Britton *et al.*, 1999). Whiskykomponenten mit struktureller Ähnlichkeit zu DHB, wie 4-Hydroxybenzoesäure, Protocatechussäure, oder auch Aldehyde, wie das Vanillin und Syringaldehyd könnten folglich süßmodulierende Eigenschaften besitzen.

Als weitere süße oder süßmodulierende Verbindungen in Whisky könnten außerdem Ester und Ether des 5-Hydroxymethylfurfurals (9) in Frage kommen. 9 wurde in den Fraktionen II-2 und -3 identifiziert. Der von Hillmann *et al.* (2012) in Aceto Balsamico identifizierte Modulator 5-Acetoxy-methylfurfural (10) könnte auch in Whisky enthalten sein, da sowohl Essigsäure wie auch 5-Hydroxymethylfurfurals Bestandteile von Whisky sind. Es zeigte sich, dass 10

süßmodulierende Eigenschaften in einer 4-%-igen Saccharose-Lösung aufwies. Eine Zugabe ab 1,5 mmol/l induzierte eine signifikante Veränderung der Süßqualität und verlängerte die Geschmackswahrnehmung ($\alpha < 0,05$). *Cutzach et al.* (1999) beschreibt den Ether 5-Ethoxymethylfurfural (**11**) als Bestandteil des flüchtigen Metaboloms von Likörweinen. Auch diese Verbindung wurde in Whisky bis dato nicht beschrieben. Ein möglicher Bildungsweg von **11** wurde bereits von *Cutzach et al.* (1999) publiziert. Ausgehend von **9** sind die möglichen Bildungswege von **10** und **11** in Abbildung 52 dargestellt.

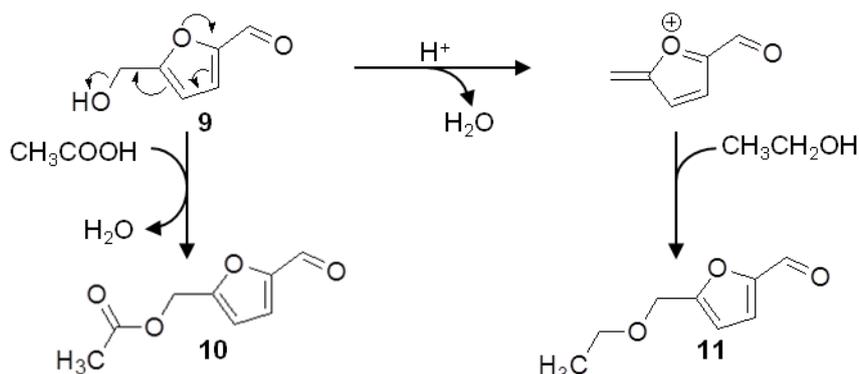


Abbildung 52: Bildungswege des Ethers 5-Ethoxymethylfurfural (11**) (nach *Cutzach et al.*, 1999) und des Esters 5-Acetoxyethylfurfural (**10**) (*Hillmann et al.*, 2012) aus 5-Hydroxymethylfurfural (**9**).**

Zunächst wurden Whiskyproben, die Fraktionen I – IV sowie die HPLC-Fractionen II-1 - 12 auf Anwesenheit der kommerziell erwerblichen Referenz des 5-Acetoxyethylfurfurals (**10**) mittels LC-MS/MS-Analyse überprüft (Abbildung 53).

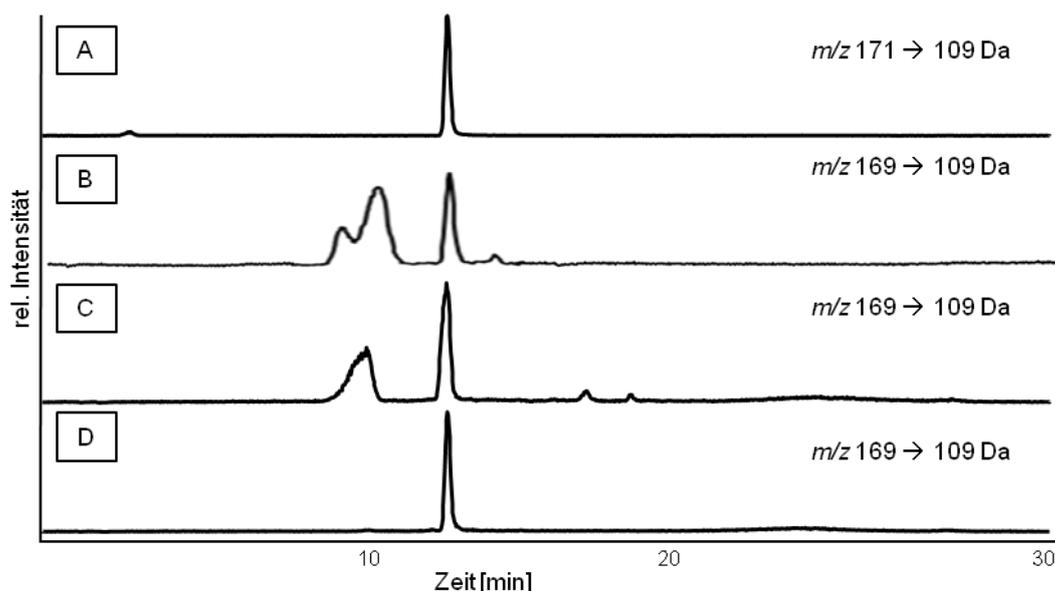


Abbildung 53: LC-MS/MS-Chromatogramme (ESI pos; System V; Gradient A 3.11.1.); MRM-Übergänge für den internen Standard $^{13}\text{C}_2$ -Acetoxyethylfurfural ($m/z\ 171 \rightarrow 109$) (A) und Acetoxyethylfurfural (10**) ($m/z\ 169 \rightarrow 109$) in Whisky AB1 (B), Fraktion II (C) und Subfraktion II-7 (D). Die Intensitäten einer jeden Probe sind normalisiert.**

Hierzu wurde außerdem ein isotopenmarkierter interner Standard des Analyten verwendet (Abbildung 53 - A). Es zeigte sich, dass der bereits bekannte Süßmodulator Bestandteil der Whiskyproben war (Abbildung 53 – B: Whisky AB1) und bei genauer Lokalisierung in den Fraktionen II (Abbildung 53 – C) und II-7 (Abbildung 53 – D) identifiziert wurde.

Synthese der 5-Hydroxymethylfurfural-Derivate

Referenzverbindungen weiterer 5-Hydroxymethylfurfural-Derivate wurden zunächst synthetisiert, um ihre Anwesenheit in Whisky allgemein und insbesondere in den süßmodulierenden Fraktionen zu überprüfen. Ethanol ist neben Wasser ein Hauptbestandteil von Spirituosen. Dessen Ether mit 5-Hydroxymethylfurfural wurde darum als mögliche unbekannte Whiskyverbindung vermutet. Weiterhin war es auch von Interesse, ob auch Hydroxymethylfurfuralether von Methanol, Fuselalkoholen und aromaaktiven Alkoholen in Whisky vorkommen. Da auch phenolische Säuren anwesend sind, wurde auch der Ester aus Vanillinsäure und 5-Hydroxymethylfurfural synthetisiert.

Die Umsetzung von 5-Hydroxymethylfurfural (**9**) zu 5-Ethoxymethylfurfural (**11**) erfolgt in Anlehnung an *Balakrishnan et al.* (2012). Nachdem der Reaktionsansatz in Ethanol bei 75°C mit Amberlyst-15 als Katalysator für 48 Stunden gerührt wurde, erfolgte eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC. Da die Zielverbindung semivolatile und unpolare Eigenschaften aufweist, wurden die wässrigen HPLC Fraktionen mit Diethylether extrahiert und so die Reinsubstanzen nach der Entfernung des Lösungsmittels erhalten. Zur Struktur- und Reinheitsüberprüfung der isolierten Substanz wurden 1D-, 2D- und *q*-NMR-Experimente durchgeführt. Die aus dem Protonenspektrum ermittelten Daten (vgl. 6 und Abbildung 54) stimmen mit den Literaturdaten (*Balakrishnan et al.* 2012) überein. Abbildung 55 zeigt das HMBC Spektrum, in welchem die $^3J(\text{C,H})$ -Kopplungen von den C-Atomen C(6) und C(7) mit den Protonen H-C(7) und H-C(6) zu sehen sind. Die spektroskopischen Daten bestätigen die Etherbindung des Ethanols mit der Hydroxy-Gruppe an Position 6 des 5-Hydroxymethylfurfurals.

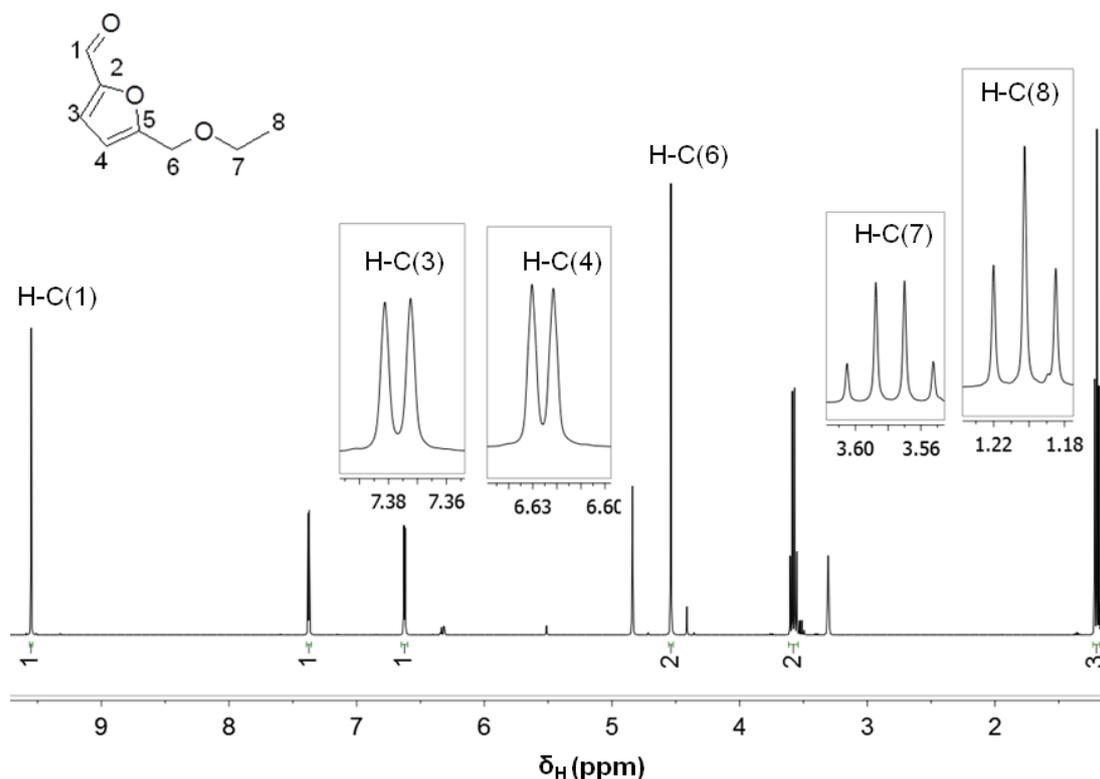


Abbildung 54: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von Ethoxymethylfurfural (11) (400 MHz, 298 K, Methanol-d₄) mit Vergrößerungen der Protonensignale bei 1,20 ppm (t), 3,57 ppm (q), 6,63 ppm (d) und 7,38 ppm (d).

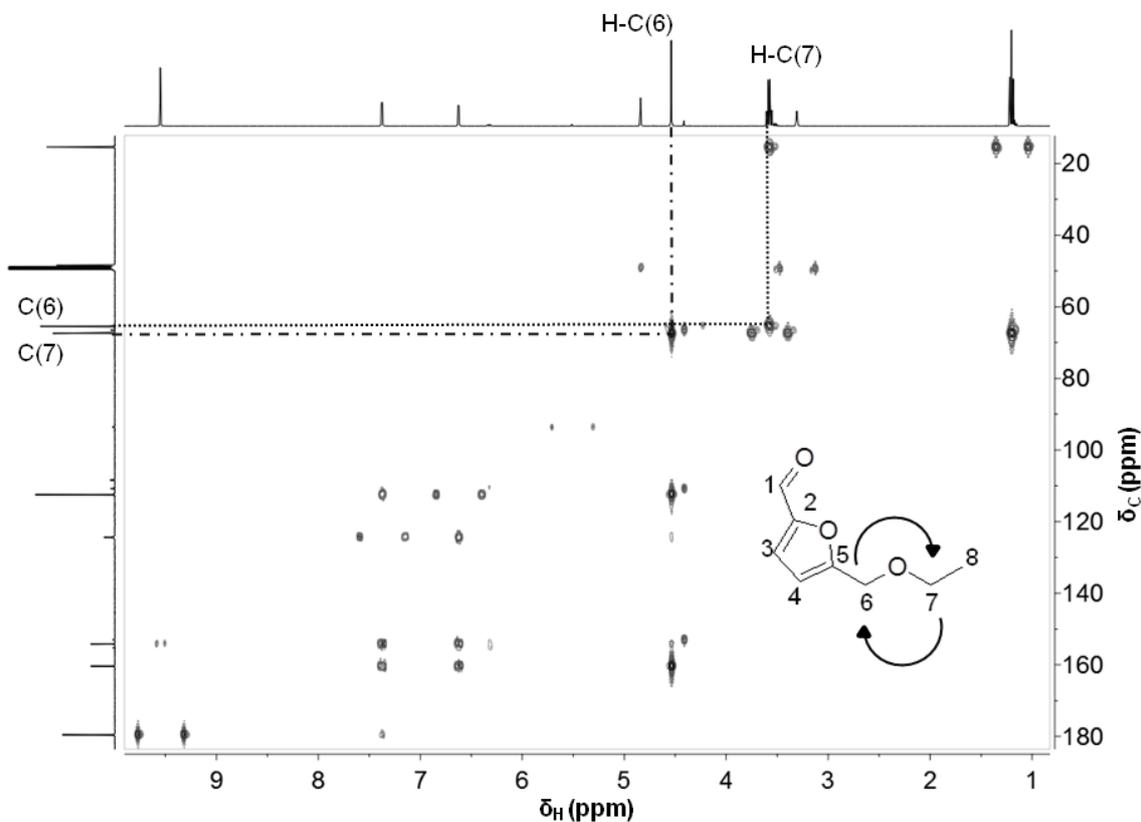


Abbildung 55: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Ethoxymethylfurfural (11) (400 MHz, 298 K, Methanol-d₄); mit den ³J(C,H)-Kopplungen von C(6) und C(7) mit den Protonen H-C(7) und H-C(6), welche die Verknüpfung über die Etherbrücke aufzeigen.

Neben dem bereits erwähnten 5-Ethoxymethylfurfural (**11**), kurz EMF, wurden analog der beschriebenen Umsetzung weitere Alkoxy-methylfurfurale synthetisiert. Dabei wurde 5-HMF (**9**) im jeweiligen Alkohol gelöst und unter Erwärmen sowie der Verwendung des Katalysators Amberlyst-15 umgesetzt. So wurde neben EMF (**11**), Referenzmaterial für 5-Methoxy- (**12**), 5-*i*-Propoxy- (**13**), 5-*n*-Propoxy- (**14**), 5-*n*-Butoxy- (**15**), 5-(2-Methylbutoxy)- (**16**), 5-(3-Methylbutoxy)- (**17**) und 5-(2-Phenylethoxy)methylfurfural (**18**) generiert (vgl. Abbildung 56).

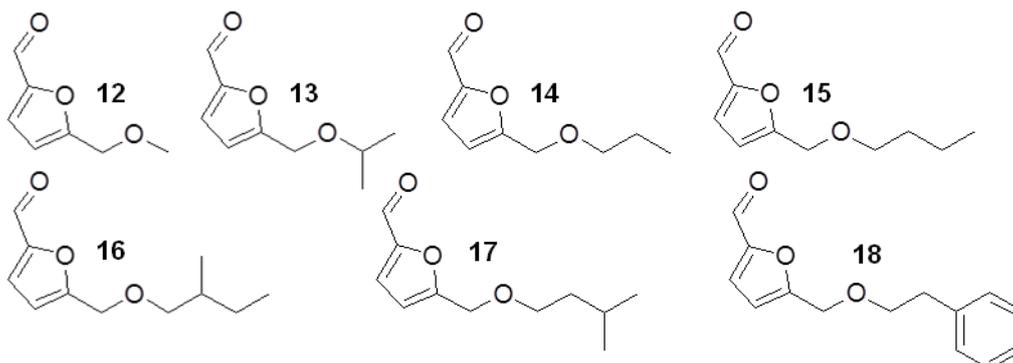


Abbildung 56: Strukturen der synthetisierten Alkoxy-methylfurfurale: 5-Methoxy- (MMF, **12**), 5-*i*-Propoxy- (*i*PMF, **13**), 5-*n*-Propoxy- (*n*PMF, **14**), 5-*n*-Butoxy- (*n*BMF, **15**), 5-(2-Methylbutoxy)- (2MBMF, **16**), 5-(3-Methylbutoxy)- (3MBMF, **17**) und 5-(2-Phenylethoxy)methylfurfural (PhEMF, **18**).

Außerdem wurde der Ester der phenolischen Säure Vanillinsäure und 5-HMF synthetisiert. Die Veresterung erfolgte in zwei Stufen. Nach der Generierung des Vanillinsäurechlorides mit Thionylchlorid, wurde HMF zugegeben. Der Ansatz wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und die Struktur des 5-Hydroxymethylfurfuralvanillinsäureesters (**19**) mittels 1D- und 2D-NMR-Experimente verifiziert. Der in Abbildung 57 dargestellte Ausschnitt des HMBC-Spektrums bestätigt die Esterbindung an C(6) anhand der $^3J(\text{C,H})$ -Kopplung zwischen den Protonen an C(6) und dem Kohlenstoffatom C (7).

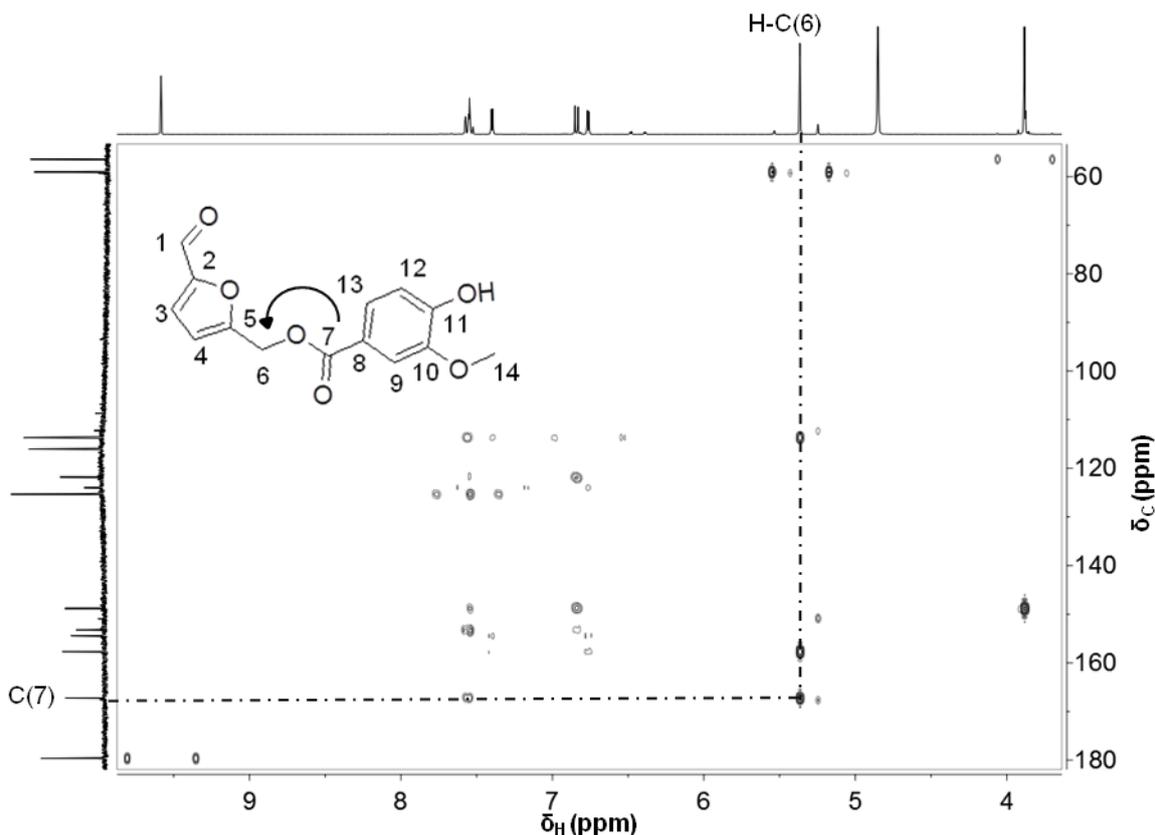


Abbildung 57: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von VanMF (**19**) (500/125 MHz, 300 K, Methanol- d_4) mit der $^3J(C,H)$ -Kopplung zwischen C(7) und H-C(6), welche die Esterbindung der Vanillinsäure und HMF aufzeigt.

Screening der 5-HMF-Derivate

Nach erfolgreicher Synthese war eine Identifizierung der 5-HMF-Derivate in Whisky und deren Lokalisierung in den Whisky-Fractionen mittels LC-MS/MS möglich. So gelang es, EMF (**11**), MMF (**12**) und VanMF (**19**) erstmals in Whisky zu identifizieren. Beim Screening der Fractionen I bis IV konnten alle drei Verbindungen in Fraction II lokalisiert werden. Die Analyse der HPLC-Fractionen II-1 bis -12 ergab, dass **12** in Fraction II-5, **11** in Fraction II-8 und **19** in Fraction II-11 zu finden waren (vgl. Abbildung 58).

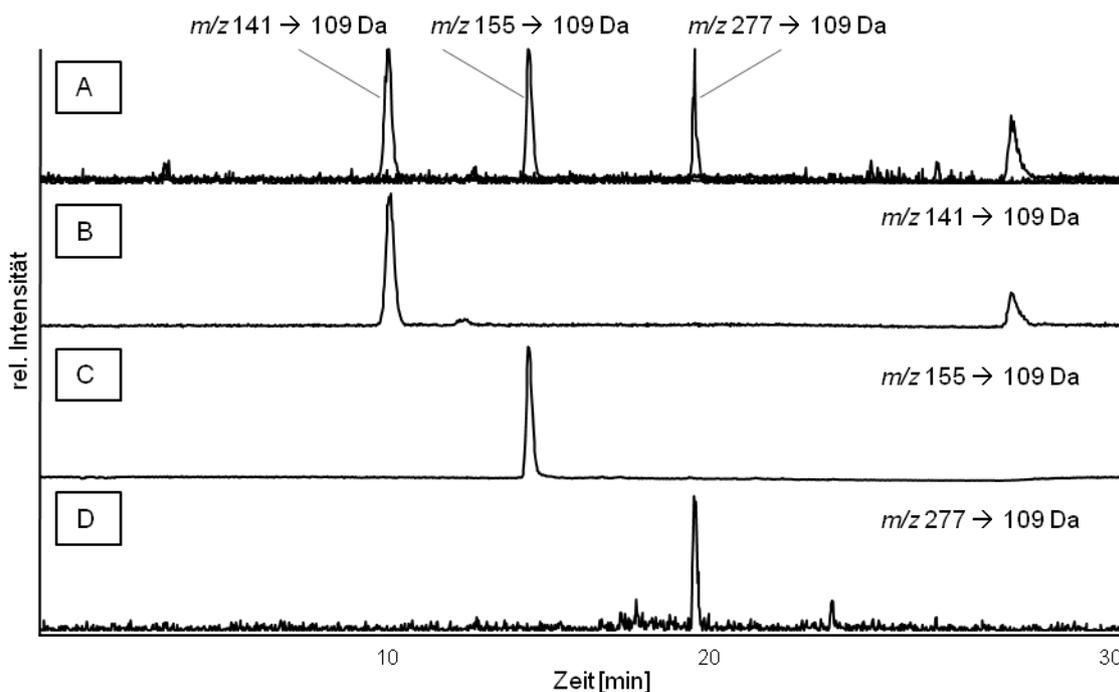


Abbildung 58: LC-MS/MS-Chromatogramme (ESI pos; System V; Gradient A 3.11.1); extrahierte MRM-Übergänge für Referenzen von MMF (12) (m/z 141 → 109), EMF (11) (m/z 155 → 109) und VanMF (19) (m/z 277 → 109) (A) und MMF (12) (m/z 141 → 109) in Fraktion II-5 (B), EMF (11) (m/z 155 → 109) in Fraktion II-8 (C) und VanMF (19) (m/z 277 → 109) in Fraktion II-11 (D). Die Intensitäten einer jeden Probe sind normalisiert.

Durch Vergleich mit Literaturdaten zu Alkoxyethylfurfuralen in alkoholischen Getränken wurde lediglich **11** bereits in Likörweinen (*Cutzach et al.*, 1999) und Madeira Weinen (*Câmara et al.*, 2004) identifiziert. *Hind und Crayton* (1963) beschrieben in ihrem Patent für Tabakaromen geeignete Prozessverfahren um Alkoxyethylfurfurale als Süßungsmittel in Tabakprodukten zu generieren. Um den Einfluss der in Whisky identifizierten HMF-Derivate auf die Süßwahrnehmung von Whisky zu untersuchen, wurden weitere sensorische Tests durchgeführt (vgl. 2.4.1). Aufgrund der langanhaltenden Wahrnehmung des süßmodulierenden Effektes, wurde für die sensorische Untersuchungen der mutmaßlichen Süßmodulatoren der Time-Intensity-Test herangezogen. Dieser war besser als der Duo-Trio-Test dafür geeignet, die Veränderung des zeitlichen Verlaufs der Süßwahrnehmung zu beobachten und diese mit Referenzlösungen vergleichen zu können (vgl. 2.4.1).

2.3.4 Diskussion

Zur Lokalisierung geschmacksaktiver Verbindungen wurde ein Bourbon Whisky zunächst einer iterativen Lösungsmittelextraktion unterzogen. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf adstringierende und süßschmeckende Fraktionen gelegt. Die Lösungsmittelfraktionierung lieferte vier Fraktionen, I – IV, die anschließend sensorisch bewertet wurden. Bezüglich ihrer

Adstringenz wurden alle vier Fraktionen als adstringierend bewertet. Beim Vergleich der einzelnen Fraktionen mit der gesamten Probe, wurde deutlich, dass sich die adstringierenden Verbindungen auf alle vier Fraktionen verteilen. Bezüglich der wahrgenommenen Süße, wurde die Diethylether Fraktion II als signifikant süßer im Vergleich zur Referenz bewertet.

Glabasnia (2007) zeigte in seinen Untersuchungen zu geschmacksgebenden Verbindungen in Whisky bereits, dass sich hauptsächlich niedermolekulare Phenole, wie zum Beispiel Syringinsäure, Syringaldehyd und Vanillin, in Fraktion II befinden. Nach weiterer Fraktionierung mittels präparativer HPLC wurde Fraktion II einer Geschmacksverdünnungsanalyse unterzogen. Diese ergab, dass Fraktion II-10 den höchsten GV-Faktor für Adstringenz aufwies. Nach strukturanalytischer Untersuchung der Fraktionen, wurde neben Ellagsäure und Sinapaldehyd auch das Oaklacton-Galloylglucosid (**1**) in II-10 identifiziert. Neben der Fraktion II-10 zeigten die Fraktionen II-7, -8, -9, -11 und -12 hohe GV-Faktoren. In Fraktion II-7 wurden der Gallussäureethylester und Vanillin identifiziert. Syringaldehyd wurde in Fraktion II-8 zusammen mit Lyoniresinol (**4**) gefunden. Eine sensorisch wichtige Rolle in Fraktion II-9 könnten außerdem Coniferyl- und Sinapaldehyd spielen. Ellagsäure konnte als Bestandteil der Fraktionen II-11 und II-12 identifiziert werden.

Die Verkostung der zwölf Fraktionen bei der GVA erfolgte in einer 2-%-igen ethanolischen Lösung. Dabei wurde keine Fraktion als süß bewertet. Die gesamte Fraktion II hingegen zeigte eine signifikant stärkere Süße, als die Referenz (20-%-ige ethanolische Lösung). Zur Lokalisierung potentieller Süßmodulatoren wurden die Fraktionen II-1 bis -12 in einer 4-%-igen Saccharose-Lösung sensorisch bewertet. Fraktionen II-5, -8 und -10 zeigten dabei eine signifikant länger anhaltende Süße. Die niedermolekularen Phenole 4-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Syringaldehyd und Sinapaldehyd konnten als Bestandteile dieser Fraktionen identifiziert werden. Auch die Fraktionen II-7 und -9, in denen Vanillin und Coniferylaldehyd identifiziert wurden, zeigten Anzeichen der Süßverstärkung. Die strukturelle Ähnlichkeit dieser Verbindungen zu 2,4-Dihydroxybenzoesäure, die bereits von *Britton et al.* (1999) als Verstärker der Süße von Aspartam beschrieben wurde, ließ auf mögliche süßmodulierende Eigenschaften schließen und verdeutlicht die Notwendigkeit von weiteren sensorischen Studien.

Die Identifizierung von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) (**9**) in den Fraktionen II-2 und -3 machte auf eine weitere Substanzgruppe mit potentiellen süßmodulierenden Eigenschaften aufmerksam, die HMF-Derivate. *Hillmann et al.* (2012) identifizierten 5-Acetoxymethylfurfural (**10**) als Süßverstärker in Aceto Balsamico. Das Screening dieser Verbindung zeigte, dass **10** auch in Whisky vorkommt und sie konnte schließlich auch in der süßer empfundenen Fraktion II identifiziert werden. Um Whisky und dessen Fraktionen auch auf die Anwesenheit

weiterer HMF-Derivate untersuchen zu können, wurden zunächst Referenzsubstanzen synthetisiert und eine LC-MS/MS Methode für deren Qualifizierung entwickelt. So gelang es von den neun synthetisierten Derivaten, darunter EMF (**11**), MMF (**12**), iPMF (**13**), nPMF (**14**), nBMF (**15**), 2MBMF (**16**) 3MBMF (**17**), PhEMF (**18**) und VanMF (**19**), drei in Whisky-Fraktion II zu lokalisieren. Beim Screening der Subfraktion II-1 bis -12 wurde **12** in II-5, **11** in II-8 und **19** in II-11 identifiziert.

11 wurde bereits von *Cutzach et al.* (1999) bezüglich Untersuchungen zum flüchtigen Metabolom von Likörweinen und von *Câmara et al.* (2004) in Madeira Weinen beschrieben. *Hind und Crayton* (1963) generierten Alkyloxymethylfurfurale als Süßungsmittel in Tabakprodukten. VanMF (**19**) wurde bis dato noch nicht in der Literatur beschrieben. *Jogia et al.* (1985) synthetisierten eine ähnliche Verbindung, den Ester aus Syringinsäure und HMF. Kenntnisse zu dessen natürlichem Vorkommen oder Daten zu sensorischen Eigenschaften gibt es jedoch nicht. Der Einfluss der in Whisky identifizierten HMF-Derivate auf die Süßwahrnehmung wurde mithilfe von weiteren sensorischen Tests untersucht (vgl. 2.4.1). Aufgrund der langanhaltenden Wahrnehmung des süßmodulierenden Effektes, wurde für weitere Untersuchungen diesbezüglich der Time-Intensity-Test herangezogen.

2.4 Humansensorische und rezeptorbasierte Studien zu süßmodulierender Verbindungen

2.4.1 Humansensorische Untersuchungen von Whisky Komponenten bezüglich ihrer süßmodulierenden Eigenschaften

Der Time-Intensity-Test ermöglicht eine kontinuierliche Messung der Intensität definierter Geschmackswahrnehmungen. Voraussetzung dafür sind feste Vorgaben, wie zum Beispiel gleiches Probenvolumen, gleiche Verweilzeit der Probe in der Mundhöhle und gleicher Zeitpunkt des Abschluckens. Um vergleichbare Ergebnisse zwischen den Panelisten und den verschiedenen Sitzungen zu generieren, waren regelmäßige Schulungen essentiell. Die Durchführung der Tests erfolgte Software-gestützt an einem berührungsempfindlichen Bildschirm.

Abbildung 59 zeigt beispielhaft die Vorgehensweise bei der Auswertung der Daten, welche von einem Sensorikteilnehmer bei einer Sitzung generiert wurden. Zu sehen ist in gestrichelter, grauer Linie die zeitliche Süßwahrnehmung der Matrixlösung (2% Saccharose, 1% Ethanol) und im Vergleich dazu als durchgezogene, schwarze Linie, die der Matrixlösung mit der Zugabe von 50 µmol/l EMF (**11**).

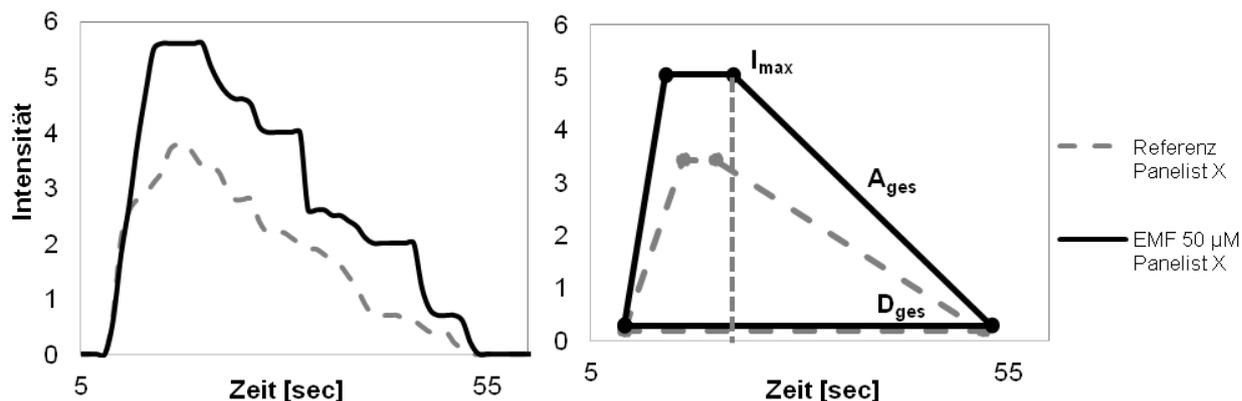


Abbildung 59: Beispiel für die Datenauswertung eines Time-Intensity-Tests; Rohdaten (links) und die nach der Trapez-Methode (Lallemant *et al.*, 1999) generierten Datenpunkte (rechts) nach Verkostung der Referenzlösung (2% Saccharose, 1% Ethanol; graue, gestrichelte Linie) und der Testlösung mit EMF (50 $\mu\text{mol/l}$ in 2% Saccharose, 1% Ethanol; schwarze, durchgezogene Linie). I_{max} : maximale Intensität; D_{ges} : Gesamtdauer; A_{ges} : gesamte Fläche unter der Kurve.

Die Rohdaten wurden von der Sensorik-Software FIZZ Calculations generiert. Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Proben wurde aus den Rohdaten mit Hilfe der Trapezmethode nach Lallemant *et al.* (1999) aus den Kurven ein Trapez berechnet. Hierzu wurden die Datenpunkte bei 5 und 90% der jeweiligen maximalen Intensität im ansteigenden sowie im abfallenden Teil der Kurve berechnet. Folgende Parameter wurden anhand des Trapezes ermittelt: die maximale Intensität (I_{max}), die gesamte Fläche unter der Kurve (A_{ges}) und die Gesamtdauer (D_{ges}) der Süßwahrnehmung. Die Parameter der verschiedenen Proben mit Zusatz wurden jeweils auf die parallel verkosteten Matrixlösungen ohne Zugabe normalisiert. Eine zweifaktorielle ANOVA wurde durchgeführt.

Um einen Überblick über alle mittels Time-Intensity generierten sensorischen Daten zu erhalten, sind die normalisierten Parameter I_{max} , A_{ges} und D_{ges} in Abbildung 60 dargestellt. Getestet wurden jeweils drei Konzentrationen (10, 25, 50 $\mu\text{mol/l}$) der Verbindungen EMF (11), VanMF (19), Syringaldehyd (20), Sinapaldehyd (21), Vanillin (22), 4-Hydroxybenzaldehyd (23) und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24) gelöst in einer Matrix aus 2% Saccharose und 1% Ethanol. Die mittels zweifaktorieller ANOVA berechneten p-Werte kleiner als 0,05 wurden als „signifikant“ (*), kleiner als 0,01 als „hoch signifikant“ und kleiner als 0,001 als „sehr hoch signifikant“ bezeichnet.

EMF (11) wurde in der süßverstärkenden Fraktion II-8 identifiziert (vgl. 2.3.3). Die humansensorischen Untersuchungen zeigten nun, dass der Zusatz von 50 $\mu\text{mol/l}$ 11 einen sehr hoch signifikanten Anstieg an I_{max} , A_{ges} und D_{ges} zur Folge hatte. Wurden 25 $\mu\text{mol/L}$ 11 zugesetzt, so zeigte die maximale Intensität eine sehr hoch signifikante Steigerung, jedoch erhöhen sich Gesamtfläche und –dauer nicht signifikant. 11 ist in der Lage die

Süßwahrnehmung in ihrer Intensität ab 25 $\mu\text{mol/l}$ und in ihrer Dauer ab 50 $\mu\text{mol/l}$ zu verändern.

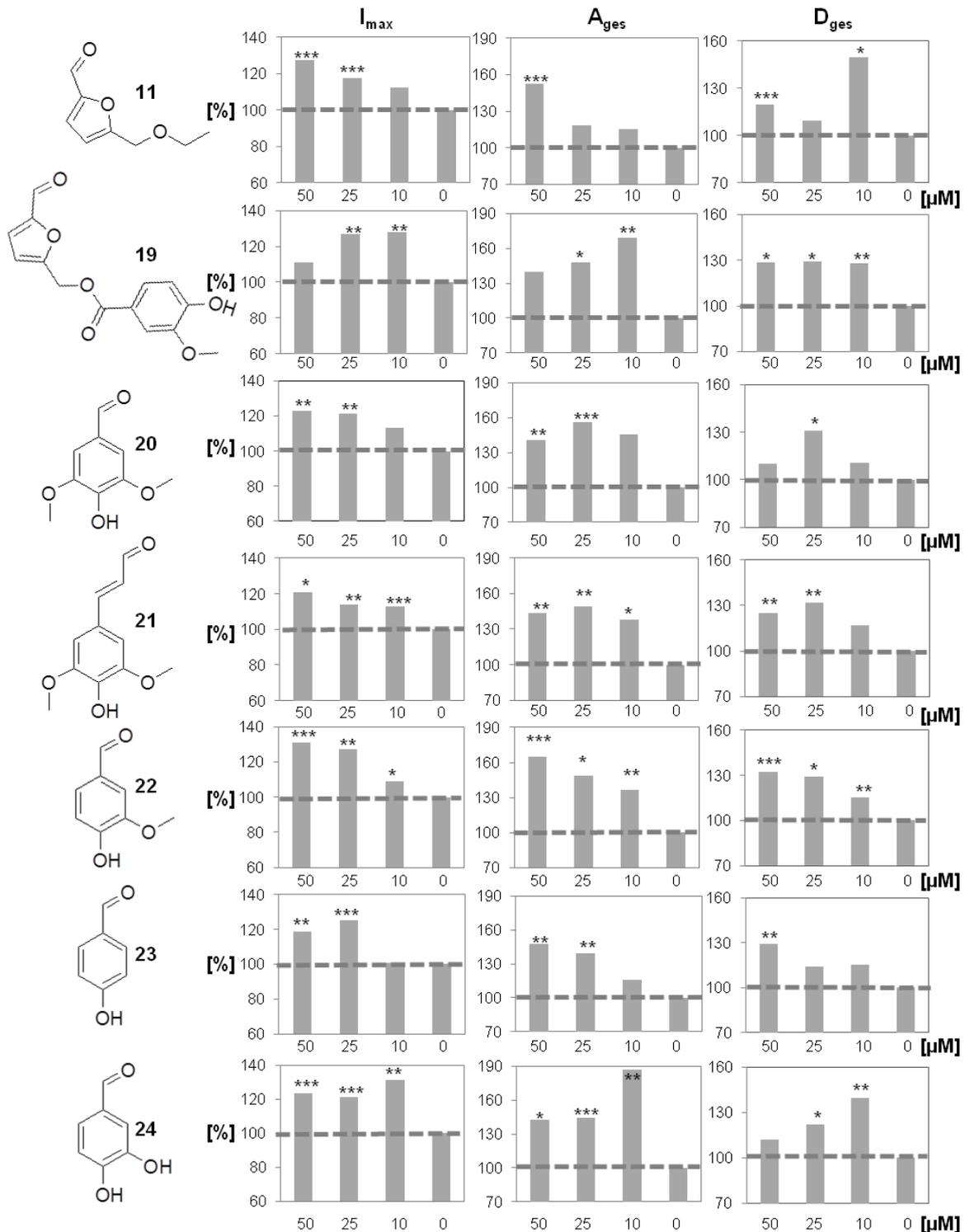


Abbildung 60: Die extrahierten Parameter I_{\max} (linke Spalte), A_{ges} (mittlere Spalte) und D_{ges} (rechte Spalte) der Time-Intensity-Tests von EMF (11), VanMF (19), Syringaldehyd (20), Sinapaldehyd (21), Vanillin (22), 4-Hydroxybenzaldehyd (23) und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24) ($c = 50, 25, 10 \mu\text{mol/l}$ Zusatz in 2% Saccharose, 1% Ethanol) und der Referenzlösung (2% Saccharose, 1% Ethanol); alle Werte wurden auf die Referenzlösung normalisiert. Darstellung der p-Werte: $< 0,05 \triangleq$ „signifikant“ (*), $< 0,01 \triangleq$ „hoch signifikant“ (**) und $< 0,001 \triangleq$ „sehr hoch signifikant“ (***). Durchführung nach 3.8.6.

VanMF (**19**) wurde in Whisky sowie in Fraktion II identifiziert (vgl. 2.3.3). Sensorische Tests sollten klären, ob der strukturell zum bekannten Süßmodulator AcMF (**10**) ähnliche Ester auch süßmodulierende Eigenschaften besitzt. Signifikante Anstiege von I_{\max} , A_{ges} und D_{ges} wurden bei 10 und 25 $\mu\text{mol/l}$ **19** verzeichnet. Dagegen zeigte die Zugabe von 50 $\mu\text{mol/l}$ **19** zwar einen signifikanten Anstieg der Gesamtdauer der Süßwahrnehmung, aber keine Signifikanz bei I_{\max} und A_{ges} . Die Ergebnisse bestätigen die Eigenschaften von VanMF, die Süßintensität und die Dauer der Süßwahrnehmung zu erhöhen. Der Vergleich der modulierenden Eigenschaften des VanMF mit EMF veranschaulicht, dass **19** bei geringeren Konzentrationen (10 und 25 $\mu\text{mol/l}$) eine bessere Wirkung zeigte. Neben den HMF Derivaten wurden in der süßer bewerteten Whisky-Fraktion II auch niedermolekulare, phenolische Aldehyde identifiziert (vgl. 2.3.2).

Die süßverstärkende Fraktion II-8 enthält neben **11** auch Syringaldehyd (**20**) (vgl. 2.3.3). Time-Intensity-Tests mit dem Zusatz von **20** zur Matrixlösung zeigten bei 25 $\mu\text{mol/l}$ signifikant höhere Werte der Parameter. Geringere Gehalte (10 $\mu\text{mol/l}$) hatten keinen Einfluss auf die Süßwahrnehmung. Hingegen bewirkte eine höhere Konzentration (50 $\mu\text{mol/l}$) eine signifikante Erhöhung der Intensität, aber nicht der Wahrnehmungsdauer.

Die Parameter I_{\max} , A_{ges} und D_{ges} verzeichneten signifikante Anstiege bei der Zugabe von 50 und 25 $\mu\text{mol/l}$ Sinapaldehyd (**21**). Die Anwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ des in Fraktion II-9 (vgl. 2.3.2) identifizierten Zimtaldehydderivates bewirkten signifikante Anstiege der maximalen Intensität und der Gesamtfläche unter der Kurve, aber keine signifikante Erhöhung der gesamten Dauer der Süßwahrnehmung.

Das in Fraktion II-7 (vgl. 2.3.2) identifizierte Vanillin (**22**) wurde ebenfalls der Matrixlösung zugesetzt. Bei allen drei getesteten Konzentrationen wurden signifikante Erhöhungen der berechneten Parameter festgestellt. Dies zeigt die verstärkenden Eigenschaften des Vanillins bezüglich der Süßintensität und der Wahrnehmungsdauer. Je höher die Konzentration an zugesetztem Vanillin war, desto stärker wurden die modulierenden Effekte bemerkbar.

Bei der Zugabe von 4-Hydroxybenzaldehyd (**23**), das in der süßmodulierenden Fraktion II-5 nachgewiesen wurde (vgl. 2.3.3), wurden signifikante Unterschiede ab 25 $\mu\text{mol/l}$ sichtbar. Bei der zugegebenen Konzentration 50 $\mu\text{mol/l}$, so waren hoch signifikante Erhöhungen festzustellen. Wurden nur 10 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt, war keine Signifikanz zwischen der Matrixlösung und der Probelösung zu verzeichnen.

3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**24**) unterscheidet sich strukturell zum 4-Hydroxybenzaldehyd (**23**) und Vanillin (**22**) nur im Substitutionsmuster an je einer Position im aromatischen System. Die Süßwahrnehmung wurde durch die Zugabe von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**24**) zur Saccharose-Lösung beeinflusst. Bei 10 und 25 $\mu\text{mol/l}$ war eine signifikante Erhöhung aller dargestellten Parameter zu verzeichnen. Bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ wurden

die maximale Intensität und die Gesamtfläche signifikant erhöht, während die Gesamtdauer keine Signifikanz zeigte. Ähnlich dem VanMF (**19**), zeigte 3,4-Dihydroxyaldehyd (**24**) einen stärkeren modulierenden Charakter in geringeren Konzentrationen.

