



BERICHT

zu Forschungsvorhaben

B 84

Projekt-Nr.

Abschlussbericht

Thema:

Epoxyfettsäuren und Epoxycarbonyl in Gerste und Malz – Analytik, Abbau durch Hefe und Malz sowie Charakterisierung neuer Zwischenprodukte als Markersubstanzen

Forschungsstelle

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB)

Forschungsinstitut für Chemisch-technische Analyse, Prof. Dr. R. Tressl

Seestrasse 13, D-13353 Berlin

Leiter der Forschungsstelle

Dipl.-Kfm. E. Weinmann

Projektleiter:

Prof. Dr. Roland Tressl / Prof. Dr. Leif-A. Garbe

Verfasser des Berichtes: Prof. Dr. Leif-A. Garbe

Datum: 15. September 2009

Bitte Inhaltsübersicht beifügen

I

INHALT

1	Teil I - Epoxyfettsäuren.....	3
1.1	Einleitung Epoxysäuren.....	3
2	Ergebnisse Synthesen Epoxysäuren.....	4
3	Teil II – Epoxydecenale	13
3.1	Einleitung Epoxydecenale	13
3.1.1	Synthese	17
3.1.2	Bieranalysen und Alterungsexperimente	25
3.1.3	Ergebnisse Bieranalysen Epoxycarbonyle.....	31
4	Zusammenfassung	33
4.1	Ausblick.....	33
5	Abbildungsverzeichnis.....	34
6	Tabellenverzeichnis.....	36

1 TEIL I - EPOXYFETTSÄUREN

1.1 EINLEITUNG EPOXYSÄUREN

Epoxyfettsäuren entstehen aus ungesättigten Fettsäuren und oxidierenden Agenzien, wie zum Beispiel Hydroperoxiden, Wasserstoffperoxid oder auch enzymatisch (s. Abb. 1).

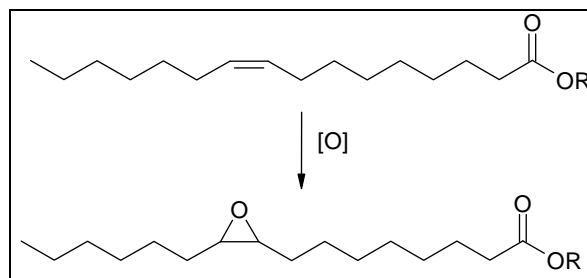


Abb. 1 Bildung von Epoxyfettsäuren aus ungesättigten Fettsäuren

Diese Prozesse laufen in der Gerste, beim Mälzen und beim Maischen ab. Die Epoxysäuren werden anschließend von der Hefe während der Gärung metabolisiert. Die Untersuchung dieses Metabolismus war Gegenstand des Forschungsvorhabens.

Zunächst war es erforderlich, durch chemische Darstellung (Synthese) von isotope markierten Vorstufen die Voraussetzung zu schaffen, sich vom endogenen Stoffwechsel der Hefe abzuheben. Sofern eine isotope markierte Vorstufe abgebaut wird, tragen auch die Metabolite die Isotope markierung und belegen so, dass sie aus der Vorstufe stammen. Als geeignete Markierung hat sich im Falle der Epoxysäuren eine O-18 Markierung der Epoxid-Gruppe erwiesen. Der Sauerstoff O-18 weist zwei Neutronen mehr im Atomkern auf und ist somit um zwei Massen (amu, atomic mass units) schwerer als das Sauerstoffisotop O-16 das mit 99,762 % in der Atmosphäre vorkommt. O-18 kommt mit nur 0,2 % atmosphärisch vor und lässt sich leicht vom O-16 Isotop mittels Massenspektrometrie unterscheiden.

Im Folgenden soll insbesondere auf den Metabolismus des chemischen Syntheseproduktes *erythro*-[9,10-¹⁸O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester eingegangen werden.

2 ERGEBNISSE SYNTHESSEN EPOXYSÄUREN

In den Abbildungen 2-4 sind die Elektronenstoß-Massenspektren (EI-MS) der synthetisierten Epoxysäuren dargestellt, die für Metabolismusuntersuchungen in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* Rh) genutzt wurden.

In der Natur treten überwiegend *cis*- ungesättigte Fettsäuren auf. Die Epoxidierung dieser *cis*-Fettsäuren liefert im allg. *cis*- oder *erythro*-Epoxide.

