

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Freising bei München

Charakterisierung qualitativer und quantitativer Unterschiede  
in wertgebenden Geruchsstoffen verschiedener Hopfenspezies

**Wolfgang Peter Wilhelm**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schuster

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

2. Univ.-Prof. Dr. T. Becker

Die Dissertation wurde am 29.04.2013 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie

am 15.11.2013 angenommen.

*für*

*Theresia*

*und*

*Bernadette, Georg, Marietta, Paul*

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. Peter Schieberle an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA) in Garching bei München durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Peter Schieberle, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die stets gewährte Unterstützung, seine wertvolle wissenschaftliche Betreuung und die anregenden Diskussionen.

Insbesondere danke ich für sein Verständnis bezüglich meiner Situation, die in der Vereinbarkeit von Familienleben und Beruf bestand.

Der Wissenschaftsförderung der deutschen Brauwirtschaft e.V. (WiFö) danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Projekts AiF-FV 13622 N.

Der Firma Hopsteiner Simon H. Steiner, Hopfen, GmbH, in Mainburg danke ich für die kostenlose Bereitstellung sämtlicher Hopfenproben. Insbesondere danke ich Dr. Dietmar Kaltner für die kompetente Beratung bei der Auswahl der Hopfensorten.

Dr. Klaus Kammhuber, Hopfenforschungszentrum Hüll, danke ich für die Einführung in die Thematik der Hopfenanalytik zu Beginn meiner Forschungstätigkeit.

Allen Mitarbeitern der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie und des Instituts für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München danke ich für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit, namentlich meinen direkten Laborkollegen Dr. Yasemin Ayverdin, Dr. Michaela Hammer, Dr. Anette Zeller, Dr. Claudia Scheidig und Dr. Simone Straßer.

Dr. Tobias Breidbach, Dr. Michael Czerny, Dr. Wolfgang Engel und Dr. Martin Steinhilber danke ich für die hilfreichen Ratschläge.

Für die Teilnahme an unzähligen sensorischen Untersuchungen gebührt mein Dank Dr. Nadja Alt, Dr. Yasemin Ayverdi, Petra Bail, Dr. Johanna Bogen, Dr. Susi Bogan, Dr. Alexander Burkon, Dr. Irene Chetschik, Dr. Monika Christlbauer, Dr. Martin Christlbauer, Dr. Michael Czerny, Dr. Philipp Dünsing, Patricia Esposito, Dr. Anja Fischer, Dr. Andrea Burdack-Freitag, Dr. Michael Granvogl, Dr. Vroni Greger, Dr. Michaela Hammer, Dr. Conny Hartl, Johanna Hauder, Dr. Sandra Held, Dr. Martina Kasper, Johanna Kreißl, Dr. Sabine Mönch, Dr. Noelia Moran-Hernandez, Sara Ochs, Dr. Astrid Oelmann, Dr. Christina Pammer, Dr. Sabine Riha, Dr. Malte Rubach,

Dr. Claudia Scheidig, Dr. Kerstin Söllner, Dr. Michael Vocke, Dr. Martin Weigl, Elke Wiegand und Dr. Annette Zeller.

Herzlichen Dank spreche ich in freundschaftlicher Verbundenheit Sami Kaviani-Nejad, Ines Otte und Sabine Heinel für ihr Engagement bei der Aufnahme zahlreicher Massenspektren aus.

Sabine Bijewitz danke ich für die sorgfältige Überarbeitung und Erstellung der chemischen Formeln und Diagramme in druckfähiger Linienstärke.

Prof. Dr. Eberhard Geiger, Ordinarius für Technologie der Brauerei II der TUM im Ruhestand († 26.10.2012), danke ich posthum für die Ermutigung zu diesem Forschungsprojekt.

Prof. Dr. Werner Back, Ordinarius für Technologie der Brauerei I der TUM im Ruhestand, danke ich, dass er in mir bereits während des Studiums die Begeisterung für Aromastoffe weckte, mir ein Aromathema als Diplomarbeit überließ und mir zur Promotion riet.

Meiner Frau Theresia Wilhelm und meinen Kindern Bernadette, Georg, Marietta und Paul danke ich für Ihr Verständnis und für die Zeitfenster, in denen ich ungestört an diesem Projekt arbeiten konnte.

Meinen Geschwistern Dr. Monika Wilhelm und Dr. Philipp Wilhelm danke ich für ihr Engagement bei der Durchsicht des Manuskripts. Schließlich danke ich meinen Eltern Otto und Johanna Wilhelm, die mir meine Ausbildung ermöglichten.



Foto: Privatbrauerei Schwerter, Meißen

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Hopfenpflanze</b> .....	<b>4</b>
1.1.1	Botanik, Anbau und Ernte .....	4
1.1.2	Verwendung .....	7
1.1.3	Sorten .....	10
1.1.4	Chemische Zusammensetzung .....	13
1.1.5	Hopfenölzusammensetzung in Abhängigkeit verschiedener Parameter ...	15
1.1.6	Flüchtige Verbindungen im Hopfen .....	19
<b>1.2</b>	<b>Der menschliche Geruchssinn und der Riechvorgang</b> .....	<b>25</b>
1.2.1	Wahrnehmung von Aromastoffen .....	25
1.2.2	Geruchssinn .....	26
1.2.3	Riechvorgang .....	28
<b>1.3</b>	<b>Wertgebende Aromastoffe in Hopfen</b> .....	<b>32</b>
1.3.1	Bewertung der Aromarelevanz flüchtiger Verbindungen .....	32
1.3.2	Übergang flüchtiger Verbindungen des Hopfens in das Bier .....	34
1.3.3	Bildung von Hopfenaromastoffen aus Vorstufen .....	37
<b>1.4</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>42</b>
<b>2.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1</b>	<b>Sensorischer Vergleich der Hopfensorten</b> .....	<b>43</b>
<b>2.2</b>	<b>Schlüsselaromastoffe der verwendeten Hopfensorten</b> .....	<b>44</b>
2.2.1	Hallertauer Smaragd .....	45
2.2.2	Hallertauer Perle .....	50
2.2.3	Hallertauer Hersbrucker Spät .....	53
2.2.4	Slowenischer Golding .....	56
2.2.5	Yakima Cascade .....	58
2.2.6	Charakterisierung qualitativer Unterschiede in wertgebenden Geruchsstoffen .....	61

<b>2.3</b>	<b>Quantitative Bestimmung ausgewählter Aromastoffe .....</b>	<b>70</b>
2.3.1	Aromastoffkonzentrationen im Erntejahrgang 2005.....	73
2.3.2	Aromastoffkonzentrationen im Erntejahrgang 2004.....	90
2.3.3	Aromastoffkonzentrationen im Erntejahrgang 2003.....	92
<b>2.4</b>	<b>Geraniol- und Linaloolgehalt in Abhängigkeit vom Destillationsverfahren und vom pH-Wert .....</b>	<b>93</b>
<b>2.5</b>	<b>Enzymatische Freisetzung von Linalool und Geraniol aus Hopfenglykosiden .....</b>	<b>102</b>
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>106</b>
<b>3.1</b>	<b>Zur Unterscheidbarkeit der Hopfensorten.....</b>	<b>106</b>
<b>3.2</b>	<b>Übergang von Hopfenaromastoffen in das Bier .....</b>	<b>108</b>
<b>3.3</b>	<b>Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis.....</b>	<b>118</b>
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>119</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungsmaterial und Chemikalien .....</b>	<b>119</b>
4.1.1	Untersuchungsmaterial.....	119
4.1.2	Referenzaromastoffe .....	120
4.1.3	Isotopenmarkierte Standards.....	121
4.1.4	Sonstige Reagenzien.....	122
<b>4.2</b>	<b>Synthesen.....</b>	<b>123</b>
4.2.1	Synthese von Referenzsubstanzen .....	123
4.2.2	Synthese von isotopenmarkierten Standards .....	125
<b>4.3</b>	<b>Identifizierung von Aromastoffen.....</b>	<b>125</b>
4.3.1	Probenaufbereitung von Hopfenpellets.....	125
4.3.1.1	Aromaextrakt für die Verdünnungsanalyse .....	126
4.3.1.2	Aromaextrakt für die Simultandestillation.....	128
4.3.1.3	Aromaextrakt für die Schwerkraft-Chromatographie.....	129

<b>4.4</b>	<b>Quantitative Bestimmung von Aromastoffen.....</b>	<b>130</b>
4.4.1	Aufarbeitung zur Gewinnung von Aromastoffen aus Extrakten.....	130
4.4.1.1	Aufarbeitung zum Nachweis von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in Bier .....	132
4.4.2	Aufarbeitung zur Gewinnung von Aromastoffen aus Glykosiden .....	132
4.4.2.1	Enzymatische Freisetzung von Linalool aus Glykosiden .....	132
4.4.2.2	Simultan- und SAFE-Destillationsmethode im Vergleich .....	133
<b>4.5</b>	<b>Chromatographische Methoden.....</b>	<b>135</b>
4.5.1	Säulenchromatographie.....	135
4.5.2	Aromaextraktverdünnungsanalyse .....	136
4.5.3	Kapillargaschromatographie/ Olfaktometrie .....	136
4.5.4	Multidimensionale Gaschromatographie.....	138
4.5.5	Affinitätschromatographie .....	139
4.5.5.1	Herstellung von Affigel 501 .....	139
4.5.5.2	Affinitätschromatographie zur Abtrennung thiolhaltiger Aromastoffe .....	140
4.5.6	GC/ Sektorfeldmassenspektrometrie .....	141
4.5.7	GC/ MS System Varian zur Quantifizierung.....	141
4.5.8	Quantifizierung mittels stabiler Isotope .....	142
4.5.9	Quantifizierung mittels Integrator .....	144
<b>4.6</b>	<b>Sensorische Untersuchung .....</b>	<b>145</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>146</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>148</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>161</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	161
7.2	Tabellenverzeichnis .....	166
7.3	Tabellenanhang.....	168
7.4	Abbildungsanhang .....	173

## 1. Einleitung

*Humulus lupulus* L., der gemeine Hopfen, entwickelte sich innerhalb der letzten 1000 Jahre zu einer weltweit geschätzten Kulturpflanze. Seinen botanischen Namen *Humulus lupulus* L. erhielt der Hopfen 1737 durch Carl von Linné (1707 – 1787, schwedischer Naturwissenschaftler und Begründer der bis heute gültigen historisch wissenschaftlichen Nomenklatur in der Botanik und Zoologie. Sein offizielles botanisches Autorenkürzel lautet „L.“ für Linné. Die älteste Erwähnung von Hopfen ist von Plinius dem Älteren (79 n.Chr.) überliefert, der in seinem Werk „Naturalis Historia“ die Sprossen des Hopfens als Delikatesse schätzte und den Hopfen mit „*Lupulus salictarius*“ bezeichnet, weil sein jähes Wachstum an einen Wolf erinnerte, der in die Weide einfällt. Spätere historische Quellen berichten über Pippin, den Vater Karls des Großen, der im Jahr 768 n. Chr. Hopfengärten an die Abtei St. Denis bei Paris verschenkte (Schiller 2002).

Die konservierende Wirkung des Hopfens war es, die dazu führte, dass er sich am Anfang des letzten Jahrtausends gegenüber allen anderen Gewürzen im Bier durchgesetzt hat. Vermutlich diente der Hopfen schon seit dem achten Jahrhundert zur Haltbarmachung des Bieres. So erwähnen die Äbtissin Hildegard von Bingen (12. Jh.) und der Abt Albertus Magnus (13. Jh.) die Eigenschaft des Hopfens, Getränke haltbar zu machen (Mayer 2008). Bereits 50 - 200 g Hopfen pro hl Bier (100 L) reichen aus, um diese Wirkung zu erreichen. Weltweit existieren mehrere hundert Hopfensorten, von denen allerdings nur noch wenige eine wirtschaftliche Bedeutung haben. In Deutschland waren die wichtigsten im Jahr 2009 angebauten Aromasorten: Hallertauer Mittelfrüher, Hersbrucker Spät, Spalter, Tettnanger, Hallertauer Tradition, Perle, Spalter Select, Saphir, Opal und Smaragd. Der Anteil der in Deutschland angebauten Aromasorten lag 2009 bei 53,4 %. Die wichtigsten Bitterhopfensorten waren: Northern Brewer, Nugget, Target, Hallertauer Magnum, Hallertauer Taurus, Hallertauer Merkur und Herkules.

Der überwiegende Anteil (99 %) der Hopfenproduktion wird zur Bierherstellung und lediglich 1 % für kosmetische und pharmazeutische Produkte verwendet. Hopfen ist in Kombination mit der Baldrianwurzel die häufigste Darreichungsform pflanzlicher

Schlaf- und Beruhigungsmittel. 2008 wurde Hopfen zur Arzneipflanze des Jahres gewählt.

Hopfen wird in Deutschland in sechs verschiedenen Regionen angebaut. Das größte Anbaugebiet, die Hallertau, liegt in Bayern, so wie auch die Regionen Spalt und Herbrucker Gebirge. Darüber hinaus gibt es Hopfenanbau im badenwürttembergischen Tettngang am Bodensee und im Anbaugebiet Elbe-Saale, das sich über die drei Bundesländer Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen erstreckt. Ein einzelner Hopfenbaubetrieb liegt in Holsthum/ Eifel.

Der deutsche Anbau entspricht circa 37,6% der Weltanbaufläche der Weltanbaufläche. Damit ist Deutschland weltweit die größte Hopfenanbaunation. Weitere Länder mit einer bedeutenden Hopfenerzeugung sind die USA (24,8 %) in den Bundesstaaten Idaho, Oregon und Washington, daneben China (9,2 %) und Tschechien (9,6 %) in den Gebieten Saaz, Auscha, Dauba und Trschitz. Bezogen auf die geerntete Hopfenmenge zeigt sich folgendes Bild: Im Jahr 2011 betrug die Welternte 100604 Tonnen. Davon entfielen auf Europa 52,8 %, auf Amerika 29,2 %, auf China 13,2 %, auf Australien / Ozeanien 1,8 %. Die Hopfenanbaugelände in Deutschland, welche überwiegend von klein- und mittelständischen Betrieben bewirtschaftet werden, haben an der Welternte einen Anteil von 37,9 %. Das entspricht einer Erntemenge von 38110,6 Tonnen Hopfen (Barth, 2012).

Diese bedeutende Marktstellung wurde erreicht, obwohl die deutsche Hopfenwirtschaft in den vergangenen sechzig Jahren bereits mehrmals großen Krisen ausgesetzt war. Beispielsweise wurde in den Jahren 1945 bis 1947 ein Großteil der bayerischen Hopfenernte von der Militärregierung beschlagnahmt und ins Ausland verkauft. In den Folgejahren war der Hopfenanbau dann stark reglementiert. Die Größe der Anbauflächen war festgelegt. Außerhalb der streng festgelegten Gebiete durfte kein Hopfen angebaut werden. Darüber hinaus mussten in den Anbaugebieten lange Zeit Einheitssorten, zum Beispiel Hallertauer Mittelfrüh im Anbaugebiet Hallertau, angebaut werden. Neue Probleme ergaben sich durch immer öfter auftretende Fälle von Pilzerkrankungen, insbesondere durch *Verticillium ssp.* Ein Befall führte bei empfindlichen Sorten nicht selten zu einem kompletten Ernteausfall.

Bis heute kann diese Pilzerkrankung nicht chemisch bekämpft werden. Die deutsche Hopfenindustrie fand aber einen Ausweg aus dieser Krise der sechziger Jahre durch die Einführung des Mehrsortenanbaus und durch Züchtung Welke resistenter Sorten.

---

Die neuen Sorten, insbesondere die Sorte Northern Brewer, waren aufgrund ihres hohen Bitterstoffgehalts zugleich eine Antwort auf die stärker werdende Nachfrage nach Bitterhopfen durch die Brauindustrie und die wachsende Konkurrenz von Hopfenanbietern aus dem Ausland. Seit den siebziger Jahren gelang der Aufbau einer hopfenverarbeitenden Industrie in Deutschland. Zwei bedeutende Innovationen - die Hopfenextraktion und das Mahlen, Pressen und Verpacken von Hopfen unter definierten Bedingungen zu Pellets - führten die Hopfenwirtschaft zu neuer Blüte und sichern ihr bis heute die Weltmarktführerschaft. Aufgrund der weltweiten Marktentwicklung sind allerdings strukturelle Anpassungen innerhalb der Hopfenwirtschaft wieder unumgänglich geworden. Die oben erwähnten klein- und mittelständischen Betriebsstrukturen lösen sich zunehmend auf, sodass immer weniger Betriebe immer größere Flächen bewirtschaften. Der Hopfenverbrauch sinkt aufgrund ergiebigerer Sorten und gesteigerter Ausbeuten innerhalb des Brauprozesses. Darüber hinaus ist ein weltweiter Trend hin zu schwach gehopften Bieren zu beobachten.

Die Eigenschaft des Hopfens, Bier in Geschmack und Aroma zu beeinflussen, gewinnt in Zeiten harten Wettbewerbes in der Brauindustrie mehr denn je an Bedeutung und bietet auch für die Hopfenveredelungsindustrie neue Lösungsansätze. Die Hopfung eines Bieres war schon immer Bestandteil des Rezeptgeheimnisses eines Brauers. Der Hopfen wird daher bis heute nicht umsonst als die Seele des Bieres bezeichnet. Um bei der Wahl der Hopfensorte zu Brau- oder Veredelungszwecken eine begründete Entscheidung treffen zu können, ist es unerlässlich, die chemischen und sensorischen Charakteristika der verschiedenen Hopfensorten zu kennen.

## 1.1 Die Hopfenpflanze

### 1.1.1 Botanik, Anbau und Ernte

*Humulus lupulus* L. zählt innerhalb der botanischen Ordnung der Nesselgewächse (Urticales) zur Familie der Hanfgewächse (Cannabaceae). Die Gattung *Humulus* L. besteht aus den Arten *Humulus lupulus* L., dem in Südostasien heimischen und überwiegend als Zierpflanze genutzten *Humulus japonicus* Siebold & Zucc. (Japanischer Hopfen) und einer dritten Art – *Humulus yunnanensis* – die allerdings nur noch als Herbarmaterial existiert (Forwick et al., 2003).

Aufgrund der geographischen Verbreitung werden bei *Humulus lupulus* fünf Varietäten unterschieden:

- *Humulus lupulus* L. var. *Cordifolius* (MIQ.) MAXIM. In FRANCH. Et SAV. in Ostasien,
- *Humulus lupulus* L. var. *Lupuloides* E. Small im östlichen Nordamerika,
- *Humulus lupulus* L. var. *Lupulus* in Europa,
- *Humulus lupulus* L. var. *Neomexicanicus* A. Nelson et Cockerell im Westen Nordamerikas und
- *Humulus lupulus* L. var. *Pubescens* E. Small im amerikanischen Mittelwesten (United States Department of Agriculture, NRCS Plants Database, 2011).

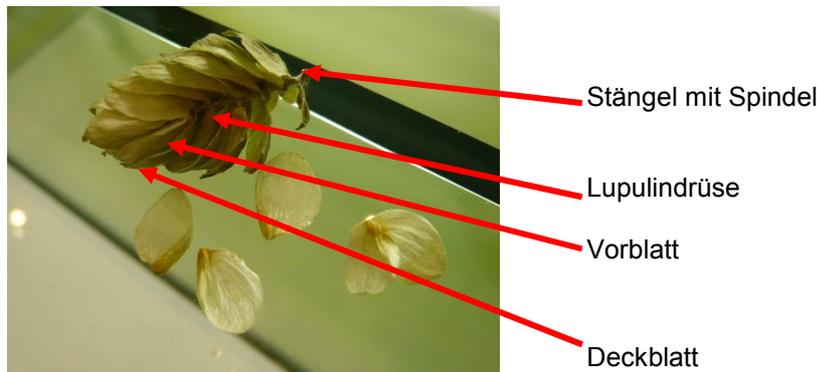
*Humulus lupulus* ist eine weit verbreitete Art. Sein Vorkommen liegt zirkumpolar zwischen dem 35. und 70. Breitengrad. Ursprünglich war die Verbreitung des Hopfens im südeuropäischen bis westasiatischen Raum nachweisbar (Forwick, 2002). Infolge der weltweiten Nutzung erfolgte - geeignete Standortbedingungen vorausgesetzt - eine weltweite Ausbreitung. Das für Hopfen ideale Klima liegt zwischen den für Wein- und Weizenanbau geeigneten Bedingungen. Sehr gute Erträge ergeben sich in Jahren mit feuchten Sommern mit nicht zu hohen Temperaturen und normaler Sonnenscheindauer. Hopfen gedeiht am besten auf Böden, die bis zu zwei Metern wurzeldurchlässig sind und keine Staunässe aufweisen (Schiller, 2002).

Hopfen bevorzugt feuchte Standorte mit guter Nährstoffversorgung. Er ist häufig in Auwäldern oder an Auwaldrändern sowie an Gebüschsäumen in Auenlandschaften zu finden. *Humulus lupulus* gehört zu den Windestauden. Er wird beim kommerziellen Hopfenanbau aus Fehsern (Setzlingen) der weiblichen Pflanzen bevorzugt auf sandig - lehmigen, tiefgründigen Böden gezogen. Eine Anzucht aus dem Samen ist

nur für Züchtungszwecke interessant, da aus den Samen sowohl männliche als auch weibliche Pflanzen mit abweichenden Eigenschaften entstehen können (Forwick et. al., 2003). Die oberirdischen Sprossen sterben jährlich im Herbst ab, während das unterirdische Wurzelwerk den Winter überdauert und bis zu 50 Jahre alt werden kann. Hopfen ist eine ausdauernde Pflanze, die etwa 20 Jahre voll ertragfähig bleiben kann. Im Frühjahr wachsen je nach Standort des Hopfengartens und je nach Ernährungszustand der Pflanze ungefähr 30 Neutriebe nach (Wachstum pro Tag 10 – 30 cm). Nur zwei bis drei dieser Triebe werden am Gerüst angeleitet, die restlichen Triebe werden bis auf ein oder zwei Reservetriebe abgeschnitten. Mit Hilfe von Widerhaken schlängelt sich der Stängel bei Berührung mit einer Stütze um diese im Uhrzeigersinn herum (Draufsicht) und wächst so an ihr empor. Hat der Hopfen eine gewisse Höhe erreicht, meist die Hälfte der maximalen Höhe, bildet die Pflanze Seitenäste aus. Die Haupttriebe des Wildhopfens können eine Höhe von drei bis sechs Metern erreichen. Kulturhopfen, der meist an Weitspanndrahtgerüsten wächst, erreicht eine Höhe von etwa zwölf Metern (Narziss und Back, 2009). Die Blätter sind gegenständig angeordnet und weisen je nach Lichteinfluss und Blattalter mehr oder weniger grob gezähnte Blattränder auf. Die Blattoberfläche ist rau und borstig behaart. Ausgewachsene Blätter weisen eine meist drei- oder fünf- oder siebenlappige Blattspreite auf. Die Blätter der blühenden Triebe sind meist herzförmig, ungeteilt. Gleiches gilt für die überdurchschnittlich großen Schattenblätter (Forwick et.al., 2003). Die 15- bis 30-tägige Blütezeit setzt Ende Juni bis Anfang Juli ein. Zu dieser Zeit erreicht der Hopfen die Gerüsthöhe. Der Hopfen ist eine zweihäusige Pflanze. Die männlichen Blüten sind unscheinbar klein. Sie wachsen in lockeren Rispen und setzen während der Blütezeit Pollen frei. Die weiblichen Blütenstände blühen im selben Zeitraum und werden nach dem Prinzip der Windbestäubung befruchtet (Forwick, 2002). Beim Kulturhopfen wird eine Bestäubung der weiblichen Hopfenblüten aus qualitativen Gründen aktiv vermieden. Im weiten Umkreis der Hopfengärten müssen daher alle männlichen Pflanzen entfernt werden. Eine Befruchtung der weiblichen Blüten findet nur zu Züchtungszwecken außerhalb der eigentlichen Hopfengärten statt.

Weibliche Blüten wachsen im Verlauf der Blütezeit zu den Hopfenzapfen heran, (von Züchtern und Pflanzern meist auch Dolden genannt). Es dauert drei bis sechs Wochen, bis die Blüten zu Dolden herangereift sind, sodass Mitte bis Ende August mit der Ernte begonnen werden kann. In den Deck- und Vorblättern der Dolden befinden

sich die Lupulindrüsen. Mit Erreichen der Pflückreife ist das gebildete Lupulin kräftig goldgelb gefärbt und die Dolden haben sich geschlossen. Die beiden Deckblätter der Doldenbasis sind zu diesem Zeitpunkt leicht violett gefärbt (Narziss und Back, 2009).

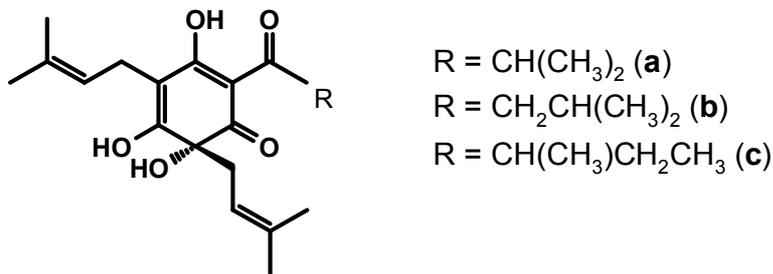


**Bild 1:** Anatomie einer Hopfendolde (Quelle: Wilhelm 2008)

Insbesondere während der Blütezeit ist zur Erzeugung von gesunden, den Qualitätsanforderungen entsprechenden Pflanzen, der gezielte Einsatz von Pflanzenschutzmitteln notwendig, da Hopfenplantagen regelmäßig von Krankheiten und Schädlingen bedroht werden. Für den Einsatz bestehen streng kontrollierte Vorschriften. Insbesondere muss eine genau definierte Wartezeit zwischen dem letzten Einsatz von Pflanzenschutzmitteln und der Ernte eingehalten werden. Vor einer Neuzulassung werden die Spritzmittel in Freiland-Kulturversuchen zunächst getestet und der Rückstand im Ernteprodukt gemessen. Die Zulassungs-Höchstmengen werden für jede dieser Chemikalien nach sehr strengen Richtlinien ermittelt. An der endgültigen Zulassung sind eine Reihe von Behörden und Institutionen beteiligt. Ist ein Pflanzenschutzmittel erst einmal zugelassen, werden die im Produkt Hopfen enthaltenen Rückstände laufend von verschiedenen Institutionen durch ein umfangreiches Monitoring überwacht. Für die Kontrolle der Untersuchungen und die amtliche Festsetzung der Höchstmenge ist in Deutschland das Bundesinstitut für Risikobewertung zuständig. Gesetzliche Grundlagen sind EU-einheitliche Richtlinien. Mittlerweile werden ca. 30 % der Gesamternte in Deutschland einer effektiven Kontrolle unterzogen. Dieser Umfang an Kontrollen wird soweit bekannt bei keinem anderen Lebensmittel erreicht. Mögliche Rückstände von Pflanzenschutzmitteln im Hopfen werden in Fachkreisen sehr intensiv diskutiert. Wenn überhaupt Pflanzenschutzmittelrückstände im Hopfen gefunden werden, dann deutlich unter der amtlich festgesetzten Rückstandshöchstmenge. Gemäß Untersuchungen des Hopfenforschungszentrums Hüll lassen sich bei der Mehrzahl der heute eingesetzten Pflanzenschutzmittel später im Hopfen labortechnisch keinerlei Rückstände mehr nachweisen (Kiesbye, 2003).

### 1.1.2 Verwendung

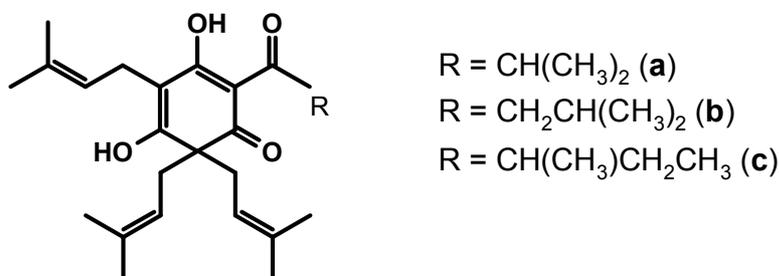
Die wichtigste kommerzielle Nutzung des Hopfens besteht in der Verwendung der weiblichen Blütenstände zu Brauzwecken, insbesondere als Aroma- und Bitterstofflieferanten des Bieres. Die in Drüsen an Deck- und Vorblättern befindlichen Harze setzen sich vorwiegend aus Bitterharzen zusammen, welche dem Bier einen bitteren Geschmack verleihen können. Die Bitterharze werden in  $\alpha$ -Säuren und  $\beta$ -Säuren unterteilt (siehe Abb. 1 und 2):



**Abb. 1:** Struktur von  $\alpha$ -Säuren als Cohumulon (a), Humulon (b), Adhumulon (c); (Intelmann et al., 2011)

Jüngste Untersuchungen mittels LC-MS/MS bestätigen erstmals quantitativ, dass Bitterharze durch Brauprozess und Alterung starken Veränderungen unterworfen sind. Anhand einer umfassenden sensorischen Analyse konnten sowohl ihre Struktur und deren Abbauprodukte als auch deren Beitrag zur Bierbittere aufgezeigt werden (Intelmann et al., 2011):

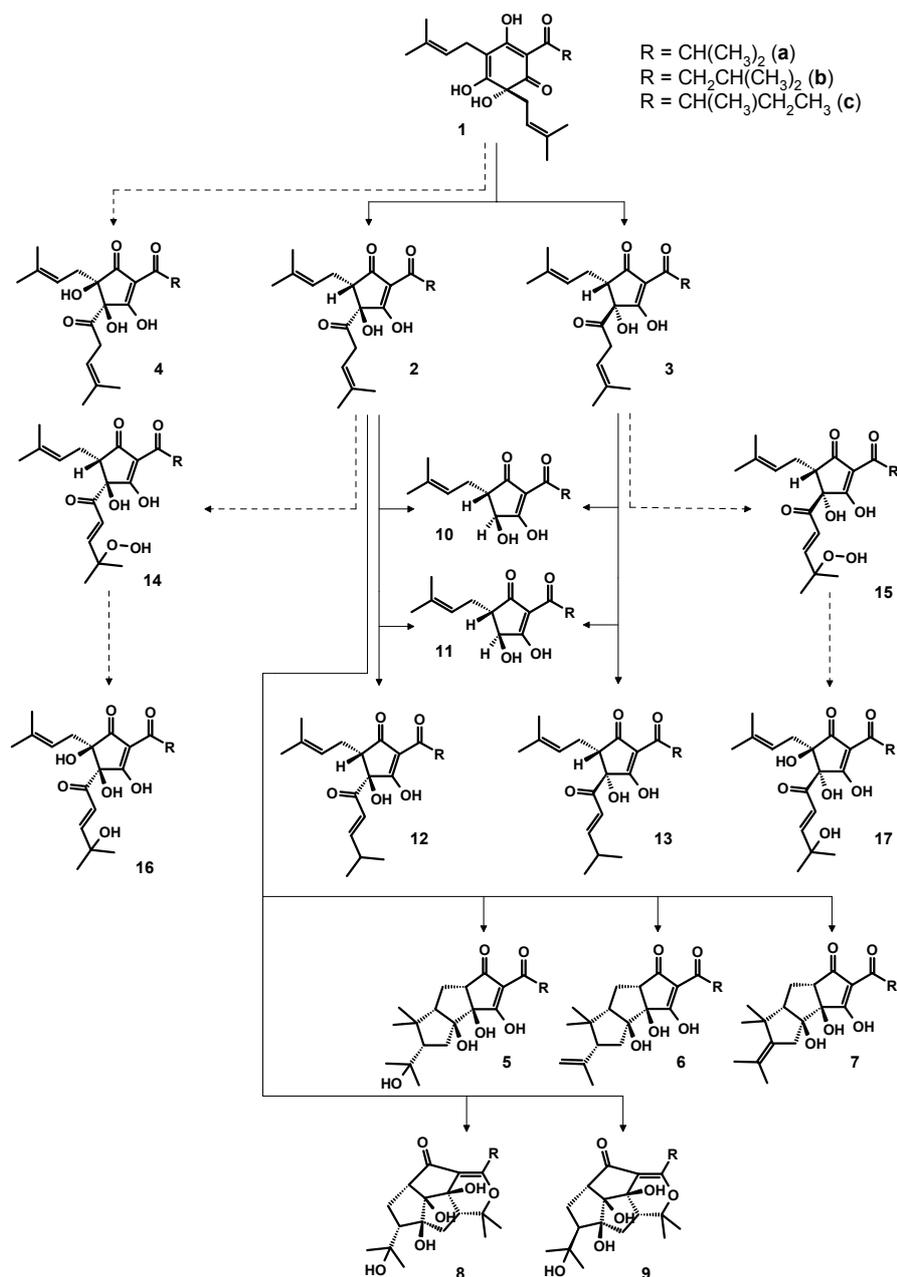
Die  $\beta$ -Säuren und ihre Abbauprodukte liefern demnach keinen erwähnenswerten Beitrag zur Bierbittere.



**Abb. 2:** Struktur von  $\beta$ -Säuren als Colupulon (a), Lupulon (b), Adlupulon (c); (Intelmann et al., 2011)

---

Die Bierbittere entwickelt sich im Wesentlichen aus den  $\alpha$ -Säuren. Diese bestehen zu 98 % aus den kongeneren Cohumulon (a), Humulon (b) und Adhumulon (c). In das fertige Bier lassen sie sich unverändert nur in sehr geringen Mengen überführen. Intelmann fand im Bier lediglich Konzentrationen von 1,12  $\mu\text{mol/L}$ . 70% der ursprünglich zur Würze gegebenen  $\alpha$ -Säuren erfahren eine Isomerisierung zu trans- und cis-Iso- $\alpha$ -Säuren (102  $\mu\text{mol/L}$ ). Diese und andere wichtige Abbauprodukte der ursprünglichen  $\alpha$ -Säuren sind in Abb. 3 dargestellt. Intelmann et al. 2011 konnte weiter nachweisen, dass sich die für die Bierbittere wichtigen trans-Iso- $\alpha$ -Säuren bereits während einer Lagerung von acht Monaten überaus stark abbauen – und zwar von 27  $\mu\text{mol/l}$  auf 1,7  $\mu\text{mol/L}$ . Der Abbau verläuft umso schneller, je wärmer die Lagerbedingungen und je tiefer der pH-Wert des Bieres sind. Im Gegenzug erfahren die stabilen Hauptabbauprodukte (5)-(11) der trans-Iso- $\alpha$ -Säuren (2a) eine Zunahme von 7,9  $\mu\text{mol/L}$  auf 29,3  $\mu\text{mol/L}$ . Das gelagerte Bier wird dadurch nachweislich nachhängend und herb im Geschmack.



**Abb. 3:** Struktur der α-Säuren Cohumulon (1a), Humulon (1b), Adhumulon (1c) und der entsprechenden Umwandlungsprodukte trans-Isocohumulon (2a), trans-Isohumulon (2b), trans-Isoadhumulon (2c), cis-Isocohumulon (3a), cis-Isohumulon (3b), cis-Isoadhumulon (3c), Cohumulonin (4a), Humulonin (4b), Adhumulonin (4c), Tricyclocohumol (5a), Tricyclohumol (5b), Tricycloadhumol (5c), Tricyclocohumen (6a), Tricyclohumen (6b), Tricycloadhumen (6c), Isotricyclocohumen (7a), Isotricyclohumen (7b), Isotricycloadhumen (7c), Tetracyclocohumol (8a), Tetracyclohumol (8b), Tetracycloadhumol (8c), Epitetricyclocohumol (9a), Epitetricyclohumol (9b), Epitetricycloadhumol (9c), Transcohumulinsäure (10a), Transhumulinsäure (10b), Transadhumulinsäure (10c), cis-Cohumulinsäure (11a), cis-Humulinsäure (11b), cis-

Adhumulinsäure (11c), trans-Alloisocohumulone (12a), trans-Alloisohumulone (12b), trans-Alloisoadhumulon (12c), cis-Alloisocohumulon (13a), cis-Alloisohumulon (13b), cis-Alloisoadhumulon (13c), Hydroperoxy-trans-alloisocohumulon (14a), Hydroperoxy-transalloisohumulon (14b), Hydroperoxy-trans-Alloisoadhumulon (14c), Hydroperoxy-cis-alloisocohumulon (15a), Hydroperoxy-cis-Alloisohumulon (15b), Hydroperoxy-cis-Alloisoadhumulon (15c), Hydroxy-trans-Alloisocohumulon (16a), Hydroxy-trans-Alloisohumulon (16b), Hydroxy-trans-alloisoadhumulon (16c), Hydroxy-cis-Alloisocohumulon (17a), Hydroxy-cis-Alloisohumulon (17b), und Hydroxy-cis-Alloisoadhumulone (17c); (Intelmann et al., 2011)

Bitterstoffe besitzen aber auch antiseptische und konservierende Eigenschaften. In der Pflanzenheilkunde wird Hopfen vor allem als Schlaf- und Beruhigungsmittel eingesetzt. Ihm wird eine beruhigende und mild-hypnotische Wirkung zugesprochen, wobei allerdings nicht genau bekannt ist, welche Verbindungen aus den bis heute bekannten 100 Bitterstoffen, 300 flüchtigen Verbindungen und 100 Polyphenolen die sedierende Wirkung des Hopfens hervorrufen (Schiller, 2002).

Hopfen findet daneben auch als Delikatesse Verwendung. Die jungen Sprossspitzen kommen als Hopfenspargel auf den Markt (Forwick et al., 2003).

### 1.1.3 Sorten

Aufgrund der oben dargestellten Bedeutung der  $\alpha$ -Säuren für den Bittergeschmack der Biere berechnet sich der Marktwert des Hopfens auf dem Weltmarkt bis heute entsprechend seinem  $\alpha$ -Säuregehalt. Die Analyse des  $\alpha$ -Säuregehalts als Summe aus Cohumulon (a), Humulon (b) und Adhumulon (c) erfolgt dabei nach standardisiertem Verfahren gemäß Analysevorschriften der European Brewery Convention EBC 7.7 und EBC 7.8 mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC). Dementsprechend gestaltet sich die Sorteneinteilung: Grundlage der Einteilung ist eine chemische und sensorische Beurteilung der Sorten durch unabhängige Laboratorien anhand von Sudversuchen mit sortenreinen Hopfenproben, anschließender Bier-Analytik und sensorischer Beurteilung nach Geruch, Trunk und Bittere. Je nach erreichter Punktzahl werden die Sorten in drei Gruppen eingeteilt:

- **Hochfeine Aromasorten:** Hopfen dieser Gruppe gehören dem Saazer Formenkreis an und erreichen über 26 Aromapunkte.
- **Feine Aromasorten:** Hopfen dieser Gruppe werden mit 24 bis 26 Aromapunkten beurteilt.
- **Bitterhopfen / Hoch- $\alpha$ -sorten:** Hopfen dieser Gruppe weisen einen  $\alpha$ -Säuregehalt von mindestens 8-12 % auf.

Genetische Kriterien haben in der Praxis nur für Züchtungszwecke eine Bedeutung.

### Hallertauer Smaragd

Smaragd ist eine Neuzüchtung des Hopfenforschungszentrums in Hüll (Zuchtstamm 87/24/55) aus der Sorte Hallertauer Gold und dem männlichen Wildhopfen Ku II/18. Die Zulassung erfolgte im Jahr 2005. Ihm werden sehr gute Aromaeigenschaften zugeschrieben, die sich von den aktuell verfügbaren Sorten unterscheiden sollen. Smaragd wird eine ausgeprägt blumige Aromanote nachgesagt. Mit Smaragd gebraute Biere werden als fruchtig, hopfenwürzig, blumig beschrieben (CMA Sortenmappe, 2005). Die Sorte zeichnet sich darüber hinaus durch angenehm harmonische Bittereigenschaften aus. Der durchschnittliche  $\alpha$ -Säuregehalt dieser Hopfensorte liegt zwischen 4,0 und 6,0 %, der  $\beta$ -Säuregehalt beträgt ca. 3,5 - 5,5 %. Das Verhältnis von  $\alpha$ -Säure zu  $\beta$ -Säure liegt zwischen 0,7 und 1,7 (Barth, 2006).

### Hallertauer Perle

Perle ist eine Aromazuchtsorte des Hopfenforschungszentrums Hüll. Sie wurde 1978 aus dem Northern Brewer gezüchtet und erlangte in den neunziger Jahren große Anbaubedeutung (CMA Sortenmappe 2005). Die Sorte Perle wird von Hopfenpflanzern wegen ihrer Toleranz gegenüber vielen Krankheiten und aufgrund der hohen Erträge sehr geschätzt. Aufgrund der engen Verwandtschaft zu den Bitterhopfen ist die Sorte Perle ein unauffälliger Aromahopfen mit ausgeglichenem Aromaprofil. Sie weist ein hopfentypisches Aroma auf und verbindet gute Aromaeigenschaften mit guten Bittereigenschaften. Mit Perle gebraute Biere tendieren zu einer sowohl hopfenwürzigen als auch fruchtig-blumigen, dezenten Geruchsnote. Die Bittere der Biere ist

harmonisch aber nicht zu intensiv (CMA Sortenmappe 2005). Der  $\alpha$ -Säuregehalt liegt bei 4,0 – 9,0 % und ist damit höher als bei den anderen untersuchten Sorten. Der  $\beta$ -Säuregehalt beträgt durchschnittlich 2,5 - 4,5 %. Insgesamt ergibt sich damit ein  $\alpha$ -Säure –  $\beta$ -Säureverhältnis von 0,9 - 3,6 (Barth, 2006).

### **Hersbrucker Spät**

Hersbrucker Spät gehört zu den traditionellen Landsorten in Deutschland. Der Sorte werden sehr gute Aromaeigenschaften nachgesagt. Biere mit Hersbrucker Spät Hopfung sind vergleichsweise etwas stärker fruchtig, hopfenwürzig und blumig. Beim Hopfen selbst sind Citrusnoten vergleichsweise schwächer ausgeprägt (CMA-Sortenmappe, 2005). Neben dem hopfentypischen Aroma soll eine leicht heuartige Geruchsnote typisch für diesen Hopfen sein. Der Hopfen zeigt harmonische Bittereigenschaften von mittlerer Intensität. Die  $\alpha$ -Säuregehalte betragen durchschnittlich 1,5 - 4,0 %, die  $\beta$ -Säuren 2,5 - 6,0 % und das  $\alpha$ -Säure-  $\beta$ -Säureverhältnis beträgt 0,3 – 1,6 % (Barth, 2006).

### **Slowenischer Golding**

Die Sorte Slowenischer Golding wurde 1861 ursprünglich unter dem Namen Fuggle aus einer englischen Natursorte gezüchtet. Heute wird Fuggle vor allem als Slowenischer Golding in Slowenien angebaut, aber auch in Österreich, Belgien, den USA, Kanada und in Australien (Tasmanien). Die Namensgebung beruht auf einer Verwechslung in den 30er Jahren, als die damals jugoslawische Hopfenindustrie einen Großteil ihrer Hopfenbestände wegen einer *Verticillium*-Welke verlor und deshalb in England nach neuem Pflanzenmaterial suchte. Dabei wurde die Sorte Englischer Golding mit der Sorte Fuggle verwechselt und folglich irrtümlich nach einer Hopfenanbauregion an der Österreichisch / Jugoslawischen Grenze als Steyrer Golding umbenannt. Für diesen Hopfen soll eine besonders auffallend, blumige Note typisch sein. Biere, die mit Slowenischem Golding gehopft worden sind, zeichnen sich durch eine intensiv blumige Geruchsnote aus. Der durchschnittliche  $\alpha$ -Säuregehalt beträgt bei dieser Sorte 4,5 – 6,0 %, der  $\beta$ -Säuregehalt liegt im Bereich von 2,5 - 3,5 % und das  $\alpha$ -Säure –  $\beta$ -Säureverhältnis ergibt durchschnittlich eine Ratio von 1,4 - 2,4 (Barth, 2006).

## Yacima Cascade

Yacima Cascade ist die erste kommerziell angebaute US-amerikanische Aromasorte und entstammt dem Zuchtprogramm der U.S.D.A. in Oregon aus dem Jahr 1956. Yacima Cascade entstand aus zwei Kreuzungen der englischen Sorte Fuggle, zunächst mit dem russischstämmigen Hopfen Serebrianka, dann mit dem männlichen Ableger dieser Kreuzung (Lemmens, 2005). Yacima Cascade wird seit 1972 als U.S. Aromahopfen kommerziell angebaut und erreichte 1975 einen Anteil von 13,3 % an der gesamten Hopfenerntemenge der USA. Dieser Anteil sank dann wieder auf aktuell 4,7 % im Erntejahr 2006 (Barth, 2006). Cascade wird bevorzugt im Ausland für stark gehopfte Biere verwendet, die eine betont citrusartige Note aufweisen sollen, wie zum Beispiel American-Style Ales. Cascade ist bekannt für sein blumig-fruchtiges Aroma, das in der Literatur als grapefruitartig (Lam et al., 1986) und rosenartig (Lemmens, 2005) beschrieben wurde. Der  $\alpha$ -Säuregehalt beträgt bei dieser Sorte 4,5 - 7,0 %, der  $\beta$ -Säuregehalt 4,8 - 7,0 %. Das Verhältnis von  $\alpha$ -Säure zu  $\beta$ -Säure beträgt durchschnittlich 0,9 - 1,0 (Barth, 2006).

### 1.1.4 Chemische Zusammensetzung

Hopfen weist durchschnittlich folgende Zusammensetzung auf:

**Tabelle 1:** Zusammensetzung getrockneter Hopfendolden (Narziss und Back, 2009)

Zusammensetzung	%
Wassergehalt:	10 - 11
Gesamtharze:	10 - 25
Hopfenöle:	0,4 - 2,0
Lipide und Wachse:	3 - -
Eiweiß	12 - 22
Polyphenole	4 - 14
Kohlenhydrate	2 - 44
Mineralstoffe	7 - 10
Cellulose	10 - 17

Die angegebenen Werte weichen je nach Hopfensorte, Anbaugebiet, Erntezeitpunkt, Trocknung und Lagerung des Hopfens mehr oder weniger stark ab (Narziss und Back, 2009).

Ein Wassergehalt von 10 – 11 % ist für eine gute Lagerfähigkeit des Hopfens wichtig. Die Gesamtharze sind in einer Menge von 10 – 25 % in den Lupulin Drüsen enthalten. Sie sind extrahierbar mit Äther und löslich in kaltem Methanol und bestehen aus einer Vielzahl von Produkten. Die weitere Fraktionierung mittels Hexan-Extraktion umfasst die Gesamtweichharze. Der unlösliche Rückstand sind die Hartharze. Durch Fällung als Bleisalz in Methanol werden die  $\alpha$ -Säuren (Humulone) erhalten. Der Rest sind  $\beta$ -Säuren (Lupulone) und unspezifische Weichharze.

Die Hopfenöle befinden sich zum überwiegenden Teil in den Lupulin Drüsen. Sie werden unterteilt in 75 % Terpenkohlenwasserstoffe und 25 % Oxyverbindungen. Derzeit sind etwa dreihundert dieser Verbindungen bekannt. Die Menge und Zusammensetzung der Hopfenöle ist von der Hopfensorte abhängig und genetisch bestimmt. Ihre Menge ist auch abhängig von den Anbaugegebenheiten, dem Klima, dem Reifezustand und der Behandlung des Hopfens (Narziss und Back, 2009).

Hopfenterpenoide werden als Indikator für die Aromacharakterisierung eines Bieres und auch zur Hopfensortenidentifizierung herangezogen.  $\beta$ -Myrcen,  $\alpha$ -Humulen,  $\beta$ -Caryophyllen,  $\beta$ -Farnesen und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Selinen gehören zu den Hauptbestandteilen des Hopfenöls. Das Verhältnis dieser Terpenoide wird zur Klassifizierung der Hopfensorten verwendet (Takoi et al.; 2010, Narziss und Back, 2009).

3 - 6 % der Hopfentrockenmasse entfällt auf die Gruppe der Polyphenole, die in monomere und polymere Polyphenole unterteilt werden. Innerhalb der monomeren Polyphenole werden die phenolischen Carbonsäuren (Benzoessäure-Derivate und Zimtsäurederivate) und die heterocyclischen Polyphenole (Flavonoide wie Catechin, Quercetin, Kämpferol und Xanthohumol) unterschieden. Innerhalb der polymeren Polyphenole wird zwischen niedermolekularen Polyphenolen (Procyanidine) und höhermolekularen Polyphenolen (Catechingerbstoffe und Tannine) unterschieden (Kammhuber, 2005).

Den Hopfenpolyphenolen werden antioxidative Eigenschaften zugeschrieben. Sie sind als natürliche Radikalfänger bekannt. Die Fähigkeit zur Eiweißfällung, einer Reaktion zwischen Gerbstoffen und Eiweiß, wird auf die reduzierenden Eigenschaften der Polyphenole zurückgeführt (Narziss und Back, 2009).

Den Polyphenolen wird allgemein eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen. So konnte nachgewiesen werden, dass der Konsum von Rotwein und Tee, die beide hohe Konzentrationen von Polyphenolen aufweisen, die Inzidenz von Herz- Kreis-

lauferkrankungen senkt. Für Xanthohumol und Iso-Xanthohumol aus dem Hopfen werden ähnliche positive Wirkungen vermutet (Moir, 2000).

Der Eiweißgehalt von Hopfen beträgt im Mittel 18 %, wovon etwa die Hälfte in Würze löslich ist. Daneben enthält Hopfen 10 – 17 % Cellulose, der keine technologische Bedeutung zukommt. Der Gehalt an Hopfenwachsen und Lipiden liegt bei 3 % des Hopfenöls. Im Hopfen lassen sich mittelkettige und höhere freie Fettsäuren nachweisen. Fettsäuren können negative Auswirkungen auf die Aromastabilität des Bieres haben (Narziss und Back, 2009). Frischer Hopfen enthält zwischen 0,8 – 3 % freie Fettsäuren (Narziss und Back, 2009). Mit zunehmender Lagerzeit steigt der Anteil der freien Fettsäuren bei ungünstigen Lagerbedingungen auf bis zu 20 % an (Narziss und Back, 2009). Die Fettsäuren entstehen als Abbauprodukte von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren (Williams und Wagner, 1979), darunter 2-Methyl-propionsäure und 3-Methyl-buttersäure, die für ihr käsiges Aromas bekannt sind (Peacock, 1998).

### **1.1.5 Hopfenölzusammensetzung in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern**

Die chemische Zusammensetzung der Öle in Hopfen ist von folgenden Parametern abhängig:

#### **Hopfensorte**

Die chemische Zusammensetzung der Öle in der Hopfendolde ist von Hopfensorte zu Hopfensorte unterschiedlich und scheint ein Charakteristikum der jeweiligen Sorte zu sein. Dies konnte schon früh in der Geschichte der Hopfenaromastoffforschung nachgewiesen werden (Naya 1971; Likens und Nickerson, 1967; Buttery und Ling, 1967). Diese essentiellen Hopfenöle bestehen zu ca. 90 % aus Terpenen und Sesquiterpenen. Während der Gesamtölgehalt in der Hopfendolde von Jahr zu Jahr schwanken kann, bleibt die Zusammensetzung der Öle konstant und wird als Charakteristikum einer Sorte angesehen (Peacock und Deinzer, 1981a).

#### **Verarbeitung**

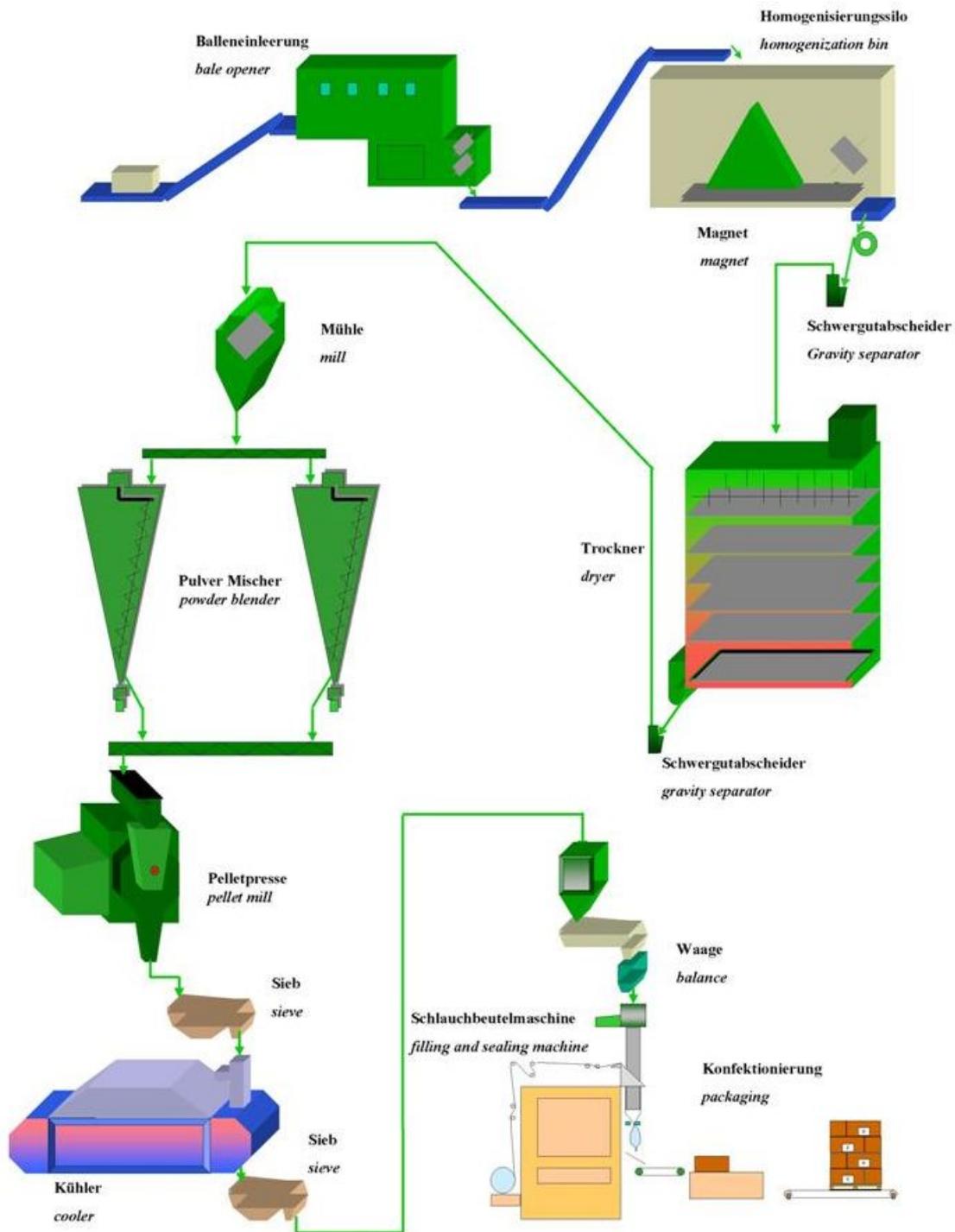
Rohhopfen wird sehr oft auch gemahlen und gepresst als Pellets gehandelt. Dies reduziert die Transport- und Lagerhaltungskosten und macht das Produkt aufgrund der

Rieselfähigkeit einer automatischen Dosierung zugänglich. Pellets sind homogener und in der Anwendung ergiebiger als Rohhopfen. Sauerstoffundurchlässig und lichtdicht verpackt sind sie gekühlt gut lagerfähig. Es wird in angereicherte Pellets (Typ 45) und nicht angereicherte Pellets (Typ 90) unterschieden (Hopfenpflanzerverband Tettngang e.V., 2011).