Alle getesteten Substanzen zeigten folglich süßmodulierende Eigenschaften. Diese unterschieden sich je nach Konzentration. Ihr Beitrag zur Süße von Whisky kann nach ihrer quantitativen Bestimmung (vgl. 2.5) genauer untersucht werden (Abschnitt 2.6.4).

2.4.2 Studien zur Aktivierung des hTAS1R2/hTAS1R3-Süßrezeptors

Alle Verbindungen, die bereits bei den humansensorischen Untersuchungen süßmodulierende Eigenschaften aufzeigten, wurden nun auch auf eine mögliche Aktivierung des Süßrezeptors hin untersucht. Rezeptorbasierte Zellassays ermöglichen es, eine Vielzahl an Substanzen auf ihre Aktivierung von Geschmacksrezeptoren zu testen. So wurden neben den Verbindungen aus den humansensorischen Tests auch strukturell ähnliche Analyten getestet um mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzeigen zu können.

In den Zellassays wurde eine HEK 293 Zelllinie verwendet, die die chimäre G-Protein-Untereinheit $G_{\alpha15}G_{\alpha i3}$ und die hTAS1R2-Untereinheit des Süßrezeptors stabil exprimierte. Zur Bildung des heterodimeren Süßrezeptors sind beide Proteine hTAS1R2 und hTAS1R3 notwendig (*Li et al.*, 2002; *Nelson et al.*, 2001). Durch Induktion mit Tetracyclin wurde das Gen der zweiten Untereinheit hTAS1R3 exprimiert und eine Aktivierung des Rezeptorheterodimers konnte mittels Calcium-Imaging detektiert werden. Eine schematische Darstellung der biochemischen Reaktionen innerhalb des verwendeten Süßrezeptorassays ist in Abbildung 61 dargestellt (*Galindo-Cuspinera et al.*, 2006; *Winnig*, 2006).

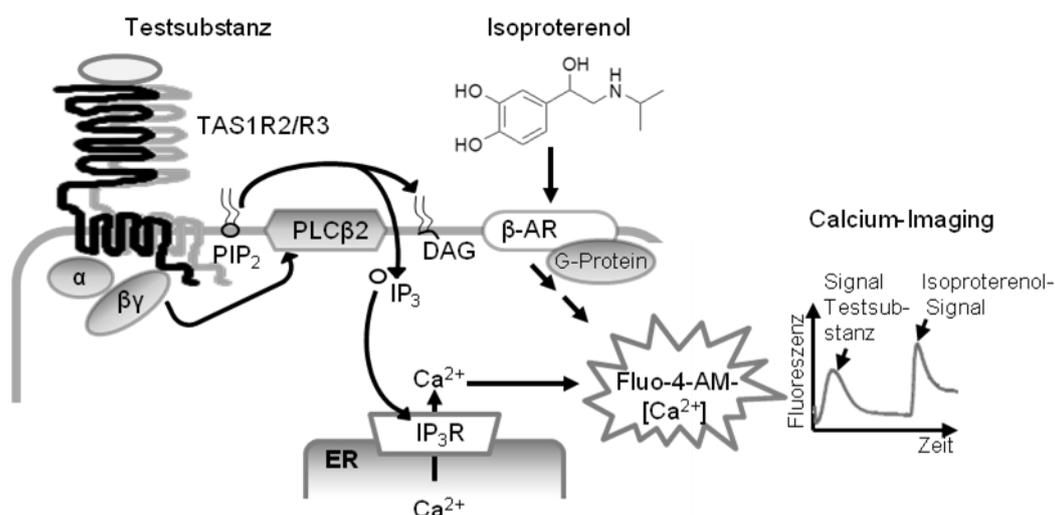


Abbildung 61: Funktionsprinzip des Calcium-Imaging am Süßrezeptorheterodimer TAS1R2/R3 mit der schematischen Darstellung der Signaltransduktion; PLC β 2 = Phospholipase-C β 2, PIP $_2$ = Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat; IP $_3$ = Inositol-1,4,5-triphosphat; ER = endoplasmatisches Retikulum; β -AR = β -adrenerger Rezeptor (Abbildung in Anlehnung an *Galindo-Cuspinera et al.*, 2006 und *Winnig*, 2006).

Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die Zellen mit dem Farbstoff Fluo-4-AM beladen. Da der heterolog exprimierte Rezeptor über eine G-Proteine Chimäre ($G_{\alpha15}G_{\alpha i3}$) an den IP_3 -Signaltransduktionsweg gekoppelt ist, führt dessen Aktivierung zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Reticulum. Der Farbstoff Fluo-4-AM komplexiert die frei gewordenen Ca^{2+} -Ionen und es kommt zu einer Fluoreszenzänderung. Diese ist abhängig von der Calciumkonzentration und kann apparativ detektiert werden. Nach Applikation der Testsubstanz erfolgt nach 5 bzw. 7 Minuten die Applikation von Isoproterenol. Dieses synthetische Catecholamin aktiviert die in den HEK-293-Zellen endogen vorhandenen β -adrenergen Rezeptoren, die ebenfalls G-Protein-gekoppelt sind und folglich auch den IP_3 -Signaltransduktionsweg aktivieren. Der darauffolgende intrazelluläre Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration wird mittels Calcium Imaging detektiert. Das mittels Isoproterenol induzierte Signal diente zur Überprüfung der Zellvitalität und dem Ausschluss von technischen Mängeln.

5-Hydroxymethylfurfural-Derivate

Hillmann *et al.* (2012) testeten bereits verschiedene 2-Furaldehyd-Derivate auf ihre Süßrezeptoraktivierung und konnten feststellen, dass die Applikation von 5-HMF (**9**), 5-Acetoxy-methylfurfural (**10**), Furan-2-carboxaldehyd, 5-Methyl-2-Furaldehyd und 5-Isobutanoyloxymethylfurfural eine Aktivierung zur Folge hatten. Getestete 5-HMF-Ester mit längeren Acyloxy-Seitenketten, wie zum Beispiel 5-Butanoyloxymethylfurfural, 5-Hexanoyloxymethylfurfural und 5-Octanoyloxymethylfurfural, aktivierten den Rezeptor nicht. Alkoxyderivate sowie Phenolsäureester des 5-HMF wurden noch nicht in Süßrezeptor-basierten Zellassays untersucht. Humansensorische Untersuchungen von EMF (**11**) und VanMF (**19**) zeigten süßmodulierende Eigenschaften der beiden HMF-Derivate. Wie in Abbildung 62 dargestellt, wurden neben diesen beiden Substanzen weitere Alkoxyderivate des HMF auf eine Aktivierung hin getestet.

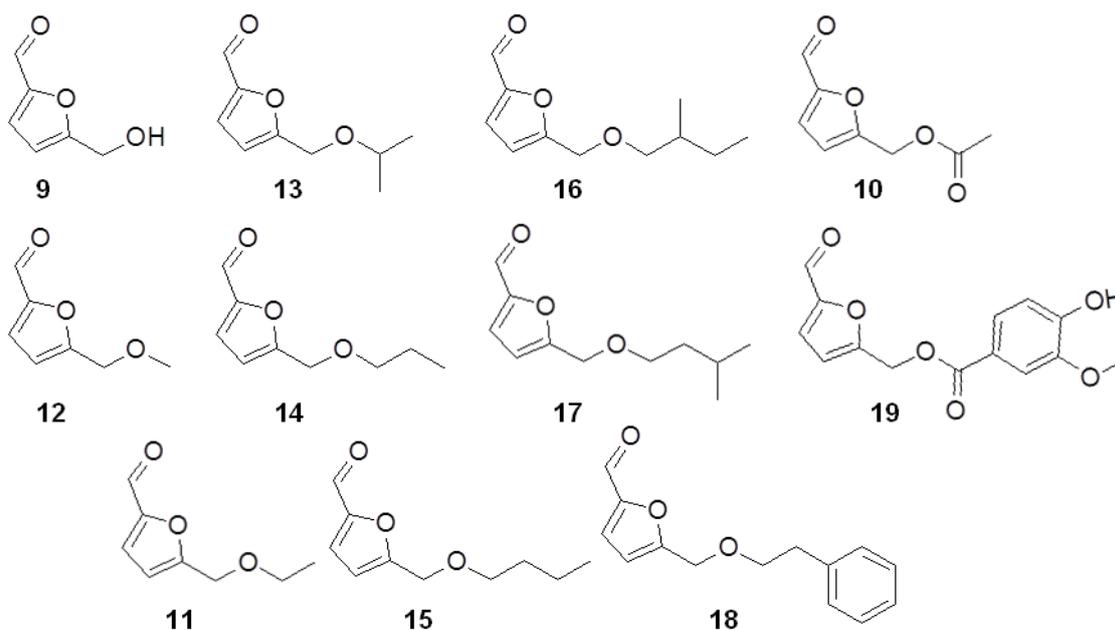


Abbildung 62: Strukturen der im Zellassay getesteten HMF-Derivate: 5-HMF (9), AcMF (10), EMF (11), MMF (12), iPMF (13), nPMF (14), nBMF (15), 2MBMF (16), 3MBMF (17), PhEMF (18) und VanMF (19).

Die Applikation der Puffer-Lösung (C1-Puffer) zeigt keine Änderung der Fluoreszenz (vgl. Abbildung 63 – erste Zeile) und ruft somit keinen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervor. Die Zahl an relativen Lichteinheiten nach Applikation von C1 stellte dadurch die Basis für die ligandeninduzierten Fluoreszenzveränderungen dar. Das meist intensivere, nach 5 bzw. 7 Minuten erscheinende Isoproterenol-Signal ist sowohl bei den induzierten Zellen ohne und mit Zusatz von Lactisol, als auch bei den nichtinduzierten Kontrollzellen zu sehen, da es unabhängig vom heterodimeren Süßrezeptor von β -adrenergen Rezeptoren initiiert wird. Den nichtinduzierten Kontrollzellen (vgl. Abbildung 63 - linke Spalte) fehlt die hTAS1R3-Untereinheit des Süßrezeptors. Werden hier Signale detektiert, so spricht dies für eine nicht-Süßrezeptor-spezifische Veränderung der zellulären Calcium-Konzentration und es kann keine Aussage bezüglich der spezifischen Aktivierung getroffen werden. Eine weitere Kontrolle erfolgte außerdem durch Co-Applikation mit Natrium-2-(4-Methoxyphenoxy)propionat (Lactisol, 1 mmol/l, vgl. Abbildung 63-rechte Spalte). Eine Aktivierung, die durch diesen selektiven hTAS1R2/R3-Antagonisten geblockt wird, kann als hTAS1R2/R3-spezifisch betrachtet werden.

Abbildung 63 (mittlere Spalte) zeigt die Aktivierung der induzierten Zellen durch EMF (11), MMF (12), iPMF (13), nPMF (14) und VanMF (19).

Sieben der elf getesteten HMF-Derivate aktivierten den humanen Süßrezeptor im Zellaassay (vgl. Tabelle 11). Der gemessene Konzentrationsbereich ergab sich dabei aus einer niedrigen Konzentration, die keine Rezeptoraktivierung hervorrief, und der maximalen artefaktfreien Konzentration. Von sogenannten Artefakten spricht man bei nicht-rezeptorspezifischen Signalen, die auch in den nicht-induzierten Kontrollzellen zu beobachten sind. Wie bereits von *Hillmann et al.* (2012) beschrieben, erfolgte eine Aktivierung des humanen Süßrezeptors im Zellaassay durch **9** und **10**. Die Alkoxy-Derivate mit einer Seitenkettenlänge von C1-3 (Verbindungen **11** – **14**) aktivierten den Süßrezeptor ebenfalls. Wurde die Alkankette des Alkoxy-Restes verlängert, so war keine Aktivierung mehr zu verzeichnen. Dagegen rief der Phenolsäureester (**19**) eine Aktivierung hervor.

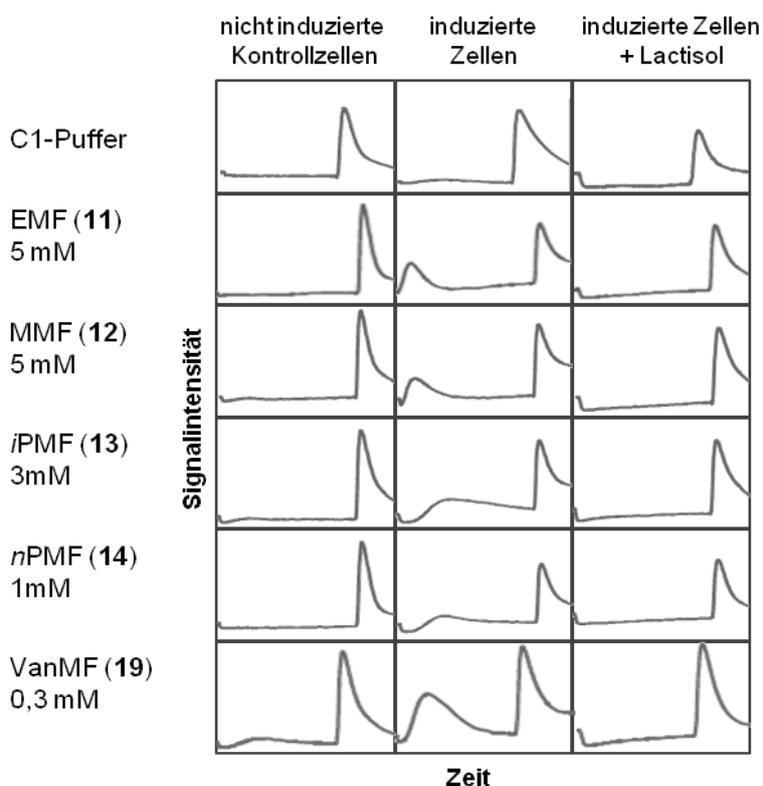


Abbildung 63: Detektierte Fluoreszenzsignale nach Applikation der HMF-Derivate ohne (linke und mittlere Spalten) und mit Lactisol (rechte Spalte) auf nicht induzierten Kontrollzellen (linke Spalte) und Zellen, die den humanen Süßrezeptors hTAS1R2/R3 exprimieren (mittlere und rechte Spalten). Nach 5 bzw. 7 min erfolgte die Applikation von Isoproterenol (Messbedingungen: 3.9.2). Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Tabelle 11: Übersicht der analysierten HMF-Derivate. Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Verbindung	Aktivierung des humanen Süßrezeptors hTAS1R2/R3	Konzentrationsbereich [$\mu\text{mol/l}$]	Maximale artefaktfreie Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]
HMF (9)	+	100 – 10000	10000
AcMF (10)	+	100 – 3000	3000
EMF (11)	+	10 – 5000	5000
MMF (12)	+	10 – 5000	5000
<i>i</i> PMF (13)	+	100 – 3000	3000
<i>n</i> PMF (14)	+	100 – 1000	1000
<i>n</i> BMF (15)	-	10 – 100	100
2MBMF (16)	-	10 – 100	100
3MBMF (17)	-	10 – 300	300
PhEMF (18)	-	10 – 300	300
VanMF (19)	+	1 – 300	300

Der Vergleich der Fluoreszenzänderung ($\Delta F/F$) bei äquimolarer Konzentration (1 mmol/l) von **9**, **10**, **11**, **12**, **13** und **14** in Abbildung 64 zeigt, dass **9** eine schwache, die Alkoxy-Derivate **11** – **14** eine ähnlich starke und das Acetoxy-Derivat **10** die stärkste Aktivierung hervorrufen. Auf Grund von Artefaktbildung konnte **19** nur bei geringerer Konzentration (0,3 mmol/l) vermessen werden, zeigte dabei aber bereits höhere $\Delta F/F$ -Werte als die Alkoxy-Derivate bei höherer Konzentration. Bei Betrachtung der Schwellenwerte wird deutlich, dass **19** bereits bei 0,01 mmol/l den Süßrezeptor aktiviert, während dies bei den anderen Derivaten erst ab der 100-fachen Konzentration erfolgte.

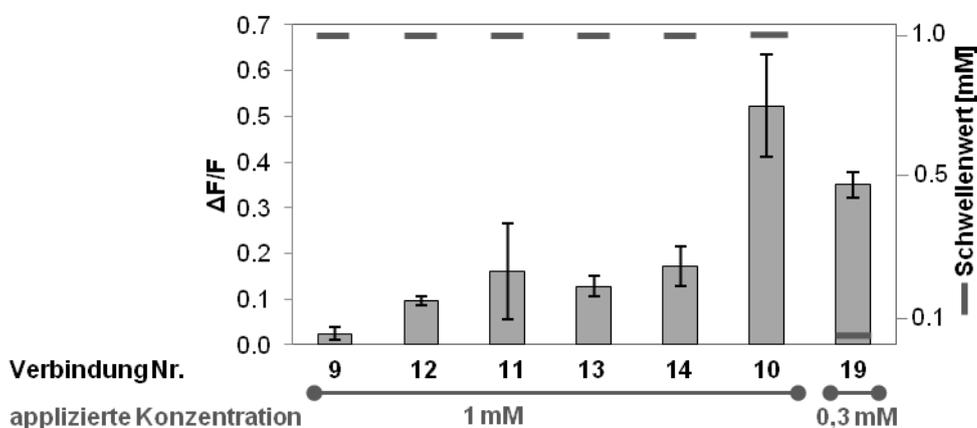


Abbildung 64: Resultierende Schwellenwerte sowie $\Delta F/F$ -Werte bei Applikation von 1 mM von HMF (9), MMF (12), EMF (11), *i*PMF (13), *n*PMF (14) und AcMF (10) bzw. von 0,3 mM VanMF (19) im Zellassay (Messbedingungen: 3.9.2). Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Benzaldehyd-Derivate

Humansensorische Untersuchungen zeigten süßmodulierende Eigenschaften von Syringaldehyd (**20**), Vanillin (**22**), 4-Hydroxybenzaldehyd (**23**) und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**24**) auf (vgl. 2.4.1). Neben diesen Verbindungen wurden strukturell ähnliche Benzaldehyd-Derivate bezüglich ihrer Süßrezeptoraktivierung im Zellassay getestet (vgl. Abbildung 65).

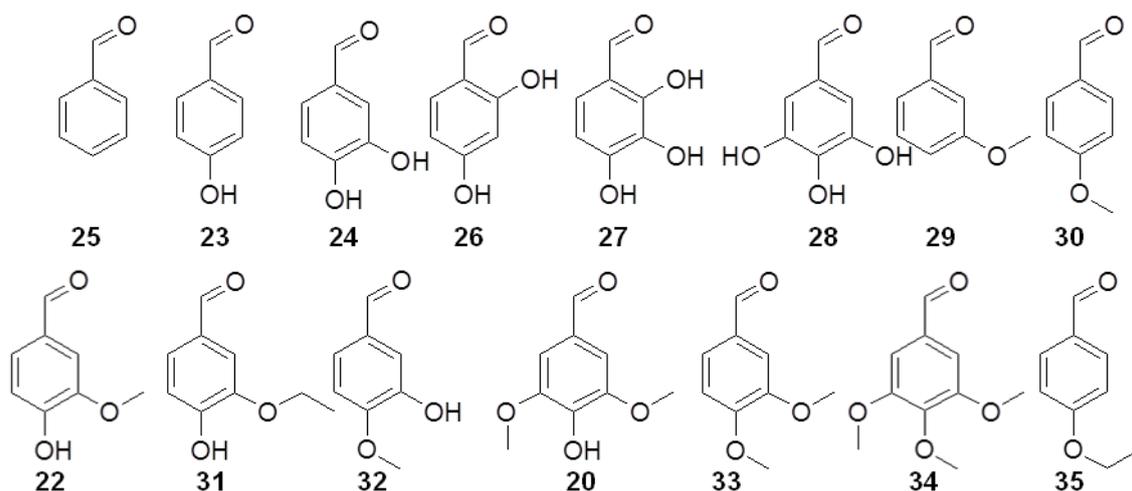


Abbildung 65: Strukturen der im Zellassay getesteten Benzaldehyd-Derivate: Benzaldehyd (25), 4-Hydroxybenzaldehyd (23), 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24), 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (26), 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyd (27), 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28), 3-Methoxybenzaldehyd (29), 4-Methoxybenzaldehyd (30), Vanillin (22), Ethylvanillin (31), Isovanillin (32), Syringaldehyd (20), 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (33), 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (34) und 4-Ethoxybenzaldehyd (35).

Von den 15 getesteten Verbindungen aktivierten 11 den humanen Süßrezeptor im Zellassay (vgl. Tabelle 12). Zu diesen Substanzen gehören Benzaldehyd (**25**), 4-Hydroxybenzaldehyd (**23**), 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**24**), 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyd (**27**), 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (**28**), 4-Methoxybenzaldehyd (**30**), Vanillin (**22**), Ethylvanillin (**31**), Isovanillin (**32**), Syringaldehyd (**20**), und 4-Ethoxybenzaldehyd (**35**).

Keine Aktivierung war dagegen bei 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**26**), 3-Methoxybenzaldehyd (**29**), 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (**33**) und 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (**34**) zu verzeichnen.

Tabelle 12: Übersicht der im Zellassay generierten Daten zu den Benzaldehyd-Derivaten. Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Verbindung	Aktivierung des humanen Süßrezeptors hTAS1R2/R3	Konzentrationsbereich [$\mu\text{mol/l}$]	Maximale artefaktfreie Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]
Benzaldehyd (25)	+	10 – 10000	10000
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	+	100 – 3000	3000
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24)	+	100 – 1000	1000
2,4-Dihydroxybenzaldehyd (26)	-	100 – 1000	1000
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28)	+	100 – 1000	1000
2,3,4-Trihydroxybenzaldehyd (27)	+	100 – 1000	1000
4-Methoxybenzaldehyd (30)	+	100 – 1000	1000
3-Methoxybenzaldehyd (29)	-	100 – 1000	1000
Vanillin (22)	+	100 – 3000	3000
Isovanillin (32)	+	100 – 1000	1000
Ethylvanillin (31)	+	100 – 1000	1000
4-Ethoxybenzaldehyd (35)	+	30 – 1000	1000
Syringaldehyd (20)	+	50 – 3000	3000
3,4-Dimethoxybenzaldehyd (33)	-	100 – 1000	1000
3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (34)	-	100 – 300	300

Abbildung 66 (mittlere Spalte) zeigt die Aktivierung der induzierten Zellen durch Benzaldehyd (25), 4-Hydroxybenzaldehyd (23), 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24), 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyd (27), 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28), 4-Methoxybenzaldehyd (30), Vanillin (22), Ethylvanillin (31), Isovanillin (32), Syringaldehyd (20), und 4-Ethoxybenzaldehyd (35).

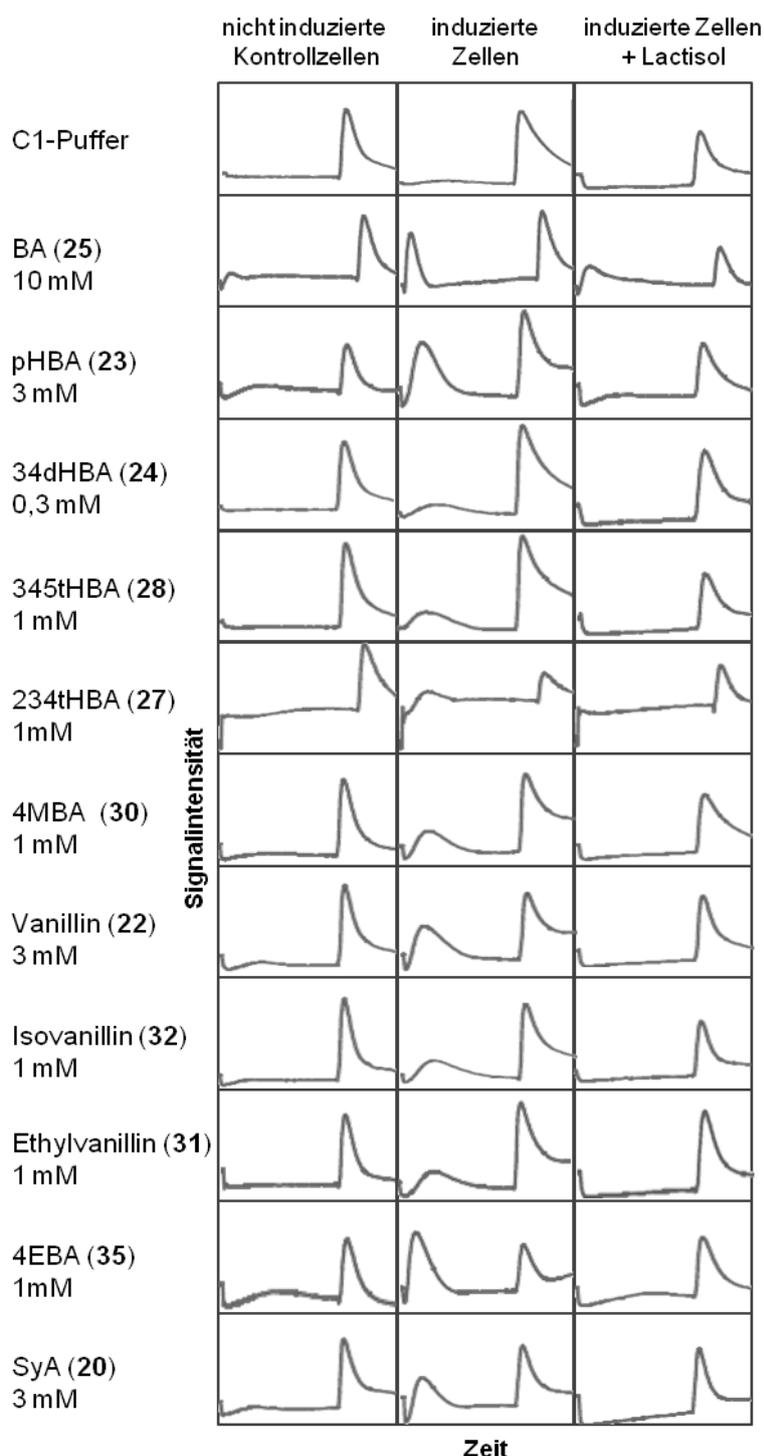


Abbildung 66: Detektierte Fluoreszenzsignale nach Applikation der Benzaldehyd-Derivate ohne (linke und mittlere Spalten) und mit Lactisol (rechte Spalte) auf nicht induzierten Kontrollzellen (linke Spalte) und Zellen, die den humanen Süßrezeptors hTAS1R2/R3 exprimieren (mittlere und rechte Spalten). Nach 5 bzw. 7 min erfolgte die Applikation von Isoproterenol (Messbedingungen: 3.9.2). Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Abbildung 67 zeigt den Vergleich der $\Delta F/F$ -Werte bei Applikation von 1 mM sowie die bestimmten Schwellenwertkonzentrationen. Die Schwellenwerte der Verbindungen **20**, **22**, **23**, **27**, **28**, **31** und **32** betragen jeweils 1 mmol/l. Der Vergleich ihrer $\Delta F/F$ -Werte bei dieser

Konzentration zeigt ähnliche Fluoreszenzänderungen im Bereich von 0,13 (**27**) bis 0,29 (**32**). Kaum höhere $\Delta F/F$ -Werte von 0,32 und 0,35 zeigen **25** und **30**. Die Schwellenwerte beider Verbindung liegen bei 0,3 mmol/l. Eine Schwellenwertkonzentration von ebenfalls 0,3 mmol/l und einen höheren $\Delta F/F$ -Wert von 0,53 zeigt **24**. Mit einem $\Delta F/F$ -Wert von 1,18 und einer Schwellenwertkonzentration von 0,1 mol/l weist **35** die höchste Aktivität auf.

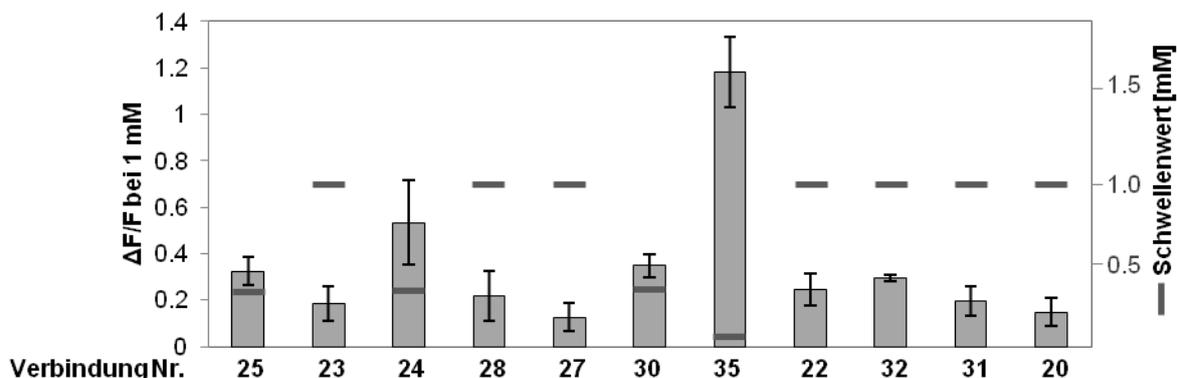


Abbildung 67: Resultierende Schwellenwerte sowie $\Delta F/F$ -Werte bei Applikation von 1 mM der Substanzen Benzaldehyd (**25**), 4-Hydroxybenzaldehyd (**23**), 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**24**), 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (**28**), 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyd (**27**), 4-Methoxybenzaldehyd (**30**), 4-Ethoxybenzaldehyd (**35**), Vanillin (**22**), Isovanillin (**32**), Ethylvanillin (**31**) und Syringaldehyd (**20**) im Zellassay (Messbedingungen: 3.9.2). Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Zimtaldehyd-Derivate

Sinapaldehyd (**21**) wurde bereits mittels Time-Intensity-Test in der Humansensorik auf seine süßverstärkenden Eigenschaften hin untersucht (vgl. 2.4.1). Dieses Zimtaldehyd-Derivat wurde zusammen mit Zimtaldehyd (**36**) und Coniferylaldehyd (**37**) im Zellassay auf direkte Aktivierung des humanen Süßrezeptors getestet. Die Strukturen der Testsubstanzen sind in Abbildung 68 dargestellt.

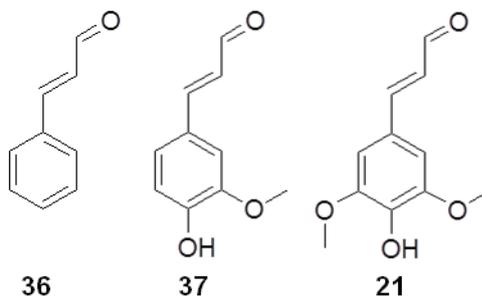


Abbildung 68: Strukturen der im Zellassay getesteten Zimtaldehyd-Derivate: Zimtaldehyd (**36**), Coniferylaldehyd (**37**) und Sinapaldehyd (**21**).

Die drei getesteten Zimtaldehyd Derivate zeigten jeweils eine positive Rezeptorantwort (vgl. Abbildung 69 und Tabelle 13). Auf Grund von starker Artefaktbildung lag der maximale Messbereich von **36** bei 100 $\mu\text{mol/l}$ und von **37** und **21** bei 300 $\mu\text{mol/l}$.

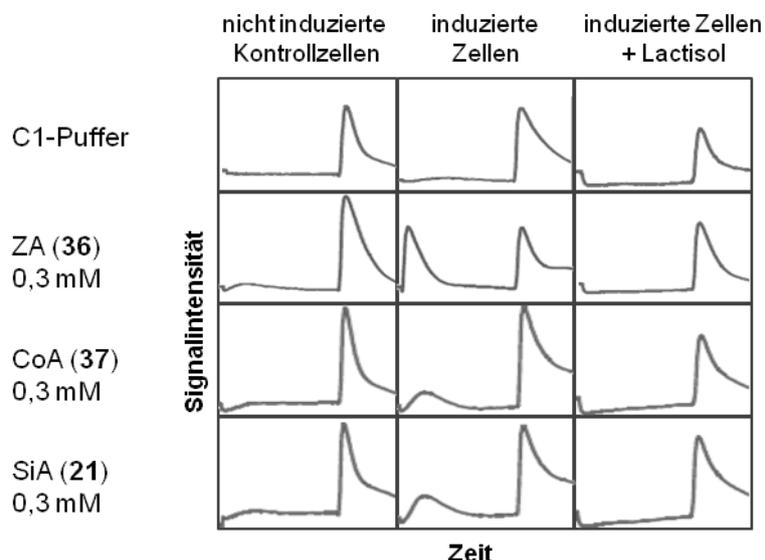


Abbildung 69: Detektierte Fluoreszenzsignale nach Applikation der Zimtaldehyd-Derivate ohne (linke und mittlere Spalten) und mit Lactisol (rechte Spalte) auf nicht induzierten Kontrollzellen (linke Spalte) und Zellen, die den humanen Süßrezeptors hTAS1R2/R3 exprimieren (mittlere und rechte Spalten). Nach 5 bzw. 7 min erfolgte die Applikation von Isoproterenol (Messbedingungen: 3.9.2). Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Tabelle 13: Übersicht der im Zellassay generierten Daten zu den Zimtaldehyd-Derivate. Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Verbindung	Aktivierung des humanen Süßrezeptors hTAS1R2/R3	Konzentrationsbereich [$\mu\text{mol/l}$]	Maximale artefaktfreie Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]
Zimtaldehyd (36)	+	0,3 – 300	300
Coniferylaldehyd (37)	+	100 – 300	300
Sinapaldehyd (21)	+	30 – 300	300

Der Vergleich der gemessenen $\Delta F/F$ -Werte und der ermittelten Schwellenwertkonzentrationen der drei strukturell sehr ähnlichen Verbindungen, dargestellt in Abbildung 70, zeigt nahezu identische Fluoreszenzänderungen und gleiche Schwellenwertkonzentrationen für **37** und **21**. **36**, das keinen Substituenten am Phenylring aufweist, aktiviert den Rezeptor bereits ab 0,01 mmol/l . Bei 0,3 mmol/l ist der $\Delta F/F$ -Wert von **36** fast siebenmal so groß wie bei **37** und **21**.

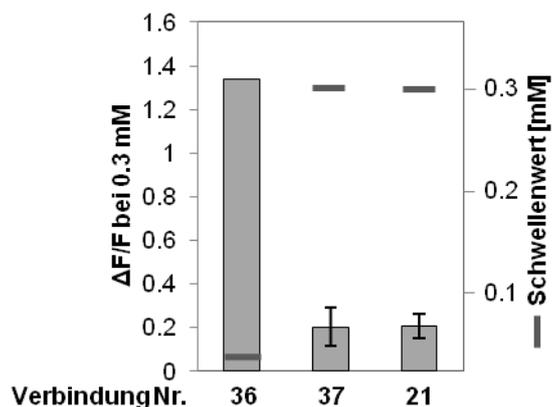


Abbildung 70: Resultierende Schwellenwerte sowie $\Delta F/F$ -Werte bei Applikation von 0,3 mM der Substanzen Zimtaldehyd (36), Coniferylaldehyd (37) und Sinapaldehyd (21) im Zellassay (Messbedingungen: 3.9.2). Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Phenolische Säuren, Ester und Alkohole

Um den Einfluss der funktionellen Gruppen auf die Eigenschaft den Süßrezeptor aktivieren zu können genauer zu untersuchen, wurden anstatt von Aldehyden phenolische Säuren, wie 4-Hydroxybenzoesäure (38), Vanillinsäure (40) und Syringinsäure (43) im Zellassay getestet. Wie bereits an 10 und 19 gezeigt werden konnte, aktivieren auch Ester den humanen Süßrezeptor im Zellassay. Ethylester von phenolischen Säuren sind Bestandteile alkoholischer Getränke. Als ein Vertreter dieser Gruppe wurde Ethylvanillat (41) im Zellassay getestet. Außerdem wurden 4-Hydroxybenzylalkohol (39) und Vanillylalkohol (42) auf Rezeptoraktivierung untersucht. Die Strukturen der analysierten Substanzen sind in Abbildung 71 dargestellt.

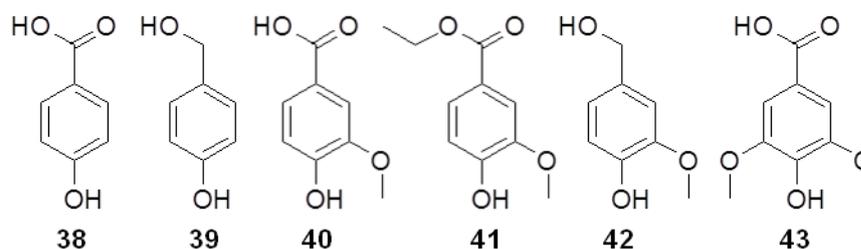


Abbildung 71: Strukturen der zusätzlich der im Zellassay getesteten Säuren, Ester und Alkohole: 4-Hydroxybenzoesäure (38), 4-Hydroxybenzylalkohol (39), Vanillinsäure (40), Ethylvanillat (41), Vanillylalkohol (42) und Syringinsäure (43).

Von den sechs getesteten Analyten aktivierten nur 38 und 39 den humanen Süßrezeptor im Zellassay (vgl. Tabelle 14 und Abbildung 72).

Tabelle 14: Übersicht der im Zellassay generierten Daten der getesteten phenolischen Säuren, Ester und Alkohole. Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Verbindung	Aktivierung des humanen Süßrezeptors hTAS1R2/R3	Konzentrationsbereich [$\mu\text{mol/l}$]	Maximale artefaktfreie Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]
4-Hydroxybenzoesäure (38)	+	3000 – 30000	30000*
Vanillinsäure (40)	-	300 – 10000	10000*
Ethylvanillat (41)	-	100 - 300	300
Syringinsäure (43)	-	3000 – 6000	6000*
4-Hydroxybenzylalkohol (39)	+	100 – 10000	10000
Vanillylalkohol (42)	-	100 – 10000	10000

* höhere Konzentrationen konnten aufgrund schlechter Löslichkeit nicht vermessen werden

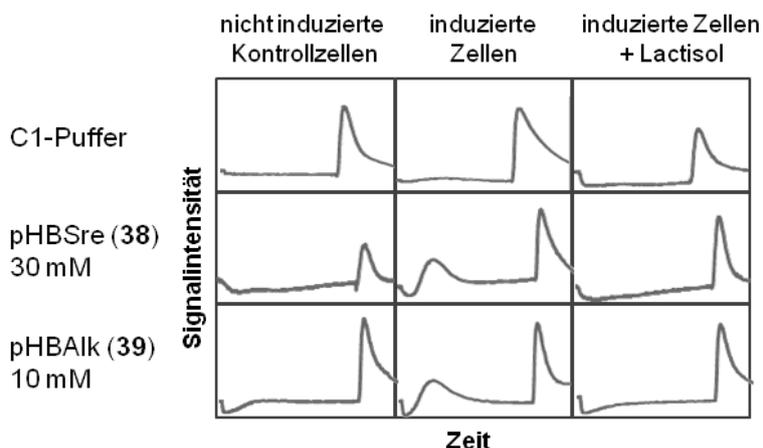


Abbildung 72: Detektierte Fluoreszenzsignale nach Applikation von 4-Hydroxybenzylalkohol (39) und 4-Hydroxybenzoesäure (38) ohne (linke und mittlere Spalten) und mit Lactisol (rechte Spalte) auf nicht induzierten Kontrollzellen (linke Spalte) und Zellen, die den humanen Süßrezeptors hTAS1R2/R3 exprimieren (mittlere und rechte Spalten). Nach 5 bzw. 7 min erfolgte die Applikation von Isoproterenol (Messbedingungen: 3.9.2). Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

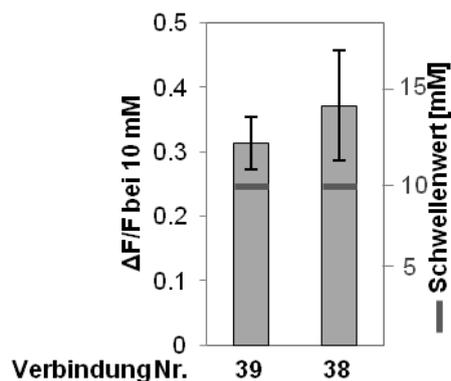


Abbildung 73: Resultierende Schwellenwerte sowie $\Delta F/F$ -Werte bei Applikation von jeweils 10 mM der Substanzen 4-Hydroxybenzylalkohol (39) und 4-Hydroxybenzoesäure (38) im Zellassay (Messbedingungen: 3.9.2). Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

2.4.3 Diskussion

Im vorangegangenen Kapitel wurden potentielle Süßmodulatoren zum Teil humansensorisch hinsichtlich ihrer Süßgeschmacksverstärkung als auch mittels eines zellbasierten Süßrezeptorassays charakterisiert. Aus den gewonnenen Ergebnissen ergeben sich Hinweise darauf, welche strukturellen Eigenschaften für die Süßrezeptoraktivierung essentiell sind.

Die Verbindungen EMF (11), VanMF (19), Syringaldehyd (20), Sinapaldehyd (21), Vanillin (22), 4-Hydroxybenzaldehyd (23) und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24) wurden jeweils gelöst in einer Matrix aus 2 % Saccharose und 1 % Ethanol mittels Time-Intensity-Tests humansensorisch auf süßmodulierende Eigenschaften getestet. Die sieben Whiskyinhaltsstoffe zeigten alle eine Veränderung der wahrgenommenen Süße. Dabei spielte ihre Konzentration eine entscheidende Rolle, da die süßverstärkende Wirkung meist nicht direkt mit dieser korreliert. Eine höhere Konzentration eines Modulators hat nicht zwangsläufig eine stärkere Süßintensität zur Folge. Außerdem kann die Zugabe einer bestimmten Konzentration von einer Verbindung zum Beispiel die Dauer der Süßwahrnehmung beeinflussen, während eine andere Verbindung dabei eine Erhöhung der Intensität bewirkt. Bei der Verkostung der Substanzen in einer Saccharose-freien, 2%-igen ethanolischen Matrix wurde keine Süße wahrgenommen (vgl. 2.6.1 und 2.6.2).

Zellbasierte Süßrezeptorassays ermöglichten die Untersuchung einer Vielzahl an strukturell ähnlichen Substanzen auf ihre Aktivierung des humanen Rezeptors hTAS1R2/R3. So wurden insgesamt 35 Substanzen auf Rezeptoraktivierung getestet. Die Verbindungen wurden aufgrund ihrer Strukturen in 4 Gruppen unterteilt, die HMF-Derivate, die Benzaldehyd-Derivate, die Zimtaldehyd-Derivate und die phenolischen Säuren, Ester und Alkohole.

Neben den bereits von *Hillmann et al.* (2012) getesteten Verbindungen HMF (**9**) und AcMF (**10**), zeigten EMF (**11**), MMF (**12**), iPMF (**13**), nPMF (**14**) und VanMF (**19**) eine Aktivierung des Rezeptorheterodimers. Ab einer Länge der Alkoxy-Seitenkette von $n > 3$, aktivierten die HMF-Derivate den Süßrezeptor nicht mehr. Dies lässt folglich einen Zusammenhang zwischen der Polarität einer Verbindung und deren Aktivierung vermuten. Der Vergleich der aktivierenden HMF-Derivate untereinander zeigte, dass **19** den niedrigsten Schwellenwert besitzt und den Süßrezeptor bereits ab einer Konzentration von 0,01 mmol/l im Zellassay aktiviert.

Elf der 15 getesteten Benzaldehyd-Derivate aktivierten ebenfalls den Süßrezeptor im zellbasierten Assay. Zu diesen Substanzen gehören Benzaldehyd (**25**), 4-Hydroxybenzaldehyd (**23**), 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**24**), 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyd (**27**), 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (**28**), 4-Methoxybenzaldehyd (**30**), Vanillin (**22**), Ethylvanillin (**31**), Isovanillin (**32**), Syringaldehyd (**20**) und 4-Ethoxybenzaldehyd (**35**). Keine Aktivierung war dagegen bei 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**26**), 3-Methoxybenzaldehyd (**29**), 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (**33**) und 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (**34**) zu verzeichnen. Eine direkte Aussage bezüglich der strukturellen Voraussetzungen für die Aktivierung des Süßrezeptors durch Benzaldehyd-Derivate kann nicht getroffen werden. Sicherlich spielt jedoch die Position des jeweiligen Substituenten am Phenylring eine entscheidende Rolle. Dies wird beim Vergleich von **24** und **26**, aber auch bei **29** und **30**, deutlich. Während das Isomer mit Hydroxy-Gruppen an Position 3 und 4 (**24**) bzw. nur einer Methoxy-Gruppe an Position 4 (**30**) eine Wechselwirkung mit dem Süßrezeptor eingeht, zeigen die Isomere mit Hydroxy-Gruppen ausschließlich an Position 2 und 4 (**26**) bzw. nur einer Methoxy-Gruppe an Position 3 (**29**) keine Aktivierung bei artefaktfreien Konzentrationen. Die ermittelten Schwellenwerte der aktivierenden Benzaldehyd-Derivate lagen im Bereich von 0,1 bis 1 mmol/l. **35** zeigte unter allen getesteten Verbindungen dieser Gruppe die höchste Aktivität (Schwellenwert: 0,1 mmol/l; $\Delta F/F = 1,18$ bei 1 mmol/l).

Alle drei getesteten Zimtaldehyd-Derivate, Sinapaldehyd (**21**), Zimtaldehyd (**36**) und Coniferylaldehyd (**37**), riefen eine Süßrezeptoraktivierung hervor. Verbindung **36**, die keinen Substituenten am Phenylring aufweist, zeigte die niedrigste Schwellenwertkonzentration der Zimtaldehyd-Derivate bei 0,01 mmol/l. Wie auch bei den strukturell sehr ähnlichen Verbindungen **20** und **22**, zeigten **21** und **37** gleiche Schwellenwertkonzentrationen und sehr ähnliche $\Delta F/F$ -Werte.