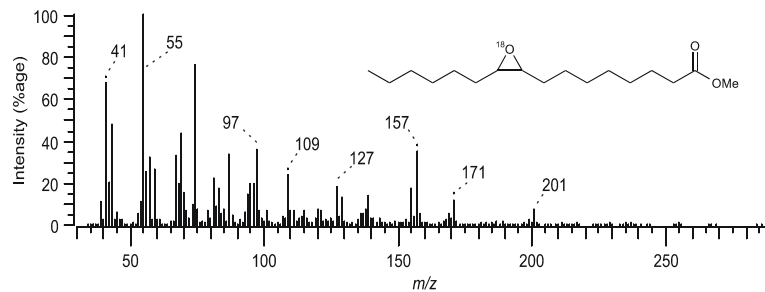


Abb. 2 EI-MS-Spektrum von *erythro*-[9,10- ^{18}O]-9,10-Epoxyhexadecansäuremethylester

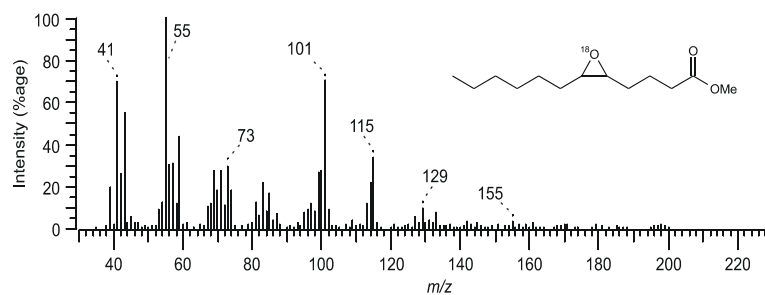


Abb. 3 EI-MS-Spektrum von *erythro*-[9,10- ^{18}O]-9,10-Epoxydodecansäuremethylester

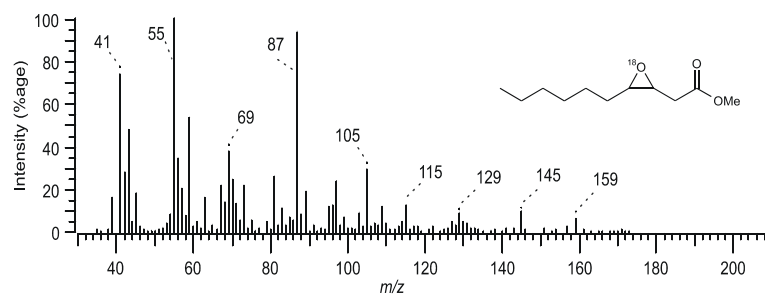


Abb. 4 EI-MS-Spektrum von *erythro*-[9,10- ^{18}O]-9,10-Epoxydecanoic acid methyl ester

Abb. 5 zeigt die postulierten Fragmentierungsmuster der Epoxysäuremethylester.

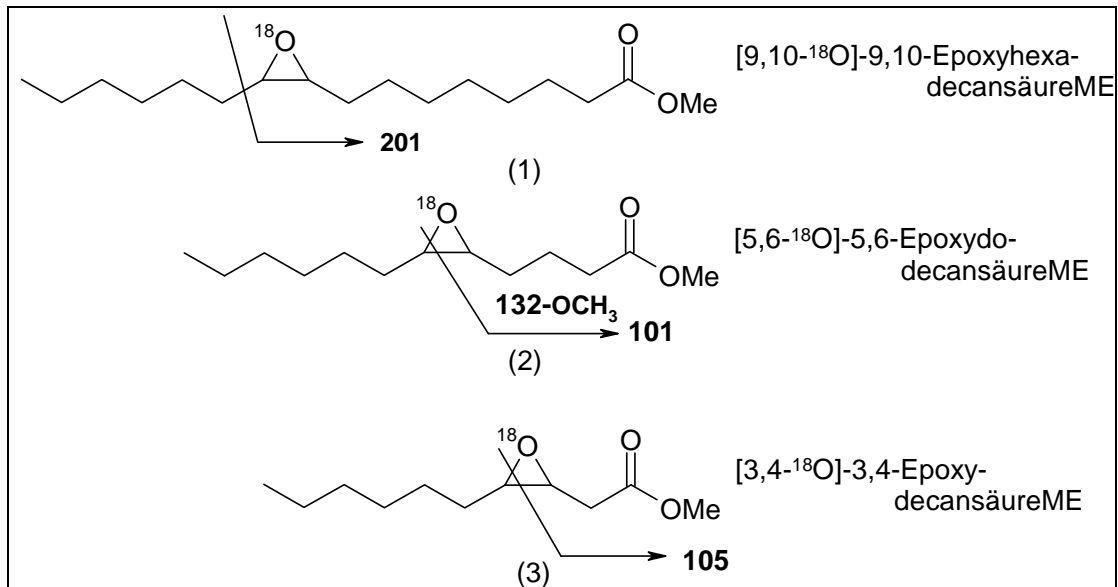


Abb. 5 postuliertes Fragmentierungsmuster der Epoxysäuremethylester

Die Inkubation der Epoxysäuren in Hefe zeigte, dass Hefe im Gegensatz zu Pflanzen Epoxide kaum direkt zu Diolen hydrolysiert. Vielmehr werden die Epoxide durch β -Oxidation kettenverkürzt und vor allem auf der Stufe 5,6-Epoxy- bzw. 3,4-Epoxy-Säure hydrolysiert. In Abb. 6 ist der mögliche Metabolismus der Epoxysäuren in Hefen und die Bildung entsprechender Dihydroxysäuren und (Hydroxy)-Lactone gezeigt.