Abbildung 4 zeigt die Herstellung von Pellets (Typ 90). Der Doldenhopfen wird homogenisiert, getrocknet, von Fremdstoffen, wie zum Beispiel Sand, Steinen und Metall befreit und vermahlen. In Pulvermischer wird das Hopfenpulver gemischt und dann der gekühlten Pelletpresse zugeführt. Die gekühlten Pellets gelangen dann über ein Zwischenlager zur Abfüllung und Verpackung. Im Gegensatz zu den Pellets (Typ 90), die den Hopfen in seiner ursprünglichen Zusammensetzung enthalten, handelt es sich bei den Pellets (Typ 45) um standardisierte Produkte die in ihrer Zusammensetzung durch Aussieben von Blatt- und Stengelanteilen auf einen bestimmten Lupulingehalt eingestellt werden. Zum Typ 90 ergeben sich folgende Verarbeitungsunterschiede:

Der Hopfen wird in tiefgekühltem Zustand vermahlen und dabei in die zwei Fraktionen Lupulin und Treber (Doldenblätter, Stengel, Stiele) aufgetrennt. Danach erfolgt die Standardisierung des gewünschten Lupulingehalts im Endprodukt durch kontrolliertes Zusammenführen der Lupulinfraktion mit der Treberfraktion. 100 Kilogramm Rohhopfen ergeben circa 90 kg Pellets (Typ 90) oder 45 kg Pellets (Typ 45). Die Typenbezeichnung gibt den Anteil der Ausbeute an der ursprünglichen Rohhopfenmenge an (Hopfenveredelung St. Johann GmbH & Co. KG., 2011).

Pellets (Typ 90) entsprechen in ihrer Zusammensetzung dem eingesetzten Doldenhopfen. Während der Verarbeitung von frischen Hopfendolden zu Pellets Typ 90 wurden kaum nennenswerte Verarbeitungseinflüsse auf die Ausprägung der Hopfenöle gefunden. Lediglich bei leicht flüchtigen Komponenten Myrcen, 2-Methylbutylisobutyrat und  $\beta$ -Octimen traten teilweise Verluste auf (Freundorfer et al., 1991). Einschränkend muss gesagt werden, dass inzwischen viele flüchtige Verbindungen als Aromastoffe identifiziert wurden, die damals noch nicht als wichtige Hopfenaromastoffe bekannt waren.



**Abb. 4:** Industrielle Herstellung von Hopfenpellets (Typ 90) aus Doldenhopfen (Hopfenveredelung St. Johann GmbH & Co. KG. 2011)

---

Über den Einfluss der Hopfentrocknung auf die Aromastoffe findet sich in der Literatur folgender Hinweis: Nach einer Erhöhung der Trocknungstemperatur wurde eine Reduzierung des Myrcengehalts und des Linaloolgehalts beobachtet (Kaltner, 2000). Interessanter Weise stieg der Gehalt von Linalool bei einer Trocknungstemperatur von 70° C wieder etwas an.

### **Standort**

Ein Einfluss der Bodengüte auf die Hopfenöle kann nach Freundorfer ausgeschlossen werden, da ein und dieselbe Hopfensorte an verschiedenen Standorten gleiche Verhältnisse in der Hopfenölzusammensetzung aufweist (Freundorfer et al., 1991). Kaltner, der mit Hopfen aus unterschiedlichen Anbaugebieten Bier braute, fand hingegen deutliche Unterschiede bezüglich der Linaloolkonzentration in Abhängigkeit vom Anbaugebiet (Kaltner et al.; 2001).

### **Reifestadium und Ernte**

Für leichtflüchtige Komponenten wie Myrcen konnte wiederholt ein Einfluss des Reifestadiums auf den Myrcengehalt nachgewiesen werden. Myrcen scheint dabei mit zunehmendem Reifegrad überproportional zuzunehmen. Bei schwerflüchtigen Hopfenölkomponenten bleibt das Verhältnis über die verschiedenen Erntetermine verhältnismäßig stabil (Freundorfer et al., 1991).

### **Jahrgang**

Nach Likens und Nickerson (1964) kann der Gesamtölgehalt in der Hopfendolde von Jahr zu Jahr schwanken, die Zusammensetzung der Hopfenöle bleibt jedoch konstant (Likens und Nickerson, 1964). Freundorfer vermutete in seinen Untersuchungen einen lediglich geringen Einfluss des Jahrgangs auf die Konzentration der flüchtigen Verbindungen des Hopfens (Freundorfer et al., 1991). An anderer Stelle wird berichtet, dass Hopfenaromastoffe als Teil der flüchtigen Verbindungen des Hopfens in ihrer Konzentration sehr wohl jahrgangsabhängigen Schwankungen unterworfen sind (Steinhaus 2000).

### 1.1.5 Flüchtige Verbindungen im Hopfen

Hopfen gehört zu den Pflanzen, deren flüchtige Verbindungen wissenschaftlich sehr intensiv untersucht wurden. Dabei lassen sich grundsätzlich drei Forschungsrichtungen erkennen: Einmal die Erforschung von Hopfenaromastoffen im Hopfenzapfen, dann die Analyse der Hopfenaromastoffe in Bier, das unter Hopfenzugabe gebraut wurde, und schließlich Untersuchungen über chemische Veränderungen und mögliche Neubildung von Hopfenaromastoffen aus Vorstufen während des Brauprozesses.

In der Anfangszeit der Lebensmittelaromaforschung, in der die Funktionsmechanismen der menschlichen Nase noch weitgehend unerforscht waren, wurden die Begriffe Aromastoff und flüchtige Verbindung nicht durchgängig klar voneinander unterschieden. Die Erkenntnis, dass nicht alle flüchtigen Verbindungen eines Lebensmittels zu dessen Aroma beitragen, setzte sich auch in der Hopfenforschung erst schrittweise durch.

Insgesamt konnten bisher 300 flüchtige Verbindungen in Hopfen identifiziert werden. Die ersten Untersuchungen zu flüchtigen Verbindungen im Hopfen erfolgten 1819 durch Hanin, der mittels Dampfdestillation Hopfenöle isolierte (Hanin, 1819). Bereits 1895 wurden von Chapman durch fraktionierte Wasserdampfdestillation von kommerziell gewonnenen Hopfenölen der Firma Schimmel, Leipzig, je eine an den Geruch von Geranien erinnernde sowie eine humulenhaltige Hopfenölfraktion gewonnen (Chapmann, 1895).

Die ersten systematischen Untersuchungen zu flüchtigen Verbindungen verschiedener Hopfensorten wurden von Guadagni (1966) durchgeführt. Er trennte das mittels Wasserdampfdestillation gewonnene Destillat über Kieselgel gefüllte Chromatographiesäulen weiter auf und bestätigte die Bedeutung von Myrcen als wichtigen Bestandteil von Hopfenöl.

Mit Einzug der Gaschromatographie in die Hopfenaromastoffforschung wurde die Aromastoffforschung erheblich beschleunigt. So gelang es Buttery, zahlreiche Hopfeninhaltsstoffe in einem durch Wasserdampfdestillation gewonnenen Destillat mittels Kapillar-Gas-Flüssig-Chromatographie zu bestimmen sowie verschiedene Hopfensorten aufgrund der identifizierten Hopfeninhaltsstoffe anhand der Höhe der Peaks im Chromatogramm zu vergleichen (Buttery und Ling, 1967).

Likens und Nickerson (1967) verfolgten über einen Zeitraum von 15 Jahren gaschromatographisch die Hopfenölzusammensetzung verschiedener Hopfensorten und rechtfertigten damit ihre Theorie, dass die Hopfenöle trotz jahrgangsbedingter Schwankungen in der Zusammensetzung zur Sortenunterscheidung herangezogen werden können. Die Chromatogramme ließen ein sortenspezifisches Muster erkennen, welches sich relativ unbeeinflusst vom Erntejahrgang zeigte.

Forschungsarbeiten zur Sortendifferenzierung erbrachten zwischenzeitlich, dass Hopfensorten aufgrund ihres jeweils spezifischen Verhältnisses von Hopfenölkomponenten zu  $\beta$ -Caryophyllen unterschieden werden können. Dieses Verhältnis ist vom Jahrgang weitgehend unbeeinflusst und wird auch durch die Weiterverarbeitung des Hopfens zu Pellets nicht verändert (Freundorfer et al., 1991).

De Cooman konnte drei Hopfensorten durch Flüssigkeits- und gaschromatographische Analysen ihrer Hopfenextrakte anhand ihrer Chromatogramme unterscheiden, indem er aus drei Hopfensorten (Saaz, Nugget und Wey Target) durch mehrstufige Extraktionen unter Abtrennung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren je eine Flavonoid- und eine Aromafraktion gewann. Er trennte die Flavonoidfraktion mittels Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatographie (RP-HPLC), und die Aromafraktion mittels Kapillargaschromatographie weiter auf. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte in beiden Fällen computerunterstützt (De Cooman et al., 1998).

De Keukeleire (1998) versuchte ein automatisiertes Verfahren zur Hopfenölanalyse zu entwickeln, mit dem Ziel, einzelne Sorten und deren Qualität anhand ihrer Zusammensetzung zu unterscheiden. Er unterzog den Hopfen einer Extraktion mit superkritischem Kohlendioxyd, trennte den gewonnenen Extrakt in eine polare und eine unpolare Fraktion auf, und analysierte beide Fraktionen mittels Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS). Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Hopfenölfraktionen beschränkte er sich auf die ihm bekannten Marker zur Sortenunterscheidung Myrcen,  $\beta$ -Caryophyllen,  $\alpha$ -Humulen und  $\beta$ -Farnesen, obwohl ihm mit Blick auf die organoleptischen Eigenschaften der flüchtigen Verbindungen bewusst war, dass die im Hopfen mengenmäßig am meisten vertretenen nicht zwingend auch die aromaaktivsten flüchtigen Verbindungen sind.

Roberts et al., (2004) suchte nach flüchtigen Verbindungen in Hopfen. Er extrahierte dazu Hopfenpellets der Sorte Target mit flüssigem Kohlendioxyd, löste den Extrakt in Dichlormethan und gewann daraus durch Destillation im Hochvakuum die Fraktion

der flüchtigen Verbindungen. Dann analysierte er eine fünfprozentige Lösung dieses gereinigten Extrakts mittels multidimensionaler Gaschromatographie in Kombination mit einem time-of-flight Massenspektrometer (GC-GC-TOFMS). Er detektierte über 1500 flüchtige Verbindungen im Hopfen. Davon konnten 119 anhand Ihres Massenspektrums und durch Vergleich mit bekannten Spektren aus einer Datenbank (NIST 1998 MS Library) identifiziert werden.

**Tabelle 2:** Flüchtige Verbindungen in Hopfenöl (Roberts, et al., 2004)

Peak Nr.	flüchtige Verbindung	RT-1, RT-2 [s]	RI DB-5	RI Literatur DB-5	Neu
1	Butanoic acid	145, 2.00	845	820	nein
2	Butanoic acid, 3-methyl-	195, 2.57	876	877	nein
3	1-Nonene	225, 1.88	894	889	ja
4	Nonane	235, 1.80		900	ja
5	Pentanoic acid	245, 2.77	907	911	nein
6	1,3-Nonadiene, (E)-	265, 2.28	921	930	ja
7	Methyl hexanoate	265, 2.78	921	923	nein
8	1R-a-Pinene	275, 2.37	929	934	nein
9	Camphene	295, 2.51	943	953	nein
10	Benzaldehyde	305, 4.61	950	962	nein
11	(1S)- $\beta$ -Pinene	335, 2.75	971	980	nein
12	1-Octen-3-ol	345, 2.83	979	980	nein
13	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	355, 3.47	986	987	nein
14	$\beta$ -Myrcene	365, 2.83	993	991	nein
15	Decane	375, 2.05		1000	ja
16	Hexanoic acid	385, 3.17	1007	1019	nein
17	$\beta$ -Phellandrene	405, 3.03	1020	1031	nein
18	D-Limonene	415, 2.87	1027	1031	ja
19	Methyl heptanoate	415, 3.06	1027		nein
20	Benzyl alcohol	415, 5.13	1027	1032	nein
21	(Z)- $\beta$ -Ocimene	425, 2.92	1033	1037	nein
22	Benzeneacetaldehyde	425, 5.42	1033	1043	ja
23	(E)- $\beta$ -Ocimene	445, 2.92	1047	1048	nein
24	$\gamma$ -Terpinene	455, 3.13	1053	1062	nein
25	2-Nonanol	475, 2.87	1067	1087	nein

**Tabelle 2:** Fortsetzung

Peak Nr.	flüchtige Verbindung	RT-1, RT-2 [s]	RI Berechnet DB-5	RI Literatur DB-5	Neu
26	1-Octanol	485, 3.10	1073	1075	nein
27	1-Undecene	515, 2.35	1093	1092	ja
28	2-Nonanone	515, 3.37	1093	1093	nein
29	Undecane	525, 2.23		1100	nein
30	Heptanoic acid	535, 3.42	1106	1085	nein
31	Phenylethyl alcohol	545, 5.40	1112	1118	ja
32	Methyl octanoate	565, 3.33	1125	1124	nein
33	L-Pinocarveol	575, 4.15	1131	1139	nein
34	(+)-Camphor	585, 4.67	1138	1147	ja
35	Sabina ketone	605, 5.12	1150	1156	ja
36	Borneol	625, 4.13	1162	1165	nein
37	1-Nonanol	645, 3.25	1175	1175	ja
38	4-Terpineol	645, 3.90	1175	1182	nein
39	p-Cymen-8-ol	655, 4.83	1181	1186	ja
40	Cryptone	655, 5.08	1181	1188	ja
41	(+)- $\alpha$ -Terpineol (p-menth-1-en-8-ol)	665, 4.08	1188	1198	nein
42	Myrtenal	665, 5.05	1188	1193	ja
43	Methyl salicylate	665, 5.20	1188	1190	nein
44	1-Dodecene	675, 2.45	1194		ja
45	Myrtenal	675, 4.38	1194	1194	ja
46	Dodecane	685, 2.32		1200	nein
47	Octanoic Acid	685, 3.51	1200	1179	nein
48	Acetic acid, octyl ester	705, 3.27	1212	1200	nein
49	$\beta$ -Cyclocitral	705, 4.72	1212	1219	ja
50	trans-Carveol	715, 4.32	1219	1217	ja
51	Methyl nonanoate	725, 3.44	1225	1224	nein
52	Nerol	735, 3.87	1231	1242	nein
53	Hexyl 2-methylbutyrate	745, 3.18	1238	1239	ja
54	Neral	745, 4.33	1238	1240	nein
55	S-Carvone	745, 4.98	1238	1242	nein
56	Geraniol	775, 4.07	1256	1255	nein

**Tabelle 2:** Fortsetzung

Peak Nr.	flüchtige Verbindung	RT-1, RT-2 [s]	RI berechnet DB-5	RI Literatur DB-5	Neu
57	Geranial	795, 4.40	1269	1268	nein
58	Nonanoic acid	825, 3.60	1288	1276	nein
59	1-Tridecene	835, 2.53	1294	1292	ja
60	Tridecane	845, 2.40	1300	1300	ja
61	2-Undecanone	845, 3.42	1300	1296	nein
62	Perilla alcohol	845, 4.82	1300	1295	nein
63	2-Undecanol	855, 3.16	1306		nein
64	Methyl decanoate	885, 3.48	1325	1326	nein
65	Methyl geranate	885, 4.19	1325	1323	ja
66	Ylangene	945, 3.42	1362	1372	nein
67	13-Bourbonene	965, 3.47	1375	1385	nein
68	Vanillin	985, 7.52	1388	1402	ja
69	1-Tetradecene	995, 2.55	1394	1392	ja
70	Tetradecane	1005, 2.42	1400	1400	ja
71	2-Dodecanol	1005, 3.16	1400		ja
72	Methyl undecanoate	1045, 3.32	1429	1425	nein
73	$\alpha$ -Bergamotene	1055, 3.28	1436	1436	nein
74	$\alpha$ -Himachalene	1055, 3.96	1436	1447	ja
75	13-Ionone	1115, 4.82	1479	1482	nein
76	$\beta$ -Selinene	1125, 4.25	1486	1485	nein
77	1-Pentadecene	1135, 2.83	1493		ja
78	2-Tridecanone	1145, 3.50	1500	1496	nein
79	$\gamma$ -Muurolene	1145, 4.00	1500	1477	nein
80	2-Triedecanol	1155, 3.37	1507		nein
81	Calamenene	1175, 4.67	1521	1521	nein
82	$\alpha$ -Muurolene	1185, 4.17	1529	1499	nein
83	Caryophyllenyl alcohol	1225, 4.57	1557	1568	nein
84	Caryophyllene oxide	1245, 4.90	1571		nein
85	Hexadecene	1275, 2.65	1593	1593	ja
86	2-Tetradecanone	1275, 3.59	1593		nein
87	Hexadecane	1285, 2.51	1600	1600	nein
88	2-Tetradecanol	1285, 3.38	1600		nein

**Tabelle 2:** Fortsetzung

Peak Nr.	flüchtige Verbindung	RT-1, RT-2 [s]	RI Berechnet DB-5	RI Literatur DB-5	Neu
89	Cubenol	1305, 4.60	1615	1642	nein
90	Ö-Cadinol	1335, 4.92	1638	1658	nein
91	a-Eudesmol	1345, 4.77	1646	1652	nein
92	a-Cadinol	1345, 4.98	1646	1653	nein
93	Cadalene	1365, 5.68	1662	1674	ja
94	Juniper camphor	1395, 5.23	1685	1691	nein
95	1-Heptadecene	1405, 2.68	1692		ja
96	2-Pentadecanone	1405, 3.66	1692	1700	nein
97	Pentadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	1415, 2.44	1700	1705	ja
98	Heptadecane	1415, 2.54	1700	1700	ja
99	Methyl tetradecanoate	1435, 3.50	1717	1706	ja
100	cis-Farnesol	1435, 4.34	1717	1697	nein
101	Tetradecanoic acid	1495, 3.65	1767	1767	nein
102	1-Octadecene	1525, 2.73	1792	1793	ja
103	Octadecane	1535, 2.60	1800	1800	nein
104	2-Hexadecanone	1535, 3.50	1800	1806	nein
105	Methyl pentadecanoate	1565, 3.43	1825	1826	ja
106	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl-	1585, 3.35	1842	1847	ja
107	Pentadecanoic acid	1605, 3.70	1858	1839	ja
108	1-Nonadecene	1645, 2.76	1892		ja
109	Nonadecane	1655, 2.63		1900	nein
110	2-Heptadecanone	1655, 3.53	1900	1910	nein
111	Methyl hexadecanoate	1685, 3.42	1927	1927	ja
112	Hexadecanoic acid	1725, 3.73	1964	1966	nein
113	Eicosene	1755, 2.81	1991		ja
114	Eicosane	1765, 2.67	2000	2000	ja
115	Heneicosane	1875, 2.70	2100	2100	ja
116	Docosane	1975, 2.75	2200	2200	ja
117	Tricosane	2075, 2.78	2300	2300	ja
118	Humulone	2095, 6.84			nein
119	Lupulone	2245, 4.93			nein

RT-1 = Retentionszeit auf GC1, RT-2 = Retentionszeit auf GC2, RI = Retentionsindex;

Nuance und Setzer (2011) untersuchten die flüchtigen Verbindungen von sieben Hopfensorten, in Hopfenextrakt, den sie mittels Simultandestillation nach Likens und Nickerson aus verschiedenen Hopfenproben gewonnen hatten. Die flüchtigen Verbindungen wurden anhand ihrer Retentionsindices und durch Vergleich ihrer Massenspektren mit veröffentlichten Spektren aus Datenbanken identifiziert. Anschließend wurde eine computerunterstützte Cluster Analyse durchgeführt. Dabei kam eine spezielle Software zur Clusteranalyse zum Einsatz (NTSYSpc Software, Version 2.2). Es gelang aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Hopfenöle nicht die Aromaunterschiede zwischen den untersuchten Sorten aufzuklären. Die Cluster Analyse zeigte aber Ähnlichkeiten in der Hopfenölzusammensetzung auf. Die Unterschiede wurden hauptsächlich von Myrcen und  $\alpha$ -Humulen geprägt. Die amerikanischen Sorten Sterling, Wilamette, Vanguard, Cascade und Northern Brewer konnten in einem Cluster zusammengefasst werden, während die europäischen Sorten Saazer und Hallertauer ein eigenes Cluster bildeten (Nuance und Setzer, 2011).

Die moderne Aromastoffforschung zeigt, dass sich Geruchsschwellen und Intensitäten von flüchtigen Verbindungen erheblich voneinander unterscheiden können. Diejenige Verbindung in einem Chromatogramm mit dem höchsten Ausschlag muss noch lange nicht den wichtigsten Aromastoff darstellen. Zur Bestimmung des Einflusses einer Verbindung auf das Hopfenaroma muss daher die menschliche Nase mit ihrem Geruchssinn eingesetzt werden.

## **1.2 Der menschliche Geruchssinn und der Riechvorgang**

### **1.2.1 Wahrnehmung von Aromastoffen**

Der Mensch verfügt bekanntlich über fünf Sinnesorgane durch die er seine Umwelt wahrnimmt und die ihn handlungs- und orientierungsfähig machen. Er nimmt seine Umwelt visuell mit den Augen, auditiv mit den Ohren, gustatorisch mit der Zunge, taktil mit der Haut und olfaktorisch mit der Nase wahr. Konkret bedeutet Riechen (*lat. olfacere*) die Wahrnehmung von Aromastoffen über den Geruchssinn. Wahrnehmung bedeutet dabei im engen Sinne die Aufnahme und Verarbeitung der objektiven physikalischen und chemischen Reize durch die Sinnesorgane und im weiten Sinne zusätzlich das mentale Erleben durch die Interpretation dieser Sinnesreize (Brockhaus

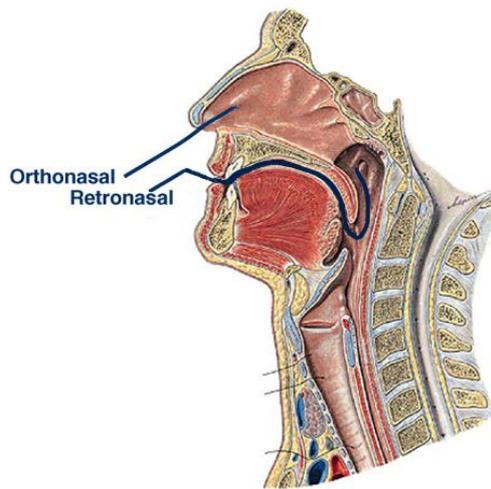
Enzyklopädie). Diese gefühlsspezifische Wirkung bezeichnet man als Geruchsqualität oder Hedonik. Sie wird auf einer neunstelligen Bewertungsskala zwischen „angenehm“ und „unangenehm“ erfasst. Der Geruch ist eine wesentliche biophysikalische Eigenschaft von Aromastoffen (Schieberle 2003). Gerüche werden vom Menschen entweder als angenehm oder unangenehm wahrgenommen. Sie ist sehr stark von subjektiven Faktoren beeinflusst. Persönliche Erfahrungen und Erinnerungen prägen die Bewertung von Gerüchen. Während zum Beispiel der vorherrschende Geruch eines Bauernhofes vom Landwirt als „normal“ empfunden wird, wird derselbe Geruch von den Nachbarn oft als Belästigung verspürt. Die Bewertung von Gerüchen kann sich auch mit dem Lebensalter verändern. Kinder haben zum Beispiel eine andere Einschätzung von Gerüchen als Erwachsene.

### **1.2.2. Geruchssinn**

Der Geruchssinn ist beim Menschen bei weitem nicht so stark ausgeprägt wie bei Tieren. Es wird allgemein angenommen, dass etwa zwei Drittel der Riechrezeptoren beim Menschen im Verlauf der Evolution verlorengegangen sind. Als Beleg für diese These wird angeführt, dass diese Rezeptoren bei anderen höheren Säugetieren noch vorhanden sind. Dennoch ist die größte Genfamilie des menschlichen Genoms für den Geruchssinn zuständig, weil ihm lebenswichtige Aufgaben zukommen:

- Auslösung von Ekel als Warnung vor verdorbenen Speisen
- Auslösung der Speichel- und Magensaftsekretion durch angenehme Gerüche
- Überwachung der Hygiene
- Vermittlung sozialer Informationen
- Beeinflussung des Sexualverhaltens
- Auslösen von Lust- oder Unlustgefühlen

In der Geruchsanalytik kann trotz technischer Errungenschaften noch immer nicht auf den menschlichen Geruchssinn verzichtet werden. Er detektiert selbst geringe Aromastoffkonzentrationen zuverlässig.



**Abb. 5:** Orthonasale und retronasale Geruchswahrnehmung (Buettner und Schieberle, 2009).

Grundvoraussetzung der Geruchsdetektion durch die Nase ist, dass die Aromastoffe genügend flüchtig sind um die Geruchsrezeptoren im oberen Rachenraum der Nase zu erreichen (Schieberle und Hofmann, 2003). Dies geschieht orthonasal direkt von außen über die Nase während des Riechvorgangs, oder retonasal über Mund und Rachen nach Freisetzung aus der zuvor oral zugeführten Lebensmittelmatrix beim Kauen und Schlucken (Abbildung. 5). Die Geruchsintensität ist dabei nach dem ersten Ausatmen nach dem Schlucken am größten (Schieberle und Hofmann, 2003). Unter den flüchtigen Verbindungen die orthonasal oder retonasal aufgenommen werden, sind nur diejenigen als Aromastoffe zu definieren, die von Geruchsrezeptoren auch tatsächlich wahrgenommen werden können; die also in Konzentrationen oberhalb der menschlichen Geruchsschwelle vorkommen. Bezogen auf Lebensmittel nehmen dabei die sogenannten Schlüsselaromastoffe eine besondere Stellung ein:

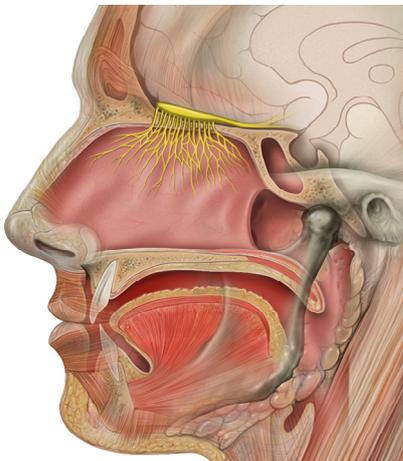
*„Schlüsselaromen sind diejenigen Geruchsstoffe, anhand derer ein Lebensmittel erkannt und bewertet wird. Sie bestimmen maßgeblich das Aroma des jeweiligen Produkts“* (Krautwurst, 2010).

Testreihen an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in Freising ergaben, dass bei 50 % der 19 identifizierten menschlichen Geruchsrezeptoren Schlüsselaromastoffe die besten Aktivatoren waren, obwohl ihr Anteil unter den Testsubstanzen nur 30% betrug (Krautwurst, 2010).

### 1.2.3 Riechvorgang

In der Neurophysiologie wird das Riechsystem auf zellulärer und molekularer Ebene erforscht. Im Jahr 1990 wurde der für die elektrische Signalweiterleitung zum Gehirn verantwortliche Riechkanal entdeckt (Dhallan et al. 1990). Der Durchbruch für die Erforschung des Riechsystems gelang im Jahr 1991 durch Linda Buck und Richard Axel (Buck und Axel, 1991). Sie erhielten im Jahr 2004 den Nobelpreis in Medizin für ihre bahnbrechenden Beiträge zur Aufklärung der grundsätzlichen Funktionsweise des Geruchssinns. Herzstück Ihrer Studien war der Nachweis von G-Proteingekoppelten Membranproteinen als Geruchsrezeptoren. Sie berichteten weiter, dass jedes olfaktorische Neuron jeweils nur eine Sorte von Geruchsrezeptoren herstellt (Julius und Katz, 2004). Beim Menschen sind etwa 1000 Gene zur Expression von spezifischen Riechzellen vorhanden. Von diesen sind etwa 390 funktionsfähig. Jeder Rezeptor kann durch mehrere Geruchsstoffe aktiviert werden und ein Geruchsstoff kann mehrere Rezeptoren aktivieren (Krautwurst, 2010).

Die Geruchsreize werden in das primäre Riechzentrum im Gehirn geleitet und gelangen von dort zu anderen Gehirnbereichen, unter anderem zum Limbischen System.

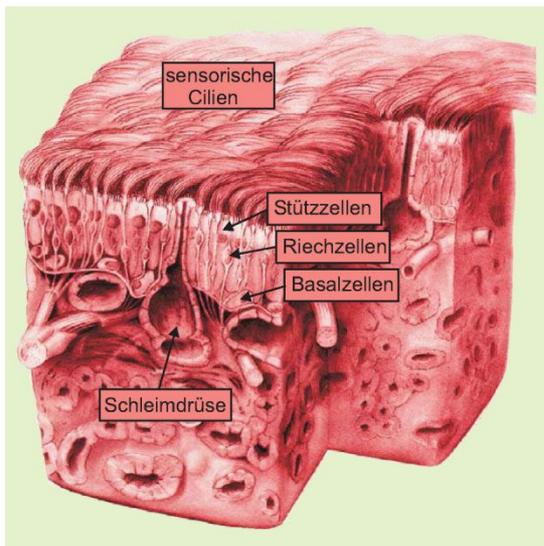


**Abb. 6:** Der Geruchsnerv (lat. *nervus olfactorius*) im Bild gelb gefärbt.

Quelle: (Lynch, P.J. und Jaffe, C., <http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/2006>)

Der genaue Aufbau des Riechepithels ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Atemluft mit darin enthaltenen Duftstoffen wird über die Nasenhöhle durch ein System von Strömungskörpern dem Riechepithel zugeleitet. Im Riechepithel sind beim Menschen auf  $10\text{ cm}^2$  rund 10 Millionen Riechzellen eingebettet. Die Oberfläche des Riechepithels

wird durch eine 5 - 30 µm dicke Schleimschicht (Mucus) bedeckt.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Riechepithels (Waldeck 2005).

Das Sekret stammt aus Drüsen und erfüllt mehrere wichtige Funktionen beim Riechen:

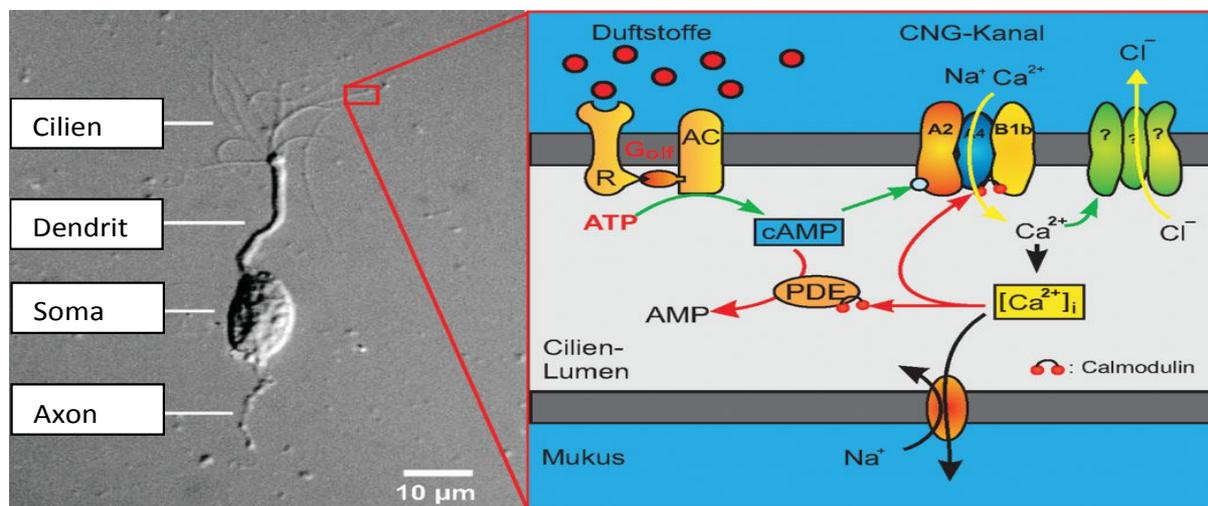
- Schutz vor Austrocknung des Epithels
- Schutz vor Infektionen durch bakteriostatische und bakterizide Proteine
- Anreicherung von Aromastoffen durch im Mucus gelöste Duftstoffbindemoleküle
- Bereitstellung von Ionen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) zur Erzeugung des Rezeptorstroms

Das Riechepithel wird zur Nasenhöhle hin durch eine einzellige Schicht Stützzellen abgegrenzt, die untereinander fest verbunden sind. Diese Stützzellen dienen auch als Diffusionsbarriere zwischen dem Mucus, der die Zellen bedeckt und der Gewebsflüssigkeit.

Unterhalb der Stützzellen liegen die Zellkörper der Riechzellen. Riechzellen sind primäre, bipolare, chemosensorische Neuronen mit einem Axon. Dieses projiziert in den paarig angelegten *Bulbus olfactorius* (Riechkolben). Der Riechkolben ist die erste Verarbeitungsstation von Geruchssignalen im Gehirn.

Die Dendriten der Riechzellen reichen bis zur Epitheloberfläche und enden dort in einem „Knopf“ der zehn bis 20 Cilien trägt. Knopf und Cilien ragen in das Lumen der Nasenhöhle und kommen dort mit den Aromastoffen in Kontakt. In diesen Knöpfen befinden sich auch alle Proteine für die Detektion von Aromastoffen und für die intrazelluläre Signalverarbeitung (chemoelektrische Transduktion).

Die unterste Schicht des Riechepithels wird von globulären Basalzellen gebildet. Diese neuronalen Stammzellen sind zur Proliferation und Zellteilung fähig. Ihre Funktion ist es, Riechzellen zu ersetzen, da diese nur eine Lebenserwartung von vier bis sechs Wochen haben. Dazu wandern die Basalzellen in die oberen Schichten des Epithels, wobei sie reifen und differenzieren. Sie bilden die chemosensorischen Cilien an der Oberfläche des Riechepithels. Beim erwachsenen Menschen besteht ein Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellproliferation. Seine Riechzellpopulationen bestehen zu jedem Zeitpunkt aus Zellen unterschiedlicher Reifestadien. Abbildung 8 zeigt eine mikroskopische Aufnahme einer einzelnen Riechzelle und erklärt schematisch, wie die chemoelektrische Transduktion von Signalen in den Riechzellen im Prinzip vor sich geht.



**Abb. 8:** Signaltransduktion in Riechzellen (Waldeck 2005; Foto Riechzelle: Kleene und Gesteland, 1981)

Das Herzstück des Geruchssinns und seiner Leistungsfähigkeit sind komplexe chemoelektrische Abläufe in den Riechzellen. Demnach lösen sich eingeatmete Aromastoffe in der die Riechzellen bedeckenden Schleimschicht (Mucus) und binden sich spezifisch an Proteine in den Cilien, die sogenannten Duftstoffrezeptoren. Die einzelnen Rezeptormoleküle aktivieren jeweils mehrere Signalübertragungsproteine (G-Proteine), von denen wiederum jedes ein Zielenzymsystem, bestehend aus endständiger Adenylatcyclase (AC III), anschalten kann. Die Adenylatcyclase synthetisiert den intrazellulären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Dies bewirkt eine Signalverstärkung. In der Zelle bindet cAMP an cyklisch nukleotidgesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle), wodurch sich diese öffnen und die Kationen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  aus dem Mukus außerhalb der Riechzelle in das Cilienlumen einströ-

men lassen. Es kommt dadurch zu einem depolarisierenden Rezeptorpotential. Ist das Potential der Membran ausreichend groß, und überschreitet die Depolarisation einen gewissen Schwellenwert, wird eine Salve von Aktionspotentialen ausgelöst. Jedes Rezeptorpotential wird zusätzlich um den Faktor zehn verstärkt, weil durch die einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen Chloridkanäle geöffnet werden, die  $\text{Cl}^-$ - Ionen aus dem Cilienlumen hinaus in den Mukus leiten. Dieser  $\text{Cl}^-$  - Strom führt zur eigentlichen Erregung der Riechzelle in Form von Aktionspotentialen bestimmter Frequenz, die im Gehirn die Sinneswahrnehmung hervorrufen. Die Frequenz der Aktionspotentiale ist konzentrationsabhängig. Je höher die Konzentration des Aromastoffs ist, desto höher ist die Frequenz. Riechzellen adaptieren sehr schnell an die Stimulation mit Aromastoffen. Auch bei kontinuierlicher Stimulation der Riechzellen feuern die Zellen nur für wenige Sekunden Aktionspotentiale. Ursache hierfür ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen vermittelte Rückkopplungshemmung: An die CNG-Kanäle ist kontinuierlich das  $\text{Ca}^{2+}$ - Bindprotein Calmodulin gebunden. Es dient als  $\text{Ca}^{2+}$ - Sensor. In die Zelle einströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an Calmodulin und bewirkt eine Konformitätsänderung der Kanäle, wodurch die Kanäle schließen.  $\text{Ca}^{2+}$  / Calmodulin aktiviert zusätzlich das Enzym Phosphodiesterase, welches den Botenstoff der Signaltransduktion, das c AMP, durch Spaltung aus den Cilien entfernt. Die Signalübertragung ist damit unterbrochen. Zusätzlich können aktivierte Duftstoffrezeptoren mittels Phosphorylierung durch Rezeptorkinase abgeschaltet werden und es wird diskutiert, ob zusätzlich der Nachschub von c AMP unterbunden wird, indem eine  $\text{Ca}^{2+}$  / Calmodulin abhängige Kinase die Adenylatcyclase (AC III) durch Phosphorylierung hemmt (Waldeck 2005). Die Signalweiterleitung erfolgt über die Axone der Riechzellen zu wenigen Glomeruli im Gehirn. Glomeruli fassen jeweils Axone tausender Riechzellen gleicher Selektivität zusammen und bilden Synapsen mit nachgeschalteten Mitralzellen, wobei ein Aromastoff mehrere Glomeruli aktivieren kann, und ein Glomeruli von verschiedenen Aromastoffen aktiviert werden kann. Darüber hinaus gilt: Jeder Rezeptor kann verschiedene Aromastoffe binden und jeder Aromastoff kann an unterschiedliche Rezeptoren binden, wobei die Glomeruli durch einzelne Aromastoffe unterschiedlich stark aktiviert werden. Dadurch entsteht ein räumliches und zeitliches Aktivitätsmuster, welches die Identität eines Aromastoffs eindeutig codiert. Ein zusätzlich vorhandenes neuronales Netzwerk ermöglicht dem Riechkolben im Gehirn die sichere Auswertung komplexer Aromastoffgemische (Waldeck 2005). Bei den meisten der

menschlichen Geruchsrezeptoren ist aber noch unbekannt, durch welchen Aromastoff welcher Rezeptor am effektivsten aktiviert wird (Krautwurst 2010).

### **1.3 Wertgebende Aromastoffe in Hopfen**

Die moderne Aromastoffforschung führte zu der Erkenntnis, dass lediglich eine beschränkte Anzahl an flüchtigen Substanzen wirklich einen Einfluss auf das Aroma eines Lebensmittels hat (Schieberle, 1995).

#### **1.3.1 Bewertung der Aromarelevanz flüchtiger Verbindungen**

Mit Hilfe der von Grosch und Schieberle entwickelten Aromaextraktverdünnungsanalyse (Grosch, 1993, Schieberle, 1995) ist es heute möglich, aromarelevante Verbindungen nachzuweisen, die unterhalb der Nachweisgrenze herkömmlicher GC Detektoren liegen, aber am Sniffingport von der menschlichen Nase erkannt werden können. Dazu wird aus dem Lebensmittel ein Lösungsmittelextrakt hergestellt, der dem Geruch des Lebensmittels entspricht. Aus diesem Extrakt werden unter schonenden Bedingungen die flüchtigen von den nichtflüchtigen Verbindungen abgetrennt. Seit 1999 gibt es dazu das Verfahren der Solvent Assisted Flavour Evaporation (SAFE), mit dem sehr effizient und temperaturschonend unter Hochvakuum destilliert werden kann (Engel et al., 1999). Zur sensorischen Beurteilung wird der Extrakt schrittweise im Verhältnis 1:1 verdünnt. Jede Verdünnungsstufe wird anschließend mittels High Resolution Gaschromatographie-Olfaktometrie (HRGC-O) analysiert. Die letzte Verdünnungsstufe, in der eine Substanz noch wahrgenommen werden kann, wird als FD-Faktor (flavor dilution faktor) definiert. Der FD-Faktor gibt an, mit wie vielen Teilen Lösungsmittel der Extrakt verdünnt werden muss, damit ein bestimmter Geruchsstoff gerade noch im Trägerstrom am Sniffingport wahrgenommen werden kann. Nach der Identifizierung werden die geruchsaktiven Aromastoffe mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse unter Einsatz isotopenmarkierter Standards quantifiziert. Diese Quantifizierungsmethode ist Stand der Technik und zeichnet sich durch ihre hohe Genauigkeit aus. Verluste während der Probenaufarbeitung und -isolierung werden ausgeglichen, da sich der zu bestimmende Aromastoff zu seinem isotopenmarkierten Standard nur sehr geringfügig in der Molekülmasse unterscheidet, ansonsten aber glei-

che chemische und physikalische Eigenschaften aufweist. Durch Bestimmung des Aromawerts als Quotient der ermittelten Konzentration des Aromastoffs im Lebensmittel zu seiner Geruchsschwelle in dem Medium, welches im Lebensmittel überwiegend vorkommt (meist Wasser oder Öl), kann der Beitrag des Aromastoffs zum Gesamtaroma des Lebensmittels ermittelt werden: Aromastoffe, deren Konzentration über ihrer Geruchsschwelle liegt (Aromawert  $> 1$ ), sind definitionsgemäß am Gesamtaroma beteiligt. Liegt der Aromawert  $\leq 1$ , wird davon ausgegangen, dass die Verbindung keinen Beitrag zum Gesamtaroma liefert.

Nach dieser Methode konnten an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in Garching die Schlüsselaromastoffe von Aromahopfen der Sorte Spalter Select identifiziert und quantifiziert werden. Erstmals wurde gezeigt, welche flüchtigen Verbindungen im Hopfen wirklich aromaaktiv sind. Steinhaus und Schieberle beschrieben (2E)-trans-4,5-epoxy-2-decenal, (R-)-Linalool und Myrcen als die wichtigsten Aromastoffe der Hopfensorte Spalter Select (Steinhaus, 2000; Steinhaus und Schieberle, 2000 a).

Steinhaus et al. (2006) konnten das nach Ananas riechende (3E,5Z,9E)-undeca-1,3,5,9-tetraen und 4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on in Hopfen der Sorten Hallertauer Perle und Yakima Cascade anhand der Retentionszeiten auf verschiedenen Kapillarsäulen, sowie anhand des Geruchseindrucks und des Geruchsschwellenwerts am Sniffing Port im Vergleich zu Referenzsubstanz, und aufgrund der Massenspektren (MS-EI, MS-CI) identifizieren.

Im Jahr 2006 konnte Kishimoto den Geruch von 4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on mittels Charm-Analyse in Hopfenextrakt der Sorte Cascade erkennen (Kishimoto et al., 2006).

Takoi konnte sowohl olfaktorisch als auch massenspektrometrisch zwei weitere Aromastoffe im Hopfen der Sorte Nelson Sauvignon nachzuweisen: Die flüchtige Thiole 3-sulfanyl-4-methylpentan-1-ol und das 3-Sulfanyl-4-methyl-pentyl-acetat (Takoi et al., 2009).

### 1.3.2 Übergang flüchtiger Verbindungen des Hopfens in das Bier

Die intensiven Untersuchungen zum Aroma des Hopfens sind vor allem im Hinblick auf die Verwendung bei der Bierherstellung bedeutsam. Etliche Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit dem Thema, welche flüchtigen Verbindungen des Hopfens beim Bierbrauen ins Bier übergehen.

1911 meldete Novak ein Patent an für ein „Verfahren und Vorrichtung zum Hopfen des Bieres“. Damit ließ sich im Bier ein ganz spezielles Hopfenaroma erzeugen. Zugleich war das Verfahren infolge der besseren Ausnutzung des Hopfens sparsamer als das herkömmliche Brauverfahren, bei dem ein Großteil der Hopfenaromastoffe mit dem Wasserdampf beim Würzekochen ausgetrieben wurde und ein weiterer Teil zusammen mit der Gärungskohlensäure aus dem Bier entwich. Das Verfahren war dadurch gekennzeichnet, dass ein Gemisch aus Hopfen und Würze in einer Destillierblase 20 bis 40 Minuten lang destilliert wurde. Der Destillationsrückstand wurde anschließend in einem gesonderten Gefäß mit Würze ausgekocht. Destillat und Sud wurden dann zumindest teilweise dem Bier zugefügt (Novak, 1911).

Über 70 Jahre später war die Entwicklung so weit, Würze energiesparend zu kochen, ohne dabei Hopfenaromastoffe auszudampfen: 1983 wurde ein „Verfahren und Vorrichtung zur kontinuierlichen Druckkochung von Bierwürze“ zum Patent angemeldet, bei dem vorgewärmte Würze mittels einer Bodenkolonne rektifiziert wurde. Die Kolonne konnte mit Brüden aus der Würze oder mit Inertgas und Frischdampf betrieben werden. Vor dem Verarbeiten der ungehopften Würze wurde ein Hopfen-Würze-Gemisch gesondert extrahiert und später als Destillat und Rückstand dem Prozess wieder zugeführt (Krüger, 1983).

Abgesehen von speziellen Versuchen im Anlagenbau, Hopfenaroma verstärkt in das Bier zu überführen, wurde vielfach analysiert, welche Verbindungen aus dem Hopfen überhaupt während des herkömmlichen Brauprozesses in das Bier übergehen:

Peacock konnte mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie zeigen, dass Geraniol, das unter anderem in den Hopfensorten Cascade und Cluster enthalten ist, in die damit gebrauten Biere übergehen kann (Peacock et al., 1981). Für Humulol und Humuladienon, die bis dahin als wichtige Hopfenaromastoffe im Bier angesehen

---

wurden, konnte Peacock jedoch anhand sensorischer Tests zeigen, dass sie im Bier nicht aromaaktiv sind. Um an quantitative Daten heranzukommen, wurden die Bierproben mit einer alkoholischen Naphthalenlösung als Standard versetzt und anschließend vollständig in Celite 545 aufgenommen. Das mittels Dichlormethan von der Säule gewaschene Eluat wurde im Vakuum eingeengt und nochmals säulenchromatographisch mit Hexan und Ether als Lösungsmittel behandelt. Die vereinigten Hexan- und Etherfraktionen wurden gaschromatographisch und massenspektrometrisch analysiert, indem die Peakflächen der Aromastoffe mit denen des Standards verglichen wurden (Peacock et al., 1981a).

Weitere Forschungsarbeiten beschreiben detailliert das Aroma von Bieren, die mit unterschiedlichen Hopfensorten gehopft wurden: Durch die Hopfung mit Cascade ergaben sich blumige bis citrusartige Biere während durch die Sorte Hallertauer Mittelfrüh eher krautig bis würzige Geruchseindrücke im Bier typisch waren. Cascadebiere enthielten deutlich mehr Geraniol während in Bieren aus Hallertauer Mittelfrüh mehr Linalool nachweisbar war. Myrcen überstand den Brauprozess hingegen nicht (Lam et al., 1986).

Bei der Klärung der Frage, welche Aromastoffe im Hopfen für die Eigenschaften des damit gebrauten Bieres wie Vollmundigkeit, Bittere und Aroma verantwortlich sind, waren die Arbeiten von Kowaka federführend. Er fand, dass das Aroma, welches der Hopfen dem Bier verleiht, mit dem Gehalt des Hopfens an Humulenepoxiden korreliert (Kowaka et al., 1983). Auch Peppard konnte mittels der statistischen Methoden ANOVA (analysis of variance) und PLS-Regressionsanalyse (Partial Least Squares) zwischen den praktischen Verkostungsergebnissen von Bieren aus Brauversuchen mit verschiedenen Hopfensorten und darin identifizierten flüchtigen Verbindungen eine Korrelation zwischen zunehmenden Konzentrationen an Humulenepoxiden und einer ausgesprochen feinen Hopfennote im Bier feststellen. Er selbst merkte zu diesem Ergebnis an, dass die festgestellte Korrelation zwischen den sensorischen Eigenschaften und den analytischen Parametern nicht zwangsläufig einen Kausalzusammenhang darstellt, denn ein eindeutiges Ergebnis könne nur erzielt werden, wenn einzelne Verbindungen aus dem Hopfenöl direkt zum Bier dosiert würden (Peppard, et al., 1989).

Um Aufschluss zu bekommen, welche Aromastoffe des Bieres aus dem Hopfen stammen und welche nicht, verglich Sanchez ungehopftes und gehopftes Bier und diagnostizierte im gehopften Bier deutliche Mengen an Linalool, Citronellol sowie 2-Phenylethylacetat und 2-Phenylethanol (Sanchez et al., 1992).

Deinzer stellten fest, dass Aromahopfensorten zwar hohe Konzentrationen an  $\alpha$ -Humulen und  $\beta$ -Caryophyllen enthalten, aber dass deren Geruchsschwellenwerte zu hoch sind, um einen signifikanten Einfluss auf das Bieraroma ausüben zu können (Deinzer und Yank, 1994).

Bei Brauversuchen mit verschiedenen Hopfensorten unter sonst gleichen Bedingungen konnte Fritsch im Jahr 2001 einen Zusammenhang zwischen dem Linaloolgehalt des Hopfens und der blumigen Hopfennote des Bieres nachweisen. Da aber in einigen dieser Biere eine stark hervortretende citrusartig-fruchtige Note entdeckt wurde, die nicht mit den Gehalten bekannter Bieraromastoffe in Verbindung gebracht werden konnte, wird davon ausgegangen, dass weitere noch unentdeckte geruchsaktive Verbindungen existieren, die wie Linalool einen Einfluss auf die Hopfennote daraus hergestellter Biere haben (Fritsch, 2001). Fritsch (2001) untersuchte darüber hinaus ungehopftes und gehopftes Bier mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse und stabiler Isotopen Verdünnungsanalyse und wies nach, dass von allen Aromastoffen, die aus dem eingesetzten Spalter Select Hopfen stammen, nur das (R)-Linalool im fertigen Bier seine Geruchsschwelle überschreitet (Fritsch, 2001). Mit Zusatz von (R)-Linalool zu ungehopftem Bier konnte er die typische Hopfennote eines mit Spalter Select hergestellten Pilsener Bieres nachahmen. Darauf aufbauend gelange es erstmals auf der Grundlage einer Ethanol-Wasser-Matrix das Aroma eines Pilsner-Bieres durch Rekombination der 22 wichtigsten Bieraromastoffe zu imitieren (Fritsch und Schieberle, 2005).

Verbindungen, die ins Bier übergehen können, werden in der isolierten Sesquiterpenfraktion des Hopfenöls vermutet. Goiris et al. (2002) erzielten durch postfermentative Dosage der mittels flüssiger Kohlensäure aus Hopfenöl extrahierten Sesquiterpen-

fraktion, Biere mit feinwürzigem Hopfenaroma. Sie vermuteten hinter dieser würzigen Note Spurenkomponenten aus der isolierten Sesquiterpenoidfraktion des Hopfenöls.

Lermusieau et al. (2001) unterzogen die mittels Amberlit XAD-2 und Diethylether als Lösungsmittel gewonnenen Extrakte aus zwei gehopften und einem ungehopftem Bier, sowie einem durch Simultandestillation nach Likens und Nickerson aus Hopfen gewonnenen Extrakt jeweils einer Aromaextraktverdünnungsanalyse. Dabei detektierten sie Aromastoffe aus dem Hopfenextrakt auch in den Extrakten der gehopften Biere. Sie vermuteten, dass es sich bei diesen Aromastoffen um Linalool, Dimethyltrisulfid, Ethylcinnamat, Geranylacetat sowie Humuladienon handeln könnte (Lermusieau et al., 2001). Lermusieau und Colin (2003) rückten schwefelhaltige Verbindungen aus dem Hopfen in den Mittelpunkt Ihrer Arbeiten und vermuteten, dass diese das Bieraroma beeinflussen und für die Sortenunterschiede verantwortlich sein könnten. Bei den schwefelhaltigen Verbindungen handelte es sich vermutlich um S-Methylthioacetat, Dimethyldisulfid, 4-Methoxy-2-methylbutanethiol-2, Diethyldisulfid, Dimethyltetrasulfid und S-Methylthiodecanoat.

Vermeulen und Collin (2003) zeigten auf, dass Thiole im Aroma von frischem Bier vorkommen, indem sie den aus Bier säulenchromatographisch einer Aromaextraktverdünnungsanalyse unterzog. Sie identifizierte 4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on und 3-sulfanylhexanol rein geruchlich am Sniffingport eines Gaschromatographen anhand ihrer Kovats Retentionsindices auf je einer FFAP und CP-SiL 5 Säule durch Datenbankabgleich mit den Kovats-Indices der Reinsubstanzen.

### **1.3.3 Bildung von Hopfenaromastoffen aus Vorstufen**

In der Literatur finden sich mehrere Hinweise, wonach das Bieraroma außer durch die bereits im Hopfen frei vorhandenen Aromastoffe auch durch gebundene Aromastoffe, die erst im Verlauf der Produktionsprozesse freigesetzt oder gebildet werden, bestimmt wird.

In diesem Zusammenhang vermutete Peacock hinter dem Geraniolgehalt im Bier eine enzymatische Freisetzung aus Geranylisobutytrat im Verlauf der Würzekochung, welches sowohl in Hopfen als auch in Bier nachweisbar war. Es gelang ihm Geraniol

mittels Bierhefe aus einer wässrigen Lösung aus Geranylisobutyrat freizusetzen (Peacock et al., 1981).

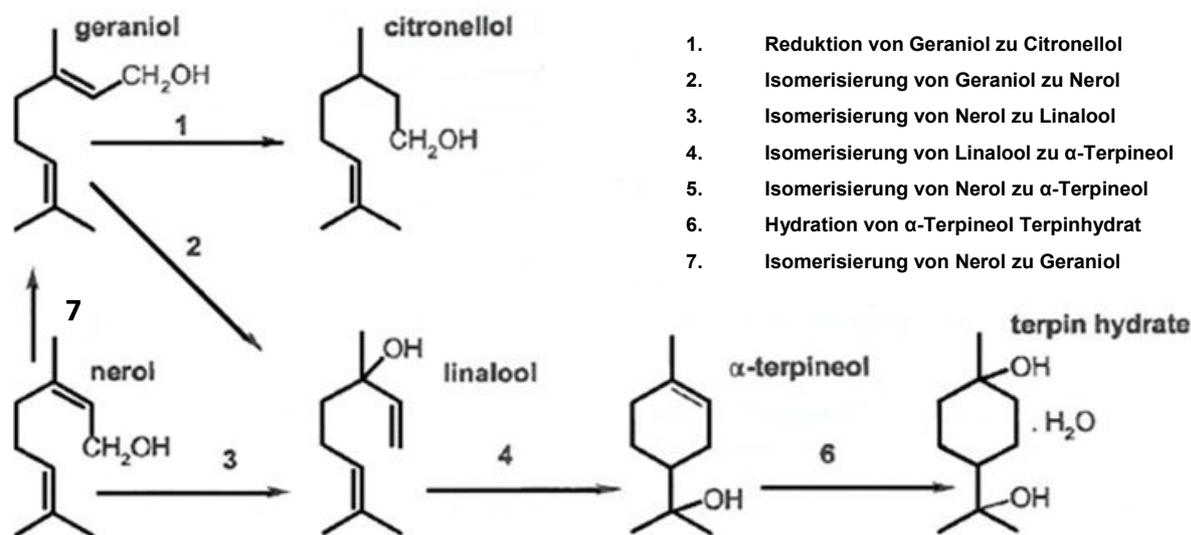
Jüngere Forschungsarbeiten bekräftigen, dass der *Einfluss von Enzymen* bei der Umwandlung oder Bildung von Aromastoffen eine Rolle spielt:

Goldstein mutmaßte, dass Hopfen Glykoside oder andere Aromastoffvorstufen enthält, aus denen später im Bier während des Gärprozesses Aromastoffe freigesetzt werden (Goldstein, 1999). Er analysierte mittels Flüssigkeitschromatographie (LC)/Elektrospraymassenspektrometrie eine Glykosidfraktion aus Hopfen und zeigte, dass im Hopfen Glykoside mit daran gebundenen Aromastoffen vorhanden sind. Als Aglykone waren unter anderem Linalool, Citronellol und Phenylethanol anhand ihrer Molekülmassen nachweisbar. Nach Derivatisierung der Glykosidfraktion (Trimethylsilylierung bzw. Trifluoroacetylierung) konnten gaschromatographisch / massenspektrometrisch einige Glykoside näher bestimmt werden. Er fand  $\beta$ -D-glucopyranoside, Diglucoprandoside und 6-o-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -d-glucopyranoside zusammen mit den bereits oben erwähnten Aglykonen (Goldstein et al., 1999a). Goldstein ließ sich zu dieser Thematik ein Verfahren patentieren, bei dem aus den Rückständen der Extraktion von Hopfen mit flüssiger Kohlensäure wasserlösliche Inhaltsstoffe gewonnen wurden, mit denen sich nachweislich das Bieraroma beeinflussen ließ (Goldstein 1999).