Von den sechs getesteten phenolischen Säuren, Ester und Alkoholen aktivierten nur 4-Hydroxybenzylalkohol (**39**) und 4-Hydroxybenzoesäure (**38**) den Süßrezeptor im Zellassay. Dies zeigt, dass die funktionelle Gruppe nicht allein ausschlaggebend für eine Interaktion mit dem Süßrezeptor ist, da Säuren, Alkohole und Aldehyde eine Aktivierung hervorriefen. Im Vergleich zum strukturanalogen Aldehyd **23**, weisen **38** und **39** eine zehnfach höhere

Schwellenwertkonzentration auf. Wie an den Beispielen Vanillylalkohol (**42**), Vanillinsäure (**40**) und Syringinsäure (**43**) zu sehen ist, ermöglicht die Aktivierung des Rezeptors durch die strukturanalogen Aldehyde **22** und **20** keine Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Alkohole oder Säuren.

Der Vergleich der Ergebnisse der *in-vivo*- und *in-vitro*-Assays veranschaulicht, dass bei der humansensorischen Analyse die untersuchten Verbindungen keinen süßen Eigengeschmack aufweisen (vgl. Kapitel 2.6.1 und 2.6.2), sie jedoch die Süße einer 2-%-igen Saccharose-Lösung verlängern bzw. verstärken können. Die Untersuchungen am humanen Süßrezeptor hTAS1R2/hTAS1R3 dagegen zeigen, dass die alleinige Applikation dieser Verbindungen auf induzierte Zellen zu einer messbaren Aktivierung führen. Wie bereits von *Hillmann et al.* (2012) angemerkt, müssen hierfür Unterschiede der *in-vitro* und *in-vivo*-Tests verantwortlich sein. Die heterologe Expression der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im *in-vitro*-Assay könnte zu Veränderungen in ihrem Transport in der Zelle, ihrer Funktion und ihrer Pharmakologie führen. So kann die Funktion möglicherweise von akzessorischen Proteinen und Begleitern beeinflusst werden, oder die Bindung erfolgt an unterschiedlichen G-Proteinen (*Ilegems et al.*, 2010). Jedoch zeigen die Rezeptorantworten der *in-vitro*-Tests, dass mehrere HMF-Derivate, Benzaldehyd-Derivate, Zimtaldehyd-Derivate, 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzylalkohol direkt mit dem menschlichen Süßrezeptor interagieren. Folglich kann vermutet werden, dass die veränderte Süßwahrnehmung von Saccharose in den humansensorischen Tests von einem länger andauernden Signal des Süßrezeptors herrührt.

2.5 Quantifizierung von Geschmacksstoffen in Whisky

Um den sensorischen Unterschied der Whiskyproben auf molekularer Ebene zu klären, wurden neben den in der Literatur beschriebenen Geschmacksstoffen auch weitere Whiskyinhaltsstoffe mittels diverser analytischer Methoden identifiziert und quantifiziert (Abbildung 74). Die quantitativen Daten dienten als Grundlage für Rekombinations- und Omissionsexperimente und waren schließlich ausschlaggebend für die Charakterisierung des Sensometaboloms von Whisky. Die quantitativen Analysen wurden mit zehn Whiskyproben durchgeführt (vgl. 3.1.1.1).

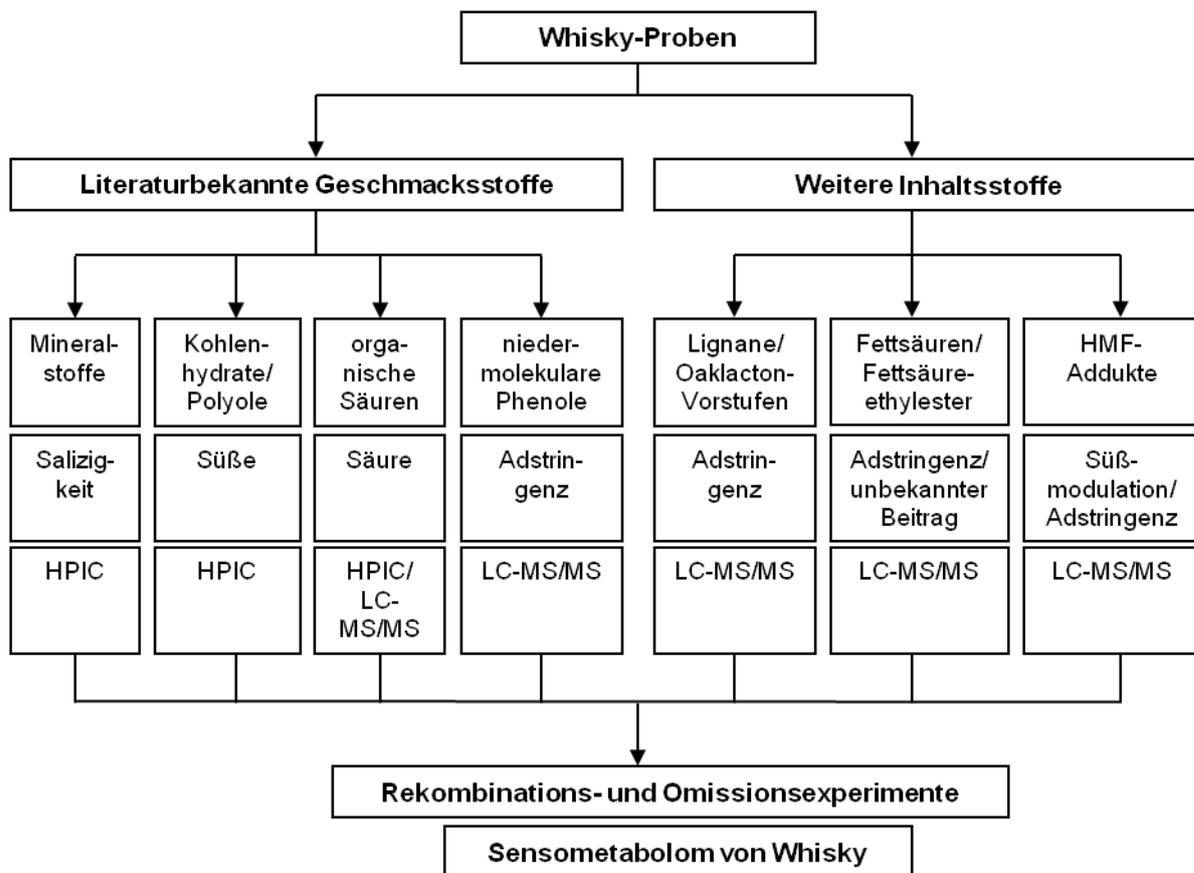


Abbildung 74: Schematische Darstellung der verwendeten Methoden zur Quantifizierung des Sensometaboloms von Whisky und der assoziierten Geschmackseindrücke

2.5.1.1 Quantifizierung der Mineralstoffe

Um festzustellen, ob und welchen Beitrag Mineralstoffe zum Geschmack des Whiskys leisten, wurden diese mittels HPIC quantifiziert. Die Whiskys wurden hierfür im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt und in Wasser wieder aufgenommen. Die Aufarbeitung war notwendig, um Ethanol aus den hochprozentigen Proben zu entfernen, da dies die Analyse mittels HPIC negativ beeinflusst hätte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 aufgeführt. Die stark unterschiedlichen Konzentrationen in den vorliegenden Proben sind insbesondere auf das bei der Herstellung in der jeweiligen Destillerie verwendete Wasser zurückzuführen. Wasser wird dabei während des Maischens zugesetzt, aber auch gegen Ende des Herstellungsprozesses bei der Rückverdünnung auf Trinkstärke. Der Vergleich der analysierten Whiskys untereinander zeigt, dass der bayerische Whisky „BSM1“ relativ hohe Gehalte an Natrium, Kalium und Sulfat und der Scotch „SSM4“ hohe Kaliumkonzentrationen aufweist.

Tabelle 15: Konzentrationen der mittels HPIC quantifizierten Mineralstoffe in Whiskys^a [$\mu\text{mol/l}$] (Methode: vgl. 3.6.2).

Probe Analyt	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Natrium	91	148	122	917	217	200	257	326	261	1678
Kalium	444	446	321	269	382	438	1026	246	305	626
Calcium	45	38	200	30	38	63	53	28	150	83
Ammonium	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18	24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Magnesium	n.d.	n.d.	100	n.d.						
Chlorid	6	23	45	118	11	158	96	17	34	42
Sulfat	14	10	29	36	47	53	210	19	10	573

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs; n.d.: nicht detektierbar

2.5.1.2 Quantifizierung der Säuren

Glabasnia (2007) beschreibt, dass Ameisensäure und Essigsäure einen wichtigen Beitrag zum sauren Geschmack von Whisky leisten. Neben diesen beiden flüchtigen Säuren, die mittels HPIC bestimmt wurden, wurden die nichtflüchtigen organischen Säuren Äpfelsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure, Oxalsäure und Citronensäure, mittels LC-MS/MS quantifiziert (Tabelle 16).

Essigsäure, die fermentativ und oxidativ aus Ethanol über Acetaldehyd gebildet wird, ist in allen analysierten Proben mengenmäßig dominierend. Die höchste Konzentration weist hierbei die Probe „AB3“ auf (8,9 mmol/l). Neben der Essigsäure wurden in den Proben auch hohe Gehalte, zwischen 0,4 und 1,8 mmol/l, an Ameisensäure nachgewiesen. Die nichtflüchtigen Säuren wurden dabei in deutlich geringeren Mengen nachgewiesen. So wurden die höchsten Gehalte bei Milchsäure in Probe „SSM4“ mit 0,2 mmol/l ermittelt. Die quantitativen Werte von Äpfel-, Bernstein-, Oxal- und Citronensäure lagen jeweils unterhalb von 0,1 mmol/l.

Tabelle 16: Konzentrationen der mittels HPIC und LC-MS/MS quantifizierten organischen Säuren in Whiskys^a [$\mu\text{mol/l}$] (Methode: vgl. 3.6.4).

Probe Analyt	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Essigsäure	5923,3	5670,0	8898,3	2816,7	4621,7	4990,0	5365,0	2288,3	3303,3	4901,7
Ameisensäure	1117,4	867,4	1028,3	369,6	1132,6	921,7	513,0	876,1	717,4	1780,4
Milchsäure	30,0	25,6	34,4	38,9	158,9	112,2	238,9	76,7	80,0	143,3
Äpfelsäure	38,1	33,6	49,3	3,7	41,0	24,6	70,1	0,7	9,7	56,0
Bernsteinsäure	20,3	14,4	20,3	4,2	11,0	11,9	62,7	5,1	5,1	25,4
Oxalsäure	8,9	42,2	31,1	8,9	20,0	5,6	15,6	4,4	20,0	6,7
Citronensäure	n.d.	3,1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	27,1	n.d.	n.d.	5,2

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs; n.d.: nicht detektierbar

2.5.1.3 Quantifizierung der Kohlenhydrate und Polyole

Süßschmeckende Kohlenhydrate und Polyole wurden mittels HPIC quantitativ bestimmt. Die analysierten Whiskyproben wurden hierfür im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt und in Wasser resolvtisiert. Die generierten quantitativen Daten sind in Tabelle 17 dargestellt.

Kohlenhydrate, wie zum Beispiel Glucose, Arabinose, Rhamnose, Fructose oder Galactose stammen aus dem Holzfass und migrieren während der Lagerung in den Whisky. Gebildet werden sie durch den Abbau von Holzpolymeren, Cellulose und Hemicellulose. Probe „BSM1“ zeigt vergleichsweise hohe Konzentrationen an Glucose (3,8 mmol/l) und Fructose (4,7 mmol/l). Außerdem zeigen die europäischen Whiskyproben tendenziell höhere Fructosegehalte im Vergleich zu den drei amerikanischen Proben. Im europäischen Recht ist der Zusatz von Zuckercouleur zum Färben von Whisky mit der Voraussetzung erlaubt, dass dieser keinen Einfluss auf dessen Geschmack hat. Eine unvollständige Umsetzung der verwendeten Saccharide bei der Herstellung von Zuckercouleur könnte folglich die erhöhten Konzentrationen erklären. Glycerin wird als Nebenprodukt der Hefefermentation beschrieben. Ansteigende Glycerin-Konzentrationen während der Fassreifung weisen außerdem auf Vorläufermoleküle des Glycerins aus dem Holz hin (*Nishimura und Matsuyama*, 1989). Der Scotch „SSM4“ weist die höchsten Glycerinmengen mit 3,3 mmol/l auf, während die Bourbons (AB1 – 3) die geringsten Gehalte an Glycerin zeigen (0,03 – 0,05 mmol/l).

Tabelle 17: Konzentrationen der mittels HPIC quantifizierten Kohlenhydrate und Polyole in Whiskys^a [$\mu\text{mol/l}$] (Methode: vgl. 3.6.3).

Probe Analyt	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Glycerin	29,9	31,2	49,4	131,7	686,8	412,2	3271,9	91,5	301,7	922,7
Glucose	283,7	320,4	444,0	106,2	1007,2	235,2	332,2	387,5	264,7	3844,4
Fructose	n.d.	n.d.	16,5	n.d.	605,3	66,3	65,8	152,5	76,5	4659,5
Sorbitol	308,6	6,5	4,2	85,0	n.d.	2,5	2,6	2,5	0,8	n.d.
Arabinose	283,0	369,2	500,2	103,2	116,5	209,0	237,8	46,0	207,3	289,6
Rhamnose	65,9	85,8	90,9	4,3	18,5	38,7	29,2	7,9	12,4	44,4
Galactose	21,3	26,4	36,2	n.d.	n.d.	7,0	22,6	7,0	22,6	n.d.
Erythritol	n.d.	n.d.	n.d.	1,6	10,4	3,9	29,1	2,4	3,4	23,7

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slys; n.d.: nicht detektierbar

2.5.1.4 Quantifizierung der niedermolekularen Phenole

Glabasnia (2007) bestimmte die wichtigsten Polyphenole in Bourbon Whiskey mit adstringierendem Geschmacksbeitrag, wie zum Beispiel Ellagsäure, Gallussäure und Syringaldehyd (**20**). Neben den von ihm beschriebenen niedermolekularen Phenolen wurden aufgrund der hohen Ethanolmengen in Whisky auch die Ethylester phenolischer Säuren

quantitativ bestimmt. *Hufnagel und Hofmann* (2008 a) veröffentlichten die quantitativen Daten dieser Ester in Rotwein und bestimmten auch ihre Geschmacksschwellenwerte. Außerdem wurden das in Whisky bekannte Coumarin Scopoletin (*Pryde et al.*, 2011; *Puech et al.*, 1988) und die Aldehyde 3,4-Dihydroxy- sowie 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd analysiert. Die Quantifizierung der niedermolekularen Phenole erfolgte mittels LC-MS/MS im MRM-Modus. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Konzentrationen der mittels LC-MS/MS quantifizierten niedermolekularen Phenole in Whiskys^a [$\mu\text{mol/l}$] (Methode: vgl. 3.6.5).

Probe Analyt	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Syringaldehyd (20)	70,77	65,44	125,27	4,62	25,77	45,66	39,83	7,31	15,93	45,50
Sinapaldehyd (21)	37,26	6,92	50,87	0,43	7,98	27,93	30,29	3,17	2,55	48,32
Gallussäure	42,29	23,88	64,06	0,29	35,94	26,24	44,39	5,94	19,65	46,98
Ellagsäure	16,49	20,70	20,36	4,70	22,88	22,09	6,23	6,36	15,00	5,96
Syringinsäure (43)	25,20	18,59	57,22	2,98	9,09	11,92	13,46	2,17	7,02	19,47
Vanillin (22)	17,19	17,81	33,81	2,82	10,50	10,92	11,53	2,33	6,30	19,25
Coniferylaldehyd (37)	21,91	16,74	27,30	0,67	4,83	14,89	28,58	1,57	2,53	53,85
Furan-2-carbonsäure	24,73	22,77	34,55	2,95	8,30	24,20	9,71	4,29	5,98	13,17
Vanillinsäure (40)	11,43	10,12	29,23	1,96	4,40	5,83	6,84	1,19	4,29	10,52
Protocatechussäure	6,60	6,14	12,88	1,83	4,18	4,12	4,59	0,98	3,59	4,53
Gallussäureethylester	1,41	1,92	4,55	1,01	3,84	3,18	2,26	0,76	3,03	1,80
Ferulasäure	1,03	1,13	1,80	0,15	0,77	1,03	0,36	0,26	0,62	0,43
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	1,15	1,23	2,54	0,25	0,74	0,90	2,73	0,08	0,49	2,63
4-Hydroxybenzoesäure (38)	1,01	1,16	2,32	0,22	0,58	0,72	0,81	0,07	0,36	0,93
Gallussäuremethylester	0,16	0,11	0,27	n.d.	0,11	0,16	0,08	n.d.	n.d.	0,12
Sinapinsäure	0,12	0,15	0,40	n.d.	0,00	0,06	0,12	n.d.	0,04	0,24
Ferulasäureethylester	0,06	0,09	0,26	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,38
Vanillinsäureethylester (41)	1,84	2,78	3,98	0,12	0,86	0,92	2,09	0,08	0,51	1,64
Protocatechussäureethylester	0,57	0,69	1,32	0,39	0,47	0,67	1,21	0,14	0,48	0,90
Syringinsäureethylester	2,58	2,47	4,40	0,19	0,84	0,98	2,46	0,18	1,04	1,21
4-Hydroxybenzoesäureethylester	0,04	0,07	0,11	n.d.	0,03	n.d.	0,12	n.d.	0,03	0,05
Gentisinsäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,05
Scopoletin	1,75	3,38	2,15	0,52	1,10	1,71	1,45	0,28	0,95	2,87
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24)	1,38	1,15	2,52	0,34	0,94	1,31	1,39	0,28	0,79	1,62
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28)	0,13	0,01	0,29	n.d.	0,17	0,17	0,37	0,02	0,10	0,17

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs; n.d.: nicht detektierbar

Mengenmäßig dominierende Verbindungen sind demnach die Aldehyde, Syringaldehyd, Sinapaldehyd (**20**), Vanillin (**22**) und Coniferylaldehyd (**37**), und die Säuren, Gallus-, Ellag-, Furan-2-carbon- und Vanillinsäure (**40**).

„AB3“ weist dabei beim Großteil der bestimmten Analyten die höchsten Konzentrationen auf. Die analysierten Bourbons (AB1 - 3) und der bayerische Whisky (BSM1) wurden jeweils in neuen Weißbuchenfässern gelagert und zeigen höhere Konzentrationen der niedermolekularen Phenole, als die schottischen Whiskys. „SSM3“ sticht beim Vergleich der schottischen Whiskys (SSM1 – 4, SB1 – 2) untereinander mit hohen Phenolkonzentrationen hervor. Hierbei handelt es sich um einen Single Malt mit einer Mindestlagerungszeit von 14 Jahren mit einem „Virgin Oak Finish“. Dies bedeutet bei diesem Single Malt, dass er zuletzt in einem neuen Fass aus amerikanischer Eiche gelagert wurde.

2.5.1.5 Quantifizierung der Fettsäuren und Fettsäureethylester

Untersuchungen zur Bildung aromaaktiver Verbindungen durch Hefen zeigten, dass Fettsäuren und dessen Ester, neben den Fuselalkoholen, zu deren wichtigsten Metabolitklassen gehören (*Soumalainen und Lehtonen, 1979*). Somit gelangen die Fettsäuren während der Gärung in die Whiskymaische. Quantitative Untersuchungen der Fettsäuren in Spirituosen aus unterschiedlichen Rohstoffen mittels GC-FID nach Methylierung verdeutlichen, dass der verwendete Hefestamm und die Fermentationsbedingungen einen größeren Einfluss auf die gebildeten Verbindungen haben, als die verwendeten Rohstoffe (*Nykänen et al., 1968*).

Die mittelkettigen Fettsäuren, Caprin- und Laurinsäure, wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits als Markerverbindungen für SSM1 im Vergleich zu AB2 (vgl. 2.2.2.1) identifiziert. Für eine absolute Quantifizierung wurden die mittleren und höheren Fettsäuren mit gerader Anzahl an Kohlenstoffatomen mittels LC-MS/MS quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Die dominierenden Fettsäuren sind hierbei Decan-, Dodecan-, Palmitolein- und Octansäure. Die Single Malts SSM2, SSM3 und SSM4 zeigen im Vergleich der analysierten Proben die höchsten Konzentrationen. Die höchste Fettsäurekonzentration konnte in SSM2 für Decansäure mit über 600 µmol/l bestimmt werden. Die drei analysierten Bourbon Whiskys (AB1 – 3) zeigen im Vergleich mit den anderen Proben durchwegs geringere Mengen an mittel- und langkettigen Fettsäuren. Besonders AB1 weist nur sehr geringe Konzentrationen auf. Die quantitativen Daten bestätigen somit, dass Decan- und Dodecansäure geeignete Marker für „Nicht-Bourbons“ sind. Beim Herstellungsprozess von AB1, einem Tennessee Whiskey, ist bekannt, dass das Destillat durch eine Kohleschicht aus Zuckerahorn gefiltert

wird, bevor man es in neue, frisch ausgekohlte Eichenholzfässer abfüllt. Desweiteren wird für die Herstellung von Bourbons durchwegs das *Sour-mash*-Verfahren angewendet und könnte folglich einen Einfluss auf den Hefemetabolismus haben.

Tabelle 19: Konzentrationen der mittels LC-MS/MS quantifizierten Fettsäuren in Whiskys^a [$\mu\text{mol/l}$] (Methode: vgl. 3.6.6).

Probe Analyt	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Octansäure	n.d.	13,0	10,8	43,6	121,1	99,3	78,3	109,9	56,5	33,2
Decansäure	25,0	39,1	55,1	143,3	620,2	543,0	501,4	232,0	196,0	323,9
Dodecansäure	n.d.	10,1	12,0	57,8	166,5	176,8	170,3	82,5	146,2	127,9
Myristinsäure	n.d.	2,7	2,6	16,0	29,3	64,2	67,5	11,5	21,3	46,7
Palmitinsäure	1,3	2,4	2,1	4,8	6,3	60,3	51,2	18,3	6,4	36,7
Stearinsäure	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,7	2,6	0,2	0,1	0,9
Palmitoleinsäure	n.d.	n.d.	n.d.	18,3	41,9	195,6	186,2	27,8	44,8	28,2
Ölsäure	0,1	0,6	0,2	0,1	0,3	3,0	3,3	0,2	0,3	2,5
Linolsäure	0,1	0,9	0,3	0,3	0,4	2,6	3,8	0,7	0,2	6,9
Linolensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,1	0,9	1,5	1,8	n.d.	2,4

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs; n.d.: nicht detektierbar

Fettsäureethylester (FSEE) sind bekannte und wichtige aromaaktive Bestandteile von Spirituosen, die während der Fermentation gebildet werden. Besonders die leicht flüchtigen und fruchtig riechenden Ester, wie Ethyloctanoat und -hexanoat, besitzen hohe Aromawerte (vgl. Tabelle 2; *Poisson und Schieberle (2008a & b)*). Ein möglicher Beitrag zum Geschmack von Whiskys wurde bis dato nicht untersucht. Wie die Ergebnisse aus dem Abschnitt 2.2.2.1 und der Quantifizierung verdeutlichten, zeigen die Fettsäuren prägnante Konzentrationsunterschiede in den verschiedenen Sorten. Eine Quantifizierung der FSEE schien folglich interessant bezüglich weiterer sortenspezifischer Unterschiede und war im Hinblick auf Rekombinations- und Omissionsexperimente essentiell.

Ihre quantitative Bestimmung erfolgte bislang zumeist mittels GC-MS. Nach dem Test verschiedener Ionisierungsmethoden wurden die FSEE im Rahmen dieser Arbeit schließlich mittels LC-MS/MS mit APCI im positiven Modus quantifiziert. Ethyloctanoat war bei der Analyse der Ester mit kürzester Kohlenstoffkettenlänge. Die quantitativen Daten sind in Tabelle 20 dargestellt.

Die dominierenden Fettsäureethylester in den analysierten Whiskys sind Ethyldecanoat, Ethyllaurat und Ethyloctanoat. Die Proben AB1 und SSM1 zeigen die geringsten Konzentrationen an FSEE (Gesamtmenge 2,5 bzw. 2,0 mg/l). Die höchsten Gehalte an Decansäureethylester wurden in den drei Single Malts SSM3, SSM2 und BSM1 nachgewiesen (163, 127 und 111 $\mu\text{mol/l}$). Auch Ethylpalmitoleat, ein Ester einer ungesättigten Fettsäure, ist in SSM3 in vergleichsweise großen Mengen mit 29 $\mu\text{mol/l}$

enthalten. Der Vergleich der generierten Daten der FSEE mit denen der Fettsäuren (Tabelle 19) zeigt, dass generell Proben mit hohen Fettsäurekonzentrationen auch größere Mengen an FSEE enthalten, aber eine direkte Korrelation nicht möglich ist.

Tabelle 20: Konzentrationen der mittels LC-MS/MS quantifizierten Fettsäureethylester in Whiskys^a [$\mu\text{mol/l}$] (Methode: vgl. 3.6.7).

Probe Analyt	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Ethyloctanoat	7,5	43,6	42,0	7,8	92,2	93,7	50,9	18,3	40,9	48,4
Ethyldecanoat	4,5	46,5	37,9	2,8	126,8	163,0	85,2	44,8	74,2	111,3
Ethyllaurat	0,8	10,2	9,0	n.d.	43,3	109,6	43,0	24,7	34,3	83,5
Ethylmyristat	n.d.	0,8	0,7	n.d.	3,1	17,2	6,4	3,5	2,0	11,2
Ethylpalmitat	0,4	1,0	0,7	0,2	1,7	22,1	9,4	2,5	2,6	14,3
Ethylpalmitoleat	n.d.	0,1	0,1	n.d.	4,0	29,1	19,8	4,2	4,0	8,6
Ethylstearat	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,7	0,1	0,1	0,2

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs; n.d.: nicht detektierbar

2.5.1.6 Quantifizierung der Bourbon-spezifischen Geschmacksstoffe

Wie unter 2.2.2.2 bereits beschrieben, gelang die Identifizierung von acht Bourbon-Markerverbindungen nach deren Isolierung aus Eichenholz. Dabei handelt es sich zum einen um drei glykosidische Verbindungen des Oaklactons und zum anderen um das Lignan Lyoniresinol (4) und vier Derivate dieser Verbindung. Die Gruppe um Koga et al. (2007) bestimmten die Menge an Lyoniresinol (4) in einem japanischen Single Malt mittels HPLC-UV (11,1 ppm). Marchal et al. (2014) quantifizierten das Lignan in unterschiedlich gelagerten Weißweinen mittels LC-HRMS und stellten die höchste Konzentration an Lyoniresinol (4) von 1,7 mg/l (\cong 4 $\mu\text{mol/l}$) bei dem Wein fest, der zuvor fünf Monate in einem neuen Eichenholzfass gelagert wurde. Sie zeigten mit ihren Untersuchungen, dass Lignane durch die Eichenfasslagerung in den Wein gelangten. Wilkinson et al. (2013) untersuchten die Glykokonjugate der 3-Methyl-4-hydroxyoctansäure in französischen Eichenholzextrakten mittels LC-MS/MS, quantitative Daten für alkoholische Getränkeproben liegen jedoch nicht vor. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung der Bourbon-Markerverbindungen (1 - 8) in zehn Whiskyproben mittels LC-MS/MS im MRM-Modus. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 gelistet.

Tabelle 21: Konzentrationen der mittels LC-MS/MS quantifizierten Bourbon-Marker Verbindungen in Whiskys^a [$\mu\text{mol/l}$] (Methode: vgl. 3.6.5)

Probe Analyt	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Oaklacton galloylglucosid (1)	2,62	0,54	3,62	0,14	0,77	1,07	1,01	0,24	0,54	1,41
Oaklacton glucosid (2)	1,27	2,95	1,71	0,10	0,25	0,75	0,36	0,01	0,09	1,06
Oaklacton rutinosid (3)	1,47	2,53	2,05	n.d.	0,38	0,69	0,49	n.d.	0,28	1,09
Lyoniresinol (4)	29,05	2,01	45,48	2,84	11,68	16,18	12,89	1,62	7,10	13,10
(+)-Lyoniresinol-xylosid (5)	1,33	0,28	2,20	0,15	0,78	0,72	0,89	0,10	0,36	0,61
(-)-Lyoniresinol-xylosid (6)	1,13	0,20	1,80	0,15	0,91	0,64	0,69	0,12	0,41	0,58
Lyoniresinol-glucosid (7)	2,21	0,29	2,63	0,23	0,92	0,94	0,88	0,16	0,51	0,87
Lyoniresinol-9-O-gallat (8)	0,17	n.d.	0,27	n.d.	0,08	0,06	0,08	n.d.	0,02	0,09

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slys; n.d.: nicht detektierbar

4 war in allen zehn Proben der Analyt mit der höchsten Konzentration zwischen 1,62 bis 45,48 $\mu\text{mol/l}$. Das Verhältnis der beiden Diastereomeren **5** und **6** ist in den untersuchten Proben meist 1 zu 1. Bezüglich der Oaklacton-Präkursoren (**1** – **3**) ist das Oaklacton-Galloylglucosid (**1**) mengenmäßig dominierend. Im Vergleich der Proben untereinander zeigt AB3 die höchsten Konzentrationen an den bestimmten Bourbon-Markerverbindungen. Wie bereits bei der Quantifizierung der niedermolekularen Phenole (vgl. 0) zu sehen war, weisen die Whiskys, die während ihrer Lagerung in Kontakt mit amerikanischer Eiche waren, das sind die Bourbons AB1 - 3, der bayerische Single Malt BSM1 und der schottische Single Malt SSM3 mit „Virgin Oak Finish“, höhere Mengen an **1** - **8** auf. Die identifizierten Bourbon-Markerverbindungen sind folglich geeignete Markersubstanzen für Whiskys, die während ihrer Lagerung Kontakt mit neuen, amerikanischen Eichenholzfässern hatten.

2.5.1.7 Quantifizierung der süßmodulierenden HMF-Derivate

Wie bereits unter 2.3.3 beschrieben wurden HMF (**9**) und dessen Derivate AcMF (**10**), EMF (**11**), MMF (**12**), sowie VanMF (**19**) in der Whiskyprobe AB1 und dessen Fraktionen identifiziert. Zur Generierung qualitativer und quantitativer Daten bezüglich dieser Substanzgruppe in verschiedenen Whiskysorten wurde eine LC-MS/MS Methode unter der Verwendung eines Triple-Quadrupol-Gerätes mit Electrospray Ionisierung im positiven Modus entwickelt. Hierbei wurde die SIVA angewendet.

11 wurde von *Cámara et al.* (2004 & 2006) bereits in Madeiraweinen mittels GC-MS unter der Zuhilfenahme von 3-Octanol als internen Standard relativ quantifiziert. Quantitative Studien zu HMF-Derivate in fassgelagerten Spirituosen wurden in der Vergangenheit noch nicht durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 aufgezeigt. Mengenmäßig dominiert **9** in den untersuchten Whiskys. Die Gehalte liegen dabei zwischen dem geringsten Wert von 1,10 µmol/l in Probe SSM1 und dem maximalen Wert von 77,41 µmol/l in Probe AB3. Weiterhin wurden die Derivate **10**, **11**, **12** und **19** in den Whiskys identifiziert und quantifiziert. Die Alkoxyderivate *p*PMF (**13**), *n*PMF (**14**), *n*BMF (**15**), PhEMF (**18**) und auch 2- und 3MBMF (**16/17**) wurden in den untersuchten Whiskys nicht identifiziert. Die höchsten Konzentrationen an **9**, **11** und **12** wurden in der Probe AB3 gefunden. Vergleicht man die quantitativen Daten von **10**, so zeigen BSM1 und SSM4 die höchsten Konzentrationen. **19** wurde in den Proben SSM1, SSM2, SB1 und SB2 nicht nachgewiesen.

Tabelle 22: Konzentrationen der mittels LC-MS/MS quantifizierten HMF-Derivate in Whiskys^a [µmol/l] (Methode: vgl. 3.6.8).

Probe Analyt	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
HMF (9)	42,06	23,53	77,41	1,10	27,71	26,35	44,29	42,18	24,95	57,89
AcMF (10)	0,19	0,08	0,14	0,02	0,03	0,21	0,28	0,09	0,04	0,53
EMF (11)	0,05	0,06	0,24	0,02	0,14	0,04	0,11	0,12	0,01	0,09
MMF (12)	0,03	0,02	0,07	0,00	0,01	0,02	0,04	0,00	0,11	0,04
<i>p</i> PMF (13)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>n</i> PMF (14)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>n</i> BMF (15)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MBMF (16/17)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PhEMF (18)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VanMF (19)	0,01	0,01	0,01	n.d.	n.d.	0,01	0,01	n.d.	n.d.	0,02

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs; n.d.: nicht detektierbar

2.5.2 Diskussion

Um weitere Einblicke in die molekulare Zusammensetzung von Whiskys zu erhalten, wurden mit Hilfe von quantitativen Untersuchungen sämtliche identifizierten sensorisch aktiven Substanzen in einer Auswahl von zehn verschiedenen Whiskys bestimmt. Neben Basisgeschmacksstoffen, wie Mineralstoffen, organischen Säuren, Kohlenhydraten und Polyolen sowie niedermolekularen Phenolen, wurden weitere Verbindungsgruppen quantifiziert, die als potentielle Geschmackstoffe in Whisky vorkommen. So wurden auch die Konzentrationen der Fettsäuren und deren Ethylester, der HMF-Derivate und der Bourbon-Markerverbindungen ermittelt.

Um einen besseren Überblick über alle quantifizierten Verbindungen zu bekommen, wurden diese in Abbildung 75 in Form einer Heat Map dargestellt. Neben Ethanol (nicht dargestellt) sind die Säuren Essig- und Ameisensäure, die Kationen Natrium und Kalium, die Hexose Glucose, die Pentose Arabinose sowie Glycerin mengenmäßig dominierend. Wie am

Beispiel der Essigsäure zu sehen ist, können ihre Konzentrationen bis zu 8900 $\mu\text{mol/l}$ erreichen.

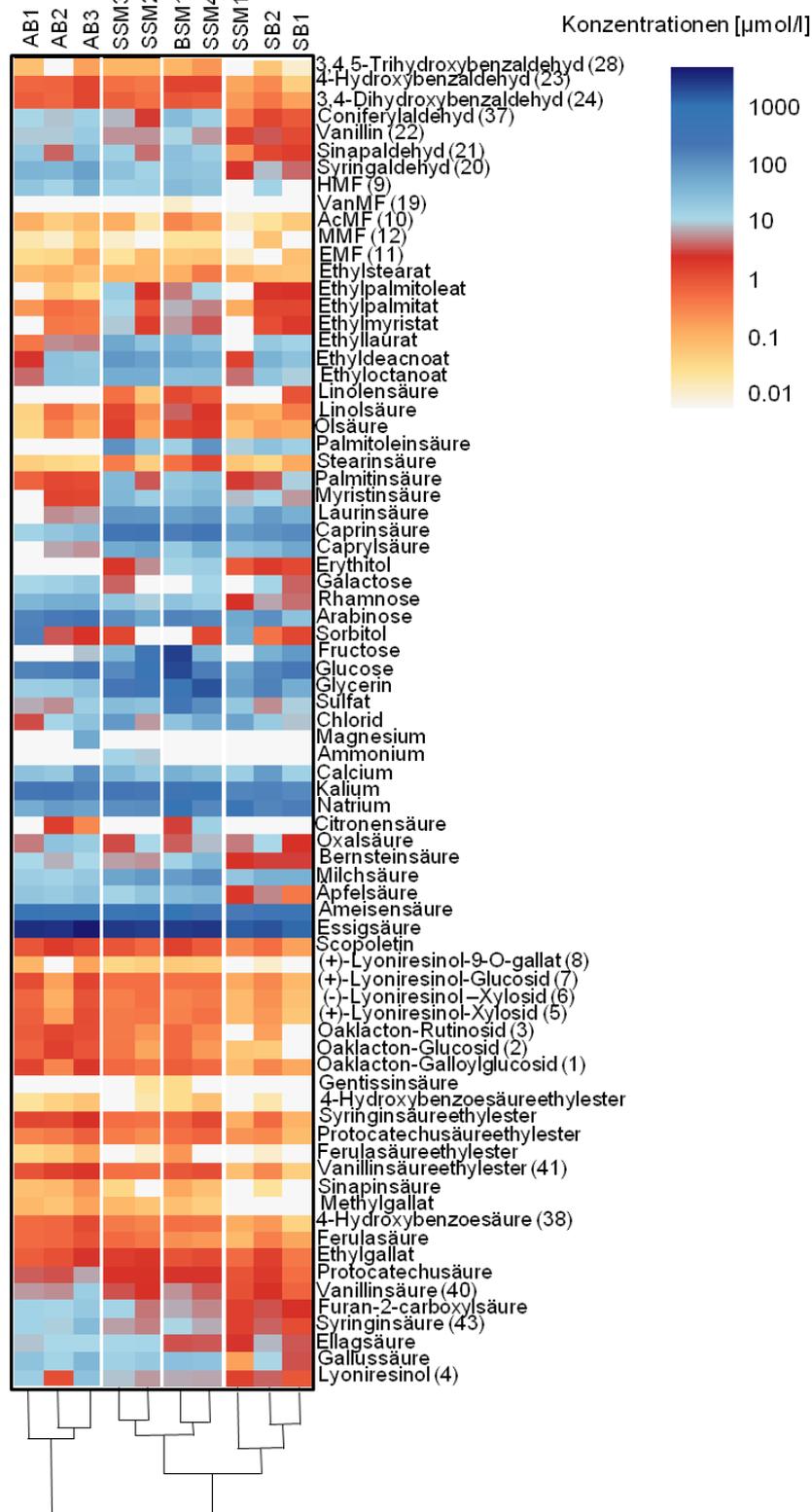


Abbildung 75: Heat Map der quantifizierten Whiskyverbindungen in den Whiskys AB1 (Jack Daniel's), AB2 (Jim Beam), AB3 (Woodford Reserve), SSM1 (Bowmore), SSM2 (Glenfiddich), SSM3 (Glendronach), SSM4 (Ardbeg), SB1 (Johnnie Walker), SB2 (Chivas Regal) und BSM1 (Slyrs); Farbzunordnung der Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] auf der rechten Seite.

Abbildung 76 zeigt die Daten nochmals in skaliertem Form. So werden die relativen Unterschiede der analysierten Proben besser sichtbar. Bezüglich der quantifizierten Mineralstoffe heben sich Probe „BSM1“ mit relativ hohen Natrium- und Sulfatkonzentrationen und Probe „SSM4“ mit hohen Kaliumkonzentrationen deutlich hervor. SSM4 zeigt außerdem im Vergleich der Proben untereinander die höchsten Gehalte der nichtflüchtigen Säuren Milch-, Äpfel- und Bernsteinsäure, und des Polyols Glycerin. Bezüglich der quantifizierten Monosaccharide tritt BSM1 mit den höchsten Glucose- und Fructosemengen hervor. Arabinose, Rhamnose und Galactose sind vergleichsweise in größeren Mengen in den Bourbons AB1 – 3 gefunden worden.

Die mittelkettigen Fettsäuren, Caprin- und Laurinsäure, wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits als Markerverbindungen für SSM1 im Vergleich zu AB2 identifiziert (vgl. 2.2.2.1). Nun zeigen die skalierten Ergebnisse in Abbildung 76 nach der absoluten Quantifizierung der Fettsäuren und deren Ethylester die Unterschiede in allen untersuchten Whiskys und verdeutlichen, dass die drei analysierten Bourbon Whiskys (AB1 – 3) und SSM1 die vergleichsweise geringsten Mengen enthalten. SSM3 zeigt neben höheren Fettsäurekonzentrationen im Vergleich von allen Proben die höchsten Gehalte aller bestimmten Fettsäureethylester.

AB3 weist bei einem Großteil der bestimmten phenolischen Verbindungen, darunter auch die Bourbon-Markerverbindungen, die vergleichsweise höchsten Konzentrationen auf. Die in neuen Weißbierfässer gelagerten Whiskys, AB1 – 3, BSM1 und SSM3 zeigen die höchsten Gehalte an phenolischen Substanzen, die während der Lagerung aus dem Holzfass in den Whisky übergegangen sind.

Die unter 2.2.2.2 identifizierten Bourbon-Markerverbindungen, Oaklacton und Lyoniresinol Glykokonjugate wurden erstmals in verschiedenen Whiskysorten quantifiziert. Hierzu wurde eine Quantifizierungsmethode mittels LC-MS/MS (Modus: ESI⁺) im MRM-Modus entwickelt. Quantitative Studien der bereits in der Literatur beschriebenen Holzbestandteile erfolgten bis dato nur in Holzextrakten und Weinen (*Wilkinson et al.*, 2013; *Marchal et al.*, 2014)

Die HMF-Derivate wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals in Whisky qualitativ und quantitativ bestimmt. *Câmara et al.* (2004 & 2006) quantifizierten das EMF (**11**) bereits in Madeiraweinen mittels GC-MS. Quantitative Studien zu HMF-Derivaten in Spirituosen wurden in der Vergangenheit noch nicht durchgeführt. Durch die Synthese isopenmarkierter Standards von EMF (**11**) und MMF (**12**) gelang es, eine SIVA mittels LC-MS/MS (Modus: ESI⁺) zu entwickeln. Der skalierte Vergleich der ermittelten Konzentrationen in Abbildung 76 zeigt, dass die höchsten Konzentrationen an HMF (**9**), EMF (**11**) und MMF (**12**) in der Probe AB3 gefunden wurden. Probe BSM1 zeigte vergleichsweise hohe Gehalte an AcMF (**10**) und VanMF (**19**).

Die ermittelten quantitativen Daten dienen als Grundlage für die Berechnung von DoT-Faktoren und waren essentiell für die Durchführung von Rekombinations- und Omissionsexperimenten (vgl. 2.6).

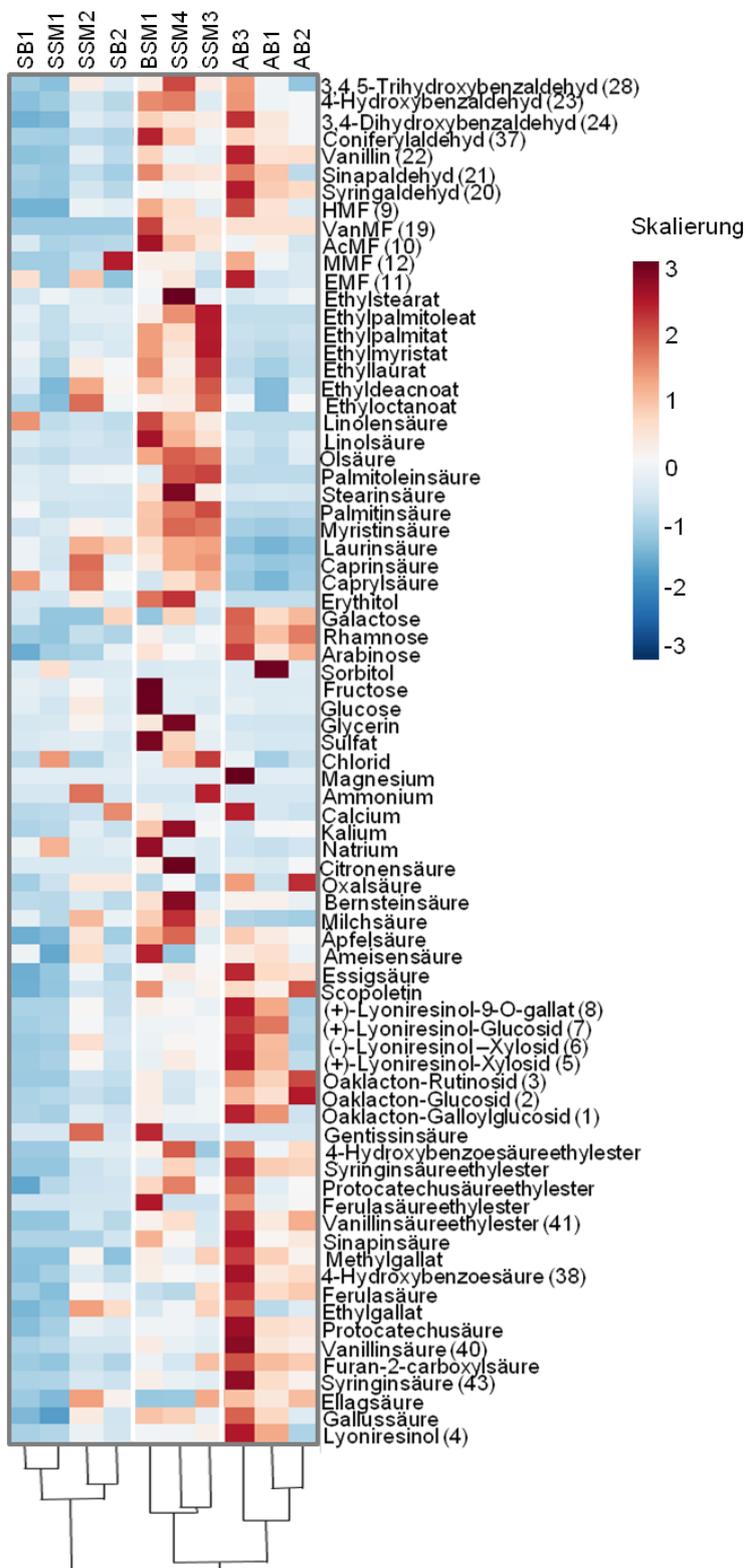


Abbildung 76: Heat Map der quantifizierten Whiskyverbindungen in den Whiskys AB1 (Jack Daniel's), AB2 (Jim Beam), AB3 (Woodford Reserve), SSM1 (Bowmore), SSM2 (Glenfiddich), SSM3 (Glendronach), SSM4 (Ardbeg), SB1 (Johnnie Walker), SB2 (Chivas Regal) und BSM1 (Slirs); Farbzunordnung der skalierten Konzentrationen der rechten Seite.

2.6 Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge, Rekombinations- und Omissionsexperimente

Genauere Information über den Geschmacksbeitrag von identifizierten, isolierten und quantifizierten Verbindungen in Whisky konnten unter Zuhilfenahme von Geschmacksschwellenwerten in Form von DoT-Faktoren generiert werden. Zum einen waren Schwellenwerte von Whisky-Inhaltsstoffen bereits in der Literatur beschrieben. Zum anderen wurden sie sensorisch ermittelt.