In Tabelle 1 sind die Gehalte an Metaboliten gezeigt, die nach Inkubation von 150 ppm O-18 markierter *erythro*-9,10-Epoxyhexadecansäure in Abhängigkeit von der Inkubationszeit auftraten.

Die Tabelle 2 zeigt die Verteilung der Isotopomeren der entsprechenden Metabolite, d.h. die Position der O-18 Markierung nach Inkubation des markierten Edukts in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Tabelle 3 zeigt die Verteilung der enantiomeren Hydroxylactone und weiterer ungewöhnlicher Metabolite der entsprechenden Inkubation.

Schließlich zeigen die Tabelle 4 und Tabelle 5 die Verteilung der Enantiomeren und Isotopomeren des γ -Decalactons bzw. die des 3-Hydroxy- γ -decalactons, welche bei der

Inkubation von *erythro*-[9,10-¹⁸O]-9,10-Epoxyhexadecansäure-ethylester in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Rh) ebenfalls entstanden sind.

Aus diesen Daten lässt sich ein Metabolismusschema von *erythro*-[9,10-¹⁸O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester postulieren, wie es in Abb. 6 (nach Spaltung des Esters) gezeigt ist.

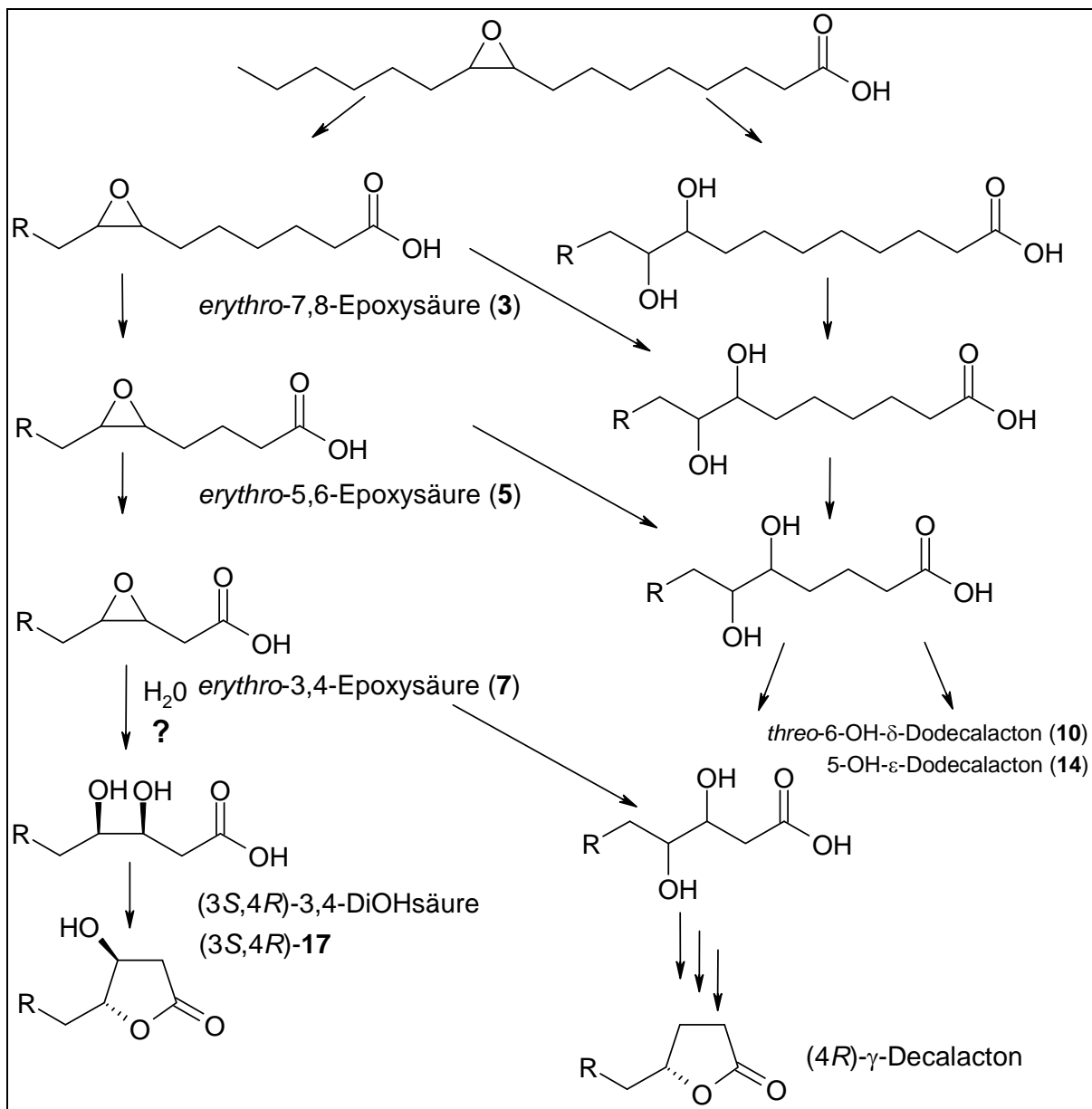


Abb. 6: Postulierter Metabolismus von *cis*- bzw. *erythro*-Epoxy säuren in Hefen zu Dihydroxysäuren, Hydroxylactonen und Lactonen

Substrat: <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-EpoxyhexadecansäureEE						
Produkt (Konz./Markierung)	Zeit [h]					
	26	45	79	121	146	240
Substrat						
Konzentration (ppm)	61,2	6,3	0	0	0	0
Metabolite						
γ -Decalacton (9)	0,6	6,2	26,4	38,2	34,2	38,6
<i>threo</i> -6-OH- δ -Dodecalacton (10)	2,0	3,4	5,9	4,9	3,9	4,9
<i>erythro</i> -3-OH- γ -Decalacton (12)	0	1,1	1,9	0,7	0,3	2
5,6-EpoxydodecansäureME (5)	0,9	3,2	0,2	0	0	n.d.
3,4-EpoxydecansäureME (7)	0	1	1,2	1,8	1,4	n.d.