Kaltner et al. (2001) bestätigten die Ergebnisse von Goldstein et al. (1999 a), indem sie in Brauversuchen unter Verwendung von Rückständen der Hopfenextraktion mit überkritischem Kohlendioxid eine Hopfenblume im Bier erzielen konnten. Darüber hinaus beobachteten sie während des Gärvorganges einen Anstieg der Linaloolkonzentration. Sie hielt daher eine enzymatische Freisetzung von Linalool aus Glykosiden während der Fermentation für wahrscheinlich.

King und Dickinson (2000) untersuchte das Verhalten von *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* und *Torulasporea delbrueckii* bezüglich ihres Verhaltens gegenüber Monoterpenalkoholen. Sie konnten zeigen, dass sowohl *Saccharomyces cerevisiae* als auch *Kluyveromyces lactis* in der Lage sind durch Biotransformation aus Geraniol Citronellol zu bilden. *Kluyveromyces lactis* und *Torulasporea delbrueckii* waren in der Lage, aus Nerol Geraniol zu bilden (siehe Abbildung 9). Alle drei Hefen

konnten sowohl aus Geraniol wie auch aus Nerol Linalool aufbauen oder Linalool und Nerol zu  $\alpha$ -Terpineol umbauen (King und Dickinson, 2000).



**Abb. 9:** Biotransformation von Monoterpenen durch Hefen (King und Dickinson, 2000).

Kollmannsberger untersuchte verschiedene Enzympräparate auf ihre Fähigkeit,  $\beta$ -D-Phenyl-Glucosid und  $\beta$ -D-Octyl-Glucosid zu spalten. Er testete die Enzympräparate auch an zuvor mittels Amberlite XAD-2 Harz isolierten aber nicht näher charakterisierten Hopfenglykosiden. Die Aromastofffreisetzung durch das Enzymsystem diente ihm indirekt als Glykosidnachweis. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus niger* erzielt (Kollmannsberger 2002). Mit der gleichen Methode wurden verschiedene Hopfensorten und Hopfenprodukte untersucht. Aus den Sorten und aus den daraus hergestellten Hopfenprodukten ließen sich unterschiedliche Mengen an Linalool freisetzen (Kollmannsberger et al., 2006).

In Fortführung der Arbeiten von Goldstein (1999) isolierte Biendl mittels Amberlite XAD-2 Harz nicht näher bestimmte Glykoside aus einem Bier vom Typ Pilsner. Durch enzymatische Hydrolyse ließen sich daraus die gleichen Aromastoffe wie bei Goldstein freisetzen. Aus dieser Freisetzung schloss Biendl auf das Vorhandensein von Hopfenglykosiden im Bier. Ziel seiner Untersuchungen war es, Grundlagen zur Aro-

maoptimierung von Bier zu erarbeiten, um durch technologische Optimierung des Gärprozesses gezielt die Spaltung von Glykosiden zu bewirken (Biendl et al., 2003).

King und Dickinson simulierten in Fortführung ihrer Arbeit (King und Dickinson, 2000) einen brautechnischen Gärprozess und stellten fest, dass *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage ist, durch Biotransformation aus Geraniol überwiegend Citronellol zu bilden. Zusätzlich konnten sie in geringen Mengen Linalool und Nerol nachweisen. Sie stellten weiter fest, dass Linalool und Nerol durch Biotransformation zu  $\alpha$ -Terpineol umgesetzt wurden. *Sacharomyces bayanus* war in der Lage, aus Geraniol zusätzlich Geranyl- und Citronelylacetat zu bilden. Sie folgerten aus diesen Versuchsergebnissen, dass die bisherige Vermutung der Freisetzung von Monoterpene aus ihren Glykosiden neu überdacht werden muss, da Hefen in der Lage sind durch Reduktion oder Isomerisierung Monoterpene wie Geraniol, Linalool, Nerol und  $\alpha$ -Terpineol ineinander umzuwandeln. Beispielsweise könnte der Linaloolgehalt im Bier durch die Wahl geeigneter Hefesorten positiv beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu wäre es aber auch möglich Linalool während der Gärung zu verlieren, mit dem Ergebnis aromaschwächerer Biere, da das Umwandlungsprodukt  $\alpha$ -Terpineol 4,6-fach weniger geruchsaktiv ist wie Linalool (King und Dickinson, 2003).

Daenen testete die Glykosidhydrolaseaktivität von 59 Hefen, darunter 54 *Saccharomyces*- und *Brettanomyces*brauhefen. Als Testglycoside wurden 4-Metylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucosid, para-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucosid und para-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucosid verwendet. *Brettanomyces*hefen, insbesondere *Br. custersii* (CMBS LD72), zeigten im Gegensatz zu den *Saccharomyces*stämmen hohe  $\beta$ -Glucosidaseaktivität. Schließlich wurde die Aktivität an Hopfenglykosiden getestet, die zuvor mittels Amberlit XAD-2 Harz isoliert worden waren. Eine Mischung aus *Br. custersii* (CMBS LD72) und *S. cerevisiae* (CMBS LD25) lieferte die besten Ergebnisse (Daenen et al., 2008).

Bei der Neuentstehung oder Umwandlung von Aromastoffen spielen offensichtlich auch die *Temperatur* und der *pH-Wert* eine Rolle: Baxter zeigte anhand von Reinstoffen, dass aus Geraniol und Nerol in verdünnter Citronensäurelösung bei pH 2,4 und 24°C im Verlauf einer mehrwöchigen Lagerung jeweils Linalool und  $\alpha$ -Terpineol entstehen (Baxter et al., 1978).

---

Kaltner beobachtete den Linaloolgehalt während der Hopfentrocknung und stellte dann fest, dass der Linaloolgehalt in Folge von Hitzeeinwirkung bei einer Trocknungstemperatur von 70 °C zunimmt (Kaltner et al., 2001).

Marriot konnte während der Würzekochung eine Zunahme des Geraniols und zugleich auch eine Abnahme des Linalools beobachten. Der pH-Wert der Würze scheint dabei einen Einfluss auf die Bildung von Geraniol und Linalool zu haben. Im pH-Bereich zwischen 3,5 und 7,5 bildete sich im sauren Milieu mehr Geraniol als im alkalischen Bereich, während sich der Linaloolgehalt umgekehrt verhielt (Marriott et al., 2006).

Die Fortschritte in der Aromastoffforschung schaffen für die Lebensmittelindustrie neue Möglichkeiten, um komplexe Herstellungsverfahren besser verstehen und gezielt optimieren zu können.

## 1.4 Aufgabenstellung

Bei Brauversuchen, insbesondere mit Yakima Cascade wurden Aromaabweichungen im Bier beobachtet die nicht mit bisher bekannten Hopfenaromastoffen erklärt werden konnten. Vor diesem Hintergrund war es Zielsetzung dieser Arbeit in Pellets der fünf Hopfensorten Yakima Cascade, Slowenischer Golding, Hallertauer Perle, Hallertauer Smaragd und Hallertauer Hersbrucker, gezielt nach Sortenunterschieden im Aroma zu suchen und die wesentlichen Unterschiede qualitativ und quantitativ zu charakterisieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit bestand die Aufgabe darin, die Aromastoffe aus den verschiedenen Hopfensorten zu extrahieren und aromaschonend unter Anwendung der SAFE-Technik (Solvent Assisted Flavour Evaporaton) von den nicht flüchtigen Verbindungen zu trennen. Dann sollten in den aromastoffhaltigen Fraktionen mittels Aromaextraktverdünnungsanalysen wertgebende Aromastoffe, die sich durch hohe FD-Faktoren auszeichnen, ermittelt und identifiziert werden. Die qualitativ anhand der identifizierten Aromastoffe erfassten Sortenunterschiede sollten nach dem modernen Verfahren der Stabilisotopenverdünnungsanalyse quantitativ ermittelt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte geklärt werden in welchem Umfang Aromastoffe im Hopfen glykosidisch gebunden vorliegen. Dazu sollte nach dem Verfahren der Stabilisotopenverdünnungsanalyse quantitativ untersucht werden in wie weit sich Aromastoffe durch saure Hydrolyse unter Berücksichtigung thermischer Einflüsse aus ihren Glykosiden freisetzen lassen. Zusätzlich sollte mit Hilfe der Stabilisotopenverdünnungsanalyse quantitativ erfasst werden in welchen Mengen Aromastoffe aus Hopfen durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt werden können.

## 2. Ergebnisse

Aus einer Vielzahl von Hopfenproben der Firma Hopsteiner (Simon H. Steiner, Hopfen, GmbH) wurden fünf Sorten mittels Handbonitierung ausgewählt, da sie Aromaunterschiede aufwiesen. Die Unterscheidbarkeit wurde anschließend von 12 Sensorikexperten der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA) mittels blinder orthonasaler Dreiecksprüfung durchgeführt (*gemäß § 64 Abs. LFGB § 64 LFGB, Band I (L), L 00.90-7 (Lebensmittel- Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch); vormals § 35 LMBG, Lebensmittelbedarfsgegenständegesetz*).

### 2.1 Sensorischer Vergleich der Hopfensorten

Die Ergebnisse der Dreiecksprüfungen (Tabelle 3) zeigten in Übereinstimmung mit dem bei der Handbonitierung erhaltenen Eindruck, dass sich das Aroma der Probe Yakima Cascade deutlich von dem der anderen vier Hopfensorten unterschied: Alle zwölf Probanden erkannten die abweichende Probe in den Tests, bei denen Yakima Cascade beteiligt war (Tabelle 3, Test 1-4). Besonders auffällig war das intensiv nach schwarzen Johannisbeeren riechende Aroma von Yakima Cascade. Dagegen war das Ergebnis bei den anderen vier Sorten uneinheitlich. Neben dem für alle Sorten typischen myrcenartigen Geruchseindruck unterschieden sich die anderen Sorten nur geringfügig. So konnte der als besonders blumig bekannte Steyrer Golding weder vom Hallertauer Hersbrucker noch von Perle und Smaragd eindeutig unterschieden werden (Tabelle 3, Test 5-7). Die Unterscheidung von Hersbrucker gegenüber Perle und Smaragd war hingegen mit hohem Signifikanzniveau möglich (Tabelle 3, Test 8-9). Ebenso unterschieden sich Perle und Smaragd (Test 10).

Die Sorte Perle zeigte sich als relativ mild im Aroma, während bei der Sorte Smaragd blumige Eindrücke überwogen. Die Sorte Hersbrucker war im Aroma kräftiger als die Sorte Perle aber weniger blumig als die Sorte Smaragd. Die der Sorte Smaragd nachgesagte fruchtige Aromanote (CMA-Sortenmappe, 2005) wurde vom Sensorteam nicht als Unterscheidungskriterium genannt.

**Tabelle 3:** Sensorische Unterscheidbarkeit der untersuchten Hopfensorten.

Test	Hopfensorte		korrekte Antworten	Unterschied gesichert?	Signifikanzniveau
1	Cascade	↔ Golding	12/12	ja	0,1 %
2	Cascade	↔ Hersbrucker	12/12	ja	0,1 %
3	Cascade	↔ Perle	12/12	ja	0,1 %
4	Cascade	↔ Smaragd	12/12	ja	0,1 %
5	Golding	↔ Hersbrucker	05/12	nein	> 5 %
6	Golding	↔ Perle	06/12	nein	> 5 %
7	Golding	↔ Smaragd	07/12	nein	> 5 %
8	Hersbrucker	↔ Perle	10/12	ja	0,1 %
9	Hersbrucker	↔ Smaragd	11/12	ja	0,1 %
10	Perle	↔ Smaragd	09/12	ja	1 %

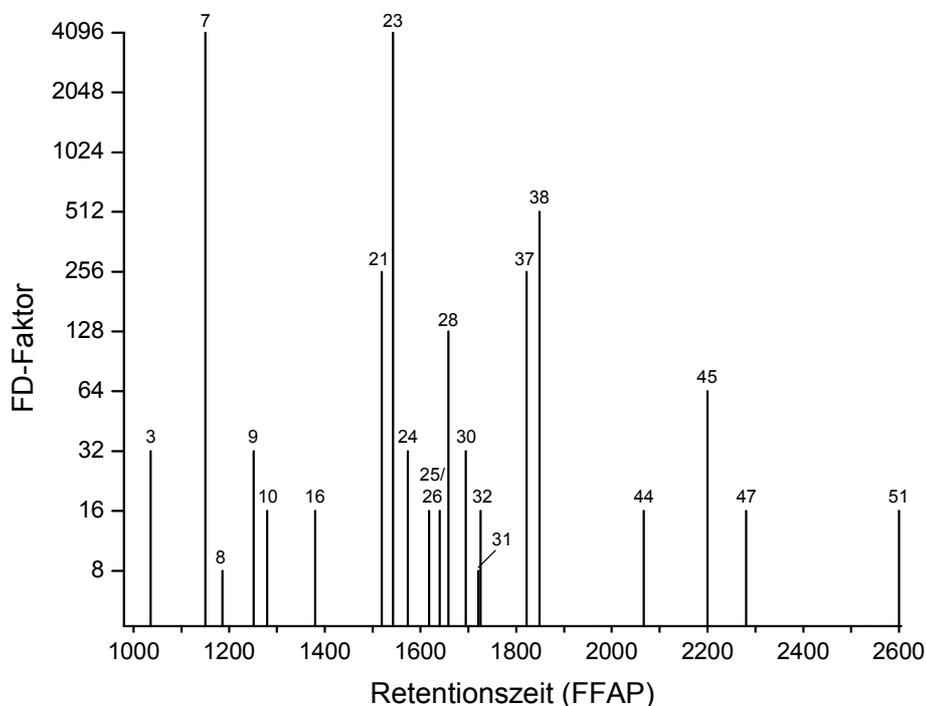
## 2.2 Schlüsselaromastoffe der verwendeten Hopfensorten

Um die für das Aromaprofil verantwortlichen Verbindungen zu lokalisieren, wurde jede Hopfensorte dem Verfahren der Aromaextraktverdünnungsanalyse von Grosch und Schieberle unterzogen (Grosch 1993, Schieberle 1995). Dazu wurden jeweils tiefgefrorene Hopfenpellets mit Mörser und Stößel zerkleinert und schonend mit Diethylether als Lösungsmittel extrahiert. Ein Filterpapierstreifen wurde mit Extrakt benetzt und der Geruch nach Verdampfen des Ethers mit dem des Hopfenpulvers verglichen. Es wurde nahezu Übereinstimmung festgestellt. Die Abtrennung der nicht flüchtigen Bestandteile aus dem Extrakt erfolgte mittels Hochvakuumdestillation nach dem von Engel et al. (1999) entwickelten Verfahren der Solvent-Assisted-Flavor-Evaporation (SAFE). Das Destillat wurde dann unter Ausschütteln mit Natriumcarbonatlösung in eine neutral-basische und eine acide Fraktion aufgetrennt, jeweils auf 1,0 ml eingeeengt, und schrittweise 1:1 verdünnt. Jede Verdünnungsstufe wurde anschließend gaschromatographisch-olfaktorisch untersucht. Es wurde so lange weiter verdünnt und analysiert, bis am Sniffing-Port kein Aromastoff mehr wahrgenommen werden konnte. Auftretende Geruchseindrücke wurden parallel zur Aufzeichnung des Schreibers am Gaschromatographen notiert. Die Identifizierung erfolgte durch Ver-

gleich von Massenspektren und Retentionsindizes (RI) mit Daten kommerziell erhältlicher oder selbst synthetisierter Referenzsubstanzen, bzw. entsprechend abgesicherter Daten einer unter vergleichbaren Messbedingungen an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie erstellten MS/RI-Bibliothek. Die Retentionsindizes wurden dazu auf Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität ermittelt (FFAP, CP SiL 19 CB, CP SiL 8 CB) und anhand der linearen Interpolation der Retentionszeiten im Vergleich zu Mischungen aus n-Alkanen bestimmt. Wo keine Vergleichssubstanz zur Verfügung stand, wurde zur Identifizierung, soweit möglich, auf Literaturdaten zurückgegriffen. In einigen Fällen erfolgte die Identifizierung aufgrund der typischen massenspektrometrischen Fragmentierung sowie der von homologen Verbindungen abgeleiteten Retentionszeit. In wenigen Fällen, in denen kein aussagekräftiges Massenspektrum erzeugt wurde, erfolgte die Identifizierung anhand von Retentionszeit und Geruch.

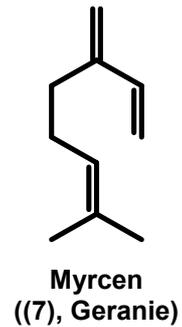
### 2.2.1 Hallertauer Smaragd

In Abbildung 10 sind alle Aromastoffe aufgeführt, die in der Sorte Hallertauer Smaragd mit einem FD-Faktor von  $FD \geq 8$  lokalisiert werden konnten:

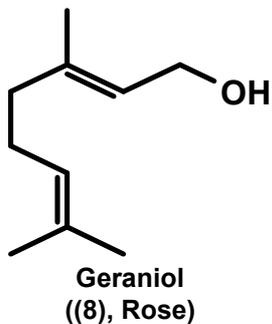
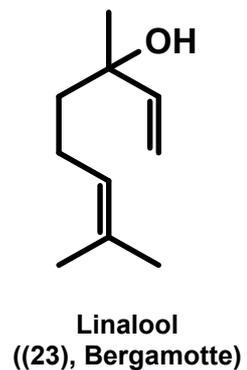


**Abb. 10:** FD-Chromatogramm ( $FD \geq 8$ ) der flüchtigen Fraktion aus Hallertauer Smaragd.

Verbindung (7) mit dem FD-Faktor 4096 und einem Geruchseindruck nach Geranie stimmte im Vergleich mit der hauseigenen Datenbank mit Myrcen überein. Nach der Fraktionierung fand sie sich in der neutral-basischen Fraktion wieder. Ein Abgleich von Verbindung (7) mit der Reinsubstanz Myrcen lieferte dieselbe Geruchsqualität, dieselbe Geruchsintensität und die gleichen Retentionsindizes auf drei verschiedenen Kapillarsäulen (FFAP, CP SiL 19 DB, CP SiL 8 CB). Sie wurde bei einem RI-Wert von 1150 auf der FFAP-Kapillarsäule, bei einem RI-Wert von 1019 auf der CP SiL 19 DB Säule und bei einem RI-Wert von 993 auf der CP SiL 8 CB Säule wahrgenommen. Die Massenspektren von Reinsubstanz und Verbindung (7) im Extrakt stimmten an dieser Stelle ebenfalls überein. Verbindung (7) wurde als **Myrcen** identifiziert.

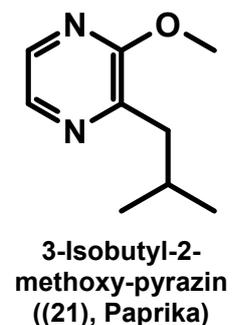


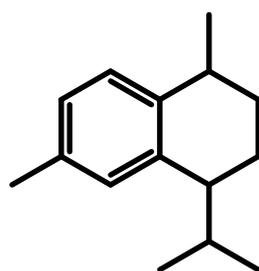
Wie Myrcen wurde auch Verbindung (23) mit dem höchsten FD-Faktor 4096 wahrgenommen und in der neutral-basischen Fraktion wiedergefunden. Die Verbindung zeichnete sich durch einen intensiven Duft nach Bergamotte aus. Verbindung (23) wurde als **Linalool** identifiziert.



Als (8) wurde ein nach Rosenöl duftender Aromastoff mit folgenden RI-Werten lokalisiert: 1848 auf FFAP, 1378 auf CP SiL 19 CB und 1260 auf CP SiL 8 CP. (8) war auch noch in 512-facher Verdünnung gut wahrnehmbar und fand sich in der neutral-basischen Fraktion wieder. Der Aromastoff wurde als **Geraniol** identifiziert.

Verbindung (21) zeigte eine auffällige Geruchsnote nach Paprika und war auch noch in 256-facher Verdünnung deutlich erkennbar. Sie fand sich in der neutral-basischen Fraktion wieder und wurde als **3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazin** identifiziert.

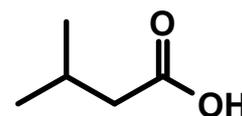




**Calamenen**  
((37), blumig, Anis)

Ein weiterer Aromastoff mit demselben hohen FD-Faktor von 256 fiel durch eine angenehm blumige, anisartige Geruchsnote auf und wurde in der neutral-basischen Fraktion wahrgenommen. (37) wurde bei folgenden RI-Werten lokalisiert: 1822 auf FFAP, 1590 auf CP SiL 19 CB und 1538 auf CP SiL 8 CB. Die RI-Werte der Datenbank ermöglichten keine Zuordnung. Der Abgleich erfolgte daher mit veröffentlichten Daten. (37) stimmte in den ermittelten RI-Werten und im Massenspektrum mit diesen Daten überein. Eine Referenzsubstanz war nicht verfügbar und konnte auch nicht in angemessener Zeit synthetisiert werden. (37) wurde mit den zur Verfügung stehenden Daten als **Calamenen** aufgeklärt.

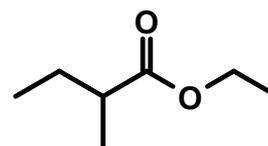
Bis zur 128-fachen Verdünnungsstufe konnte in der aciden Fraktion Verbindung (28) mit einer unangenehm schweißig riechenden Geruchsnote wahrgenommen und lokalisiert werden. Die Identifizierung ergab **3-Methylbuttersäure**.



**3-Methyl-buttersäure**  
((28), schweißig)

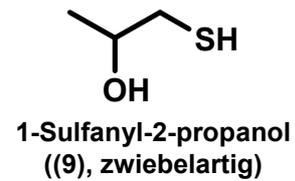
Eine noch unbekannte Substanz (45) gehörte der aciden Fraktion an, fiel durch ihren aufdringlichen Geruch nach Ziege auf und konnte bis in 64-facherer Verdünnungsstufe noch deutlich wahrgenommen werden. (45) konnte auf der FFAP Kapillarsäule bei einem RI-Wert von 2200 lokalisiert werden. Eine Zuordnung zu bisher bekannten Aromastoffen war nicht möglich; es gelang nicht ein brauchbares Massenspektrum zu erhalten.

Verbindung (3) wurden bis in 32-facher Verdünnung noch wahrgenommen und fand sich in der neutral-basischen Fraktion wieder. Die Geruchsnote war fruchtig. Diese Verbindung wurde als **Ethyl-2-methyl-butanoat** identifiziert.

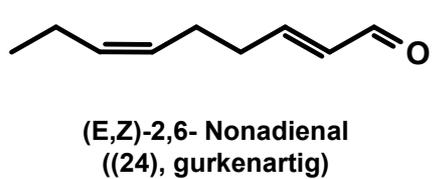


**Ethyl-2-methyl-butanoat**  
((3), fruchtig)

Verbindung (9) zeichnete sich durch ein zwiebelartiges Aroma aus. Sie war mit einem FD-Faktor von 32 in der neutralbasischen Fraktion nachweisbar und konnte durch Abgleich der eigenen mit den in SciFinder® veröffentlichten Daten unter der CAS Registriernummer 1068-47-9 als **1-Sulfanyl-2-propanol (9)**, zwiebelartig identifiziert werden.

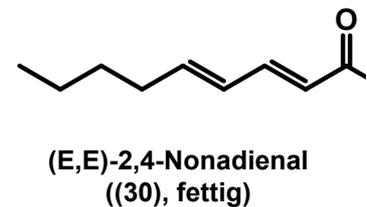


Zwei weitere Verbindungen mit einem FD-Faktor von 32 konnten in der neutralbasischen Fraktion wahrgenommen und identifiziert werden.



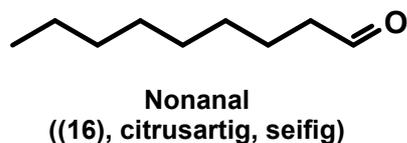
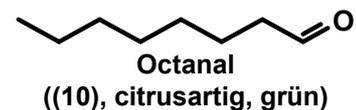
Der gurkenähnliche Geruch von Verbindung (24) wurde als **(E,Z)-2,6-Nonadienal** identifiziert.

Der fettige Geruchseindruck von Verbindung (30) konnte als das **(E,E)-2,4-Nonadienal** identifiziert werden.



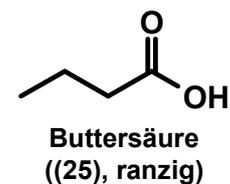
Sieben Verbindungen ließen sich bis zu einem FD-Faktor von 16 sensorisch nachweisen:

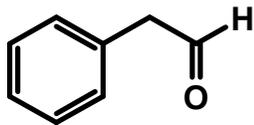
Die beiden Aromastoffe (10) und (16) in der neutralbasischen Fraktion wurden mit je einer citrusartigen Geruchsnote wahrgenommen. Die Identifizierung



führte bei Verbindung (10) zu **Octanal** (citrusartig, grün), und bei Verbindung (16) zu **Nonanal** (citrusartig, seifig).

Verbindung (25) wurde in der aciden Fraktion mit einem Geruch nach ranziger Butter bis in Verdünnungsstufe 16 wahrgenommen und konnte als **Buttersäure** identifiziert werden.

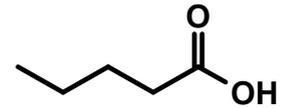




**Phenylacetaldehyd**  
((26), honigartig)

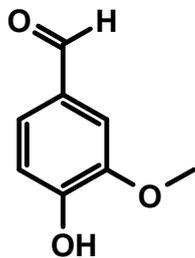
Mit Verbindung (26) wurde bis zur gleichen Verdünnungsstufe 16 in der neutral-basischen Fraktion ein nach Honig riechender Aromastoff lokalisiert und als **Phenylacetaldehyd** identifiziert.

In der aciden Fraktion gelang es, die Verbindung (32) bis zur 16-fachen Verdünnungsstufe zu lokalisieren. Ihr Geruch wurde käsig wahrgenommen. Verbindung (32) wurde als **Pentansäure** identifiziert.



**Pentansäure**  
((32), käsig)

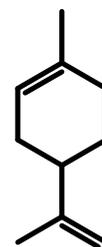
Eine unbekannte Substanz (47) mit stickig-phenolischem Geruchseindruck konnte in der aciden Fraktion zwar deutlich bis zu einem FD-Faktor von 16 lokalisiert werden, eine Identifizierung scheiterte jedoch an dem Versuch, ein eindeutiges Massenspektrum dieser Verbindung ermitteln zu können.



**Vanillin**  
((51), vanilleartig)

Ebenfalls in der aciden Fraktion wurde eine nach Vanille riechende Verbindung (51) lokalisiert. Die Verbindung konnte bis zu einem FD-Faktor von 16 wahrgenommen werden. Die Identifizierung ergab **Vanillin**.

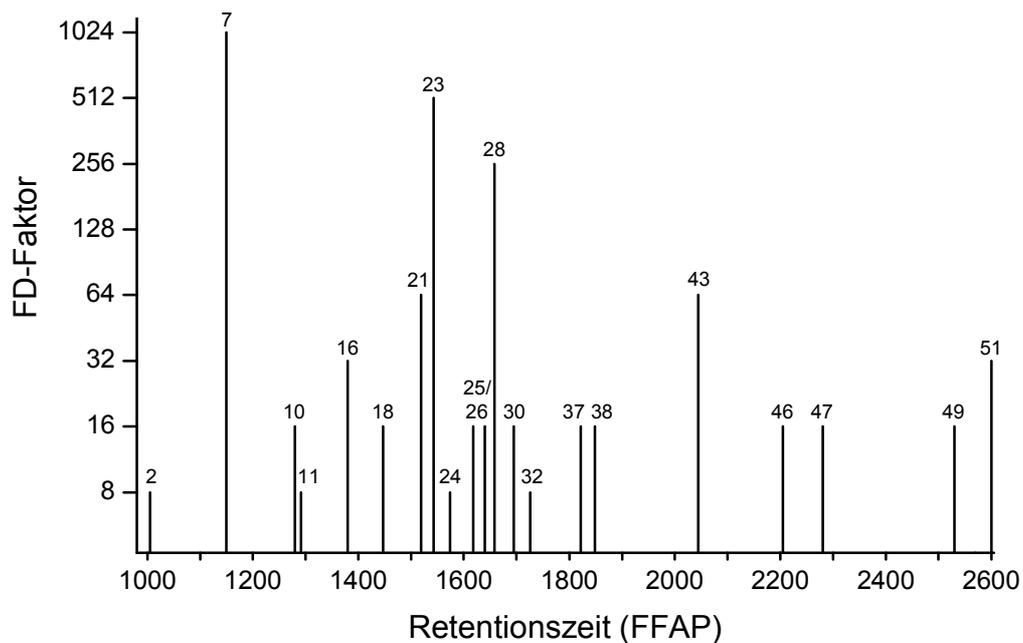
Eine citrusartig duftende Verbindung (8), der die RI-Werte 1186 auf FFAP und 1030 auf CP SiL 8 CB zugeordnet werden konnten, wurde in der neutral-basischen Fraktion wahrgenommen und als **Limonen** (8) identifiziert.



**Limonen**  
((8) citrusartig)

### 2.2.2 Hallertauer Perle

In der Sorte Hallertauer Perle sind alle Aromastoffe aufgeführt, die einen FD-Faktor von  $FD \geq 8$  aufwiesen (Abbildung 11):



**Abb. 11:** FD-Chromatogramm ( $FD \geq 8$ ) der flüchtigen Fraktion aus Hallertauer Perle.

Die intensivste Geruchsnote dieses Hopfens stammte von **Myrcen (7)**, das mit seinem geranienartigen Duft noch bei 1024-facher Verdünnung wahrnehmbar war.

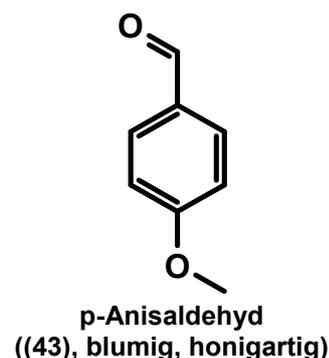
**Linalool (23)** konnte als blumige, bergamotteartige Aromanote noch bei 512-facher Verdünnung erkannt werden.

Eine Verdünnungsstufe tiefer war **3-Methylbuttersäure (28)** mit einer schweißig riechenden Note noch bei 256-facher Verdünnung wahrnehmbar.

Das erdig, paprikaartig riechende **3-Isobutyl-2-methoxypyrazin (21)** war nach 64-facher Verdünnung noch detektierbar.

Die Verbindung (**43**) war bis zu 64-facher Verdünnung detektierbar und wurde in der neutral-basischen Fraktion mit folgenden RI-Werten lokalisiert: 2044 auf FFAP und 1273 auf CP SiL 8 CB. Die Identifizierung entdeckte hinter der blumigen, honigartigen Note

**p-Anisaldehyd.**



Das citrusartig, seifig duftende **Nonanal (16)** und **Vanillin (51)**, mit seinem typischen Geruch nach Vanille, waren noch in 32-facher Verdünnung über der Geruchsschwelle detektierbar.

Das citrusartig, grün riechende **Octanal (10)** und **Phenylacetaldehyd (26)**, mit seinem typisch honigartigen Geruch, waren in 16-facher Verdünnung noch erkennbar. Gleiches galt für das blumig, anisartige **Calamenen (37)**, das nach Rose duftende **Geraniol (38)** sowie für das fettig riechende **(E,E)-2,4-Nonadienal (30)**.



(3E,5Z,9E)-Undecatetraen  
((18), fruchtig, ananasartig)

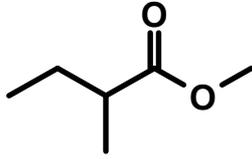
Darüber hinaus war in 16-facher Verdünnung (**18**) lokalisierbar. (**18**) wurde in der neutral-basischen Fraktion detektiert. Ihr fruchtig, ananasartiger Geruch konnte als **(3E,5Z,9E)-Undecatetraen** identifiziert werden.

Es wurden in der Verdünnungsstufe 16 aber auch zwei Verbindungen mit einem eher unangenehmen Eindruck wahrgenommen: Die ranzig riechende **Buttersäure (25)** und die unbekannte Verbindung (**47**) mit stickig, phenolischem Geruchseindruck.

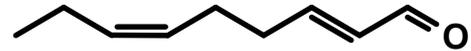
In der aciden Fraktion konnte Verbindung (**46**) als würziger Geruchseindruck wahrgenommen und lokalisiert werden. Folgende RI-Werte wurden bestimmt: 2205 auf FFAP und 1110 auf CP SiL 8 CB. Verbindung (**46**) konnte als **Sotolon** identifiziert werden.



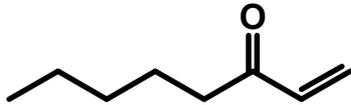
Folgende vier Verbindungen konnten bis zu einer Verdünnungsstufe von acht lokalisiert und identifiziert werden: In der neutral-basischen Fraktion fanden sich das fruchtige **Methyl-2-methyl-butanoat (2)**, das pilzartige **1-Octen-3-on (11)** und das gurkenartige riechende **(E,Z)-2,6-Nonadienal (24)** wieder.



**Methyl-2-methyl-butanoat**  
**((2), fruchtig)**



**(E,Z)-2,6-Nonadienal**  
**((24), gurkenartig)**

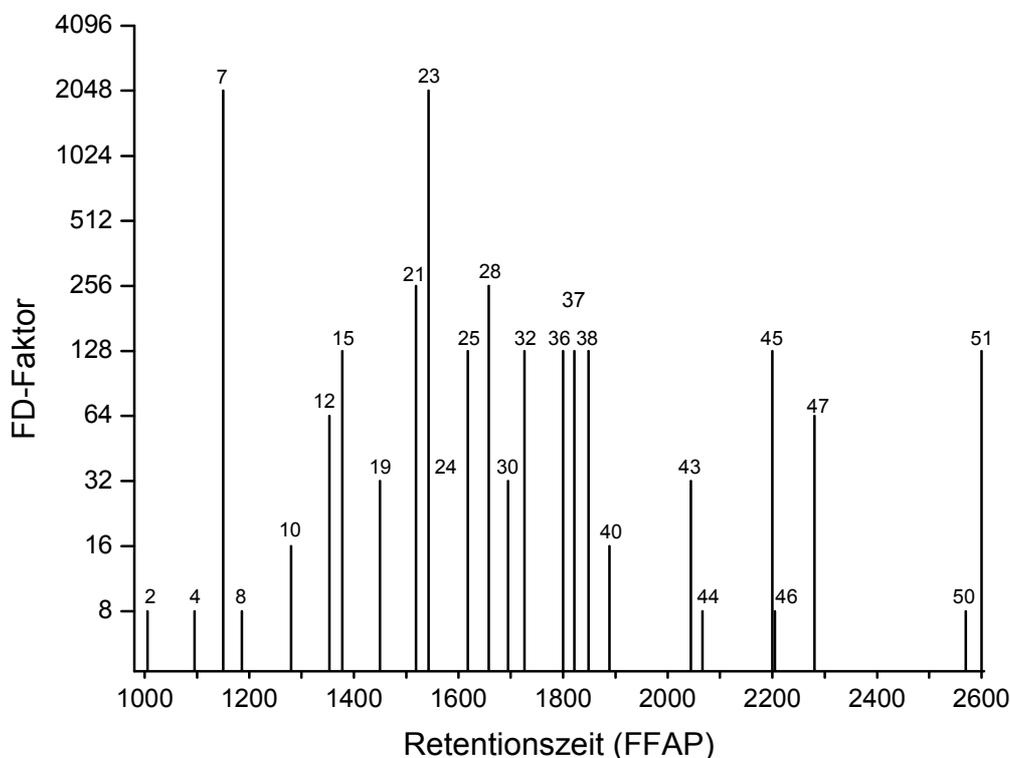


**1-Octen-3-on**  
**((11), pilzartig)**

In der aciden Fraktion dieses Hopfens wurde noch die käsige riechende **Pentansäure (32)** lokalisiert und auch identifiziert.

### 2.2.3 Hallertauer Hersbrucker Spät

Abbildung 12 zeigt das Geruchsprofil der Hallertauer Sorte Hersbrucker Spät. In dieser Sorte wurden 25 Aromaverbindungen gefunden, die FD-Faktoren von  $FD \geq 8$  aufwiesen.



**Abb. 12:** FD-Chromatogramm ( $FD \geq 8$ ) der flüchtigen Fraktion aus Hallertauer Hersbrucker Spät.

**Myrcen (7)**, geranienartig) und **Linalool (23)**, Bergamotte) konnten in 2048-facher Verdünnung noch klar geruchlich lokalisiert werden.

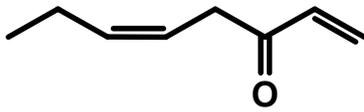
Nach 256-facher Verdünnung waren das **3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazin (21)**, erdig, paprikaartige) sowie **3-Methylbuttersäure (28)**, schweißig) deutlich erkennbar. Nach 128-facher Verdünnung waren 8 Verbindungen erkennbar:



**(3E,5Z)-1-3-5-Undecatrien**  
(15), ananasartig, citrusartig)

Verbindung (15) konnte mit einem typisch ananas-citrusartigen Geruch in der neutral-basischen Fraktion mit folgenden RI-Werten lokalisiert werden: 1378 auf FFAP, 1218 auf CP SiL 19 CB und 1178 auf CP SiL 8 CB. Die Identifizierung ergab **(3E,5Z)-1-3-5-Undecatrien**,

Darüber hinaus wurden **Buttersäure** ((25), ranzig) sowie **Pentansäure** ((32), käsig), **Calamenen** ((37), blumig, anisartig), **Geraniol** ((38), rosenartig) und **Vanillin** ((51), vanilleartig) lokalisiert und identifiziert. Die unbekannte Substanz (45) mit ihrem nach Ziege riechenden Geruch wurde in diesem Hopfen mit einem FD-Faktor von 128 wahrgenommen

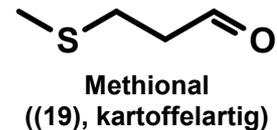


(Z)-1,5-Octadien-3-on  
((12), geranienartig)

In 64-facher Verdünnung war Verbindung (12) lokalisierbar. Sie fand sich in der neutral-basischen Fraktion mit einem geranienartigen Geruchseindruck wieder. Durch die Identifizierung entpuppte sich diese Verbindung als das **(Z)-1,5-Octadien-3-on**.

Darüber hinaus wurde mit FD-Faktor 64 eine noch unbekannte Verbindung mit stickig-phenolischem Charakter (47) detektiert.

Mit einem RI-Wert von 1450 auf FFAP und 1038 auf CP SiL 19 CB wurde eine nach Kartoffel riechende Verbindung lokalisiert. (19) konnte als **Methional** identifiziert werden.



**Methional**  
((19), kartoffelartig)

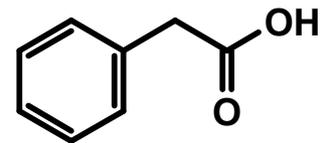
Neben Methional (19) wurden noch **(E,E)-2,4-Nonadienal** ((30), fettig) und **p-Anisaldehyd** ((43), blumig, honigartig) in 32-facher Verdünnung deutlich wahrgenommen.

Folgende zwei Verbindungen konnten in 16-facher Verdünnungsstufe wahrgenommen werden: **Octanal** ((10), citrusartig) und eine noch unbekannte Verbindung (40) mit haferflockenähnlichem Geruchseindruck und den RI-Werten 1889 auf FFAP und 1432 auf CP SiL 19 CB, die nicht weiter identifiziert werden konnte, weil kein brauchbares Massenspektrum erhalten wurde.

Sechs Verbindungen wurden bis zu 8-facher Verdünnung wahrgenommen:

**Methyl-2-methyl-butanoat** ((2), fruchtig) und zwei noch unbekannte Verbindungen (4) bzw. (44) mit fruchtigem bzw. stickig-phenolischem Charakter, sowie das citrusartig duftende **Limonen** (8) und **Sotolon** (46) mit seiner einprägsam würzigen Geruchsnote.

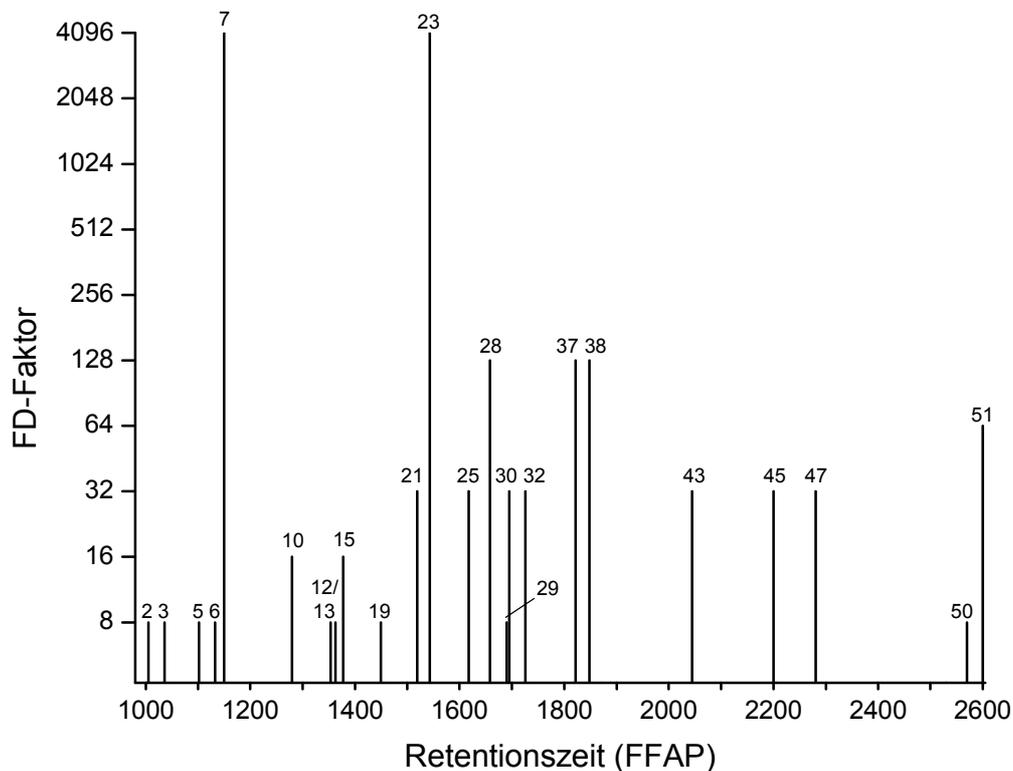
In der selben Verdünnung wurde Verbindung (50) bei einem RI-Wert von 2570 auf FFAP mit einem honigartigen Duft wahrgenommen. Die Identifizierung ergab **Phenylacetsäure**.



Phenylacetsäure  
((50), honigartig)

### 2.2.4 Slowenischer Golding

In Abbildung 13 sind die FD-Faktoren der wichtigsten Geruchsnoten im Hopfen der Sorte Slowenischer Golding dargestellt. In dieser Hopfensorte wurden 24 Aromaverbindungen mit FD-Faktoren von  $FD \geq 8$  gefunden.



**Abb. 13:** FD-Chromatogramm ( $FD \geq 8$ ) Slowenischer Golding.

**Myrcen** ((7), geranienartig) und **Linalool** ((23), Bergamotte) erreichten unter allen nachweisbaren Verbindungen den höchsten FD-Faktor von 4096.

Mit FD-Faktor 2048 fanden sich keine Verbindungen. Aromastoffe mit FD-Faktor 128 waren **Calamenen** ((37), anisartig) und **Geraniol** ((38), rosenartig) sowie **3-Methylbuttersäure** ((28), schweißig). In der Gruppe der Aromastoffe mit einem FD-Faktor von 64 war nur **Vanillin** ((51), vanillinartig) vertreten. Nach 32-facher Verdünnung fanden sich noch sieben Aromastoffe in diesem Hopfen: **3-Isobutyl-2-methoxypyrazin** ((21), erdig, paprikaartig), **(E,E)-2,4-Nonadienal** ((30), fettig), **p-Anisaldehyd** ((43), honigartig), **Buttersäure** ((25), ranzig) und **Pentansäure** ((32), käsig). Daneben fanden sich noch zwei unbekannte Verbindungen ((45), (47)) mit ziegenartigem bzw. stickig-phenolischem Geruchseindruck.

In der Gruppe aller Aromastoffe mit FD-Faktor 16 waren **Nonanal** ((10), citrusartig) sowie **(3E, 5Z)-1-3-5-Undecatrien** ((15), ananasartig) vertreten.

Zwei fruchtige Verbindungen, **Methyl-2-methyl-butanoal** (2) und **Ethyl-2-methyl-butanoal** (3), waren in der achtfachen Verdünnungsstufe noch erkennbar, zudem zeigte sich eine unbekannte Verbindung (5) mit einem kaffeeartigen Geruchseindruck.



**Z-3-Hexenal**  
(Nr. 6, grasig, grün)

Verbindung (6) konnte in der neutral-basischen Fraktion mit einer grasig-grünen Geruchsnote wahrgenommen werden. Die RI-Werte betragen 1133 auf FFAP, 883 auf CP SiL 19 CB und 802 auf

CP SiL 8 CB. (6) konnte als **Z-3-Hexenal** identifiziert werden.

Weitere Verbindungen in dieser achten Verdünnungsstufe waren **Z-1,5-Octadien-3-on** ((12), geranienartig) und eine schweflig, kohlig riechende Verbindung (13) in der neutral-basischen Fraktion, die sich später durch Identifizierung als **Dimethyltrisulfid** herausstellte.

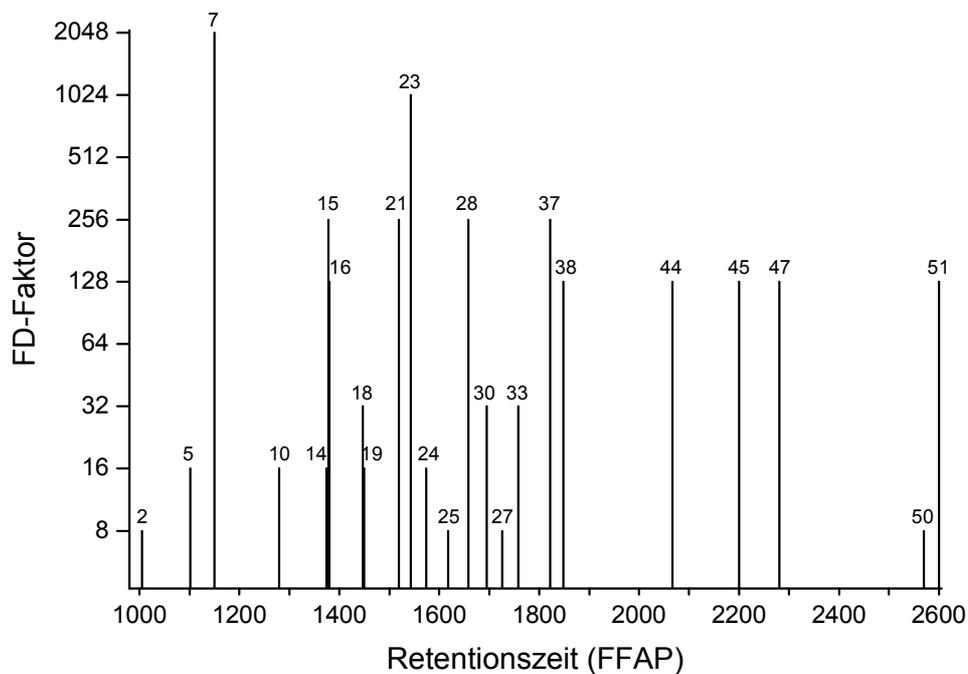


**Dimethyltrisulfid**  
(Nr. 13, schweflig, kohlig)

Daneben fanden sich **Phenyllessigsäure** ((50), honigartig) und eine unbekannte Verbindung (29), die einen stechenden, an Lösungsmittel erinnernden Geruchseindruck hinterließ.

### 2.2.5 Yakima Cascade

In der Sorte Yakima Cascade (YCA) wurden 25 Aromaeindrücke gefunden, die FD-Faktoren von  $FD \geq 8$  aufwiesen. Abbildung 14 zeigt das FD-Chromatogramm für Yakima Cascade.



**Abb. 14:** FD-Chromatogramm ( $FD \geq 8$ ) der flüchtigen Fraktion aus Yakima Cascade.

Als ein Schlüsselaromastoff des Yakima Cascades wurde **Myrcen** detektiert ((**7**), geranienartig), das noch in 2048-facher Verdünnung geruchlich wahrnehmbar war. **Linalool** (**23**) war mit seiner intensiv blumigen und nach Bergamotte riechenden Aromate noch bei 1024-facher Verdünnung gut wahrnehmbar. **(3E, 5Z)-1-3-5-Undecatrien** ((**15**), ananasartig, citrusartig) war noch bei 256-facher Verdünnung erkennbar. Das gleiche galt für **3-Isobutyl-2-methoxypyrazin** ((**21**), erdig, paprikaartig), **Calamenen** ((**37**), blumig, anisähnlichen) sowie für die **3-Methylbuttersäure** ((**28**), schweißiger Geruchseindruck), die alle jeweils noch bei Verdünnungsstufen von 256 eindeutig wahrnehmbar waren.

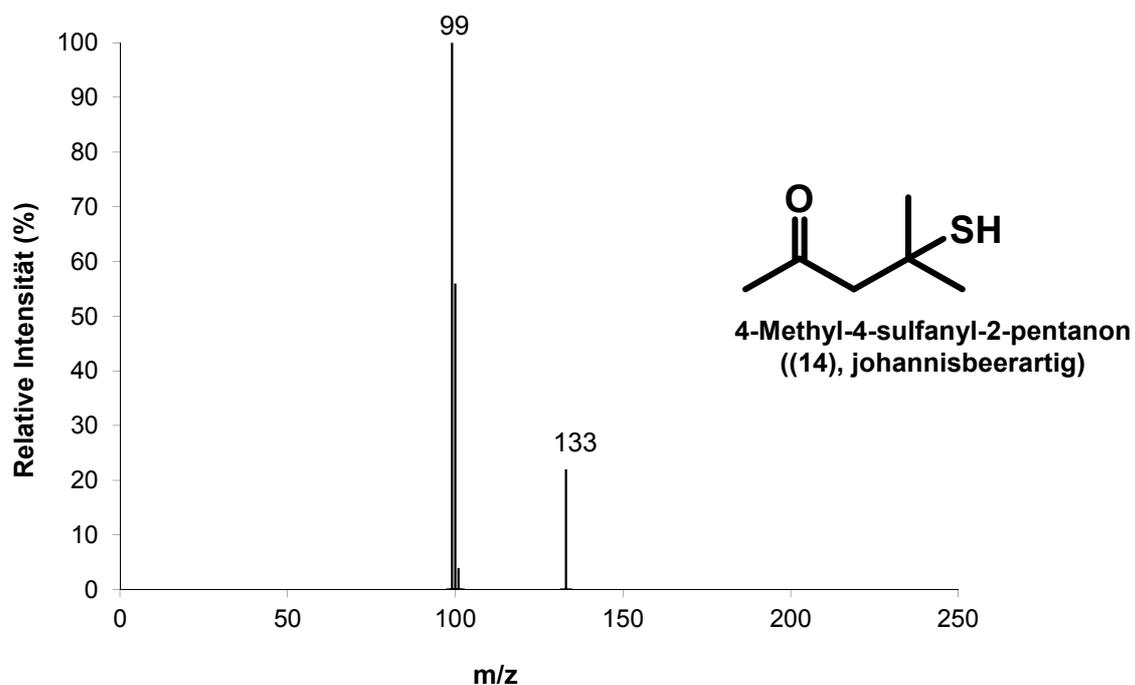
**Nonanal** ((**16**), citrusartig), **Geraniol** ((**38**), rosenartig) und **Vanillin** ((**51**), vanilleartig) waren noch bei 128-facher Verdünnung detektierbar.

Das galt auch für drei noch unbekannte Verbindungen: **(44)**, unangenehm stickig, **(45)**, nach Ziege riechend sowie Verbindung **(47)**, stickig phenolisch.

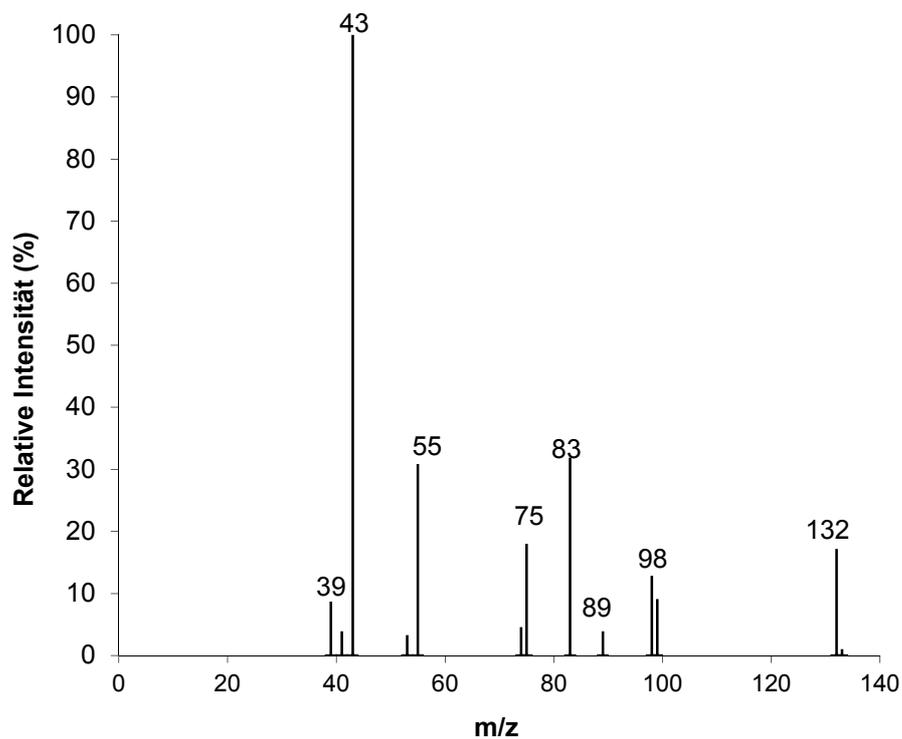
**(3E,5Z,9E)-Undecatetraen**, (**(18)**, ananasartig), **(E,E)-2,4-Nonadienal** (**(30)**, fettiger Geruchseindruck) sowie eine noch unbekannte Substanz mit blumiger Note **(33)** waren nach 32-facher Verdünnung noch erkennbar.

Eine nach Lösungsmittel beziehungsweise an Kaffee erinnernde, noch unbekannte Verbindung **(5)** war bis FD-Faktor 16 geruchsaktiv, ebenso **Octanal** (**(10)**, citrusartig) und eine nach Johannisbeere riechende Verbindung **(14)**.