2.6.1 Geschmacksschwellenwerte whiskyrelevanter Verbindungen aus der Literatur

Geschmackseindrücke und Schwellenwertkonzentrationen von einigen Whisky-relevanten Verbindungsgruppen wurden bereits in der Literatur beschrieben. Die Daten von *Glabasnia* (2007) (*), *Hufnagel und Hofmann* (2008) (**) und *Toelstede und Hofmann* (2008) (***) sind in Tabelle 23 bis Tabelle 27 aufgelistet.

Tabelle 23: Geschmackseindrücke und Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] von whiskyrelevanten Kohlenhydraten und Polyolen nach *Glabasnia* (2007)* und *Hufnagel und Hofmann* (2008)**

Verbindung	Geschmackseindruck	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]
Glycerin	süß	81200*
Glucose	süß	18000*
Fructose	süß	10200*
Sorbitol	süß	33800**
Arabinose	süß	17700*
Rhamnose	süß	11800*
Galactose	süß	50000*
Erythritol	süß	36300**

Tabelle 24: Geschmackseindrücke und Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] von whiskyrelevanten Mineralstoffen nach *Glabasnia* (2007)* und *Hufnagel und Hofmann* (2008)**

Verbindung	Geschmackseindruck	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]
Natrium	salzig	3900*
Kalium	salzig	12600*
Calcium	salzig	3100*
Ammonium	salzig	5000**
Magnesium	salzig	3200*
Chlorid	salzig	3900*
Sulfat	salzig	5200*

Tabelle 25: Geschmackseindrücke und Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] von whiskyrelevanten organischen Säuren nach *Glabasnia (2007) und *Hufnagel und Hofmann (2008)*****

Verbindung	Geschmackseindruck	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]
Essigsäure	sauer	1990*
Ameisensäure	sauer	4300*
Äpfelsäure	sauer	3690*
Milchsäure	sauer	15480**
Bernsteinsäure	sauer	900*
Oxalsäure	sauer	5600*
Citronensäure	sauer	2600*

Tabelle 26: Geschmackseindrücke und Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] von whiskyrelevanten Phenolen nach *Glabasnia (2007) und *Hufnagel und Hofmann (2008)*****

Verbindung	Geschmackseindruck	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]
Gallussäure	adstringierend	292*
Methylgallat	adstringierend	232*
Ethylgallat	adstringierend	185*
4-Hydroxybenzoesäure	adstringierend	670*
Protocatechussäure	adstringierend	208*
Gentisinsäure	adstringierend	123*
Vanillinsäure	adstringierend	315*
Syringinsäure	adstringierend	263*
Vanillin	adstringierend	829*
Syringaldehyd	adstringierend	331*
Ferulasäure	adstringierend	67*
Sinapinsäure	adstringierend	76*
Coniferylaldehyd	adstringierend	184*
Sinapaldehyd	adstringierend	321*
Furan-2-carboxylsäure	adstringierend	160*
Ellagsäure	adstringierend	7*
5-Hydroxymethylfurfural	adstringierend	1032*
Vanillinsäureethylester	adstringierend	125**
Protocatechussäureethylester	adstringierend	49**
Ferulasäureethylester	adstringierend	67**
Syringinsäureethylester	adstringierend	18**

Tabelle 27: Geschmackseindrücke und Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] von whiskyrelevanten Fettsäuren nach *Toelstede und Hofmann (2008)****

Verbindung	Geschmackseindruck	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]
Octansäure	adstringierend	5200***
Decansäure	adstringierend	15500***

2.6.2 Sensorische Charakterisierung weiterer whiskyrelevanter Verbindungen

Zur Bestimmung der Geschmacksaktivität der aus Holz isolierten Substanzen sowie von weiteren Verbindungen, die in Whisky identifiziert wurden, wurden die Geschmacksschwellenwerte sensorisch ermittelt. Die Reinheit der isolierten Substanzen wurde zuvor mittels $^1\text{H-NMR}$ überprüft. Die Schwellenwertkonzentrationen wurden in einer Matrixlösung mit 2% Ethanol aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 bis Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 28: Geschmackseindrücke und Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] von Bourbon-Marker-Verbindungen

Verbindung	Geschmackseindruck	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]
Oaklacton-Galloylglucosid (1)	adstringierend	8,9
Oaklacton-Glucosid (2)	adstringierend	7,2
Oaklacton-Rutinosid (3)	adstringierend	6,7
Lyoniresinol (4)	adstringierend	31
(+)-Lyoniresinol-Xylosid (5)	adstringierend	14
(-)-Lyoniresinol-Xylosid (6)	adstringierend	48
Lyoniresinol-Glucosid (7)	adstringierend	27
Lyoniresinol-9-O-gallat (8)	adstringierend	30

Tabelle 29: Geschmackseindrücke und Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] von HMF-Derivaten

Verbindung	Geschmackseindruck	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]
EMF (11)	adstringierend	30
MMF (12)	adstringierend	200
iPMF (13)	adstringierend	600
nPMF (14)	adstringierend	300
BMF (15)	adstringierend	210
PhEMF (18)	adstringierend	90
VanMF (19)	adstringierend	30

Tabelle 30: Geschmackseindrücke und Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] weiterer Whiskykomponenten

Verbindung	Geschmackseindruck	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	adstringierend	153
Scopoletin	adstringierend	360
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24)	adstringierend	143
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28)	adstringierend	76

2.6.3 Berechnung der „Dose-over-Threshold“-Faktoren

Nach der Bestimmung aller Geschmacksschwellenwerte von Whisky-relevanten Geschmacksstoffen und deren Quantifizierung, wurden mittels dieser Daten „Dose-over-Threshold“(DoT)-Faktoren berechnet. Hierfür wurde die entsprechende Konzentration mit dem Schwellenwert ins Verhältnis gesetzt. Ist dieser berechnete Faktor > 1 , so bedeutet dies, dass eine Verbindung in Konzentrationen oberhalb des Schwellenwertes vorliegt und von einem direkten Geschmacksbeitrag auszugehen ist. Synergistische und additive Effekte können jedoch dafür ausschlaggebend sein, dass auch Verbindungen mit einem $\text{DoT} < 1$ eine wichtige Rolle beim Gesamtgeschmack spielen können. Die Berechnung der DoT-Faktoren erfolgte für alle identifizierten, adstringierenden (Tabelle 31), sauren (Tabelle 32), salzigen (Tabelle 33) und süßen (Tabelle 34) Verbindungen.

Der Vergleich der einzelnen DoT-Faktoren für adstringierende Substanzen (vgl. Tabelle 31) verdeutlicht, dass lediglich Ellagsäure und Lyoniresinol direkt zur Adstringenz beitragen, da beide DoT-Faktoren > 1 haben. Andere niedermolekulare Phenole weisen DoT-Faktoren $> 0,1$ auf. Diese Verbindungen, zum Beispiel Syringaldehyd, Gallussäure, Coniferylaldehyd oder Oaklacton-Vorläufer tragen nicht direkt zur Adstringenz bei, aber könnten aufgrund additiver und synergistischer Effekte einen Beitrag leisten.

Der Vergleich der vorliegenden Daten mit den ermittelten DoT-Faktoren für Ellagsäure in Bourbon Whiskey von *Glabasnia* (2007) zeigt vergleichbare Werte. Die Wissenschaftler um *Marchal et al.* (2014) stellten einen Beitrag der Lignane aus Eichenholz zum bitteren Geschmack von Wein fest und bestimmten dabei auch Geschmacksschwellenwerte für Lyoniresinol (**4**) in Weißwein. Daneben führten sie auch sensorische Experimente mit den Glykosiden **5**, **6** und **7**, sowie mit dem Ester **8** durch. Bei der Verkostung von je 10 mg/l der jeweiligen Verbindung in Wasser, einer 12-%-igen ethanolischen Lösung und in Weißwein zeigte **7** einen bitteren Geschmack. In Wasser wurde **8** als leicht süßlich beschrieben. Ihr Beitrag zur Adstringenz wurde nicht untersucht. Vergleichsdaten bezüglich Whiskys liegen zu den Bourbon-Markerverbindungen nicht vor.

Der Vergleich der Whiskys untereinander zeigt erneut, dass die in neuen amerikanischen Eichenfässern gelagerten Proben die höchsten DoT-Faktoren für adstringierende Verbindungen aufweisen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 31: Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] und DoT-Faktoren der adstringierenden Verbindungen der zehn Whiskyproben^a

Probe Analyt	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Lyoniresinol (4)	31	0,94	0,07	1,47	0,09	0,38	0,52	0,42	0,05	0,23	0,42
Syringaldehyd (20)	331	0,21	0,20	0,38	0,01	0,08	0,14	0,12	0,02	0,05	0,14
Sinapaldehyd (21)	321	0,12	0,02	0,16	<0,01	0,02	0,09	0,09	0,01	0,01	0,15
Gallussäure	292	0,14	0,08	0,22	<0,01	0,12	0,09	0,15	0,02	0,07	0,16
Ellagsäure	7	2,49	3,13	3,08	0,71	3,46	3,34	0,94	0,96	2,27	0,90
Syringinsäure (43)	263	0,10	0,07	0,22	0,01	0,03	0,05	0,05	0,01	0,03	0,07
Vanillin (22)	829	0,02	0,02	0,04	<0,01	0,01	0,01	0,01	<0,01	0,01	0,02
Coniferylaldehyd (37)	184	0,12	0,09	0,15	<0,01	0,03	0,08	0,16	0,01	0,01	0,29
Furan-2-carbonsäure	160	0,15	0,14	0,22	0,02	0,05	0,15	0,06	0,03	0,04	0,08
Vanillinsäure (40)	315	0,04	0,03	0,09	0,01	0,01	0,02	0,02	<0,01	0,01	0,03
Protocatechusäure	208	0,03	0,03	0,06	0,01	0,02	0,02	0,02	<0,01	0,02	0,02
Ethylgallat	185	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	<0,01	0,02	0,01
Ferulasäure	67	0,02	0,02	0,03	<0,01	0,01	0,02	0,01	<0,01	0,01	0,01
4-Hydroxybenzoesäure (38)	670	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Methylgallat	232	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Sinapinsäure	76	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ferulasäure-ethylester	67	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01
Vanillinsäure-ethylester	125	0,01	0,02	0,03	<0,01	0,01	0,01	0,02	<0,01	<0,01	0,01
Protocatechusäureethylester	49	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,02	<0,01	0,01	0,02
Syringinsäure-ethylester	18	0,14	0,14	0,24	0,01	0,05	0,05	0,14	0,01	0,06	0,07
Gentisinsäure	123	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
(+)-Lyoniresinol-Xylosid (5)	14	0,09	0,02	0,16	0,01	0,06	0,05	0,06	0,01	0,03	0,04
(-)-Lyoniresinol-Xylosid (6)	48	0,02	<0,01	0,04	<0,01	0,02	0,01	0,01	<0,01	0,01	0,01
Lyoniresinol-Glucosid (7)	27	0,08	0,01	0,10	0,01	0,03	0,03	0,03	0,01	0,02	0,03
Lyoniresinol-Gallat (8)	30	0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Oaklacton-Galloylglucosid (1)	8,9	0,29	0,06	0,41	0,02	0,09	0,12	0,11	0,03	0,06	0,16
Oaklacton-Glucosid (2)	7,2	0,18	0,41	0,24	0,01	0,03	0,10	0,05	<0,01	0,01	0,15

Fortsetzung Tabelle 31: Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] und DoT-Faktoren der adstringierenden Verbindungen der zehn Whiskyproben^a

Probe Analyt	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Oaklacton-Rutinosid (3)	6,7	0,22	0,38	0,31	<0,01	0,06	0,10	0,07	<0,01	0,04	0,16
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	153	0,01	0,01	0,02	<0,01	<0,01	0,01	0,02	<0,01	<0,01	0,02
Scopoletin	360	<0,01	0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24)	143	0,01	0,01	0,02	<0,01	0,01	0,01	0,01	<0,01	0,01	0,01
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28)	76,4	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Octansäure	5200	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01
Decansäure	15500	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,04	0,04	0,03	0,01	0,01	0,02

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs;

Bei Betrachtung der sauerschmeckenden Substanzen in Whisky (vgl. Tabelle 32) wird der Beitrag der Essigsäure deutlich, deren berechnete DoT-Faktoren in allen untersuchten Proben größer als eins sind. Die organischen Säuren Äpfel-, Milch-, Bernstein-, Oxal- und Citronensäure sind für den sauren Geschmack der Whiskys nicht von Bedeutung.

Tabelle 32: Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] und DoT-Faktoren der sauren Verbindungen der zehn Whiskyproben^a

Probe Analyt	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Essigsäure	1990	2,98	2,85	4,47	1,42	2,32	2,51	2,70	1,15	1,66	2,46
Ameisensäure	4300	0,26	0,20	0,24	0,09	0,26	0,21	0,12	0,20	0,17	0,41
Äpfelsäure	3690	0,01	0,01	0,01	<0,01	0,01	0,01	0,02	<0,01	<0,01	0,02
Milchsäure	15480	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,01	0,02	<0,01	0,01	0,01
Bernsteinsäure	900	0,02	0,02	0,02	<0,01	0,01	0,01	0,07	0,01	0,01	0,03
Oxalsäure	5600	<0,01	0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Citronensäure	2600	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs;

Die quantifizierten Mineralstoffe zeigen durchwegs DoT-Faktoren < 1 , wie der Tabelle 33 zu entnehmen ist. Den höchsten Wert zeigt dabei die Probe BSM1 für das salzig schmeckende Natrium mit 0,43.

Tabelle 33: Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] und DoT-Faktoren der salzigen Verbindungen der zehn Whiskyprouben^a

Probe Analyt	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Natrium	3900	0,02	0,04	0,03	0,24	0,06	0,05	0,07	0,08	0,07	0,43
Kalium	12600	0,04	0,04	0,03	0,02	0,03	0,03	0,08	0,02	0,02	0,05
Calcium	3100	0,01	0,01	0,06	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,05	0,03
Ammonium	5000	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Magnesium	3200	<0,01	<0,01	0,03	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Chlorid	3900	<0,01	0,01	0,01	0,03	<0,01	0,04	0,02	<0,01	0,01	0,01
Sulfat	5200	<0,01	<0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	<0,01	<0,01	0,11

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs;

Wie auch bei den Mineralstoffen, so weist keine analysierte Probe einen DoT-Faktor > 1 für die quantifizierten Kohlenhydrate und Polyole auf. Erneut wurden bei Probe BSM1 die höchsten Werte für Fructose und Glucose mit 0,51 und 0,21 berechnet (vgl. Tabelle 34).

Tabelle 34: Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] und DoT-Faktoren der süßen Verbindungen der zehn Whiskyprouben^a

Probe Analyt	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$]	AB1	AB2	AB3	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SB1	SB2	BSM1
Glycerin	81200	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,01	0,04	<0,01	<0,01	0,01
Glucose	18000	0,02	0,02	0,02	0,01	0,06	0,01	0,02	0,02	0,01	0,21
Fructose	10200	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,07	0,01	0,01	0,02	0,01	0,51
Sorbitol	33800	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Arabinose	17700	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	<0,01	0,01	0,02
Rhamnose	11800	0,01	0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Galactose	50000	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Erythritol	36300	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

a) AB1: Jack Daniel's, AB2: Jim Beam, AB3: Woodford Reserve, SSM1: Bowmore, SSM2: Glenfiddich, SSM3: Glendronach, SSM4: Ardbeg, SB1: Johnnie Walker, SB2: Chivas Regal, BSM1: Slyrs;

2.6.4 Rekombination- und Omissionsexperimente verschiedener Whiskys

Um sicherzustellen, dass alle Substanzen, die zum Geschmack von Whisky beitragen, erfolgreich quantifiziert worden sind, wurden Geschmacksrekombinate mit drei unterschiedlichen Whiskys durchgeführt. Dabei wurde jeweils die authentische Whiskyproube als Referenz zum hergestellten Rekombinat verkostet. Die Geschmacksattribute wurden hierbei auf Skalen zwischen 0 (nicht wahrnehmbar) und 5 (sehr stark wahrnehmbar) bewertet.

Es wurden Rekombinate von AB1 (A), AB3 (B) und SSM2 (C) hergestellt und verkostet. Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 77, zeigen, dass sie sehr gut geschmacklich mit den

authentischen Proben übereinstimmten und keine signifikanten Unterschiede wahrgenommen wurden. Die Rekonstitutionsexperimente zeigen folglich, dass alle Schlüsselgeschmacksstoffe der untersuchten Whiskys quantitativ erfasst wurden.

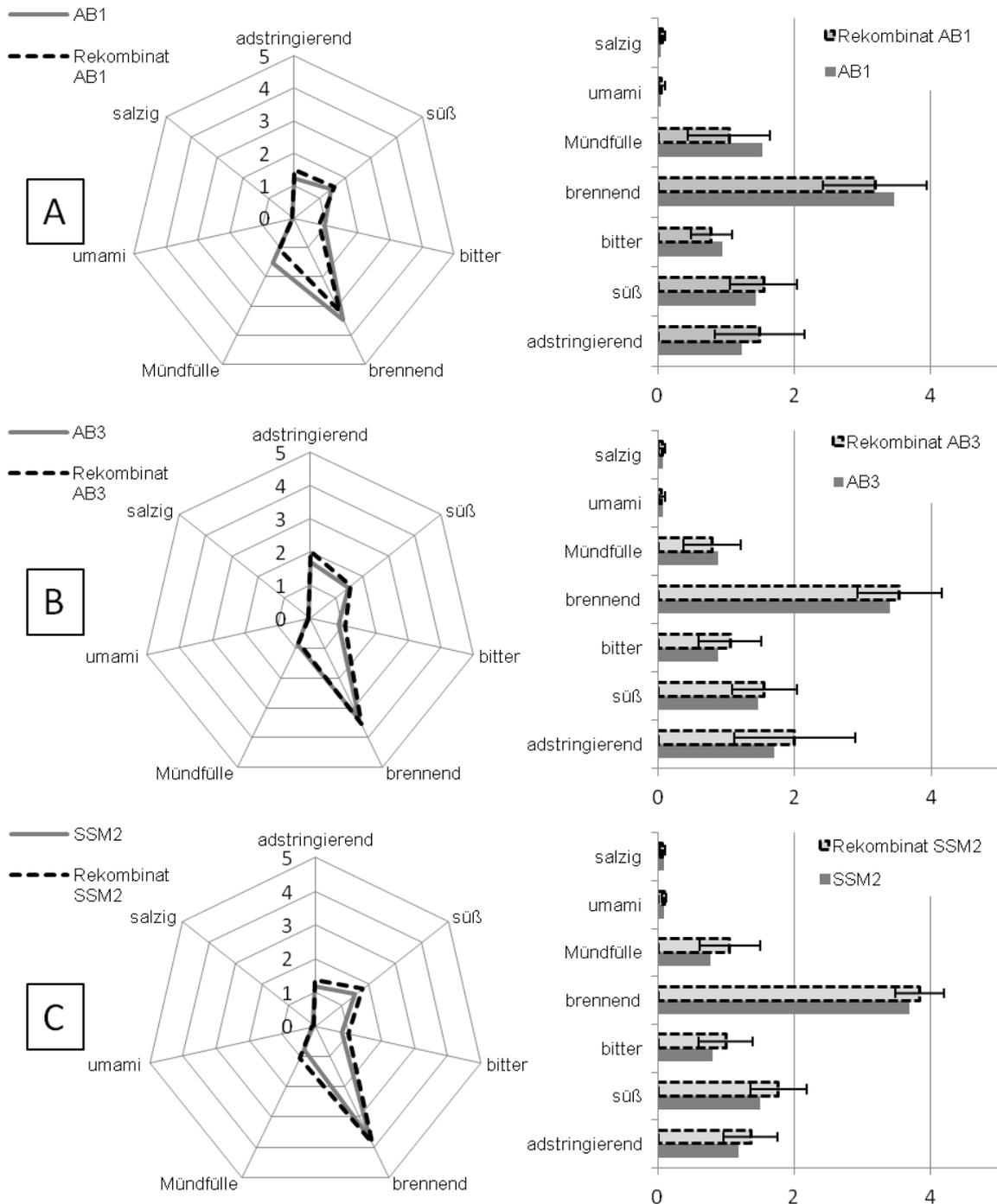


Abbildung 77: Geschmacksprofile der unverdünnten Whiskys und ihrer Rekombinate; AB1 (A) in 40 % Vol., AB3 (B) in 45 % Vol. und SSM2 (C) in 40 % Vol. (Durchführung nach 3.8.7).

Der Einfluss einzelner Verbindungen und Verbindungsklassen wurde anhand von Omissionsexperimenten genauer beleuchtet. Neben den Geschmacksschwellenwerten von Octan- und Decansäure für Adstringenz ist in der Literatur kaum etwas über den

Geschmacksbeitrag der Fettsäuren und deren Ethylester zum Whiskey bekannt. Das Weglassen dieser beiden Substanzgruppen vom Geschmacksrekombinat der Probe SSM2 und der anschließende Vergleich mit dem Gesamtrekombinat geben Aufschluss zu ihrer Geschmacksrelevanz. Das Omissionsexperiment wurde vom Sensorikpanel im Vergleich zum Vollrekombinat in einer Profilsensorik verkostet. Die statistische Auswertung zeigt, dass die Fettsäuren und Fettsäureethylester keine wichtige Rolle bei der Geschmackswahrnehmung von Whisky spielen, da keine signifikante Unterschiede festgestellt wurden (Abbildung 78).

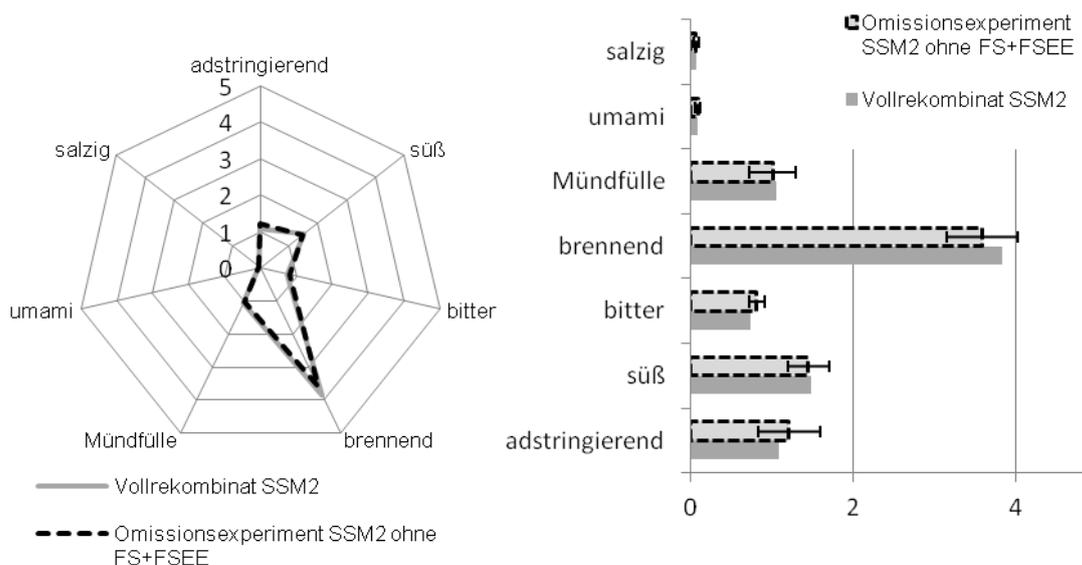


Abbildung 78: Profilsensoriken des Whisky-Rekombinates SSM2 und einem Omissionsexperiment ohne Fettsäuren und Fettsäureethylester; in 40 % Vol. (Durchführung nach 3.8.7).

Zur Beurteilung des Einflusses der süßmodulierenden Verbindungen, wie zum Beispiel EMF (11), Vanillin (22) oder Syringaldehyd (20), wurden diese Substanzen einmal dem Vollrekombinat von AB3 zugegeben und einmal weggelassen. Aufgrund der zeitlichen Veränderung der Süßwahrnehmung durch Zugabe von Modulatoren, wurde der Time-Intensity-Test herangezogen. Um die sensorische Beurteilung der Süße zu erleichtern, wurde der Alkoholgehalt auf 20 % Vol. reduziert.

Abbildung 79 und Tabelle 35 zeigen die Ergebnisse des Omissionsexperimentes mit AB3. Die Anwesenheit der Süßmodulatoren im Vollrekombinat bewirkte im Vergleich mit dem Omissionsexperiment signifikant höhere Werte für die maximale Intensität (I_{max}), die Gesamtfläche (A_{ges}) und die Gesamtdauer (D_{ges}) der Süßwahrnehmung. Dies verdeutlicht die wichtige Rolle dieser Substanzgruppe für die Intensität und Länge der Süßwahrnehmung von Whisky.

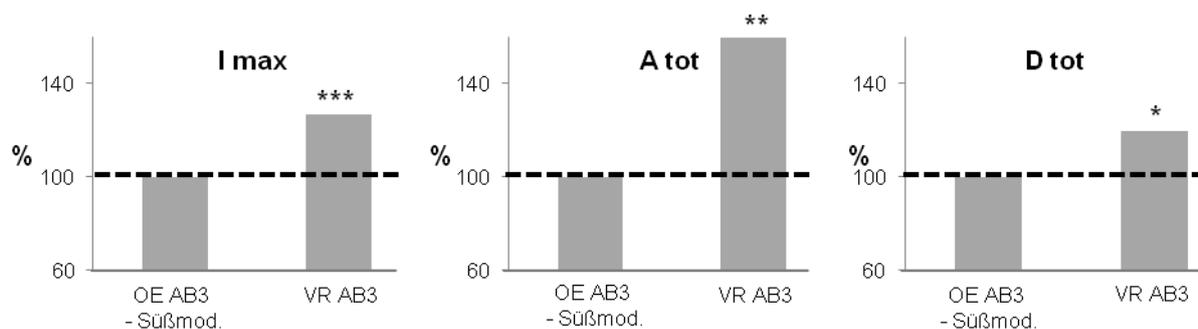


Abbildung 79: Die extrahierten Parameter I_{max} (links), A_{ges} (Mitte) und D_{ges} (rechts) der Time-Intensity-Tests von dem Omissionsexperiment AB3 ohne Süßmodulatoren (OE AB3 –Süßmod.) und des Vollrekombinates von AB3 (VR AB3) (20 % Vol.); alle Werte wurden auf das Omissionsexperiment normalisiert. Darstellung der p-Werte: < 0,05 \triangleq „signifikant“ (*), < 0,01 \triangleq „hoch signifikant“ (**) und < 0,001 \triangleq „sehr hoch signifikant“ (***) (Durchführung nach 3.8.7).

Tabelle 35: Durchschnittswerte des Omissionsexperimentes (OE AB3) und des Vollrekombinates (VR AB3), auf das Omissionsexperiment normalisierte Daten des Vollrekombinates (Norm. VR AB3) und p-Werte der maximalen Intensität (I_{max}), der Gesamtfläche (A_{ges}) und der Gesamtdauer (D_{ges}); 20 % Vol. (Durchführung nach 3.8.7).

Parameter	OE AB3 - Süßmod.	VR AB3 + Süßmod.	Norm. VR AB3 [%]	p-Wert
I_{max}	3,5	4,4	126,8	< 0,001
A_{ges}	50,5	60,6	159,6	< 0,01
D_{ges}	27,4	32,8	119,4	< 0,05

2.6.5 Diskussion

Zur Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Zusammenhängen wurden zum einen literaturbekannte Schwellenwerten von geschmacksaktiven Whisky-Verbindungen herangezogen und zum anderen neu identifizierte Substanzen erstmals sensorisch charakterisiert. So wurden 19 weitere Geschmacksschwellenwerte bestimmt. In Verbindung mit den quantitativen Daten dieser Metabolite (vgl. 2.5) war nun die Berechnung von DoT-Faktoren möglich. Einen Überblick über diese Daten bietet Abbildung 80. Deutlich wird dabei die wichtige Rolle von Ellagsäure und Lyoniresinol für die Adstringenz von Whisky. Bei Betrachtung aller zur Adstringenz beitragenden Verbindungen zeigen die Proben SSM1 und SB1 die geringsten DoT-Faktoren, besonders bei Vergleich mit Probe AB3. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Daten der Profilanalyse von SSM1 und AB3 in Abbildung 12 (vgl. 2.1) und zeigt, dass sich die Lagerung der Whiskys in amerikanischen Eichenfässern auf deren Geschmack auswirkt.

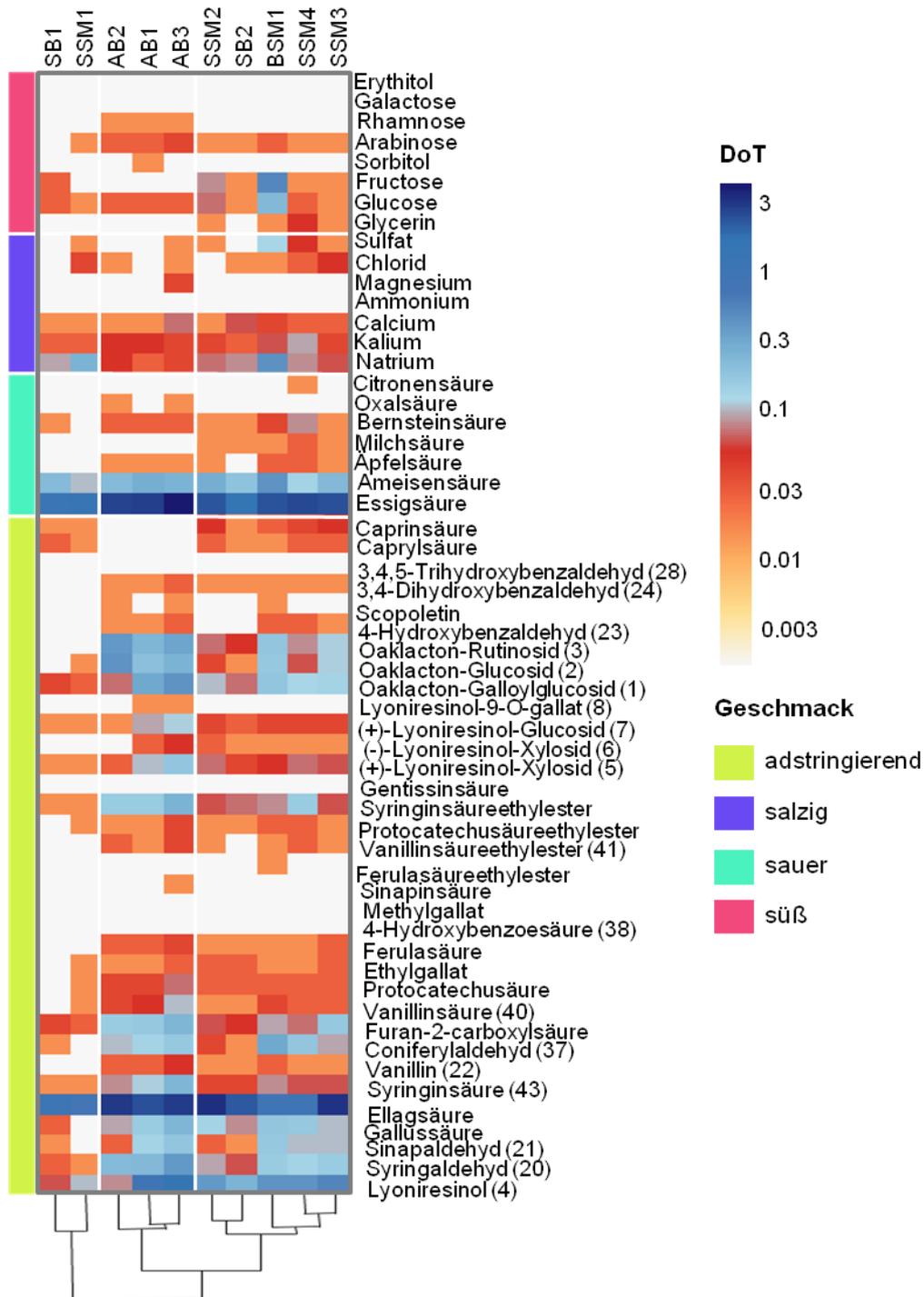


Abbildung 80: Heat Map der berechneten DoT-Faktoren von Whiskys AB1 (Jack Daniel's), AB2 (Jim Beam), AB3 (Woodford Reserve), SSM1 (Bowmore), SSM2 (Glenfiddich), SSM3 (Glendronach), SSM4 (Ardbeg), SB1 (Johnnie Walker), SB2 (Chivas Regal) und BSM1 (Styrs); Farbzuoordnung der skalierten DoT-Werte und der Geschmacksattribute auf der rechten Seite.

Auch die Rolle von Essig- und Ameisensäure für den sauren Geschmack von Whisky wird bei Betrachtung derer DoT-Faktoren deutlich (vgl. Abbildung 80). In Einklang mit den Ergebnissen der Profilsensoriken von Whiskys (vgl. 2.1), werden Whiskys weder als salzig empfunden, noch waren die DoT-Faktoren der quantifizierten Mineralstoffe > 1 . Anders war dies bei der Süße von Whisky zu beobachten, da dieser als signifikant süßer als eine Referenzlösung beurteilt wurde (vgl. 2.3.1), die berechneten DoT-Faktoren der süßschmeckenden Kohlenhydrate und Polyole aber durchwegs < 1 waren. Rekombinations- und Omissionsexperimente sollten dabei Aufschluss bezüglich des Einflusses von Süßmodulatoren geben.

Es wurden Rekombinationsexperimente von drei unterschiedlichen Whiskys durchgeführt, die alle in Übereinstimmung mit dem jeweiligen authentischen Whisky waren. Omissionsexperimente verdeutlichten die untergeordnete Rolle der Fettsäuren und Fettsäureethylester bezüglich der Geschmackswahrnehmung. Außerdem zeigten sie die Wichtigkeit der identifizierten Süßmodulatoren, da das Weglassen dieser Verbindungen eine signifikant schwächere Süße verursachte.

2.7 Modellstudien zur Bildung von Ethoxymethylfurfural

In Abschnitt 2.4 wurden bereits die süßmodulierenden Eigenschaften des Ethoxymethylfurfurals (**11**) anhand von Humansensoriken und die Süßrezeptoraktivierung mit Hilfe von Zellassays aufgezeigt. Modellexperimente sollten tiefere Einblicke in die Bildung des Süßmodulators in alkoholischen Getränken verschaffen. Der mögliche Bildungsweg von **11** wurde bereits von *Cutzach et al.* (1999) publiziert und ist nochmals in Abbildung 81 dargestellt. Die Reaktion von HMF (**9**) mit Ethanol zu EMF (**11**) erfolgt demnach nach einer säurekatalysierten Wasserabspaltung über das Carbokation.

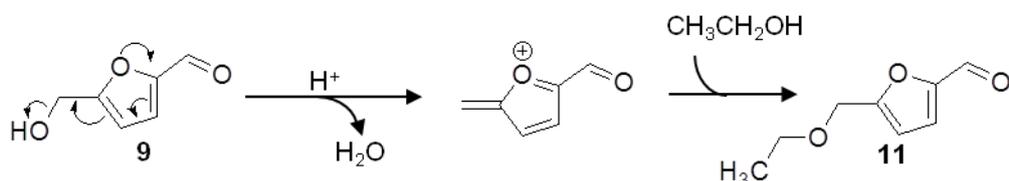


Abbildung 81: möglicher Bildungsweg von Ethoxymethylfurfural (11**) aus HMF (**9**) und Ethanol im sauren Milieu; in Anlehnung an *Cutzach et al.* (1999)**

Cutzach et al. (1999) untersuchten die Gehalte an HMF (**9**) und EMF (**11**) in weißen und roten Likörweinen in einem Zeitraum über 6 bzw. 12 Monaten. Dabei lagerten sie die Proben mit und ohne Sauerstoffkontakt bei $37^\circ C$. Der Alkoholgehalt dieser Proben lag zwischen 15 und 18 % Vol. Likörweine enthalten im Vergleich zu Whisky neben HMF (**9**) eine Vielzahl an nichtflüchtigen Inhaltsstoffen aus der Traube, unter anderem eine hohe Menge an Hexosen.

Die quantitativen Daten von **9** zeigten während der 12-Monatigen Lagerung von weißem Likörwein eine Zunahme von 30 $\mu\text{mol/l}$ auf 430 $\mu\text{mol/l}$ ohne und auf 190 $\mu\text{mol/l}$ mit Sauerstoffzufuhr. Die Konzentration an **11** erreichte nach 12 Monaten mit 0,8 $\mu\text{mol/l}$ und ohne Sauerstoffzufuhr 3,4 $\mu\text{mol/l}$.

Lagerungsansätze von HMF in Ethanol-Wasser-Gemischen

Lagerungsexperimente von HMF (**9**) in Ethanol-Wasser-Mischungen mit unterschiedlichen Alkoholkonzentrationen bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen lieferten detaillierte Informationen zur Bildung von EMF (**11**). Hierzu wurden 14 Ansätze für einen Zeitraum von über 14 Monaten gelagert. 12 Proben lagerten bei Raumtemperatur, eine Probe bei 4°C und eine weitere bei 40°C. Um den Einfluss des pH-Wertes genauer zu beleuchten, wurde dieser bei vier Proben auf pH = 3, bei sechs Proben auf pH = 4,5 und bei vier Proben auf pH = 6 eingestellt. Bei jeweils gleichem pH-Wert und Raumtemperatur variierte außerdem der Alkoholgehalt zwischen 10, 20, 40 oder 60 % Vol. So wurden die Ethanolgehalte verschiedener alkoholischer Getränke, wie zum Beispiel Wein, Likörwein und Spirituosen in Trink- und Fassstärke simuliert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden jeweils Proben entnommen und deren Konzentrationen an HMF (**9**) und EMF (**11**) mittels LC-MS/MS ermittelt. Die eingestellte Anfangskonzentration von 80 $\mu\text{mol/l}$ für **9** stellte eine realistische Konzentration für einen Whisky dar (vgl. Tabelle 22) und zeigte während der Lagerung in keiner Probe eine signifikante Zu- oder Abnahme. Die Zunahme an **11** war dagegen analytisch zu verfolgen und ist in Abbildung 82 dargestellt. Mit zunehmender Lagerzeit erhöhten sich die Konzentrationen an **11** in den 14 Modellansätzen. Deutlich wird auch die Abhängigkeit der Umsetzung vom pH-Wert. Da die Reaktion im sauren katalysiert wird, zeigen die drei Ansätze mit mindestens 20 % Vol. bei pH = 3 und Raumtemperatur die höchsten Konzentrationen (**x**, **▲**, **■**). Der Vergleich dieser drei Ansätze mit höchsten Konzentrationen an **11** verdeutlicht den Einfluss der Ethanolkonzentration auf die Umsatzrate. Der Ansatz mit 60% Vol. bei pH = 3 und RT (**x**) zeigt die höchsten EMF Konzentrationen aller 14 Ansätze mit 0,09 $\mu\text{mol/l}$. Der Ansatz mit 40% Vol. bei pH=3 und RT (**▲**) enthält nach 440 Tagen 0,04 $\mu\text{mol/l}$ EMF. Der Vergleich dieser Mengen mit den unter 2.5.1.7 bestimmten Konzentrationen an EMF in Whisky, die je nach Probe zwischen 0,01 – 0,24 $\mu\text{mol/l}$ liegen, verdeutlicht die Ähnlichkeit der Modellansätze zu einer realen Whiskyprobe. Nach einem Jahr Lagerzeit konnten schließlich auch bei den Ansätzen mit einem pH-Wert > 3, Mengen an **11** oberhalb der Nachweisgrenze (0,0006 $\mu\text{mol/l}$) detektiert werden. Bei Betrachtung der drei identischen Proben mit pH = 4,5 und 40 % Vol., die für 440 Tagen bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert wurden, wird die Temperaturabhängigkeit der Bildungsreaktion nochmals veranschaulicht. Die

Konzentrationen an **11** nehmen mit ansteigender Temperatur zu (x (4°C): < LoQ; ▲(RT): 0,007 µmol/l; x (40°C): 0,009 µmol/l).

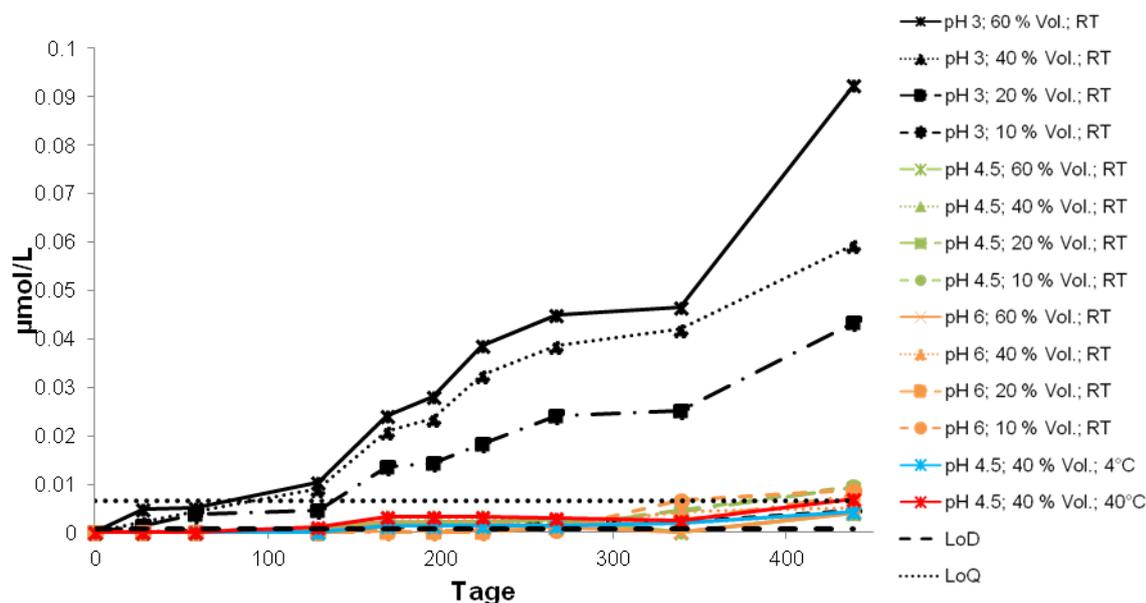


Abbildung 82: EMF-Konzentrationen [µmol/l] der 14 Modellansätze während deren Lagerungszeitraum von 440 Tagen

Forcierte Alterungsstudien zu Whisky

Die HMF (**9**) Konzentrationen in Whisky (vgl. Tabelle 22) weisen bei einem Alkoholgehalt von mindestens 40 % Vol. ein Potential für die weitere Bildung von EMF (**11**) auf. Wie die Lagerstudien zeigten, verläuft die Bildung abhängig von pH-Wert und Temperatur sehr langsam. Um die Umsetzungsrate zu beschleunigen wurden zum Vergleich die Synthesebedingungen von EMF (**11**) in 3.5.1 herangezogen. Eine schnelle, nahezu vollständige Umsetzung von **9** zu **11** erfolgt unter der Zugabe eines Katalysators in Form eines stark sauren Ionenaustauschers (Amberlyst-15) und einer Erwärmung auf 75°C.

Um für die Whiskylagerung realistischere Bedingungen zu schaffen, wurden forcierte Lagerungsstudien der Probe AB3 mit Amberlyst-15 bei 45°C durchgeführt. Neben **9** und **11** wurden auch AcMF (**10**), MMF (**12**) und VanMF (**19**) quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 83 aufgeführt. Im Zeitraum von einer Woche wurden zu sechs Zeitpunkten Proben gezogen und analysiert. Die Konzentration an **11** (x) nahm dabei stetig von 0,2 auf 1,1 µmol/l zu und konnte so in kurzer Zeit auf das Fünffache erhöht werden. Die Konzentration an **12** (▲) zeigte anfangs einen geringen Anstieg von 0,07 auf 0,10 µmol/l und erhöhte sich dann nicht weiter, was auf die Abwesenheit von Methanol als Reaktionspartner zurückzuführen sein kann. Die Gehalte der beiden identifizierten Ester des HMF, **10** (*) und **19** (■), sind sehr gering. Die Konzentration an **19** (■) bleibt konstant bei 0,01 µmol/l, während **10** (*) von einer Anfangskonzentration von 0,06 µmol/l nach sieben Tagen auf < 0,01 µmol/l abnimmt.

Da der Zusatz eines Katalysators möglicherweise Einfluss auf die gesamte Zusammensetzung des Whiskys und seiner sensorischen Eigenschaften hat, sollte dies genauer untersucht werden.

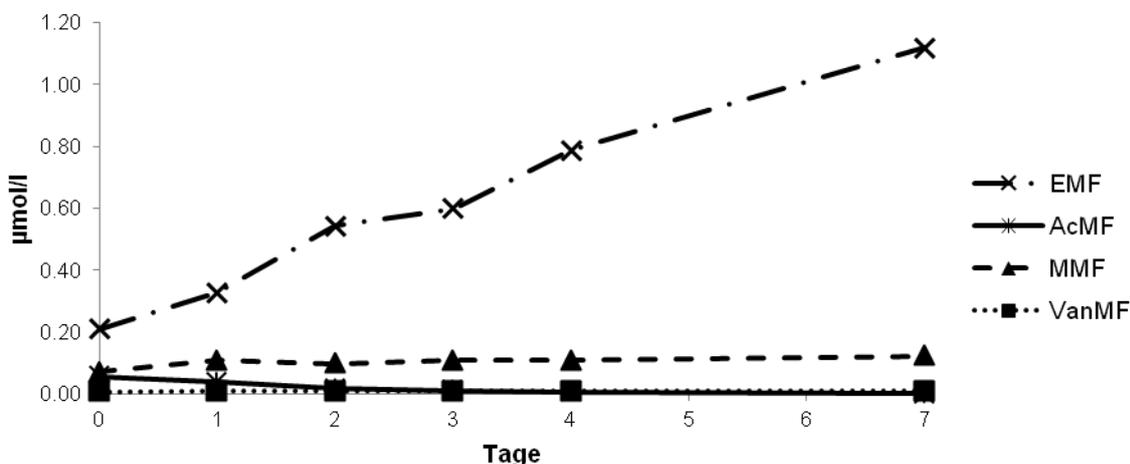


Abbildung 83: Konzentrationen an EMF (11, x), AcMF (10, *), MMF (12, ▲) und VanMF (19, ■) [$\mu\text{mol/l}$] der Ansätze des Whiskys AB3 mit forcierten Lagerung mit Amberlyst-15 bei 45°C während 7 Tage

2.8 Quantitative Studien von Holzextrakten mit unterschiedlichem Toastungsgrad

Die Gesetze der verschiedenen Länder, der europäischen Union oder der vereinten Nationen haben die Verwendung von Holzfässern bei der Whiskyherstellung als einheitliche Vorgabe. Die *Scotch Whisky Regulations* schreiben eine obligatorische Reifung in Eichenholzfässern für mindestens drei Jahre vor. Straight Bourbon muss nach den *Federal Standards of Identity for Distilled Spirits* mindestens zwei Jahre lang in neuen, ausgekohnten Eichenfässern gelagert werden. Vergleicht man den Fassausbau von Whisky mit Praktiken bei der Vinifikation, so gibt es auf diesem Gebiet bereits viele Alternativprodukte der Eiche auf dem Markt. Diese verleihen dem Wein das typische Holzaroma, auch wenn die Lagerung in Stahlfässern erfolgt. Die diversen Produkte gibt es in unterschiedlichen Anwendungsformen als Pulver bzw. Holzmehl, Späne, Chips, Würfel oder Stäbe. Es werden außerdem unterschiedliche Eichenarten mit verschiedenen Toastungsgraden angeboten. Auch Eichenholzextrakte sind auf dem Markt erhältlich und bieten somit eine weitere Alternative für die Lagerung im Holzfass.