4-OxodecansäureME (26)	0	0	0,3	0,5	0,2	n.d.
4-OH-DecansäureME (27)	0,7	4,6	5,5	3,9	2,9	n.d.
2-OH-OctansäureME (28)	0	0,8	1,3	1,6	1,3	n.d.

Tabelle 1 Inkubation von *erythro*-[9,10-¹⁸O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung von entsprechenden Metaboliten.

Metabolite	Zeit [h]			
	45	79	45	79
	¹⁸ O-Inkorporation (%)		Konzentration (ppm)	
Edukt (<i>m/z</i> 157) (1b)	59	n.d.	n.d.	n.d.
Edukt (<i>m/z</i> 201) (1b)	69	n.d.	n.d.	n.d.
[5- ¹⁸ O]-5,6-DiOH-DodecansäureME (<i>m/z</i> 205) (16)	n.d.	13	n.d.	1,4
[6- ¹⁸ O]-5,6-DiOH-DodecansäureME (<i>m/z</i> 189) (16)	n.d.	68	n.d.	1,4
[5- ¹⁸ O]- <i>threo</i> -6-OH- δ -Dodecalacton (<i>m/z</i> 174) (10)	6	6	0,9	7,4
[6- ¹⁸ O]- <i>threo</i> -6-OH- δ -Dodecalacton (<i>m/z</i> 189) (10)	76	76	1,2	7,4
[5- ¹⁸ O]-5-OH- ϵ -Dodecalacton (<i>m/z</i> 118) (14)	18	19	0,78	11
[6- ¹⁸ O]-5-OH- ϵ -Dodecalacton (<i>m/z</i> 203) (14)	78	77	6,4	11
[3- ¹⁸ O]- <i>erythro</i> -3-OH- γ -Decalacton (<i>m/z</i> 118) (12)	7	7	0,8	5,5
[4- ¹⁸ O]- <i>erythro</i> -3-OH- γ -Decalacton (<i>m/z</i> 189) (12)	79	79	2,1	5,5
[3- ¹⁸ O]- <i>threo</i> -3-OH- γ -Decalacton (<i>m/z</i> 118) (13)	n.d.	11	0,1	0,2
[3- ¹⁸ O]- <i>threo</i> -3,4-DiOH-DecansäureME (<i>m/z</i> 250) (18)	10	n.d.	n.d.	n.d.
[4- ¹⁸ O]- <i>threo</i> -3,4-DiOH-DecansäureME (<i>m/z</i> 189) (18)	71	n.d.	n.d.	n.d.
[3- ¹⁸ O]- <i>erythro</i> -3,4-DiOH-DecansäureME (<i>m/z</i> 250) (17)	18	10	0,82	0,1
[4- ¹⁸ O]- <i>erythro</i> -3,4-DiOH-DecansäureME (<i>m/z</i> 189) (17)	79	79	0,9	0,1
2-OH-OctansäureME (<i>m/z</i> 189) (28)	51	47	0,8	1,3

Tabelle 2: Inkubation von *erythro*-[9,10-¹⁸O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe *S. cerevisiae* (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung einzelner Isomere und Isotopomere.