Die RI-Werte von **(14)** konnten zu 1374 auf FFAP und 937 auf CP SiL 8CB bestimmt werden. Es gelang zunächst aber nicht, ein brauchbares Massenspektrum zu erhalten. Der Geruch ließ eine thiolgruppenhaltige Verbindung in sehr niedriger Konzentration vermuten. Zur Aufkonzentrierung und Abtrennung dieses Aromastoffs wurde daher die neutralbasische Fraktion des Hopfenextrakts, in der die Verbindung lokalisiert worden war, einer Affinitätschromatographie mit Affigel 501 unterzogen. Eine Chromatographiesäule mit Glasfritte wurde dazu mit Affinitätsgel befüllt. Das Gel wurde anschließend mit Isopropanol gewaschen. Dann wurde der Hopfenextrakt auf die Säule gegeben. Nach Aufgabe der Probe wurde mit einem Gemisch aus Pentan/Dichlormethan nachgespült. Anschließend wurden die an die Säule gebundenen Thiole mittels Dithiotreitollösung aus dem Affigel freigesetzt. Die Abtrennung der flüchtigen thiolhaltigen Verbindungen von Dithiotreitoll erfolgte durch Destillation des Eluats im Hochvakuum. Das Destillat wurde eingeeengt und mittels zweidimensionaler Gaschromatographie analysiert. Dazu musste die johannisbeerartige Verbindung zunächst am ersten Gaschromatographen geruchlich lokalisiert werden, um sie dann im Verlauf von bis zu sechs weiteren Einspritzungen in der daran angeschlossenen Kühlfalle sammeln zu können. Die Kühlfalle wurde anschließend ausgeheizt, zeitgleich startete ein der Kühlfalle nachgelagerter zweiter Gaschromatograph. Von dort wurde die Verbindung letztlich einem Massenspektrometer zugeführt. Die Identifizierung ergab: Das Massenspektrum stimmte mit den Daten der institutseigenen Datenbank überein. Ein Vergleich mit der zuvor synthetisierten Reinsubstanz anhand von RI-Werten und Massenspektren bestätigte, dass es sich bei Verbindung **(14)** um **4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon** handelte.



**Abb. 15:** Massenspektrum (MS-Cl), GCMS, OC, FFAP, 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanone, Affigelextrakt aus Hopfenpellets der Sorte Yakima Cascade.



**Abb. 16:** Massenspektrum (MS-EI), GCMS, OC, FFAP, von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanone, Affigelextrakt aus Hopfenpellets der Sorte Yakima Cascade.

In der 16-fachen Verdünnungsstufe wurden neben 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon auch noch **Methional** ((19), kartoffelartig) und **(E,Z)-2,6-Nonadienal** ((24), gurkenähnlich) lokalisiert und identifiziert.

Bis zu einer 8-fachen Verdünnung waren das fruchtige Aroma von **Methyl-2-methylbutanoat** (2) sowie der käsige Eindruck der **Buttersäure** ((25), käsig) und der **Pentansäure** ((32), käsig) als auch die honigartige Aromanote von **Phenyllessigsäure** ((50), honigartig) wahrnehmbar.

In der gleichen Verdünnungsstufe acht konnte der harzig, blumige Geruchseindruck von Verbindung (27) aus der neutral-basischen Fraktion folgenden RI-Werten zugeordnet werden: 1655 auf FFAP, 1463 auf CP SiL 19 CB, und 1468 auf CP SiL 8 CB. Die Identifizierung ergab das für Hopfen spezifische  **$\alpha$ -Humulen** (27).

## 2.2.6 Charakterisierung qualitativer Unterschiede in wertgebenden Geruchsstoffen

### Vergleich der Hopfensorten nach Geruchseindrücken

Um die Unterscheidbarkeit in wertgebenden Geruchsstoffen zu charakterisieren, wurden die Ergebnisse aus der Aromaextraktverdünnungsanalyse anhand der lokalisierten Geruchseindrücke miteinander verglichen. Insgesamt wurden 51 Aromastoffe gefunden, die in mindestens einem der fünf Hopfensorten ab einer Verdünnungsstufe von vier und höher (FD-Faktor  $\geq 4$ ) nachweisbar waren.

**Tabelle 4:** Gegenüberstellung von Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Hallertauer Hersbrucker (HHE), Slowenischer Golding (SLGO), und Yakima Cascade (YCA), Erntejahrgang 2005, anhand von FD-Faktoren aromaaktiver Verbindungen.

Nr.	Aromastoff <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	FD-Faktor <sup>c)</sup>					Fraktion <sup>d)</sup>	RI <sup>e)</sup> (Retentionsindex)		
			HSD	HPE	HHE	SLGO	YCA		FFAP	CP SiL 19 CB	CP SiL 8 CB
1	Ethyl-2-methyl-propanoat <sup>f)</sup>	fruchtig	2	2	<1	<1	<1	NF	975	815	757
2	Methyl-2-methyl-butanoat	fruchtig	4	8	8	8	8	NF	1005	833	772
3	Ethyl-2-methyl-butanoat	fruchtig	32	4	<1	8	<1	NF	1036	908	848
4	unbekannt	fruchtig	4	4	8	<1	<1	NF	1095	-	-
5	unbekannt	Lösungsmittel, Kaffee	4	2	4	8	16	AF	1102	-	-
6	Z-3-Hexenal	grün-grasig	2	4	<1	8	<1	NF	1133	883	802
7	Myrcen	Geranie	4096	1024	2048	4096	2048	NF	1150	1019	993
8	Limonen	citrus	8	4	8	2	<1	NF	1186	-	1030
9	1-Sulfanyl-2-propanol <sup>e)</sup>	Zwiebel	32	4	4	<1	<1	NF	1251	880	932
10	Octanal	Citrus	16	16	16	16	16	NF	1280	1006	1090
11	1-Octen-3-on <sup>f)</sup>	pilzig	4	8	<1	2	<1	NF	1291	1071	979
12	Z-1,5-Octadien-3-on	Geranie	4	<1	64	8	<1	NF	1353	1080	-
13	Dimethyltrisulfid	Kohlartig-schweflig	<1	<1	<1	8	<1	NF	1363	1043	969
14	4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on	Johannisbeere	2	<1	<1	<1	16	NF	1374	-	937

**Tabelle 4:** Fortsetzung

Nr.	Aromastoff <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	FD-Faktor <sup>c)</sup>					Fraktion <sup>d)</sup>	RI <sup>e)</sup> (Retentionsindex)		
			HSD	HPE	HHE	SLGO	YCA		FFAP	CP SiL 19 CB	CP SiL 8 CB
15	(3E,5Z)-1-3-5-Undecatrien	Ananas, Citrus	<1	2	128	16	256	NF	1378	1218	1178
16	Nonanal	Citrus	16	32	2	<1	128	NF	1380	1190	1102
18	(3E,5Z,9E)-Undecatetraen	fruchtig, Ananas	<1	16	<1	<1	32	NF	1447	1229	1178
19	Methional	gekochte Kartoffel	4	4	32	8	16	NF	1450	1038	-
20	unbekannt	frisch, fruchtig	<1	<1	4	<1	<1	NF	1498	-	-
21	3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazin	erdig, Paprika	256	64	256	32	256	NF	1519	1241	1184
22	unbekannt	gekochte Mandel	4	<1	4	2	2	NF	1529	-	-
23	Linalool	Bergamotte	4096	512	2048	4096	1024	NF	1543	1196	1102
24	(E,Z)-2,6-Nonadienal	Gurke	32	8	4	4	16	NF	1574	1157	1276
25	Buttersäure	ranzig	16	16	128	32	8	AF	1618		
26	Phenylacetaldehyd	honigartig	16	16	<1	2	<1	NF	1640	1173	-
27	$\alpha$ -Humulen	harzig, blumig	4	4	4	4	8	NF	1655	1463	1468
28	3-Methyl-buttersäure	schweißig	128	256	256	128	256	AF	1658	-	-
29	unbekannt	stechend, Lösungsmittel	<1	<1	<1	8	<1	NF	1690	-	-

Tabelle 4: Fortsetzung

Nr	Aromastoff <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	FD-Faktor <sup>c)</sup>					Fraktion <sup>d)</sup>	RI <sup>e)</sup> (Retentionsindex)		
			HSD	HPE	HHE	SLGO	YCA		FFAP	CP SiL 19 CB	CP SiL 8 CB
30	(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig	32	16	32	32	32	NF	1695	1346	1220
31	unbekannt	blumig, Honig	8	2	4	<1	<1	NF	1721	-	-
32	Pentansäure	käsigt	16	8	128	32	8	AF	1726	-	-
33	unbekannt	blumig	<1	<1	4	<1	32	NF	1758	-	-
34	p-Methyl-acetophenon <sup>f)</sup>	blumig, mandelartig	<1	<1	<1	4	2	NF	1776	-	-
35	(E,E)-2,4-Decadienal <sup>f)</sup>	fettig, frittiert	<1	<1	<1	2	<1	NF	1805	-	-
36	Germacren (B) <sup>e)</sup>	terpenig, pilzig	<1	<1	128	<1	<1	NF	1800	-	1574
37	Calamenen <sup>e)</sup>	blumig, Anis	256	16	128	128	256	NF	1822	1590	1538
38	Geraniol	Rose	512	16	128	128	128	NF	1848	1378	1260
39	unbekannt	kokosartig	<1	<1	<1	2	<1	NF	1872	-	-
40	unbekannt	Haferflocke	<1	<1	16	2	<1	NF	1889	1432	-
41	unbekannt	phenolisch, medizinisch	4	<1	<1	<1	<1	AF	1970	-	-
43	p-Anisaldehyd	blumig, honigartig	<1	64	32	32	<1	AF	2044	-	1273
44	unbekannt	stickig, phenolisch	16	<1	8	<1	128	AF	2067	-	-

**Tabelle 4:** Fortsetzung

Nr	Aromastoff <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	FD-Faktor <sup>c)</sup>					Fraktion <sup>d)</sup>	RI <sup>e)</sup> (Retentionsindex)		
			HSD	HPE	HHE	SLGO	YCA		FFAP	CP SiL 19 CB	CP SiL 8 CB
45	unbekannt	Ziege	64	4	128	32	128	AF	2200	-	-
46	Sotolon	würzig	<1	16	8	4	<1	AF	2205	-	1110
47	unbekannt	stickig, phenolisch	16	16	64	32	128	AF	2281	-	-
49	unbekannt	harzig	4	16	<1	4	<1	AF	2530	-	-
50	Phenyllessigsäure	honigartig	4	2	8	8	8	AF	2570	-	-
51	Vanillin	vanilleartig	16	32	128	64	128	AF	2600	-	1402

<sup>a)</sup> Identifizierung der Aromastoffe anhand ihrer Retentionszeiten auf den in der Tabelle angegebenen Kapillarsäulen sowie anhand des Geruchseindrucks und des Geruchsschwellenwerts am Sniffing Port im Vergleich zu Referenzsubstanzen und aufgrund der Massenspektren (MS-EI, MS-CI)

<sup>b)</sup> Ermittelter Geruchseindruck am „Sniffing Port“ (olfaktorischen Detektor) des Gaschromatographen

<sup>c)</sup> Flavor-Dilution-Faktor (Verdünnungsfaktor)

<sup>d)</sup> Fraktion, in welcher der Aromastoff im Rahmen der Aromaextraktverdünnungsanalyse detektiert werden konnte. NBF: nneutral /basic volatiles (neutral / basische Aromastoffe) ; AV: acidic volatiles, saure Aromastoffe

<sup>e)</sup> Referenzsubstanz stand nicht zur Verfügung, Identifizierung erfolgte durch Abgleich mit veröffentlichten Daten.

<sup>f)</sup> MS-Daten waren zu schwach; die Auswertung erfolgte anhand der übrigen Kriterien unter a) Von den restlichen 15 Aromastoffen gelang es den teilweise sehr charakteristischen Geruchseindruck zu beschreiben und die Retentionsindizes auf Säulen unterschiedlicher Polarität zu ermitteln. Es ließen sich folgende Unterschiede und Gemeinsamkeiten erkennen (sortiert nach absteigenden FD-Faktoren):

Das Aroma aller fünf Hopfensorten wurde besonders von Myrcen (**7**) und Linalool (**23**) geprägt. Myrcen (**7**) zeigte FD-Faktoren von 1024 bis 4096, und für Linalool (**23**) wurden Werte zwischen 512 und 4096 ermittelt. Der geringste Wert wurde in der Sorte Hallertauer Perle detektiert. Ursache dafür ist die nahe Verwandtschaft dieses Hopfens zur Familie der Bitterhopfen die gewöhnlich aromaschwächer sind. Der dritthöchste FD-Faktor wurde für Geraniol (**38**) gemessen. Die FD-Werte lagen zwischen 16 in der Hallertauer Perle und 512 im Hallertauer Smaragd. Diese beide Sorten unterschieden sich im Geraniolgehalt deutlich voneinander, während in den übrigen drei Sorten Hallertauer Hersbrucker, Slowenischer Golding und Yakima Cascade, jeweils der selbe hohe FD-Faktor von 256 ermittelt wurde. Neben Myrcen (**7**), Linalool (**23**) und Geraniol (**38**) war auch 3-Methylbuttersäure (**28**) ein wichtiger Aromastoff. 3-Methylbuttersäure (**28**) konnte bis in die 256 fache Verdünnungsstufe detektiert werden. Die Sorten unterschieden sich diesbezüglich nicht nennenswert voneinander. Die FD-Faktoren von 3-Methylbuttersäure (**28**) im Hallertauer Smaragd und Slowenischer Golding lagen nur eine Verdünnungsstufe tiefer als in den übrigen drei Sorten. Ein weiterer Aromastoff fiel durch hohe FD-Faktoren auf: Calamenen (**37**). Der charakteristisch blumige Geruchseindruck, den diese auch in hohen Verdünnungsstufen noch wahrnehmbare Verbindung im Hopfen hervorrief, war im Verlauf der bisherigen Hopfenforschung nicht aufgefallen, obwohl Calamenen (**37**) bereits 1978 als Inhaltsstoff im Hopfenöl der Sorten Spalter (Tressl et al., 1978 b) und Hersbrucker Spät (Tressl et al., 1983) nachgewiesen werden konnte. Die Sorten Hallertauer Smaragd, Yakima Cascade, Hallertauer Hersbrucker und Slowenischer Golding waren sich im Calamengehalt sehr ähnlich (FD-Faktoren 128 - 256). Nur in der Sorte Hallertauer Perle lag der Calamengehalt deutlich darunter (FD-Faktor 16). 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin (**21**) war in allen fünf Hopfensorten deutlich geruchsaktiv und zeigte in den Sorten Hallertauer Smaragd, Hallertauer Hersbrucker und Yakima Cascade mit einem FD-Faktor von jeweils 256 die höchsten Werte. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin (**21**) wurde in dieser Arbeit erstmals als Hopfenaromastoff beschrieben. Es konnte in der Sorte Hallertauer Perle bis zu einer Verdünnungsstufe von 64, und im Slowenischen Golding bis zu einem FD-Faktor von 32 geruchlich wahrgenommen werden. Ein weiterer Hopfenaromastoff mit relativ hohem FD-Faktor war Vanillin (**51**). Im Hallertauer Hersbrucker und im Yakima Cascade konnte Vanillin (**51**) bis in Verdünnungsstufe 128 wahrgenommen werden. Im Slowenischen Golding

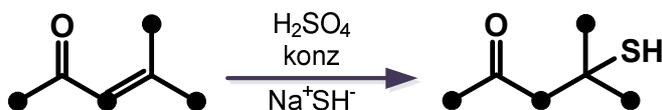
lag der Wert eine, Verdünnungsstufe, in der Hallertauer Perle zwei, und im Hallertauer Smaragd drei Verdünnungsstufen darunter. Hallertauer Hersbrucker unterscheidet sich von den anderen Sorten durch den Gehalt an Germacren (B) **(36)**. Germacren (B) konnte nur im Hallertauer Hersbrucker detektiert werden. Es war bis zur 128-fachen Verdünnungsstufe wahrnehmbar. Auch Buttersäure **(25)** und Pentansäure **(32)** konnten im Hallertauer Hersbrucker bis zur 128-fachen Verdünnungsstufe detektiert werden. Hallertauer Hersbrucker unterschied sich damit um vier Verdünnungsstufen vom Yakima Cascade, jedoch nur um zwei bis drei Verdünnungsstufen von den übrigen Sorten. Zusätzlich wurde der Aromaeindruck von Yakima Cascade durch Nonanal **(16)** und von zwei phenolisch-stickig riechende Verbindungen **(44)** und **(47)** geprägt. Diese beiden Verbindungen und Nonanal erreichten im Yakima Cascade jeweils einen FD-Faktor von 128. Für Nonanal **(16)** konnte in der Hallertauer Perle nur ein FD-Faktor von 32, im Hallertauer Smaragd von 16, und in der Sorte Hallertauer Hersbrucker von zwei ermittelt werden. Im Unterschied dazu war Nonanal **(16)** im Slowenischen Golding geruchlich nicht wahrnehmbar. p-Anisaldehyd **(43)**, welches an dieser Stelle erstmals als Hopfenaromastoff genannt wird, wurde in den Sorten Hallertauer Perle mit einem FD-Faktor von 64 detektiert. Im Slowenischen Golding und im Hallertauer Hersbrucker wurden für p-Anisaldehyd **(43)** FD-Faktoren von jeweils 32 ermittelt. In den Sorten Hallertauer Smaragd und Yakima Cascade konnte p-Anisaldehyd **(43)** geruchlich nicht detektiert werden. Ebenfalls mit FD-Faktor 64 wurde in der Sorte Hallertauer Hersbrucker Z-1,5-Octadien-3-on **(12)** gemessen. Der Hopfen unterschied sich damit von den Sorten Hallertauer Perle und Yakima Cascade, in denen Z-1,5-Octadien-3-on **(12)** geruchlich nicht wahrgenommen werden konnte, sowie vom Hallertauer Smaragd und vom Slowenischen Golding, in denen dieser Aromastoff nur bis zur vierten beziehungsweise bis zur achten Verdünnungsstufe wahrnehmbar war. Das zwiebelartig riechende 1-Sulfanyl-2-propanol **(9)**, wurde hier erstmals als Hopfenaromastoff erkannt. Es bestimmte wesentlich den Sortenunterschied von Hallertauer Smaragd gegenüber den anderen Sorten. In der Literatur wurde es als Aromastoff von erhitztem Knoblauch beschrieben, der sich unter Hitzeeinwirkung bei 180 °C in wässriger Lösung aus Deoxyalliin, einem Aromastoffprecursor, im Knoblauch bildete (Yu et al., 1994). Das 1-Sulfanyl-2-propanol **(9)** war im Hallertauer Smaragd bis in Verdünnungsstufe 32 geruchlich aktiv, nicht jedoch im Slowenischen Golding und im Yakima Cascade. In der Hallertauer Perle und im Hallertauer Hersbrucker wurde für 1-Sulfanyl-2-propanol **(9)** jeweils

ein FD-Faktoren von vier detektiert. Für Ethyl-2-methyl-butanoat (**3**) wurde im Hallertauer Smaragd ein vergleichsweise hoher FD-Faktor von 32 gemessen. Das ist ein deutlicher Unterschied gegenüber den Sorten Hallertauer Hersbrucker und Yakima Cascade, in denen Ethyl-2-methyl-butanoat (**3**) nicht auffiel (FD-Faktor <1). Yakima Cascade und Hallertauer Perle unterschieden sich wiederum von Hallertauer Hersbrucker sowie Hallertauer Smaragd und Slowenischem Golding bezüglich (3E,5Z,9E)-Undecatetraen (**18**). Dieser Aromastoff konnte im Yakima Cascade bis zur Verdünnungsstufe 32 detektiert werden, während es in den genannten Sorten nicht wahrgenommen wurde (FD-Faktor <1). Methional (3-Methyl-thiopropional; (**19**)) war in allen fünf Hopfensorten detektierbar, allerdings wieder mit unterschiedlich hohen FD-Faktoren. Im Hallertauer Hersbrucker wurde mit FD-Faktor 32 der höchste Wert an Methional gemessen, gefolgt von den Sorten Yakima Cascade (FD-Faktor 16) und Slowenischer Golding (FD-Faktor 8). Schwach detektierbar (FD-Faktor 4) war Methional in den Sorten Hallertauer Smaragd und Hallertauer Perle. Das (E,Z)-2,6-Nonadienal konnte in der Sorte Hallertauer Smaragd bis zur Verdünnungsstufe 32 wahrgenommen werden. Der zweithöchste Wert wurde im Yakima Cascade gemessen (FD-Faktor 16). In den übrigen drei Sorten war es sensorisch nur relativ schwach nachweisbar. Hallertauer Hersbrucker unterschied sich von den anderen Sorten durch einen nach Haferflocke riechenden Aromastoff (**40**) der in dieser Sorte bis in Verdünnungsstufe 16 und im Slowenischen Golding nur bis zu einem FD-Faktor von 2 wahrnehmbar war. In den übrigen Sorten war diese unbekannte Verbindung (**40**) nicht detektierbar. Phenylacetaldehyd (**26**) hatte in den Sorten Hallertauer Smaragd und Hallertauer Perle jeweils einen FD-Faktor von 16. Sie unterschieden sich damit deutlich vom Hallertauer Hersbrucker und vom Yakima Cascade, in denen Phenylacetaldehyd nicht geruchlich detektiert wurde. Für die würzige Note in Hopfen war der Aromastoff Sotolon (3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon; (**46**)) mitbestimmend. Sotolon wurde in dieser Arbeit erstmals als würziger Hopfenaromastoff beschrieben. Seine einprägsam würzige Note nach „Maggi“ beziehungsweise Liebstöckel war in den Sorten Hallertauer Perle, Hallertauer Hersbrucker und Slowenischer Golding mit FD-Faktoren von 16, 8 und 4 geruchlich detektierbar. Damit unterschieden sich diese drei Sorten deutlich von Yakima Cascade und Hallertauer Smaragd, in denen Sotolon nicht geruchlich detektiert werden konnte. Bei der Gegenüberstellung der fünf Hopfensorten zeigt sich, dass die Unterschiede insbesondere gegenüber der Sorte Yakima Cascade besonders deutlich ausgeprägt wa-

ren, während sich die übrigen Sorten weniger deutlich voneinander unterschieden. Die für den deutlichen Unterschied von Yakima Cascade zu den übrigen Sorten verantwortliche aromaaktive Verbindung wurde als 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon (**14**) identifiziert. 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon (**14**) nahm aufgrund seiner Geruchsin-tensität eine Sonderstellung unter den Hopfenaromastoffen ein. Schon in geringsten Konzentrationen (1,8 - 2,9 µg/kg Hopfen) vermittelte es einen fruchtartigen Geruchs-eindruck, der je nach Konzentration von grapefruchtartig bis johannisbeerartig bis schweflig in einen aufdringlichen an Katzenurin erinnernden Geruchseindruck um-schlug. Wie hier erstmals gezeigt werden konnte, war das geruchlich hoch aktive 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon (**14**) der Schlüsselaromastoff von Yakima Cascade. 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon (**14**) wurde darüber hinaus auch in der Sorte Hallertauer Smaragd entdeckt, dort war es aber mit einem FD-Faktor von 2 nahezu bedeu-tungslos für das Aroma dieser Hopfensorte. Ein weiterer Aromastoff der bis in Ver-dünnungsstufe 16 wahrgenommen werden konnte war Octanal (**10**). Erkennbare Sortenunterschiede ergaben sich aber durch Octanal (**10**) nicht. Z-3-Hexenal (**6**) er-reichte im Slowenischen Golding einen FD-Faktor von acht. Es unterschied sich da-mit vom Hallertauer Hersbrucker und vom Yakima Cascade in denen Z-3-Hexenal (**6**) nicht geruchlich detektiert wurde. Ein weiterer Sortenunterschied war bei Dimethyltri-sulfid (**13**) erkennbar. Es konnte nur im Slowenischen Golding geruchlich detektiert werden, genauso wie eine unbekannte Verbindung mit stechend-lösungsmittelartigem Geruch (**29**). Die pilzige Geruchsnote des 1-Octen-3-on (**11**) wurde nur in der Sorte Hallertauer Perle bis in Verdünnungsstufe acht registriert. Das ist ein deutlicher Unterschied zu den Sorten Hallertauer Hersbrucker und Yakima Cascade in denen diese Verbindung nicht geruchlich detektiert wurde. Schließlich unterschied sich die Sorte Hallertauer Hersbrucker von den Sorten Slowenischer Golding und Yakima Cascade durch eine unbekannte Verbindung mit fruchtigem Ge-ruch (**4**).

### 2.3 Quantitative Bestimmung ausgewählter Aromastoffe

Aromastoffe, die im Hopfen in größeren Mengen vorhanden waren, wurden nach 4.5.9 mittels HRGC und Integrator quantifiziert. Dieses Verfahren wurde für Myrcen angewandt. Dazu wurden im Chromatogramm die Flächen unter den Peaks von internem Standard  $\alpha$ -Phellandren und Myrcen unter Berücksichtigung des Responsefaktors durch Integration ermittelt. Alle anderen Aromastoffe wurden nach dem Verfahren der Isotopenverdünnungsanalyse quantifiziert. Die dazu notwendigen isoto-  
 penmarkierten Standards standen bis auf eine Ausnahme alle zur Verfügung. Zur Quantifizierung von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon wurde [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methyl-4-sulfanyl-  
 pentan-2-on aus käuflich erworbenem [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methylpent-3-en-2-on (Mesityloxid) synthetisiert. Dazu wurde markiertes Mesityloxid nach 4.2.2 in einem mit Septum verschlossenen Reaktionsgefäß nacheinander unter mehrstündigem Rühren mit konzentrierter Schwefelsäure, Natriumhydrogensulfid und Wasser versetzt.



**Abb. 17:** Synthese von [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon aus [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methylpent-3-en-2-on (Mesityloxid).

Das gebildete [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methyl-sulfanyl-pentan-2-on wurde mit Diethylether extrahiert und mit Natronlauge aus dem Ether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit Salzsäure auf pH 3 angesäuert. Anschließend wurde [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methyl-4-sulfanyl-  
 pentan-2-on durch Extraktion in Pentan überführt und über Natriumsulfat getrocknet. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Teil der unmarkierten Verbindung bekannter Konzentration mit einer Lösung von Methyl-octanoat bekannter Konzentration im Verhältnis 1+1, 2+1 und 1+2 verdünnt und über HRGS/FID analysiert. Aus der Peakflächenauswertung wurde ein Responsefaktor  $R_f$  ermittelt.

$$R_f = \frac{(\text{Konzentration der unmarkierten Verbindung}) \cdot (\text{Peakfläche des Methyl-octanoatstandard})}{(\text{Konzentration des Methyl-octanoatstandard}) \cdot (\text{Peakfläche der unmarkierten Verbindung})}$$

Anschließend wurde ein definierter Teil der markierten Verbindung mit den gleichen Volumenverhältnissen Methyloctanoatlösung versetzt. Aus den mittels HRGC /FID ermittelten Peakflächen wurde die Konzentration  $c$  der markierten Verbindung berechnet.

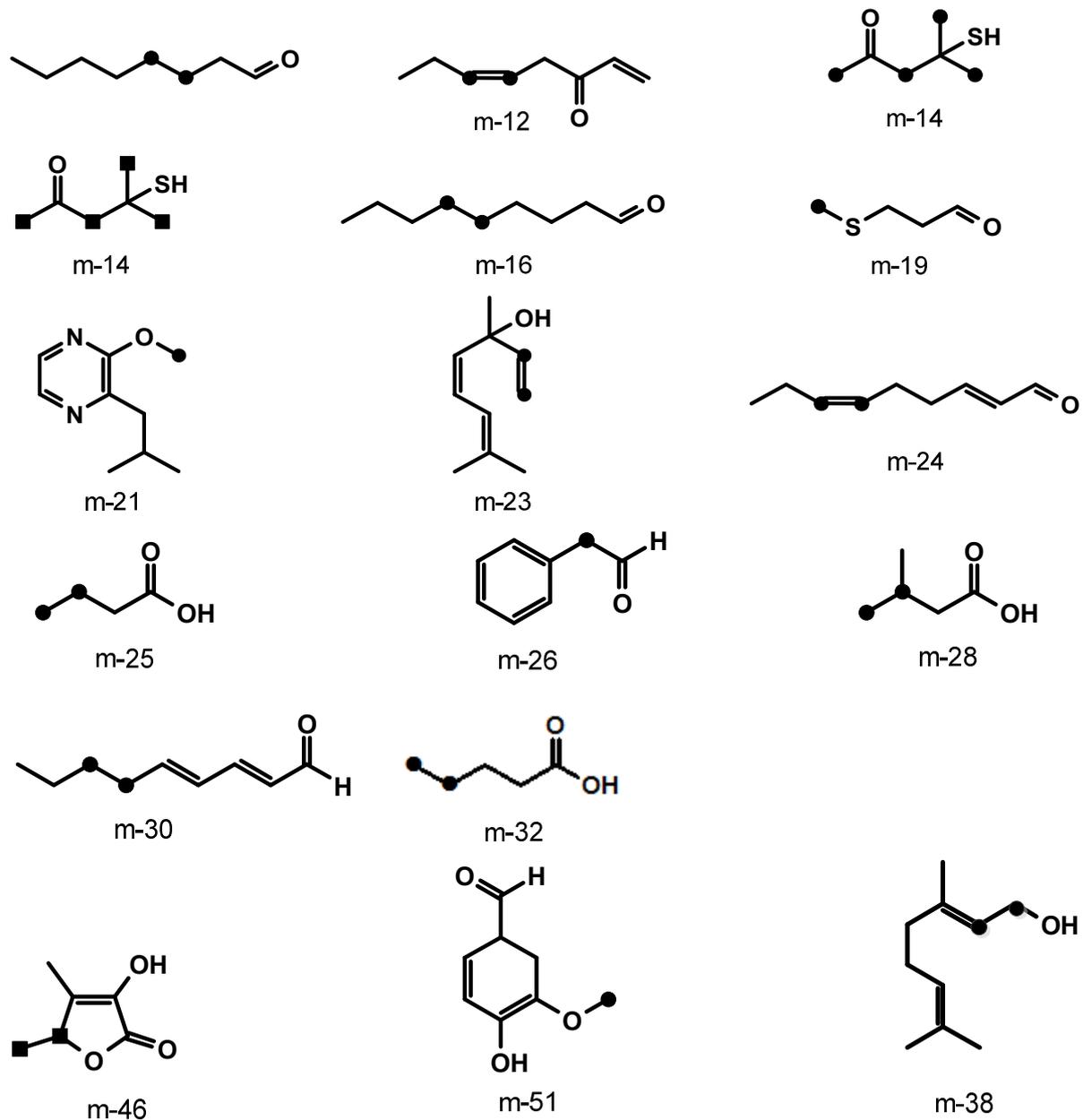
$$c = \frac{(\text{Konzentration des Methyloctanoatstandard}) \cdot (\text{Peakfläche der markierten Verbindung}) \cdot Rf}{(\text{Peakfläche des Methyloctanoatstandard})}$$

Zur Quantifizierung der Aromastoffe wurde nach 4.4.1 eine den zu bestimmenden Aromastoffen angepasste Menge Hopfen eingewogen und mit Diethylether versetzt, dem unmittelbar zuvor stabile Isotopen der zu quantifizierenden Aromastoffe als interner Standard beigemischt worden war. Nach einer Equilibrierzeit von einer Stunde wurde die Suspension aus Hopfen und Lösungsmittel über ein Filterbett aus Watte und Sand filtriert. Das Filtrat wurde anschließend im Hochvakuum der SAFE-Destillation von nichtflüchtigen Bestandteilen befreit. Das Destillat wurde in eine neutral-basische und eine acide Fraktion aufgetrennt. Die neutral-basische Fraktion wurde nach Methode 4.5.1 durch Säulenchromatographie weiter aufgegliedert. Die Fraktionen wurden aufkonzentriert und zur Massenchromatographie (MS-Cl) nach 4.5.4 eingesetzt. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte anhand der relativen Intensitäten charakteristischer Massenfragmente. Zusätzlich wurden auch in Mischungen von markiertem und unmarkiertem Standard im Verhältnis 1+2, 1+1 und 2+1 die relativen Intensitäten der charakteristischen Massenfragmente, vorzugsweise die Molekülmassen bestimmt, und zu den Gewichtsverhältnissen von Standard und Analyt ins Verhältnis gesetzt. Daraus wurde nach 4.5.8 durch Mittelwertbildung ein Responsefaktor  $Rf$  bestimmt, der dann zur Korrektur des Quantifizierungsergebnisses herangezogen wurde.

$$c(R) = \frac{F(R) \cdot c(IST)}{F(IST)} \cdot Rf$$

$c(R)$ : Konzentration Analyt  
 $c(IST)$ : Konzentration Standard  
 $F(R)$ : Fläche Analyt  
 $F(IST)$ : Fläche Standard  
 $Rf$ : Responsefaktor

Abbildung 18 zeigt die verwendeten isopenmarkierten Standards.



● = Position der  $^2\text{H}$ -Markierung;

■ = Position der  $^{13}\text{C}$ -Markierung;

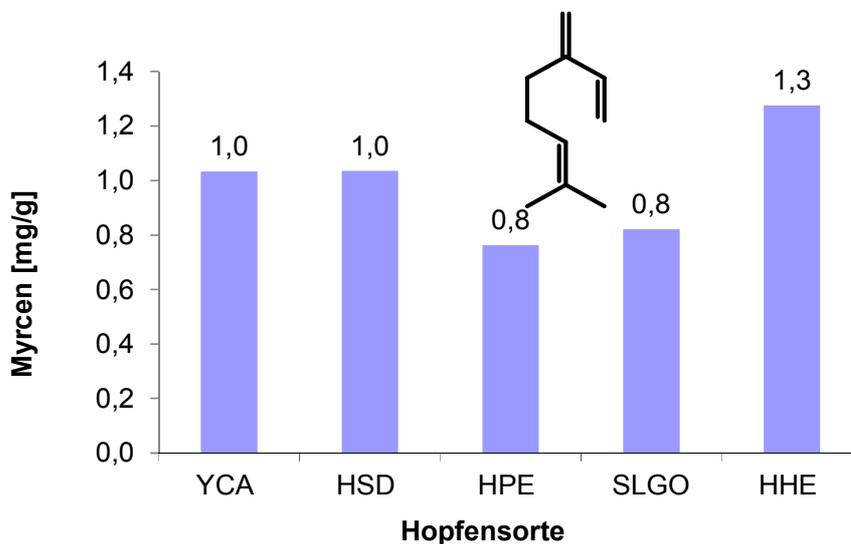
Die Nummern beziehen sich auf die fortlaufende Nummerierung der Aromastoffe aus Tabelle 4.

m-10	$^2\text{H}_{2-4}$ -Octanal	m-25	$^2\text{H}_2$ -Buttersäure
m-12	$[5,6-^2\text{H}_2]$ -(1,5)-(Z)-Octadien-3-on	m-26	$^2\text{H}_2$ -Phenylacetaldehyd
m-14	$^{13}\text{C}_4$ -4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon	m-28	$^2\text{H}_2$ -3-Methylbuttersäure
m-14	$^2\text{H}_{10}$ -4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon	m-30	$^2\text{H}_2$ -(E,E)-2,4-Nonadienal
m-16	$^2\text{H}_4$ -Nonanal	m-32	$^2\text{H}_2$ -Pentansäure
m-19	$^2\text{H}_2$ -Methional	m-38	$^2\text{H}_2$ -Geraniol
m-21	$^2\text{H}_2$ -3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	m-46	$^{13}\text{C}_2$ -3-Hydroxy-4,5-dimethyl-5(2H)-furanon
m-23	$^2\text{H}_2$ -Linalool	m-51	$^2\text{H}_3$ -Vanillin
m-24	$^2\text{H}_2$ -(E,Z)-2,6-Nonadienal		

**Abb. 18:** Struktur der isotopenmarkierten Standards zur Aromastoffquantifizierung.

Die Ergebnisse der Quantifizierung wurden anschließend in Balkendiagrammen dargestellt, um die Sortenunterschiede zu verdeutlichen. Dazu wurden die einzelnen Hopfensorten anhand ihres Gehalts an Aromastoffen einander gegenübergestellt. Die entsprechenden Tabellen zur Responsefaktor- und Konzentrationsbestimmung befinden sich im Anhang. Die Quantifizierungen wurden mit Hopfenpelletproben aus dem Erntejahrgang 2005 durchgeführt. Für die Aromastoffe Myrcen, Linalool, Geraniol und 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanone konnten zusätzlich Quantifizierungen mit den Erntejahrgängen 2003 und 2004 durchgeführt werden.

### 2.3.1 Aromastoffkonzentrationen im Erntejahrgang 2005

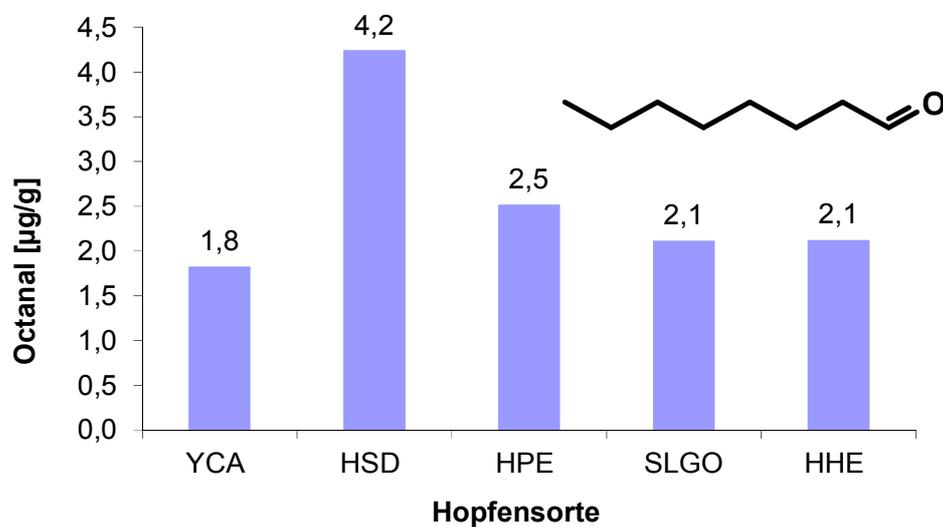


**Abb. 19:** Myrcen in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade YCA, Hallertauer Smaragd HSD, Hallertauer Perle HPE, Slowenischer Golding SLGO, Hallertauer Hersbrucker HHE.

Von allen untersuchten Aromastoffen war erwartungsgemäß Myrcen der Aromastoff, der in allen Hopfensorten die höchste Konzentration aufwies.

## Octanal

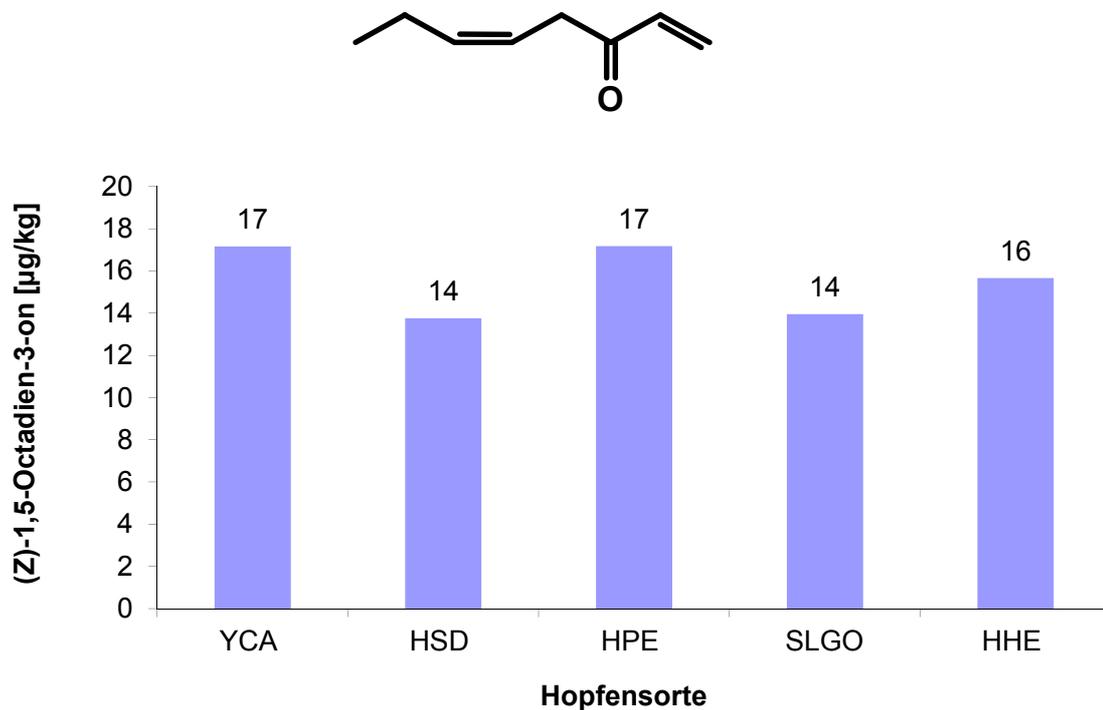
Für Octanal konnten im Erntejahr 2005 folgende quantitative Daten ermittelt werden: In der Hopfensorte Hallertauer Smaragd wurden 4,2  $\mu\text{g}$  Octanal pro g Hopfen quantifiziert. In den anderen vier Sorten fand sich weit weniger Octanal: Hallertauer Perle enthielt 2,5  $\mu\text{g/g}$ , in den Sorten Slowenischer Golding und Hallertauer Hersbrucker wurden jeweils 2,1  $\mu\text{g/g}$  gefunden und damit nur halb so viel Octanal wie in der Sorte Hallertauer Smaragd. Noch geringfügig tiefer lagen die Werte in der Sorte Yakima Cascade. In diesem Hopfen wurde ein Octanalgehalt von 1,8  $\mu\text{g/g}$  Hopfen gemessen (Abbildung 20).



**Abb. 20:** Octanalgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

### (Z)-1,5-Octadien-3-on

Für das geranienartig riechende (Z)-1,5-Octadien-3-on wurden für das Erntejahr 2005 folgende quantitativen Daten ermittelt: Im Yakima Cascade und in der Hallertauer Perle wurden 17 µg/kg quantifiziert. Im Hopfen der Sorte Hallertauer Perle waren 16 µg/kg und in den beiden Sorten Hallertauer Smaragd und Slowenischer Golding waren jeweils 14 µg/kg (Z)-1,5-Octadien-3-on pro kg Hopfen enthalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

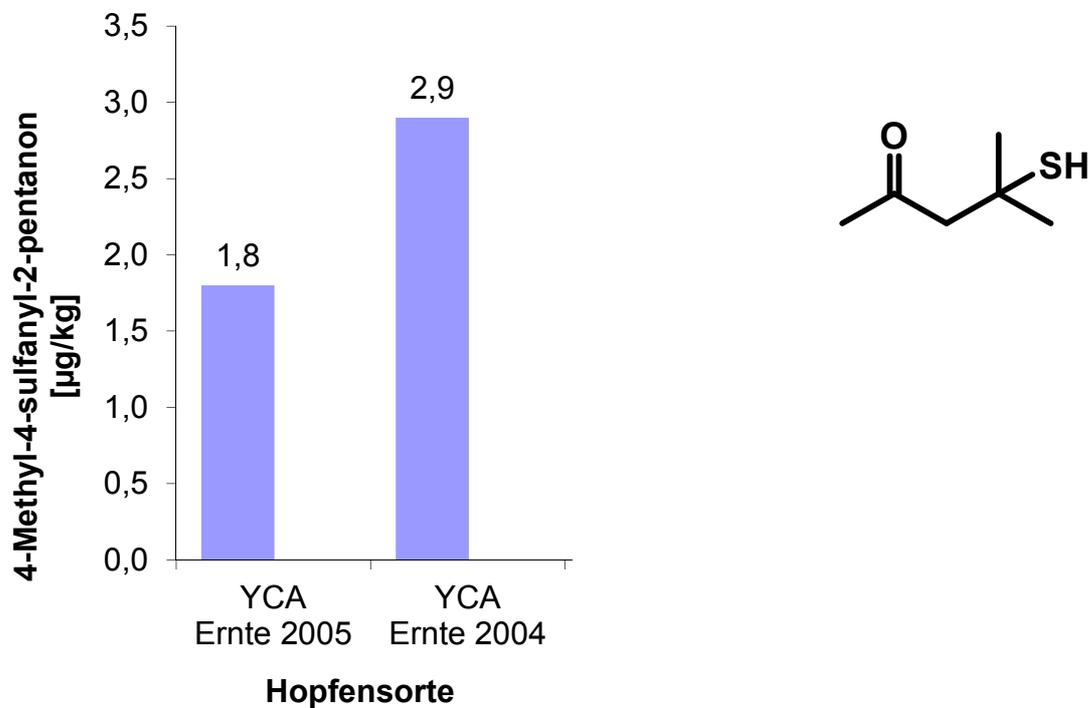


**Abb. 21:** (Z)-1,5-Octadien-3-on in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Sorten im Gehalt an (Z)-1,5-Octadien-3-on sehr ähnlich sind.

#### 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon

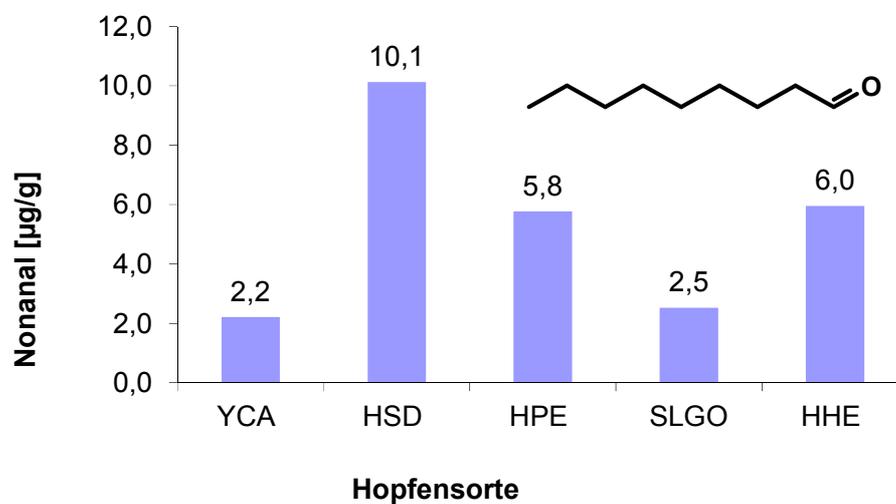
In dieser Arbeit wurde 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon erstmalig in Hopfen identifiziert und als Schlüsselaromastoff der Sorte Yakima beschrieben. In den Hopfensorten der untersuchten Erntejahre (2004 und 2005) war 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in Konzentrationen zwischen 1,8-2,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  lediglich in der Hopfensorte Yakima nachweisbar. In den anderen Hopfensorten Hallertauer Smaragd, Hallertauer Perle und Slowenischer Steyrer Golding lag 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon nicht, bzw. nur in Spuren (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Hopfen) vor. Die grafische Darstellung für beide Erntejahre zeigt Abbildung 22.



**Abb. 22:** 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanongehalt in Hopfenpellets Typ 90 der Sorte Yakima Cascade (YCA), Ernten 2004 und 2005.

## Nonanal

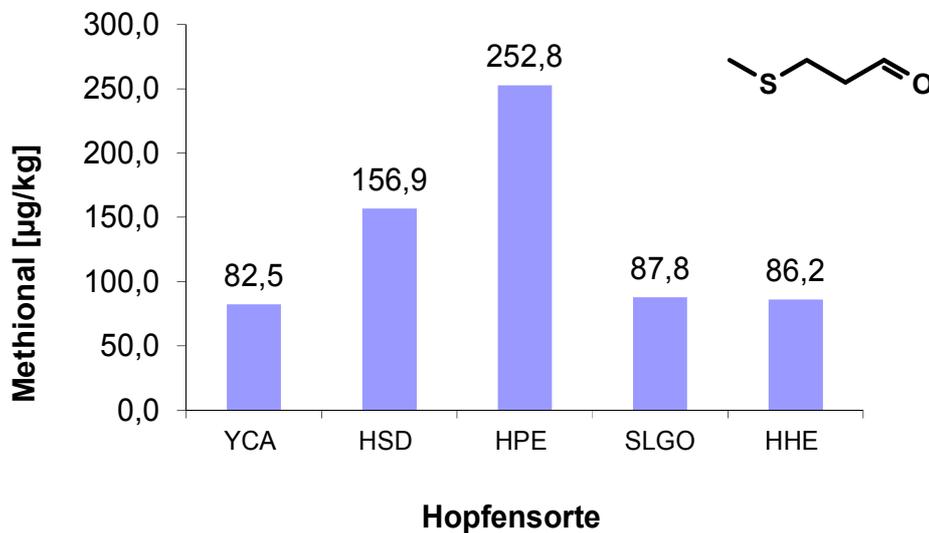
Ein weiterer quantifizierter Aromastoff war das citrusartig riechende Nonanal. Die untersuchten Hopfensorten unterschieden sich deutlich (Abbildung 23): Die Sorte Hallertauer Smaragd enthielt mit 10,1  $\mu\text{g/g}$  Hopfen den höchsten Gehalt an Nonanal mit Abstand gefolgt von der Sorte Hallertauer Hersbrucker (6,0  $\mu\text{g/g}$ ) und Hallertauer Perle (5,8  $\mu\text{g/g}$ ). Die Sorten Slowenischer Golding und Yakima Cascade enthielten deutlich weniger Nonanal. Es wurden im Slowenischer Golding 2,5  $\mu\text{g/g}$  und im Yakima Cascade 2,2  $\mu\text{g/g}$  Nonanal quantifiziert.



**Abb. 23:** Nonanalgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

## Methional

Für Methional ist ein Aroma „nach gekochter Kartoffel“ typisch. Die Quantifizierung in den fünf Hopfensorten, Ernte 2005, ergab folgendes Ergebnis: Mit 252,8 µg/kg Hopfen enthielt die Sorte Hallertauer Perle den höchsten Gehalt an Methional, gefolgt von Hallertauer Smaragd (156,9 µg/kg) sowie Slowenischer Golding (87,8 µg/kg), Hallertauer Hersbrucker (86,2 µg/kg) und Yakima Cascade (82,5 µg/kg). Hallertauer Perle unterscheidet sich bezüglich des Methionalgehalts deutlich von den anderen vier untersuchten Hopfensorten.

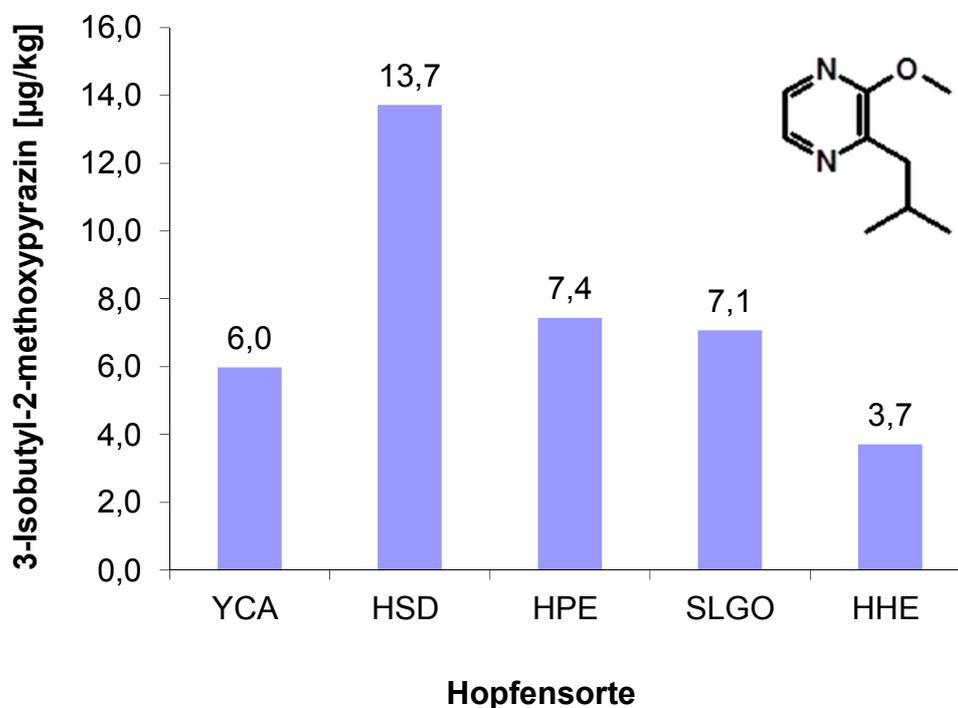


**Abb. 24:** Methional in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

### 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin

Die erdige Geruchsnote in den untersuchten Hopfensorten wurde als 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin identifiziert. Die Quantifizierung lieferte für den Erntejahrgang 2005 folgendes Ergebnis:

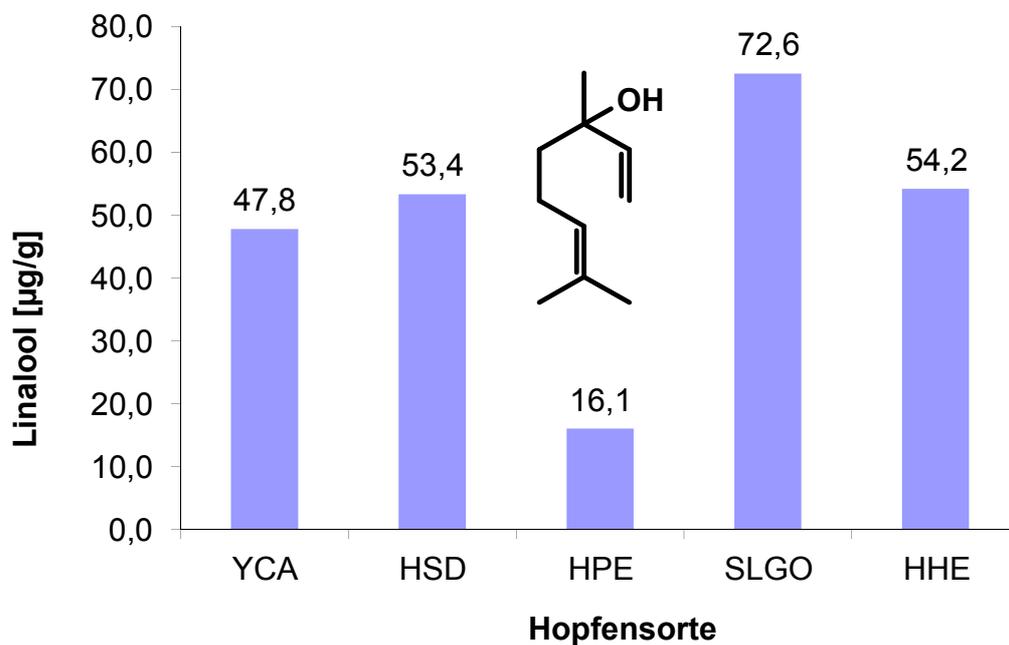
Die Sorte mit dem höchsten Gehalt an 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin war Hallertauer Smaragd (13,7 µg/kg), gefolgt von den Sorten Hallertauer Perle (7,4 µg/kg) und Slowenischer Golding (7,1 µg/kg), Yakima Cascade (6,0 µg/kg) und der Sorte Hallertauer Hersbrucker (3,7 µg/kg).



**Abb. 25:** 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

## Linalool

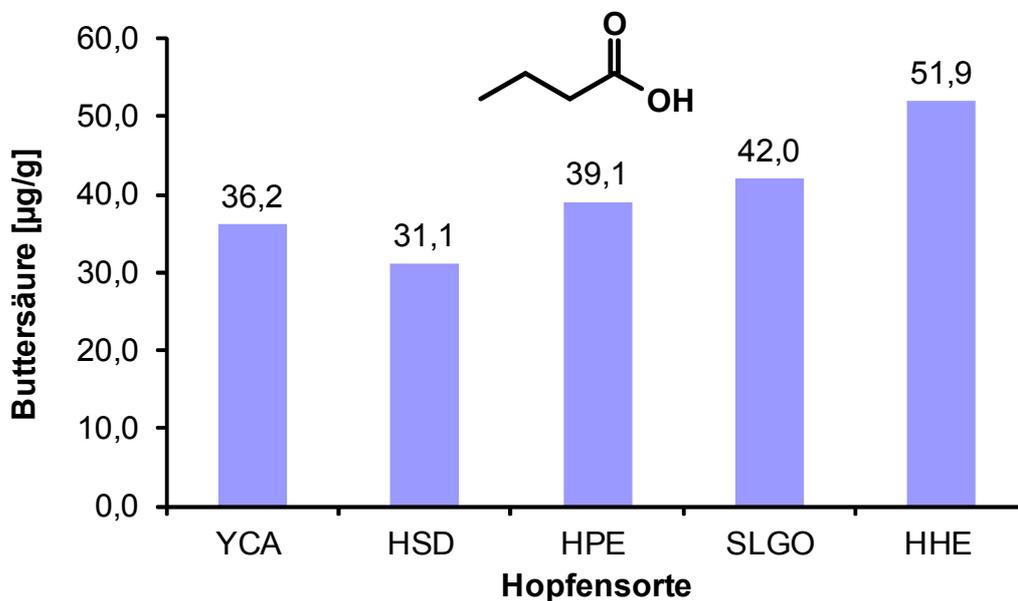
Linalool ist für die blumige, nach Bergamottblüte duftende Aromanote in Hopfen verantwortlich. Im Erntejahrgang 2005 wurden in der Sorte Slowenischer Golding der höchste Linaloolgehalt von allen untersuchten Hopfensorten gemessen. Slowenischer Golding enthielt 72,6 µg/g Linalool, gefolgt von Hersbrucker und Smaragd mit 54,2 µg und 53,4 µg sowie Yakima Cascade mit 47,8 µg. Die Sorte Hallertauer Perle enthielt mit 16,1 µg am wenigsten Linalool.