Wie die Studien im Rahmen dieser Arbeit zeigten (vgl. 2.6) spielen Holzextraktstoffe, wie zum Beispiel Lignane und Ligninabbauprodukte, eine wichtige Rolle für den Geschmack von Whisky. Das Sensometabolom von Extrakten verschiedener Toastungsgrade von *Quercus alba* und *Quercus robur* wurde deshalb genauer beleuchtet. Sechs unterschiedliche

Holzchips wurden für die Quantifizierungen herangezogen. Dabei handelte es sich jeweils um die drei Toastungsgrade nicht, medium und stark getoastet von *Quercus alba* (AOn, AOm, AOh) und *Quercus robur* (FOn, FOm, FOH). Deren Extraktion erfolgte nach Zerkleinerung mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch (60/40 (v/v)). Die Ausbeuten wurden nach Lyophilisation gravimetrisch bestimmt (vgl. Tabelle 36).

Tabelle 36: Ausbeuten [mg/g] der Holzextrakte durch Extraktion mit Ethanol-Wasser (60/40 (v/v))

Holzprobe	Ausbeute [mg/g]
American oak non toasted (AOn)	44,4
American oak medium toasted (AOm)	33,3
American oak heavy toasted (AOh)	50,5
French oak non toasted (FOn)	57,3
French oak medium toasted (FOm)	97,1
French oak heavy toasted (FOh)	92,6

Zum Vergleich der lyophilisierten Eichenholzextrakte werden definiert konzentrierte Lösungen (2,5 g/l) hergestellt. Da die phenolischen Verbindungen und die HMF-Derivate eine sensorisch wichtige Rolle in Whisky spielen, werden diese mittels LC-MS/MS identifiziert und quantifiziert (vgl. Tabelle 37).

Tabelle 37: Quantitative Daten der sechs Holzextrakte^b in [$\mu\text{mol/l}$]^a

Probe	AOn	AOm	AOh	FOn	FOm	FOh
Analyt						
Oaklacton-Galloylglucosid (1)	12,38	4,00	0,51	4,47	0,35	0,33
Oaklacton-Glucosid (2)	2,22	2,23	1,06	1,07	0,02	0,14
Oaklacton-Rutinosid (3)	7,53	1,97	0,01	0,25	0,00	0,00
Lyoniresinol (4)	84,08	51,82	15,76	55,16	30,27	11,29
(+)-Lyoniresinol-Xylosid (5)	15,61	0,60	0,58	6,78	0,74	0,34
(-)-Lyoniresinol-Xylosid (6)	13,67	0,64	0,37	5,53	0,81	0,36
(+)-Lyoniresinol-Glucosid (7)	12,79	3,79	0,66	6,75	2,46	0,53
(+)-Lyoniresinol-Gallat (8)	2,49	0,72	0,05	1,86	0,98	0,30
5-Hydroxymethylfurfural (9)	1,13	56,19	26,15	0,76	27,90	22,58
5-Acetoxymethylfurfural (10)	0,02	1,37	1,68	0,00	0,49	0,91
VanMF (19)	0,01	0,11	0,04	0,01	0,07	0,04
Syringaldehyd (20)	4,10	142,86	442,58	1,70	35,99	172,53
Sinapaldehyd (21)	3,21	226,68	103,85	0,88	126,92	152,40
Vanillin (22)	3,65	63,19	132,57	1,55	17,60	37,66
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	0,01	0,70	0,52	n.d.	0,08	0,29
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24)	0,01	1,37	2,54	n.d.	0,03	0,52
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28)	0,01	0,26	0,35	n.d.	0,01	0,10
Coniferylaldehyd (37)	1,23	156,18	37,84	0,04	64,33	48,65

Fortsetzung Tabelle 37: Quantitative Daten der sechs Holzextrakte in [$\mu\text{mol/l}$]^a

Probe	AOn	AOm	AOh	FOn	FOm	FOh
Analyt						
4-Hydroxybenzoesäure (38)	0,23	0,79	0,48	0,08	0,15	0,28
Vanillinsäure (40)	6,64	16,85	32,50	4,54	7,74	18,13
Syringinsäure (43)	6,39	51,52	100,00	4,02	13,01	53,28
Gallussäure	33,18	29,47	2,26	15,88	40,32	12,41
Ellagsäure	84,44	174,67	100,17	119,37	180,46	166,39
Castalagin	73,82	3,49	1,90	75,16	28,21	2,38
Furan-2-carbonsäure	4,85	27,99	12,90	3,46	6,95	9,21
Ferulasäure	2,60	4,81	3,02	3,53	2,68	1,79
Protocatechussäure	0,51	2,56	2,35	0,00	0,00	0,47
Sinapinsäure	n.d.	4,13	4,05	n.d.	0,30	1,00
Gentisinsäure	0,01	0,37	0,11	n.d.	0,01	0,01

a) Lösungen enthalten 2,5 g pulverisierten Extrakt pro Liter

b) AOn: American oak non toasted, AOm: American oak medium toasted, AOh: American oak heavy toasted, FOn: French oak non toasted, FOm: French oak medium toasted, FOh: French oak heavy toasted; n.d.: nicht detektierbar

Das Cluster-Dendrogramm in Abbildung 84 zeigt, dass sich die quantifizierten Holzbestandteile in zwei Hauptgruppen, A und B, einteilen lassen. Diese beiden Hauptgruppen können in fünf weitere Untergruppen, 1 bis 5, eingeteilt werden. Um die Unterteilung besser zu verstehen, zeigen Abbildung 85 und Abbildung 86 den Verlauf der Analytkonzentrationen in Abhängigkeit des Toastungsgrades. Der Vergleich der Hauptgruppen A und B zeigt, dass Gruppe A Verbindungen beinhaltet, die während des Toastens abgebaut werden. Verbindungen der Gruppe B werden zum Teil während des Toastungsprozesses gebildet. Verbindungen des Clusters 1 bauen sich während des Toastens in beiden Eichensorten, der Amerikanischen und der Französischen ab. Bei Cluster 2 ist derselbe Trend der Konzentrationsabnahme zu sehen, jedoch verläuft er nicht so geradlinig wie im ersten Clusters. Einzelne Verbindungen weisen Konzentrationsmaxima im Toastungslevel medium auf. Die quantifizierten Geschmacksstoffe, die Cluster 3 zugeordnet sind, zeigen, analog der Cluster 4 und 5, höhere Konzentrationen bei höherem Toastungslevel. Aber während Verbindungen aus Cluster 5 ihre maximale Konzentration bei Toastungslevel medium in beiden Sorten aufweisen, zeigen Substanzen des Clusters 4 diesen Trend nur bei der Amerikanischen Eiche.

Zusammenfassend hat der Toastungsprozess starken Einfluss auf die Zusammensetzung des Eichenholzextraktes. Betrachtet man adstringierende Geschmacksstoffe, wie Castalagin, Lyoniresinol (4) oder das Oaklacton-Galloylglucosid (1), so beinhaltet nicht getoastete Eiche höhere Konzentrationen. Verbindungen mit süßmodulierenden Eigenschaften, wie Vanillin (22), Syringaldehyd (20) oder VanMF (19), werden erst durch einen gewissen Hitzeeinfluss gebildet.

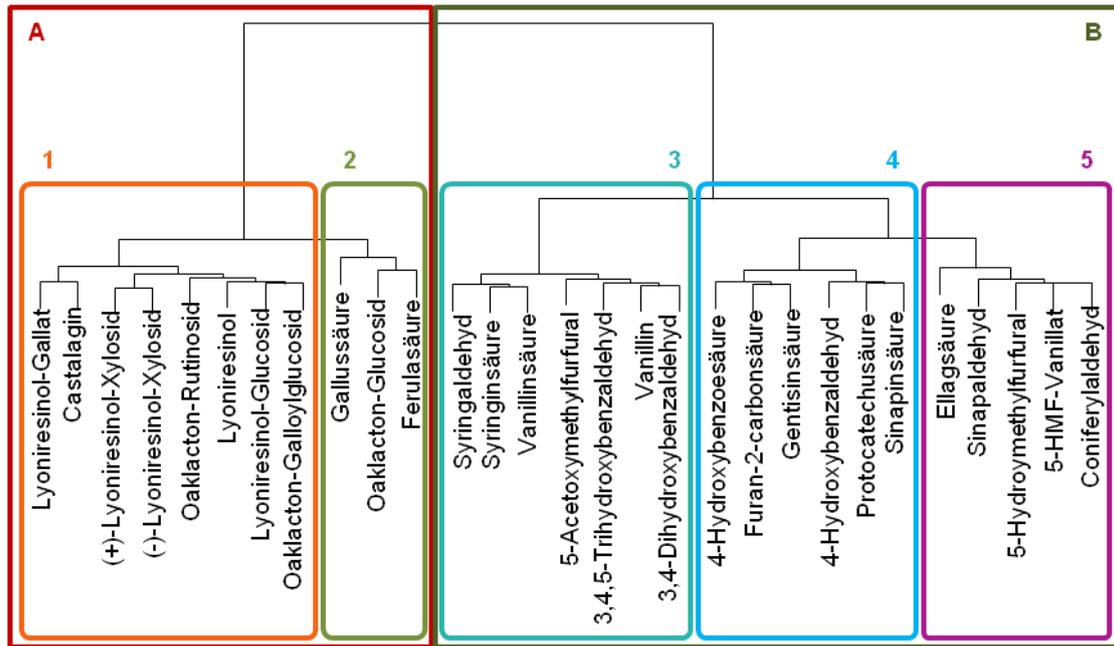


Abbildung 84: Cluster-Dendrogramm der quantifizierten Holzbestandteile; dargestellt sind zwei Hauptgruppen A und B sowie fünf Untergruppen 1 – 5;

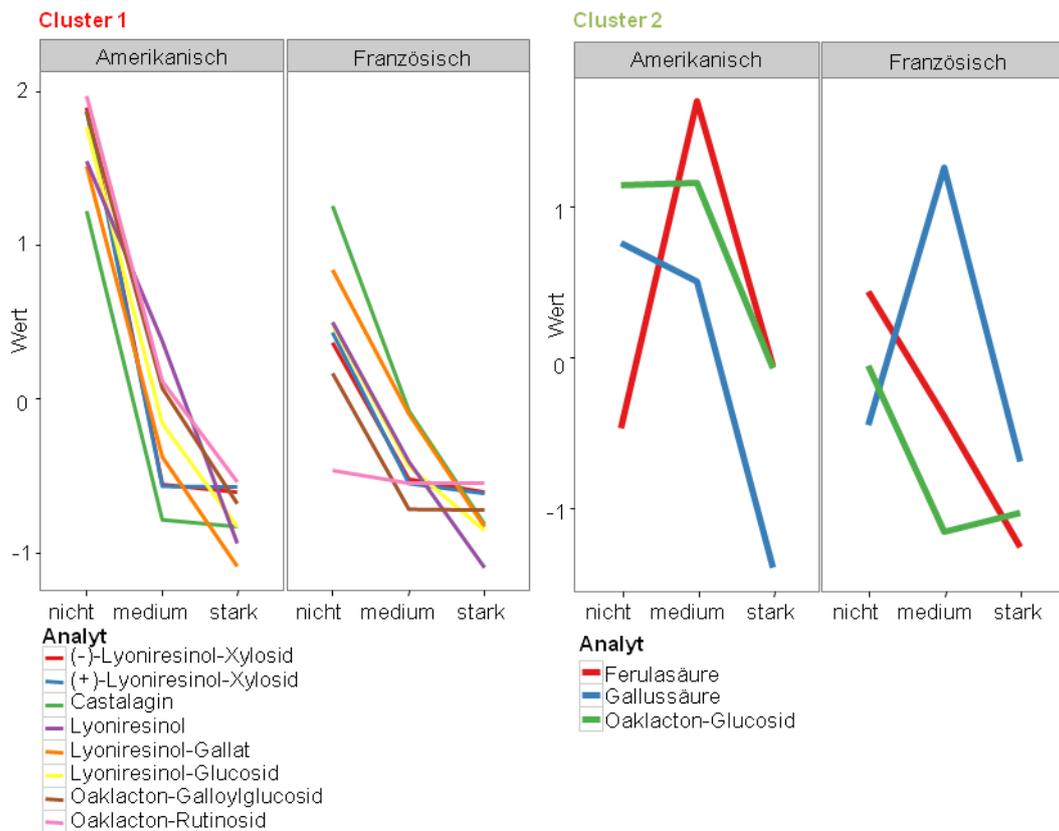


Abbildung 85: normalisierte Konzentrationen der Verbindungen aus Gruppe A

Ergebnisse und Diskussion

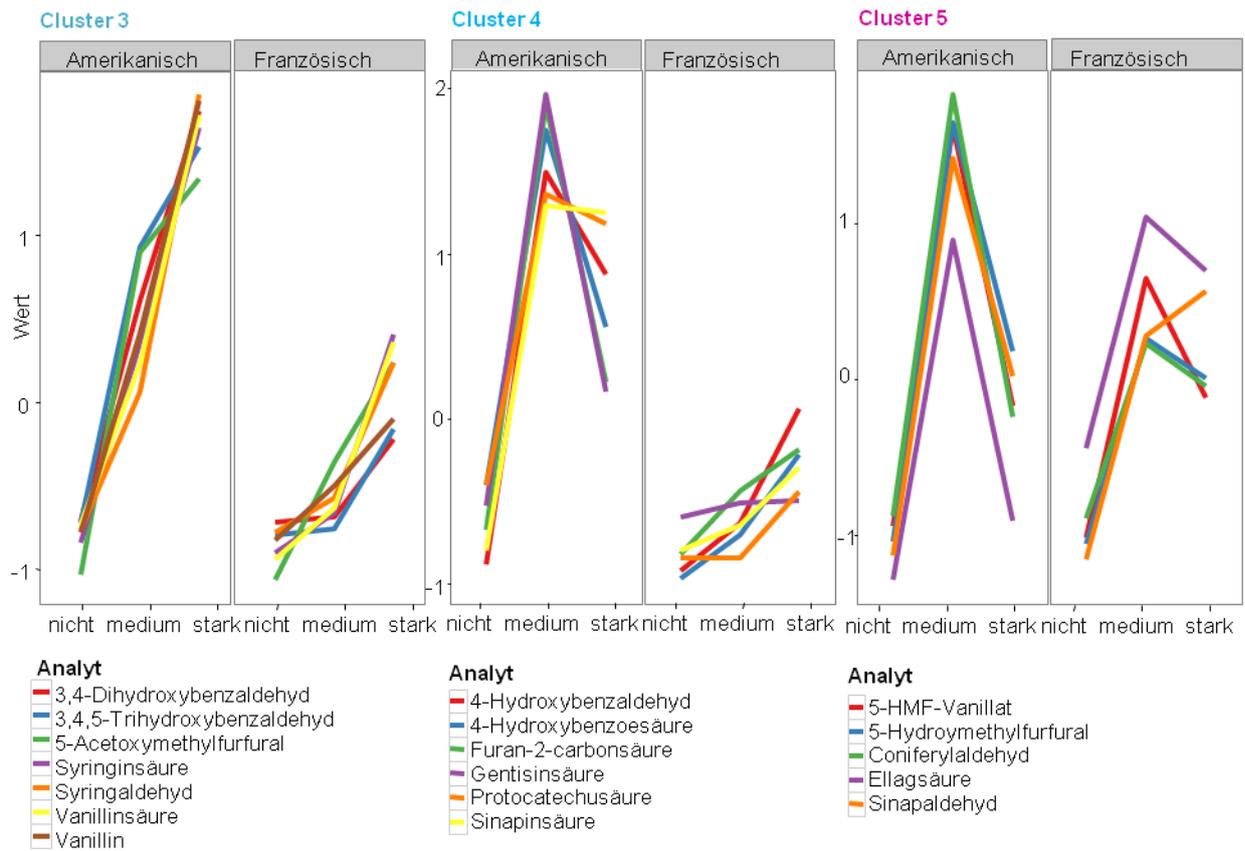


Abbildung 86: normalisierte Konzentrationen der Verbindungen aus Gruppe B

3 Experimenteller Teil

3.1 Untersuchungsmaterialien, Reagenzien und Materialien

3.1.1 Untersuchungsmaterialien

3.1.1.1 Whiskys

Bei den für die Untersuchungen verwendeten Whiskyproben (Tabelle 38) handelt es sich um kommerziell erhältliche Bourbon, Single Malt und Blended Scotch Whiskys.

Tabelle 38: Whiskyproben

Whisky	Bezeichnung	Beschreibung (Mindestlagerzeit; Ethanolgehalt)
Jack Daniel`s	AB1	Tennessee Sour Mash Whiskey, 3-4 Jahre, 40 % Vol.
Jim Beam	AB2	Bourbon Whisky, 4 Jahre, 40 % Vol.
Woodford Reserve	AB3	Bourbon Whiskey, 43,2 % Vol.
Bowmore	SSM1	Islay Single Malt Whisky, 11 Jahre, 40 % Vol.
Glenfiddich	SSM2	Single Malt Whisky, 12 Jahre, 40 % Vol.
Glendronach	SSM3	Single Malt Whisky, Virgin Oak Finish, 14 Jahre, 46 % Vol.
Ardbeg*	SSM4	Ardbeg Uigeadail, Single Malt Whisky, 54 % Vol.
Johnnie Walker	SB1	Blended Scotch Whisky, 40 % Vol.
Chivas Regal	SB2	Blended Scotch Whisky, 12 Jahre, 40 % Vol.
Slyrs*	BSM1	Bayerischer Single Malt, 3 Jahre (American Oak), 43 % Vol.

AB = amerikanischer Bourbon; SSM = schottischer Single Malt; SB = schottischer Blend; BSM = bayerischer Single Malt; * nur für Quantifizierungen eingesetzt

3.1.1.2 Eichenholzprodukte

Die für die Untersuchungen verwendeten Eichenholzprodukte sind kommerziell erhältlich und sind von der Wilhelm Eder GmbH sowie der Erbslöh Geisenheim AG bezogen worden.

Tabelle 39: Eichenholzprodukte

Bezeichnung	Abkürzung	Varietät	Anbieter
Oak Powder - American Oak <i>non toasted</i>	AOn	<i>Quercus alba</i>	Wilhelm Eder GmbH, Bad Dürkheim, Deutschland
Oak Chips - French Oak <i>non toasted</i>	FOn	<i>Quercus robur</i>	Wilhelm Eder GmbH, Bad Dürkheim, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 39: Eichenholzprodukte

Bezeichnung	Abkürzung	Varietät	Anbieter
OakyVin® American Oak <i>medium toasted</i>	AOm	<i>Quercus alba</i>	Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim, Deutschland
OakyVin® American Oak <i>heavy toasted</i>	AOh	<i>Quercus alba</i>	Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim, Deutschland
OakyVin® French Oak <i>medium toasted</i>	FOm	<i>Quercus robur</i>	Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim, Deutschland
OakyVin® French Oak <i>heavy toasted</i>	FOh	<i>Quercus robur</i>	Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim, Deutschland

3.1.2 Reagenzien

Die eingesetzten Reagenzien haben, soweit nicht anders aufgeführt, p.a.-Qualität. Lösungsmittel, die für die Extraktion verwendet werden, wurden zuvor destilliert. Deuterierte Lösungsmittel (d_4 -Methanol, d_3 -Acetonitril, d_5 -Pyridin, d_5 -Ethanol) werden von Euriso-Top (Gif-Sur-Yvette, Frankreich) bezogen. Für sensorische Experimente wird mineralstoffarmes Wasser der Marke Evian® verwendet (in der Arbeit als „Sensorikwasser“ bezeichnet).

Acetonitril, HPLC grade; Merck, Darmstadt, Deutschland
 Acetonitril, HPLC gradient grade, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
 5-Acetoxymethyl-2furaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Amberlyst-15, getrocknet, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Ameisensäure (98-100%), Merck, Darmstadt, Deutschland
 Ammoniumacetat-Lösung, 10 M, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Ammoniumchlorid (>99.5 %), Grüssing, Filsum, Deutschland
 DL-Äpfelsäure, Riedel-De Haën, Seelze-Hannover, Deutschland
 D(-)-Arabinose, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Bernsteinsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
n-Butanol, Merck, Darmstadt, Deutschland
 Calciumchlorid (>97 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Citronensäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Coniferylaldehyd (98 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Decansäure (96 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Decansäureethylester (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Dichlormethan (99.9 %), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Diethylether, Merck, Darmstadt, Deutschland
 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 Ellagsäure (95%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
meso-Erythritol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Essigsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
 Ethanol, absolut, Merck, Darmstadt, Deutschland
 Ethanol absolut AnalaR NORMAPUR, VWR International, Leuven, Belgien

Ethylacetat, Merck, Darmstadt, Deutschland
Ferulasäure (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetal-calf-serum (FCS), Biochrom AG, Berlin, Deutschland
D(-)-Fructose, Merck, Darmstadt, Deutschland
Furan-2-carbonsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D(+)-Galactose, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Gallussäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Gallussäureethylester (> 96 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Gallussäuremethylester (> 98 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Gentisinsäure (98 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D(+)-Glucose, Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamax-Medium, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Heptafluorbuttersäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
n-Hexan, Merck, Darmstadt, Deutschland
Hexansäure (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Hydroxybenzaldehyd (98 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Hydroxybenzoesäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5-Hydroxymethylfurfural (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hygromycin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
meso-Inositol, Riedel-De Haën, Seelze-Hannover, Deutschland
Isoproterenol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaffeensäure (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Laurinsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Laurinsäureethylester (98 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Linolsäure (>99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Linolensäure (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid (>99%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mannitol, Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol, HPLC gradient grade, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Methanol, Merck, Darmstadt, Deutschland
Methansulfonsäure für die Ionenchromatographie, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
(S)-(-)-2-Methyl-1-butanol (>95%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3-Methyl-1-butanol (>98.5%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Milchsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Myristinsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
Myristinsäureethylester (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (>99.5 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid, 0,1 mol/l, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Natriumhydroxid (50 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natrium-2-(4-Methoxyphenoxy)propionat (Lactisol), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumsaccharin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumsulfat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Octansäure, Fluka, Buchs, Schweiz
Octansäureethylester (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Ölsäure (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Oxalsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Palmitinsäure (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Palmitinsäureethylester (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Palmitoleinsäure (> 99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Palmitoleinsäureethylester (> 95 %), Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Penicillin-G, 10000 Units/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pentan, Merck, Darmstadt, Deutschland
2-Phenylethanol (>99%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Poly-D-Lysin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Probenecid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Propanol, HPLC gradient grade, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
n-Propanol; Merck, Darmstadt, Deutschland
Protocatechusäure, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rhamnose, Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Ribitol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Saccharose, Marck, Darmstadt, Deutschland
Sinapinaldehyd, Extrasynthese, Genay, Frankreich
Sinapinsäure (98 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D-Sorbitol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Stearinsäure (99%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Stearinsäureethylester (99 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Streptomycin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Syringaldehyd (98 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Syringinsäure (> 98 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetracyclin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetrahydrofuran, getrocknet, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Thionylchlorid (99%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trifluoressigsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin, Biochrom, Berlin, Deutschland
Vanillin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Vanillinsäure (> 97 %), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Vanillinsäureethylester, Aoin chemicals, Oxon, Großbritannien
Xylitol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D(+)-Xylose, Lancaster, Eastgate, England

3.1.3 Materialien

96-Well-Mikrotiterplatten, Greiner Bio-Oe, Frickenhausen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter, Minisart RC 15, 0.45 µm, Sartorius, Göttingen, Deutschland
SPE Kartuschen, Strata C 18-E, 55 µm, 1 g/ 6 ml, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Wasser, aufgereinigt mit Milli-Q-Wasser Advantage A 10 Reinigungssystem (Millipore, Molsheim, Frankreich)

3.2 Isolierung der Bourbon-Markerverbindungen aus Eichenholzfraktionen

3.2.1 Herstellung und Fraktionierung von Eichenholzextrakten

3.2.1.1 Herstellung des Ethanol-Wasser-Extraktes

Kommerziell erhältliches Holzmehl der amerikanischen Weißeiche „Oak Powder“ (AOn, 500 g) wird dreimal mit je 1,5 l Ethanol/Wasser (60/40 (v/v), pH=4,5) für 12 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Filtration werden die Extrakte bei 40°C und vermindertem Druck von Ethanol befreit, anschließend lyophilisiert und vereinigt.

3.2.1.2 Fraktionierung des Ethanol-Wasser-Extraktes mittels Lösungsmittel-extraktion

Der nach 3.2.1.1 erhaltene pulverförmige Ethanol-Wasser-Extrakt (15 g) wird dreimal für je 45 Minuten mit in einem Ethylacetat/n-Hexan-Gemisch (200 ml, 1/9 (v/v)) im Ultraschallbad extrahiert. Nach Filtration wird das Filtrat bei 40°C und vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und der so generierte ölige Rückstand als Ethylacetat/n-Hexan-Extrakt (EH) bezeichnet.

Der in Ethylacetat/n-Hexan-unlösliche Rückstand wird zunächst getrocknet und anschließend dreimal für je eine Stunde mit Methanol (250 ml) im Ultraschallbad extrahiert. Die Suspension wird filtriert und das Filtrat, der Methanol-Extrakt (M), wird bei 40°C und vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit.

Der Methanol-unlösliche, polare Rückstand (W) wird in Wasser aufgenommen und anschließend gefriergetrocknet.

3.2.1.3 Fraktionierung des Methanol-Extraktes mittels MPLC

12 g des nach 3.2.1.2 generierten Methanol-Extraktes (M) werden in einer Methanol/Wasser-Mischung (20 ml, 60/40 (v/v)) aufgenommen und für 10 Minuten im Ultraschallbad suspendiert. Nach Zentrifugation und anschließender Membranfiltration des Überstandes wird M mittels MPLC wie unter 3.10 beschrieben aufgetrennt. Das Eluat wird in 7 Fraktionen (M 1 – 7) unterteilt, wie in Abbildung 18 zu sehen ist. Nach Entfernung des Methanols bei 40°C und vermindertem Druck, werden die wässrigen Rückstände der vereinigten Fraktionen lyophilisiert.

3.2.1.4 Chromatographische Trennung der MPLC Fraktionen mittels präparativer HPLC

Die MPLC-Fraktionen M 4 (300 mg) und M 5 (300 mg) werden in einer Acetonitril/Wasser-Mischung (3 ml, 50/50 (v/v)) im Ultraschallbad für je 5 Minuten gelöst. Beide Fraktionen werden nach Membranfiltration chromatographisch mittels präparativer HPLC, wie in

3.10.2.3 beschrieben, aufgetrennt. Das Eluat von M 4 wird in 15 Subfraktionen, M 4-1 – 15 (vgl. Abbildung 20), unterteilt, während das Eluat von M 5 zu 14 Subfraktionen, M 5-1 – 14 (vgl. Abbildung 21), vereinigt wird. Acetonitril wird bei 40°C und vermindertem Druck entfernt und die wässrigen Rückstände der vereinigten Fraktionen werden lyophilisiert.

3.2.2 Isolierung der Bourbon-Markerverbindungen aus HPLC Fraktionen

3.2.2.1 Isolierung von Lyoniresinol (4) aus HPLC-Fraktion M 5-5

Die HPLC-Fraktion M 5-5 (9 mg) wird in einer Acetonitril/Wasser-Mischung (2 ml, 20/80 (v/v)) gelöst, membranfiltriert und chromatographisch mittels semi-präparativer HPLC aufgetrennt. Der verwendete Gradient A ist unter 3.10.2.2 aufgeführt. Das resultierende Eluat wird in sechs Subfraktionen M 5-5-1 bis -6 unterteilt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und die nun wässrigen Fraktionen werden gefriergetrocknet.

3.2.2.2 Isolierung von Lyonisid (5) und Nudiposid (6) aus HPLC-Fraktion M 4-10

HPLC-Fraktion M 4-10 (24 mg) wird in einer Acetonitril/Wasser-Mischung (3 ml, 20/80 (v/v)) aufgenommen und membranfiltriert. Die chromatographische Auftrennung erfolgt mittels semi-präparativer HPLC aufgetrennt unter Verwendung von Gradient B (3.10.2.2). Nach Einteilung des Eluates in sieben Subfraktionen M 4-10-1 bis -7, wird das Lösungsmittel bei 40°C und vermindertem Druck entfernt. Anschließend werden die wässrigen Fraktionen gefriergetrocknet.

3.2.2.3 Isolierung von Lyoniresinol-9'-O-glucosid (7) aus HPLC-Fraktion M 4-7

In 6 ml einer Acetonitril/Wasser-Mischung (25/75 (v/v)) wird die HPLC-Fraktion M 4-7 (13 mg) gelöst. Nach Membranfiltration und chromatographischer Auftrennung mittels semi-präparativer HPLC (C 3.10.2.2), werden sieben Subfraktionen M 4-7-1 bis -7 erhalten. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrigen Fraktionen werden schließlich lyophilisiert.

3.2.2.4 Isolierung von Lyoniresinol-9-O-gallat (8) aus HPLC-Fraktion M 5-12

Die in einer Acetonitril/Wasser-Mischung (1 ml, 20/80 (v/v)) gelöste HPLC-Fraktion M 5-12 (12 mg) wird nach Membranfiltration mittels semi-präparativer HPLC in vier Subfraktionen M 5-12-1 bis -4 aufgetrennt. Der verwendete Gradient D ist unter 3.10.2.2 aufgeführt. Acetonitril wird bei 40°C und vermindertem Druck entfernt und die resultierenden wässrigen Fraktionen werden gefriergetrocknet.

3.2.2.5 Isolierung von Oaklacton-Galloylglucosid (1) aus HPLC Fraktion M 5-9

HPLC-Fraktion M 5-9 (22 mg) wird in einer Acetonitril/Wasser-Mischung (2 ml, 25/75 (v/v)) gelöst, membranfiltriert und chromatographisch aufgetrennt. Der verwendete Gradient E bei der semi-präparativen HPLC ist unter 3.10.2.2 aufgeführt. Das resultierende Eluat wird in vier Subfraktionen M 5-9-1 bis -4 unterteilt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer werden die wässrigen Fraktionen lyophilisiert.

3.2.2.6 Isolierung von Oaklacton-Glucosid (2) aus HPLC Fraktion M 5-4

9 mg der HPLC-Fraktion M 5-4 werden gelöst in einer Acetonitril/Wasser-Mischung (2 ml, 20/80 (v/v)). Die gelöste Fraktion wird membranfiltriert und mittels semi-präparativer HPLC subfraktioniert. Der verwendete Gradient F ist unter 3.10.2.2 aufgeführt. Die daraus resultierenden sieben Subfraktionen M 5-4-1 bis -7 werden von Acetonitril bei 40°C und vermindertem Druck befreit und anschließend gefriergetrocknet.

3.2.2.7 Isolierung von Oaklacton-Rutinosid (3) aus HPLC Fraktion M 5-1

HPLC-Fraktion M 5-1 (3 mg) wird in 1 ml einer Acetonitril/Wasser-Mischung (20/80 (v/v)) aufgenommen, membranfiltriert und chromatographisch unter Verwendung des Gradienten G (3.10.2.2) aufgetrennt. Das Eluat wird in sieben Subfraktionen M 5-1-1 bis -7 unterteilt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und schließlich werden die wässrigen Fraktionen lyophilisiert.

3.3 Saure Hydrolyse von Oaklacton Vorstufen

3.3.1 Saure Hydrolyse von Oaklacton-Galloylglucosid (1)

Ein Aliquot des in 3.2.2.5 isolierten Oaklacton-Galloylglucosids (1,9 mg) wird in Methanol (20 ml) gelöst. Die Lösung wird während der langsamen Zugabe von Schwefelsäure (48 ml, 12 M) gekühlt und anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach erfolgt eine dreimalige Extraktion mit Pentan/Dichlormethan (20 ml, 2/1 (v/v)). Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und mittels einer Vigreux-Kolonnen auf wenige Milliliter eingengt.

3.3.2 Saure Hydrolyse von Oaklacton-Glucosid (2)

Nach dem Lösen eines Aliquotes des in 3.2.2.6 isoliertem Oaklacton-Glucosids (0,4 mg) in Methanol/Wasser (1 ml, 3/7 (v/v)) wird Trifluoressigsäure (0,4 ml, 2M) zugegeben und eine Stunde bei 120°C erhitzt. Im Anschluss wird die Lösung dreimal mit Dichlormethan (5 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Das Volumen wird zuletzt mittels Vigreux-Kolonnen auf wenige Milliliter eingengt.

3.3.3 Saure Hydrolyse von Oaklacton-Rutinosid (3)

Ein Aliquot des in 3.2.2.7 isolierten Oaklacton-Rutinosids (0,5 mg) werden in Acetonitril/Wasser (1 ml, 2/8 (v/v)) gelöst und nach Zugabe von Trifluoressigsäure (0,4 ml, 2M) für eine Stunde bei 120°C erhitzt.

Danach wird die Lösung dreimal mit Dichlormethan (5 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und mittels einer Vigreux-Kolonnen eingeeengt.

3.4 Fraktionierung von Whisky

3.4.1 Iterative Lösungsmittelfraktionierung von Whisky

Flüchtige Verbindungen des Whiskys AB1 (700 ml) werden bei 40°C und vermindertem Druck entfernt und der wässrige Rückstand wird sukzessiv, nach ansteigender Polarität, mit Pentan (5 x 250 ml), Diethylether (5 x 250 ml) und Ethylacetat (5 x 250 ml) im Scheidetrichter extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden bei 40°C und vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Zurück bleiben vier Fraktionen: die ölige, gelbe Pentan-Fraktion (I), die Diethylether-Fraktion (II), die Ethylacetat-Fraktion (III) und die wässrige Fraktion (IV).

Probenaufarbeitung für die Quantifizierung von HMF-Derivaten mittels LC-MS/MS

Die von Lösungsmitteln befreiten Fraktionen I – IV werden ohne Lyophilisation auf ein definiertes Volumen im Messkolben aufgefüllt (vgl. Tabelle 40).

Tabelle 40: Verdünnungen der Fraktionen I – IV für die Quantifizierung der HMF-Derivate mittels LC-MS/MS

Fraktion	Lösungsmittel	Volumen [ml]
I	<i>i</i> -Propanol/ACN (50/50)	100
II	ACN	100
III	ACN/Wasser (80/20)	100
IV	Wasser	500

Probenaufarbeitung für Sensorische Untersuchungen

Die von Lösungsmitteln befreiten Fraktionen I – IV werden zunächst lyophilisiert und dann in einem Gemisch aus Sensorikwasser/Ethanol (Sensorikwasser auf pH 4,5 eingestellt, 20/80 (v/v)) in ihren „natürlichen“ Konzentrationsverhältnis aufgenommen. Die Geschmacksaktivität der einzelnen Fraktionen wird von einem trainierten Sensorikpanel beschrieben, dabei werden die Geschmacksqualitäten auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr stark wahrnehmbar) bewertet. Als sensorischer Test wird der Half-Mouth Test (*Scharbert et al.*, 2004) herangezogen.

3.4.2 Chromatographische Trennung der Fraktion II mittels präparativer HPLC

Die Diethylether-Fraktion (II) wird in einem Ethanol/Wasser-Gemisch (20 ml, 60/40 (v/v)) im Ultraschallbad für 10 Minuten gelöst. Die Fraktion wird nach Membranfiltration mittels präparativer HPLC (Gradient C 3.10.2.3) aufgetrennt. Das Eluat wird in 12 Fraktionen eingeteilt, II-1 bis -12. Bei 40°C und unter vermindertem Druck wird Methanol entfernt.

Probenaufarbeitung für die GVA

Die wässrigen Rückstände der Fraktionen II-1 bis -12 werden zweifach lyophilisiert und vollständig jeweils in einem Ethanol/Sensorikwasser-Gemisch (20 ml, 2/98 (v/v)) gelöst und sukzessiv 1 zu 1 verdünnt. Verdünnungsreihen der zwölf Fraktionen werden dem Sensorikpanel in aufsteigender Konzentration präsentiert. Jede Verdünnungsstufe wird im Half-Mouth Test (*Scharbert et al.*, 2004) gegen einen Blindwert verkostet. Die Verdünnungsstufe, bei der ein Geschmacksunterschied zwischen Probe und Referenzlösung wahrnehmbar ist, wird als GV-Faktor festgelegt.

Probenaufarbeitung für das Screening nach Süßmodulatoren

Um semivolatile Verbindungen nicht zu verlieren, werden die wässrigen Rückstände der Fraktionen II-1 bis -12 ohne Lyophilisation auf aktivierte und konditionierte RP-18 SPE-Kartuschen gegeben. Das Wasser wird entfernt und die Fraktion mit Ethanol eluiert. Nach Entfernung des Ethanols bei 40°C und reduziertem Druck, werden sie in einem Ethanol/Sensorikwasser-Gemisch (20 ml, 4/56 (v/v)) aufgenommen.

a) Quantifizierung mittels LC-MS/MS

Für die Bestimmung von HMF Derivaten in den Fraktionen II-1 bis -12 mittels LC-MS/MS werden die konzentrierten Fraktionen nochmals verdünnt (308 µL + 692 µL). Die Endkonzentration entspricht der zehnfachen natürlichen Whiskykonzentration.

Vor der Messung mittels LC-MS/MS wird die Interne Standard Lösung (10 µl, vgl. 3.6.8) zugegeben.

b) Sensorische Experimente

Für die sensorische Untersuchung der Fraktionen II-1 bis -12 bezüglich ihres süßmodulierenden Potentials, werden die konzentrierten Fraktionen verdünnt (6,17 ml + 3,83 ml Sensorikwasser + 10 ml 8 %-ige Saccharose-Lösung). Die Endkonzentration entspricht einer Lösung mit 2 % Ethanol und 4 % Saccharose bei einer zehnfachen, natürlichen Whiskykonzentration.

Die zwölf Fraktionen werden bezüglich ihrer süßmodulierenden Eigenschaften im Duo-Trio-Test verkostet.

3.5 Synthese von Referenzsubstanzen der HMF-Derivate

3.5.1 Umsetzung von HMF mit Alkoholen: Bildung von Ethern

5-Hydroxymethylfurfural (**9**) wird zunächst im jeweils verwendeten Lösungsmittel (vgl. Tabelle 41) gelöst und der Katalysator Amberlyst-15 wird zugegeben. Die Lösung wird unter Rühren erwärmt und für die jeweils angegebene Reaktionszeit auf konstanter Temperatur gehalten. Nach dem Abkühlen, wird das Katalysatormaterial abgetrennt und das Lösungsmittel bei 40°C und unter vermindertem Druck entfernt. Der jeweilige Rückstand wird in wenigen Millilitern eines Wasser/Acetonitril-Gemisches aufgenommen (50/50 (v/v)). Die Zielverbindung wird mittels präparativer HPLC aus dem Reaktionsansatz isoliert.

Nach Identifizierung der gewünschten Verbindung in der jeweiligen HPLC Fraktion, wird diese am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der wässrige Rückstand wird mit Diethylether (3 x 50 ml) extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wird bei 40°C und unter reduziertem Druck entfernt. Der jeweilige Rückstand wird mehrmals in Ethanol aufgenommen und im Stickstoffstrom wieder eingeeengt, um verschleppte Lösungsmittelrückstände zu entfernen.

Tabelle 41: Synthese der Referenzverbindungen von HMF-Alkohol-Ether

Verbindung	Abkürzung	Einwaage HMF [mg]	Lösungsmittel (LM)	Volumen LM [ml]	Einwaage Amberlyst-15 [mg]	Temperatur [°C]	Reaktionszeit [h]
5-Ethoxy-methylfurfural	EMF (11)	100	Ethanol	3	30	75	48
5-d ₅ -Ethoxy-methylfurfural	dEMF	200	d ₆ -Ethanol	0,5	30	75	48
5-Methoxy-methylfurfural	MMF (12)	200	Methanol	5	50	60	50
5-d ₃ -Methoxy-methylfurfural	dMMF	100	d ₄ -Methanol	0,5	30	60	24
5- <i>i</i> -Propoxy-methylfurfural	<i>i</i> PMF (13)	200	<i>i</i> -Propanol	5	50	75	46
5- <i>n</i> -Propoxy-methylfurfural	<i>n</i> PMF (14)	200	<i>n</i> -Propanol	5	50	75	26
5- <i>n</i> -Butoxy-methylfurfural	<i>n</i> BMF (15)	200	<i>n</i> -Butanol	5	50	75	28
5-2-Methylbutoxy-methylfurfural	2MBMF (16)	200	2-Methylbutanol	6	50	75	48
5-3-Methylbutoxy-methylfurfural	3MBMF (17)	200	3-Methylbutanol	6	50	75	48
5-2-Phenylethoxy-methylfurfural	PhEMF (18)	200	2-Phenylethanol	6	50	75	48

3.5.2 Umsetzung von HMF mit Vanillinsäure: Bildung eines Phenolsäureesters

Vanillinsäure (200 mg) wird in THF (5 ml) gelöst und Thionylchlorid (2 ml) wird zugegeben. Die Lösung wird drei Stunden unter Rückfluss gekocht. Lösungsmittel werden im Stickstoffstrom entfernt und der ölig, gelbe Rückstand wird wieder in THF (5 ml) gelöst. Anschließend werden 150 mg HMF ebenfalls in 5 ml THF gelöst und zugegeben. Der Ansatz wird zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem dann das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt wird, wird der Rückstand in Acetonitril (5 ml) aufgenommen und mittels präparativer HPLC aufgereinigt (vgl. 3.10.2.3 Gradient D8).

3.6 Quantitative Bestimmung von Whiskyinhaltsstoffen

3.6.1 Probenaufarbeitung für die Quantitativen Untersuchungen

3.6.1.1 Aufarbeitung von Whiskyproben

Die Whiskyproben (vgl. Tabelle 38) werden für die verschiedenen quantitativen Analysen unterschiedlich aufgearbeitet.

Für die Bestimmung der Mineralstoffe und Zucker mittels HPIC wird je 1 ml der Whiskyprobe im Stickstoffstrom zur Trockene eingeeengt und in 0,5 ml Reinstwasser resolvatisiert. Dies bewirkt die Entfernung von Ethanol und die Verdoppelung der Analytkonzentration.

Aufgrund der hohen Konzentrationen an Essigsäure in Whiskys, werden für deren Quantifizierung alle Whiskyproben lediglich 1 zu 1 mit Reinstwasser verdünnt. Zur Bestimmung der flüchtigen Ameisensäure, werden je 5 ml der Proben mit Natriumhydroxid alkalisiert und anschließend lyophilisiert. Nach Aufkonzentrierung und Resolvatisierung der Proben in 2,5 ml Reinstwasser kann Natriumformiat quantifiziert werden.

Ethanol stört bei der Analyse der Whiskys mittels LC-MS/MS nicht und so werden die Whiskyproben je nach Analytkonzentration verdünnt, gegebenenfalls ein interner Standard zugesetzt und direkt am jeweiligen LC-MS/MS-System vermessen.

3.6.1.2 Aufarbeitung der Holzprodukte für die Quantifizierung

Die Eichenholzprodukte (vgl. Tabelle 39) werden mit flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend mit einer Analysenmühle gemahlen. Je 20 g der so generierten Holzmehle wird jeweils mit einer Ethanol/Wasser-Mischung (2 x 200 ml; 60/40 (v/v)) für zwei Stunden extrahiert. Das Lösungsmittel wird nach der Filtration am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrigen Rückstände werden gefriergetrocknet.

Zur Quantifizierung werden definierte Mengen des gefriergetrockneten Extraktes (10 mg) in 4 ml einer Ethanol/Wasser-Mischung (60/40 (v/v)) aufgenommen, im Ultraschallbad für 10

Minuten homogenisiert und anschließend membranfiltriert. Die bedeutet, dass 1 Liter des zu untersuchenden flüssigen Extraktes einer Menge von 2,5 g gefriergetrocknetem Extrakt entspricht.

3.6.2 Quantifizierung von Mineralstoffen in Whisky mittels HPIC

Für die Quantifizierung der sensorisch relevanten Mineralstoffe in verschiedenen Whiskyproben wird die Hochleistungsionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion verwendet. Die Chloridsalze der Kationen sowie die Kaliumsalze der Anionen werden als Referenzen herangezogen und über externe Kalibriergeraden quantifiziert. Hierzu werden die Stammlösungen (Tabelle 42 und Tabelle 43) in einem Konzentrationsbereich von 1:10 bis 1:1000 (sechspunkt Kalibrierung) verdünnt. Je 1 ml der Whiskyproben wird im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt und in 0,5 ml Reinstwasser resolvatziert. Diese Lösungen werden nach Membranfiltration in das jeweilige HPIC-System (vgl. 3.10.4) injiziert.