Substrat: <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-EpoxyhexadecansäureEE						
Produkt (Konz./Markierung)	Zeit [h]					
	26	45	79	121	146	166
Metabolite (ppm)						
(4 <i>R</i>)- γ -Decalacton (9)	0,2	1,9	12,2	30,6	24,6	17,2
(4 <i>S</i>)- γ -Decalacton (9)	0,2	1,7	5,4	10,6	9,4	6,8
(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-3-OH- γ -Decalacton (12)	0	0	6,1	3,9	2,3	6,9
(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-3-OH- γ -Decalacton (12)	0	0	0,3	0	0	0,1
(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-3-OH- γ -Decalacton (13)	0	0	1,1	0	0	0,4
(5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-OH- δ -Dodecalacton (10)	1,5	6,3	8,4	13,4	10	8,1
(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-OH- δ -Dodecalacton (10)	0,1	5,2	7,8	11,2	9,6	8,7
5-Hexyltetrahydrofuran-2yl-CH ₂ COOME (19)	0	0,1	0,4	0,7	0,7	0,5
5-Hexyltetrahydrofuran-2yl-CH ₂ COOME (20)	0		0,4	1,3	1,8	0,6
3,4-DiOH-DecansäureME I	0	0,6	0	0	0	0
3,4-DiOH-DecansäureME II	0	0,3	0	0	0	0
4-OH-DecansäureME (27)	0,7	4,6	5,5	3,9	2,9	2,3
(2 <i>R</i>)-2-OH-OctansäureME (28)	0	0,8	1,3	1,6	1,3	1,3

Tabelle 3: Inkubation von *erythro*-[9,10-¹⁸O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe *S. cerevisiae* (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung von Enantiomeren des γ -Decalactons, von Hydroxylactonen und der 2-Hydroxyoctansäure sowie neuer Metabolite (Furansäuren).

Substrat: erythro -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-EpoxyhexadecansäureEE						
	Zeit [h]					
	26	45	79	121	146	166
Enantiomerenverteilung (unmarkiert) (%)						
(4R)- γ -Decalacton (%)	55	55	78	82,5	81,5	80
(4S)- γ -Decalacton (%)	45	45	21	17,5	18,5	20
ee (R) (%)	10	10	57	65	63	60
Enantiomerenverteilung (¹⁸ O-markiert) (%)						
(4R)- γ -Decalacton (%)	51	51	63	67	69	65
(4S)- γ -Decalacton (%)	49	49	37	33	31	35
ee (R) (%)	2	2	26	34	38	30

Tabelle 4: Inkubation von *erythro*-[9,10-¹⁸O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe *S. cerevisiae* (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung von Enantiomeren des γ -Decalactons (O-18 markiert und unmarkiert).

Substrat: erythro -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-EpoxyhexadecansäureEE						
	Zeit [h]					
	26	45	69	121	146	166
¹⁸ O-Inkorporation (%)						
<i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-EpoxyhexadecansäureEE <i>m/z</i> 201	75	79	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
[4- ¹⁸ O]-(3S,4R)-3-OH- γ -Decalacton <i>m/z</i> 117	60	60	68	65	64	68
[4- ¹⁸ O]-(4R)- γ -Decalacton <i>m/z</i> 87	75	45	62	61	66	60
[4- ¹⁸ O]-(4S)- γ -Decalacton <i>m/z</i> 87	77	49	77	78	80	77

Tabelle 5 Tabelle: Inkubation von *erythro*-[9,10-¹⁸O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe *S. cerevisiae* (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung von Enantiomeren und Isotopomeren des γ -Decalactons sowie des 3-Hydroxy- γ -decalactons.

Weitere Arbeiten zum Metabolismus der Epoxysäuren lieferten Daten aus dem Abbau der entsprechend *trans*- bzw. *threo*-konfigurierten Epoxysäuren. Dabei traten ebenfalls Dihydroxysäuren, Hydroxylactone, Lactone etc. auf. Allerdings waren die Enantiomeren und Isotopomeren des γ -Decalactons im Vergleich zur Inkubation der *cis*- bzw. *erythro*-Epoxysäuren verschoben. Da den *trans*- bzw. *threo*-Epoxysäuren in der Natur weniger

Bedeutung zukommt, wird auf diese Arbeiten nicht näher eingegangen. Zur Veranschaulichung des Abbaus sind in Abb. 7 und Abb. 8 die möglichen Stoffwechselwege postuliert.