**Abb. 26:** Linaloolgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

## Buttersäure

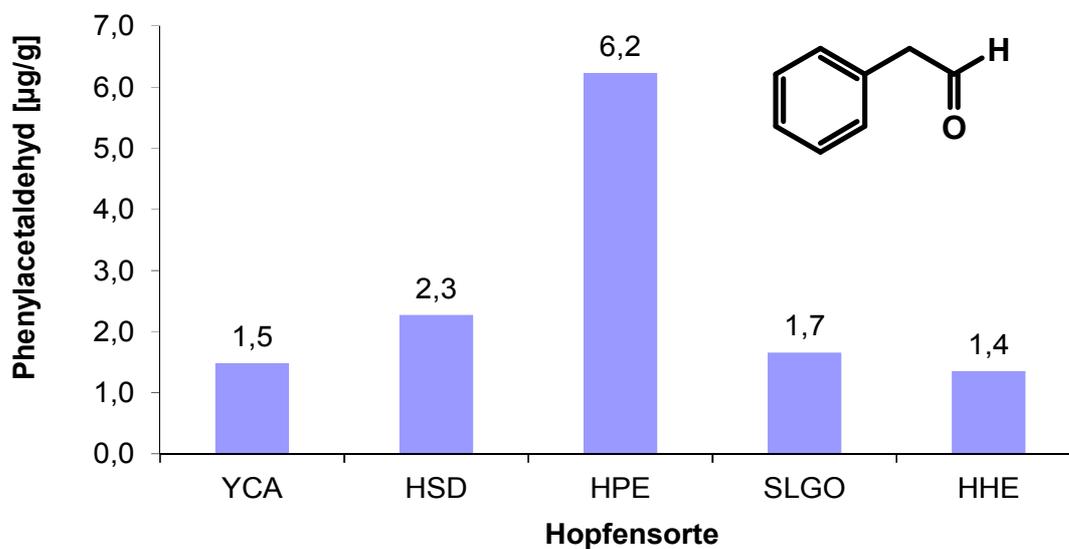
Die nach ranziger Butter riechende Buttersäure wurde in folgenden Mengen in den untersuchten Hopfensorten (Ernte 2005) gefunden: Die Sorte Hallertauer Hersbrucker (51,9 µg/g) war am meisten buttersäurehaltig, gefolgt von den Sorten Slowenischer Golding (42,0 µg/g) und Hallertauer Perle (39,1 µg/g). Im Yakima Cascade wurden 36,1 µg/g Buttersäure und im Hallertauer Smaragd 31,1 µg/g Buttersäure quantifiziert. Der Unterschied zwischen der buttersäurereichsten und -ärmsten Hopfensorte beträgt 20,8 µg.



**Abb. 27:** Buttersäuregehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

## Phenylacetaldehyd

Für das blumig nach Honig riechende Phenylacetaldehyd wurden in den untersuchten Hopfensorten aus der Ernte 2005 folgende quantitativen Daten ermittelt: Phenylacetaldehyd war nur in kleinen Mengen im Hopfen vorhanden. Die Werte bewegten sich zwischen 6,2 µg/g (Hallertauer Perle) und 1,2 µg/g (Hallertauer Hersbrucker). Die Sorte Hallertauer Smaragd enthielt 2,3 µg/g, in den Sorten Yakima Cascade und Slowenischer Golding fanden sich 1,5 µg/g und 2,3 µg/g.



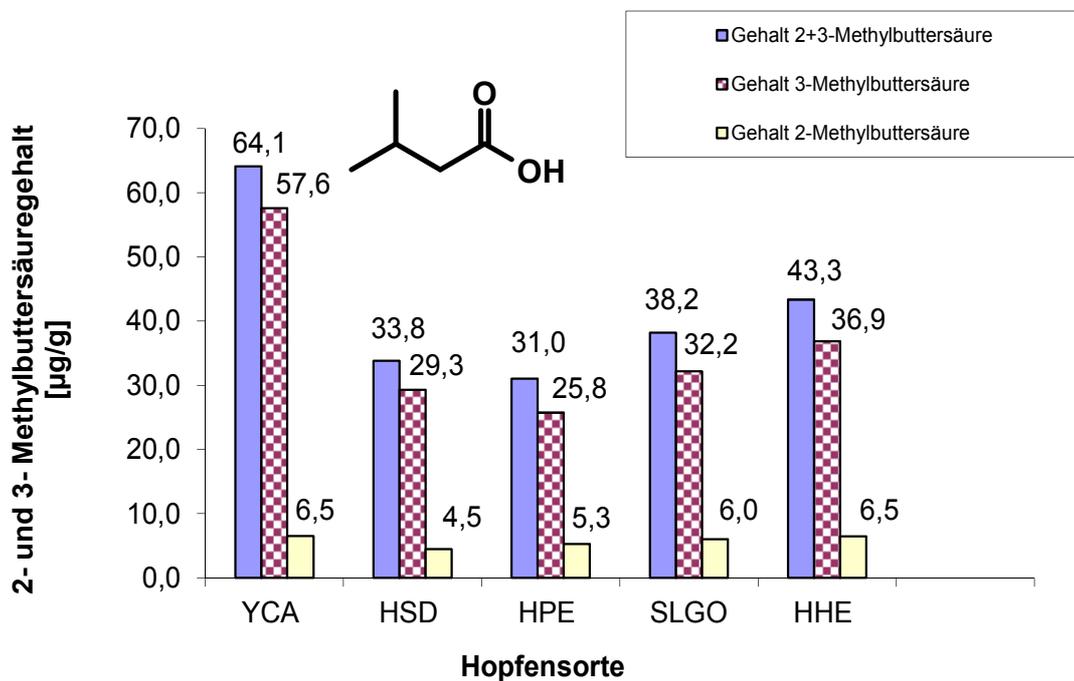
**Abb. 28:** Phenylacetaldehyd in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

## 3-Methylbuttersäure

3-Methylbuttersäure ist ursächlich für die intensiv schweißige Geruchsnote in Hopfen verantwortlich. Sie konnte zusammen mit 2-Methylbuttersäure in den untersuchten Sorten quantifiziert werden. Da 2-Methylbuttersäure und 3-Methylbuttersäure gaschromatographisch nicht getrennt werden können, erfolgte die Unterscheidung von 2-Methylbuttersäure und 3-Methylbuttersäure anhand der spezifischen Massenfragmente  $m/z$  74 für 2-Methylbuttersäure und  $m/z$  60 für 3-Methylbuttersäure und der zugehörigen Flächenverhältnisse.

Wie Abbildung 29 zeigt, enthält die Sorte Yakima Cascade bezogen auf 1 g Hopfen die größte Menge an 3-Methylbuttersäure (57,6 µg), gefolgt von Hallertauer Hersbrucker (36,9 µg), Slowenischer Golding (32,2 µg), Hallertauer Smaragd (29,3 µg) und Hallerauer Perle (25,8 µg).

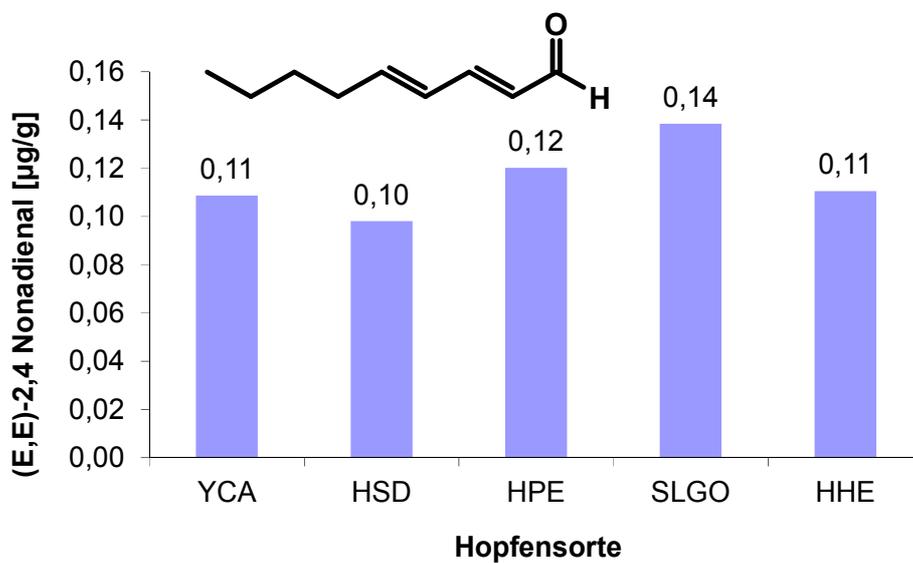
2-Methylbuttersäure war hingegen nur in geringen Mengen im Hopfen vorhanden: In den Sorten Yakima Cascade und Hallertauer Hersbrucker waren je 6,5 µg enthalten, im Slowenischen Golding 6,0 µg, in der Hallertauer Perle 5,3 µg und im Hallertauer Smaragd konnten 4,5 µg 2- Methylbuttersäure bestimmt werden.



**Abb. 29:** 3- und 2-Methylbuttersäuregehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

### (E,E)-2,4-Nonadienal

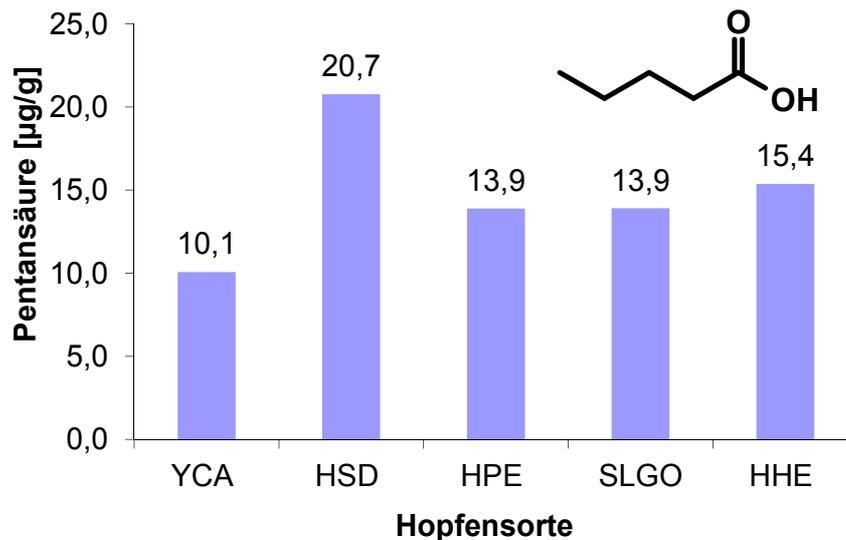
Mit (E,E)-2,4-Nonadienal wurde ein deutlich fettig riechender Aromastoff quantifiziert. Bei den untersuchten Hopfensorten, Ernte 2005, waren keine Unterschiede im (E,E)-2,4-Nonadienalgehalt messbar (Abbildung 30). Im Einzelnen wurden gemessen: Yakima Cascade 0,11  $\mu\text{g}$ , Hallertauer Smaragd 0,10  $\mu\text{g}$ , Hallertauer Perle 0,12  $\mu\text{g}$ , Slowenischer Golding 0,14  $\mu\text{g}$  und Hallertauer Hersbrucker 0,11  $\mu\text{g}$  (E,E)-2,4-Nonadienal pro Gramm Hopfen.



**Abb. 30:** (E,E)-2,4-Nonadienalgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

## Pentansäure

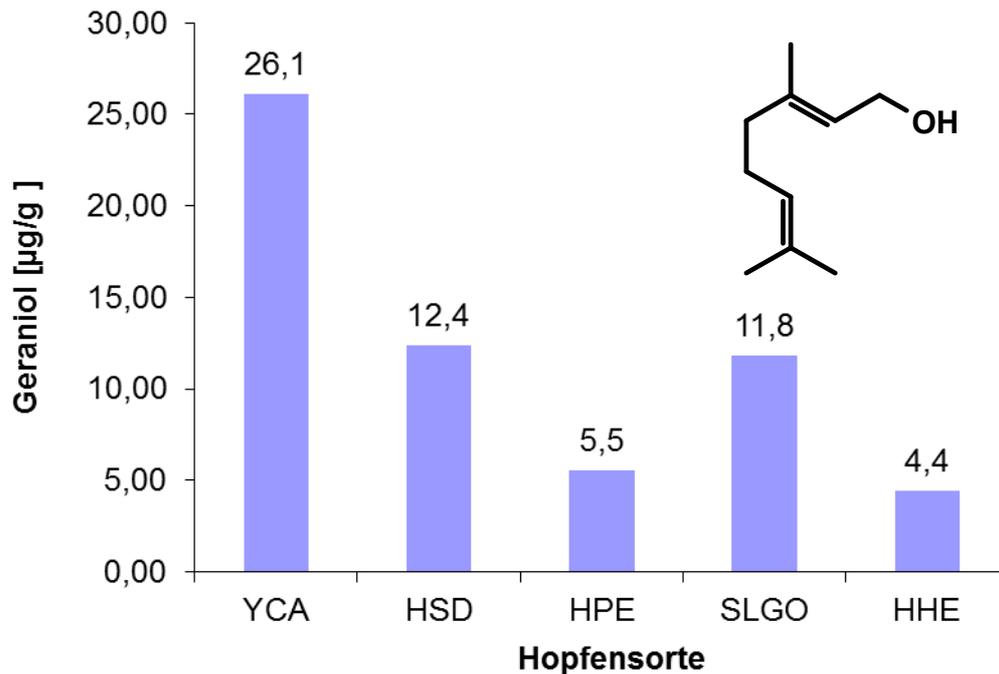
Pentansäure war im Hopfen an ihrem parmesanartig-käsigen Geruch zu erkennen. Die quantifizierten Mengen im Erntejahr 2005 betragen im Hallertauer Smaragd 20,7 µg, im Hallertauer Hersbrucker 15,4 µg, im Slowenischen Golding und in der Hallertauer Perle je 13,9 µg und im Hopfen der Sorte Yakima Cascade 10,1 µg Pentansäure pro Gramm Hopfen.



**Abb. 31:** Pentansäuregehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

## Geraniol

Nachfolgend sind die Quantifizierungsergebnisse für Geraniol aufgeführt, welches am Hopfenaroma mit seiner blumigen, nach Rose duftenden Aromanote beteiligt war.

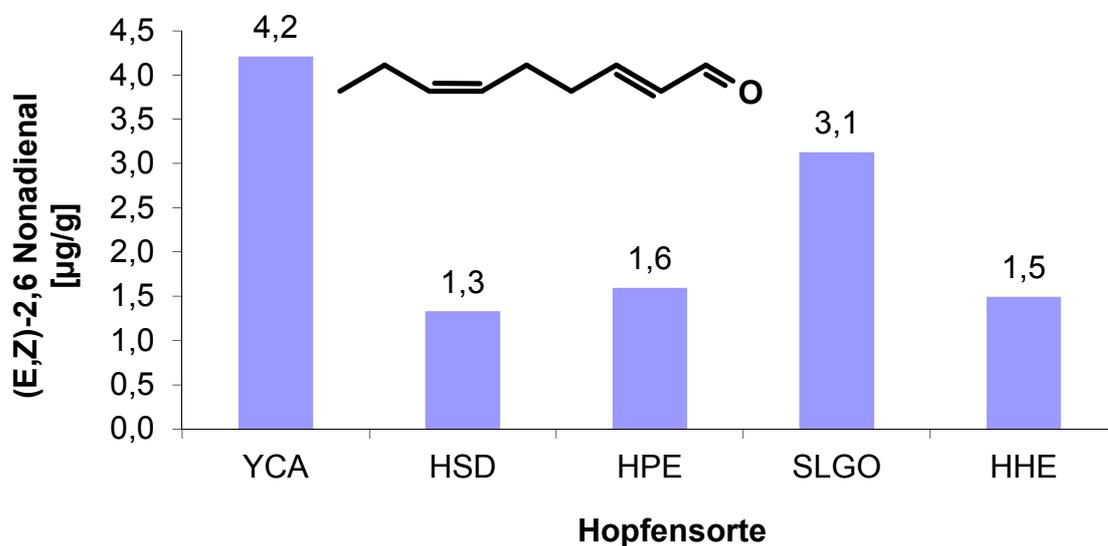


**Abb. 32:** Geraniol in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

Im Erntejahr 2005 konnten für die Sorte Yakima Cascade 26,1 µg/g Geraniol ermittelt werden. Deutlich geringere Mengen fanden sich in den Sorten Hallertauer Smaragd (12,4 µg/g) und Slowenischen Golding (11,8 µg/g). In den Sorten Hallertauer Perle wurden 5,5 µg/g und in der Sorte Hallertauer Hersbrucker 4,4 µg/g Geraniol gefunden.

### (E,Z)-2,6-Nonadienal

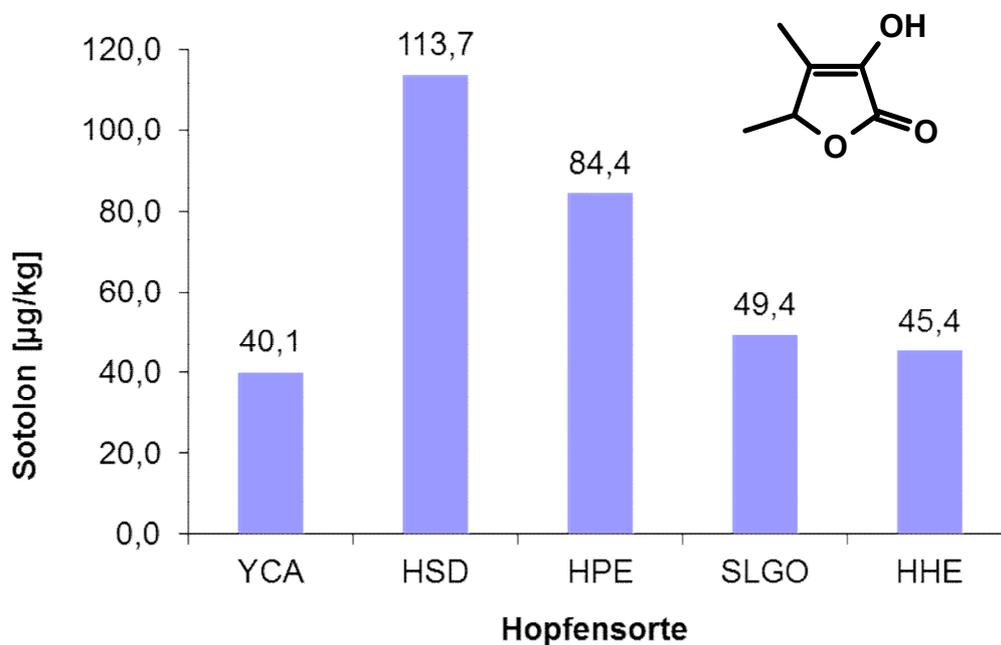
Das (E,Z)-2,6-Nonadienal riecht markant nach Gurke und wurde in folgenden Mengen in den untersuchten Hopfensorten der Ernte 2005 nachgewiesen: Der Hopfen mit dem höchsten Gehalt an (E,Z)-2,6-Nonadienal war die Sorte Yakima Cascade. In ihr waren 4,2  $\mu\text{g/g}$  enthalten. In der Sorte Slowenischer Golding wurden 3,1  $\mu\text{g/g}$  quantifiziert. In den Hallertauer Sorten waren 1,6  $\mu\text{g/g}$  (Perle), 1,5  $\mu\text{g/g}$  (Hersbrucker) und 1,3  $\mu\text{g/g}$  (Smaragd) gemessen worden. Die Messergebnisse werden in Abbildung 33 gezeigt.



**Abb. 33:** (E,Z)-2,6-Nonadienalgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

## Sotolon

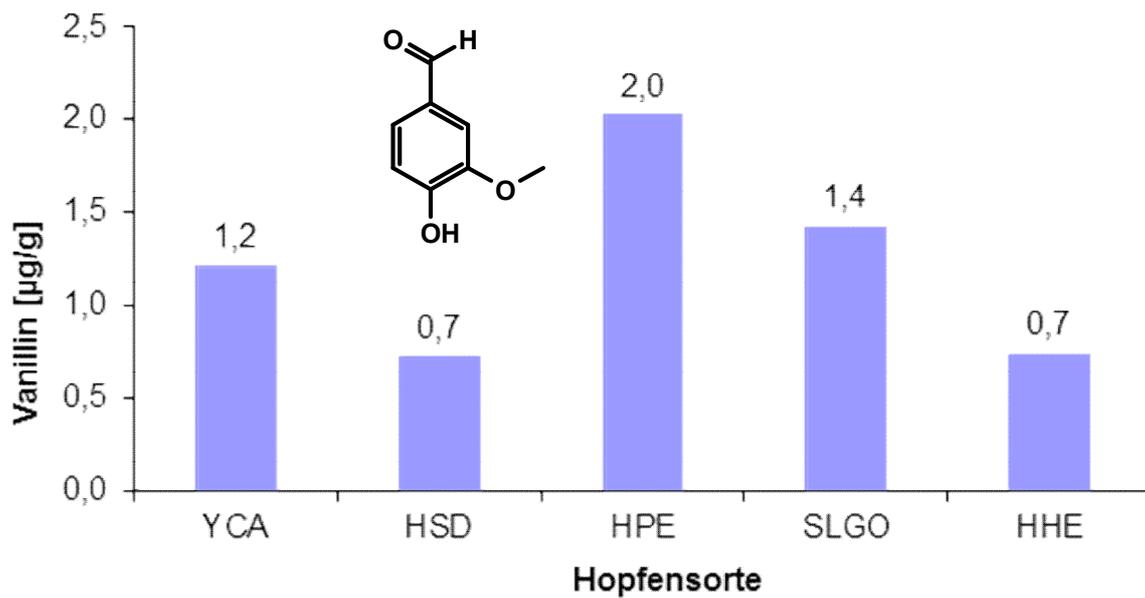
Sotolon trug zum Hopfenaroma mit einer markant würzigen Geruchsnote (nach „Maggi“) bei. Die quantitativen Untersuchungen der Hopfenernte 2005 ergaben für die einzelnen Hopfensorten unterschiedliche Werte. Der höchste Sotolongehalt bezogen auf ein Kilogramm Hopfen wurde in der Sorte Hallertauer Smaragd festgestellt (113,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), gefolgt von der Sorte Hallertauer Perle (84,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) und den Sorten Slowenischer Golding (49,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), Hallertauer Hersbrucker (45,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), und der Sorte Yakima Cascade (40,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (siehe Abbildung 34).



**Abb. 34:** Sotolon in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

## Vanillin

Die im Erntejahrgang 2005 quantifizierten Mengen Vanillin schwanken zwischen 2,0  $\mu\text{g/g}$  Hopfen in der Sorte Hallertauer Perle und 0,7  $\mu\text{g/g}$  in der Sorte Hallertauer Hersbrucker und Hallertauer Smaragd. Im Slowenischen Golding konnten 1,4  $\mu\text{g/g}$  Vanillin quantifiziert werden. Yakima Cascade enthielt 1,2  $\mu\text{g/g}$  Vanillin.

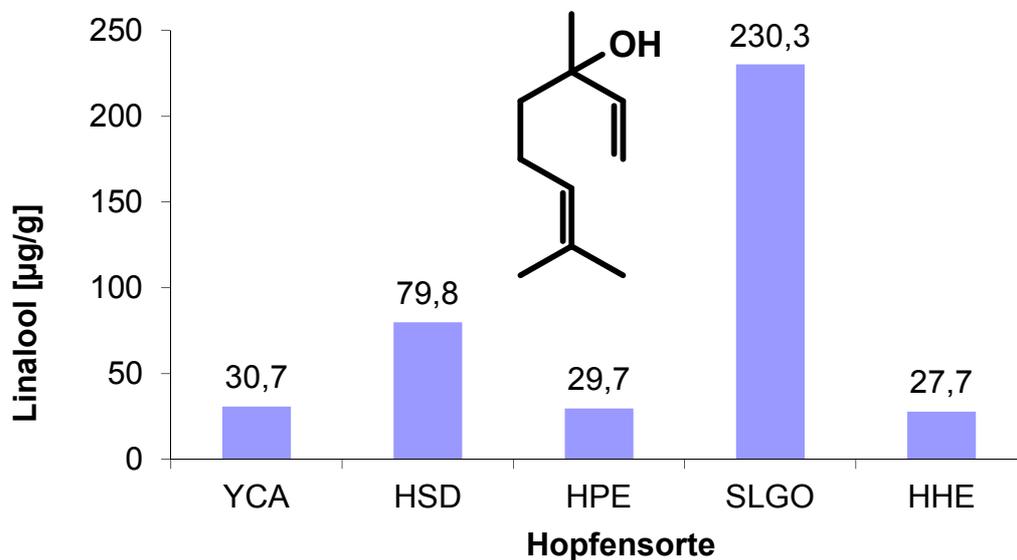


**Abb. 35:** Vanillin in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

### 2.3.2 Aromastoffkonzentrationen im Erntejahrgang 2004

Zusätzlich wurde der Linaloolgehalt in den entsprechenden Hopfensorten des Erntejahrgangs 2004 bestimmt:

Im Erntejahrgang 2004 enthielt die Hopfensorte Slowenischer Golding 230,3 µg/g Linalool. Die Sorte Hallertauer Smaragd enthielt 79,8 µg/g, Yakima Cascade 30,7 µg/g, Hallertauer Perle 29,7 µg/g und Hallertauer Hersbrucker 27,7 µg/g Linalool. Abbildung 36 zeigt die grafische Sortengegenüberstellung.

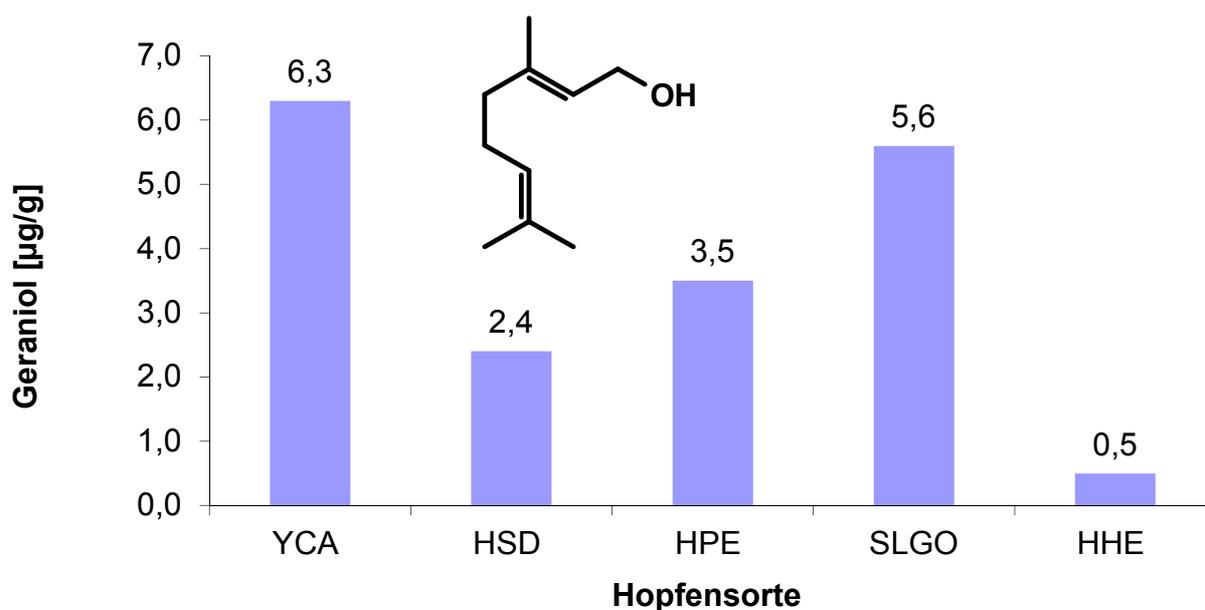


**Abb. 36:** Linaloolgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2004, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

Die Linaloolgehalte der einzelnen Hopfensorten waren deutlich unterschiedlich. Darüber hinaus beeinflusst der Erntejahrgang die Linaloolgehalte erheblich. Die Hopfensorte Slowenischer Golding war im Vergleich zu den anderen untersuchten Sorten sehr linaloolhaltig. Dieses Ergebnis konnte sowohl im Erntejahrgang 2005 (72,6 µg/g Hopfen) als auch im Erntejahrgang 2004 (230 µg/g Hopfen) beobachtet werden.

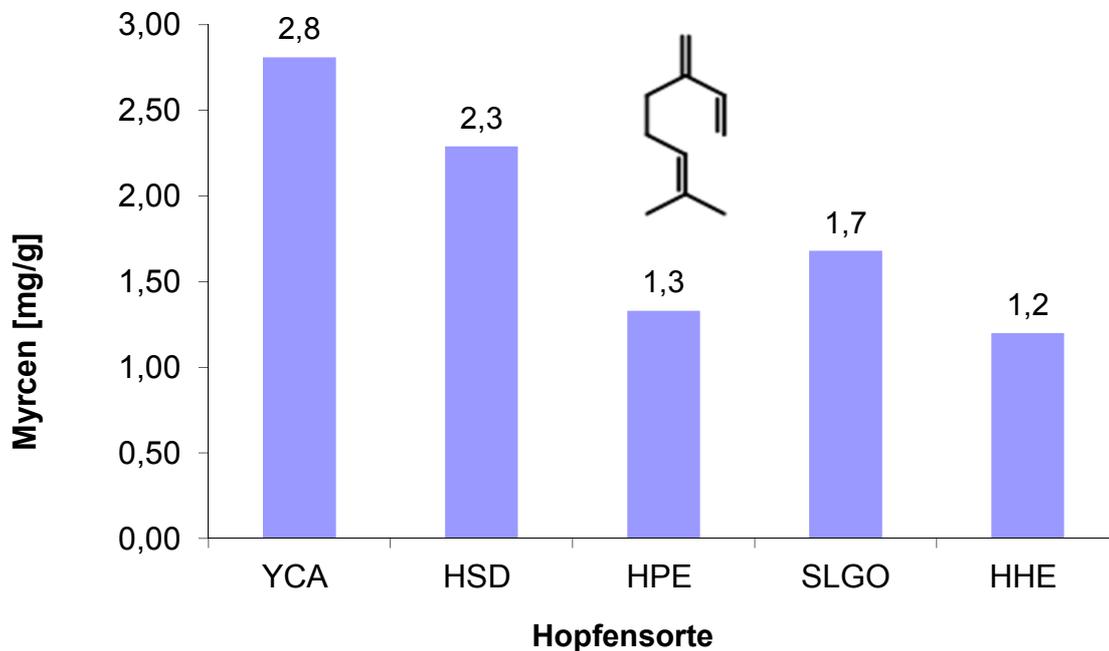
Im Gegensatz dazu enthielt die Sorte Hallertauer Perle in beiden Jahrgängen auffällig wenig Linalool (16,1  $\mu\text{g/g}$  Hopfen im Jahr 2005 und 29,7  $\mu\text{g/g}$  Hopfen im Jahr 2004). Darüber hinaus zeigte die Sorte Hallertauer Perle die geringsten jahrgangsbedingten Schwankungen. Die Sorten Yakima Cascade und Hallertauer Hersbrucker enthielten im Jahr 2005 deutlich mehr Linalool als im Jahr 2004, während die Sorten Hallertauer Smaragd, Hallertauer Perle und Slowenischer Golding im Jahr 2004 mehr Linalool enthielten als im Erntejahr 2005. Der Linaloolgehalt ist offensichtlich sorten- und jahrgangsabhängig.

Die Geraniolkonzentrationen im Erntejahr 2004 sind in Abbildung 37 veranschaulicht. In der Sorte Yakima Cascade wurden 6,3  $\mu\text{g/g}$  gefunden, in der Sorte Slowenischer Golding 5,6  $\mu\text{g/g}$ , in der Sorte Hallertauer Perle 3,5  $\mu\text{g/g}$ , in der Sorte Hallertauer Smaragd 2,4  $\mu\text{g/g}$  und in der Sorte Hallertauer Hersbrucker 0,5  $\mu\text{g/g}$ .



**Abb. 37:** Geraniol in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2004, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

### 2.3.3 Aromastoffkonzentrationen im Erntejahrgang 2003



**Abb. 38:** Myrcengehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2003, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO) und Hallertauer Hersbrucker (HHE).

Im Vergleich der Erntejahrgänge 2005 mit 2003 konnten die größten Unterschiede bei den Sorten Yakima Cascade und Hallertauer Smaragd festgestellt werden.

Das Jahr 2005 brachte in beiden Sorten eine deutlich geringere Myrcenausbeute. Im Yakima Cascade sank die Ausbeute um 1,8 mg/g, im Hallertauer Smaragd waren es 1,3 mg/g. Bei der Sorte Slowenischer Golding fehlten im Jahr 2005 im Vergleich zum Jahr 2003 0,9 mg Myrcen pro g Hopfen, in der Sorte Hallertauer Perle waren es 0,9 mg/g Hopfen. Während die Sortenunterschiede im Jahr 2005 bezüglich des Myrcengehalts nicht sehr ausgeprägt waren, erwiesen sich die Sorten Yakima Cascade und Hallertauer Smaragd im Erntejahrgaben 2003 als vergleichsweise myrcenkräftige Sorten.

**Tabelle 5:** Jahrgangsabhängige Schwankungen im Aromastoffgehalt von Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE). n.b. = nicht bestimmt.

Aromastoff	Myrcen			4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on			Linalool			Geraniol		
	mg/g			µg/kg			µg/g			µg/g		
Erntejahr	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
<b><u>Hopfensorte</u></b>												
YCA	2,8	n.b.	1,8	n.b.	2,9	1,8	n.b.	30,7	47,8	n.b.	6,3	26,1
HSD	2,3	n.b.	n.b.	n.b.	0,1	0,0	n.b.	79,8	53,4	n.b.	2,4	12,4
HPE	1,3	n.b.	n.b.	n.b.	0,0	0,0	n.b.	29,7	16,1	n.b.	3,5	5,5
SLGO	1,7	n.b.	n.b.	n.b.	0,0	0,0	n.b.	230,3	72,6	n.b.	5,6	11,8
HHE	1,2	n.b.	n.b.	n.b.	0	0	n.b.	27,7	54,2	n.b.	0,5	4,4

## 2.4 Geraniol- und Linaloolgehalt in Abhängigkeit vom Destillationsverfahren und vom pH-Wert

Im Hopfen werden Aromavorstufen vermutet. Vieles deutet darauf hin, dass es sich dabei um Glykoside handelt, die im Hopfen unbestritten vorhanden sind (Goldstein 1999). Kollmannsberger (2006) und Daenen (2008) konnten bereits enzymatisch Aromastoffe aus Hopfen freisetzen. Darüber hinaus beobachtete Kaltner (2001) während der Hopfentrocknung in Folge von Hitzeeinwirkung einen Anstieg des Linaloolgehalts. Eine exakte quantitative Analyse wurde jedoch bisher nicht durchgeführt.

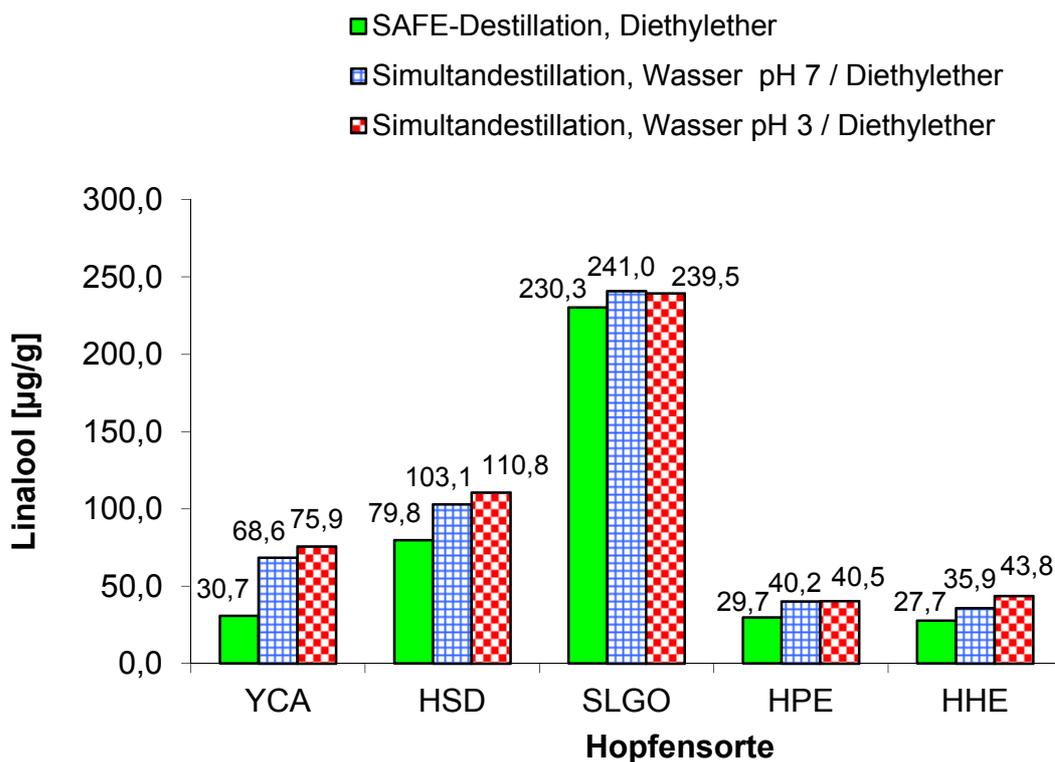
Um zu klären, in welchen Mengen Linalool und Geraniol aus Hopfenglykosiden freigesetzt werden können, wurde die exakte Quantifizierungsmethode der Stablen Isotopen Verdünnungsanalyse (SIVA) bei nachfolgenden Experimenten angewendet.

### Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die Freisetzung von Geraniol und Linalool

Ausgehend von der Überlegung, dass Glykoside in saurer wässriger Lösung unter Hitzeeinwirkung gespalten werden können, wurde zwei unterschiedliche Destillationsmethoden verwendet: Die schonende Solvent Assisted Flavor Evaporation im Hochvakuum mittels SAFE-Apparatur nach Engel (1999) sowie die Simultandestillation mittels SDE –Apparatur nach Flath (1977) zur Destillation unter Hitzeeinwirkung. Die Auswirkung der Hitzeeinwirkung wurde darüber hinaus bei zwei verschiedene pH-Werten getestet. Dazu wurde die Simultandestillation jeweils mit einer Hopfenprobe in Pufferlösung bei pH 3 und pH 7 durchgeführt. Sowohl die Variation des Destillationsverfahrens als auch die Variation des pH-Wertes zeigten messbare Unterschiede in den Geraniol- und Linaloolausbeute. Die Ergebnisse werden wie folgt wieder anhand von Balkendiagrammen dargestellt und erläutert.

Es zeigte sich bei vier von fünf Hopfensorten (Yakima Cascade, Hallertauer Smaragd, Hallertauer Perle und Hallertauer Hersbrucker), dass bei pH 3 geringfügig mehr Linalool freigesetzt werden konnte als bei pH 7. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Linalool und Geraniol als glykosidisch gebunden vorliegen könnten. Aus der Sorte Slowenischer Golding ließ sich durch SDE Destillation pH-Wert unabhängig die höchste Linaloolmenge freisetzen. Das heißt, die Sorte Slowenischer Golding enthält nicht nur am meisten freies Linalool, sondern auch am meisten gebundenes Linalool. Es scheint neben dem Einfluss von Temperatur und pH-Wert noch weitere Einflussfaktoren auf die Freisetzung der Aromastoffe zu geben.

Zunächst wurde die Ausbeutesteigerung für Linalool nach Simultandestillation (4.3.1.2) im Vergleich zur SAFE-Destillation (4.3.1.1) untersucht. Die Simultandestillation von Hopfenpulver wurde jeweils in Pufferlösungen bei pH 3 und pH 7 durchgeführt. Der interne Standard (markiertes Linalool) wurde in den Rundkolben zum Hopfenpulver und der Pufferlösung pipettiert, kurz bevor dieser an die SDE-Apparatur angeschlossen wurde. Bei der SAFE-Destillation erfolgte die Standardzugabe zum Extraktionsmittel, mit dem das Hopfenpulver extrahiert wurde. Die quantitativen Daten nach Simultandestillation wurden dann mit den Ergebnissen der SAFE-Destillationsmethode aus Kapitel 2.4.2.2 verglichen (Abbildung 39).



**Abb. 39:** Linaloolgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2004, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

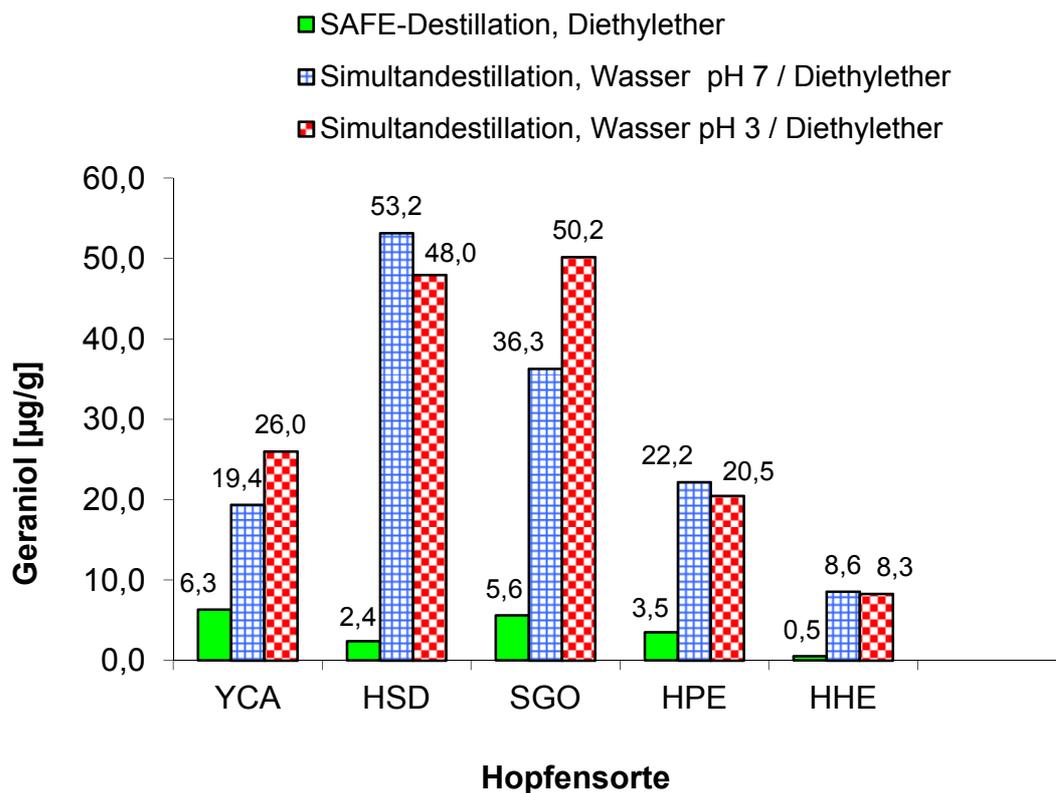
Es ist deutlich erkennbar, dass die Linaloolausbeute bei der Simultandestillationsmethode sowohl bei pH 3 als auch bei pH 7 über den Ausbeuten der SAFE-Destillationsmethode lagen. Für Yakima Cascade war ein Anstieg von 30,7 µg Linalool (SAFE-Destillation) über 68,6 µg (Simultandestillation, pH 7) auf 75,9 µg (Simultandestillation, pH 3) zu beobachten. In Hallertauer Smaragd konnten mittels SAFE-Destillation 79,8 µg Linalool und durch Simultandestillation 103,1 µg bei pH 7 und 110,8 µg bei pH 3 quantifiziert werden. Für die Sorte Hallertauer Perle ergab sich eine Steigerung von 29,7 µg (SAFE-Destillat) und 40,2 µg (Simultandestillation bei pH 7) auf 40,5 µg (Simultandestillation bei pH 3). In Hallertauer Hersbrucker ließen sich 27,7 µg Linalool nachweisen. Durch Simultandestillation stieg die Ausbeute auf 35,9 µg (pH 7) bzw. auf 43,8 µg (pH 3). Der durch SAFE-Destillation in der Sorte Hallertauer Spalter Select quantifizierte Linaloolgehalt betrug 68,1 µg. Durch Simultandestillation steigerte sich der Wert auf 107,8 µg (pH 7) und 141,1 µg (pH 3). Die linaloolreiche Sorte Slowenischer Golding zeigte 230,3 µg. Dieser Wert ließ sich durch

die Simultandestillation bei pH 7 nochmals um 10,7 µg auf 241 µg Linalool steigern. Die Destillation bei pH 3 erbrachte eine Steigerung um 9,2 µg auf 239,5 µg Linalool.

Nachfolgend wurde die Ausbeutesteigerung für Geraniol nach Simultandestillation (4.3.1.2) im Vergleich zur SAFE-Destillation (4.3.1.1) untersucht. Die Simultandestillation wurde jeweils in Pufferlösungen bei pH 3 und pH 7 durchgeführt. Der interne Standard (markiertes Geraniol) wurde in den Rundkolben zum Hopfenpulver und der Pufferlösung pipettiert, kurz bevor dieser an die SDE-Apparatur angeschlossen worden ist. Bei der SAFE-Destillation erfolgte die Standardzugabe zum Extraktionsmittel, mit dem das Hopfenpulver extrahiert wurde.

Insbesondere beim Geraniol trat die Ausbeutesteigerung infolge von erhöhter Hitze- einwirkung besonders stark hervor. Bei Geraniol war im Sortenvergleich kein eindeutiger Einfluss des pH-Wertes auf die Geraniolfreisetzung feststellbar. Bei Yakima Cascade und Slowenischer Golding wurde bei pH 3 mehr Geraniol freigesetzt, bei den anderen Sorten geringfügig weniger (Abbildung 40).

Die Ausbeute stieg im Yakima Cascade von 6,3 µg Geraniol (SAFE-Destillation) auf 19,4 µg (Simultandestillation bei pH 7), im Hallertauer Smaragd von 2,4 µg auf 53,2 µg (pH 7). Im Slowenischen Golding ließ sich die Ausbeute durch Simultandestillation bei pH 7 von 5,6 µg auf 36,3 µg Geraniol steigern; in der Hallertauer Perle von 3,5 µg auf 22,2 µg und im Hallertauer Hersbrucker steigerte sich von 0,5 µg auf 8,6 µg Geraniol. Die pH-Absenkung auf pH 3 erbrachte für die Sorte Yakima Cascade eine Steigerung der Ausbeute auf 26,0 µg Geraniol, für die Sorte Hallertauer Smaragd auf 48,0 µg, für die Sorte Slowenischer Golding auf 50,2 µg, für die Sorte Hallertauer Perle auf 20,5 µg und für die Sorte Hallertauer Hersbrucker auf 8,3 µg Geraniol.



**Abb. 40:** Geraniolgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2004.

Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

Wie weitere Untersuchungen zeigten, entstehen Linalool und Geraniol vorwiegend im Harzrückstand und weniger im Hopfenpulverrückstand.

#### Freisetzung von Linalool und Geraniol aus den Rückständen der Hopfenextraktion

Um zu testen, ob sich die Ausbeuteerhöhungen durch SDE-Destillation im Vergleich zur SAFE-Destillation einer bestimmten Fraktion der Extraktionsrückstände zuordnen lassen, wurden die Rückstände gesondert untersucht. Darüber hinaus wurde quantitativ erfasst, welchen Einfluss die Lagerung auf den Geraniol- und Linaloolgehalt hatte. Dazu wurde die Quantifizierung von Linalool und Geraniol in der inzwischen acht Monate alten Hopfenprobe mittels SAFE-Destillation nach 4.4.2.2 wiederholt ((A) in Abbildung 41 im Anhang): Die SAFE-Destillation hatte in der frischen Probe Slowenischer Golding eine Geraniolausbeute von 5,6 µg/g Hopfen ergeben. In der acht Mo-

nate alten Probe wurden 17,0 µg/g quantifiziert. Der Linaloolgehalt des Hopfens hatte in der frischen Probe ursprünglich 230,3 µg/g betragen. In der acht Monate alten Probe wurden hingegen 136,8 µg/g bestimmt. Der Geraniolgehalt ist um 11,4 µg/g gestiegen, der Linaloolgehalt hat um 93,5 µg/g abgenommen.

Zur Rückstandsgewinnung wurde die Hopfenextraktion mit nachfolgender SAFE-Destillation ohne Zugabe von internem Standard wiederholt. Aus der Hopfenextraktion mit Diethylether blieb ein Hopfenpulverrückstand übrig. Dieser wurde zur Entfernung eventuell noch vorhandener flüchtiger Verbindungen fünfmal mit Diethylether gewaschen. Aus der nachgelagerten SAFE-Destillation verblieb Hopfenharz. Dieses wurde durch je dreimaliges Auflösen in Diethylether und nachfolgender SAFE-Destillation gewaschen um anhaftende Rückstände flüchtiger Verbindungen zu entfernen. Die Rückstände wurden gefriergetrocknet und gewogen und wie nachfolgend beschrieben nacheinander in Pufferlösung bei pH 3 und pH 7 einer Hitzebehandlung ausgesetzt.

Ziel des ersten Versuchs war es zu testen, ob sich bei Zimmertemperatur durch die alleinige Einwirkung von neutraler und saurer wässriger Pufferlösung auf den Hopfenpulverrückstand Aromastoffe freisetzen lassen. Zur Gewinnung eines Kaltwasserauszugs wurde eine abgewogene Teilmenge Hopfenpulver in einem Rundkolben in Pufferlösung bei pH 3 beziehungsweise bei pH 7 eingerührt, mit internem Standard versetzt und ohne Enzymzugabe acht Stunden lang im verschlossenen Kolben gerührt. Der unlösliche Rückstand wurde abfiltriert. Aus diesem Kaltwasserauszug (Filtrat) wurden die freigesetzten Aromastoffe mit Diethylether ausgeschüttelt. Der Diethylether wurde dann der SAFE-Destillation unterzogen. Im Destillat wurden wieder Geraniol und Linalool quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte wieder nach Methode 4.5.4 in der organischen Phase aus der neutral-basischen Fraktion, die zu diesem Zweck über eine Vigreux Kolonne aufkonzentriert worden war ((**B**) in Abbildung 41 im Anhang). Mit Kaltwasser (pH 3) konnten aus dem Hopfenpulverrückstand 5,7 µg/g Geraniol und 27,2 µg/g Linalool freigesetzt werden. Bei pH 7 waren es 0,8 µg/g Geraniol und 28,5 µg/g Linalool. Die Geraniolfreisetzung mittels Kaltwasserauszug aus dem Hopfenpulverrückstand war bei Zimmertemperatur (ca. 20 °C) also pH-abhängig. In saurer Lösung wurde mehr Geraniol freigesetzt als in neutraler Lösung.

Ziel des zweiten Versuchs war es festzustellen, welchen Einfluss die Temperatur auf die Geraniol- und Linaloolfreisetzung hat. Dazu wurde der erste Versuch unter Hitzeeinwirkung wiederholt. Die beiden Kaltwasserauszüge bei pH 3 und pH 7 wurden direkt einer SDE-Destillation unterzogen. Das Destillat wurde mittels SAFE-Destillation gereinigt und in gewohnter Weise quantifiziert ((C) in Abbildung 41 im Anhang). Durch Kochen in saurer Lösung (pH 3) wurden 4,3 µg/g Geraniol und 287,3 µg/g Linalool freigesetzt. In neutraler Lösung (pH 7) konnten 4,1 µg/g Geraniol und 26,9 µg/g Linalool quantifiziert werden. Die oben beobachtete pH-Abhängigkeit der Geraniol- und Linaloolausbeute war jetzt nach Kochen des Kaltwasserauszugs nicht mehr gegeben. Die Geraniolmenge blieb nahezu unverändert, während sich die Menge an freigesetztem Linalool in saurer Lösung drastisch erhöhte.

Ziel des dritten Versuchs war es zu untersuchen, ob sich aus dem Hopfenpulverrückstand vom ersten Versuch durch Hitzeeinwirkung Geraniol und Linalool freisetzen lassen. Dazu wurde nochmals je ein Kaltwasserauszug bei pH 3 und pH 7 hergestellt. Der Kaltwasserauszug wurde aber im Gegensatz zum ersten Versuch verworfen. Der Hopfenpulverrückstand wurde in einem Rundkolben in Pufferlösungen bei pH 3 und pH 7 eingebracht. Dann wurde der interne Standard pipettiert. Schließlich wurden die Proben der Simultandestillation unterzogen und zur Vorbereitung der Quantifizierung mittels SAFE-Destillation gereinigt ((D) in Abbildung 41 im Anhang). Aus dem Hopfenpulverrückstand ließen sich durch Hitzeeinwirkung in saurer Lösung (pH 3) 1,0 µg/g Geraniol und 3,8 µg/g Linalool freisetzen. Bei einem pH-Wert von 7 waren es 0,7 µg/g Geraniol und 13,8 µg/g Linalool.

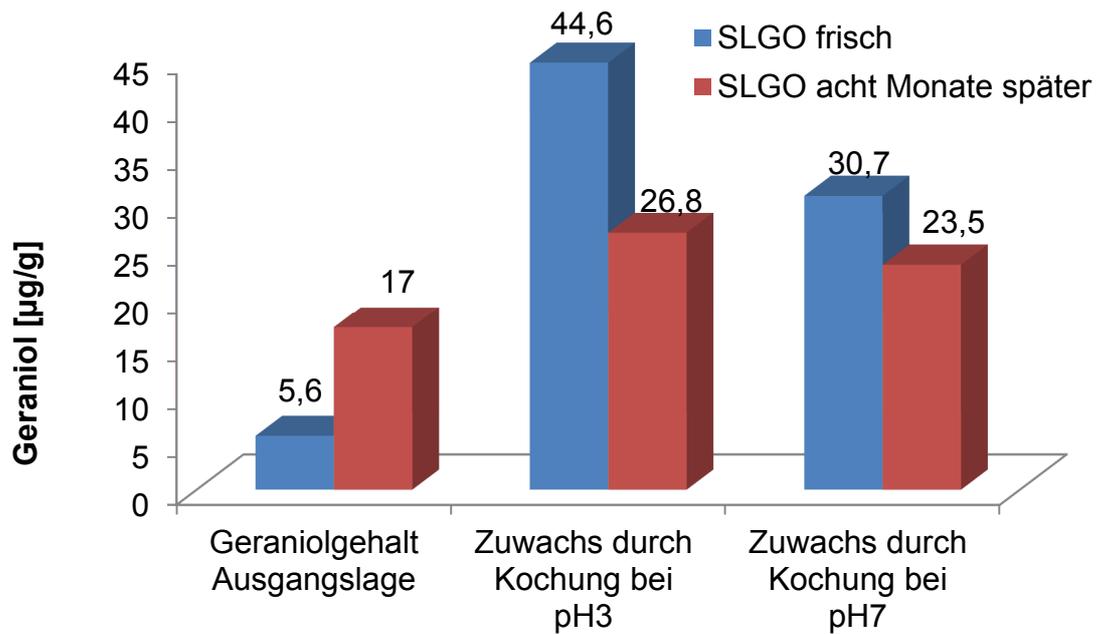
Ziel des vierten Versuchs war es zu untersuchen, ob sich durch Hitzeeinwirkung aus dem Harzrückstand der SAFE-Destillation Geraniol und Linalool freisetzen lassen. Dazu wurden jeweils gleiche Mengen Harz in je einen Rundkolben eingewogen und mit Pufferlösung von pH 3 beziehungsweise pH 7 und internem Standard versetzt. Dann wurde der Kolbeninhalt mittels Simultandestillationsapparatur destilliert um die Proben einer Hitzebehandlung auszusetzen und dabei freiwerdende Aromastoffe aufzufangen. Der aromastoffhaltige Diethylether wurde anschließend mittels SAFE Destillation in gewohnter Weise zur Quantifizierung von Geraniol und Linalool vorbereitet. Die Quantifizierung erfolgte nach Methode 4.5.4 in der organischen Phase aus der neutral-basischen Fraktion, die zu diesem Zweck über eine Vigreux Kolonne auf-

konzentriert worden war ((E) in Abbildung 41 im Anhang). Aus dem Harzrückstand konnten unter sauren Bedingungen (pH 3) 21,5 µg pro Gramm Hopfen Geraniol und 113,9 µg/g Linalool freigesetzt werden. Unter pH 7 waren es 18,7 µg/g Geraniol und 128,7 mg/g Linalool. Die Geraniol- und Linaloolfreisetzungen fanden also zum größten Teil im Harzrückstand statt, wobei bei pH 3 vergleichsweise mehr Geraniol und bei pH 7 wieder mehr Linalool freigesetzt wurden.