Tabelle 42: Konzentrationen der Kationen in der Stammlösung

Kation	Eingesetztes Salz	Konzentration Stammlösung [mg/l]
Natrium	Natriumchlorid	501.36
Ammonium	Ammoniumchlorid	415.27
Kalium	Kaliumchlorid	905.19
Magnesium	Magnesiumchlorid	518.72
Calcium	Calciumchlorid	946.74

Tabelle 43: Konzentration der Anionen in der Stammlösung

Anion	Eingesetztes Salz	Konzentration Stammlösung [mg/l]
Chlorid	Kaliumchlorid	219.07
Sulfat	Kaliumsulfat	255.20

3.6.3 Quantifizierung von Kohlenhydraten und Polyolen in Whisky mittels HPIC

Die quantitative Analyse der Kohlenhydrate und Polyole in Whisky erfolgt mittels HPIC. Externe Kalibriergeraden werden anhand von Standardlösungen I und II (vgl. Tabelle 44 und Tabelle 45) der Kohlenhydrate und Polyole in Verdünnungen von 1:1 bis 1:100 (Siebenpunkt Kalibrierung) erstellt.

Tabelle 44: Konzentration der Kohlenhydrate und Polyole in der Stammlösung I

Verbindung	Konzentration Stammlösung [mg/l]
Glycerin	7,83
Erythritol	9,43
Rhamnose	12,00
Sorbitol	14,08
Arabinose	17,88
Glucose	19,98
Galactose	22,01
Ribose	25,73
Cellobiose	35,12

Die Whiskyproben werden unterm Stickstoffstrom eingengt und in Reinstwasser resolvatisiert. Zur Aufkonzentrierung wird je 1 ml Probe in 500 µl gelöst, membranfiltriert und ins HPIC System (vgl. 3.10.4) injiziert.

Tabelle 45: Konzentration der Kohlenhydrate und Polyole in der Stammlösung II

Verbindung	Konzentration Stammlösung [mg/l]
Inositol	7,43
Xylitol	10,58
Arabitol	12,66
Mannitol	16,39
Mannose	18,06
Xylose	20,27
Fructose	23,44
Saccharose	37,17
Inosit	7,43

3.6.4 Quantifizierung von organischen Säuren in Whisky

3.6.4.1 Quantifizierung von flüchtigen Säuren mittels HPIC

Die quantitative Bestimmung von Ameisen- und Essigsäure erfolgt über HPIC und Leitfähigkeitsdetektion. Über externe Siebenpunkt-Kalibriergeraden (1:1 bis 1:100) mit Referenzsubstanzen werden Essigsäure und Ameisensäure quantifiziert. Die Konzentration der hergestellten Stammlösung ist in Tabelle 46 aufgelistet. Für die Quantifizierung der Essigsäure werden alle Whiskeyproben 1 zu 1 mit Reinstwasser verdünnt und dann direkt mittels HPIC (vgl. 3.10.4) vermessen. Zur Bestimmung von Ameisensäure, werden je 5 ml der Proben mit Natriumhydroxid alkalisiert und anschließend lyophilisiert. Nach

Aufkonzentrierung und Resolvatisierung der Proben in 2,5 ml Reinstwasser werden sie membranfiltriert und ins HPIC System (vgl. 3.10.4) injiziert.

Tabelle 46: Konzentration der Säureanionen

Verbindung	Konzentration Stammlösung [mg/l]
Formiat	155,85
Acetat	213,78

3.6.4.2 Quantifizierung von nicht-flüchtigen organischen Säuren mittels LC-MS/MS

Die nicht-flüchtigen organischen Säuren werden mit einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) mittels LC-MS/MS im MRM Modus (ESI⁻) quantifiziert (vgl. 3.11). Als isotopenmarkierte interne Standards dienen ¹³C₂-Citronensäure, d₄-Bernsteinsäure und ¹³C₂-Oxalsäure (vgl. Tabelle 48). Die für die Quantifizierung herangezogenen spezifischen Massenübergänge der jeweiligen Verbindungen und die dazugehörigen internen Standards sind in Tabelle 47 aufgelistet. Response-Faktoren werden mit Standard Lösungen der organischen Säuren bestimmt. Hierzu werden die Referenzlösungen (vgl. Tabelle 49) 1:1 bis 1:100 verdünnt und mit je 30 µl IS (vgl. Tabelle 50) versetzt. Durch Auftragen der Flächenverhältnisse von Analyt und internem Standard gegen die Konzentrationsverhältnisse werden Kalibriergeraden erhalten. Für die quantitative Bestimmung in Whisky werden die Proben ohne Verdünnung nach Membranfiltration und der Zugabe der internen Standard Lösung (1 ml Probe + 30 µl IS) in das LC-MS/MS System injiziert.

Tabelle 47: Nichtflüchtige Säuren und ihre zugehörigen isotopenmarkierten internen Standards mit jeweils ausgewählten Massenübergängen und MS/MS-Parameter

Verbindung (Nr.)	Massen- übergang [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	R _t [min]	IS
Äpfelsäure	132,9/70,7	-30	-22	-11	11,0	¹³ C ₂ -Citronensäure
Citronensäure	190,9/110,7	-30	-16	-5	11,2	¹³ C ₂ -Citronensäure
Bernsteinsäure	116,9/72,9	-45	-12	-3	10,3	d ₄ -Bernsteinsäure
Oxalsäure	88,9/88,9	-30	-6	-5	11,0	¹³ C ₂ -Oxalsäure
Milchsäure	88,9/88,9	-35	-6	-3	6,3	¹³ C ₂ - Oxalsäure

Tabelle 48: Isotopenmarkierte interne Standards der nichtflüchtigen Säuren mit ausgewählten Massenübergänge und MS/MS-Parameter

Interner Standard	Massen- übergang [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	R _t [min]
¹³ C ₂ -Citronensäure	192,9/112,8	-35	-16	-19	11,2
d ₄ -Bernsteinsäure	121,0/76,9	-25	-18	-3	10,3
¹³ C ₂ -Oxalsäure	90,9/90,8	-20	-6	-7	11,0

Tabelle 49: Konzentration der Stammlösung der nicht-flüchtigen Säuren

Verbindung	Konzentration Stammlösung [mg/l]
Äpfelsäure	33,45
Citronensäure	28,37
Bernsteinsäure	35,41
Oxalsäure	30,90
Milchsäure	27,38

Tabelle 50: Konzentration des internen Standards (IS)

Verbindung	Konzentration der Stammlösung des IS [mg/l]	Konzentration des IS in der Probe [mg/l]
¹³ C ₂ -Citronensäure	97,80	2,85
d ₄ -Bernsteinsäure	88,07	2,57
¹³ C ₂ -Oxalsäure	121,00	3,52

3.6.5 Quantifizierung der niedermolekularen Phenole mittels LC-MS/MS

Die Quantifizierung der niedermolekularen Phenole in Whisky und Holzextrakten erfolgt mittels LC-MS/MS im MRM Modus (ESI⁺). Dabei werden spezifische Massenübergänge der Zielanalyten verwendet (vgl. Tabelle 51). Referenzlösungen der niedermolekularen Phenole (vgl. Tabelle 52) werden 1:1 bis 1:1000 verdünnt und externe Kalibriergeraden aufgenommen. Die Holzextrakte und Whiskyproben werden für die Bestimmung verdünnt oder direkt vermessen. Nach Membranfiltration werden die Proben ins LC-MS/MS System injiziert.

Tabelle 51: Niedermolekulare Phenole mit jeweils ausgewählten Massenübergängen und MS/MS-Parameter

Verbindung (Nr.)	Massen- übergang [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	R _t [min]
Gallussäure	169,0/124,8	-50	-22	-7	6,8
Methylgallat	183,0/123,9	-70	-30	-7	10,1
Ethylgallat	196,9/123,8	-80	-32	-1	12,0
4-Hydroxybenzoesäure (38)	136,9/92,8	-50	-22	-7	10,1
Protocatechusäure	153,0/108,8	-20	-20	-5	10,5
Gentisinsäure	152,9/107,8	-45	-26	-5	11,4
Vanillinsäure (40)	166,9/108,0	-55	-26	-5	10,7
Syringinsäure (43)	197,0/181,9	-60	-18	-11	11,0
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	121,0/91,8	-90	-34	-5	11,4
Vanillin (22)	151,0/135,8	-50	-18	-9	12,3
Syringaldehyd (20)	181,1/165,9	-40	-18	-9	12,6
Kaffeesäure	179,0/135,0	-50	-22	-9	11,5
Ferulasäure	193,0/133,8	-55	-22	-7	12,8
Sinapinsäure	223,0/163,9	-60	-20	-9	12,8
Coniferylaldehyd (37)	177,0/161,9	-45	-20	-9	14,4
Sinapaldehyd (21)	207,0/176,8	-60	-28	-11	14,4
Furan-2-carbonsäure	110,9/66,9	-40	-18	-9	9,5
Ellagsäure	301,0/144,8	-115	-56	-7	12,1
Ferulasäureethylester	221,0/205,9	-70	-22	-1	18,3
Vanillinsäureethylester (41)	195,0/180,1	-55	-20	-5	17,3
Protocatechusäureethylester	181,0/107,9	-65	-34	-5	14,8
Syringinsäureethylester	225,0/209,8	-50	-20	-1	18,1
4-Hydroxybenzoesäureethylester	165,0/92,0	-65	-30	-5	17,7
Castalagin	933,1/300,8	-60	-54	-6	8,6
Scopoletin	191,1/103,6	-75	-36	-17	12,8
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24)	136,9/136,9	-15	-12	-7	9,9
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28)	152,9/152,9	-5	-6	-11	8,5
Lyoniresinol (4)	419,2/359,1	-125	-42	-11	12,6
Lyonisid (5)	551,3/419,2	-135	-34	-15	23,0
Nudiposid (6)	551,3/419,2	-135	-34	-15	25,1
Lyoniresinol-Glucosid (7)	581,3/419,3	-120	-36	-13	11,4
Lyononiresinol-9-O-gallat (8)	571,2/124,9	-140	-76	-9	14,8
Oaklacton-Galloylglucosid (1)	487,2/168,6	-155	-40	-9	14,1
Oaklacton-Glucosid (2)	335,0/58,9	-80	-50	-1	13,2
Oaklacton-Rutinosid (3)	481,2/58,9	-125	-72	-1	12,4

Tabelle 52: Konzentration der Stammlösung der niedermolekularen Phenole

Verbindung	Konzentration Stammlösung [mg/l]
Gallussäure	27,34
Methylgallat	44,74
Ethylgallat	35,44
4-Hydroxybenzoesäure (38)	31,44
Protocatechusäure	22,38
Gentisinsäure	22,22
Vanillinsäure (40)	19,90
Syringinsäure (43)	21,42
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	21,28
Vanillin (22)	29,52
Syringaldehyd (20)	18,02
Kaffeesäure	21,06
Ferulasäure	22,64
Sinapinsäure	20,12
Coniferylaldehyd (37)	13,50
Sinapaldehyd (21)	11,50
Furan-2-carbonsäure	38,68
Ellagsäure	19,75
Ferulasäureethylester	18,38
Vanillinsäureethylester (41)	20,64
Protocatechusäureethylester	18,88
Syringinsäureethylester	19,04
4-Hydroxybenzoesäureethylester	17,62
Scopoletin	11,1
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24)	49,04
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28)	59,28
Lyoniresinol (4)	25,12
Lyonisid (5)	22,24
Nudiposid (6)	24,87
Lyoniresinol-Glucosid (7)	3,77
Lyononiresinol-9-O-gallat (8)	14,01
Oaklacton-Galloylglucosid (1)	35,94
Oaklacton-Glucosid (2)	6,09
Oaklacton-Rutinosid (3)	10,00

3.6.6 Quantifizierung von Fettsäuren in Whisky mittels LC-MS/MS

In Whisky werden ausgewählte Fettsäuren mittels LC-MS/MS im MRM Modus quantifiziert. Dabei werden spezifische Massenübergänge der Analyten (vgl. Tabelle 53) sowie externe Siebenpunkt-Kalibriergeraden mit Standardlösungen (vgl. Tabelle 54) zur quantitativen Bestimmung herangezogen. Die Whiskyproben werden für die Bestimmung direkt ins LC-MS/MS System (vgl. 3.11) injiziert.

Tabelle 53: Fettsäuren mit jeweils ausgewählten Massenübergängen und MS/MS-Parameter

Verbindung	Massenübergang [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	R _t [min]
Octansäure	143,0/143,0	-55	-12	-15	3,2
Decansäure	171,0/171,0	-55	-8	-1	5,6
Laurinsäure	199,0/199,1	-75	-14	-7	10,7
Myristinsäure	227,1/227,0	-80	-14	-17	15,1
Palmitinsäure	255,2/255,2	-75	-20	-7	18,3
Stearinsäure	283,2/283,2	-85	-14	-13	21,0
Palmitoleinsäure	253,1/253,2	-95	-14	-7	15,4
Ölsäure	281,2/281,4	-85	-14	-9	18,0
Linolsäure	279,2/279,2	-70	-16	-15	16,0
Linolensäure	277,1/277,1	-80	-12	-9	14,1

Tabelle 54: Konzentration der Stammlösung

Verbindung	Konzentration Stammlösung [mg/l]
Octansäure	5,51
Decansäure	1,67
Laurinsäure	0,95
Myristinsäure	0,89
Palmitinsäure	1,22
Stearinsäure	0,89
Palmitoleinsäure	0,88
Ölsäure	0,79
Linolsäure	1,09
Linolensäure	4,33

3.6.7 Quantifizierung von Fettsäureethylester in Whisky mittels LC-MS/MS

Fettsäureethylester werden in Whisky mittels LC-MS/MS im MRM Modus quantitative analysiert. Spezifische Massenübergänge der Analyten (vgl. Tabelle 55) und externe achtpunkt Kalibriergeraden von Standardlösungen (vgl. Tabelle 56) werden für die Quantifizierung herangezogen. Die Bestimmung in den Proben erfolgt nach direkter Injektion der Proben ins LC-MS/MS System (vgl. 3.11).

Tabelle 55: Fettsäureethylester mit jeweils ausgewählten Massenübergängen und MS/MS-Parameter

Verbindung (Nr.)	Massenübergang [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	R _t [min]
Ethyl-octanoat	173,2/145,1	46	13	6	5,6
Ethyl-decanoat	201,2/173,3	51	15	6	9,4
Ethyl-laurat	229,2/201,3	41	17	20	13,0
Ethyl-myristat	257,2/229,5	51	17	2	15,8
Ethyl-palmitat	285,2/257,2	61	17	12	18,1
Ethyl-palmitoleat	283,3/237,4	46	15	8	15,5
Ethyl-stearat	313,2,1/313,2	56	9	16	20,9

Tabelle 56: Konzentration der Stammlösung

Verbindung	Konzentration Stammlösung [mg/l]
Ethyl-octanoat	178,6
Ethyl-decanoat	403,2
Ethyl-laurat	238,6
Ethyl-myristat	489,0
Ethyl-palmitat	290,4
Ethyl-palmitoleat	37,9
Ethyl-stearat	159,1

3.6.8 Quantifizierung von HMF-Derivaten in Whisky mittels LC-MS/MS

HMF und dessen Derivate werden mit einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) mittels LC-MS/MS im MRM Modus (ESI⁺) quantifiziert (vgl. 3.11). Als isotope-markierte interne Standards dienen 5-¹³C₂-Acetoxymethylfurfural, 5-d₃-Methoxymethylfurfural und 5-d₅-Ethoxymethylfurfural. Die für die Quantifizierung herangezogenen spezifischen Massenübergänge der jeweiligen Verbindungen und die dazugehörigen internen Standards sind in Tabelle 57 aufgelistet. Response-Faktoren werden mit Standard Lösungen der HMF-Derivate bestimmt. Hierzu werden die Referenzlösungen (vgl. Tabelle 60) 1:1 bis 1:1000 verdünnt und mit je 10 µl IS (vgl. Tabelle 61) versetzt. Durch Auftragen der Flächenverhältnisse von Analyt und internem Standard gegen die Konzentrationsverhältnisse werden Kalibriergeraden erhalten. Für die quantitative

Bestimmung in den Holzextrakten, den Modellansätzen und im Whisky werden die Proben verdünnt (1:50) und unverdünnt nach Membranfiltration und der Zugabe der internen Standard Lösung (1 ml Probe + 10 µl IS) in das LC-MS/MS System (vgl. 3.11) injiziert.

Tabelle 57: HMF-Derivate und ihre zugehörigen isotopenmarkierten internen Standards mit jeweils ausgewählten Massenübergängen und MS/MS-Parameter

Verbindung (Nr.)	Massen- übergang [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	R _t [min]	IS
5-Hydroxymethylfurfural (9)	127,0/109,3	16	15	16	5,2	5-d ₃ -Methoxy- methylfurfural
5-Acetoxymethylfurfural (10)	169,1/108,9	31	13	8	16,8	5- ¹³ C ₂ -Acetoxy- methylfurfural
5-Ethoxymethylfurfural (11)	155,0/108,9	26	17	8	18,5	5-d ₅ -Ethoxy- methylfurfural
5-Methoxymethylfurfural (12)	141,1/109,0	56	19	8	13,9	5-d ₃ -Methoxy- methylfurfural
5- <i>i</i> -Propoxymethylfurfural (13)	169,1/109,0	56	19	8	20,8	5-d ₅ -Ethoxy- methylfurfural
5- <i>n</i> -Propoxymethylfurfural (14)	169,1/108,9	61	17	10	21,4	5-d ₅ -Ethoxy- methylfurfural
5- <i>n</i> -Butoxymethylfurfural (15)	183,1/109,0	61	19	8	22,7	5-d ₅ -Ethoxy- methylfurfural
5-2-Methyl-butoxymethylfurfural (16)	197,1/109,0	46	19	8	23,6	5-d ₅ -Ethoxy- methylfurfural
5-3-Methyl-butoxymethylfurfural (17)	197,0/109,0	41	19	8	23,5	5-d ₅ -Ethoxy- methylfurfura
5-2-Phenyl-ethoxymethylfurfural (18)	231,1/108,9	31	19	8	23,3	5-d ₅ -Ethoxy- methylfurfural
5-HMF-Vanillate (19)	277,1/109,0	36	19	8	21,7	5-d ₅ -Ethoxy- methylfurfural

Tabelle 58: Isotopenmarkierte interne Standards der HMF Addukte mit ausgewählten Massenübergängen und MS/MS-Parametern

Interner Standard	Massenübergang [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	R _t [min]
5-d ₃ -Methoxymethylfurfural	144,1/108,9	46	17	8	13,9
5-d ₅ -Ethoxymethylfurfural	160,1/108,9	51	17	8	18,4
5- ¹³ C ₂ -Acetoxymethylfurfural	171,0/108,9	21	13	8	16,8

Die Reinheiten aller synthetisierten Verbindungen werden mittels q-NMR ermittelt. Sie sind zusammen mit den Ausbeuten in Tabelle 59 aufgelistet.

Tabelle 59: Ausbeute und Reinheit der synthetisierten Referenzsubstanzen

Verbindung	Ausbeute	Reinheit (q-NMR)	Molekulargewicht [g/mol]
5-Ethoxymethylfurfural (11)	1 g	77 %	154
5-d ₅ -Ethoxymethylfurfural	100 mg	76 %	159
5-Methoxymethylfurfural (12)	80 mg	83 %	140
5-d ₃ -Methoxymethylfurfural	3 mg	80 %	143
5- <i>n</i> -Propoxymethylfurfural (14)	70 mg	87 %	168
5- <i>i</i> -Propoxymethylfurfural (13)	70 mg	82 %	168
5- <i>n</i> -Butoxymethylfurfural (15)	85 mg	99 %	182
5-2-Phenylethoxymethylfurfural (18)	20 mg	98 %	230
5-2-Methylbutoxymethylfurfural (16)	16 mg	78 %	196
5-3-Methylbutoxymethylfurfural (17)	20 mg	87 %	196
VanMF (19)	20 mg	92 %	276

Tabelle 60: Konzentration der Stammlösung

Verbindung	Konzentration Stammlösung [mg/l]
5-Hydroxymethylfurfural (9)	0,98
5-Acetoxymethylfurfural (10)	0,51
5-Ethoxymethylfurfural (11)	0,29
5-Methoxymethylfurfural (12)	0,14
5- <i>n</i> -Propoxymethylfurfural (14)	0,18
5- <i>i</i> -Propoxymethylfurfural (13)	0,14
5- <i>n</i> -Butoxymethylfurfural (15)	0,13
5-2-Phenylethoxymethylfurfural (18)	0,14
5-2-Methylbutoxymethylfurfural (16)	0,09
5-3-Methylbutoxymethylfurfural (17)	0,09
VanMF (19)	0,09

Tabelle 61: Konzentration des Internen Standards (IS)

Verbindung	Konzentration der Stammlösung des IS [mg/l]	Konzentration des IS in der Probe [mg/l]
5- ¹³ C ₂ -Acetoxymethylfurfural	5,0	0,050
5-d ₅ -Ethoxymethylfurfural	1,2	0,012
5-d ₃ -Methoxymethylfurfural	2,0	0,020

3.7 Modelstudien zur Bildung von EMF

3.7.1 Lagerungsstudien von HMF in Ethanol/Wasser-Gemischen

14 Lösungen (je 100 ml) werden mit der gleichen Konzentration an HMF (**9**) (10 mg/l) hergestellt. Die Ansätze unterscheiden sich in ihrem Ethanolgehalt, pH-Wert oder der Lagertemperatur und sind in Tabelle 62 aufgelistet. Nach Abnahme eines Aliquotes (1 ml) und der Zugabe von internem Standard (1 ml Probe + 10 µl IS) werden sie monatlich mittels LC-MS/MS (vgl. 3.6.8) vermessen um die Konzentrationen von HMF (**9**) und EMF (**11**) zu bestimmen.

Tabelle 62: Modelansätze der Lagerstudien zur Bildung von EMF

Ansatz	EtOH (Vol. %)	pH	Temperatur (°C)
1	10	3	RT
2	20	3	RT
3	40	3	RT
4	60	3	RT
5	10	4,5	RT
6	20	4,5	RT
7	40	4,5	RT
8	60	4,5	RT
9	10	6	RT
10	20	6	RT
11	40	6	RT
12	60	6	RT
13	40	4,5	6°C
14	40	4,5	40°C

3.7.2 „Forced Aging“-Experimente mit Whisky

Fünf Ansätze werden vorbereitet. Diese enthalten alle das gleiche Volumen an der Whiskyprobe „AB3“ (2 ml). Jedem Ansatz werden je 20 mg Katalysator „Amberlyst-15“ zugegeben und bei 45°C für unterschiedlich lange Zeitperioden (7, 4, 3, 2, und einem Tag) gerührt. Vor der Messung mittels LC-MS/MS (vgl. 3.6.8) werden die Ansätze membranfiltriert.

3.8 Sensorische Analysen

Das Sensorikpanel, zusammengesetzt aus 12 bis 14 geschulten Mitarbeiter im Alter zwischen 21 und 37 Jahren des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und molekularer Sensorik der TU München, wurde im Hinblick auf ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis ausgewählt. Die Verkostungen fanden in klimatisierten Sensorikkabinen bei 22 – 25°C statt. Farbige Proben werden dabei in farbig beleuchteten Kabinen bewertet, um eine Beeinflussungen zu verhindern. Die Sensorikteilnehmer sind stets angehalten handelsübliche Nasenklammern zu tragen.

Kommerziell erhältliches mineralstoffarmes Wasser (Evian®) wird für alle humansensorischen Analysen eingesetzt. Dabei werden die Proben, Fraktionen und Reinsubstanzen in Sensorikwasser gelöst und der pH-Wert mit Ameisensäure auf 4,5 angepasst.

Isolierte Fraktionen oder Reinsubstanzen werden vor ihrer Verkostung auf ihre Reinheit überprüft.

3.8.1 Schulung des Sensorikpanels

Zur Schulung des Panels werden Referenzsubstanzen in regelmäßigen Trainingssitzungen verkostet. Die Prüfer werden dabei mit den verschiedenen Techniken der gustatorischen Bewertung von komplexen Proben, Lösungen mit höherem Ethanolgehalt ($\geq 20\%$) sowie von isolierten Geschmackstoffen vertraut gemacht. Der besondere Fokus in den Übungen wird dabei auf Adstringenz und Süßmodulation gelegt.

3.8.1.1 Schulung der Grundgeschmacksqualitäten

Zum Training des sensorischen Eindrucks der Grundgeschmacksqualitäten süß, sauer, salzig, bitter, rau- und samtig-adstringierend, werden Übungssensoriken mit den in Tabelle 63 aufgeführten Referenzsubstanzen durchgeführt.

Tabelle 63: Substanzen und jeweilige Konzentrationen der Schulungssensoriklösungen

Geschmacksqualität	Substanz	Konzentration
süß	Saccharose	20 mmol/l
sauer	Milchsäure	20 mmol/l
salzig	Natriumchlorid	12 mmol/l
bitter	Coffein	1 mmol/l
umami	Natriumglutamat	5 mmol/l
rau-adstringierend	Tannin	0,05 %
samtig-adstringierend	Rutin	0,001 mmol/l

3.8.1.2 Schulung des Half-Mouth-Tests

Der nach *Scharbert et al.* (2004) entwickelte „Half-Mouth“-Test ist besonders für die Bewertung langanhaltender und adstringierender Geschmackswahrnehmungen geeignet. Um eine Probelösung direkt mit einer Referenz vergleichen zu können, werden die Lösungen, wie in Abbildung 87 dargestellt, je auf die linke und rechte Zughälfte pipettiert, ohne sie zu durchmischen. Anschließend wird durch Reiben der Zunge am Gaumen die unterschiedliche Wahrnehmung des Geschmackseindrucks bewertet. Vor und nach dem sensorischen Test wird jeweils die Mundhöhle mit Sensorikwasser gespült. Bei einer langanhaltenden Intensität der Adstringenz wird zwischen weiteren Proben bis zu 10 Minuten gewartet.

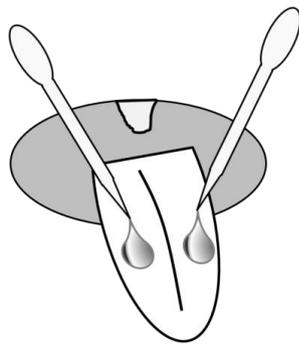


Abbildung 87: Durchführung des Half-Mouth-Tests

Die korrekte Durchführung dieser sensorischen Prüfung bedarf eines Trainings. Hierzu werden die adstringierenden Referenzsubstanzen (vgl. Tabelle 63) in aufsteigenden Konzentrationen im Half-Mouth-Test verkostet.

3.8.1.3 Schulung der Durchführung von Time-Intensity-Tests im Hinblick auf die Verkostung süßmodulierender Verbindungen

Bei der Durchführung von Time-Intensity-Tests werden Intensitäten von Geschmacksattributen einer Referenz- und Probelösung auf einer horizontalen, nichtstrukturierten Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 10 (sehr stark wahrnehmbar) aufgezeichnet. Um die Panelisten mit dem Versuchsablauf und der Durchführung der Tests am Touchscreen vertraut zu machen, sind Übungssensorik unabdingbar. Die Schulung wird mit Lösungen durchgeführt, die jeweils 2 % Saccharose und 1% Ethanol enthalten. Der Probelösung wird der Süßstoff Natriumsaccharin (5 und 10 mg/l) zugesetzt, während der Referenz nichts zugesetzt wird.

3.8.2 Durchführung von Profilsensoriken

Die Bestimmung der Geschmacksprofile erfolgt angelehnt an DIN 10967. Die Whiskys werden für die Aufnahme der Geschmacksprofile zum einen direkt ohne Verdünnung auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr stark wahrnehmbar) sensorisch in den Attributen adstringierend, bitter, süß, brennend, umami, salzig und Mundfülle vom Panel bewertet.

Für die sensorische Evaluierung der Whiskyfraktionen I – IV (vgl. 3.4.1) werden diese, wie auch die Whiskyprobe „AB1“, nach Gefriertrocknung in ihren natürlichen Konzentrationen in 20 % Ethanol gelöst und dem Panel zur Profilsensorik bereitgestellt.

3.8.3 Schwellenwertbestimmung

Schwellenwertkonzentrationen der aufgereinigten, isolierten und synthetisierten Verbindungen, werden bestimmt, indem die in Tabelle 64 aufgeführten Substanzen zunächst in einer 2 %-igen ethanolischen Lösung aufgenommen werden.

Tabelle 64: Einwaage und Probevolumen der Testverbindungen für die Schwellenwertbestimmung

Verbindung	Einwaage [mg]	Probenvolumen [ml]
Lyoniresinol (4)	4,0	20
Lyonisid (5)	1,1	20
Nudiposid (6)	3,0	20
Lyoniresinol-Glucosid (7)	2,1	20
Lynoniresinol-9-O-gallat (8)	2,8	20
Oaklacton-Galloylglucosid (1)	1,7	20
Oaklacton-Glucosid (2)	0,3	20
Oaklacton-Rutinosid (3)	1,0	20
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	2,4	20
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24)	2,8	20
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28)	3,4	20
Scopoletin	2,1	20
EMF (11)	2,5	20
MMF (12)	5,2	20
<i>i</i> PMF (13)	5,3	20
<i>n</i> PMF (14)	5,5	20
BMF (15)	17,7	20
PhEMF (16)	8,9	20
VanMF (17)	0,6	20

Der in 3.8.1.2 bereits erwähnte Half-Mouth-Test wird zur Ermittlung der Geschmacksschwellenwerte herangezogen. Dazu werden den Panelisten 1:1-Verdünnungen der Probelösungen in aufsteigender Konzentration präsentiert. In jeder Verdünnungsreihe

wird dem Teilnehmer je ein Blindwert und eine Probenlösung gereicht, wobei der Proband die von dem Blindwert abweichende Probe markieren soll. Aus zwei Sitzungen wird das arithmetische Mittel der individuellen Schwellenwerte gebildet und daraus die Schwellenwerte für das Sensorikpanel über die Bildung des geometrischen Mittels berechnet. Der Schwellenwert eines jeden Prüfers definiert sich somit als das geometrische Mittel aus der letzten nicht erkannten und der ersten richtig erkannten Konzentrationsstufe. Der Schwellenwert des Panels errechnet sich dann aus dem geometrischen Mittel über die jeweiligen Werte der Prüfer.

Für eine Prüfperson:

$$E = \sqrt{c_e \times c_{e-1}}$$

c_e : arithmetisches Mittel der Konzentration bei erstmaliger richtiger Erkennung

c_{e-1} : arithmetisches Mittel der Konzentration der vorangegangenen Probe

Für das Sensorikpanel:

$$\bar{E} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n E_i}$$

n : Anzahl der Prüfpersonen

E_i : Erkennungsschwelle der einzelnen Prüfperson

3.8.4 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Der nach *Scharbert und Hofmann* (2005) eingeführte Begriff „Dose-over-Threshold (DoT)-Faktor“ stellt ein Maß dafür dar, ob eine geschmacksaktive Substanz über ihrem Schwellenwert in einem Lebensmittel präsent ist ($\text{DoT} > 1$). Der DoT-Faktor berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Dose-over-Threshold (DoT)} = \frac{\text{Konzentration des Geschmackstoffs}}{\text{Schwellenwert des Geschmackstoffs}}$$

3.8.5 Bestimmung der süßmodulierenden Eigenschaften

Die Bestimmung der süßmodulierenden Eigenschaften der Whiskyfraktionen II-1 - 12 in Gegenwart von 4 % Saccharose und 1% Ethanol erfolgt mittels paarweiser Vergleichsprüfung. Dazu werden Lösungen der zu testenden Fraktionen (vgl. 3.4.2) in 4 %

Saccharose und 1 % Ethanol hergestellt und jeweils paarweise mit Vergleichslösungen mit 4 % Saccharose und 1 % Ethanol ohne Zusatz dargereicht. In der jeweiligen sensorischen Prüfung werden die Panelisten aufgefordert, für die in zufällig kodierten Polypropylenbechern präsentierten Probenpaare, diejenige Probe zu bestimmen, die einen länger anhaltenden Süßgeschmack aufweist. Dies erfolgt unter „forced choice“ Bedingungen. Die Auswertung erfolgt nach DIN EN ISO 5495.

3.8.6 Time-Intensity-Tests

Bei den durchgeführten Time-Intensity-Tests enthalten Probe- und Referenzlösungen jeweils 2 % Saccharose und 1% Ethanol. Die Konzentrationen der Stocklösungen sind in Tabelle 65 aufgeführt. Aus diesen werden Probelösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweils zu testenden Verbindungen hergestellt. Panelisten sollen bei der Durchführung des Tests ein Aliquot (10 ml) der Probelösung aus einem für jeden Teilnehmer vorbereiteten zufällig kodierten Reagenzglas in den Mundraum überführen, im Mund behalten und dabei die Bewertung der Süßintensität beginnen. Nach 5 Sekunden werden sie aufgefordert zu schlucken und mit der Bewertung der Süßintensität so lange fortzufahren bis sie keine Süße mehr wahrnehmen. Bei jeder Sitzung wird jeweils zusätzlich zur Probelösung analog eine Referenzlösung getestet, die lediglich 2% Saccharose und 1 % Ethanol enthält. Die Konzentrationen der zu testenden Verbindungen in den Probelösungen sind jeweils 10, 20 bzw. 25 und 50 µmol/l. Jede Konzentration wird in Doppelbestimmung analysiert.

Tabelle 65: Konzentrationen der Stocklösungen in Ethanol

Verbindung	Einwaage [mg]	Probenvolumen [ml]	Konzentration [mmol]
EMF (11)	15,4	20	5
VanMF (19)	2,8	2	5
Vanillin (Van, 22)	15,2	20	5
4-Hydroxybenzaldehyd (pHBA, 23)	12,2	20	5
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (34dHBA, 24)	13,8	20	5
Syringaldehyd (SyA, 20)	18,2	20	5
Sinapaldehyd (SinA, 21)	20,8	20	5

Die Datenaufnahme findet mit der Sensoriksoftware FIZZ (Version 2.46 A; Biosystems, Couternon, France) statt. Die Auswertung erfolgt nach der Trapezmethode nach *Lallemant et al. 1999*, die besonders für die Auswertung von Time-Intensity-Kurven mit Plateau geeignet ist. Es werden anhand der mit FIZZ generierten Rohdaten vier Punkte mittels Excel festgelegt, die den Kurvenverlauf beschreiben (5 und 90 % der Maximalintensität in der ansteigenden und absteigenden Kurve). Aus jedem Trapez werden Parameter, wie Maximale Intensität, Gesamtfläche unter der Kurve, Fläche unter dem ansteigenden Teil der

Kurve, Fläche unter dem Plateau, Fläche unter dem abfallenden Teil der Kurve, Gesamtdauert der Süßwahrnehmung, Dauer der Wahrnehmung von Anfang bis zum Plateau, Dauer der Wahrnehmung während des Plateaus, Dauer der Wahrnehmung nach dem Plateaus bis zum Ende extrahiert. Mittels zweifaktorieller ANOVA wird dann überprüft, ob zwischen Referenz- und Probenlösung signifikante Unterschiede in den einzelnen Parametern vorliegen.

3.8.7 Rekombinationsexperimente

Rekombinate werden erstellt, indem alle quantifizierten Inhaltsstoffe in ihren natürlichen Konzentrationen (vgl. Tabelle 66) in einem Ethanol/Wasser-Gemisch (AB3: 45/55 (v/v), AB1: 40/60 (v/v), SSM2: 40/60 (v/v)) gelöst werden. Die pH-Werte der Rekombinationsexperimente werden überprüft und falls notwendig mit Hydrogenchlorid eingestellt. Nach Equilibrierung (1 Tag) bei Raumtemperatur werden sie mittels Profilanalyse sensorisch verkostet. Dabei wird der authentische Whisky als Referenz verwendet. Die Geschmacksqualitäten werden vom Panel auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr stark wahrnehmbar) beurteilt.

Tabelle 66: Zusammensetzung der Geschmacksrekombinate

Rekombinat des Whiskeys	AB3	AB1	SSM2
Ethanolgehalt	45 % Vol.	40 % Vol.	40 % Vol.
Verbindung	Eingesetzte Konzentration [mg/L]		
Essigsäure	534,0	355,3	275,9
Natriumformiat	84,0	99,2	89,3
Glucose	79,9	51,1	18,2
Arabinose	75,0	42,5	17,5
Ameisensäure	35,7	34,2	36,2
Lyoniresinol (4)	24,1	12,2	4,9
Syringaldehyd (20)	22,8	12,5	4,7
Rhamnose	14,9	11,1	3,1
Calciumhydroxid	14,8	3,9	3,8
Syringinsäure (43)	11,3	5,1	1,8
Gallussäure	10,9	7,2	6,1
Sinapaldehyd (21)	10,6	7,8	1,6
5-Hydroxymethylfurfural (9)	9,8	5,3	3,5
Decansäure	9,5	4,3	10,80
Ethyldeacnoat	7,6	1,3	15,9
Ethyloctanoat	7,2	1,3	15,90
Magnesiumlactat	7,1	-	-
Äpfelsäure	6,7	5,1	5,5
Galactose	6,5	3,8	-
Ellagsäure	6,2	5,1	6,9
Vanillin (22)	5,2	2,6	1,6
Vanillinsäure (40)	4,9	1,98	0,72
Coniferylaldehyd (37)	4,9	3,9	0,86
Glycerin	4,5	2,8	63,2

Fortsetzung Tabelle 66: Zusammensetzung der Geschmacksrekombinate

Rekombinat des Whiskeys	AB3	AB1	SSM2
Ethanolgehalt	45 % Vol.	40 % Vol.	40 % Vol.
Verbindung	Eingesetzte Konzentration [mg/L]		
Natriumoxalat	4,3	1,5	2,9
Furan-2-carbonsäure	3,9	2,8	0,93
Kaliumchlorid	3,4	0,43	0,89
Fructose	3,0	-	109,1
Bernsteinsäure	2,4	2,4	1,3
Laurinsäure	2,4	-	33,3
Ethyllaurat	2,0	0,21	9,9
Protocatechusäure	2,0	1	0,63
Oaklacton-Galloylglucosid (1)	1,8	1,2	0,34
Lyoniresinol-Glucosid (2)	1,6	1,3	0,52
Octansäure	1,6	-	17,5
(+)-Lyoniresinol-Xylosid (5)	1,2	0,75	0,44
Oaklacton-Rutinosid (3)	1	0,72	0,18
Syringinsäureethylester	1,0	0,59	0,21
(-)-Lyoniresinol-Xylosid (6)	0,99	0,63	0,52
Ethylgallat	0,90	0,28	0,75
Vanillinsäureethylester (41)	0,78	0,36	0,17
Sorbit	0,77	56,2	-
Oaklacton-Glucosid (2)	0,63	0,44	0,10
Myristinsäure	0,58	-	6,7
Palmitinsäure	0,54	0,33	1,6
Ferulasäure	0,35	0,21	0,16
4-Hydroxybenzoesäure (38)	0,32	0,14	0,08
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	0,31	0,14	0,09
Protocatechusäureethylester	0,24	0,11	0,09
Ethylpalmitat	0,21	0,11	0,51
Ethylmyristat	0,17	-	0,81
Linolsäure	0,10	0,02	0,13
Sinapinsäure	0,09	0,03	-
Ölsäure	0,06	0,02	0,08
Ferulasäureethylester	0,06	0,01	-
Methylgallat	0,05	0,03	0,02
Ethylstearat	0,04	0,05	0,05
5-Ethoxymethylfurfural (11)	0,04	0,01	0,02
5-Acetoxymethylfurdural (10)	0,02	0,03	0,01
4-Hydroxybenzoesäureethylester	0,02	-	-
Ethylpalmitoleat	0,02	-	1,1
Stearinsäure	0,01	0,03	0,03
5-Methoxymethylfurfural (12)	0,01	-	-
Milchsäure	-	2,7	52,10

Omissionsexperimente werden analog der Rekombinate hergestellt, aber mit Weglassen bestimmter Substanzgruppen.

Das Experiment ohne den Fettsäuren und derer Ethylester wird mit der Whiskyprobe „SSM2“ durchgeführt. Dabei werden Decansäure, Laurinsäure, Octansäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Linolsäure, Ölsäure, Stearinsäure, Ethyldecanoat, Ethyloctanoat, Ethyllaurat, Ethylpalmitat, Ethylmyristat, Ethylstearat und Ethylpalmitoleat weggelassen.

Das Omissionsexperiment ohne Süßmodulatoren wird mit der Whiskyprobe „AB3“ durchgeführt. Dabei werden Syringaldehyd, Sinapaldehyd, Vanillin, Coniferylaldehyd, EMF, AcMF und MMF weggelassen. Außerdem wird eine 20%-ige ethanolische Lösung verwendet.

3.9 Zelleexperimente mit hTAS1R-Süßrezeptoren

Die Untersuchungen zur Aktivierung des Süßrezeptors durch ausgewählte HMF Derivate, niedermolekulare phenolische Aldehyde, Säuren und Alkohole wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes am Arbeitskreis von Prof. Dr. W. Meyerhof am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke mit der Unterstützung von Juliane Bojahr durchgeführt.

3.9.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293 FlpIn T-Rex $G_{\alpha 15}G_{\beta 3}$ /hTAS1R2, Invitrogen, Karlsruhe) bei denen die Untereinheit TAS1R2 des humanen Süßrezeptors und die G-Protein-Untereinheit $G_{\alpha 15}G_{\beta 3}$ stabil sowie die Untereinheit hTAS1R3 Tetracyclin-induziert expremiert werden, werden für die Zelleexperimente verwendet.

Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, versetzt mit FCS (10 %, Tetrazyklin-frei), L-Glutamin (1%), Penicilin G (1 %, 1000 Units/ml) und Streptomycin (10 mg/ml), in Plastik-Kulturschalen (10 cm Ø) kultiviert. Die Selektion erfolgt mit Hilfe von Hygromycin (200 µg/ml), G481 (200 µg/ml), Blasticidin (15g/ml) und Puromycin (1µg/ml). Das Medium wird zum Vereinzeln der Zellen abgesaugt. Dann werden die Zellen mit 3 ml auf 37°C vorgewärmter, phosphatgefufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mit Trypsin (3 ml) versetzt und für etwa 2-3 min bei 37°C inkubiert. Durch anschließendes 10-maliges Auf-und Abpipettieren werden die Zellen vom Boden der Kulturschale gelöst und nach Zugabe von 3 ml Medium stoppt das Trypsinieren. Durch Zentrifugation (5 min, 900 rpm) werden Zellen vom Überstand getrennt und das Pellet in definierten Volumen aufgenommen. Nach Resuspension der Zellen werden die vereinzelt Zellen weiter kultiviert.

3.9.2 FLIPR-Calcium Imaging

96-Well-Multititerplatten mit durchsichtigem Boden werden mit Poly-D-Lysin beschichtet. In die Löcher der beschichteten Platten werden je 100 µl 1:10 verdünnter Zellsuspension (3.9.1) pipettiert. Die Kultivierung der Zellen (37°C, 5 % CO₂) erfolgt bis zu einer Konfluenz von etwa 70 %. Die anschließende Induktion der hTAS1R3-Untereinheit erfolgt mittels Tetracyclin (2,5 µg). Die Induktion erfolgt lediglich bei der Hälfte der Wells, die andere Hälfte stellt die Negativkontrolle dar, um unspezifische Zellantworten ausschließen zu können. Je Well werden 100 µl Medium mit Tetracyclin (induzierte Zellen) oder Medium ohne Tetracyclin (Kontrollzellen) pipettiert. 24 Stunden nach Induktion werden die Zellen mit dem Farbstoff Fluo-4-AM (2 µM/Platte) und Probenecid (2,5 mM/Platte) beladen. Die anschließende Inkubation (1 h; 37°C; 5 % CO₂) zur intrazellulären Anreicherung des Farbstoffes erfolgt im Dunkeln. Überschüssiger Farbstoff wird durch Waschen mit Puffer (130 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l Na-Pyruvat, pH 7,4) entfernt. Nach 45-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgt ein weiterer Waschschriff. Nach dem Waschen verbleiben je 100 µl des Puffers im Well und es erfolgt die Messung am fluorimetrischen Plattenlesegeräte (FLIPR) bei einer Anregungswellenlänge von 470 - 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 -570 nm. Hierbei erfolgt zunächst die Applikation der jeweiligen Probelösung (50 µl) und nach 5 bzw. 7 Minuten wird eine Isoproterenol-Lösung (50 µl, 40 µM) zur Kontrolle der Zellvitalität appliziert.

Lösungen der Testsubstanzen werden mit Puffer (130 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 10 mmol/l HEPES, 2 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l Na-Pyruvat, pH 7,4) in dreifacher Konzentration angesetzt. Die maximale Konzentration an DMSO beträgt 0,5 %. Die Messung von binären Lösungen der Testsubstanzen mit Natrium-2-(4-Methoxy-phenoxy)propionat (finale Konzentration 1 mmol/l) dient zur Überprüfung der Inhibierung der Rezeptoraktivität.

Die Daten werden in mindestens zwei unabhängigen Serien gesammelt, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wird. Die Fluoreszenzsignale der hTAS1R2/hTAS1R3-exprimierenden Zellen werden um das Signal der Kontrollzellen (nicht mit Tetracyclin induziert) reduziert und auf die Hintergrundfluoreszenz normalisiert.

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{F - F_0}{F_0}$$

Die maximal einsetzbare Konzentration der Testsubstanzen ist von ihrer artefaktfreien Konzentration abhängig. Die maximale artefaktfreie Konzentration ergibt sich aus der maximalen Konzentration, bei der die nichtinduzierten Kontrollzellen keine unspezifische Zellantwort geben. Ausgehend von dieser Konzentration werden Verdünnungsreihen (vgl. Tabelle 67) hergestellt und im Zellassay getestet.