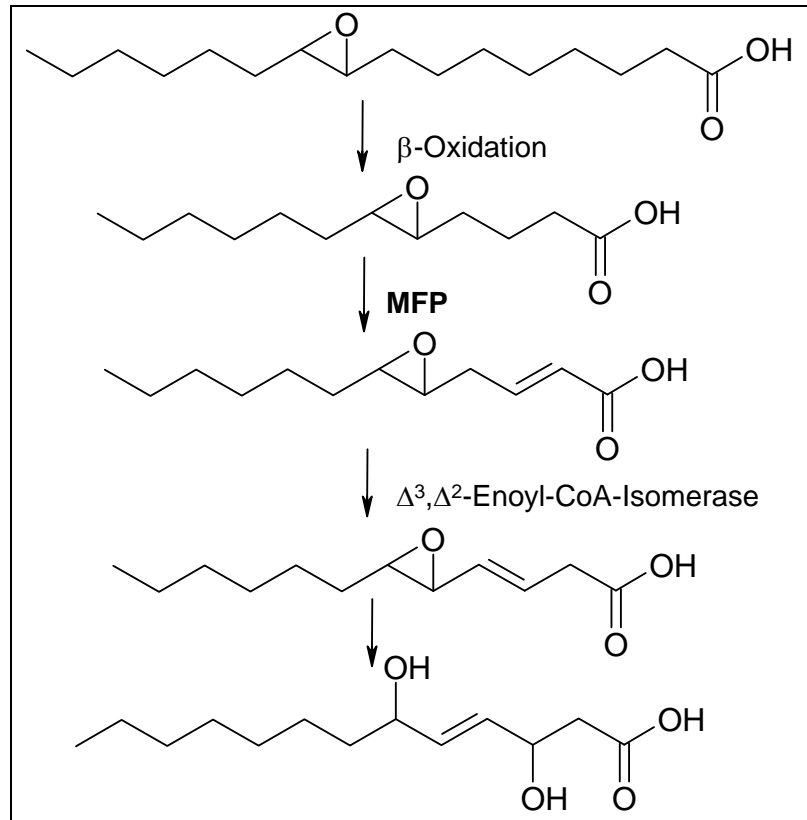


Abb. 7: Postulierter Metabolismus von *trans*- bzw. *threo*-Epoxy Säuren in Hefen