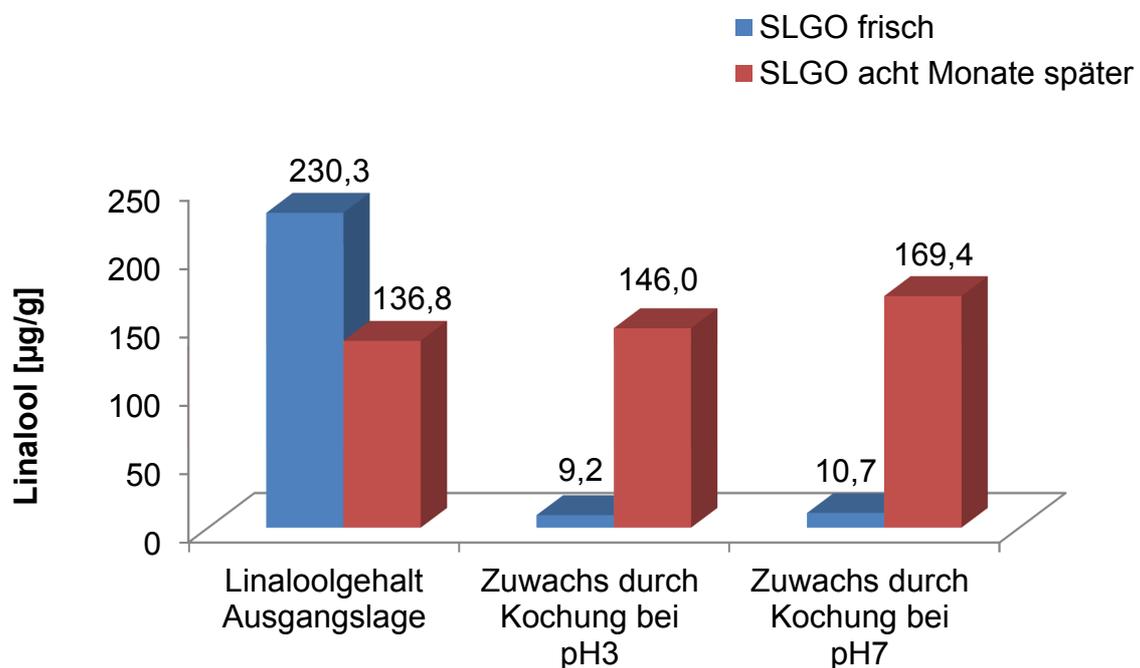
### Einfluss der Lagerung

Im Rahmen dieser Versuche wurde der Hopfen der Sorte Slowenischer Golding (Hopfenernte 2004) zu zwei Zeitpunkten analysiert. Zwischen diesen Zeitpunkten lagen etwa acht Monate, in denen die Hopfenpellets lichtgeschützt und tiefgefroren gelagert waren. Es zeigte sich, dass der Linaloolgehalt in dieser Zeit abnahm, der Geraniolgehalt jedoch zunahm.

In der Summe ergab sich aus den vorangegangenen Versuchen zur Geraniol und Linaloolfreisetzung folgendes (Abbildungen 42, 43): Vor allem Hitzeeinwirkung und ein tiefer pH-Wert führten in der frischen Probe zu einer deutlichen Geraniolfreisetzung (44,6 µg/g), während die Freisetzung in der gelagerten Probe deutlich geringer war (26,8 µg/g). Es fällt auf, dass der Geraniolgehalt durch Lagerung von 5,6 µg/g auf 17,0 µg/g anstieg. Trotzdem lag die freigesetzte Geraniolmenge in der gelagerten Probe weit über der ursprünglichen Ausgangskonzentration (17,0 µg/g). In der frischen Probe konnte durch Hitzeeinwirkung pH-Wert unabhängig relativ wenig Linalool freigesetzt werden (9,2 µg/g bei pH 3 und 10,7 µg/g bei pH 7). Aus den Extraktionsrückständen des gelagerten Hopfens konnte durch Hitzeeinwirkung unter pH 3 überproportional viel Linalool freigesetzt werden (146,0 µg/g), sodass 52,5 µg mehr Linalool freigesetzt wurden als in der frischen Hopfenprobe ursprünglich ungebunden vorhanden waren. Bei pH 7 waren es sogar 75,9 µg mehr.



**Abb. 42:** Einfluss von pH-Wert und Extraktionstemperatur auf Veränderung des Geraniolgehalts im Extraktionsrückstand des Slowenischen Golding (Ernte 2004) innerhalb von acht Monaten Lagerung.



**Abb. 43:** Einfluss von pH-Wert und Extraktionstemperatur auf Veränderung des Linaloolgehalts im Extraktionsrückstand des Slowenischen Golding (Ernte 2004) innerhalb von acht Monaten Lagerung.

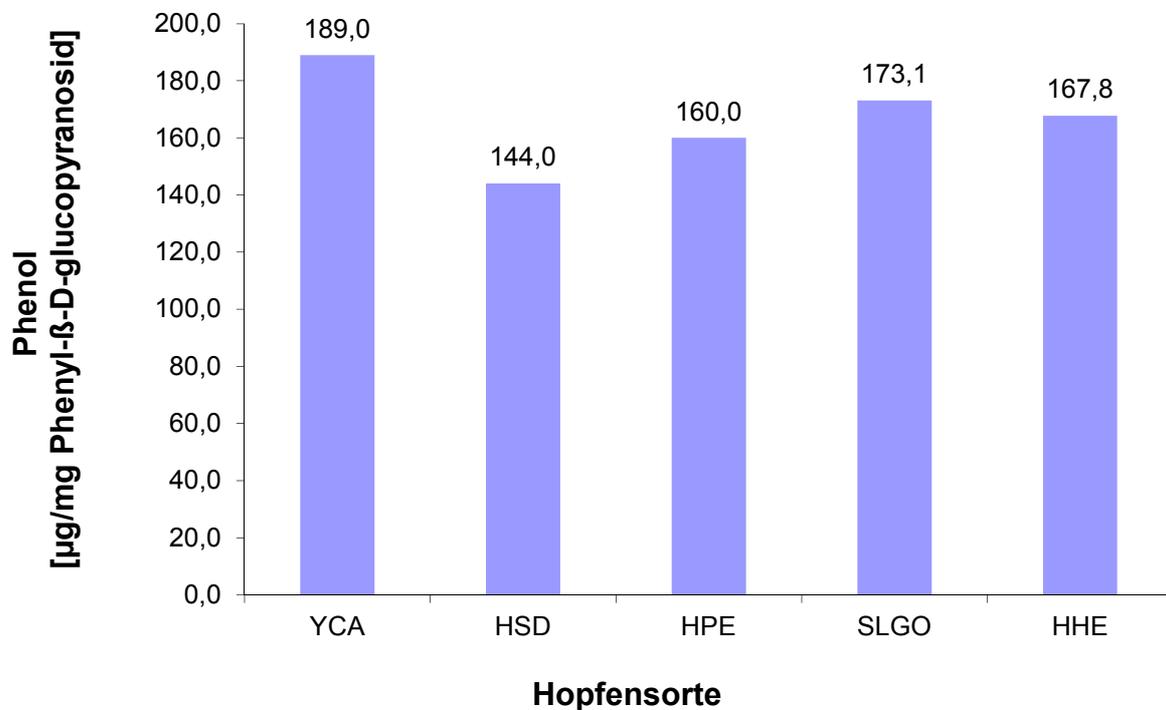
## 2.5 Enzymatische Freisetzung von Linalool und Geraniol aus Hopfenglykosiden

Um nachzuweisen, ob und in welchem Maß durch Enzymreaktionen Glykoside gespalten werden, wurden die von Kollmannsberger (2002) verwendete Methode zur Isolierung von Glykosiden angewandt (4.4.2.1). Der Hopfen wurde im Mörser zerrieben und mit einer definierten Menge Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid als internem Standard versetzt. Dann wurde mit kochendem Wasser extrahiert. Aus dem wässrigen Extrakt wurden Polyphenole mittels Polyvinylpolypyrrolidon abgetrennt. Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer bei reduziertem Druck eingeeengt und zur Eiweißabtrennung mit Methanol versetzt. Nach erneuter Filtration wurde das Filtrat im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und zur weiteren Aufreinigung durch Chromatographie auf eine Amberlite XAD-2 Glassäule aufgebracht. Es wurde nacheinander mit Wasser, einer Mischung aus Pentan-Dichlormethan und Methanol eluiert. Das methanolische Eluat wurde mittels Rotationsverdampfer unter Vakuum bis zur Trockene eingeeengt und in Phosphat-Citrat-Puffer aufgenommen. Diese Lösung wurde für die enzymatische Hydrolyse mit Glucosidase aus *Aspergillus niger* verwendet. Die freigesetzten Aromastoffe wurden mit Diethylether, dem markiertes Phenol und markiertes Linalool als interne Standards zugesetzt waren, extrahiert. Aus dem Extrakt wurde die acide Fraktion ausgeschüttelt und mit Natriumhydrogencarbonatlösung entfernt. Der Extrakt wurde anschließend über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und auf eine Kieselgel gefüllte Glassäule aufgebracht. Die Kohlenwasserstofffraktion wurde mit Pentan eluiert. Dann wurde die linalool- geraniol- und phenolhaltige Fraktion mit Diethylether von der Säule gewaschen und eingeeengt. Die nachfolgende Quantifizierung brachte folgendes Ergebnis:

### Phenolfreisetzung aus dem Standard durch Glucosidase aus *Aspergillus niger*:

Theoretisch lassen sich aus 1 mg Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid 359,9  $\mu$ g Phenol abspalten. Im Versuch wurden mit Glucosidase aus *Aspergillus niger* im Zeitraum von

72 h bei 37 °C tatsächlich 326,3 µg Phenol freigesetzt. Die Ausbeute betrug 90,7 %. Die Phenolausbeute sank unter Anwesenheit der Hopfenglykosidfraktionen deutlich ab (Abbildung 44). Unter Anwesenheit der Glykosidfraktion aus Yakima Cascade betrug die Phenolausbeute aus dem internen Standard Phenyl-β-D-glucopyranosid 189,0 µg/g, das sind nur noch 52,5 %. Mit Glykosiden aus Slowenischer Golding wurden 173,1 µg (48,1 %) Phenol freigesetzt; in Anwesenheit der Glykosidfraktion des Hallertauer Hersbrucker konnten 167,8 µg (46,6 %) Phenol quantifiziert werden. Die Phenolfreisetzung im Versuch mit Glykosiden aus Hallertauer Perle betrug 160,0 µg (44,5 %) und im Versuch mit Glykosiden aus Hallertauer Smaragd 144,0 µg (40 %).

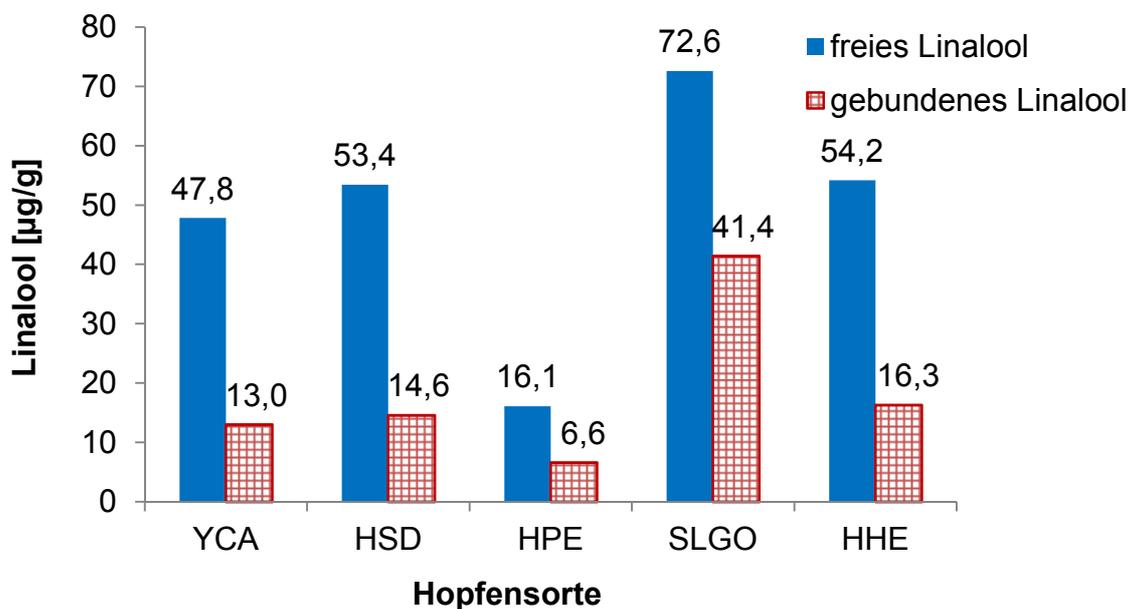


**Abb. 44:** Enzymatische Phenolfreisetzung aus internem Standard Phenyl-β-D-glucopyranosid durch 50 mg Glucosidase aus *Aspergillus niger* nach 72 h bei 37 °C während enzymatischer Spaltung von Glykosiden verschiedener Hopfsorten, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).

Unter Berücksichtigung der prozentualen Ausbeuteverluste an Phenol wurden nachfolgend die enzymatische Linalool- und Geraniolfreisetzung aus Hopfenglykosiden ausgewertet:

### Enzymatische Freisetzung von Linalool

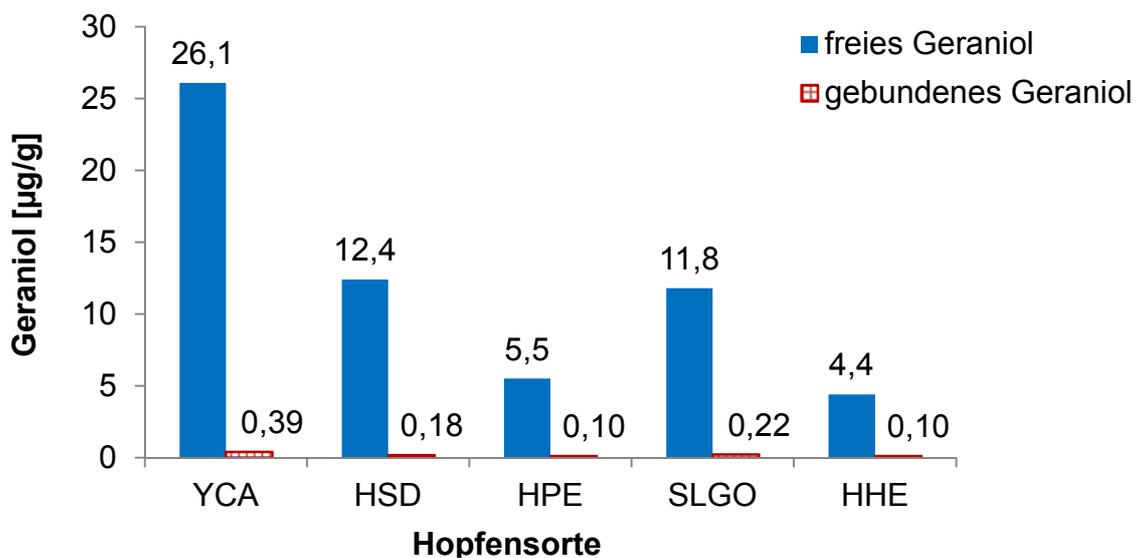
Die durch Glucosidase aus *Aspergillus niger* freigesetzte Linaloolmenge war stark sortenabhängig. Aus der Sorte Slowenischer Golding ließ sich mit 41,4 µg/g deutlich mehr Linalool aus Glykosiden freisetzen als aus den übrigen Sorten. Die enzymatische Freisetzung von Linalool aus Glykosiden der Sorte Hallertauer Perle betrug dagegen nur 6,6 µg Linalool. Aus der Sorte Hallertauer Hersbrucker wurden 16,3 µg freigesetzt; die Freisetzung aus Glykosiden der Sorte Hallertauer Smaragd betrug 14,6 µg und aus Yakima Cascade 13,0 µg. Für alle Sorten ließ sich feststellen: Je mehr gebundenes Linalool vorlag, desto mehr freies Linalool war auch vorhanden. Die Sorte Slowenischer Golding war auch die Sorte mit dem höchsten Gehalt an freiem Linalool (Abbildung 45).



**Abb. 45:** Enzymatische Linaloolfreisetzung aus Glykosiden verschiedener Hopfsorten, Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) unter Berücksichtigung der Ausbeuteverluste des internen Standards Phenyl-β-D-glucopyranosid.

### Enzymatische Freisetzung von Geraniol

Im Gegensatz zu Linalool ließ sich Geraniol nach der enzymatischen Hydrolyse der Hopfenglykoside in kaum nennenswerten Mengen freisetzen. Im Versuch wurden aus Yakima Cascade 0,39 µg Geraniol, aus Slowenischer Golding 0,22 µg Geraniol, aus Hallertauer Smaragd 0,18 µg, und aus den Sorten Hallertauer Perle und Hallertauer Hersbrucker je 0,10 µg Geraniol freigesetzt (Abbildung 46).



**Abb. 46:** Enzymatische Geraniolfreisetzung aus Glykosiden verschiedener Hopfensorten, Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) unter Berücksichtigung der Ausbeuteverluste des internen Standards Phenyl-β-D-glucopyranosid.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Zur Unterscheidbarkeit der Hopfensorten

Es ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen wesentliche Sortenunterschiede in wertgebenden Geruchsstoffen qualitativ aufzuklären und quantitativ zu erfassen. Damit werden der Hopfenverarbeitenden Industrie wertvolle Hinweise zur gezielten Optimierung der Aromaeigenschaften ihrer Produkte gegeben. Insbesondere konnte geklärt werden, warum sich die Hopfensorte Yakima Cascade beim sensorischen Sortenscreening am Beginn dieser Arbeit signifikant von allen anderen Sorten (Golding, Hersbrucker, Perle, Smaragd) unterschied. Das konnte nicht an der Linaloolkonzentration liegen, denn Cascade hatte einen ähnlich hohen Linaloolgehalt wie die Sorten Smaragd und Hersbrucker; diese wiederum konnten sensorisch nicht vom Golding unterschieden werden, der die höchsten Linaloolkonzentrationen aufwies. Der signifikante Unterschied von Cascade zu den anderen Sorten musste also eine andere Ursache haben: Analytisch wurden im Cascade im Vergleich zu allen anderen Hopfensorten höhere Konzentrationen folgender Verbindungen gefunden: (E,Z)-2,6 Nonadienal, Geraniol, 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon. Beim (E,Z)-2,6 Nonadienal betrug der Unterschied von Cascade zur Sorte Golding lediglich 1,1 µg. Der Unterschied zwischen Golding und den anderen Hopfensorten betrug durchschnittlich 1,6 µg. Trotzdem wurde zwischen Golding und Perle, Smaragd und Hersbrucker sensorisch kein Unterschied festgestellt. Es ist daher unwahrscheinlich, dass (E,Z)-2,6 Nonadienal für die gute Unterscheidbarkeit von Cascade zu allen anderen Hopfensorten verantwortlich war. Die im Vergleich zu den Sorten Perle, Smaragd, Golding und Hersbrucker gefundenen hohen Geraniolkonzentrationen könnten eine Ursache für die gute Unterscheidbarkeit sein. Über die Bedeutung von Geraniol im Hopfen wurden für Yakima Cascade ebenfalls an anderer Stelle berichtet (Eyres et al., 2007). Eyres, der seine Ergebnisse auf eine Charm-Analyse stützte, ordnete Geraniol der Gruppe wichtiger Hopfenaromastoffe zu. Dem 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon, das in der hier vorliegenden Arbeit erstmals als Aromastoff des Hopfens identifiziert und quantifiziert worden ist, kommt die Rolle des Schlüsselaromastoffs von Cascade Hopfen zu. Der Aromastoff konnte im Rahmen der Aromaextraktverdünnungsanalyse

bis in Verdünnungsstufe 16 sensorisch detektiert werden. Die Konzentration im Yakima Cascade bezogen auf das Erntejahr 2004 betrug nur 2,9 µg/kg und im Erntejahr 2005 nur 1,8 µg/kg. Diese Konzentrationen liegen um den Faktor 1000 unter der Konzentration der meisten anderen Aromastoffe. Die spezielle johannisbeerartige Note des Yakima Cascade war trotzdem unverkennbar für das typische Aroma dieses Hopfens. Sein Aroma prägt auch die damit gebrauten Biere. Auf die Übergänge in das Bier wird später noch näher eingegangen.

Die Geruchsschwelle von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in Wasser liegt bei 0,1 ng/L (Tominaga et al., 1997). Dies erklärt, warum dieser Aromastoff in einer so geringen Konzentration eine so bedeutende Rolle einnehmen konnte, obwohl andere Hopfenaromastoffe in einer vielfach höheren Konzentration vorlagen und zudem auch in weit höheren Verdünnungsstufen wahrnehmbar waren. 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon wurde zuvor bereits in den unterschiedlichsten Lebensmitteln und Naturstoffen detektiert. Im Jahr 1995 gelang der Nachweis in Rotwein (Darriet, et al., 1995). Im Jahr 1997 konnte 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in verschiedenen Weißweinsorten gefunden werden (Guth, 1997). Im Jahr 1997 wurde 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon zum ersten Mal als ungebundener Aromastoff in Buxbaum, *Buxus sempervirens* beschrieben (Tominaga et al., 1997). 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon wurde darüber hinaus als wichtiger Aromastoff in Grapefruits entdeckt (Buettner und Schieberle, 1999). Stets wurde diesem Aromastoff eine auffällige Beteiligung am Aroma der untersuchten Naturstoffe zugeschrieben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten darüber hinaus belegen, dass die Sorte Perle zu Recht unter den Aromahopfen den aromaschwächeren zugerechnet wird. Dies hängt mit ihrer Herkunft zusammen: Perle wurde aus dem Bitterhopfen Northern Brewer gezüchtet. Die hier gefundenen und im FD-Chromatogramm (Abbildung. 11) deutlich sichtbar geringen Linalool, Geraniol- und Myrcenkonzentrationen verwundern deshalb nicht, sondern bestätigen das bisherige Wissen über diese Sorte (CMA Sortenmappe 2005).

Den qualitativen und quantitativen Daten folgend, sind es vor allem die geringeren Linalool- Geraniol- und Myrcenmengen, die dazu führten, dass die Sorte Perle von den Sorten Cascade, Hersbrucker und Smaragd unterschieden werden konnte. Neben den bereits von Steinhaus (2001) als Schlüsselaromastoffe des Hopfens identifi-

zierten Verbindungen Linalool und Myrcen war auch Geraniol für die Unterscheidbarkeit der hier untersuchten Sorten ein wichtiger Aromastoff.

Da Hopfen, wie anfangs beschrieben, überwiegend zum Bierbrauen verwendet wird, ist es zur Herstellung hopfenaromatischer Biere essentiell zu wissen, welche seiner Schlüsselaromastoffe in welchen Mengen aromawirksam durch den Brauprozess in das Bier übergehen:

### **3.2 Übergang von Hopfenaromastoffen in das Bier**

Es ist bekannt, dass Linalool als wichtiger Hopfenaromastoff (Steinhaus 2000) während des Brauprozesses aromawirksam in das fertige Bier übergeht (Fritsch, 2001) Fritsch konnte darüber hinaus zeigen, dass von den Schlüsselaromastoffen der von Steinhaus (2000) untersuchten Hopfensorte Spalter Select (R)-Linalool maßgeblich für die typische Hopfennote des damit gebrauten Bieres verantwortlich war.

Die niedrigen Linaloolwerte in der Hopfensorte Hallertauer Perle bestätigen also die landläufige Ansicht, dass sich mit dieser Hopfensorte eher Biere mit geringer Hopfenblume brauen lassen. Der relativ hohe Geraniolgehalt in der Hopfensorte Yakima Cascade legt den Schluss nahe, dass Geraniol tatsächlich das Aroma eines mit Yakima Cascade gebrauten Bieres beeinflussen kann. Dies wurde bereits 1986 von Lam postuliert (Lam et al., 1986).

In Brauversuchen von Kaltner et al. (2001) wurden später citrusartige, fruchtige Aromenoten registriert, die nicht mit Linalool erklärt werden konnten. Dies legte die Vermutung nahe, dass es neben Linalool in anderen Hopfensorten weitere Aromastoffe geben muss, die sich auf das Bieraroma auswirken und die nicht mit den bisher bekannten Hopfenaromastoffen erklärt werden konnten.

In weiteren Untersuchungen identifizierten und quantifizierten Fritsch und Schieberle (2005) 22 Aromastoffe in Bier vom Typ Pilsner mit denen sie anschließend das Aroma dieser Biersorte nachahmen konnten. Unter diesen 22 Aromastoffen war auch der Hopfenaromastoff Ethyl-4-methylpentanoat, der von Steinhaus (2000) in Spalter Select identifiziert wurde, bisher aber nicht als Bieraromastoff aufgefallen war. Dies könnte daran liegen, dass Ethyl-4-methylpentanoat nicht in allen Hopfensorten aromawirksam vertreten war und die untersuchten Biere von Fritsch (2001) womöglich

---

mit eben solchen Sorten gebraut worden waren. Beispielsweise ist dieser Aromastoff in den Sorten Hallertauer Hersbrucker, Hallertauer Perle, Hallertauer Smaragd, Slowenischer Golding und Yakima Cascade nicht mit FD-Faktoren  $\geq 4$  aufgefallen. Würde man also mit diesen Sorten Bier brauen, wäre nach den zurzeit üblichen Brauverfahren ein aromawirksamer Übergang von Ethyl-4-methylpentanoat in das Bier eher unwahrscheinlich.

Darüber hinaus wurden tatsächlich, wie von Fritsch (2001) vermutet, weitere aromapragende Verbindungen identifiziert, von denen bisher nicht bekannt war, dass sie zu den Aromastoffen des Hopfens gehörten. 1-Sulfanyl-2-propanol war mit seiner zwiebeligen Geruchsnote typisch für die Sorte Hallertauer Smaragd. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin prägte das Aroma aller fünf Hopfensorten mit einer deutlich erdigen, paprikaartigen Note. Calamenen fiel mit seinem blumig-anisartigen Aroma auf. Es wurde bereits 1978 als Hopfeninhaltsstoff erwähnt (Tressl et al., 1978 a). Bisher fand sich jedoch kein Hinweis auf die Bedeutung von Calamenen als Schlüsselaromastoff des Hopfens. Auch die blumig, honigartige Note von p-Anisaldehyd war bisher noch nie Gegenstand von Aromaanalysen in Hopfen. Hinter der würzigen Geruchsnote im Hopfen wurde darüber hinaus erstmals Sotolon (3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon identifiziert und quantifiziert. Sotolon wies in mindestens einer Hopfensorte einen FD-Faktor von 16 auf. Seine einprägsame würzige Note erinnerte an „Maggi“ beziehungsweise Liebstöckel und trug wesentlich zur quantitativen Unterscheidbarkeit der Hopfensorten Smaragd, Perle und Cascade bei. Sotolon wurde bereits 2001 in hellem Lagerbier identifiziert (Komarek, 2001). Sein Vorkommen in ungekochter und ungehopfter Bierwürze ist ebenfalls gesichert (Fritsch et al., 2004). Sotolon wurde später von Fritsch und Schieberle, (2005) als Bieraromastoff mit einem FD-Faktor von 512 und einem Aromawert von 3 registriert. Er wusste damals aber nicht, dass es sich bei 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon auch um einen Hopfenaromastoff handelte.

Der in Bezug auf Hopfen und Bier interessanteste Aromastoff ist das bereits oben erwähnte 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon. Nachfolgend wird 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon deshalb unter dem Aspekt Übergang in das Bier diskutiert:

4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon wurde von Vermeulen und Collin et al. (2003) in frischem Bier entdeckt. Man konnte sich die Herkunft dieser Verbindung nicht eindeutig erklären und unternahm in Unwissenheit von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon als Hopfenaromastoff einige hier nicht näher ausgeführte Erklärungsversuche. Lange war darüber hinaus unklar, ob die Beeinflussung des Bieraromas durch 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon positiv oder negativ zu werten sei. 1980 wurde von Tressl in gealterten Lagerbieren ein johannisbeerartiges Fehlroma festgestellt. Da in manchen dieser gealterten Lagerbieren auch 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon nachgewiesen werden konnte, lag der Schluss nahe, dass 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon für das Fehlroma verantwortlich sein könnte (Tressl et al., 1980). Beweisen ließ sich diese These damals nicht, da nicht alle gealterten Biere mit starkem johannisbeerartigem Fehlroma auch 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon enthielten. Eine lagerungsbedingte Bildung von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon erschien aber möglich. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der im selben Jahr entdeckten unbeabsichtigten Bildung von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon aus Mesityloxid, welches durch Ausdünstungen mesityloxidhaltiger Farbe während der Renovierungsarbeiten im laufenden Betrieb einer Mälzerei über das Malz seinen Weg in die Würze gefunden hatte und im Verlauf der Gärung nachweislich zu 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon umgesetzt worden war (Cosser, 1980). Hopfen als Aromastoffquelle wurde damals ausgeschlossen, da sowohl das beanstandete Bier als auch die Nullprobe mit derselben Hopfencharge gebraut worden waren.

1986 wurde in Bier, welches mit Hopfen der Sorte Cascade gebraut worden war, eine intensive grapefruitartige Note festgestellt, die damals aber nicht identifiziert werden konnte (Lam et al., 1986). Lam vermutete dahinter Alterungsreaktionen.

Ob 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon am Alterungsaroma von Bier beteiligt ist, konnte nie bewiesen werden. Eingehende Untersuchungen am Alterungsverhalten von hellem Vollbier haben keinen Hinweis auf 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon ergeben; stattdessen wurde in diesem gealtertem Bier 3-Methyl-3-sulfanylbutylformiat entdeckt, welches einen sehr ähnlichen Geruch wie höher konzentriertes 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon aufweist, nämlich unangenehm ähnlich wie Katzenurin (Schieberle, 1991).

Escudero et al. (2004) konnte anhand von Weinanalysen nachweisen, dass sich 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon aromawirksam gegenüber weit potenteren Aromastoffen durchsetzte. Dies führte dazu, dass auch in Bier wieder gezielt nach Thiolen gesucht wurde.

Vermeulen et al. (2006) bestätigte Ihr Ergebnis von (2003) indem sie erneut 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in Bier nachwies. Sie nahm an, dass 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon während des Brauprozesses durch Enzyme der Hefe aus Aromavorstufen freigesetzt werden könnte. Dieser Weg wurde für Rotwein bereits aufgezeigt und als Aromavorstufe 4-(4-Methylpentan-2-on)-L-cystein genannt (Howell et al., 2004).

An der Versuchs- und Lehrbrauerei Weihenstephan wurde 2003 ein mit Yakima Cascade stark gehopft Bier gebraut. Das Bier zeichnete sich tatsächlich durch eine charakteristische fruchtige Note aus, die in Vergleichsbieren ohne Hopfung mit Yakima Cascade nicht festgestellt worden war. Es war daher naheliegend außerhalb des Themas dieser Arbeit, nach 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in diesem Bier zu suchen. Die nach Methode 4.4.1.1 quantifizierten 4,4 ng/L 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon lagen deutlich über dem für diesen Aromastoff bekannten Schwellenwert in Wasser von 0,1 ng/L (Tominaga, 1997). Steinhaus und Schieberle erbrachten (2007) den endgültigen Nachweis, dass 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon vom Hopfen in das Bier übergeht. Das Thiol erreichte im Cascade-Bier bei einer Transferrate von 64% eine Konzentration von 1,7 ng /L. Der Aromawert von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in Bier betrug drei. Durch Verkostung von handelsüblichem Bier, dem zuvor 1,7 ng /L 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon zu dosiert worden war, konnte der Aromabeitrag von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon klar bestätigt werden (Steinhaus und Schieberle, 2007). Ob die Aromanote von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon letztlich als angenehm oder unangenehm empfunden wird, entscheidet die Konzentration dieses Thiols. Takoi bewertete den Einfluss des 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon im Hopfen auf das damit gebraute Bier als positiv und schrieb ihm eine betont blumige Geruchsnote zu (Takoi et al., 2009). Dies deckt sich mit den eigenen Beobachtungen aus dem Versuchssudbier, welches mit Yakima Cascade gehopft worden war.

Für die Erzielung einer fruchtigen 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon-Note in Bier ist abschließend folgende Beobachtung von Kishimoto interessant:

Arbeiten von Kishimoto et al. (2008) vermuteten einen Zusammenhang zwischen dem Einsatz von kupferhaltigem Pflanzenschutzmittel in Hopfengärten und dem Gehalt an 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in den jeweiligen Hopfenpellets. Bei der Untersuchung von 18 Hopfensorten aus unterschiedlichen Herkunftsländern, darunter USA, Australien, Neuseeland, Deutschland, Tschechien und Großbritannien konnte ein inverser Zusammenhang zwischen dem Gehalt an 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon und Kupfer nachgewiesen werden. Kishimoto et al. (2008) fand „extrem hohe“ Kupferkonzentrationen in allen untersuchten Hopfensorten europäischer Anbauggebiete, während in den Hopfensorten aus amerikanischen, australischen und neuseeländischen Anbaugebieten kaum Kupfergehalte vorhanden waren. Gehalte an 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon fanden sich ausschließlich in den nicht-europäischen Hopfensorten. Kishimoto erklärte dies mit dem in Europa zum Einsatz gebrachten Pflanzenschutzmittel „Bordeaux mixture“, das Kupfer(II)-sulfat und Calciumhydroxid enthält. Im Weinbau kam es nach Einsatz dieses Pflanzenschutzmittels zu einem Aromaverlust der davon betroffenen Trauben (Kobayashi und Tominaga, 2005). Als Ursache wurde eine Reaktion thiolhaltiger Aromastoffe mit Kupferionen angenommen. Kishimoto vermutete deshalb analoge Reaktionen zwischen 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon und den Kupferionen (Kishimoto et al., 2008).

Der Übergang von Linalool aus dem Hopfen in das Bier ist hervorragend. Dies wurde von Fritsch (2001) bewiesen und von Steinhaus und Schieberle (2007) erneut bestätigt. Voraussetzung dafür ist allerdings eine zweite Hopfengabe in den Whirlpool da das Linalool der ersten Hopfengabe verloren geht (Fritsch, 2001).

Auch über den Aromabeitrag von Geraniol im Bier wurden mehrere Überlegungen angestellt: Tressl et al. (1978 a) fand Geraniol in Hopfenöl und vermutete einen Übergang von Hopfen in Bier. Er konnte Geraniol wenig später auch in Bier identifizieren (Tressl, 1978 b), äußerte sich aber nicht über den Aromabeitrag dieser Verbindung. Peacock war der Überzeugung, dass aus den Hopfensorten Cascade und Cluster relativ viel Geraniol in die damit gebrauten Biere übergeht. Er konnte Geraniol nach Brauversuchen in Bieren nachweisen. Peacock vermutete hinter dem Gera-

---

niolgehalt im Bier eine enzymatische Freisetzung aus Geranylisobutytrat im Verlauf der Würzekochung, welches sowohl in Hopfen als auch in Bier nachweisbar war. Er untermauerte seine Vermutung durch einen Versuch, in dem er zeigte, dass Bierhefe potentiell in der Lage ist, aus einer wässrigen Lösung Geranylisobutytrat Geraniol freizusetzen (Peacock et al., 1981).

Steinhaus und Schieberle konnten (2007) zeigen, dass Geraniol aromawirksam vom Hopfen in das Bier übergeht. Geraniol erreichte im Bier aus Cascade-Hopfen einen Aromawert von eins.

Im Zusammenhang mit dem Übergang von Hopfenaromastoffen in das Bier wurde überlegt, wie die Aromaverluste durch den Kochprozess umgangen werden könnten. Insbesondere in Deutschland stieß man schnell an die Grenzen des Reinheitsgebots. Gemäß § 9 Abs. 5 vorläufiges Biergesetz dürfen Hopfenauszüge nur vor oder während der Dauer des Würzekochens zugegeben werden. Der deutsche Brauerbund stellte am 17. Januar 2012 klar, dass unter Hopfenauszügen Hopfenextrakt zu verstehen sei. Damit besteht auch für deutsche Brauer Rechtssicherheit darüber, dass die im Ausland schon lange praktizierte technologische Methode, Naturhopfen oder Hopfenpellets nach dem Würzekochen in Gärbehälter, Lagertanks oder inline mittels Durchlaufbehälter auch unmittelbar vor der Abfüllung des Bieres zuzugeben, auch in Deutschland zulässig ist. Dieses als „Hopfenstopfen“ bekannte Verfahren verstößt also nicht gegen gesetzliche Vorschriften (Dornbusch, 2012). Unter dieser Prämisse kann jetzt diskutiert werden, welche Aromastoffe neben Linalool, Geraniol und 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon durch Hopfenstopfen in das Bier überführt werden könnten, die ansonsten durch den Prozess des Würzekochens verloren gegangen wären. Dazu wurden nachfolgend aus den bekannten Geruchsschwellen der quantifizierten Aromastoffe des Sortenvergleichs und den quantitativen Daten die entsprechenden Aromawerte berechnet. Die Geruchsschwellen dieser Aromastoffe in Wasser wurden überwiegend den Analysen von Czerny et al. (2008) entnommen:

**Tabelle 6:** Geruchsschwellenwerte quantifizierter Hopfenaromastoffe

<b>Aromastoff</b>	<b>Geruchsschwellen in Wasser [µg/L]</b>	<b>Literatur</b>
Myrcen	4,9	Czerny 2008
Octanal	6,9	Czerny 2008
(Z)-1,5-Octadien-3-on	0,0012	Rychlik 1998
4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon	0,0008	Tominaga 1998
Nonanal	8,0	Czerny 2008
Methional	1,4	Czerny 2008
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	0,038	Czerny 2008
Linalool	0,17	Czerny 2008
Buttersäure	7700	Czerny 2008
Phenylacetaldehyd	6,3	Schuh 2004
3-Methylbuttersäure	29000	Czerny 2008
(E,E)-2,4-Nonadienal	0,19	Czerny 2008
(E,Z)-2,6-Nonadienal	0,0091	Czerny 2008
Pentansäure	17000	Czerny 2008
Geraniol	2,5	Czerny 2008
Sotolon	1,1	Czerny 2008
Vanillin	210	Czerny 2008

Für die Berechnung der Aromawerte wurde von einer kräftigen Hopfengabe von 300 g pro 100 L ausgegangen. Das nachfolgende Gedankenexperiment für ein Hopfenstopfen setzte weiter voraus, dass die Aromastoffe aus dem Hopfen vollständig in das Bier übergehen.

**Tabelle 7:** Aromawerte quantifizierter Hopfenaromastoffe der Sorten Yakima Cascade, Hallertauer Smaragd, Hallertauer Perle, Slowenischer Golding, Hallertauer Hersbrucker (Hopfendosage je 3 g/L).

<b>Aromastoffe</b>	<b>Aromawerte</b>				
	<b>YCA</b>	<b>HSD</b>	<b>HPE</b>	<b>SLGO</b>	<b>HHE</b>
<b>Myrcen</b>	<b>612</b>	<b>612</b>	<b>490</b>	<b>490</b>	<b>796</b>
Octanal	<1	2	1	<1	<1
<b>(Z)-1,5-Octadien-3-on</b>	<b>43</b>	<b>35</b>	<b>43</b>	<b>35</b>	<b>40</b>
<b>4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon</b>	<b>6,8</b>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Nonanal	<1	4	2	<1	2
Methional	<1	<1	<1	<1	<1
<b>3-Isobutyl-2-methoxypyrazin</b>	<b>474</b>	<b>1082</b>	<b>584</b>	<b>561</b>	<b>292</b>
<b>Linalool</b>	<b>844</b>	<b>942</b>	<b>284</b>	<b>1281</b>	<b>957</b>
Buttersäure	<1	<1	<1	<1	<1

**Tabelle 7: Fortsetzung**

Aromastoffe	Aromawerte				
	YCA	HSD	HPE	SLGO	HHE
Phenylacetaldehyd	<1	1	3	<1	<1
3-Methylbuttersäure	<1	<1	<1	<1	<1
<b>(E,E)-2,4-Nonadienal</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>(E,Z)-2,6-Nonadienal</b>	<b>1385</b>	<b>429</b>	<b>528</b>	<b>1022</b>	<b>495</b>
Pentansäure	<1	<1	<1	<1	<1
<b>Geraniol</b>	<b>31</b>	<b>15</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>5</b>
Sotolon	<1	<1	<1	<1	<1
Vanillin	<1	<1	<1	<1	<1

Neben den bereits diskutierten Aromastoffen Myrcen, Linalool, 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon und Geraniol, die trotz Würzekochung nachweislich in das Bier übergangen, könnten durch Hopfenstopfen unter den oben gemachten Annahmen zusätzlich Octanal, (Z)-1,5-Octadien-3-on, Nonanal, 3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazin, Phenylacetaldehyd, (E,E)-2,4-Nonadienal und (E,Z)-2,6-Nonadienal, aromawirksam in das Bier übergehen.

Die Diskussion der Übergänge von Hopfenaromastoffen in das Bier muss berücksichtigen, dass nicht nur die Hopfensorte, sondern auch spezifische Bedingungen während der Weiterverarbeitung den Aromastoffgehalt beeinflussen. Bekannt ist, dass Hopfenalterung zu einem Anstieg der freien Fettsäuren führt, wobei der Gehalt an freien Fettsäuren ein wichtiges Kriterium zur Sortenunterscheidung von Hopfen ist (Tressl et al., 1978 a). Ein relativ hoher 3-Methylbuttersäuregehalt ist typisch für gealterten Hopfen. Im Vergleich von Aroma- und Bitterhopfen gilt aber zusätzlich, dass Aromahopfensorten relativ mehr 3-Methylbuttersäure enthalten während für Bitterhopfen größere Anteile an 2-Methylpropionsäure typisch sind. Das Konzentrationsverhältnis zwischen 3-Methylbuttersäure und 2-Methylpropionsäure kann deshalb nach Tressl zur Sortendifferenzierung verwendet werden. Bezogen auf den aktuellen Sortenvergleich fiel auf, dass sich der geringste 3-Methylbuttersäuregehalt in der Hallertauer Perle findet, die wie oben beschrieben eng mit den Bitterhopfen verwandt ist.

Lagerung wirkte sich positiv auf den Geraniolgehalt aus. Er stieg, was in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte. Hingegen baute sich Linalool durch die Lagerung ab. Diese Beobachtungen werden durch Marriott (2006) bestätigt. Eine schlüssige Erklä-

rung konnte dafür bisher nicht gefunden werden. Es bedarf also weiterer Untersuchungen.

Es gibt darüber hinaus Hinweise auf eine Freisetzung von Linalool aus Hopfen in Folge von Hitzeeinwirkung während der Hopfentrocknung (Kaltner et al., 2001). Die Daten der hier vorliegenden Arbeit bestätigen eine Linaloolfreisetzung unter Hitzeeinwirkung. Der Effekt trat auf, als zwei Hopfenextraktionsmethoden miteinander verglichen wurden. Die Simultandestillationsmethode lieferte deutlich höhere Geraniol- und Linaloolausbeuten als das schonende Verfahren SAFE. Untersucht wurde im Rahmen der Simultandestillationsmethode auch eine eventuelle pH-Abhängigkeit. Die beobachtete Geraniol Zunahme während des Kochens bei pH-Werten im sauren Bereich, die offensichtlich auf eine Hydrolyse zurückzuführen war, findet durch die Arbeiten von Marriott (2006) Bestätigung. Auch er konnte bei abnehmenden pH-Werten während der Würzekochung eine Zunahme des Geraniols beobachten. Die von ihm unter denselben Bedingungen beschriebene Abnahme des Linaloolgehalts konnten in dieser vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Das Gegenteil war der Fall. Linalool nahm während des Kochens bei pH Werten im sauren Bereich geringfügig zu.

Auch Gärprozesse führen zu einem Anstieg der Linaloolkonzentration (Kaltner et al., 2001). Daraus wurde geschlossen, dass Hopfen Glykoside oder andere Aromastoffvorstufen enthält, aus denen sich später im Bier während des Gärprozesses Aromastoffe freisetzen lassen, so wie es bereits von Goldstein im Jahr (1999) postuliert wurde. Exakte Quantifizierungsergebnisse zur Unterstützung dieser Vermutung fehlten bisher. Die Autoren konnten also nicht klären in welchen Mengen sich Aromastoffe, insbesondere Linalool, tatsächlich aus Glykosiden freisetzen lassen. Diese Lücke konnte mit vorliegender Arbeit geschlossen werden. Die Ergebnisse der Stabilisotopenverdünnungsanalyse zeigten: Die Fähigkeit der Bierhefe, während der Gärung glykosidisch gebundenes Linalool freizusetzen, ist für die Praxis bedeutungslos, da im Bier nur wenige Glykoside vorliegen. Zu berücksichtigen ist weiter, dass durch die Hefe freie Terpene mittels Biotransformation ineinander umwandelt werden können. Insbesondere sind Hefen in der Lage in kleinen Mengen Linalool in Geraniol und Geraniol in Citronellol, Nerol und  $\alpha$ -Terpineol umzubauen (King et al., 2003). Ein Beitrag der Bierhefe zur Steigerung des Hopfenaromas im Bier ist daher in nennenswertem Umfang nicht zu erwarten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen auch, dass

---

im Hopfen offensichtlich Hemmstoffe vorhanden sind die eine enzymatische Hydrolyse behindern. Die Wirksamkeit der Hemmstoffe ist dabei sortenspezifisch leichten Schwankungen unterworfen. Eine antibakterielle Wirkung von Hopfeninhaltsstoffen ist seit längerem bekannt (Jählig und Schade, 1981). Zahlreiche Autoren konnten eine Hemmwirkung von Hopfeninhaltsstoffen vor allem gegen grampositive Bakterien nachweisen. Diese antibakterielle Wirkung bestimmter Hopfeninhaltsstoffe war bekanntlich einer der wichtigen Gründe, warum Hopfen seit Urzeiten beim Bierbrauen eingesetzt wurde. Hopfen wird auch heute u.a. großtechnisch zur Hemmung von Bakterien und damit zur Einsparung von Desinfektionsmitteln bei der Zuckerrübenextraktion verwendet (Hein und Pollach, 1997). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass zuerst die Hemmstoffe aus dem Hopfenextrakt entfernt werden müssten, um das Aromapotentiale glykosidisch gebundener Aromastoffe voll auszuschöpfen.

.

### **3.3 Schlussfolgerung für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis**

Der wirtschaftliche Wert des Hopfens wird bisher durch seinen Gehalt an  $\alpha$ -Säure bestimmt. Dadurch wird allein die Bitterkeit berücksichtigt, nicht jedoch das Aroma. Zwischen dem  $\alpha$ -Säuregehalt und dem Aromagehalt des Hopfens besteht nach Hermann et al., (2008) keine Korrelation. Das entscheidende aromarelevante Merkmal einer Aromahopfensorte ist sein charakteristisches Aromaprofil. Mit einer höheren Hopfenzugabe, die verwendet wird, um z.B. das hopfige Aroma der Sorte auszunutzen, wird jedoch zwangsläufig auch eine Erhöhung der Bitterstoffe bewirkt. Eine Möglichkeit, das Aroma ohne gleichzeitige Intensivierung der Bitterkeit zu erhöhen, kann nur in einer Fraktionierung und anschließender selektiver Dosage einiger ausgewählter Hopfenfraktionen bestehen. Technische Weiterentwicklungen des Sudhausprozesses sind hierzu erforderlich. Es wird darüber hinaus empfohlen, die Herangehensweise bei der Aromaoptimierung zu ändern. Die Frage sollte nicht heißen, welche Aromastoffe des Hopfens den Brauprozess überleben, sondern vielmehr sollte gefragt werden, wie der Brauprozess so geändert werden kann, dass möglichst viele erwünschte Aromastoffe des Hopfens beim Bierbrauen in das Bier übergehen. Weiterhin legen neuere Forschungsergebnisse von Kishimoto et al. (2008) nahe, den Einfluss von Pflanzenschutzmitteln auf das Hopfenaroma nicht länger als unwahrscheinlich anzusehen.

---

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1 Untersuchungsmaterial und Chemikalien

#### 4.1.1 Untersuchungsmaterial

Folgende Hopfensorten wurden untersucht:

**Tabelle 8:** Untersuchte Hopfensorten

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Herkunft</b>
Hallertauer Smaragd	HSD	Hallertau, Deutschland
Hallertauer Perle	HPE	Hallertau, Deutschland
Hallertauer Hersbrucker Spät	HHE	Hallertau, Deutschland
Slowenischer Golding	SLGO	Slowenien
Yacima Cascade	YCA	Yakima Valley, Washington, USA

---

Die Proben stammten von Hopfen der Erntejahre 2003, 2004 und 2005. (Pellets Typ 90, Simon Steiner Hopfen GmbH, Mainburg).

#### 4.1.2 Referenzaromastoffe

Für die Analysen wurden folgende Referenzaromastoffe eingesetzt:

**Tabelle 9:** Referenzaromastoffe

<b>Aromastoff</b>	<b>Quelle</b>
Linalool (3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol)	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Myrcen (7-Methyl-3-methylen-1,6-octadien)	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Geraniol (E)-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol)	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
(E,Z)-2,6-Nonadienal	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
(Z)-1,5-Octadien-3-on	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Methyl-2-methylbutanoat	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Nonanal	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon	(Guth H. 1997)
3-Methylbuttersäure	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
(E,E)-2,4-Nonadienal	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
p-Methylacetophenon	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Anethol	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Buttersäure	(Fluka, Sigma-Aldrich Chemie)
tr-Zimtaldehyd	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
trans-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	(Steinhaus 2000)
Ethyl-2-methylbutanoat	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Ethyl-2-methyl-propanoat	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-5(2H)-furanon	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
2-Isopropyl-3-methoxypyrazin	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Dimethyltrisulfid	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
(E,E)-2,4-Decadienal	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Nonatrienal, unbekannter Struktur	(Schuh C. 2004)
Methional	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Pentansäure	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie,
1-Octen-3-on	(Lancaster, Mühlheim/Main)
$\alpha$ -Humulen	(Fluka, Sigma-Aldrich Chemie)
(E,Z)-1,3,5-Undecatrien	(Steinhaus M. 2000)

**Tabelle 9:** Fortsetzung

<b>Aromastoff</b>	<b>Quelle</b>
(E,Z,E)-1,3,5,9-Undecatetraen	(Steinhaus M. 2000)
Octanal	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Z-1,5-Octadien-3-on	(Steinhaus M. 2000)
Phenylacetaldehyd	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Phenyllessigsäure	(Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
Z-3-Hexenal	(Steinhaus M. 2000)

#### 4.1.3 Isotopenmarkierte Standards

Für die Quantifizierungen wurden folgende isotopenmarkierte Standards verwendet:

**Tabelle 10:** Isotopenmarkierte Standards

<b>Verbindung</b>	<b>Quelle</b>
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Buttersäure	(Kirchhoff E. 2000)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Geraniol	(Fischer A. 2009)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Linalool	(Steinhaus M. und Fritsch H. 2003)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Methylbuttersäure	(Steinhaus M. 2000)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-( <i>E,E</i> )-2,4-Nonadienal	(Frauendorfer F. 2003)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-( <i>E,Z</i> )-2,6-Nonadienal	(Guth H.; Grosch W. 1990)
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-Nonanal	(Kerscher R. 1997)
[ <sup>2</sup> H <sub>2-4</sub> ]-Octanal	(Blekas G. und Guth H., 1995)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Phenylacetaldehyd	(Pfnür P. 1998)
[ <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]-4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon	(Guth H. 1997)
[ <sup>2</sup> H <sub>10</sub> ]-4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon	(Guth H. 1997)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Methional	(Sen, A.; Grosch W. 1991)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	(Sammelroch P. Grosch W. 1996)
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Pentansäure	(Jagella T.; Grosch, W. 1999)
[5,6- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-( <i>1,5</i> )-( <i>Z</i> )-Octadien-3-on	(Guth H., Grosch W. 1990)
[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-3-Hydroxy-4,5-dimethyl-5(2H)-furanon	(Blank I. et al. 1993)
[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-Phenol	(Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen)
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Vanillin	(Sammelroch P. et al., 1995)

#### 4.1.4 Sonstige Reagenzien

**Tabelle 11:** sonstige Reagenzien

Chemikalien	Quelle
Aceton	Merck Darmstadt
Schwefelsäure	Merck Darmstadt
Natriumhydrogensulfid	Merck Darmstadt
Citronensäure (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O)	Merck Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, destilliert durch DFA
Natriumbenzoat	Merck, Darmstadt, destilliert durch DFA
Glucosidase von <i>Aspergillus niger</i>	BioChemica Fluka
Hemicellulase	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Diethylether	Merck, Darmstadt, destilliert durch DFA
Pentan	Merck, Darmstadt, destilliert durch DFA
Dichlormethan	Merck Darmstadt
Natronlauge	Merck Darmstadt
Salzsäure	Merck Darmstadt
Natriumsulfat, wasserfrei	Merck Darmstadt
Affinitätsgel, Affigel 10	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Isopropanol, Li Chrosolv	Merck Darmstadt
p-Aminophenylmercuryacetat	Merck Darmstadt
Dimethylformamid	Merck Darmstadt
Amberlite XAD-2	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Polyvinylpolypyrrolidon	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethanolamin	Merck Darmstadt
Dithiotreitol	Merck Darmstadt
3,7-Dimethyl-3-octanol	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
α-Phellandren	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dinatriumhydrogensulfat	Merck, Darmstadt, destilliert durch DFA
Kaliumhydrogensulfat	Merck, Darmstadt, destilliert durch DFA
Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm)	Merck Darmstadt
4-Methyl-3-penten-2-on (Mesityloxid)	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Phenyl-β-D-glucopyranosid	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

### **Pufferlösung mit pH-Wert 3**

Zur Herstellung einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 3 wurden Citronensäure ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ; 8,47 g), Natriumchlorid (3,49 g), Natronlauge (68 mL, 1 mol/L) und Fungizidzusatz (Natriumbenzoat, 2 g) in destilliertem Wasser gelöst und in einem Messkolben auf 1 L aufgefüllt.