Tabelle 67: Im Zellassay eingesetzte Verbindungen, mit gemessenem Konzentrationsbereich und maximaler, artefaktfreier Konzentration

Verbindung	Konzentrationsbereich [µmol/l]	Maximale Konzentration [µmol/l]
HMF (9)	100 – 10000	10000
AcMF (10)	100 – 3000	3000
EMF (11)	10 – 5000	5000
MMF (12)	10 – 5000	5000
iPMF (13)	100 – 3000	3000
nPMF (14)	100 – 1000	1000
nBMF (15)	10 – 100	100
2MBMF (16)	10 – 100	100
3MBMF (17)	10 – 300	300
PhEMF (18)	10 – 300	300
VanMF (19)	1 – 300	300
Benzaldehyd (25)	10 – 10000	10000
4-Hydroxybenzaldehyd (23)	100 – 3000	3000
3,4-Dihydroxybenzaldehyd (24)	100 – 1000	1000
2,4-Dihydroxybenzaldehyd (26)	100 – 1000	1000
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (28)	100 – 1000	1000
2,3,4-Trihydroxybenzaldehyd (27)	100 – 1000	1000
4-Methoxybenzaldehyd (30)	100 – 1000	1000
3-Methoxybenzaldehyd (29)	100 – 1000	1000
Vanillin (22)	100 – 3000	3000
Isovanillin (32)	100 – 1000	1000
Ethyl-Vanillin (31)	100 – 1000	1000
Ethylvanillat (41)	100 - 300	300
4-Ethoxybenzaldehyd (35)	30 – 1000	1000
Syringaldehyd (20)	50 – 3000	3000
3,4-Dimethoxybenzaldehyd (33)	100 – 1000	1000
3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (34)	100 – 300	300
Zimtaldehyd (36)	0,3 – 100	100
Coniferylaldehyd (37)	100 – 300	300
Sinapaldehyd (21)	30 – 300	300
4-Hydroxybenzoesäure (38)	3000 – 30000	30000*
Vanillinsäure (40)	300 – 10000	10000*
Syringinsäure (43)	3000 – 6000	6000*
4-Hydroxybenzylalkohol (39)	100 – 10000	10000
Vanillylalkohol (42)	100 – 10000	10000

*maximal messbare Konzentration, bedingt durch Löslichkeit der Substanz in Puffer

Schwellenwerte werden ermittelt. Sie sind definiert als Konzentration, bei der die spezifische Zellantwort signifikant größer ist, als die bei der Messung des Puffers ohne Zugabe der Testsubstanz.

3.10 Chromatographische Methoden

3.10.1 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie

System:	Büchi Sepacore® (Flawil, Schweiz)
Pumpe:	Pump Manager C-615 mit zwei Pumpmodulen C-605
Injektionseinheit:	6-Wege-Ventil
Probenschleife:	20 ml
Fraktionssammler:	C-660
Detektor:	UV Photometer C-635
Software:	Sepacore Record Software
Kartusche:	Polypropylen, Innendurchmesser 40 mm, Länge 150 mm
Stationäre Phase:	RP-18 Balkmaterial, Lagerung in Methanol

Gradient A (Trennung des Methanol Extraktes):

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Methanol; $\lambda = 254 \text{ nm}$; Flussrate = 40 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	90	10
5	90	10
12	80	20
20	70	30
40	35	65
41	0	100
46	0	100

Gradient B (Aufreinigung von 5-2- & 5-3-Methylbuthoxymethylfurfural):

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Methanol; $\lambda = 220 \text{ nm}$; Flussrate = 40 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	60	40
5	60	40
15	0	100
25	0	100

3.10.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

3.10.2.1 Analytische HPLC

System I: Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
 Pumpe: PU-2087 Plus
 Autosampler: AS-2055 Plus
 Degasser: DG-2080-53
 Detektor DAD: MD 2010 Plus
 Probenschleife: 100 µl
 Software: Chrompass

System II: Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
 Pumpe: PU-2087 Plus
 Autosampler: AS-2055 Plus
 Degasser: Degasys DG-1310; (Uniflows, Tokyo, Japan)
 Detektor DAD: MD 2010 Plus
 Detektor ELSD: Sedex LT-ELSD Model 80 (Sedere, Alfortville, France)
 Probenschleife: 100 µl
 Software: Chrompass

Gradient A:

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna 5 µm, 250 x 4,6 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 1 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	90	10
5	90	10
25	0	100
35	0	100
36	90	10
41	90	10

3.10.2.2 Semipräparative HPLC

<u>System I:</u>	Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
Pumpe:	PU-2087 Plus
Degasser:	Degasyt DG-1310; (Uniflows, Tokyo, Japan)
Detektor DAD:	MD 2010 Plus
Detektor ELSD:	Sedex LT-ELSD Model 80 (Sedere, Alfortville, France)
Probenschleife:	500 µl
Software:	Chrompass

Gradient A (Isolierung von Lyoniresinol):

Stationäre Phase: Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 250 x 10 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 272 nm; Flussrate = 5 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	83	17
28	83	17
29	0	100
32	83	17
37	83	17

Gradient B (Isolierung von Lyonisid + Nudiposid):

Stationäre Phase: Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 250 x 10 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 220 nm; Flussrate = 5 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	83	17
30	83	17

Gradient C (Isolierung von Lyoniresinol-glucosid):

Stationäre Phase: Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 250 x 10 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 220 nm; Flussrate = 5 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	85	15
40	85	15
45	0	100
50	85	15
55	85	15

Experimenteller Teil

Gradient D (Isolierung von Lyoniresinol-gallat):

Stationäre Phase: Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 250 x 10 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 5 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	80	20
45	80	20

Gradient E (Isolierung von Oaklacton galloylglucosid):

Stationäre Phase: Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 250 x 10 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 5 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	85	15
20	80	20
45	80	20
46	85	15
51	85	15

Gradient F (Isolierung von Oaklacton glucosid):

Stationäre Phase: Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 250 x 10 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; ELSD Gain: 10; Flussrate = 5 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	83	17
28	83	17
29	0	100
32	83	17
37	83	17

Gradient G (Isolierung von Oaklacton rutinosid):

Stationäre Phase: Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 250 x 10 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; ELSD Gain: 10; Flussrate = 5 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	85	15
40	85	15
45	0	100
50	85	15
55	85	15

3.10.2.3 Präparative HPLC

System I: Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
 Pumpe: PU-2087 Plus
 Degasser: DG-2080-53
 Detektor UV/VIS: UV
 Probenschleife: 2 ml
 Software: Chrompass

System II: Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
 Pumpe: PU-2087 Plus
 Degasser: DG-2080-53
 Detektor DAD: MD 2010 Plus
 Probenschleife: 2 ml
 Software: Chrompass

System III: Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
 Pumpe: PU-2087 Plus
 Degasser: Degasys DG-1310; (Uniflows, Tokyo, Japan)
 Detektor DAD: MD 2010 Plus
 Detektor ELSD: Sedex LT-ELSD Model 80 (Sedere, Alfortville, France)
 Probenschleife: 500 µl; 2 ml
 Software: Chrompass

Gradient A (Auftrennung der Fraktion M4):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna, 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 220 nm; Flussrate = 18 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	85	15
10	80	20
15	80	20
20	75	25
25	0	100
28	85	15
33	85	15

Experimenteller Teil

Gradient B (Auftrennung der Fraktion M5):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna, 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 220 nm; Flussrate = 18 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	80	20
10	80	20
15	75	25
20	75	25
25	70	30
30	0	100
32	80	20
37	80	20

Gradient C (TDA Fraktion II):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna, 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Methanol ; λ = 270 und 220 nm; Flussrate = 18 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	85	15
10	65	35
20	40	60
26	20	80
27	0	100
33	0	100
35	85	15
40	85	15

Gradient D1 (Isolierung von EMF):

Stationäre Phase: Varian Microsorb C-18, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 18 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	95	5
15	55	45
20	50	50
24	0	100
25	0	100
27	95	5
32	95	5

Experimenteller Teil

Gradient D2 (Isolierung von MMF):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 20 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	80	20
3	80	20
12	70	30
16	0	100
18	0	100
20	80	20
25	80	20

Gradient D3 (Isolierung von nPMF):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 20 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	80	20
3	80	20
15	40	60
17	40	60
25	0	100
28	0	100
30	80	20
35	80	20

Gradient D4 (Isolierung von iPMF):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 20 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	80	20
3	80	20
12	52	48
14	50	50
18	0	100
20	0	100
22	80	20
27	80	20

Experimenteller Teil

Gradient D5 (Isolierung von *n*BMF):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 20 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	80	20
12	35	65
13	35	65
18	0	100
19	0	100
21	80	20
26	80	20

Gradient D6 (Isolierung von *d*₅-EMF):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 20 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	80	20
3	80	20
12	60	40
14	60	40
18	0	100
20	0	100
22	80	20
27	80	20

Gradient D7 (Isolierung von PhEMF):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 220 nm; Flussrate = 18 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	60	40
8	35	70
10	35	70
14	0	100
16	0	100
17	60	40
22	60	40

Gradient D8 (Isolierung von VanMF):

Stationäre Phase: Phenomenex Phenyl-Hexyl Luna 5 µm, 250 x 21,20 mm

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; λ = 270 nm; Flussrate = 20 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	80	20
5	80	20
20	0	100
24	0	100
25	80	20
30	80	20

3.10.3 Gaschromatographie

GC-System: HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland)
 Stationäre Phase: FFAP-Säule: Länge 30 m, Innendurchmesser A: 0.32 mm B: 0.25 mm, 0.25 µm Filmdicke (Agilent Technologies)
 Ionisation: EI (MS-EI), 70 eV
 Temperaturprogramm: A: 40° C (2 min) → 6° C/min → 230° C (5min)
 B: 40° C (2 min) → 8° C/min → 230° C (5min)
 Injektion: 0,5 µl Cool-on-column
 Massenspektrometer: Sektorfeld Massenspektrometer Typ MAT 95 S (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)

3.10.4 Hochleistungsionenchromatographie

System I (Kationen):

System: Dionex ICS-2000 (Dionex, Idstein)
 Pumpe: GS 50 Gradientenpumpe
 Autosampler: AS 50 Autosampler
 Suppressorzelle: CSRS II 2 mm, Autosuppression Recycle Mode
 Eluentengenerator: RFIC EluGen® Cartridge EGC II MSA
 Detektor: ED 50A Leitfähigkeitsdetektor mit selbstregenerierender
 Supressorzelle
 Software: Chromeleon 6.80
 Stationäre Phase: IonPac CS 18, 250 x 2 mm (Dionex)
 Vorsäule: IonPac CG 18, 50 x 2 mm (Dionex)
 Temperatur: 40°C

Experimenteller Teil

Säulenofen: AS 50 Thermal Compartment mit Säulenschaltventil
Mobile Phase: 5 mM Methansulfonsäure
Gradient: isokratisch, 20 min
Flussrate: 0,3 ml/min
Injektionsvolumen: 10 µl

System II (Anionen):

System: Dionex ICS-2500 (Dionex, Idstein)
Pumpe: GS 50 Gradientenpumpe
Autosampler: AS 50 Autosampler
Detektor: ED 50A Leitfähigkeitsdetektor mit selbstregenerierender
Supressorzelle
Suppressorzelle: ASRS Ultra II 2 mm, Autosuppression Recycle Mode
Software: Chromeleon 6.80
Stationäre Phase: IonPac AS11-HC, 250 x 2 mm (Dionex)
Vorsäule: IonPac AG11-HC, 50 x 2 mm (Dionex)
Temperatur: 30°C
Säulenofen: AS 50 mit Säulenschaltventil
Mobile Phase: A: Wasser
B: 5 mM NaOH
C: 100 M NaOH

Gradient: 0 min 80 % A; 20 % B, 0 % C
8 min 80 % A; 20 % B, 0 % C
18 min 85 % A; 0 % B, 15 % C
28 min 70 % A; 0 % B, 30 % C
38 min 40 % A; 0 % B, 60 % C
40 min 40 % A; 0 % B, 60 % C
42 min 80 % A; 20 % B, 0 % C
60 min 80 % A; 20 % B, 0 % C
Flussrate: 0,38 ml/min
Injektionsvolumen: 10 µl

System III (Organische Säuren):

System: Dionex ICS-2500 (Dionex, Idstein)
Pumpe: GS 50 Gradientenpumpe
Autosampler: AS 50 Autosampler
Detektor: ED 50A Leitfähigkeitsdetektor mit selbstregenerierender
Supressorzelle
Suppressorzelle: AMMS-ICE II, chemische Suppression mit 5 mmol/l
Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung (3 ml/min)
Software: Chromeleon 6.80
Stationäre Phase: IonPac® ICE-AS6, 9 x 250 mm (Dionex)
Vorsäule: IonPac® ICE-AS6, 9 x 50 mm (Dionex)
Temperatur: 20°C
Säulenofen: AS 50 mit Säulenschaltventil
Mobile Phase: 0,4 mM Heptafluorbuttersäure
Gradient: 30 min, isokratisch
Flussrate: 1 ml/min
Injektionsvolumen: 10 µl

System IV (Kohlenhydrate und Polyole):

System: Dionex ICS-2500 (Dionex, Idstein)
Pumpe: GS 50 Gradientenpumpe
Autosampler: AS 50 Autosampler
Detektor: Dionex ED 50, gepulste Amperometrie an Goldelektrode,
Referenzelektrode Ag/AgCl
Software: Chromeleon 6.80
Stationäre Phase: Carbo-Pac ® MA-1, 4 x 250 mm (Dionex)
Vorsäule: Carbo-Pac ® MA-1, 4 x 50 mm (Dionex)
Temperatur: 30°C
Säulenofen: AS 50 mit Säulenschaltventil
Mobile Phase: A: Wasser
B: 1 M NaOH
Gradient: 70 min, isokratisch 48 % B
Flussrate: 0,4 ml/min
Injektionsvolumen: 25 µl

3.11 Spektroskopische Methoden

3.11.1 HPLC-Massenspektrometrie

Massenspektrometer: API 4000QTrap triple quadrupole (AB Sciex, Concord, Canada)

HPLC Pumpe: Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)

Autosampler: Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)

Software: Analyst 1.5

System I (niedermolekulare Phenole):

Ionisierung: Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI-)

Stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 ; 3µm 100A, 150x2.0 mm

Gradient A :

A = 1 % Ameisensäure; B = 1 % Ameisensäure in Acetonitril ; Flussrate = 0,3 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0 – 3,5	100	0
4,5	85	15
15,0	60	40
16,0	0	100
20,0	0	100
21,0	100	0
27,0	100	0

Gradient B (Lyonisid und Nudiposid):

A = 1 % Ameisensäure; B = 1 % Ameisensäure in Acetonitril ; Flussrate = 0,3 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0 – 22	88	12
25,0	0	100
27,0	0	100
30,0	88	12
35,0	88	12

Modus: scheduled MRM-mode

Quantifizierung: Extern

Experimenteller Teil

System II (Fettsäuren):

Ionisierung: Atmospheric-pressure chemical ionization (APCI)

Stationäre Phase: Hyperclone ODS ; 3µm 100A, 150x2.0 mm

Gradient :

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; Flussrate = 0,25 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	40	60
16	0	100
20	60	40
22	0	100
25	0	100

Modus: MRM

Quantifizierung: Extern

Injektionsvolumen: 40 µl

System III (nicht-flüchtige Säuren):

Ionisierung: Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI-)

Stationäre Phase: ZIC®-pHILIC; 4,6mm x 15 cm, 5,0 µm (Merck, Darmstadt, Germany)

Flussrate: 0,5 ml/min

Gradient: A = 50 ml H₂O + 1 ml 5 M Ammoniumacetat, eingestellt auf pH=9 (mit Ammoniak) und aufgefüllt mit Acetonitril auf 1 l

B = 1 l H₂O + 1 ml 5 M Ammoniumacetat, eingestellt auf pH=9 (mit Ammoniak)

Zeit in min	A in %	B in %
0	80	20
5	80	20
15	0	100
20	0	100
25	80	20
35	80	20

Modus: MRM

Quantifizierung: SIVA

Injektionsvolumen: 10 µl

Experimenteller Teil

System IV (Fettsäureethylester):

Ionisierung: Atmospheric-pressure chemical ionization (APCI)

Stationäre Phase: Hyperclone ODS ; 3µm 100A, 150x2.0 mm

Gradient :

A = 0,1 % Ameisensäure; B = Acetonitril ; Flussrate = 0,25 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	30	70
16	0	100
20	60	40
22	0	100
25	0	100

Modus: MRM

Quantifizierung: Extern

Injektionsvolumen: 40 µl

System V (HMF Addukte):

Ionisierung: Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI+)

Stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 ; 3µm 100A, 150x2.0 mm

Säulentemperatur: 40°C

Gradient A :

A = 1 % Ameisensäure; B = 1 % Ameisensäure in Acetonitril ; Flussrate = 0,3 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0 – 5	100	10
15	50	50
22	0	100
24	0	100
25	100	0
30	100	0

Gradient B :

A = 1 % Ameisensäure; B = 1 % Ameisensäure in Acetonitril ; Flussrate = 0,3 ml/min

Zeit in min	A in %	B in %
0	100	0
5.0	0	100
7.0	100	0
12.0	100	0

Modus: MRM
 Quantifizierung: SIVA

3.11.2 Hochauflösende Massenspektrometrie (TOF-MS)

Massenspektrometer: Synapt G2 HDMS Time of Flight (Waters, Manchester)
 Polarität: ES-
 Massenbereich: 50 bis 1200 Da
 Software: Mass Lynx™ (Waters, Manchester)
 Marker Lynx™ (Waters, Manchester)
 Auflösung: Resolution Mode
 Capillary: 1.5 kV
 Sampling Cone: 30
 Extraction Cone: 4
 Quellentemperatur: 150°C
 Desolvation Temperatur: 450°C
 Cone Gas Flow: 30 l/h
 Desolvation Gas Flow: 850 l/h

Die Marker Lynx™ Software wird zur Datenverarbeitung herangezogen. Es wurde mit Hilfe der Informationen über die exakte Masse, der Retentionszeit und der Intensität einer jeder Verbindung eine Matrix erstellt und nach Normalisierung eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt.

Gradient A :

A = 0,1 % Ameisensäure; B = 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril ; Flussrate = 0,4 ml/min

Stationäre Phase: ACQUITY UPLC® BEH Phenyl 1.7µm, 150 x 2.1 mm (PCA)

Zeit in min	A in %	B in %
0	99	1
1,1	99	1
8,0	5	95
9,0	5	95
9,2	99	1
10,0	99	1

Gradient B :

A = 0,1 % Ameisensäure; B = 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril ; Flussrate = 0,4 ml/min

Stationäre Phase: ACQUITY UPLC® C18; 1.7µm, 150 x 2.1 mm

Zeit in min	A in %	B in %
0	95	5
4,0	0	100
4,2	95	5
5,0	95	5

3.11.3 Kernresonanzspektroskopie

Proben wurden in deuterierten Lösungsmitteln gelöst und in NMR-Röhrchen (Schott Professional, 178 x 5 mm) gefüllt. Chemische Verschiebungen wurden auf die Lösungsmittelsignale referenziert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der NMR Software MestRe Nova 7.0 (Santiago de Compostela University, Spain).

NMR (400 MHz)	400 MHz DRX 400 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)
Software	Topspin Version 3,2 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)
Probe	5mm Multinuclear Z 108618/0347 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)
NMR (500 MHz)	500 MHz Avance III (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)
Software	Topspin Version 2,1 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)
Probe	Cryo Probe TCI 1H-13C/15N/D Z-GRD Z44881/0055 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)

¹H-NMR:

Die chemischen Verschiebungen (δ , in ppm), bezogen auf TMS sowie die Kopplungskonstanten (J , in Hz) benachbarter Protonen können mittels ¹H-NMR ermittelt werden. In den verwendeten protischen Lösungsmitteln werden lediglich kohlenstoffgebundene Protonen erfasst.

¹³C-NMR:

Die Anzahl der Kohlenstoffatome einer Verbindung kann mittels ¹³C-NMR ermittelt werden. Es wird dabei eine ¹H-Breitbandentkopplung mittels CPD (Composite Pulse Decoupling) durchgeführt, um heteronuklearen J -Kopplungen zu unterdrücken und das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern.

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY:

Die Signale der $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -korrelierten 2D-Spektren auf der Diagonalen im 2D-Konturdiagramm entsprechen dem ^1H -Spektrum, während symmetrisch angeordnete Kreuzsignale im 2D-Plot die homonuklearen Kopplungen zwischen geminal und vicinal benachbarter Protonen anzeigen.

Heteronukleare inverse Verschiebungskorrelation (HMQC und HSQC):

Das HSQC-Experiment erzeugt ein $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -korreliertes 2D-Spektrum. Das entsprechende ^1H -Experiment ist dabei auf die horizontale Achse projiziert. Auf der vertikalen Achse ist das korrespondierende ^{13}C -Spektrum sichtbar. Im Konturdiagramm werden nur Signale von Methin-, Methylen- und Methylgruppen detektiert, während quartäre Kohlenstoffatome nicht detektiert werden.

Heteronukleare inverse Long-Range-Verschiebungskorrelation (HMBC):

Die HMBC-Spektroskopie dient der Bestimmung von Kopplungen über mehrere Bindungen (v.a. $^2\text{J-C,H}$, $^3\text{J-C,H}$, $^4\text{J-C,H}$). Geminale Kopplungen werden dabei durch die Pulssequenz unterdrückt. Im Gegensatz zum HMQC- liefert das HMBC-Experiment auch Informationen über quartäre Kohlenstoffe, da diese über mehrere Bindungen ein Proton als Kopplungspartner (Long-range Kopplungen) haben können.

3.11.4 Circular dichroismus

CD-Spektren werden an einem J-810 Spektropolarimeter (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland), ausgestattet mit einer 0,1 cm Quartzküvette 106-QS (Hellma, Müllheim, Deutschland) gemessen. Sie werden im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm bei 25°C mit einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min generiert. Als Lösungsmittel dient Methanol. Nach Abzug des durch das Methanol hervorgerufenen Untergrundrauschens werden die Spektren mit Hilfe der Gerätesoftware bearbeitet.

3.12 Heatmapping, Datenanalyse und Visualisierung

Die Analyse und Visualisierung der Daten für die PCA und S-Plots wurde von Dr. Timo Stark (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik) durchgeführt.

Die Analyse und Visualisierung der Daten für Heatmaps wurde von Andreas Dunkel (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik) durchgeführt. Dabei wurde die Datenanalyse und Visualisierungsplattform R (Version 3.1.1) und das Visualisierungspaket Pheatmap (Version 0.7.7) herangezogen. Für die Darstellung der Konzentrationsänderungen

während des Toastungsprozesses wurde das Visualisierungspaket ggplot2 (Version 1.0.0) verwendet. Liniendiagramme wurden auf Grundlage skaliertes und zentrierter Konzentrationsdaten erstellt. Die Clusteranalyse erfolgte durch Anwendung der Ward's Minimum Variance Methode.

4 Zusammenfassung

Whisky, der wegen seines attraktiven Aromas und typischen Geschmacksprofils als Genussmittel weltweit sehr beliebt ist, wird durch Destillation einer fermentierten Getreidemaische und anschließender, mehrjähriger Lagerung in Eichenholzfässern hergestellt.

Unterschiedliche Rohstoffe, Herstellungsverfahren sowie Reifungsfaktoren beeinflussen die sensorischen Ausprägungen von Whisky, die bislang weitgehend empirisch optimiert wurden. Eine systematische Optimierung des süßlichen, adstringierenden und typisch brennenden Geschmacksprofils von Whisky ist aufgrund mangelnder Kenntnisse der Schlüsselgeschmacksstoffe bislang nicht möglich. Ziel der Arbeit war daher die den typischen Geschmack von amerikanischem Bourbon Whiskey und schottischem Single Malt Whisky ursächlich prägenden Verbindungen zu identifizieren, zu quantifizieren und funktional zu charakterisieren.

Die Identifizierung sortenspezifischer Markerverbindungen gelang dabei durch Kombination einer holistischen Metabolomanalyse mittels UPLC-ESI-TOF-MS und multivariater Statistik. Die mittleren Fettsäuren Caprin- und Laurinsäure erwiesen sich als signifikante Marker für einige Single Malts. Bezüglich Markersubstanzen für Bourbons gelang es, die Strukturen der Verbindungen nach ihrer Isolierung aus Eichenholzextrakten zu verifizieren. Darunter befanden sich die drei Oaklacton-Glykokonjugate Oaklacton-galloylglucosid, Oaklacton-glucosid und Oaklacton-rutinosid. Letzteres wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal mittels NMR-spektroskopischer Methoden charakterisiert. Außerdem konnten mittels Massenspektrometrie, 1D/2D-NMR- und CD-Spektroskopie die Strukturen des Lignans Lyoniresinol und dessen Glykoside (+)-Lyoniresinol-xylosid, (-)-Lyoniresinol-xylosid, (+)-Lyoniresinol-glucosid sowie des Esters Lyoniresinol-gallat bestätigt werden. Dies ermöglichte auch quantitative Studien und die sensorische Charakterisierung dieser Substanzen.

Mittels aktivitätsorientierter Fraktionierung wurden zudem geschmacksaktive und geschmacksmodulierende Metabolite in Whisky lokalisiert, identifiziert und schließlich quantifiziert. So gelang es Vanillin und Syringaldehyd erstmals als Süßmodulatoren zu identifizieren. Weiterhin ermöglichte die gezielte Synthese von süßmodulierenden Derivaten des 5-Hydroxymethylfurfurals deren Identifizierung und Quantifizierung in Whisky. Neben dem aus Aceto Balsamico bereits bekannten 5-Acetoxymethylfurfural wurden erstmals die Ether 5-Ethoxymethylfurfural und 5-Methoxymethylfurfural sowie der Ester von 5-Hydroxymethylfurfural und Vanillinsäure als Süßmodulatoren identifiziert. Neben humansensorischen Untersuchungen der Süßmodulatoren wurden mithilfe von *In-Vitro*-

Assays insgesamt 35 identifizierte Verbindungen auf ihre Aktivierung des Süßrezeptors TAS1R2/R3 getestet.

Die Konzentrationen der bekannten und neu identifizierten geschmacksaktiven bzw. geschmacksmodulierenden Metabolite wurden anschließend gezielt in zehn verschiedenen Whiskyproben quantitativ ermittelt. So wurden geschmacksaktive Kohlenhydrate, Polyole, Polyphenole und Lignane, organischen Säuren, Mineralstoffe, Fettsäuren und deren Ethylester, sowie die Süßmodulatoren quantitativ bestimmt. Auf Grundlage der ermittelten Substanzkonzentrationen bestätigten Rekombinations- und Omissionsexperimente die Vollständigkeit der Identifizierungs- und Quantifizierungsarbeiten, die sensorische Relevanz der identifizierten Süßmodulatoren und die geschmacklich vernachlässigbare Rolle der Fettsäuren und deren Ethylester. Anschließend konnte anhand von Modellstudien der Mechanismus der Bildung des Süßmodulators 5-Ethoxymethylfurfural während der Lagerung von alkoholischen Getränken in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur und Alkoholgehalt aufgeklärt werden.

Bekanntermaßen spielt die Lagerung von Whisky im Holzfass eine entscheidende Rolle für die Konzentrationen nicht-flüchtiger Whiskyverbindungen, die aus der Fasswand ins Destillat migrieren. Die Quantifizierung der adstringierenden und süßmodulierenden Geschmacksstoffe in verschiedenen Holzextrakten verschaffte Einblicke zum Einfluss von Toastungsgrad und der Eichensorte auf die Schlüsselgeschmacksstoffe in Whisky.

5 Literatur

- Balakrishnan, M.; Sacia, E. R.; Bell, A. T. (2012): Etherification and reductive etherification of 5-(hydroxymethyl)furfural: 5-(alkoxymethyl)furfurals and 2,5-bis(alkoxymethyl)furans as potential bio-diesel candidates. In: *Green Chemistry* 6 (14), S. 1626–1634.
- Baldwin, S.; Black, A.; Andreasen, A. A.; Adams, S. L. (1967): Aromatic Congener Formation in Maturation of Alcoholic Distillates. In: *J. Agric. Food Chem.* 15 (3), S. 381–385.
- Bathgate, G. N. und Cook, R. (1989): Malting of barley for Scotch whiskies. In: *The Science and Technology of Whiskies*, Chapter 2, S. 19-63.
- Behrens, M.; Meyerhof, W.; Hellfritsch, C.; Hofmann, T. (2011): Sweet and Umami Taste: Natural Products, Their Chemosensory Targets, and Beyond. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (10), S. 2220–2242.
- Buglass, A. J. (Hg.) (2011): *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects* (John Wiley & Sons). Chapter 3.2 Scotch Whisky, S. 469-514.
- Buglass, A. J. (Hg.) (2011): *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects* (John Wiley & Sons). Chapter 3.3 Whiskeys, S. 515-534.
- Britton, S. J.; Fry, J. C.; Lindley, M. G.; Marshall, S. (1999): Sweetening composition comprising aspartame and 2,4-dihydroxybenzoic acid. PCT Patent Appln. No.: WO 99/15032.
- Bronsky, A. J. und Schumann, R. W. (1989): Cereals for whisky production. In: *The Science and Technology of Whiskies*, Chapter 1, S. 1-18.
- Cadahía, E.; Muñoz, L.; Fernández de Simón, B.; García-Vallejo, M. C. (2001): Changes in Low Molecular Weight Phenolic Compounds in Spanish, French, and American Oak Woods during Natural Seasoning and Toasting. In: *J. Agric. Food Chem.* 49 (4), S. 1790–1798.
- Caldeira, I.; Clímaco, M. C.; Sousa, R. B.; Belchior, A. P. (2006): Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. In: *Journal of Food Engineering* 76 (2), S. 202–211.
- Câmara, J. S.; Alves, M. A.; Marques, J.C. (2006): Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. In: *Analytica Chimica Acta* 563 (1-2), S. 188–197.
- Câmara, J. S.; Marques, J. C.; Alves, M. A.; Silva Ferreira, A. C. (2004): 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)furanone Levels in Fortified Madeira Wines: Relationship to Sugar Content. In: *J. Agric. Food Chem.* 52 (22), S. 6765–6769.
- Cartoni, C.; Yasumatsu, K.; Ohkuri, T.; Shigemura, N.; Yoshida, R.; Godinot, N. et al. (2010): Taste Preference for Fatty Acids Is Mediated by GPR40 and GPR120. In: *Journal of Neuroscience* 30 (25), S. 8376–8382.
- Chandrashekar, J.; Hoon, M. A.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. (2006): The receptors and cells for mammalian taste. In: *Nature* 444 (7117), S. 288–294.
- Chandrashekar, J.; Mueller, K.; Hoon, M. A.; Adler, E.; Feng, L.; Guo, W. et al. (2000): T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. In: *Cell* (100), S. 703–711.
- Chatonnet, P.; Cutzach, I.; Pons, M.; Dubourdieu, D. (1999): Monitoring Toasting Intensity of Barrels by Chromatographic Analysis of Volatile Compounds from Toasted Oak Wood. In: *J. Agric. Food Chem.* 47 (10), S. 4310–4318.
- Chaudhari, N.; Roper, S. D. (2010): Review series: The cell biology of taste. In: *The Journal of Cell Biology* 190 (3), S. 285–296.
- Chen, D.; Song, Y.-L.; Nie, C.-X.; Ma, X.; Tu, P.-F. (2012): Chemical constituents from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. In: *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 21, S. 88–92.
- Clyne, J.; Conner, J. M.; Paterson, A.; Piggott, J. R. (1993): The effect of cask charring on Scotch whisky maturation. In: *International Journal of Food Science and Technology* 28, S. 69–81.

- Cutzach, I.; Chatonnet, P.; Dubourdieu, D. (1999): Study of the Formation Mechanisms of Some Volatile Compounds during the Aging of Sweet Fortified Wines. In: *J. Agric. Food Chem.* 47 (7), S. 2837–2846.
- Czepa, A.; Hofmann, T. (2004): Quantitative Studies and Sensory Analyses on the Influence of Cultivar, Spatial Tissue Distribution, and Industrial Processing on the Bitter Off-Taste of Carrots (*Daucus carota* L.) and Carrot Products. In: *J. Agric. Food Chem.* 52 (14), S. 4508–4514.
- Dada, G.; Corbani, A.; Manitto, P.; Speranza, G.; Lunazzi, L. (1989): Lignan Glycosides from the Heartwood of European Oak *Quercus petraea*. In: *Journal of Natural Products* 52 (6), S. 1327–1330.
- Dawid, C.; Hofmann, T. (2014): Quantitation and bitter taste contribution of saponins in fresh and cooked white asparagus (*Asparagus officinalis* L.). In: *Food Chemistry* 145, S. 427–436.
- Doussot, F.; Jéso, B.; Quideau, S.; Pardon, P. (2002): Extractives Content in Cooperage Oak Wood during Natural Seasoning and Toasting; Influence of Tree Species, Geographic Location, and Single-Tree Effects. In: *J. Agric. Food Chem.* 50 (21), S. 5955–5961.
- Dunkel, A.; Hofmann, T. (2009): Sensory-Directed Identification of β -Alanyl Dipeptides as Contributors to the Thick-Sour and White-Meaty Orosensation Induced by Chicken Broth. In: *J. Agric. Food Chem.* 2 (57), S. 9867–9877.
- Fengel, D.; Wegener, G. (1989): *Wood. Chemistry, ultrastructure, reactions.* Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Fernández Izquierdo, M. E.; Quesada Granados, J.; Villalon Mir, M.; López Martínez, M. C. (2000): Comparison of methods for determining coumarins in distilled beverages. In: *Food Chemistry* (70), S. 251–258.
- Ferrer-Gallego, R.; Gonçalves, R.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T.; Freitas, V. (2012): Interaction of phenolic compounds with bovine serum albumin (BSA) and α -amylase and their relationship to astringency perception. In: *Food Chemistry* 135 (2), S. 651–658.
- Festring, D.; Brockhoff, A.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. (2011): Stereoselective Synthesis of Amides Sharing the Guanosine 5'-Monophosphate Scaffold and Umami Enhancement Studies Using Human Sensory and hT1R1/rT1R3 Receptor Assays. In: *J. Agric. Food Chem.* 59 (16), S. 8875–8885.
- Festring, D.; Hofmann, T. (2010): Discovery of N²-(1-Carboxyethyl)guanosine 5'-Monophosphate as an Umami-Enhancing Maillard-Modified Nucleotide in Yeast Extracts. In: *J. Agric. Food Chem.* 58 (19), S. 10614–10622.
- Frank, O.; Ottinger, H.; Hofmann, T. (2001): Characterization of an Intense Bitter-Tasting 1 H , 4 H - Quinolizinium-7-olate by Application of the Taste Dilution Analysis, a Novel Bioassay for the Screening and Identification of Taste-Active Compounds in Foods. In: *J. Agric. Food Chem.* 49 (1), S. 231–238.
- Frank, O.; Zehentbauer, G.; Hofmann, T. (2006): Screening and identification of bitter compounds in roasted coffee brew by taste dilution analysis. In: *Flavour Science - Recent Advances and Trends* 43. S. 165–168.
- Fujieda, M.; Tanaka, T.; Suwa, Y.; Koshimizu, S.; Kouno, I. (2008): Isolation and Structure of Whiskey Polyphenols Produced by Oxidation of Oak Wood Ellagitannins. In: *J. Agric. Food Chem.* 56 (16), S. 7305–7310.
- Galindo, M. M.; Voigt, N.; Stein, J.; van Lengerich, J.; Raguse, J.-D.; Hofmann, T. et al. (2012): G Protein-Coupled Receptors in Human Fat Taste Perception. In: *Chemical Senses* 37 (2), S. 123–139.
- Galindo-Cuspinera, V.; Winnig, M.; Bufe, B.; Meyerhof, W.; Breslin, P. A. S. (2006): A TAS1R receptor-based explanation of sweet 'water-taste'. In: *Nature* 441 (7091), S. 354–357.
- Glabasnia, A. (2007): *Molekulare und sensorische Untersuchungen zu geschmacksgebenden Verbindungen in Whiskey sowie von verarbeitungsbedingt gebildeten Ellagittannin-Transformationsprodukten.* Münster: Schöling.
- Glabasnia, A.; Hofmann, T. (2006): Sensory-Directed Identification of Taste-Active Ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European Oak Wood (*Quercus robur* L.) and Quantitative Analysis in Bourbon Whiskey and Oak-Matured Red Wines. In: *J. Agric. Food Chem.* 54 (9), S. 3380–3390.
- Go, Y.; Satta, Y.; Takenaka, O.; Takahata, N. (2005): Lineage-Specific Loss of Function of Bitter Taste Receptor Genes in Humans and Nonhuman Primates. In: *Genetics* 170 (1), S. 313–326.

- Günther, C.; Mosandl, A. (1987): Chirospezifische Analyse natürlicher Aromastoffe: 3-Methyl-4-octanolid-, Quercus-, Whiskylacton". In: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* (185), S. 1–4.
- Hagerman, A. E.; Rice, M. E.; Ritchard, N. T.: Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin (4f8) Catechin (Procyanidin). In: *J. Agric. Food Chem.* 46, S. 2590–2595.
- Hatt, H. (2007): Geruch und Geschmack. In: Schmidt, R. F. (Hg.) (2007): *Physiologie des Menschen*. 30. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch), S. 422 – 436.
- Hayasaka, Y.; Wilkinson, K. L.; Elsey, G. M.; Raunkjær, M.; Sefton, M. A. (2007): Identification of Natural Oak Lactone Precursors in Extracts of American and French Oak Woods by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. In: *J. Agric. Food Chem.* 55 (22), S. 9195–9201.
- Hellfritsch, C.; Brockhoff, A.; Stähler, F.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. (2012): Human Psychometric and Taste Receptor Responses to Steviol Glycosides. In: *J. Agric. Food Chem.* 60 (27), S. 6782–6793.
- Hillmann, H.; Mattes, J.; Brockhoff, A.; Dunkel, A.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. (2012): Sensomics Analysis of Taste Compounds in Balsamic Vinegar and Discovery of 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyde as a Novel Sweet Taste Modulator. In: *J. Agric. Food Chem.* 60 (40), S. 9974–9990.
- Hind, J.D.; Crayton, F. H. (1963): Tobacco flavorants. US Pat. No.: 3,095,882.
- Huang, A. L.; Chen, X.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Guo, W.; Tränkner, D. et al. (2006): The cells and logic for mammalian sour taste detection. In: *Nature* 442 (7105), S. 934–938.
- Hufnagel, J. C.; Hofmann, T. (2008 a): Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine. In: *J. Agric. Food Chem.* 56 (4), S. 1376–1386.
- Hufnagel, J. C.; Hofmann, T. (2008 b): Quantitative Reconstruction of the Nonvolatile Sensometabolome of a Red Wine. In: *J. Agric. Food Chem.* 56 (19), S. 9190–9199.
- Ilegems, E.; Iwatsuki, K.; Kokrashvili, Z.; Benard, O.; Ninomiya, Y.; Margolskee, R. F. (2010): REEP2 Enhances Sweet Receptor Function by Recruitment to Lipid Rafts. In: *Journal of Neuroscience* 30 (41), S. 13774–13783
- Intelmann, D.; Haseleu, G.; Hofmann, T. (2009): LC-MS/MS Quantitation of Hop-Derived Bitter Compounds in Beer Using the ECHO Technique. In: *J. Agric. Food Chem.* 57 (4), S. 1172–1182.
- Jöbstl, E.; O'Connell, J.; Fairclough, J. P. A.; Williamson, M. P. (2004): Molecular Model for Astringency Produced by Polyphenol/Protein Interactions. In: *Biomacromolecules* 5 (3), S. 942–949.
- Jogia, M. K.; Vakamoce, V.; Weavers, R. T.: Synthesis of Some Furfural and Syringic Acid Derivatives. In: *Australian journal of chemistry* 1985 (38), S. 1009–1016.
- Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M. N.: Evidence that Salivary Proteins are involved in Astringency. In: *Journal of Sensory Studies* 1998 (13), S. 29–43.
- Kessler, W. (Hg.) (2007): *Multivariate Datenanalyse*: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Koga, K.; Taguchi, A.; Koshimizu, S.; Suwa, Y.; Yamada, Y.; Shirasaka, N.; Yoshizumi, H. (2007): Reactive Oxygen Scavenging Activity of Matured Whiskey and Its Active Polyphenols. In: *J Food Science* 72 (3), S. S212–S217.
- Korhola, M.; Harju, K.; Lehtonen, M. (1989): Fermentation. In: *The Science and technology of whiskies*, Chapter 4, S. 89–117.
- Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Hofmann, T.; Frank, Oliver; Behrens, M. et al. (2004): Bitter Taste Receptors for Saccharin and Acesulfame K. In: *Journal of Neuroscience* 24 (45), S. 10260–10265.
- Lallemant, M.; Giboreau, A.; Rytz, A.; Colas, B. (1999): Extracting Parameters from Time-Intensity Curves using a Trapezoid Model: the Example of some sensory Attributes of Ice Cream. In: *Journal of Sensory Studies* 14 (4), S. 387–497.
- Larson-Powers, N.; Pangborn, R. M. (1978): Paired Comparison and Time-Intensity Measurements of the sensory Properties of Beverages and Gelatins containing Sucrose or synthetic Sweeteners. In: *Journal of Food Science* 43 (1), S. 41–46.
- Lea, A. G. H.; Piggott, J. R. (Hg.) (1997): *Fermented Beverage Production*. London-Weinheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras: Chapman & Hall.

- Ley, J. P.; Blings, M.; Paetz, S.; Kindel, G.; Freiherr, K.; Krammer, G.; Bertram, H.-J (2008): Enhancers for Sweet Taste from the World of Non-Volatiles: Polyphenols as Taste Modifiers. In: *Sweetness and Sweeteners: Biology, Chemistry and Psychophysics* 25, S. 400–409.
- Ley, J. P.; Blings, M.; Paetz, S.; Krammer, G. E.; Bertram, H.-J. (2006): New Bitter-Masking Compounds: Hydroxylated Benzoic Acid Amides of Aromatic Amines as Structural Analogues of Homoeriodictyol. In: *J. Agric. Food Chem.* 54 (22), S. 8574–8579.
- Li, Liya; Seeram, Navindra P. (2010): Maple Syrup Phytochemicals Include Lignans, Coumarins, a Stilbene, and Other Previously Unreported Antioxidant Phenolic Compounds. In: *J. Agric. Food Chem.* 58 (22), S. 11673–11679.
- Li, X.; Staszewski, L.; Xu, H.; Durick, K.; Zoller, M.; Adler, Elliot (2002): Human receptors for sweet and umami taste. In: *PNAS* 99 (7), S. 4692–4696.
- Lindemann, B. (2001): Receptors and transduction in taste. In: *Nature* (413), S. 219–225
- Maga, J. A. (1984): Flavour contribution if wood in alcoholic beverages. Weurman Symposium. In: *Progress in flavour research*, S. 409–416.
- Maga, J. A. (1989): Formation an extraction of cis- and trans- β -methyl- γ -octalactone from *Quercus alba*. In: *Distilled beverages flavour*, S. 171–176.
- Marchal, A.; Cretin, B. N.; Sindt, L.; Waffo-Téguo, P.; Dubourdieu, D. (2014): Contribution of oak lignans to wine taste: chemical identification, sensory characterization and quantification. In: *Tetrahedron* 71 (20), S. 3148–3156.
- Martínez, J.; Cadahía, E.; Fernández de Simón, B.; Ojeda, S.; Rubio, P. (2008): Effect of the Seasoning Method on the Chemical Composition of Oak Heartwood to Cooperage. In: *J. Agric. Food Chem.* 56 (9), S. 3089–3096.
- Masson, E.; Baumes, R.; Le Guernevé, C.; Puech, J.-L. (2000): Identification of a Precursor of β -Methyl- γ -octalactone in the Wood of Sessile Oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). In: *J. Agric. Food Chem.* 48 (9), S. 4306–4309.
- Masson, G.; Guichard, E.; Fournier, N.; Puech, J.-L (1995): Stereoisomers of beta-methyl-gamma-octalactone. II. Contents in the wood of french (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) and american (*Quercus alba*)oaks. In: *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (4), S. 424–428.
- Masson, G.; Puech, J.-L.; Moutounet, M. (1994): Localization of the Ellagitannins in the Tissues of *Quercus robur* and *Quercus petraea* Woods. In: *Phytochemistry* 37(5), S. 1245–1249.
- Masuda, M.; Nishimura, K. (1971): Branched Nonalactones from some *Quercus*. In: *Phytochemistry* (10), S. 1401–1402.
- Masuda, M.; Nishimura, K. (1981 a): Absolute Configurations of *Quercus* lactones (3S, 4R)- and (3S, 4S)-3-Methyl-4-octanolide, from Oak Wood and Chiroptical Properties of monocyclic γ -Lactones. In: *Chemistry Letters*, S. 1333–1336.
- Masuda, M.; Nishimura, K. (1981 b): Changes in Volatile Sulfur Compounds of Whisky During Aging. In: *J. Food Sci.* 47, S. 101–105
- Meyerhof, W.; Born, S.; Brockhoff, A.; Behrens, M. (2011): Molecular biology of mammalian bitter taste receptors. A review. In: *Flavour Fragr. J.* 26 (4), S. 260–268.
- Miyamura, M.; Nohara, T.; Tomimatsu, T.; Nishioka, I. (1983): Seven aromatic Compounds from Bark of *Cinnamomum cassia*. In: *Phytochemistry* 22 (1), S. 215–218.
- Mosedale, J. R. (1995): Effects of oak wood on the maturation of alcoholic beverages with particular reference to whisky. In: *Forestry* 68 (3), S. 203–230.
- Mosedale, J. R.; Puech, J.-L. (1998): Wood maturation of distilled beverages. In: *Trends in Food Science & Technology* 9(3), S. 95–101.
- Moyer, B.; Zlotnik, A.; Hevezi, P.; Soto, H.; Kalabat, D.; Lu, M. et al. (2009): Identification of TRPML3 (MCOLN3) as a salty taste receptor and use in assays for identifying taste (salty) modulators and/or therapeutics that modulate sodium transport, absorption or excretion and/or aldosterone, and/or vasopressin production or release . US Pat. No.: 20090210953.
- Nabeta, K.; Yonekubo, J.; Miyake, M. (1987): Phenolic compounds from the heartwood of European oak (*Quercus robur* L.) and brandy. In: *Mokuzai Gakkaishi* 33 (5), S. 408-415.