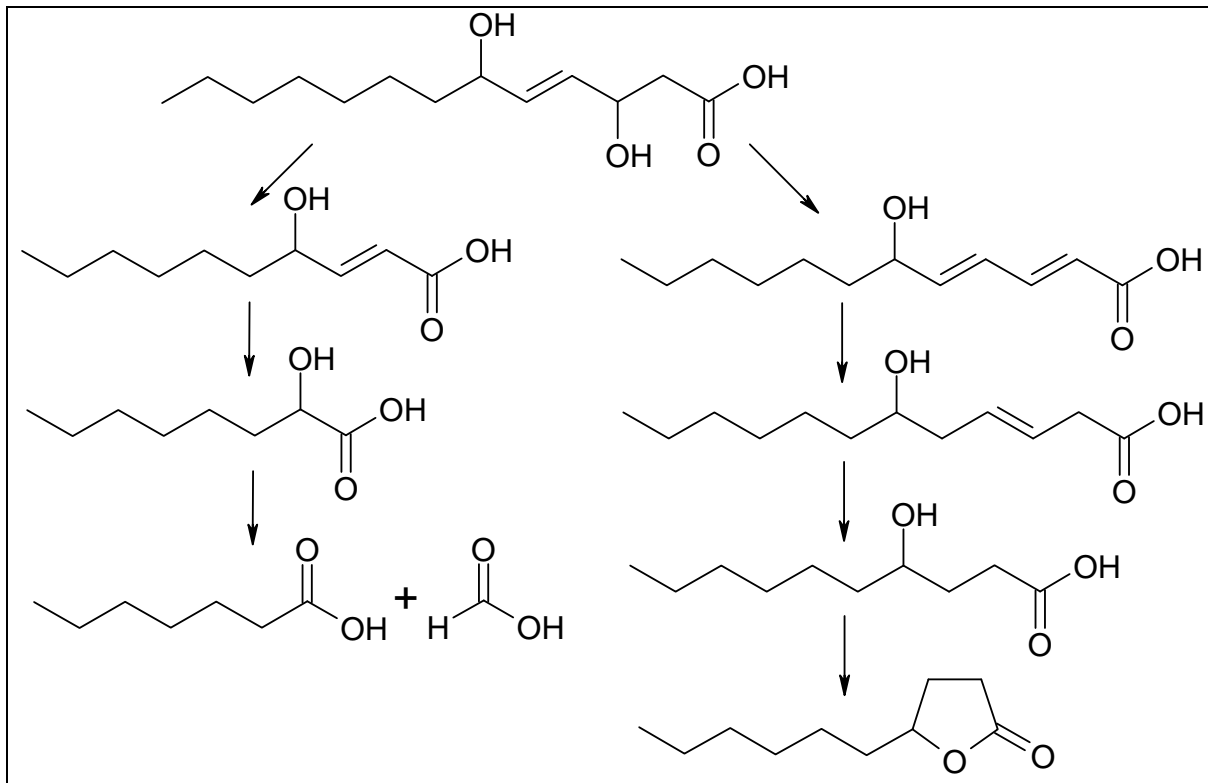


Abb. 8: Postulierter Metabolismus von *trans*- bzw. *threo*-Epoxyssäuren in Hefen zum γ -Decalacton

3 TEIL II – EPOXYDECENALE

3.1 EINLEITUNG EPOXYDECENALE

Epoxyde entstehen ubiquitär während enzymatischer und nichtenzymatischer Abbauvorgänge von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Sie sind eine reaktive Spezies und können verschiedene Folgereaktionen durchlaufen. Dabei entstehen wiederum reaktive Produkte wie die Aldehyde 3Z- bzw. 2E-Nonenal, 4-Hydroxy-2E-nonenal, 4-Oxo-2E-nonenal oder auch ungesättigte Epoxycarbonyle, wie das hochreaktive 4Z- und 4E-Epoxy-2E-decenal (Abb. 9).

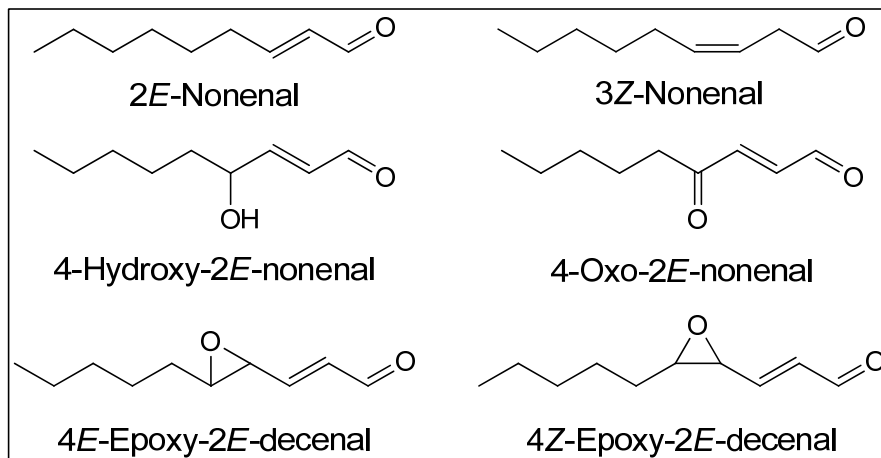


Abb. 9: Sechs Beispiele von Abbauprodukten ungesättigter Fettsäuren

Dabei sind diese Carbonyle (Aldehyde) Aromakomponenten. Sie entstehen bei Kontakt von ungesättigten Fettsäuren mit Sauerstoff oder Katalysatoren, wie eisenhaltige Moleküle (Hämoglobin, Cytochrome, Myoglobin,...). Sie stellen wichtige Botenstoffe in Signalkaskaden von Pflanzen und tierischen Zellen dar, die im Falle von Verletzungen durch Fressfeinde (Sauerstoff kann nun leicht in den Organismus eindringen) Duftstoffe freisetzen, die dann zu Reaktionen in benachbarten Organellen (Blätter, Stängel) führen (Initiierung von Stoffwechselwegen). Charakteristisch sind die typisch „grünen“ Gerüche von Aldehyden nach frisch gemähtem Gras oder Gurke (3Z-Hexenal, 2E,6Z-Nonadienal) die typische Hinweise auf oxidativen Stress für Pflanzen sind. Auf der anderen Seite dienen diese Stoffe zur Abwehr von Infektionen durch eindringende Krankheitserreger. Abb. 10 zeigt einen

Stoffwechselweg für die Linolsäure, in dessen Verlauf es zur Bildung aromaaktiver Substanzen kommt.