### **Pufferlösung mit pH-Wert 7**

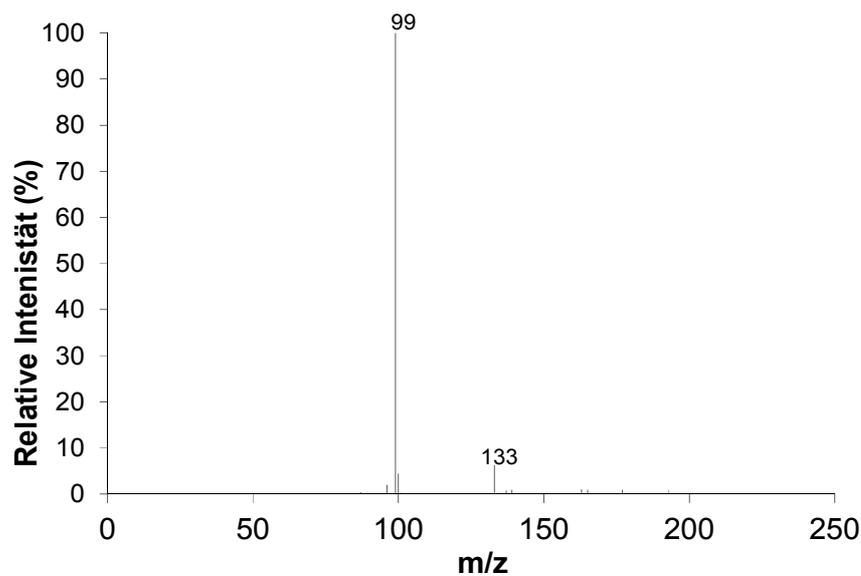
Zur Herstellung einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7 wurden 14,5362 g Dinatriumhydrogenphosphat  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  und 7,0445 g Kaliumhydrogenphosphat  $KH_2PO_4$  in destilliertem Wasser gelöst und in einem Messkolben auf 2 L aufgefüllt.

## **4.2 Synthesen**

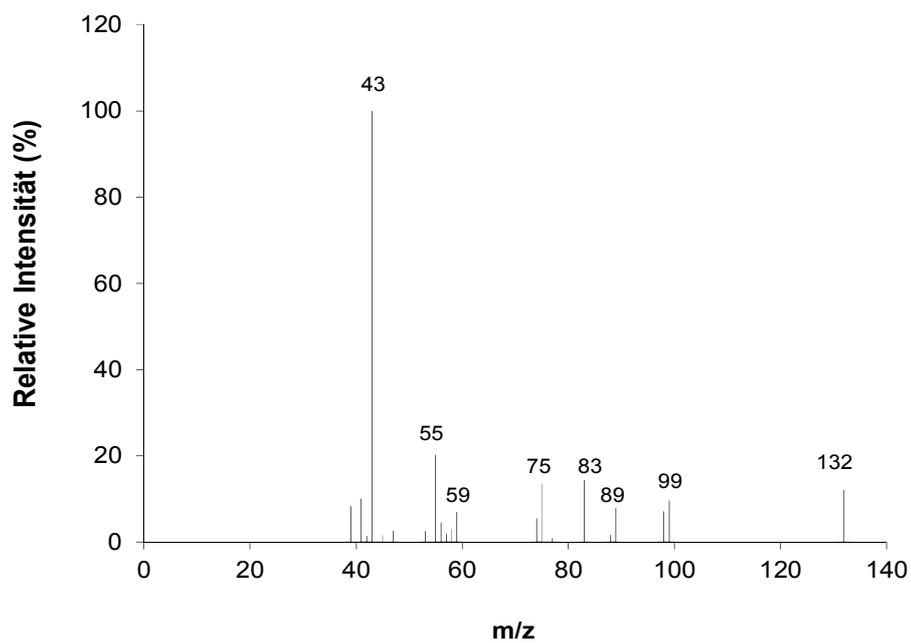
### **4.2.1 Synthese von Referenzsubstanzen**

#### **Synthese von 4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on**

Gemäß der Vorschrift nach Guth (1997), wurde zu Mesityloxid (9,2 mmol, 1000 mg) konzentrierte Schwefelsäure (2  $\mu$ L) gegeben. Die Mischung wurde verschlossen 24 Stunden bei 25 °C gerührt. Nach Zugabe von Natriumhydrogensulfid (9,2 mmol, 517 mg) wurde das Reaktionsgefäß mit einem Septum verschlossen und weitere 12 Stunden bei 25 °C gerührt. Es folgte die Zugabe von Wasser (50 mL). Das gebildete 4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on wurde mit Diethylether (2 x 50 mL) extrahiert und anschließend mit Natronlauge (2 mol/L, 2 x 10 mL) im Scheidetrichter isoliert. Die wässrige Phase wurde mittels Salzsäure (0,1 mol/L) auf pH 3 angesäuert. Abschließend erfolgte die Extraktion mit Pentan (2 x 25 mL) und Trocknung über Natriumsulfat. Es wurden 40 mL Syntheselösung erhalten. Die Konzentration von diesem in Pentan gelöstem 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon betrug 51,0  $\mu$ g/mL.



**Abb. 47:** Massenspektrum (MS-Cl) GCMS, OC, FFAP, 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon, Synthese.



**Abb. 48:** Massenspektrum (MS-EI), GCMS, OC, FFAP, 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon, Synthese.

## 4.2.2 Synthese von isotopenmarkierten Standards

### Synthese von [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on

Gemäß der Vorschrift nach Guth (1997), wurde zu [ $^2\text{H}_{10}$ ]-Mesityloxid (9,2 mmol, 1000 mg) konzentrierte Schwefelsäure (2  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Die Mischung wurde 24 Stunden bei 25 °C gerührt. Nach Zugabe von Natriumhydrogensulfid (9,2 mmol, 517 mg) wurde das Reaktionsgefäß wieder mit einem Septum verschlossen und weitere 12 Stunden bei 25 °C gerührt. Es folgt Zugabe von Wasser (50 mL). Das gebildete [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on wurde mit Diethylether (2 x 50 mL) extrahiert und anschließend mit Natronlauge (2 mol/L, 2 x 10 mL) im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mittels Salzsäure (0,1 mol/L) auf pH 3 angesäuert. Abschließend erfolgte die Extraktion mit Pentan (2 x 25 mL) und Trocknung über Natriumsulfat. Die Konzentration von [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in der Syntheselösung betrug 51,0  $\mu\text{g/mL}$  in Pentan.

Massenspektrometrische Daten des auf diesem Weg synthetisierten [ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanons: MS(EI): m/z (%) 46 (100), 62 (16), 108 (8), 142 (M<sup>+</sup>, 10).

## 4.3 Identifizierung von Aromastoffen

### 4.3.1 Probenaufbereitung von Hopfenpellets

Als Ausgangsmaterial aller hier beschriebenen Analysen wurden getrocknete Dolden oben vorgestellter Aromahopfenarten verwendet (Handbonitierung durch die Firma Simon H. Steiner Hopfen GmbH in Mainburg, Holledau).

Die Proben lagen sortenrein vor, waren frei von Verunreinigungen und wiesen keine Fremdgerüche auf. Aus der Vielzahl der Sorten wurden fünf ausgewählt, weil sie bei den Testern als deutlich unterscheidbar galten oder für besondere Aromaeindrücke bekannt sind. Proben dieser Sorten wurden erntefrisch vom Hopfenhandelshaus zu Hopfenpellets vom Typ 90 verarbeitet, unter Stickstoffatmosphäre abgepackt und tiefgefroren bei – 20 °C bis zur Analyse gelagert. Dies hat den Vorteil, dass die Oxidation der Hopfeninhaltsstoffe und die damit verbundene Ausbildung eines Fehlromas innerhalb der üblichen Verarbeitungsfristen verhindert werden. Hopfendolden sind im tiefgekühlten Zustand nur umständlich zu handhaben, weil Lupulin in der Kälte seine klebrigen Eigenschaften verliert und bereits bei geringen Erschütterungen

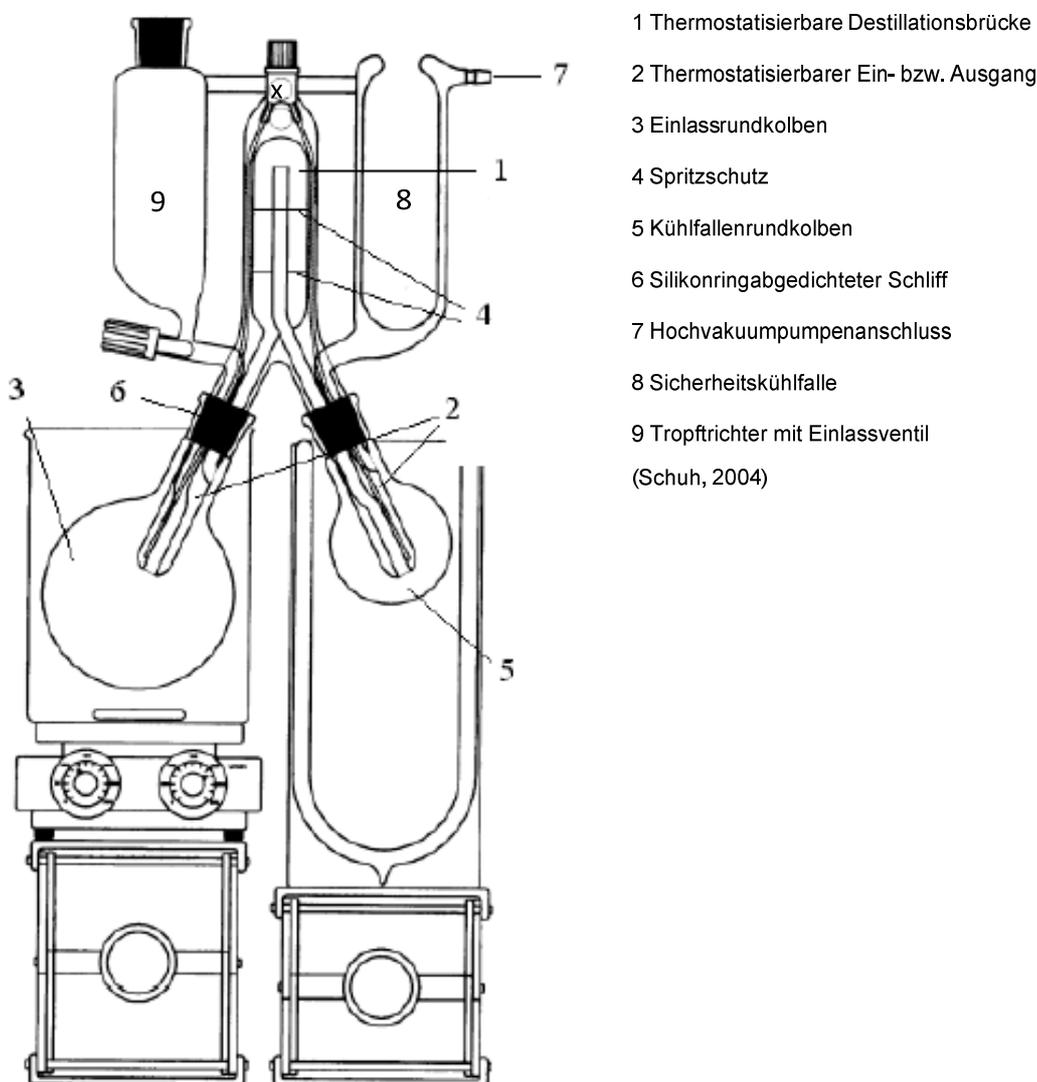
aus den Dolden fällt. Es ist dadurch praktisch nicht problemlos möglich, homogene Teilmengen aus einer Hopfendoldenprobe zu ziehen. Hopfenpellets hingegen sind unkompliziert für die Analyse, weil sie aufgrund spezieller Verfahrensschritte homogenisiert und dicht gepresst vorliegen.

Hopfenpellets (Typ 90), wie sie in dieser Arbeit durchgängig verwendet wurden, enthalten die Inhaltsstoffe der jeweiligen Hopfensorte in der gleichen natürlichen Zusammensetzung wie Hopfendolden.

#### 4.3.1.1 Aromaextrakt für die Verdünnungsanalyse

Gefrorene Hopfenpellets wurden in kalter Reibschale und Pistill vermahlen. 5 g des erhaltenen Hopfenpulvers wurden mit der gleichen Menge wasserfreiem Natriumsulfat in ein Becherglas eingewogen und im Dunklen mit Diethylether (100 mL) während einer Stunde gerührt. Nach Abtrennen des unlöslichen Anteils mittels Filtration durch ein Bett aus entfetteter Watte und Seesand wurde dieser Rückstand nochmals mit Diethylether gerührt (100 mL, 30 min). Die Extrakte wurden vereinigt. Dann wurde die Extraktionsqualität olfaktorisch überprüft. Ein Filterpapierstreifen wurde dazu mit dem Extrakt benetzt. Nach Verdunsten des Lösungsmittels wurde die Aromanote auf dem Filterpapierstreifen mit dem Geruch der ursprünglichen Hopfenprobe verglichen und auf Übereinstimmung überprüft. Der Extrakt wurde anschließend mit Hilfe der SAFE-Apparatur (Abbildung 53) im Hochvakuum ( $10^{-2}$  hPa) bei 40 °C destilliert. Dazu wurde die zerlegte Apparatur dem Trockenschrank entnommen und, wie im Bild dargestellt, zusammgebaut. Die Destillationsbrücke (1) und die beiden Schenkel (2) sowie der Einlassrundkolben (3) wurden kontinuierlich mit Warmwasser aus einem temperierten Wasserbecken umströmt. Es war dabei auf die richtige Flussrichtung zu achten, um ein Vereisen der Apparatur zu vermeiden (Wassereinlauf oben, darunter Wasserauslauf). Mittels Vakuumpumpe wurde die Apparatur über Anschluss (7) mit einem Unterdruck beaufschlagt und auf Dichtigkeit überprüft. Der Auslassrundkolben wurde in einen Dewar abgesenkt. Dewar und Sicherheitskühlfalle (8) wurden mit flüssigem Stickstoff geflutet. Der Extrakt wurde in den Tropftrichter gefüllt. Dann wurde die Apparatur mit dem Hochvakuum beaufschlagt. Der Extrakt wurde durch vorsichtiges Öffnen des Einlaufventils in kleinen Teilmengen dem Einlassrundkolben zugeführt, in dem er schlagartig verdampfte. Die Dämpfe kondensierten in der Kühlfalle, während die nichtflüchtigen Substanzen im Einlasskolben zurückblieben. Das

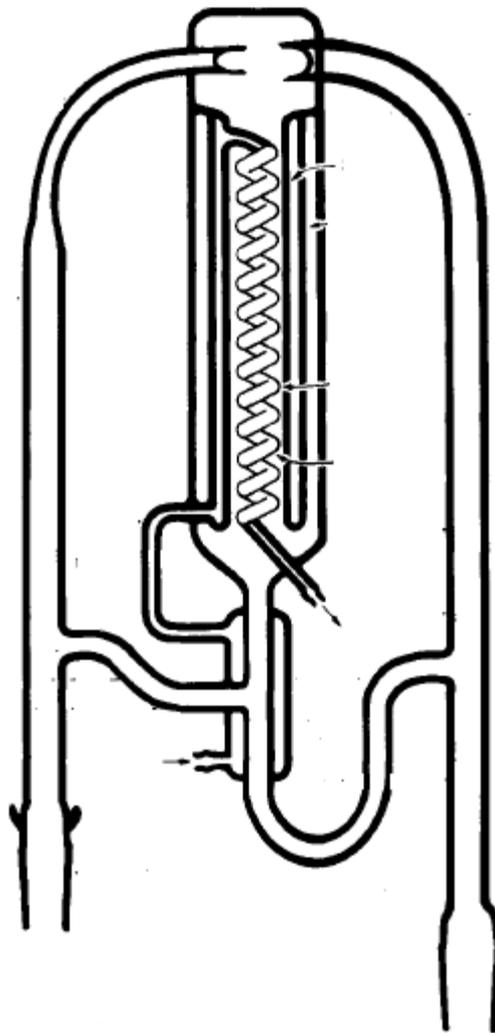
Destillat musste sich anschließend auf Raumtemperatur erwärmen, bevor es mit Natriumcarbonatlösung (0,5 M; 4 × je 50 ml) ausgeschüttelt werden konnte. Die neutral-basische Fraktion NBF (organische Phase) wurde anschließend mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, an einer Vigreux-Kolonne (50 × 1 cm) durch Mikrodestillation schonend auf ein Volumen von 500 µL konzentriert und in Glasprobenfläschchen mit Teflondichtung überführt. Die wässrige Fraktion wurde mit Diethylether (50 mL) gewaschen und mit halbkonzentrierter Salzsäure angesäuert (pH 3). Anschließend erfolgte die Extraktion der sauren Verbindungen mit Diethylether (4 × 50 mL) durch Ausschütteln. Dieser Etherextrakt (AF) wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, an einer Vigreux-Kolonne (50 × 1 cm) schonend auf ein Volumen von 0,5 mL konzentriert und in Glasprobenfläschchen mit Teflondichtung überführt.



**Abb. 49:** Desillationsapparatur für die Solvent Assisted Favor Evaporation (SAFE; Engel et al., 1999).

#### 4.3.1.2 Aromaextrakt für die Simultandestillation

Die Simultandestillation der Hopfenpellets vom Typ 90 in wässriger Lösung bei pH 7 und pH 3 wurde mit einer durch Flath (1977) modifizierten Simultandestillationsapparatur nach Likens & Nickerson (1964) durchgeführt (Schultz et al 1977).



**Abb. 50:** Apparatur zur Simultandestillation (SDE), (Flath et al., 1977).

Dazu wurde das U-Rohr der Destillationsapparatur mit destilliertem Wasser gefüllt. Dann wurde die Apparatur an das Kühlwasser angeschlossen. In einen ersten Rundkolben (250 mL) wurde Diethylether vorgelegt (100 mL). Der Kolben wurde anschließend mit Siedesteinchen versehen an der vorgesehenen Stelle der Apparatur auf der Seite des längeren U-Rohrschenkels fixiert. In einen zweiten Rundkolben (250 mL) wurden Siedesteinchen und Hopfenpulver (1g) gefüllt, welches durch Zerkleinern von tiefgefrorenen Hopfenpellets gewonnen worden war. Weiter wurden Pufferlösung

(pH-Wert 7,0; 100mL) nach 4.1.4 sowie markiertes Geraniol und Linalool als interner Standard pipettiert. Zur Simultandestillation und Extraktion bei pH 3 wurde Pufferlösung (pH-Wert 3,0; 100 mL) nach 4.1.4 verwendet eingesetzt. Wasser und Diethylether wurden zum Sieden gebracht. Der Rundkolben der Probe wurde dabei direkt mit einem thermostatgeregelten elektrischen Heizpilz beheizt, der Kolben mit dem Diethylether wurde im Wasserbad auf konstant 40°C temperiert. Sobald beide Flüssigkeiten siedeten, wurde eine Stunde lang extrahiert. In dieser Zeit reicherten sich die Hopfenaromastoffe im Diethylether an. Anschließend wurde der Diethylether mit Natriumcarbonatlösung (0,5 M; 4 × je 50 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase (NBF) wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, an einer Vigreux-Kolonnen (50 × 1 cm) auf ein Volumen von 500 µL konzentriert und in Glasprobenfläschchen mit Teflondichtung überführt.

#### 4.3.1.3 Aromaextrakt für die Schwerkraft-Chromatographie

500 g Hopfenpellets wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und anschließend mit Reibschale und Pistill vermahlen. Zur Extraktion wurde das Pulver in zehn Portionen zu je 50 g aufgeteilt und portionsweise weiterverarbeitet. Je 100 g Hopfenpulver wurden in ein Becherglas eingewogen und mit Diethylether (300 mL) während einer Stunde gerührt. Nach Abtrennen des unlöslichen Anteils mittels Filtration durch ein Bett aus entfetteter Watte und Seesand wurde nochmals mit Diethylether (200 mL) extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend mit Hilfe der SAFE-Apparatur (Engel et al. 1999) im Hochvakuum bei 40 °C zweimal destilliert. Das Destillat wurde auf Raumtemperatur erwärmt und in mehreren Portionen mit insgesamt 1000 mL Natriumhydrogencarbonatlösung (0,5 M) extrahiert. Die organische Phase (NBF) wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonnen (50 × 1 cm) schonend auf ein Volumen von 10 mL konzentriert. Durch dreimalige Zugabe von je 20 mL Pentan und anschließendem Einengen auf 10 mL wurde das Lösungsmittel Ether durch Pentan ersetzt.

## 4.4 Quantitative Bestimmung von Aromastoffen

### 4.4.1 Aufarbeitung zur Gewinnung von Aromastoffen aus Extrakten

Der Aromastoffgehalt in den untersuchten Hopfensorten unterschied sich teilweise um mehrere Zehnerpotenzen. Um dem Rechnung zu tragen, wurden unterschiedliche Mengen des Probematerials eingesetzt.

**Tabelle 12:** Probemengen zur Quantifizierung der einzelnen Aromastoffe

Aromastoff	Eingesetzte Menge Hopfen [g]
Myrcen	1
Octanal	5
(Z)-1,5-Octadien-3-on	5
4-Methy-4-sulfanyl-2-pentanon	600
Nonanal	5
Methional	5
3-Isobuty-2-methoxypyrazin	5
Linalool	5
Buttersäure	1
Phenylacetaldehyd	5
3-Methylbuttersäure	1
(E,E)-2,4-Nonadienal	5
Pentansäure	5
Geraniol	5
(E,Z)-2,6-Nonadienal	5
Sotolon	5
Vanillin	5

Die Quantifizierung wurde mit Hopfenpellets aus den Jahrgängen 2003, 2004 und 2005 durchgeführt. Tabelle 13 zeigt die verwendeten Erntejahrgänge und die darin quantifizierten Aromastoffe.

**Tabelle 13:** Übersicht der verwendeten Erntejahrgänge und der darin quantifizierten Aromastoffe.

Aromastoff	Jahrgang		
	2003	2004	2005
Myrcen	X		X
Octanal			X
(Z)-1,5-Octadien-3-on			X
4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon		X	X
Nonanal			X
Methional			X
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin			X
Linalool		X	X
Buttersäure			X
Phenylacetaldehyd			X
3-Methylbuttersäure			X
(E,E)-2,4-Nonadienal			X
Pentansäure			X
Geraniol		X	X
(E,Z)-2,6-Nonadienal			X
Sotolon			X
Vanillin			X

Die Aromastoffe wurden aus den Hopfenpellets nach Methode 4.3.1.1 extrahiert. Für die Quantifizierung wurde dem Extraktionsmittel vor Extraktionsbeginn interner Standard gemäß 4.5.8 zu dosiert. Die Quantifizierung von Myrcen wurde nach 4.5.9 mittels HRGC und Integrator durchgeführt. Zur Quantifizierung von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon wurde der Extrakt zur Abtrennung thiolhaltiger Verbindungen einer Affinitätschromatographie nach 4.5.5 unterzogen. Die Bestimmungen der übrigen Aromastoffe erfolgten in den aciden Fraktionen oder in den neutral-basischen Fraktionen, die nach 4.5.1 säulenchromatographisch nach Polarität weiter aufgetrennt worden waren. Schließlich wurde nach 4.5.1 massenspektrometrisch analysiert.

#### 4.4.1.1 Aufarbeitung zum Nachweis von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon in Bier

In 500 ml Cascade-Bier, Herstellung 09/03, wurden 5,1 ng interner Standard dosiert ( $d_{10}$ -4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon). Das Bier wurde anschließend mit Diethylether extrahiert und im Hochvakuum destilliert. Die Anreicherung und Freisetzung der Thiole erfolgte mittels Affinitäts-Chromatographie (Affigel 501 aus eigener Herstellung). Eine Chromatographiesäule (30 cm lang, Durchmesser 1 cm) wurde mit Affinitätsgel (1 mL) gefüllt. Anschließend wurde das Gel mit Isopropanol (5 mL) gewaschen. Nach Aufgabe der Probe (50 mL) wurde mit einem Gemisch (2+1) aus Pentan / Dichlormethan nachgespült (50 mL). Die Freisetzung der an die Säule gebundenen Thiole erfolgte durch Aufgabe von Dithiotreitollösung (50 mL, 10 mmol / L, in Pentan / Dichlormethan 2+1). Zur Abtrennung der flüchtigen, thiolhaltigen Verbindung von Dithiotreitollösung wurde das Eluat im Hochvakuum destilliert. Die Auswertung erfolgte massenspektrometrisch nach 4.5.1 am Doppelofensystem GC/GC/ MS.

#### 4.4.2 Aufarbeitung zur Gewinnung von Aromastoffen aus Glykosiden

##### 4.4.2.1 Enzymatische Freisetzung von Linalool aus Glykosiden

Hopfenpellets Typ 90, (10 g), der Sorten Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO) und Hallertauer Hersbrucker (HHE), Erntejahr 2005, wurden bei Raumtemperatur im Mörser fein zerrieben und nach Zugabe einer wässrigen Lösung von Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (1 mL; 1,282 mg/mL) als internem Standard, mit kochendem Wasser (400 mL) extrahiert.

Zur Polyphenolabtrennung wurde die Lösung mit Polyvinylpolypyrrolidon (10 g) versetzt, gerührt (20 min) und über eine dünne Schicht Kieselgel mittels Nutsche abfiltriert. Dieser Vorgang wurde unter Verwendung von 5 g Polyvinylpolypyrrolidon wiederholt. Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer bei reduziertem Druck und 40 °C auf 50 mL eingengt, zur Eiweißabtrennung mit Methanol (280 mL) versetzt, anschließend filtriert und im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 mL Wasser gelöst und zur Chromatographie auf eine Amberlite XAD-2 Glassäule (20 x 300 mm) aufgebracht. Die Elution erfolgte mit 1 Liter Wasser (10 mL/min), 500 mL Pentan-Dichlormethan (2:1 v/v, 7 mL/min) und 500 mL

Methanol (5 mL/min). Das methanolische Eluat wurde mittels Rotationsverdampfer bei 40 °C unter Vakuum bis zur Trockene eingeengt und in Phosphat-Citrat-Puffer (50 mL, pH 5) aufgenommen (Kollmannsberger 2002).

Die enzymatische Hydrolyse erfolgte während 72 h bei 37 °C nach Zugabe von Glucosidase aus *Aspergillus niger* (50 mg; 68,5 U/g) beziehungsweise in einem zweiten Versuch mit 0,5 g untergäriger Reinzuchtbierhefe der Staatsbrauerei Weihenstephan, unter beständigem Rühren. Anschließend wurde mit 2 x 25 mL Diethylether, dem markiertes Phenol und markiertes Linalool als interne Standards zugesetzt waren, extrahiert. Die Etherphasen wurden gesammelt und anschließend im Hochvakuum destilliert. Anschließend wurden die Säuren durch Ausschütteln mit Natriumhydrogencarbonatlösung (3x 50 mL; 0,5 M) abgetrennt. Dann wurde der Extrakt über Natriumsulfat getrocknet und auf 500 µL eingeengt. Die Abtrennung der Kohlenwasserstofffraktion erfolgte durch Chromatographie auf einer Kieselgel gefüllten Glas säule (20 x 300 mm). Eluiert wurde mit Pentan (100 mL). Die linalool-, geraniol- und phenolhaltige Fraktion wurde anschließend mit Diethylether (200 mL) von der Säule gewaschen und eingeengt. Die Quantifizierung von Phenol, Linalool und Geraniol erfolgte in allen Extrakten massenspektrometrisch über ein Doppelofensystem, das mit einem Massenspektrometer gekoppelt war (GC-GC-MS).

#### 4.4.2.2 Simultan- und SAFE-Destillationsmethode im Vergleich

Nach Methode 4.1.4 wurden frische Pufferlösungen bereit. Hopfenpellets (10,03 g) wurden in gefrorenem Zustand im Mörser zermahlen und mit insgesamt 500 mL Diethylether stufenweise mit jeweils 100 mL extrahiert. Der Rückstand wurde gefriergetrocknet und gewogen. Es konnten 7,20 g Rückstand gewonnen werden. Neben dem pulverförmigen Rückstand wurde auch noch Hopfenharz gewonnen. Der Extrakt wurde dazu mittels SAFE-Destillation destilliert. Der Rückstand wurde dreimal hintereinander in 100 mL Diethylether gelöst und erneut destilliert. Übrig blieben 2,80 g Hopfenharz.

Hopfenharzuntersuchung: Je ein Gramm Hopfenharz wurde in je einen Rundkolben eingewogen und mit 100 mL Pufferlösung bei pH 3 bzw. pH 7 überschichtet. Es wurden Siedesteinchen hinzugegeben und Standard pipettiert. Dann wurden die Proben der Simultandestillation unterzogen. Die Extrakte wurden mit Hilfe der SAFE-Apparatur im Hochvakuum bei 40 °C destilliert. Das Destillat musste sich anschließend auf Raumtemperatur erwärmen, bevor es mit Natriumcarbonatlösung (0,5 M; 4 × je 50 ml) ausgeschüttelt werden konnte. Die neutral-basische Fraktion NBF (organische Phase) wurde anschließend mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, an einer Vigreux-Kolonnen (50 × 1 cm) schonend auf ein Volumen von 500 µL konzentriert und in Glasprobenfläschchen mit Teflondichtung überführt.

Hopfenpulverrückstand: In einem ersten Versuch wurde getestet, ob sich Aromastoffe freisetzen lassen, wenn der Hopfenpulverrückstand mit einer wässrigen Pufferlösung (100 mL, pH 3 bzw. 100 mL, pH 7) ausgewaschen wird. Dazu wurden je 1 g Pulverrückstand in je einen 250 mL Rundkolben eingewogen und mit wässriger Pufferlösung (100 mL, pH 3) beziehungsweise mit wässriger Pufferlösung (100 mL, pH 7) versetzt. Dann wurde interner Standard pipettiert. Der Kolben wurde mit Rührfisch versehen und acht Stunden bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) gerührt. Dann wurde die Lösung durch ein Bett aus entfetteter Watte und Seesand abfiltriert. Nach Abtrennen des unlöslichen Anteils mittels Filtration wurde dieser Rückstand nochmals mit Diethylether gerührt (50 mL, 15 min). Die Extrakte wurden vereinigt und mit Hilfe der SAFE-Apparatur im Hochvakuum bei 40 °C destilliert. Das Destillat musste sich anschließend auf Raumtemperatur erwärmen, bevor es mit Natriumcarbonatlösung (0,5 M; 4 × je 50 ml) ausgeschüttelt werden konnte. Die neutral-basische Fraktion NBF (organische Phase) wurde anschließend mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, an einer Vigreux-Kolonnen (50 × 1 cm) schonend auf ein Volumen von 500 µL konzentriert und in Glasprobenfläschchen mit Teflondichtung überführt.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob sich im Kaltwasserauszug durch Hitzeeinwirkung Linalool und Geraniol freisetzen lassen. Dazu wurden wieder jeweils 1 g Hopfenpulverrückstand in je einen 250 mL Hundskolben eingewogen und wie zuvor mit wässriger Pufferlösung (100 mL, pH 3) beziehungsweise mit wässriger Pufferlösung

(100 mL, pH 7) versetzt. Die Kolben wurden mit Rührfisch versehen und acht Stunden bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) gerührt. Dann wurden die Lösungen durch ein Bett aus entfetteter Watte und Seesand abfiltriert. Anschließend wurden die Lösungen mit jeweils 2 x 50 ml Diethylether ausgeschüttelt, um potentiell freie Aromastoffe zu entfernen. Die wässrigen Phasen wurden in je einen 250 mL Rundkolben überführt. Es wurden Siedesteinchen zugegeben und interner Standard hinzu pipettiert. Die Lösungen wurden danach mittels Simultandestillationsapparatur nach 4.3.1.2 eine Stunde lang destilliert und extrahiert. Die Destillate wurden mittels SAFE-Destillation gereinigt, und mit Natriumcarbonatlösung (0,5 M; 4 x je 50 ml) ausgeschüttelt. Dann wurde die neutral-basische Fraktion mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und wie zuvor an einer Vigreux-Kolonnen (50 x 1 cm) schonend auf ein Volumen von 500 µL konzentriert und in Glasprobenfläschchen mit Teflondichtung überführt. Dann wurde der Versuch wiederholt, mit dem Unterschied, dass zunächst kein Standard zugefügt wurde. Die Kaltwasserauszüge wurden verworfen, stattdessen wurde der Hopfenpulverrückstand aus diesen Auszügen nach Reinigung in Diethylether (2x je 50 mL) in Pufferlösung (100 mL, pH 3) und Pufferlösung (100 mL, pH 3) überführt und nach Standardzugabe jeweils einer Simultandestillation (Dauer: eine Stunde) unterzogen.

Die Quantifizierung Linalool und Geraniol erfolgte in allen Extrakten massenspektrometrisch über ein Doppelofensystem, das mit einem Massenspektrometer gekoppelt war (GC-GC-MS).

## **4.5 Chromatographische Methoden**

### **4.5.1 Säulenchromatographie**

Für die Säulenchromatographie zur Auftrennung der Aromaextrakte nach Polarität wurde ein gereinigtes und reaktiviertes Kieselgel 60 verwendet. Dazu wurde Kieselgel (100 g) mit konzentrierter Salzsäure (1,5 L) versetzt und gut durchmischt. Nach 24 Stunden Standzeit wurde das Gel nach dem abdekantieren der überstehenden Salzsäure mit Leitungswasser säurefrei gewaschen. Zur Reaktivierung wurde das säurefreie Kieselgel mit je 2 L destilliertem Wasser gespült, abgenutscht, getrocknet und auf einen Wassergehalt von 7 % eingestellt (Esterbauer 1968).

Eine Chromatographieglassäule (100mL, 35 x 2 cm) wurde mit entfetteter Watte, 2g Seesand und zuvor in Pentan aufgeschlammtem Kieselgel 60, (25 g), (0,040  $\mu\text{m}$  – 0,063 mm) luftblasenfrei gefüllt. Nach Probenaufgabe (1-2 mL) ließ man die Probe einziehen, anschließend wurde mit 100 mL Pentan (100, v / v), 100 mL Pentan / Ether (98 / 2, v / v), 100 mL Pentan / Ether (90 / 10, v / v), 100 mL Pentan / Ether (70 / 30 v / v) und 100 mL Ether (100, v / v) eluiert. Das Eluat wurde unter Berücksichtigung des Totvolumens in verschiedenen Fraktionen aufgefangen. Fraktion I: 100 mL, Fraktion II: 2 x je 50 mL, Fraktion III: 2 x je 50 mL, Fraktion IV: 2 x je 50 mL, Fraktion V: 100 mL. Die einzelnen Fraktionen wurden dann mittels Vigreux-Kolonnen und Mikrodestillationsapparatur stufenweise auf 1 mL eingeeengt (Steinhaus 2000).

#### **4.5.2 Aromaextraktverdünnungsanalyse**

Die Aromaextraktverdünnungsanalysen begannen mit der stufenweisen 1+1 (V+V) Verdünnung der Hopfenextrakte. Dazu wurden in kalibrierten Glasprobenfläschchen jeweils 0,5 ml Diethylether vorgelegt und mit der jeweils um eine Stufe konzentrierteren Lösung auf 1 ml aufgefüllt. Die Verdünnungen wurden solange fortgesetzt, bis bei der gaschromatographischen Trennung durch Abriechen des Eluats am Sniffingport des Gaschromatographen kein Aromastoff mehr wahrgenommen werden konnte. Jedem Aromastoff wurde dann ein Flavor-Dilution-Faktor (FD-Faktor) zugeordnet, welcher der höchsten Verdünnungsstufe entsprach, in welcher der betreffende Aromastoff noch wahrgenommen werden konnte, wobei dem unverdünnten Extrakt ein FD-Faktor von eins zugeteilt wurde.

#### **4.5.3 Kapillargaschromatographie / Olfaktometrie**

Die Identifizierung der Hopfenaromastoffe erfolgte durch Vergleich der durch Aromaextraktverdünnungsanalysen ermittelten Geruchsqualitäten und Geruchsstärken sowie der auf zwei Säulen unterschiedlicher Polarität (DB-5 und FFAP) bestimmten linearen Retentionsindices (RI-Werte) mit Referenzsubstanzen. Die Retentionsindices wurden durch lineare Interpolation nach Chromatographie einer Mischung von n-Alkanen (25 mg/100 ml Pentan) bestimmt. Die Injektion erfolgte dabei cold-on-column. Für FFAP-Säulen war eine Alkanmischung C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub> in Pentan optimal, für CP-SIL8-CP oder CP-SiL16-CP Säulen reichte eine Alkanmischung aus C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> aus. Entscheidend war, dass der letzte zu identifizierende Aromastoff vor dem letzten Alkan eluierte. Für die GC-Sniffing-Analyse wurde ein Gaschromatograph „Trace“

(2000 Series, Thermo Finnigan, Egelsbach) verwendet. Als Trägergas diente Helium bei einem Vordruck von 70 kPa. Die Probenaufgabe erfolgte durch einen cold-on-column-Injektor mit Sekundärkühlung. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 0,5 - 2 µl. Am Ende der Trennkapillare (DB-FFAP, WCOT Fused Silica, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Film bzw. DB-5, WCOT Fused Silica, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Film; beide J&W Scientific, Agilent Technologies, Böblingen, D) wurde der Trägergasstrom durch einen Glassplitter (Varian-Chrompack, Darmstadt) im Verhältnis 1:1 gesplittet und gelangte über 40 cm lange Kapillaren aus desaktiviertem Fused-Silica (0,2 mm ID) zu einem Flammenionisationsdetektor und einem Sniffingport. Der Sniffingport besteht aus einem beheizten (220 °C) Aluminiumelement mit Bohrung zur Aufnahme der Kapillare. Der FID (220 °C) wurde mit Wasserstoff (20 mL/min) und Luft (200 mL/min) betrieben. Als Beschleunigungsgas dient Stickstoff (30 mL/min). Die Aufzeichnung des Chromatogramms erfolgte mit einem Schreiber Servogor 124 (ABB Metrawatt, Nürnberg) bei einem Papiervorschub von 1 cm/min. Die Injektion erfolgte bei einer Ofentemperatur von 40 °C. Nach 2 min wurde die Temperatur mit einer Heizrate von 6 °C/min auf 190 °C und anschließend mit 12 °C/min auf 240 °C erhöht. Die Endtemperatur wurde für 10 min gehalten.

### Messparameter

Probenaufgabetechnik:	on column bei 40 °C
Probenaufgabemenge:	0,5 - 2,0 µL
Trägergas:	Helium, 1-2 mL/min
Trägergasvordruck:	50 - 100 kPa
Beschleunigungsgas:	Stickstoff, (30mL/min)
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Brenngas für FID:	Wasserstoff, (20 mL/min), Sauerstoff, (200 mL /min)
Ausgangssplittverhältnis:	1:1 Split zum FID und in den Sniffingport
Detektortemperatur:	240 °C
Sniffingporttemperatur	230 °C

### Verwendete Kapillarsäulen

Vorsäule:	5 m x 0,32 mm (Länge x Innendurchmesser)
FFAP:	30m x 0,32 mm (Länge x Innendurchmesser) (J&W Scientific, Folsom, USA)
CP-SIL8-CB:	30m x 0,32 mm (Länge x Innendurchmesser) (Chrompack, Frankfurt)

### Temperaturprogramme

FFAP:	40 °C, 2 min, (6 °C/min), 190 °C, 0 min, (12°/min), 240 °C, 10 min
CP-SIL8-CB:	40 °C, 2 min, (6 °C/min), 190 °C, 0 min, (12 °C/min), 240 °C, 10 min
CP-SIL19-CB:	40 °C, 2 min, (6 °C/min), 190 °C, 0 min, (12 °C/min), 230 °C, 10 min

#### 4.5.4 Multidimensionale Gaschromatographie

Die zweidimensionale Gaschromatographie wurde verwendet, um Geruchseindrücke einem Massenspektrum zuordnen zu können und um Verbindungen, die aufgrund von Überlagerungen mit eindimensionaler Gaschromatographie nicht zugänglich waren, zu quantifizieren. Zur Zuordnung von Geruchseindrücken zu den entsprechenden Massenspektren wurde ein Gaschromatograph 5160 (Carlo Erba, Hofheim) mit einem Massenspektrometer ITD 800 (Finnigan MAT, Bremen) verbunden. Dieser Anordnung war ein Gaschromatograph HRGC Mega 2 (Fisons Instruments, Egelsbach) mit Moving-Column-Stream-Switching-System (Fison Instruments, Egelsbach) und nachfolgender Kühlfalle vorgeschaltet. Die Injektion erfolgte cold-on-column in den Gaschromatographen HR GC Mega 2, wobei sich das Moving-Column-Stream-Switching-System bei dieser ersten Einspritzung im Off-Line-Modus befand. Als Trägergas wurde Helium bei einem Fluss von 2 ml/min verwendet. Als Trennkapillare diente eine DB-FFAP-Säule (J&W, Köln). Das Eluat wurde zeitgleich zu einem FID und einem beheizten Sniffingport geleitet. Die Lokalisierung der zu bestimmenden Substanzen wurde im Chromatogramm über ihren charakteristischen Geruch oder das Retentionsverhalten der Referenzsubstanz erfasst. Anschließend erfolgte nach einer zweiten Einspritzung die Durchführung der zweidimensionalen GC-Trennung. Dazu wurde das Moving-Column-Stream-Switching-System während

der Elution der zu bestimmenden Substanz für 1 min in den Transfermodus geschaltet. Das auf diese Weise „ausgeschnittene“ Säuleneluat wurde auf eine  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlte Falle, bestehend aus einer unbelegten Fused-Silica-Kapillare (1m x 0,32 mm, J&W, Köln), umgeleitet und fixiert. Durch Erhitzen der Kühlfalle auf  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  verdampfte das Eluat und wurde anschließend auf die Trennsäule des zweiten Gaschromatographen 5160 (Carlo Erba, Hofheim) überführt. Als zweite Trennsäule diene eine DB 1701 Kapillare (J&W, Köln). Das Temperaturprogramm für beide Säulenöfen startete bei einer Anfangstemperatur von  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Diese wurde für 2 min beibehalten. Anschließend wurde mit einer Rate von  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis zu einer Maximaltemperatur von  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgeheizt. Das Eluat wurde gesplittet. Ein Teil gelangte zum Sniffingport, der andere Teil erreichte fast zeitgleich das Ion Trap Massenspektrometer (ITD 800). Wurde ein Geruchseindruck registriert, notierte man die Scannummer am Massenspektrometer und wertete dann das Spektrum an dieser Stelle aus. Das Massenspektrometer wurde im EI-Modus bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV, oder im CI-Modus bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV mit Methanol als Reaktantgas betrieben. Für Quantifizierungen wurde noch ein zweites GC/GC/MS System eingesetzt. Wie oben beschrieben, waren auch hier zwei Gaschromatographen und ein Ionenfallenmassenspektrometer über Transfer Lines in Reihe geschaltet. Beim ersten Gaschromatographen handelte es sich um den Typ Trace 2000 Series (Thermo Quest Egelsbach). Er war zusätzlich mit einem Autosampler Combi Pal (Varian Darmstadt) ausgestattet. Der zweite Gaschromatograph war aus der Baureihe CP 3800 (Varian, Darmstadt). Das Massenspektrometer hatte einen Ionenfallendetektor vom Typ Saturn 2000 (Varian, Darmstadt).

## **4.5.5 Affinitätschromatographie**

### **4.5.5.1 Herstellung von Affigel 501**

Affi-Gel 10 (100 mL), Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA, wurde in einen Büchner Trichter überführt. Anschließend wurde das Gel mit wasserfreiem Isopropanol (300 mL, Li Chrosolv, Merck, Darmstadt) gewaschen. Dann wurde p-Aminophenylmercuryacetat (1,50 g) in Dimethylformamid (30 mL) gelöst und dem gewaschenen Affi-Gel 10 zugesetzt. Die Mischung wurde vier Stunden bei Raumtemperatur mittels UPG-Rührer gerührt. Es erfolgte die Zugabe von Ethanolamin

---

(1 mL). Nach 1 Stunde wurde das Gel in einen Büchnertrichter überführt und mit Dimethylformamid (250 mL) und anschließend mit wasserfreiem Isopropanol (700 mL, Li Chrosolv, Merck Darmstadt) gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde das Gel in wasserfreiem Isopropanol (300 mL) aufgeschlämmt. Das Gel wird zur Abtrennung thiolgruppenhaltiger Aromastoffe verwendet.

#### 4.5.5.2 Affinitätschromatographie zur Abtrennung thiolhaltiger Aromastoffe

Die Affinitätschromatographie wurde speziell zur Aufkonzentrierung und Abtrennung thiolhaltiger Aromastoffe verwendet. Eine Chromatographiesäule mit Glasfritte (Säulenlänge 30 cm, Durchmesser 1 cm) wurde mit Affinitätsgel (1 mL) gefüllt. Anschließend wurde das Gel mit Isopropanol (5mL) gewaschen. Nach Aufgabe der Probe (50 mL) wurde mit einem Gemisch (2+1) aus Pentan / Dichlormethan nachgespült (50 mL). Die Freisetzung der an die Säule gebundenen Thiole erfolgte durch Aufgabe von Dithiotreitollösung (50mL, 10mmol/L, in Pentan / Dichlormethan 2+1). Zur Abtrennung der flüchtigen, thiolhaltigen Verbindungen von Dithiotreitol wurde das Eluat im Hochvakuum destilliert.

#### 4.5.6 GC /Sektorfeldmassenspektrometer

Ein Gaschromatograph 5890 Series II (Hewlett Packard, Waldbronn) war mit einem Sektorfeldmassenspektrometer MAT 95 S (Finnigan MAT, Bremen) verbunden.

##### Verwendete Kapillarsäulen

Vorsäule	5 m x 0,32 mm (Länge x Innendurchmesser)
FFAP	30m x 0,32 mm (Länge x Innendurchmesser) (J&W Scientific, Folsom, USA)
CP-SIL8-CB	30m x 0,32 mm (Länge x Innendurchmesser) (Chrompack, Frankfurt)
CP-SIL19-CB	30m x 0,32 mm (Länge x Innendurchmesser) (Chrompack, Frankfurt)

##### Temperaturprogramme

FFAP:	40 °C, 2 min, (6 °C / min), 190 °C, 0 min, (12 °C/min), 240 °C, 10 min
CP-SIL8-CB:	40 °C, 2 min, (6 °C / min), 190 °C, 0 min, (12 °C / min), 240 °C, 10 min
CP-SIL19-CB:	40 °C, 2 min, (6 °C / min), 190 °C, 0 min, (12 °C/min), 230 °C, 10 min

Die Ionisationsenergie bei Aufnahme der EI-Spektren betrug 70 eV, CI-Spektren wurden unter Verwendung von Isobutan als Reaktantgas bei 115 eV aufgenommen.

#### 4.5.7 GC / MS System Varian zur Quantifizierung

Ein Gaschromatograph Varian 3800 war mit einem Ion-Trap Massenspektrometer Varian Saturn GC-MS/MS 2000 (Firma Varian, Darmstadt) verbunden. Das System war darüber hinaus mit einem Autosampler von CTC Analytics (Schweiz) ausgestattet. Die Probenaufgabe erfolgte mittels Autosampler cold-on-column bei einer Ofentemperatur von 40 °C. Die verwendeten Trennkapillarsäulen sind nachfolgend angegeben:

### Verwendete Kapillarsäulen

Vorsäule	5 m x 0,5 mm (Länge x Innendurchmesser)
FFAP	30m x 0,32 mm (Länge x Innendurchmesser) (J&W Scientific, Folsom, USA)
CP-SIL8-CB	30m x 0,32 mm (Länge x Innendurchmesser) (Chrompack, Frankfurt)

### Temperaturprogramme

FFAP:	40 °C, 2 min, (6 ° C/min), 190 °C, 0 min, (12 °C/min), 240 °C, 10 min
CP-SIL8-CB:	40 °C, 2 min, (6 °C/min), 190 °C, 0 min, (12 °C/min), 240 °C, 10 min

Die Ionisationsenergie bei Aufnahme der EI-Spektren betrug 70 eV, CI-Spektren wurden unter Verwendung von Methanol als Reaktantgas bei 115 eV aufgenommen. Das Gerät wurde zur Bestimmung der Responsefaktoren und zur Quantifizierung eingesetzt.

## 4.5.8 Quantifizierung mittels stabiler Isotope

### Responsefaktorbestimmung

Zum Ausgleich eines möglichen Fehlers aufgrund unvollständiger Markierung des internen Standards wurden im CI-Modus des Massenspektrometers definierte Mengen von unmarkierter Reinsubstanz und markierter Verbindung zueinander ins Verhältnis gesetzt. Als Mischungsverhältnisse von markierter und unmarkierter Substanz wurden die Verhältnisse 1+1, 1+2 und 2+1 gewählt. Der Korrekturfaktor ergab sich aus der Konzentration der beiden Verbindungen und dem Verhältnis ihrer Flächenzahlen im MS-Chromatogramm.

$$Rf = \frac{F(IST) \cdot c(R)}{F(R) \cdot c(IST)}$$

Für jedes Mischungsverhältnis erhielt man einen Responsefaktor und daraus durch Mittelwertbildung den gemittelten Responsefaktor, der für die Quantifizierung herangezogen wurde.

## Zugabe stabiler Isotopen als interner Standard

Zur Quantifizierung eines Aromastoffes wurde zu Beginn der Hopfenextraktion eine definierte Menge des markierten Aromastoffes als interner Standard zugesetzt.

**Tabelle 14:** Zur Quantifizierung ausgewählte Ionen (m/z) der Aromastoffe und ihrer internen Standards sowie deren Responsefaktoren (Rf)

Aromastoff	Interner Standard	Analyt	m/z Standard	Rf	Kapillarsäule
Myrcen	$\alpha$ -Phellandren	-	-	0,86	CP- SIL 8-16 CB
Octanal	[ $^2\text{H}_{2-4}$ ]-Octanal	111	113-115	1,09	FFAP / OV1701
(Z)-1,5-Octadien-3-on	[5,6- $^2\text{H}_2$ ]- (1,5)-(Z)-Octadien-3-on	125	127	0,48	FFAP / OV1701
Nonanal	[ $^2\text{H}_4$ ]-Nonanal	145	147	0,54	FFAP / OV1701
Linalool	[ $^2\text{H}_2$ ]-Linalool	139	137	1,08	FFAP / OV1701
(E,Z)-2,6-Nonadienal	[ $^2\text{H}_2$ ]- (E,Z)-2,6-Nonadienal	139	137	0,99	FFAP / OV1701
Buttersäure	[ $^2\text{H}_2$ ]-Buttersäure	90-91	89	1,05	FFAP / OV1701
Phenylacetaldehyd	[ $^2\text{H}_2$ ]-Phenylacetaldehyd	123	121	0,63	FFAP / OV1701
3-Methylbuttersäure	[ $^2\text{H}_2$ ]-3-Methylbuttersäure	105	103	1,09	FFAP / OV1701
(E,E)-2,4-Nonadienal	[ $^2\text{H}_2$ ]- (E,E)-2,4-Nonadienal	141	139	0,69	FFAP / OV1701
Pentansäure	[ $^2\text{H}_2$ ]-Pentansäure	106	103	1,03	FFAP / OV1701
Geraniol	[ $^2\text{H}_2$ ]-Geraniol	139	137	0,91	FFAP / OV1701
4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-on	[ $^2\text{H}_{10}$ ]-4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon	133	143	1,097	FFAP / OV1701
4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-on	[ $^{13}\text{C}_4$ ]-4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon	103	99	1,04	FFAP / OV1701
3-Methylthiopropional (Methional)	[ $^2\text{H}_2$ ]-Methional	131	129	0,95	FFAP / OV1701
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	[ $^2\text{H}_2$ ]-3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	170	168	0,84	FFAP / OV1701
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-5(2H)-furanon (Sotolon)	[ $^{13}\text{C}_2$ ]-3-Hydroxy-4,5-dimethyl-5(2H)-furanon	131	129	0,71	FFAP / OV1701
Phenol	[ $^2\text{H}_6$ ]-Phenol	99-101	95	1,01	FFAP / OV1701
Vanillin	[ $^2\text{H}_3$ ]-Vanillin	156	153	0,92	FFAP / OV1701

Die zugesetzte Menge richtete sich nach der zu erwartenden Konzentration des betreffenden Aromastoffes im Hopfen. Auf eine gleichmäßige Vermischung von Extraktionsmittel und Standard wurde geachtet.

### **Auswertung anhand spezifischer Massenfragmente**

Zur Quantifizierung der Aromastoffe wurden die Peakflächen charakteristischer Massenfragmente, vorzugsweise die Molekülmasse, von Analyt und Standard ausgewertet. Unter Berücksichtigung des Responsefaktors ergab sich die Konzentration des Analyten wie folgt:

$$c(R) = \frac{F(R) \cdot c(IST)}{F(IST)} \cdot Rf$$

$c(R)$ : Konzentration Analyt  
 $c(IST)$ : Konzentration Standard  
 $F(R)$ : Fläche Analyt  
 $F(IST)$ : Fläche Standard  
 $Rf$  : Responsefaktor

#### **4.5.9 Quantifizierung mittels Integrator**

Der Gaschromatograph der Marke Trace wurde mit einem Integrator (Spectra Physics, San Jose, CA, USA, Model SP 4270) verbunden. Aus dem Chromatogramm wurden durch Integration die Flächen unter den Peaks von internem Standard und Referenz ermittelt. Responsefaktorbestimmung und Berechnung erfolgten analog zur oben angegebenen Responsefaktorbestimmung und Auswertung mittels Verwendung von isotoenmarkiertem Standard.

## 4.6 Sensorische Untersuchung

Um sicherzustellen, dass sich die mittels Handbonitierung ausgewählten Hopfensorten auch tatsächlich im Aroma unterscheiden, wurde für jede mögliche Paarung der fünf Sorten ein objektiver Test auf Unterscheidbarkeit nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG) L 00.90-7 durch eine orthonasale Dreiecksprüfung im „forced choice Modus“ durchgeführt.

Das Testpanel bestand aus zwölf sensorisch geschulten und erfahrenen Probanden der deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie. Zur Prüfung wurde den Probanden Hopfenpulver, das manuell durch Verreiben von Pellets Typ 90 der jeweiligen Hopfensorten mit Reibschale und Pistill hergestellt worden war, vorgelegt. Aufgrund sortenbedingter Farbunterschiede der Hopfenpulver wurden die Tests blind durchgeführt. Die einzelnen Proben jeder Reihe wurden Testern (mit verbundenen Augen) von einem Interviewer in vorgegebener Reihenfolge gereicht, anschließend wurde das Ergebnis der Prüfung vom Interviewer notiert.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf verschiedene Hopfensorten hinsichtlich ihrer analytisch und sensorisch fassbaren Merkmale und sensorischen Eigenschaften charakterisiert. Es handelte sich dabei um die Hallertauer Sorten Perle, Smaragd und Hersbrucker sowie um die beiden ausländischen Sorten Slowenischer Golding aus Slowenien und Yakima Cascade aus den USA. In den fünf Hopfensorten wurden 51 Aromastoffe geruchlich detektiert und 17 Aromastoffe, nämlich diejenigen mit den höchsten Intensitäten, analytisch quantifiziert.

Im direkten Vergleich beim sensorischen Sortenscreening wurde das Aroma aller Sorten von Myrcen und Linalool dominiert. Die Sorte Yakima Cascade unterschied sich im Screening signifikant von den übrigen Sorten, während die Sorte Slowenischer Golding nicht von den Sorten Hersbrucker, Perle und Smaragd unterscheidbar war. Hersbrucker, Perle und Smaragd waren im Vergleich zueinander jedoch signifikant unterschiedlich.

Der Aromastoff, der mit Abstand die größten Konzentrationen in allen Hopfensorten aufwies, war Myrcen mit Konzentrationen zwischen 760  $\mu\text{g/g}$  und 1300  $\mu\text{g/g}$  Hopfen. Am meisten Myrcen wurde in der Sorte Hersbrucker gefunden, am wenigsten in der Sorte Perle. Die zweithöchsten Konzentrationen wies Linalool auf, dessen Konzentrationen zwischen 16  $\mu\text{g/g}$  (Perle) und 72  $\mu\text{g/g}$  (Golding) lagen. Geraniol wurde in Konzentrationen zwischen 4  $\mu\text{g/g}$  (Hersbrucker) und 26  $\mu\text{g/g}$  (Yakima Cascade) nachgewiesen. Gemessen an den ermittelten FD-Faktoren als auch an den quantitativen Daten zählte die Sorte Perle zu den aromaschwachen Hopfensorten. Die Sorte Smaragd hingegen war im Vergleich als stark blumig und fruchtig wahrgenommen worden, während die Sorte Hersbrucker bei den Geruchseindrücken käsig-schweißig und grün-grasig hervortrat. Die Sorte Golding wurde als blumig empfunden, die Sorte Yakima Cascade als citrusartig, würzig und johannisbeerartig.