- Nelson, G.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Zhang, Y.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. (2001): Mammalian Sweet Taste Receptors. In: *Cell* 106 (3), S. 381–390.
- Ney, H. H. (1971): Aromaintensivierende Wirkung von L-Glutamat und ähnlichen Verbindungen. In: *European food research and technology* 146 (3), S. 141–143.
- Nicol, D. (1989): Batch distillation. In: *The Science and technology of whiskies*, Chapter 5, S. 118–149.
- Nishimura, K.; Matsuyama, R. (1989): Maturation and maturation chemistry. In: *The Science and technology of whiskies*, Chapter 8, S. 235–263.
- Nykänen, L.; Puputti, E.; Soumaleinen, H. (1968): Volatile Fatty Acids in Some Brands of Whisky, Cognac and Rum. In: *Journal of Food Science* 33 (33), S. 88–92.
- Ogawa, M.; Ogihara, Y. (1976): Studies on the constituents of *Enkianthus nudipes*. V. A new lignan xyloside from the stems. In: *chem. pharm. bull.* 24 (9), S. 2102-2105.
- Ottinger, H.; Soldo, T.; Hofmann, T. (2003): Discovery and Structure Determination of a Novel Maillard-Derived Sweetness Enhancer by Application of the Comparative Taste Dilution Analysis (cTDA). In: *J. Agric. Food Chem.* 51 (4), S. 1035–1041.
- Palmer, G. H. (1989): *Cereal science and technology*: Aberdeen University Press.
- Panek, R. J.; Boucher, A. R. (1989): Continuous distillation. In: *The Science and technology of whiskies*, Chapter 6, S. 150–181.
- Pickrahn, S.; Sebald, K.; Hofmann, T. (2014): Application of 2D-HPLC/Taste Dilution Analysis on Taste Compounds in Aniseed (*Pimpinella anisum* L.). In: *J. Agric. Food Chem.* 62 (38), S. 9239–9245.
- Piggott, J. R.; Hunter, E. A.; Margomenou, L. (2000): Comparison of methods of analysis of time-intensity data: application to Scotch malt whisky. In: *Food Chemistry* 71 (71), S. 319–326.
- Piggott, J. R.; Sharp, R.; Duncan, R.E.B (Hg.) (1989): *The Science and technology of whiskies*. Harlow, Essex, England, New York, NY: Longman Scientific & Technical; J. Wiley.
- Piggott, J. R.; Conner, J. M. (1997): Whiskies. In: *Fermented Beverage Production*, Chapter 10, S. 247–274.
- Poisson, L.; Schieberle, P. (2008 a): Characterization of the Most Odor-Active Compounds in an American Bourbon Whisky by Application of the Aroma Extract Dilution Analysis. In: *J. Agric. Food Chem.* 56 (14), S. 5813–5819.
- Poisson, L.; Schieberle, P. (2008 b): Characterization of the Key Aroma Compounds in an American Bourbon Whisky by Quantitative Measurements, Aroma Recombination, and Omission Studies. In: *J. Agric. Food Chem.* 56 (14), S. 5820–5826.
- Pryde, J.; Conner, John M.; Jack, F.; Meek, L.; Owen, C.; Paterson, R. et al. (2011): Sensory and Chemical Analysis of Shackleton's Mackinlay Scotch Whisky. In: *J. Inst. Brew.* 117 (2), S. 156–165.
- Puech, J.-L.; Rabier, P.; Moutounet, M. (1988): Preparative separation by high-performance liquid chromatography of an extract of oak wood and determination of the composition of each fraction. In: *Journal of Chromatography A* (451), S. 431–436.
- Puech, J.-L.; Mertz, C.; Michon, V.; Le Guernevé, C.; Doco, T.; Du Hervé Penhoat, C. (1999): Evolution of Castalagin and Vescalagin in Ethanol Solutions. Identification of New Derivatives. In: *J. Agric. Food Chem.* 47 (5), S. 2060–2066.
- Rahman, A., D.; Katayama, T.; Suzuki, T.; Yoshihara, Y.; Nakagawa, T. (2007): Stereochemistry and biosynthesis of (+)-lyoniresinol, a syringyl tetrahydronaphthalene lignan in *Lyonia ovalifolia* var. *elliptica* II: feeding experiments with ¹⁴C labeled precursors. In: *J Wood Sci* 53 (2), S. 114–120.
- Reazin, G. (1981): Chemical Mechanisms of Whiskey Maturation. In: *Am. J. Enol. Vitic* 32(4), S. 283–289.
- Reid, K. J. G.; Swan, J. S.; Gutteridge, C. S. (1993): Assessment of Scotch whisky quality by pyrolysis—mass spectrometry and the subsequent correlation of quality with the oak wood cask. In: *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 25, S. 49–62.
- Rehner, G.; Daniel, H. (2010): *Biochemie der Ernährung*. 3. Aufl. Heidelberg, Neckar: Spektrum Akademischer Verlag, S. 199 – 216.

- Rotzoll, N.; Dunkel, A.; Hofmann, T. (2005): Activity-Guided Identification of (S)-Malic Acid 1-O- β -D-Glucopyranoside (Morelid) and γ -Aminobutyric Acid as Contributors to Umami Taste and Mouth-Drying Oral Sensation of Morel Mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.). In: *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), S. 4149–4156.
- Running, C. A.; Craig, B. A.; Mattes, R. D. (2015): Oleogustus: The Unique Taste of Fat. In: *Chemical Senses* 40 (7), S. 507–516.
- Sarni, F.; Moutounet, M.; Puech, J.-L.; Rabier, P. (1990): Effect of Heat Treatment of Oak Wood Extractable Compounds. In: *Holzforschung* 44 (6), S. 461–466.
- Scharbert, S.; Hofmann, T. (2005): Molecular Definition of Black Tea Taste by Means of Quantitative Studies, Taste Reconstitution, and Omission Experiments. In: *J. Agric. Food Chem.* 53 (13), S. 5377–5384.
- Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. (2004): Identification of the Astringent Taste Compounds in Black Tea Infusions by Combining Instrumental Analysis and Human Bioresponse. In: *J. Agric. Food Chem.* 52 (11), S. 3498–3508.
- Schneider, T. (2008): Scotch Single Malt Whisky. Zur Chemie einer besonderen Spirituose. In: *Chem. Unserer Zeit* 42 (4), S. 264–269.
- Schöbel, N.; Radtke, D.; Kyereme, J.; Wollmann, N.; Cichy, A.; Obst, K. et al. (2014): Astringency Is a Trigeminal Sensation That Involves the Activation of G Protein-Coupled Signaling by Phenolic Compounds. In: *Chemical Senses* 39 (6), S. 471–487.
- Schwarz, B.; Hofmann, T. (2007): Sensory-Guided Decomposition of Red Currant Juice (*Ribes rubrum*) and Structure Determination of Key Astringent Compounds. In: *J. Agric. Food Chem.* 55 (4), S. 1394–1404.
- Schwarz, B.; Hofmann, T. (2008): Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? In: *Eur. Food Res Technol.* 227 (6), S. 1693–1698.
- Shigemura, R.; Podgurski, C.; Kitisin, B.; Ward, J.; Alatorre, A. (2010): Compositions comprising sweetness enhancers and methods of making them. World Patent: 2010/014813 A2.
- Soares, S.; Kohl, S.; Thalmann, S.; Mateus, N.; Meyerhof, W.; Freitas, V. de (2013): Different Phenolic Compounds Activate Distinct Human Bitter Taste Receptors. In: *J. Agric. Food Chem.* 61 (7), S. 1525–1533.
- Soumaleinen, H.; Lehtonen, M.: The Production of Aroma Compounds by Yeast. In: *J. Inst. Brew.* 1979 85, S. 149–156.
- Spirituosenverordnung, Verordnung Nr.110/2008 des Europäischen Parlaments.
- Stark, T.; Bareuther, S.; Hofmann, T. (2005): Sensory-Guided Decomposition of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) and Structure Determination of Taste-Active Polyphenols. In: *J. Agric. Food Chem.* 53 (13), S. 5407–5418.
- Stark, T.; Hofmann, T. (2005 a): Isolation, Structure Determination, Synthesis, and Sensory Activity of N-Phenylpropenoyl-L-amino Acids from Cocoa (*Theobroma cacao*). In: *J. Agric. Food Chem.* 53 (13), S. 5419–5428.
- Stark, T.; Hofmann, T. (2005 b): Structures, Sensory Activity, and Dose/Response Functions of 2,5-Diketopiperazines in Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*). In: *J. Agric. Food Chem.* 53 (18), S. 7222–7231.
- Starkenmann, C.; Cayeux, I.; Decorzant, E.; Yang, Emma X.-H.; Niclass, Y.; Nicolas, L. (2009): Taste Contribution of (R)-Strombine to Dried Scallop. In: *J. Agric. Food Chem.* 57 (17), S. 7938–7943.
- Süß, B.; Brockhoff, A.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. (2013): Structures, orosensory activity, and T1R1/T1R3 receptor activation of amides generated by lactone aminolysis using food-related processing conditions. In: *Eur Food Res Technol* 237 (1), S. 57–70.
- Tanaka, T.; Kuono, I. (1996): Whisky Lactone Precursors from the Wood of *Platycarya strobilacea*. In: *J. Nat. Prod.* 59, S. 997–999.
- Tanaka, T.; Matsuo, Y.; Kouno, I. (2010): Chemistry of Secondary Polyphenols Produced during Processing of Tea and Selected Foods. In: *IJMS* 11 (1), S. 14–40.

- Toelstede, S.; Hofmann, T. (2008): Quantitative Studies and Taste Re-engineering Experiments toward the Decoding of the Nonvolatile Sensometabolome of Gouda Cheese. In: *J. Agric. Food Chem.* 56 (13), S. 5299–5307.
- Treesukosol, Y.; Lyall, V.; Heck, G. L.; DeSimone, J. A.; Spector, A. C. (2007): A psychophysical and electrophysiological analysis of salt taste in Trpv1 null mice. In: *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292 (5), S. R1799–R1809.
- Tressl, R. (1979): Formation of aldehyde by lipid oxidation and their importance as "off-flavor" components in beer. In: *Proceedings of the Congress* 17, S. 27.
- Vecchietti, V.; Ferrari, G.; Orsini, F.; Pelizzoni, F. (1979): Alkaloid and Lignan constituents of *Cinnamomum madagascariensis*. In: *Phytochemistry* 18, S. 1847–1849.
- Vocke, M. (2008): Einfluss des Herstellungsprozesses auf die Bildung wertgebender Aromastoffe in amerikanischem Whisky. 1. Aufl. Garching: Dt. Forschungsanst. für Lebensmittelchemie.
- Wilkin, G. D. (1989): Milling, cooking and mashing. In: *The Science and technology of whiskies*, Chapter 3, S. 64–88.
- Wilkinson, K. L.; Prida, A.; Hayasaka, Y. (2013): Role of Glycoconjugates of 3-Methyl-4-hydroxyoctanoic Acid in the Evolution of Oak Lactone in Wine during Oak Maturation. In: *J. Agric. Food Chem.* 61 (18), S. 4411–4416.
- Wine Spectator: Impact Databank - Juli 2013.
- Winnig, M. (2006): Struktur-Wirkungsbeziehungen der Süßgeschmacksrezeptoren des Menschen und der Ratte. Universität Potsdam, Potsdam.
- Yasumatsu, K.; Horio, N.; Murata, Y.; Shirotsaki, S.; Ohkuri, T.; Yoshida, R.; Ninomiya, Y. (2009): Multiple receptors underlie glutamate taste responses in mice. In: *American Journal of Clinical Nutrition* 90 (3), S. 747S–752S.
- Zhang, F.; Klebansky, B.; Fine, R. M.; Liu, H.; Xu, H.; Servant, G. et al. (2010): Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (10), S. 4752–4757.
- Zhang, F.; Klebansky, B.; Fine, R. M.; Xu, H.; Pronin, A. (2008): Molecular mechanism for the umami taste synergism. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (52), S. 20930–20934.

6 Spektroskopische Daten

3S,4S (cis)-Oaklacton-Galloylglucosid (1)

Hellgelbes/bräunliches Pulver;

UV (MeOH) λ_{\max} = 216, 272 nm;

MS (ESI⁻) m/z: 487 ([M-H]⁻)

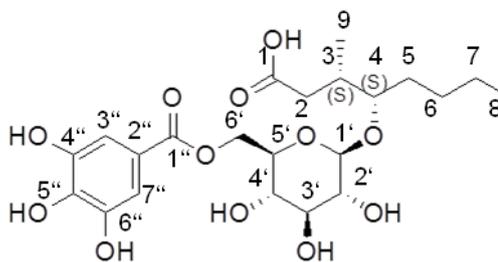
¹H NMR (500 MHz, 300 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 0,72 [t, ³J=7,1 Hz, 3H, H-C(8)], 0,93 [d, ³J=6,6

Hz, 3H, H-C (9)], 1,22 – 1,09 [m, 3H, H_b-C(6), H_{a,b}-C(7)], 1,31 – 1,25 [m, 1H, H_a-C(6)], 1,53 – 1,34 [m, 2H, H_{a,b}-C(5)], 2,25 – 2,12 [m, 2H, H_b-C(2), H-C(3)], 2,63 – 2,57 [m, 1H, H_a-C(2)], 3,24 – 3,17 [m, 1H, H-C(2')], 3,40 – 3,35 [m, 2H, H-C(3',4')], 3,61 – 3,50 [m, 2H, H-C(4,5')], 4,33 [d, ³J=7,8 Hz, 1H, H-C(1')], 4,41 [dd, ²J=11,8, ³J=6,3 Hz, 1H, H_b-C(6)], 4,47 [dd, ²J=11,8, ³J=2,4 Hz, 1H, H_a-C(6')], 7,08 [s, 2H, H-C(3'',7'')]

¹³C NMR (125 MHz, 300 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 14,4 [C-8], 15,0 [C-9], 23,6 [C-7], 29,0 [C-6], 32,2 [C-5], 34,5 [C-3], 38,2 [C-2], 65,1 [C-6'], 72,1 [C-4'], 75,3 [C-5'], 75,5 [C-2'], 78,2 [C-3'], 83,7 [C-4], 104,4 [C-1'], 110,3 [3'',7''], 121,6 [C-2''], 139,9 [C-5''], 146,6 [C-4'',6''], 168,4 [C-1''], 177,7 [C-1]



3S,4S (cis)-Oaklacton-Glucosid (2)

Hellgelbes/bräunliches Pulver;

MS (ESI⁻) m/z: 335 ([M-H]⁻)

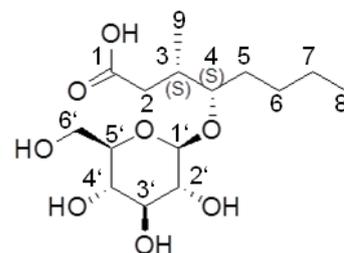
¹H NMR (500 MHz, 300K, d₄-Methanol) ppm:

δ 0,95 [t, 3H, ³J=7,0 Hz, H-C(8)], 0,99 [d, 3H, ³J=6,7 Hz, H-C

(9)], 1,40–1,29 [m, 3H, H_b-C(6), H_{a,b}-C(7)], 1,62–1,41 [m, 3H, H_{a,b}-C(5), H_a-C(6)], 2,17 [dd, 1 H, ²J=15,0 Hz; ³J=9,0 Hz; H_b-C(2)], 2,31–2,22 [m, 1H, H-C(3)], 2,64 [dd, 1H, ²J=14,8 Hz; ³J=5,4 Hz; H_a-C(2)], 3,18 [pt, 1H; ³J=8,1 Hz; H-C(2')], 3,28–3,22 [m, 1H, H-C(5')], 3,31 [MeOH, 1H, H-C(4')], 3,39–3,34 [m, 1H, H-C(3')], 3,72–3,63 [m, 2H, H-C(4), H_b-C(6')], 3,85 [dd, 1H, ²J=11,5 Hz; ³J=2,4 Hz, H_a-C(6')], 4,33 [d, 1H, ³J=7,8 Hz, H-C(1')]

¹³C NMR (125 MHz, 300 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 14,4 [C-8], 15,1 [C-9], 23,7 [C-7], 29,1 [C-6], 32,0 [C-5], 34,3 [C-3], 38,0 [C-2], 62,9 [C-6'], 71,7 [C-4'], 75,5 [C-2'], 77,7 [C-5'], 78,2 [C-3'], 83,5 [C-4], 104,1 [C-1'], 177,7 [C-1]



3S,4S (cis)-Oaklacton-Rutinosid (3)

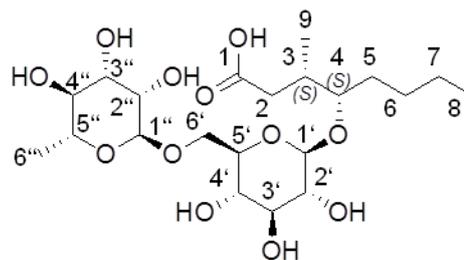
Hellgelbes/bräunliches Pulver;

MS (ESI⁻) m/z: 481 ([M-H]⁻)**¹H NMR** (500 MHz, 300 K, d₅-Pyridin) ppm:δ 0,94 [t, 3H, ³J=7,4 Hz, H-C(8)], 1,19 [d, 3H, ³J=6,8Hz, H-C (9)], 1,50–1,34 [m, 2H, H_{a,b}-C(7)], 1,62–1,51[m, 1H, H_b-C(6)], 1,78–1,67 [m, 2H, H_b-C(5), H_a-C(6)], 1,65 [d, 3H, ³J=6,1 Hz, H-C (6'')],1,91–1,82 [m, 1H, H_a-C(5)], 2,63 [dd, 1 H, ²J=14,9 Hz; ³J=8,9 Hz; H_b-C(2)], 2,80–2,70 [m, 1H,H-C(3)], 3,17 [dd, 1H; ²J=14,9 Hz; ³J=5,1 Hz; H_a-C(2)], 4,08–3,97 [m, 4H, H-C(4), H-C(2'), H-C(4'), H-C(5')], 4,14 [dd, 1H, ²J=11,0 Hz; ³J=6,6 Hz, H_b-C(6')], 4,23 [pt, 1H, ³J=8,7 Hz; H_a-C(3')], 4,26 [pt, 1H, ³J=9,4 Hz; H_a-C(4'')], 4,40–4,32 [m, 1H, H-C(5'')], 4,54 [dd, 1H,³J=3,4 Hz, 9,2 Hz; H_a-C(3'')], 4,60 [dd, 1H, ³J=1,4 Hz, 3,4 Hz; H_a-C(2'')], 4,68 [d, 1H, ²J=10,3Hz; H_a-C(6'')], 4,97 [d, 1H, ³J=7,7 Hz, H-C(1'')], 5,51 [d, 1H, ³J=1,4 Hz, H-C(1'')]**¹³C NMR** (125 MHz, 300 K, d₅-Pyridin) ppm:

δ 14,7 [C-8], 15,7 [C-9], 19,0 [C-6''], 23,4 [C-7], 28,7 [C-6], 32,0 [C-5], 34,3 [C-3], 38,9 [C-2],

69,0 [C-6'], 70,2 [C-5'], 72,3 [C-5'], 72,6 [C-2'], 73,1 [C-3'], 74,4 [C-4'], 75,9 [C-2'], 77,2

[C-4'], 78,9 [C-3'], 83,3 [C-4], 103,0 [C-1''], 104,8 [C-1'], 177,1 [C-1]

**Lyoniresinol(4)**

Hellgelbes Pulver;

UV (MeOH) λ_{max} = 212, 280 nm;**CD** (c = 2,38 x 10⁻³, MeOH) [θ]²⁵ (nm) -2600 (287), +9900 (271),

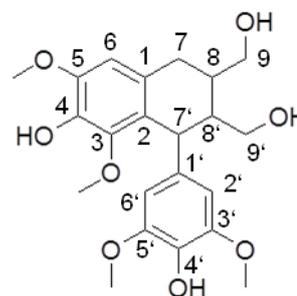
+35400 (244)

MS (ESI⁻) m/z: 419 ([M-H]⁻)**¹H NMR** (500 MHz, 300 K, d₄-Methanol) ppm:δ 1,67-1,58 [m, 1H, ³J=5,1 Hz, 6,5 Hz; H-C(8)], 1,97 [ddd, 1H, ³J=5,5 Hz, 8,4 Hz, 11,1 Hz; H-C(8')], 2,57 [dd, 1H, ²J=14,9 Hz; ³J=11,5 Hz; H_α-C(7)], 3,38 [s, 3H, H₃CO-C(3)], 2,70 [dd, 1H,²J=15,1 Hz; ³J=4,9 Hz; H_β-C(7)], 3,53-3,45 [m, 3H, ²J=10,5; ³J=5,4 Hz, 6,6 Hz; H₂C(9'), H_α-C(9)], 3,59 [dd, 1H, ²J=10,8; ³J=5,1 Hz; H_β-C(9)], 3,73 [s, 6H, H₃CO-C(3'), H₃CO-C(5')], 3,86[s, 3H; H₃CO-C(5)], 4,31 [d, 1H, ³J=5,6 Hz; H-C(7')], 6,38 [s, 2H; H-C(2'), H-C(6')], 6,58 [s,

1H; H-C(6)],

¹³C NMR (125 MHz, 300 K, d₄-Methanol) ppm:δ 33,6 [C-7], 40,9 [C-8], 42,3 [C-7'], 56,6 [CH₃-C-5], 49,0 [C-8'], 56,8 [CH₃-C-3', CH₃-C-5'],60,2 [CH₃-C-3], 64,2 [C-9'], 66,8 [C-9], 106,9 [C-2', C-6'], 107,8 [C-6], 130,2 [C-1], 126,3 [C-

2], 134,6 [C-4'], 138,9 [C-4], 139,3 [C-1'], 147,7 [C-3], 148,7 [C-5], 149,0 [C-3', C-5']



Lyonisid (5)

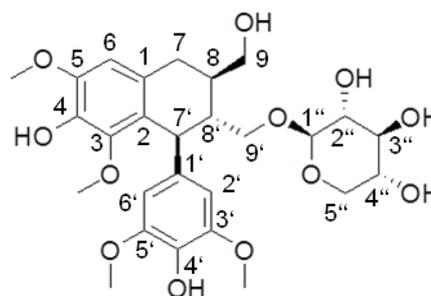
Hellgelbes Pulver;

UV (MeOH) λ_{\max} = 216, 280 nm;**CD** ($c = 1,81 \times 10^{-3}$, MeOH) $[\theta]^{25}$ (nm) -14500 (287), +62800 (273), +208100 (244)**MS** (ESI⁻) m/z : 551 ([M-H]⁻)**¹H NMR** (400 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 1,77-1,66 [m, 1H, ³J=4,9 Hz, 6,5 Hz, 9,1 Hz; H-C(8)], 2,10-2,03 [m, 1H, ³J=5,0 Hz, 9,5 Hz; H-C(8')], 2,64 [dd, 1H, ²J=14,9 Hz; ³J=11,2 Hz; H α -C(7)], 2,72 [dd, 1H, ²J=15,2 Hz; ³J=4,9 Hz; H β -C(7)], 3,18 [pt, 1H, ²J=11,5 Hz; ³J=10,3 Hz; H α -C(5'')], 3,25 [pt, 1H, ³J=7,6 Hz, 8,8 Hz; H-C(2'')], 3,34-3,32 [m, 1H, H-C(3'')], 3,36 [s, 3H, H₃CO-C(3)], 3,43 [dd, 1H, ²J=9,8 Hz; ³J=4,0 Hz; H α -C(9)], 3,52-3,46 [m, 1H, ³J=5,4 Hz, 8,9 Hz, 10,0 Hz; H-C(4'')], 3,56 [dd, 1H, ²J=10,9; ³J=6,5 Hz; H α -C(9)], 3,66 [dd, 1H, ²J=10,8; ³J=4,4 Hz; H β -C(9)], 3,76 [s, 6H, H₃CO-C(3'), H₃CO-C(5')], 3,85-3,81 [m, 2H; H β -C(5''), H β -C(9'')], 3,86 [s, 3H; H₃CO-C(5)], 4,23 [d, 1H, ³J=7,6 Hz; H-C(1'')], 4,39 [d, 1H, ³J=6,6 Hz; H-C(7'')], 6,44 [s, 2H; H-C(2'), H-C(6')], 6,58 [s, 1H; H-C(6)],

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

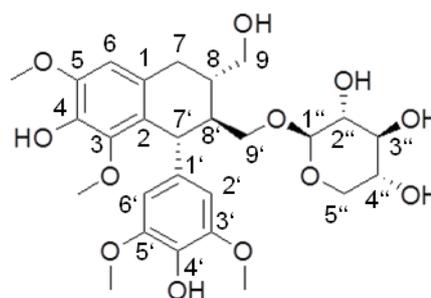
δ 33,9 [C-7], 40,5 [C-8], 43,0 [C-7'], 46,7 [C-8'], 56,6 [CH₃O-C-5], 56,8 [CH₃O-C-3', CH₃O-C-5'], 60,0 [CH₃O-C-3], 66,0 [C-9], 67,0 [C-5''], 71,0 [C-9'], 71,3 [C-4''], 75,0 [C-2''], 78,0 [C-3''], 105,5 [C-1''], 106,9 [C-2', C-6'], 107,8 [C-6], 126,4 [C-2], 130,1 [C-1], 134,5 [C-4'], 138,9 [C-4], 147,6 [C-3], 139,4 [C-1'], 148,6 [C-5], 149,0 [C-3', C-5']

**Nudiposid (6)**

Hellgelbes Pulver;

UV (MeOH) λ_{\max} = 216, 280 nm;**CD** ($c = 1,81 \times 10^{-3}$, MeOH) $[\theta]^{25}$ (nm) +20100 (287), -68500 (273), -200400 (244)**MS** (ESI⁻) m/z : 551 ([M-H]⁻)**¹H NMR** (400 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 1,78-1,68 [m, 1H, ³J= 5,6 Hz, 9,4 Hz; H-C(8)], 2,09-2,00 [m, 1H, ³J=4,8 Hz, 9,2 Hz; H-C(8')], 2,74-2,67 [m, 2H, H₂-C(7)], 3,15 [pt, 1H; ³J=10,7 Hz; H α -C(5'')], 3,21 [dd, 1H, ³J=7,6 Hz, 8,8 Hz; H-C(2'')], 3,28 [pd, 1H, ³J=8,8 Hz; H-C(3'')], 3,32 [s, 3H, H₃CO-C(3)], 3,51 [ddd, 1H; ³J=5,4 Hz, 8,9 Hz, 10,3 Hz; H-C(4'')], 3,66-3,62 [m, 2H, ³J=4,7 Hz, 10,0 Hz; H α -C(9), H β -C(9)], 3,76 [s, 6H, H₃CO-C(3'), H₃CO-C(5')], 3,85-3,81 [m, 1H; ³J=4,5 Hz; H β -C(9'')], 3,90-3,85 [m, 1H; ³J=5,4 Hz; H β -C(5'')], 3,87 [s, 3H; H₃CO-C(5)], 4,11 [d, 1H, ³J=7,6 Hz; H-C(1'')], 4,24 [d, 1H, ³J=7,1 Hz; H-C(7'')], 6,43 [s, 2H; H-C(2'), H-C(6')], 6,58 [s, 1H; H-C(6)]



¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 34,0 [C-7], 40,7 [C-8], 43,4 [C-7'], 46,9 [C-8'], 56,6 [CH₃O-C-5], 56,8 [CH₃O-C-3', CH₃O-C-5'], 59,9 [CH₃O-C-3], 66,0 [C-9], 67,1 [C-5''], 71,1 [C-9'], 71,3 [C-4'], 75,0 [C-2''], 78,0 [C-3'], 105,0 [C-1'], 106,9 [C-2', C-6'], 107,7 [C-6], 126,3 [C-2], 130,1 [C-1], 134,5 [C-4'], 138,9 [C-4], 147,6 [C-3], 139,6 [C-1'], 148,7 [C-5], 149,0 [C-3', C-5']

(+)-Lyoniresinol-Glucosid (7)

Hellgelbes Pulver;

UV (MeOH) λ_{max} = 216, 276 nm;

CD (c = 1,72 x 10⁻³, MeOH) [θ]²⁵ (nm) -2200 (287),

+41400 (273), +177600 (244)

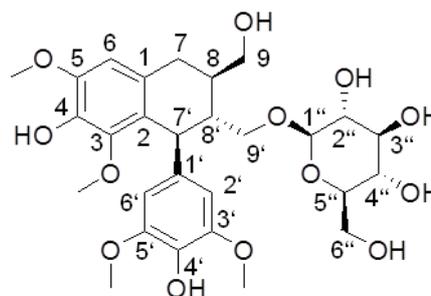
MS (ESI⁻) m/z: 581 ([M-H]⁻)

¹H NMR (400 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 1,78-1,67 [m, 1H; H-C(8)], 2,14-2,04 [m, 1H, H-C(8')], 2,66 [dd, 1H, ²J=15,1 Hz; ³J=11,5 Hz; H_α-C(7)], 2,73 [dd, 1H, ²J=15,1 Hz; ³J=4,8 Hz; H_β-C(7)], 3,28-3,22 [m, 2H; H-C(2''), H-C(5'')], 3,31-3,29 [m, 1H, H-C(3'')], 3,36 [s, 3H, H₃CO-C(3)], 3,38 [pt, 1H; ³J=8,5 Hz; H-C(4'')], 3,47 [dd, 1H, ²J=9,6 Hz; ³J=4,2 Hz; H_α-C(9')], 3,56 [dd, 1H, ²J=11,0; ³J=6,7 Hz; H_α-C(9)], 3,69-3,64 [m, 2H; H_α-C(6''), H_β-C(9)], 3,76 [s, 6H, H₃CO-C(3'), H₃CO-C(5')], 3,87-3,83 [m, 1H; H_β-C(6'')], 3,87 [s, 3H; H₃CO-C(5)], 3,91 [dd, 1H; ²J=9,7 Hz; ³J=5,5 Hz; H_β-C(9'')], 4,29 [d, 1H, ³J=7,8 Hz; H-C(1'')], 4,44 [d, 1H, ³J=6,2 Hz; H-C(7'')], 6,44 [s, 2H; H-C(2'), H-C(6')], 6,59 [s, 1H; H-C(6)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 34,0 [C-7], 40,6 [C-8], 42,8 [C-7'], 46,6 [C-8'], 56,6 [CH₃O-C-5], 56,8 [CH₃O-C-3'], 60,2 [CH₃O-C-3], CH₃O-C-5'], 62,9 [C-6''], 66,1 [C-9], 71,4 [C-9'], 71,5 [C-3''], 75,1 [C-2''/5''], 77,8 [C-2''/5''], 78,3 [C-4''], 78,3 [C-4''], 104,7 [C-1''], 106,9 [C-2', C-6'], 107,8 [C-6], 126,6 [C-2], 130,1 [C-1], 134,5 [C-4'], 136,9 [C-4], 139,2 [C-1'], 147,8 [C-3], 147,8 [C-3], 148,7 [C-5], 149,0 [C-3', C-5']



Lyoniresinol-9-O-gallat (8)

Hellgelbes Pulver;

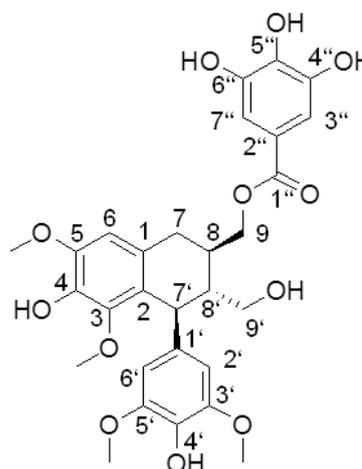
UV (MeOH) λ_{max} = 216, 280 nm;

CD (c = 1,75 x 10⁻³, MeOH) [θ]²⁵ (nm) +1900 (288), +12100 (276), +52300 (244)

MS (ESI⁻) m/z: 571 ([M-H]⁻)

¹H NMR (500 MHz, 300 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 2,04–1,98 [m, 1H, H-C(8)], 2,17–2,08 [m, 1H, H-C(8')], 2,69–2,63 [m, 1H, H_β-C(7)], 2,80 [dd, 1H, ²J=15,3, ³J=4,9 Hz, H_α-



C(7)], 3,39 [s, 3H, H₃CO-C(3)], 3,59–3,54 [m, 2H, H_{a,b}-C(9')], 3,72 [s, 6H, H₃CO-C(3',5')], 3,86 [s, 3H, H₃O-C(5)], 4,16 [dd, 1H, ²J=10,9, ³J=7,3 Hz, H_b-C(9)], 4,28 [dd, 1H, ²J=10,9, ³J=5,1 Hz, H_a-C(9)], 4,39 [d, 1H, ³J=5,3 Hz, H-C(7')], 6,38 [s, 2H, H-C(2',6')], 6,60 [s, 1H, H-C(6)], 7,02 [s, 2H, H-C(3'',7'')]

¹³C NMR (125 MHz, 300 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 33,3 [C-7], 37,4 [C-8], 41,9 [C-7'], 49,3 [C-8'], 56,6 [CH₃OC-C-5], 56,8 [CH₃OC-C-3',5'], 60,2 [CH₃O-C-3], 63,8 [C-9'], 68,7 [C-9], 106,9 [C-2',6'], 107,8 [C-6], 110,1 [C-3'',7''], 121,6 [C-2''], 125,9 [C-2], 129,3 [C-1], 134,6 [C-4'], 139,0 [C-1',4], 139,8 [C-5'], 146,5 [C-4'',6''], 147,8 [C-3], 148,8 [C-5], 149,1 [C-3',5'], 168,5 [C-1'']

5-Ethoxymethylfurfural (11)

Hellgelbe Flüssigkeit;

UV (ACN/H₂O) λ_{max} = 220, 276 nm;

MS (ESI⁺) m/z: 155 ([M+H]⁺)

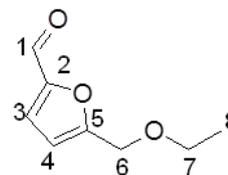
¹H NMR (400 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 1,20 [t, ³J = 7,0 Hz, 3H, H-C(8)], 3,57 [q, ³J = 7,0 Hz, 2H, H-C(7)], 4,54 [s, 2H, H-C(6)], 6,63 [d,

³J = 3,6 Hz, 1H, H-C(4)], 7,38 [d, ³J = 3,6 Hz, 1H, H-C(3)], 9,55 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

δ 15,4 [C-8], 65,5 [C-7], 67,4 [C-6], 112,5 [C-4], 124,4 [C-3], 154,2 [C-2], 160,4 [C-5], 179,5 [C-1]



5-d5-Ethoxymethylfurfural

Hellgelbe Flüssigkeit;

UV (ACN/H₂O) λ_{max} = 220, 276 nm;

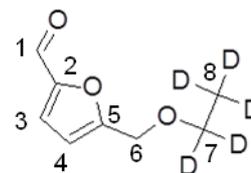
MS (ESI⁺) m/z: 160 ([M+H]⁺)

¹H NMR (400 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

δ 4,48 [s, 2H, H-C(6)], 6,56 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(4)], 7,30 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(3)], 9,54 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

δ 13,4 [quintet, C-8], 65,0 [C-6], 65,1 [septet, C-7], 112,2 [C-4], 124,1 [C-3], 153,7 [C-2], 159,8 [C-5], 178,8 [C-1]



5-Methoxymethylfurfural (12)

Hellgelbe Flüssigkeit;

UV (MeOH/H₂O) λ_{\max} = 228, 278 nm;

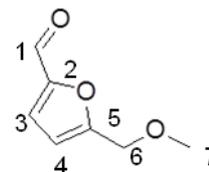
MS (ESI⁺) m/z: 141 ([M+H]⁺)

¹H NMR (400 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 3,33 [s, 3H, H-C(7)], 4,45 [s, 2H, H-C(6)],

 6,58 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(4)], 7,30 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(3)], 9,55 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 58,6 [C-7], 66,9 [C-6], 112,5 [C-4], 124,0 [C-3], 153,8 [C-2], 159,3 [C-5], 178,9 [C-1]

5-d3-Methoxymethylfurfural

Hellgelbe Flüssigkeit;

UV (ACN/H₂O) λ_{\max} = 228, 280 nm;

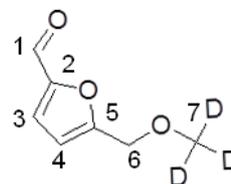
MS (ESI⁺) m/z: 144 ([M+H]⁺)

¹H NMR (400 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 4,46 [s, 2H, H-C(6)], 6,59 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(4)], 7,31 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(3)],

9,56 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 57,7 [quintet, C-7], 66,5 [C-6], 112,4 [C-4], 123,8 [C-3], 153,7 [C-2], 159,1 [C-5], 178,9 [C-1]

5-i-Propoxymethylfurfural (13)

Hellgelbe Flüssigkeit;

UV (ACN/H₂O) λ_{\max} = 224, 280 nm;

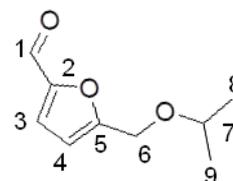
MS (ESI⁺) m/z: 169 ([M+H]⁺)

¹H NMR (400 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 1,52 [d, ³J = 6,1 Hz, 6H, H-C(8,9)], 3,48 [m, 1H, H-C(7)], 4,48 [s, 2H, H-C(6)], 6,56 [d, ³J =

 3,5 Hz, 1H, H-C(4)], 7,30 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(3)], 9,54 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 22,3 [C-8,9], 62,9 [C-7], 72,6 [C-6], 111,9 [C-4], 124,3 [C-3], 153,6 [C-2], 160,3 [C-5], 178,8 [C-1]


5-n-Propoxymethylfurfural (14)

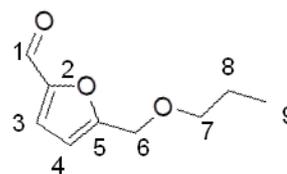
Hellgelbe Flüssigkeit;

UV (ACN/H₂O) λ_{\max} = 224, 276 nm;**MS** (ESI⁺) m/z: 169 ([M+H]⁺)**¹H NMR** (400 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

δ 0,88 [d, ³J = 7,4 Hz, 3H, H-C(9)], 1,56 [m, 2H, H-C(8)], 3,44 [t, ³J = 6,6 Hz, 2H, H-C(7)], 4,49 [s, 2H, H-C(6)], 6,57 [d, J = 3,5 Hz, 1H, H-C(4)], 7,30 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(3)], 9,54 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

δ 10,8 [C-9], 23,6 [C-8], 65,3 [C-7], 73,2 [C-6], 112,2 [C-4], 124,1 [C-3], 153,7 [C-2], 159,8 [C-5], 178,8 [C-1]

**5-n-Butoxymethylfurfural (15)**

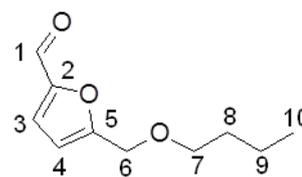
Hellgelbe Flüssigkeit;

UV (ACN/H₂O) λ_{\max} = 224, 276 nm;**MS** (ESI⁺) m/z: 183 ([M+H]⁺)**¹H NMR** (400 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

δ 0,89 [t, ³J = 7,4 Hz, 3H, H-C(10)], 1,34 [m, 2H, H-C(9)], 1,52 [m, 2H, H-C(8)], 3,48 [t, ³J = 6,5 Hz, 2H, H-C(7)], 4,48 [s, 2H, H-C(6)], 6,56 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(4)], 7,30 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(3)], 9,54 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

δ 14,1 [C-10], 20,0 [C-9], 32,4 [C-8], 65,3 [C-7], 71,3 [C-6], 112,2 [C-4], 124,0 [C-3], 153,7 [C-2], 159,8 [C-5], 178,8 [C-1]

**5-2-Methylbutoxymethylfurfural (16)**

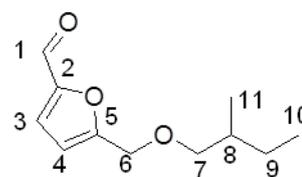
Hellgelbe Flüssigkeit;

UV (ACN/H₂O) λ_{\max} = 224, 276 nm;**MS** (ESI⁺) m/z: 191 ([M+H]⁺)**¹H NMR** (400 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

δ 0,88 [m, 6H, H-C(10,11)], 1,12 [m, 1H, H β -C(9)], 1,41 [m, 1H, H α -C(9)], 1,61 [m, 1H, H-C(8)], 3,31 [m, 2H, H-C(7)], 4,49 [s, 2H, H-C(6)], 6,58 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(4)], 7,31 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(3)], 9,55 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

δ 11,5 [C-10], 16,8 [C-11], 26,8 [C-9], 35,7 [C-8], 65,5 [C-6], 76,6 [C-7], 112,2 [C-4], 124,1 [C-3], 153,7 [C-2], 159,8 [C-5], 178,8 [C-1]



5-3-Methylbutoxymethylfurfural (17)

Hellgelbe Flüssigkeit;

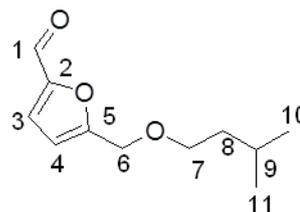
UV (ACN/H₂O) λ_{\max} = 224, 272 nm;

MS (ESI⁺) m/z: 191 ([M+H]⁺)

¹H NMR (400 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 0,88 [m, 6H, H-C(10,11)], 1,45 [m, 2H, H-C(8)], 1,67 [m, 1H, H-C(9)], 3,52 [m, 2H, H-C(7)], 4,49 [s, 2H, H-C(6)], 6,57 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(4)], 7,31 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(3)], 9,55 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 22,8 [C-10,11], 25,8 [C-9], 39,1 [C-8], 65,2 [C-6], 69,9 [C-7], 112,2 [C-4], 124,1 [C-3], 153,7 [C-2], 159,7 [C-5], 178,8 [C-1]

5-2-Phenylethoxymethylfurfural (18)

Hellgelbe Flüssigkeit;

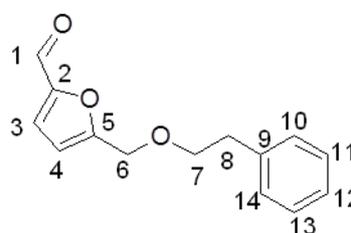
UV (ACN/H₂O) λ_{\max} = 212, 272 nm;

MS (ESI⁺) m/z: 231 ([M+H]⁺)

¹H NMR (400 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 2,87 [t, ³J = 6,8 Hz, 2H, H-C(8)], 3,72 [t, ³J = 6,8 Hz, 2H, H-C(7)], 4,52 [s, 2H, H-C(6)], 6,54 [d, ³J = 3,5 Hz, 1H, H-C(4)], 7,26 [m, 5H, H-C(3, 10-14)], 9,55 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₃-Acetonitril) ppm:

 δ 36,3 [C-8], 65,3 [C-6], 72,3 [C-7], 112,4 [C-4], 124,1 [C-3], 127,2 [C-12], 129,3 [C-11, 13], 129,9 [C-10, 14], 140,2 [C-9], 153,7 [C-2], 159,4 [C-5], 178,8 [C-1]

5-Hydroxymethylfurfuralvanillat (19)

Hellgelbes Pulver;

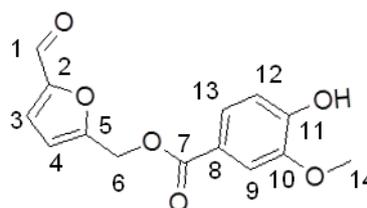
UV (ACN/H₂O) λ_{\max} = 216, 268 nm;

MS (ESI⁺) m/z: 277 ([M+H]⁺)

¹H NMR (400 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

 δ 3,89 [s, 3H, H-C(14)], 5,37 [s, 2H, H-C(6)], 6,77 [d, ³J = 3,6 Hz, 1H, H-C(4)], 6,84 [d, ³J = 8,2 Hz, 1H, H-C(12)], 7,40 [d, ³J = 3,6 Hz, 1H, H-C(3)], 7,56 [m, 2H, H-C(9,13)], 9,59 [s, 1H, H-C(1)]

¹³C NMR (100 MHz, 298 K, d₄-Methanol) ppm:

 δ 56,4 [C-14], 59,0 [C-6], 113,6 [C-9 o, 13], 113,7 [C-4], 116,0 [C-12], 121,8 [C-8], 124,0 [C-3], 125,4 [C-9 o, 13], 148,8 [C-10], 153,3 [C-11], 154,4 [C-2], 157,7 [C-5], 167,2 [C-7], 179,7 [C-1]


Persönliche Daten

Geburtsdatum 29. März 1986
Geburtsort Ingolstadt
Familienstand verheiratet seit dem 16.06.2017
mit Manuel Vinzenz Froschmeier, geb. Vidovic
Staatsangehörigkeit deutsch
Eltern Werner Froschmeier
Agnes Froschmeier, geb. Rusch
Geschwister Monika Froschmeier
Anita Froschmeier

Berufserfahrung

Seit 07/2017 **Daiichi-Sankyo Europe GmbH**
Europazentrale eines japanischen Pharmaunternehmens
Lab Manager/Analytical Specialist

09/2015 – 06/2017 **Sandoz GmbH**
österreichischer Pharmahersteller und -exporteur
Lab Head Analytics

01/2011 – 10/2014 **Technische Universität München**
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

04/2010 – 05/2010 **Landratsamt Eichstätt**
Bereich Lebensmittelüberwachung
Hospitantin

12/2009 – 03/2010 **Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)**
Praktische Ausbildung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin
Praktikantin

10/2009 – 11/2009 **Technische Universität München**
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik
Studentische und wissenschaftliche Hilfskraft

Ausbildung und Studium

- 01/2011 – 10/2014 **Technische Universität München**
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik
Promotion „Molekulare Charakterisierung von
Schlüsselgeschmacksstoffen in Whisky“
- 12/2009 – 11/2010 **Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit**
Praktische Ausbildung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin
2. Staatsexamen
- 10/2005 – 10/2009 **Technische Universität München**
Studium der Lebensmittelchemie
1. Staatsexamen
- 09/1996 – 07/2005 **Apian Gymnasium Ingolstadt**
Abitur
- 09/1992 – 07/1996 **Grundschule Zuchering**