In dieser Arbeit konnten in den fünf Hopfensorten charakteristische, für die Unterscheidung bedeutsame Aromastoffe nachgewiesen werden. So wurden das 1-sulfanyl-2-propanol als Schlüsselaromastoff der Sorte Hallertauer Smaragd sowie das 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon als Schlüsselaromastoff der Sorte Yakima

Cascade nachgewiesen. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin, ein Aromastoff mit erdigem Eindruck, der in allen Sorten gleichermaßen vorkommt, wurde erstmals in Hopfen nachgewiesen. Darüber hinaus trugen Calamenen und das p-Anisaldehyd zum Sortenunterschied bei. Sotolon wurde in Konzentrationen zwischen 0,04 µg/g und 0,11 µg/g gefunden, Phenylacetaldehyd konnte in Konzentrationen zwischen 1,4 µg/g und 6,2 µg/g in den untersuchten Hopfenproben nachgewiesen werden. Bisher war Phenylacetaldehyd nur als Alterungskomponente in gelagertem Bier bekannt (Soares et al., 2004), die im Verlauf der Lagerung zunimmt (Vanderhaegen und Derdelinckx 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch geklärt werden, ob und in welchem Umfang Aromastoffe im Hopfen in Form von glykosidisch gebundenen Vorstufen vorliegen, und ob diese freigesetzt werden können. Dies wurde für das Linalool und teilweise für das Geraniol untersucht.

Linalool und Geraniol kamen im Hopfen in freier und glykosidisch gebundener Form vor und konnten durch Hitzeeinwirkung oder Enzymwirkung freigesetzt werden. Erfolgte die Freisetzung durch Temperatureinwirkung dann war diese bei Linalool vom pH-Wert weitgehend unabhängig. Die Geraniolfreisetzung war hingegen bei tiefem pH-Wert deutlich besser. Die Menge an gebunden vorliegendem Linalool entsprach 57 % der Menge des freien Linalools. Je mehr freies Linalool eine Hopfensorte aufwies, umso höher war auch der Anteil an gebunden vorliegendem Linalool. Gebundenes Geraniol und Linalool konnten vorwiegend aus dem Harzrückstand isoliert werden. Erfolgte die Freisetzung enzymatisch ließ sich deutlich mehr Linalool als Geraniol freisetzen.

Die Ergebnisse belegen indirekt, dass Aromareserven im Hopfen in Form von glykosidisch gebundenen Vorstufen vorliegen, die sich durch Enzyme oder Hitzeeinwirkung freisetzen lassen. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass Hemmstoffe im Hopfen die Freisetzung deutlich behindern. Ob diese Reserven daher zu einer weiteren Optimierung des Hopfenaromas im Bier genutzt werden können bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

---

## 6. Literaturverzeichnis

Back, W. Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie. *Nürnberg, Fachverlag Hans Carl GmbH. 2005.*

Barth, S. J. Der Barth Bericht, Hopfen 2005/2006.;  
[http://www.barthhaasgroup.com/cmsdk/content/bhg/news/report2/Barth\\_2006\\_Deutsch.pdf](http://www.barthhaasgroup.com/cmsdk/content/bhg/news/report2/Barth_2006_Deutsch.pdf). **2006.**

Barth, S. J. Der Barth Bericht, Hopfen 2007/2008.;  
[http://www.barthhaasgroup.com/cmsdk/content/bhg/news/report2/Barth\\_2008\\_Deutsch.pdf](http://www.barthhaasgroup.com/cmsdk/content/bhg/news/report2/Barth_2008_Deutsch.pdf). **2008.**

Barth, S.J. Der Barth Bericht, Hopfen 2009/2010.;  
[http://www.barthhaasgroup.com/images/pdfs/barthreport20092010\\_german.pdf](http://www.barthhaasgroup.com/images/pdfs/barthreport20092010_german.pdf).  
**2010.**

Barth, S.J. Der Barth Bericht, Hopfen 2011/2012.;  
[http://www.barthhaasgroup.com/images/pdfs/barthreport20092010\\_german.pdf](http://www.barthhaasgroup.com/images/pdfs/barthreport20092010_german.pdf).  
**2012.**

Baxter, R.; Laurie, W.; McHale, D. Transformations of monoterpenoids in aqueous acids – The reactions of linalool, geraniol, nerol, and their acetates in aqueous citric acid. *Tetrahedron. 1978, 34, 2195–2199.*

Blank I.; Schieberle P.; Grosch W. Quantification of the flavour compounds 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon and ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanone by a stable isotope dilution assay. in: Schreiner P.; Winterhalter P. (Hrsg.) Allured publishing: Carol Stream, IL. *Progr. Flavour Precursor Stud. 1993, 103-109.*

Blekas, G.; Guth, H. Evaluation and quantification of potent odorants of greek virgin olive oil. *Dev. Food Sci. 1995, 37, 419-427.*

Biendl, M.; Kollmannsberger, H., Nitz, S. Occurrence of glycosidically bound flavour compounds in different hop products. *Europ. Brew. Conv. Proc. 29th Congr., Dublin. 2003.*

Bishop, J. Microencapsulation in yeast cells. *J. Microencapsulation. 1998, 15, 761-773.*

- Buck L.; Axel R. A novel multigen family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. **1991**, *65* (1), 175-187.
- Buettner, A.; Schieberle, P. Characterization of the most odor-active volatiles in fresh, hand-squeezed juice of grapefruit (citrus paradisi macfayden). *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*(12), 5189-5193.
- Buettner, A.; Otto, S.; Beer, A. Mestres, M. Schieberle, P. Hummel, T. Dynamics of retronasal aroma perception during consumption: Cross-linking on-line breath analysis with medico-analytical tools to elucidate a complex process. *Food Chem.* **2008**, *108*, 1234-1246.
- Buttery, R. G.; Ling, L. Identification of hop varieties by gas chromatographic analysis of their essential oils. Capillary gas chromatography patterns and analyses of hop oils from american grown varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*(3), 531-535.
- Chapman, A. C. Essential oil of hops. *J. Chem. Soc. Trans.* **1895**, *67*: 54-63.
- CMA-Sortenmappe, V. D. H. e. V. Die Seele des Bieres, Hopfen aus Deutschland.; <http://www.deutscher-hopfen.de>. **2005**.
- Cosser, K. Investigation of a ribes off-flavour in beer. *MBAA Techn. Quart.* **1980**, *17*(2), 53-59.
- Cullere, L.; Escudero, A.; Cacho, J.F.; Ferreira, V. Gas chromatography - olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*(6), 1653-1660.
- Czerny, M.; Christlbauer, M.; Christlbauer, M.; Fischer, A.; Granvogl, M.; Hammer, M.; Hartl, C.; Moran-Hernandez, N.; Schieberle, P. Re-investigation on odor thresholds of key food aroma compounds and developments of an aroma language based on odor qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *228*, 265-273.
- Daenen, L.; Saison, F.; Sterckx, F. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in saccharomyces and brettanomyces brewing yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, 478-488.

- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.-N. and Dubourdieu, D. Identification of a powerful aromatic component of vitis vinifera L. var. Sauvignon wines: 4-sulfanyl-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragrance J.* **1995**, *10*, 385-392.
- De Cooman, L.; Everaert, E.; De Keukeleire, D. Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*, 145-150.
- Deinzer, M.; Yang, X. Hop aroma: Charakter impact compounds found in beer, methods of formation of individual compounds. In *EBC monograph 22nd symposium on hops, Zoeterwoude, The Netherlands; Getränke-Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, 1994; pp 181-197.*
- De Keukeleire, D.; David, F.; Haghebaert, K.; Sandra, P. Automated reporting on the quality of hops and hop products." *J. Inst. Brew.* **1998**, *104(2)*, 75-82.
- Dhallan, R.S.; Yau, K.W. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature.* **1990**, *347*, 184-187.
- Dornbusch H. Hopfenstopfen: Eine neue Aromawelt auch für deutsche Biere. *Brauind.* **2012**; *3*, 33.
- Engel, W.; Bahr, W.; Schieberle, P. Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 3-4, 237-241.
- Escudero, A.; Gogorza, B.; Melus, M.A.; Ortin, N.; Cacho, J. and Ferreira, V. Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52(11)*, 3516-3524.
- Esterbauer, H. Über die Autoxydation von Linolsäuremethylester in Wasser III: Chromatographische Auftrennung der wasserlöslichen Reaktionsprodukte. *Fette, Seifen, Anstrichmittel.* **1968**, *70(1)*, 1-4.
- Eyres, G. T.; Marriott, P. J.; Dufour, J.P. Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*humulus lupulus* L.) Essential oil from four different varieties & sect. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55(15)*, 6252-6261.
- Flath R.A.; Forrey R.R. Volatile components of papaya (*carica papaya* L., solo variety). *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 103-109.

- 
- Forster, A. The 2003 Hallertau hop crop - challenges and outlook. *Brauw. Intern.* **2003**, 15-21.
- Forwick, J. Wildpflanzen als Genetische Ressourcen Phänotypische Variabilität bei Echem Feldsalat (*Valerianella locusta* (L.) Laterr.), Wiesen-Kümmel (*carum carvi* L.) und Hopfen (*humulus lupulus* L.) in Nordrhein-Westfalen. *Dissertation, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.* **2002**, 78-109.
- Forwick, J.; Wunder, J.; Wingender, R.; Mösel, B. M.; Schnabl, H. Morphometrische und molekularbiologische Erfassung und Untersuchung von Wildpflanzenpopulationen in Nordrhein-Westfalen als pflanzengenetische Ressourcen. *Forschungsbericht 114. L. F. d. Rheinischen und F.-W.-U. Bonn. Bonn: Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen.* **2003**.
- Frauendorfer, F. Zum Einfluss des Röstvorgangs auf die Bildung wertgebender Aromastoffe in Kakao. *Dissertation Technische Universität München.* **2003**.
- Freundorfer, J.; Maier, J.; Reiner, L. Rechnergestützte Verfahren zur Sortenerkennung bei Hopfen und Hopfenprodukten auf der Basis der ätherischen Öle. *Monatszeitschrift f. Brauwiss.* **1991**, 6, 221-238.
- Fritsch, H. Einfluss des Hopfens auf wertgebende Aromastoffe in Pilsener-Bieren sowie in Zwischenstufen des Brauprozesses. *Dissertation, Technische Universität München.* **2001**.
- Fritsch, H.; Kaltner, D.; Steiner, S.; Schieberle, P.; Back, W. Entschlüsselung des Hopfenaromas in Bier Ein Paradebeispiel anwendungsorientierter Forschung. *Brauwelt.* **2004**, 39/40, 1206-1207.
- Fritsch, H.; Schieberle, P. Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a bavarian pilsner-type beer. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7544-7551.
- Gesetzestext. Sensorische Untersuchung eines Prüflebensmittels. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG).* **1990**, Band I (L), L 00.90-7.

---

Goiris K.; De Ridder M.; De Rouck, G.; Boeykens, A.; Van Opstaele, F.; Aerts, G.; De Cooman, L.; De Keukeleire, D. The oxygenated sesquiterpenoid fraction of hops in relation to the spicy hop character of beer. *J. Inst. Brew.* **2002**, *108(1)*, 86-93.

Goiris K.; Syryn, E.; Jaskula B.; Van Opstaele F.; De Rouck G.; Aerts G.; De Cooman L. Hop polyphenols: potential for beer flavor and flavor stability. *Proceedings of the Europ. Brew. Conv. Congr., Prague. 2005*, Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, Contribution. zitiert in: Opstaele, F.; De Rouck G.; De Clippeleer, J.; Aerts, G. and De Cooman, L. Analytical and sensory assessment of hoppy aroma and bitterness of conventionally hopped and advanced hopped pilsner beers. *J. Inst. Brew.* **2010**, *116(4)*, 445-458.

Goldstein, H. Methods of making an using purified kettle hop flavorants. *United States Patent Application.* **1999**, *5*, 972,411.

Goldstein, H.; Ting, P.; Navarro, A. Watersoluble hop flavor precursors and their role in beer flavor. *Europ. Brew. Conv. Proc. 29 th Congr., Cannes. 1999 a.*

Grosch, W. Detection of potent odorants in food by aroma extract dilution analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **1993**, *4*, 68-73.

Guadagni, D. G.; Buttery, R.G.; Harris, J. Odour intensities of hop oil components. *J. Agric. Food Chem.* **1966**, *17(3)*, 142-144.

Guth H.; Grosch W. Deterioration of soy-bean oil: Quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1990**, *23*, 513-522.

Guth, H. Identification of character impact odorants of different white wine varieties." *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45(8)*, 3022-3026.

Hanke S. Untersuchungen zum Einfluss der Hopfungstechnologie auf die Geschmacksstabilität und Harmonie untergäriger Biere. *Dissertation Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan Fakultät für Landnutzung Ernährung und Umwelt.* **2009**.

Hanke S.; Ditz V.; Herrmann, M.; Back, W.; Becker, T. and Krottenthaler, M. Influence of ethylacetate, isoamylacetate and linalool on off-flavour perception in beer. *Brew. Sci.* **2010**, *63*, 140-147.

Hanin, L. *Cours de Mature Medicale, par D; Hanin: Paris. 1819; T.1, pp 332.*

Hein, W.; G. Pollach, G. Neue Erkenntnisse beim Einsatz von Hopfenprodukten in der Zuckerindustrie. *Zuckerind.* **1997**, *122*, 940-949.

Herrmann, M.; Hanke, S.; Kaltner, D.; and Back W. Hop volatile compounds (part I): Analysis of hop pellets and seasonal variations. *Brew. Sci.* **2008**, *61*, 135-139.

Hopfenpflanzerverband Tettngang e.V. Pellets. <http://www.tettnganger-hopfen.de/de/hopfen/hopfenprodukte/32-pellets>. **2011**.

Hopfenveredelung St. Johann GmbH & Co. KG. Hopfenveredelung St. Johann. <http://www.hopfenveredelung.de/typ90.php>. **2011**.

Howell, K.; Swiegers, J.; Elsey, G.; Siebert, T.; Bartowsky, E.; Fleet, G.; Pretorius, I.; Lopes, M. Variation in 4-Sulfanyl-4-methyl-pentan-2-one release by *saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiol. Letters.* **2004**, *240*, 125-129.

Intelmann, D.; Haseleu, G.; Dunkel, A.; Langemann, A.; Stephan, A.; and Hofmann, T. Comprehensive sensomics analysis of hop-derived bitter compounds during storage of beer. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1939-1953.

Irwin, A. J. Varietal dependence of hop flavour volatiles in lager. *J. Inst. Brew.* **1989**, *95*, 185-194.

Jagella, T.; Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.). III. Desirable and undesirable odorants of white pepper. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 27-31.

Jährig, A.; Schade, W. Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Hopfeninhaltsstoffen und deren Umwandlungsprodukten gegenüber Mikroorganismen in der Brauerei. *Lebensmittelind.* **1981**, *28* (H.7), 311-315.

Jaskula, B.; Kafarski P.; Aerts, G.; and Cooman, L. A kinetic study on the isomerization of hop  $\alpha$ -acids." *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6408-6415.

Julius, D.; Katz, L.C. A Nobel for smell. *Cell.* **2004**, *119*, 747-752.

- 
- Kammhuber, K. Die Bedeutung der Hopfeninhaltsstoffe für das Bierbrauen, für die Gesundheit und für andere Anwendungen.;  
[http://www.lfl.bayern.de/ipz/hopfen/16858/hopfeninhaltsstoffe-bier\\_und\\_gesundheit.pdf](http://www.lfl.bayern.de/ipz/hopfen/16858/hopfeninhaltsstoffe-bier_und_gesundheit.pdf). **2005**.
- Kaltner, D. Untersuchungen zur Ausbildung des Hopfenaromas und technologische Maßnahmen zur Erzeugung hopfenaromatischer Biere. *Dissertation Technische Universität München*. **2000**.
- Kaltner, D.; Thum, B.; Forster, C. Untersuchungen zum Hopfenaroma in Pilsner Bieren bei Variation technologischer Parameter. *Monatsschr. Brauwiss.* **2001**, 9/10, 199-205.
- Kaltner, D.; Steinhaus, M.; Mitter, W.; Biendl, M.; Schieberle, P. (R)-Linalool als Schlüsselaromastoff für das Hopfenaroma in Bier und sein Verhalten während der Bieralterung. *Monatsschr. Brauwiss.* **2003**, 11/12, 192-196.
- Kaltner, D. Moderne Hopfenprodukte - Getränkeherstellung Deutschland.;  
<http://www.hopsteiner.com>. **2005**.
- Kaltner, D. Changes in hop derived compounds during beer production and aging. *1st International Brewers Symposium on Hop Flavour and Aroma, August 2007, Corvallis, Oregon, USA*. **2007**.
- Kerscher, R. Animal species related aroma differences of heated meat (in Germany). *Dissertation Technische Universität München*. **2000**.
- King, A. J.; Dickinson, J. R. Biotransformation of monoterpene alcohols by *saccharomyces cerevisiae*, *torulaspora delbrueckii* and *klyveromyces lactis*.  
*Yeast*. **2000**, 16, 499-506.
- King, A. J.; Dickinson, J. R. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Res.* **2003**, 3, 53-62.
- Kirchhoff, E. Charakterisierung von Schlüsselaromastoffen in Roggenbrot. *Disseration Technische Universität München*. **2000**.
- Kisbye, G. Alle Jahre wieder. 53. Arbeitstagung des Bundes Österreichischer Braumeister und Brautechniker. *Brauind.* **2003**, 11, 78-80.

---

Kishimoto, T.; Wanikawa, A.; Kono, K. and Shibata, K. Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8855-8861.

Kishimoto, T.; Kobayashi, M.; Yako, N.; Iida, A.; and Wanikawa, A. Comparison of 4-Sulfanyl-4-methylpentan-2-one contents in hop cultivars from different growing regions. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1051-1057.

Kleene, R.C.; Gesteland, S.J. Dissociation of frog olfactory epithelium with N-ethylmaleimide. *Brain Res.* **1981**, *229* (2), 536-540.

Kobayashi, M.; Tominaga, T. New style of Koshu wine – Kiuroka. *J. ASEV Jpn.* **2005**, *16*, 150-151. zitiert in: Kishimoto, T.; Kobayashi, M.; Yako, N.; Iida, A.; and Wanikawa, A. Comparison of 4-Sulfanyl-4-methylpentan-2-one contents in hop cultivars from different growing regions. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1051-1057.

Kollmannsberger, H.; Nietz, S. Glykosidisch gebundene Aromastoffe in Hopfen (*Humulus lupulus* L.): 1. Enzymatische Freisetzung von Aglyconen. *Advances in Food Sci.* **2002**, *24* (No. 3), 106-114.

Kollmannsberger, H.; Biendl, M.; Nitz, S. Occurrence of glycosidically bound flavour compounds in hops, hop products and beer. *Monatsschr. Brauwiss.* **2006**, *5/6*, 83-89.

Komarek, D. Key odorants in beer - Influence of storage on the flavor stability. *Dissertation Technische Universität München.* **2001**.

Kowaka K.; Fukuoka, Y.; Kawasaki, H; Asano, K. Über den wirklichen Brauwert von Aromahopfen. *Europ. Brew. Conv.*, 19th Congr., London. **1983**.

Krautwurst, D. Biodiversität des Geruchssinns. *ForschungsRep.* **2010**, *1*, 13-15.

Krüger, R. Verfahren und Vorrichtung zur kontinuierlichen Druckkochung von Bierwürze. *Deutsches Patentamt Bundesrepublik Deutschland.* **1983**, DE 31 26 714 C2.

Lam, K. C.; Forster, R. T.; Deinzer, M. L. Aging of hops and their contribution to beer flavor. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*(4), 763-770.

Lemmens, G. W. The breeding and parentage of Hop Varieties. [http://www.brewerssupplygroup.com/pdf/knowledge\\_center/TheBreeding\\_Varieties.pdf](http://www.brewerssupplygroup.com/pdf/knowledge_center/TheBreeding_Varieties.pdf). **2005**.

- 
- Lermusieau, G.; Bulens, M.; Collin, S. Use of GC - Olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*(8), 3867-3874.
- Lermusieau, G.; Collin, S. Volatile sulfur compounds in hops and residual concentrations in beer - A Review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2003**, *61*(3), 109-113.
- Likens, S. T.; Nickerson, G. B. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* **1964**. 5-13
- Likens, S. T.; Nickerson, G. B. Identification of hop varieties by gas chromatographic analysis of their essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 525-530.
- Marriott, R. The organoleptic impact of hop floral molecules in beer. *IBD Asia Pacific Convention Hobart, Tasmania.* **2006**, 19th to 26th March 06, Hobart.
- Mayer, D. J. G. Hopfen - Arzneipflanze des Jahres 2008.  
<http://www.klostermedizin.de/index.php?cat=196&cl2=193&cl3=196&art=53>. **2008**.
- Miyazawa, T. The impact of subthreshold carboxylic acids on the odor intensity of suprathreshold flavor compounds. *Chem. Percept.* **2008**, *1*, 163-167.
- Moir, M. Hops - A Millennium Review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2000**, *58*(4), 131-146.
- Nance, M.R.; Setzer, W.N. Volatile components of aroma hops (*humulus lupulus* L.) commonly used in beer brewing. *J. Brew. Dest.* **2011**, *2*, 22-26.
- Naya, Y. The constituents of hops. VI studies of the volatile composition of *humulus lupulus* L. during ripening. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, *44*, 3116-3120.
- Novak, J. Verfahren und Vorrichtung zum Hopfen des Bieres. *Schweizerische Eidgenossenschaft; Eidgen. Amt für Geistiges Eigentum.* **1911**, Nr. 57972.
- Ohta, T. Characteristic flavor of kansho-shochu (sweet potato spirit). *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*(6), 1353-1357.
- Peacock, V. E.; Deinzer, M. L.; Likens, S. T.; Nickerson, G. B; and McGill, L.A. Floral hop aroma in beer." *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*(6), 1265-1269.
- Peacock, V. E.; Deinzer, M. L. Chemistry of hop aroma in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1981a**, *39* No, 4, 136-141.

---

Peacock, V. E. Fundamentals of hop chemistry. *Master Brew. Assoc. Am. Tech. Q.* **1998**, No 1,4-8.

Peppard, T. L.; Ramus, S. A.; Witt C.A; and Siebert K.J. Correlation of sensory and instrumental data in elucidating the effect of varietal differences on hop flavour in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1989**, 47, 18-26.

Pfnür P. Untersuchungen zum Aroma von Schokolade. *Dissertation, Technische Universität München.* **1998**.

Pollach, G.; Hein, W.; Rösner, G. Rübenqualitätsstudien an getrockneten Rübenproben. *Zuckerind.* **1998**, 123(10), 808-815.

Roberts, M.T.; Dufour, J.P.; Lewis, A.C. Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC x GCTOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. *J. Sep Sci.* **2004**, 27, 473-478.

Saison D.; De Schutter D.P.; Vanbeneden N.; Daenen L.; Delvaux F.; Delvaux F.R. Decrease of aged beer aroma by the reducing activity of brewing yeast. *J. Agric. Food. Chem.* **2010**, 58, 3107-3115.

Sanchez, N. B.; Lederer, C. L.; Nickerson, G.B.; Libbey, L.M.; and McDaniel, M.R. Sensory and analytical evaluation of hop oil oxygenated fractions. In *Food Science and Human Nutrition*; Charalambous, G., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, **1992**, 371-402.

Schieberle, P. (1991). Primary odorants of pale lager beer, differences to other beers and changes during storage". *Zeitschr. Lebensm.-Unters. u. -Forschung.* **1991**, 193, 558-565.

Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile compounds and their precursors. *Characterization of food*; Elsevier Science: BV, **1995** 403-431.

Schieberle, P; Hofmann T. Die molekulare Welt des Lebensmittelgenusses. *Chem. Unserer Zeit.* **2003**, 37, 388-401.

Schiller, K. H. Wirkungen von Zubereitungen aus Humulus lupulus L. in pharmakologischen Modellen. *Mathematisch- Naturwissenschaftliche Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster. Dissertation.* **2002**.

---

Schultz, T. H.; Flath, R. A.; Mon, T.R.; Egging, S.B.; Teranishi, R. Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food. Chem.* **1977**, *25*(3), 446-449.

Schuh, C. Wichtige Aromastoffe in schwarzem und grünem Tee (*Camellia sinensis*). TUM *Technische Universität München*, Institut für Lebensmittelchemie. *Dissertation*. **2004**.

Semmelroch P.; Grosch W. Studies on character impact compounds of coffee brews. *J. Agric. Food. Chem.* **1996**, *44*, 537-543.

Sen, A.; Grosch W. Synthesis of six deuterated sulfur containing odorants to be used as internal standards in quantification assays. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, *192*, 541-547.

Soares da Costa M.; Goncalves, C.; Ferreira, A.; Ibsen, C.; Guedes de Pinho, P. Further Insights into the Role of Methional and Phenylacetaldehyde in Lager Beer Flavor Stability. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7911-7917.

Steinhaus, M. Wichtige Aromastoffe in Hopfen (*humulus lupulus* L.). *Dissertation*, *Technische Universität München, Fakultät für Lebensmittelchemie*. **2000**.

Steinhaus, M.; Schieberle, P. Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*humulus lupulus* L. variety spalter select) Based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2000 a**, *48*(5): 1776-1783.

Steinhaus M.; Fritsch H. T.; Schieberle, P. Quantitation of (R) and (S)- linalool in beer using a solid-phase microextraction (SPMW) in combination with a stable isotope dilution assay (SIDA). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7100-7105.

Steinhaus, M.; Wilhelm, W.; Schieberle, P. Comparison of the most odour-active volatiles in different hop varieties by application of a comparative aroma extract dilution analysis. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *226*, 45-55.

Steinhaus, M.; Schieberle, P. Transfer of potent hop odorants linalool, geraniol and 4-methyl-4-sulfanyl-2-pentanone from hops into beer. In: *Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, 31st Europ. Brew. Conv., Venice*, **2007**, 1004-1011.

Takoi, K.; Degueil M.; Shinkaruk S.; Thibon C.; Maeda K.; Ito K.; Bennetau B.; Denis Dubourdieu, D.; and Tominaga T. Identification and characteristics of new volatile

- thiols derived from the hop (*humulus lupulus* L.) cultivar Nelson Sauvin. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2493-2502.
- Takoi, K.; Koie, K.; Itoga, Y.; Katayama, Y.; Shimase, M.; Nakayama, Y.; and Watari J. Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58(8)*, 5050-5058.
- Takoi, K.; Itoga Y.; Koie, K.; Kosugi, T.; Shimase, M.; Katayama, Y.; Nakayama, Y.; Watari, J. The contribution of geraniol metabolism to the citrus flavour of beer. *J. Inst. Brew.* **2010**, *116(3)*, 251-260.
- Tominaga, T. Identification of 4-Sulfanyl-4-methylpentan-2-one from the box tree (*buxus sempervirens* L.) and broom (*sarathamnus scoparius* (L.) Koch.). *Flavour Fragr. J.* **1997**, *12*, 373-376.
- Tominaga, T. Identification of new volatile thiols in the aroma of *vitis vinifera* L. var. sauvignon blanc wines. *Flavour Fragr. J.* **1998**, *13*, 159-162.
- Tressl, R. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of volatile compounds of beer. *Monatsschr. Brau.* **1978**, *28(5)*: 109-118.
- Tressl, R.; Friese L.; Fendesack, F.; and Köppler, H. Studies of the volatile composition of hops during storage. *J. Agric. Food Chem.* **1978 a**, *26*, No. 6: 1426-1430.
- Tressl, R.; Friese, L.; Fendesack, F.; Koeppler, H. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of hop aroma constituents in beer. *J. Agric. Food Chem.* **1978 b**, *26*, No. 6, 1422-1426.
- Tressl, R.; Bari, D.; Kossa M. Formation of off-flavor components in beer In: Charalambous G (ed). The analysis and control of less desirable flavours in food and beverages. *Academic Press New York, Charalambous G (ed).* **1980**, 293-318.
- Tressl, R.; Engel, K.H.; Kossa, M. Characterization of tricyclic sesquiterpenes in hop (*humulus lupulus* var. Hersbrucker Spaet). *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31(4)*, 892-897.
- United States Department of Agriculture USDA: National Resource Conservation Service NRCSN. Plants Database.;

---

<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=HUMUL>.

**2011.**

Vanderhaegen, B.; Derdelinckx, G. Characterization of flavour compounds in fresh and aged beer by purge and trap-gas chromatography-mass spectrometry.

*Monatszeitschr. Brauwiss.* **2005**, *58*, 11/ 12, 1-9.

Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.* **2006**, *95*, 3, 357-381.

Vermeulen, C.; Collin, S. Combinatorial synthesis and sensorial properties of 21 Mercapto esters. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*(12), 3618-3622.

Vermeulen, C.; Lejeune I.; Tran, T.H.; Colin, S. Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5061-5068.

Waldeck, C.; Frings, S. Die Molekularen Grundlagen der Geruchswahrnehmung: Wie wir riechen, was wir riechen. *Biol. Unserer Zeit.* **2005**, *35*(5), 302-309.

Wang, D.; Yoshimura, T.; Kubota, K.; and Kobayashi, A. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 1. Qualitative and quantitative analyses of glycosides with aglycons as aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*(11), 5411-5418.

Williams, R. S., and Wagner, H. P. Contribution of hop bitter substances to beer staling mechanisms. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1979**, *37*, 13–19. zitiert in: Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.* **2006**, *95*, 3, 357-381.

Yu, T. H.; Wu, C. M.; Rosen, R.T.; Hartman, T.G.; Ho, C.T. Volatile compounds generated from thermal degradation of alliin and deoxyalliin in an aqueous solution.

*J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*(1), 146-153.

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Struktur von $\alpha$ -Säuren als Cohumulon (a), Humulon (b), Adhumulon (c).....	7
<b>Abb. 2:</b>	Struktur von $\beta$ -Säuren als Colupulon (a), Lupulon (b), Adlupulon (c) .....	7
<b>Abb. 3:</b>	Struktur der $\alpha$ -Säuren Cohumulon (1a), Humulon (1b), Adhumulon (1c) und der entsprechenden Umwandlungsprodukte. ....	9
<b>Abb. 4:</b>	Industrielle Herstellung von Hopfenpellets (Typ 90) aus Doldenhopfen .	17
<b>Abb. 5</b>	Orthonasale und retronasale Geruchswahrnehmung .....	27
<b>Abb. 6:</b>	Der Geruchsnerve (lat. <i>nervus olfactorius</i> ) .....	28
<b>Abb. 7:</b>	Schematische Darstellung des Riechepithels.....	29
<b>Abb. 8:</b>	Signaltransduktion in Riechzellen .....	30
<b>Abb. 9:</b>	Biotransformation von Monoterpenen durch Hefen .....	39
<b>Abb. 10:</b>	FD-Chromatogramm (FD $\geq$ 8) der flüchtigen Fraktion aus Hallertauer Smaragd .....	43
<b>Abb. 11:</b>	FD-Chromatogramm (FD $\geq$ 8) der flüchtigen Fraktion aus Hallertauer Perle .....	48
<b>Abb. 12:</b>	FD-Chromatogramm (FD $\geq$ 8) der flüchtigen Fraktion aus Hallertauer Hersbrucker Spät .....	51
<b>Abb. 13:</b>	FD-Chromatogramm (FD $\geq$ 8) der flüchtigen Fraktion aus Sloweni- scher Golding .....	54
<b>Abb. 14:</b>	FD-Chromatogramm (FD $\geq$ 8) der flüchtigen Fraktion aus Yakima Cascade .....	
<b>Abb. 15:</b>	Massenspektrum (MS-Cl), GCMS, OC, FFAP, von 4-Methyl-4- sulfanyl-pentan-2-on, Affigelextrakt aus Hopfenpellets der Sorte Yakima Cascade .....	58

---

<b>Abb. 16:</b>	Massenspektrum (MS-EI), GCMS, OC, FFAP, von 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon, Affigelextrakt aus Hopfenpellets der Sorte Yakima Cascade.....	58
<b>Abb. 17:</b>	Synthese von [ <sup>2</sup> H <sub>10</sub> ]-4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon aus [ <sup>2</sup> H <sub>10</sub> ]-4-Methylpent-3-en-2-on (Mesityloxid) .....	68
<b>Abb. 18:</b>	Struktur der isotopenmarkierten Standards zur Aromastoffquantifizierung .....	71
<b>Abb. 19:</b>	Myrcen in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005,	
<b>Abb. 20:</b>	Octanalgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....	73
<b>Abb. 21:</b>	(Z)-1,5-Octadien-3-on in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).....	74
<b>Abb. 22:</b>	4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanongehalt in Hopfenpellets Typ 90 der Sorte Yakima Cascade (YCA), Ernte 2004 und 2005. ....	75
<b>Abb. 23:</b>	Nonanalgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).. ....	76
<b>Abb. 24:</b>	Methional in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).. ....	77
<b>Abb. 25:</b>	3-Isobutyl-2-methoxypyrazin in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).....	78

- 
- Abb. 26:** Linaloolgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....79
- Abb. 27:** Buttersäuregehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).....80
- Abb. 28:** Phenylacetaldehyd in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).....81
- Abb. 29:** 3- und 2-Methylbuttersäuregehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).....82
- Abb. 30:** (E,E)-2,4-Nonadienalgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) 83
- Abb. 31:** Pentansäuregehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).....84
- Abb. 32:** Geraniol in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....85
- Abb. 33:** (E,Z)-2,6-Nonadienalgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....86
- Abb. 34:** Sotolon in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....87

- 
- Abb. 35:** Vanillin in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....88
- Abb. 36:** Linaloolgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2004, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....89
- Abb. 37** Geraniol in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2004, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....90
- Abb. 38:** Myrcengehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2003 den Sorten Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO) und Hallertauer Hersbrucker (HHE), Ernte 2003 .....91
- Abb. 39:** Linaloolgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2004, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....94
- Abb. 40:** Geraniolgehalt in Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2004 Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) .....96
- Abb. 41:** Versuchsschema zur Freisetzung von Geraniol und Linalool aus Hopfen der Sorte Slowenischer Golding Ernte 2004 durch SAFE und Simultandestillation bei unterschiedlichen pH Werten ..... 169
- Abb.42:** Einfluss von pH-Wert und Extraktionstemperatur auf Veränderung des Geraniolgehalts im Extraktionsrückstand des Slowenischen Golding (Ernte 2004) innerhalb von acht Monaten Lagerung ..... 100
- Abb.43:** Einfluss von pH-Wert und Extraktionstemperatur auf Veränderung des Linaloolgehalts im Extraktionsrückstand des Slowenischen Golding (Ernte 2004) innerhalb von acht Monaten Lagerung ..... 100

- 
- Abb. 44:** Enzymatische Phenolfreisetzung aus internem Standard Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid durch 50 mg Glucosidase aus *Aspergillus niger* nach 72 h bei 37 °C während enzymatischer Spaltung von Glykosiden verschiedener Hopfensorten, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) ..... 102
- Abb. 45:** Enzymatische Linaloolfreisetzung aus Glykosiden verschiedener Hopfensorten, Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) unter Berücksichtigung der Ausbeuteverluste des internen Standards Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid ..... 103
- Abb. 46:** Enzymatische Geraniolfreisetzung aus Glykosiden verschiedener Hopfensorten, Hopfenpellets Typ 90, Ernte 2005, Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE) unter Berücksichtigung der Ausbeuteverluste des internen Standards Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid ..... 104
- Abb. 47:** Massenspektrum (MS-CI) GCMS, OC, FFAP, 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon, Synthese..... 134
- Abb. 48:** Massenspektrum (MS-EI), GCMS, OC, FFAP, 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon, Synthese..... 134
- Abb. 49:** Destillationsapparat für die Solvent Assisted Favor Evaporation (SAFE), (Engel 1999). ..... 137
- Abb. 50:** Apparatur zur Simultandestillation (SDE), (Flath 1977). ..... 138

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Zusammensetzung getrockneter Hopfendolden (Narziss und Back 2009) .....	13
<b>Tab. 2:</b>	Flüchtige Verbindungen in Hopfenöl.....	21
<b>Tab. 3:</b>	Sensorische Unterscheidbarkeit der untersuchten Hopfensorten.....	42
<b>Tab. 4:</b>	Gegenüberstellung von Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Hallertauer Hersbrucker (HHE) Slowenischer Golding (SLGO), und Yakima Cascade (YCA) (Ernte 2005), anhand von FD-Faktoren aromaaktiver Verbindungen .....	60
<b>Tab. 5:</b>	Jahrgangsabhängige Schwankungen im Aromastoffgehalt von Yakima Cascade (YCA), Hallertauer Smaragd (HSD), Hallertauer Perle (HPE), Slowenischer Golding (SLGO), Hallertauer Hersbrucker (HHE).....	93
<b>Tab. 6:</b>	Geruchsschwellenwerte quantifizierter Hopfenaromastoffe.....	114
<b>Tab. 7:</b>	Aromawerte quantifizierter Hopfenaromastoffe der Sorten Yakima Cascade, Hallertauer Smaragd, Hallertauer Perle, Slowenischer Golding, Hallertauer Hersbrucker (Hopfendosage je 3 g/L).....	114
<b>Tab. 8:</b>	Untersuchte Hopfensorten.....	119
<b>Tab. 9:</b>	Referenzaromastoffe .....	120
<b>Tab. 10:</b>	Isotopenmarkierte Standards.....	121
<b>Tab. 11:</b>	sonstige Reagenzien .....	122
<b>Tab. 12:</b>	Probemengen zur Quantifizierung der einzelnen Aromastoffe .....	130
<b>Tab. 13:</b>	Übersicht der verwendeten Erntejahrgänge und der darin quantifizierten Aromastoffe.....	131
<b>Tab. 14:</b>	Zur Quantifizierung ausgewählte Ionen (m/z) der Aromastoffe und ihrer internen Standards sowie deren Responsefaktoren (Rf) .....	143
<b>Tab. 15:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, Myrcen – $\alpha$ -Phellandren.....	164

---

<b>Tab. 16</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> -Octanal – Octanal.....	164
<b>Tab. 17:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, [5,6-d <sub>2</sub> ]- <i>(Z)</i> -1,5-Octadien-3-on) – <i>(Z)</i> -1,5-Octadien-3-on.....	164
<b>Tab. 18:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>4</sub> -Nonanal – Nonanal.....	164
<b>Tab. 19:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> -Linalool – Linalool .....	165
<b>Tab. 20:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> - <i>(E,E)</i> -2,4-Nonadienal – <i>(E,E)</i> -2,4-Nonadienal.....	165
<b>Tab. 21:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> -Buttersäure –Buttersäure .....	165
<b>Tab. 22:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> -Phenylacetaldehyd – Phenylacetaldehyd.....	165
<b>Tab. 23:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> -3-Methylbuttersäure – 3-Methylbuttersäure .....	166
<b>Tab. 24:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> - <i>(E,E)</i> -2,4-Nonadienal – <i>(E,E)</i> -2,4-Nonadienal.....	166
<b>Tab. 25:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> -Pentansäure – Pentansäure...	166
<b>Tab. 26:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> -Geraniol – Geraniol .....	166
<b>Tab. 27:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>10</sub> -4-Methyl- 4-sulfanylpentan-2-on – 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon .....	167
<b>Tab. 28:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, <sup>13</sup> C <sub>4</sub> -4-Methyl-4-sulfanyl- 2-pentanon –4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon.....	167
<b>Tab. 29:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> -Methional– Methional .....	167
<b>Tab. 30:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14 d <sub>2</sub> -3-Isobutyl-2-methoxypyrazin – 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin .....	167
<b>Tab. 31:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>2</sub> Sotolon – Sotolon .....	168
<b>Tab. 32:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>6</sub> -Phenol – Phenol .....	168
<b>Tab. 33:</b>	Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d <sub>3</sub> -Vanillin – Vanillin .....	168

### 7.3 Tabellenanhang

**Tabelle 15:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, Myrcen –  $\alpha$ -Phellandren.

Fläche (Myrcen)	Fläche ( $\alpha$ -Phellandren)	Verhältnis	Myrcen [ $\mu\text{g/mL}$ ]	$\alpha$ -Phellandren [ $\mu\text{g/mL}$ ]	RF	Mittelwert RF
12462920	14306900	1:1	2040	2057	0,88	
6331206	28038620	1:4	2040	8228	0,91	0,86
24635480	7825544	4:1	8160	2057	0,79	

**Tabelle 16:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14,  $d_2$ -Octanal – Octanal.

Fläche ( $d_{2-4}$ -Octanal) m/z 113-115	Fläche (Octanal) m/z 111	Verhältnis	$d_{2-4}$ -Octanal [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Octanal [ $\mu\text{g/mL}$ ]	RF	Mittelwert RF
2443	5443	1:1	5,8	12,7	1,02	
2354	13007	1:3	5,8	38,1	0,84	1,09
5734	4887	3:1	17,4	12,7	1,17	

**Tabelle 17:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14,  
[5,6- $d_2$ ]-( $Z$ )-1,5-Octadien-3-on – ( $Z$ )-1,5-Octadien-3-on

Fläche [5,6- $d_2$ ]-( $Z$ )-1,5- Octadien-3-on) m/z 127	Fläche ( $Z$ )-1,5-Octadien- 3-on m/z 125	Verhältnis	[5,6- $d_2$ ]-( $Z$ )-1,5- Octadien-3-on [ $\mu\text{g/mL}$ ]	( $Z$ )-1,5-Octadien- 3-on [ $\mu\text{g/mL}$ ]	RF	Mit- tel- wert RF
335888	164880	1:1	17,27	17,25	0,49	
231582	201427	1:2	17,27	34,50	0,44	0,48
421914	109192	2:1	34,54	17,25	0,52	

**Tabelle 18:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14,  $d_4$ -Nonanal – Nonanal

Fläche ( $d_4$ -Nonanal) m/z 147	Fläche (Nonanal) m/z 145	Verhältnis	$d_4$ -Nonanal [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Nonanal [ $\mu\text{g/mL}$ ]	RF	Mittelwert RF
16387	30782	1:1	2,91	10,4	0,53	
15623	79919	1:3	2,91	31,2	0,48	0,54
40002	28541	3:1	8,73	10,4	0,60	

**Tabelle 19:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d<sub>2</sub>-Linalool – Linalool

Fläche (d <sub>2</sub> - Linalool) m/z 139	Fläche (Linalool) m/z 137	Verhältnis	d <sub>2</sub> -Linalool [µg/mL]	Linalool [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
19478	19646	1:1	536	508	1,06	
16900	33735	1:2	536	1016	1,05	1,08
20976	11026	2:1	1072	508	1,11	

**Tabelle 20:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 66, d<sub>2</sub>-(E,Z)-2,6-Nonadienal – (E,Z)-2,6-Nonadienal

Fläche (d <sub>2</sub> - (E,Z)-2,6- Nonadienal) m/z 141	Fläche ((E,Z)-2,6- Nonadienal) m/z 139	Verhältnis	d <sub>2</sub> -(E,Z)-2,6- Nonadienal [µg/mL]	(E,Z)-2,6- Nonadienal [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
8782	9575	1:1	132	146	0,99	
8365	17417	1:2	132	292	0,94	0,99
16134	9242	2:1	264	146	1,04	

**Tabelle 21:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d<sub>2</sub>-Buttersäure –Buttersäure

Fläche (d <sub>2</sub> - Buttersäure) m/z 90 -91	Fläche (Buttersäure) m/z 89	Verhältnis	d <sub>2</sub> -Butter- säure [µg/mL]	Butter- säure [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
54317	61736	1:1	25	26	1,09	
16446	31738	1:2	25	52	0,93	1,05
31679	18632	2:1	50	26	1,13	

**Tabelle 22:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 50, d<sub>2</sub>-Phenylacetaldehyd – Phenylacetaldehyd

Fläche (d <sub>2</sub> - Phenyl- acetaldehyd) m/z 123	Fläche (Phenyl- acetaldehyd) m/z 121	Verhältnis	d <sub>2</sub> -Phenyl- acetaldehyd [µg/mL]	Phenyl- acetaldehyd [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
145793	96360	1:1	1120	1114	0,66	
355666	437649	1:2	1120	2228	0,62	0,63
561224	170154	2:1	2240	1114	0,61	

**Tabelle 23:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 53, d<sub>2</sub>-3-Methylbuttersäure – 3-Methylbuttersäure

Fläche (d <sub>2</sub> - 3-Methyl- buttersäure) m/z/ 105	Fläche (3-Methyl- buttersäure) m/z 103	Verhältnis	d <sub>2</sub> -3-Methyl- buttersäure [µg/mL]	3-Methyl- buttersäure [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
17896	19092	1:1	70,3	67,3	1,11	
18333	35694	1:2	70,3	134,6	1,02	1,09
37349	20152	2:1	140,6	67,3	1,13	

**Tabelle 24:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 56, d<sub>2</sub>-(E,E)-2,4-Nonadienal – (E,E)-2,4-Nonadienal

Fläche (d <sub>2</sub> - (E,E)-2,4- Nonadienal) m/z 141	Fläche (E,E)-2,4- Nonadienal) m/z 139	Verhältnis	d <sub>2</sub> -(E,E)-2,4- Nonadienal [µg/mL]	(E,E)-2,4- Nonadienal [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
148581	105563	1:1	132,1	137	0,69	
140644	192300	1:2	132,1	274	0,66	0,69
233753	87401	2:1	264,2	137	0,72	

**Tabelle 25:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 59a, d<sub>2</sub>-Pentansäure –Pentansäure

Fläche (d <sub>2</sub> - Pentansäure) m/z 106	Fläche (Pentansäure) m/z 103	Verhältnis	d <sub>2</sub> -Pentansäure [µg/mL]	Pentansäure [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
13736	12092	1:1	572	510	0,99	
15649	42849	1:3	572	1530	1,02	1,03
45737	15406	3:1	1716	510	1,07	

**Tabelle 26:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 61, d<sub>2</sub>-Geraniol – Geraniol

Fläche (d <sub>2</sub> - Geraniol) m/z 139	Fläche (Geraniol) m/z 137	Verhältnis	d <sub>2</sub> -Geraniol [µg/mL]	Geraniol [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
15849	15293	1:1	127	134	0,91	
9123	16531	1:2	127	268	0,86	0,91
24659	12423	2:1	254	134	0,95	

**Tabelle 27:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d<sub>10</sub>-4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on – 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon;

Fläche d <sub>10</sub> -4-Methyl-4- sulfanyl-2- pentanon m/z 143	Fläche (4-Methyl-4- sulfanyl-2- pentanon) m/z 133	Fläche d <sub>10</sub> -4- Methyl-4- sulfanyl-2- pentanon	d <sub>10</sub> -4-Methyl- 4-sulfanyl-2- pentanon [µg/mL]	4-Methyl-4- sulfanyl-2- pentanon [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
60733	18287	3:1	153	67,9	1,47	
29430	39523	1:1	51	67,9	0,99	1,097
12698	61041	1:3	51	203,7	0,83	

**Tabelle 28:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon – 4-Methyl-4-sulfanyl-2-pentanon

Fläche ( <sup>13</sup> C <sub>4</sub> - 4-Methyl- 4-sulfanyl-2- pentanon) m/z 103	Fläche (4-Methyl-4- sulfanyl-2- pentanon) m/z 99	Verhältnis	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -4-Methyl- 4-sulfanyl-2- pentanon [µg/mL]	4-Methyl-4- sulfanyl-2- pentanon [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
379119	368022	1:1	62,8	57	1,07	
146626	281017	1:2	62,8	114	1,06	1,03
119121	56871	2:1	125,6	62,8	0,95	

**Tabelle 29:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d<sub>2</sub>-Methional – Methional

Fläche d <sub>2</sub> -Methional m/z 170	Fläche Methional m/z 168	Verhältnis	d <sub>2</sub> -Methional [µg/mL]	Methional [µg/mL]	RF	Mittel wert RF
166541	86287	2:1	320,6	157	1,06	
139393	126357	1:1	160,3	157	0,93	0,95
81975	140275	1:2	160,3	314	0,87	

**Tabelle 30:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14 d<sub>2</sub>-3-Isobutyl-2-methoxypyrazin – 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin

Fläche d <sub>2</sub> -3-Isobutyl-2- methoxy-pyrazin m/z 170	Fläche 3-Isobutyl-2- methoxy-pyrazin m/z 168	Verhältnis	d <sub>2</sub> -3-Isobutyl-2- methoxypyrazin [µg/mL]	3-Isobutyl-2- methoxypyrazin [µg/mL]	RF	Mittel- wert RF
238565	109115	2:1	315,6	160	0,90	
103132	157438	1:2	157,8	320	0,75	0,84
241918	107840	2:1	315,6	160	0,88	

**Tabelle 31:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d<sub>2</sub> Sotolon– Sotolon

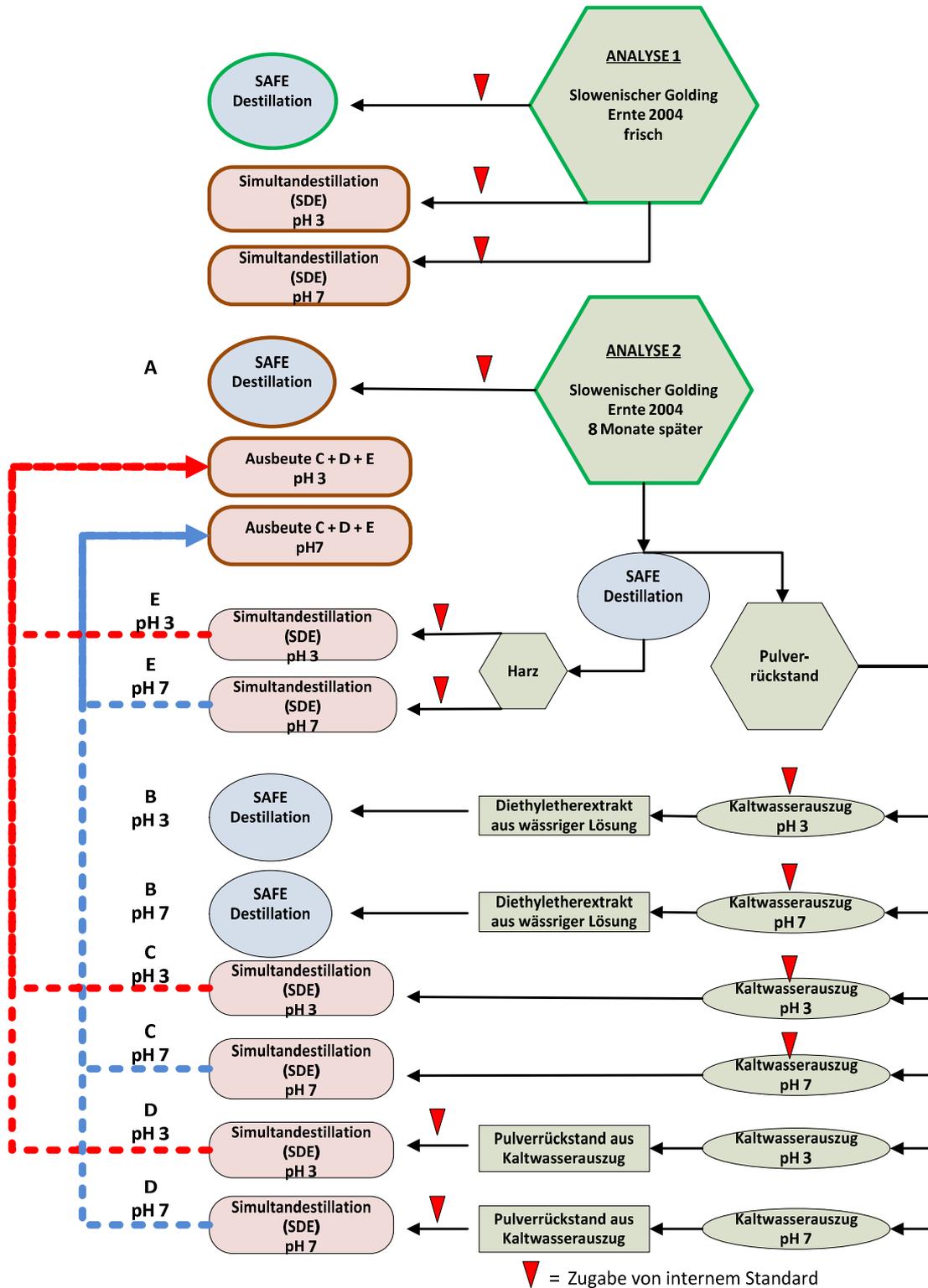
Fläche d <sub>2</sub> -Sotolon m/z 131	Fläche Sotolon m/z 129	Verhältnis	d <sub>2</sub> -Sotolon [µg/mL]	Sotolon [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
568727	783830	1:2	274	538	0,70	
453668	327056	1:1	274	269	0,73	0,71
559439	191350	2:1	548	269	0,70	

**Tabelle 32:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d<sub>6</sub>-Phenol – Phenol

Fläche (d <sub>6</sub> - Phenol) m/z 99-101	Fläche (Phenol) m/z 95	Verhältnis	d <sub>6</sub> -Phenol [µg/mL]	Phenol [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
197602	197833	1:1	1291	1291	1,00	
133104	266154	1:2	1291	2582	1,00	1,01
231104	118194	2:1	2582	1291	1,02	

**Tabelle 33:** Responsefaktor (RF) zu Tabelle 14, d<sub>3</sub>-Vanillin – Vanillin

Fläche (d <sub>3</sub> - Vanillin) m/z 156	Fläche (Vanillin) m/z 153	Verhältnis	d <sub>3</sub> -Vanillin [µg/mL]	Vanillin [µg/mL]	RF	Mittelwert RF
317656	572249	1:2	132,2	264	0,90	
145696	133712	1:1	132,2	132	0,92	0,92
63391	29549	2:1	264,4	132	0,93	

7.4 **Abbildungsanhang**

**Abb. 41:** Versuchsschema zur Freisetzung von Geraniol und Linalool aus Hopfen der Sorte Slowenischer Golding Ernte 2004 durch SAFE und Simultandestillation bei unterschiedlichen pH-Werten.

**Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Promotion vorgelegten Arbeit mit dem Titel:

**„Charakterisierung qualitativer und quantitativer Unterschiede in wertgebenden Geruchsstoffen verschiedener Hopfenspezies“**

in den Laboren der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie unter Anleitung und Betreuung durch Herrn Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß §4 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

(x) Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

( ) Die vollständige Dissertation wurde in .....veröffentlicht. Die Fakultät für ..... hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.

(x) Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

( ) Ich habe bereits am ..... bei der Fakultät für ..... der Hochschule ..... unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema ..... die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis.....

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

Landshut, den 08.12.2012

Wolfgang P. Wilhelm

---

## Werdegang

**Name:** Wolfgang Peter Wilhelm  
**Geburtsdatum:** 15.12.1967, Lindenberg im Allgäu

### Ausbildung und Berufserfahrung

1974 - 1978	Grundschule Lindenberg
1978 - 1986	Gymnasium Lindenberg
1986 - 1988	Bodenseegymnasium Lindau
1988 - 1989	Bundeswehr Kempten im Allgäu Wehrdienst im 3. Gebirgsartilleriebataillon 81 (3. Geb. Art. Batl. 81), 1. Richtkanonier auf Haubitze M110
1990 - 1990	Meckatzer Löwenbräu, Benedikt Weiss KG, Heimenkirch Praktikum
1990 - 1996	TU München-Weihenstephan Fakultät für Brauwesen und Getränketechnologie Studium der Brau- und Getränketechnologie
1997 - 1998	Meckatzer Löwenbräu, Benedikt Weiss KG, Heimenkirch Zeitlich befristet tätig als Fassabfüller.
1998 - 2001	Frucade GmbH, Rosenheim Technische Anwendungsberatung
2001 - 2002	Esarom Ges.m.b.H, Oberrohrbach bei Wien Vertrieb und technische Anwendungsberatung
2003 - 2006	Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle
seit 2007 -	KRONES AG, Neutraubling Verfahrensingenieur

Landshut, den 08.12.2012

Wolfgang P. Wilhelm