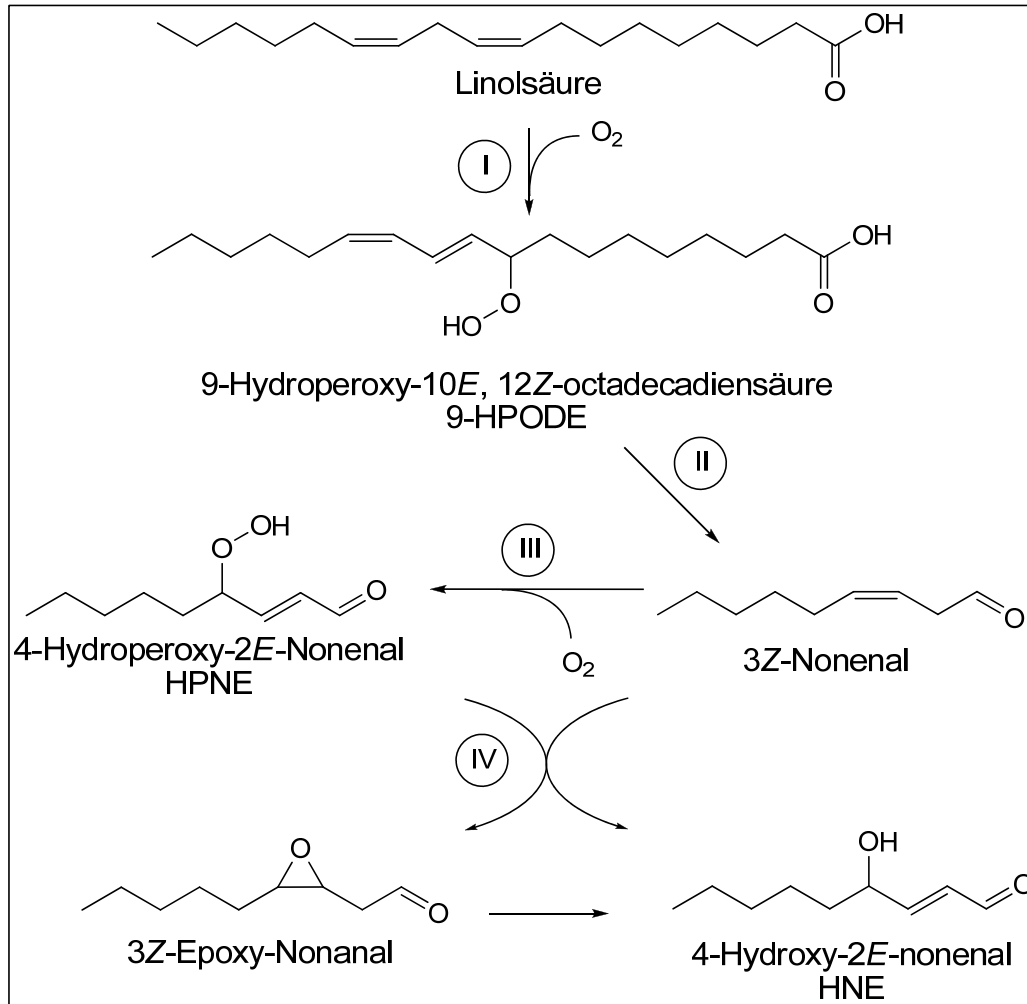


Abb. 10: Oxidativer Linolsäurestoffwechsel I-Lipoygenase, II-Hydroperoxidlyase, III-3Z-Alkenaloxxygenase, IV-Epoxygenase

Beispielhaft hierfür ist der Leukotrien-Pathway der tierischen Zelle, bei dem aus der Arachidonsäure (4-fach ungesättigt) durch Lipoygenase Leukotrien A_4 (LTA_4) entsteht. Dieses kann dann zu LTB_4 und LTC_4 metabolisiert werden, die eine Entzündungsantwort z.B. im menschlichen Körper auslösen. Ähnliche Vorgänge sind aus pflanzlichen Zellen bekannt (Jasmonatstoffwechsel).

Zum anderen sind die oben gezeigten Stoffe als Elektrophile sehr reaktiv und können so innerhalb der Zelle durch Reaktionen an nukleophilen Proteinen und auch an DNA zu irreparablen Schäden führen. Daher werden Zellen, in denen diese Stoffe entstehen,

versuchen, diese Stoffe ins umgebende Medium abzugeben oder sie zu entgiften, beispielsweise über die Öffnung der Epoxide oder Reduktion der Doppelbindung.

Gerade die ungesättigten Epoxy-carbonyl sind sehr reaktiv und können über nucleophile Angriffe an Seitenketten von z. B. Proteinen fixiert werden (Abb. 11).

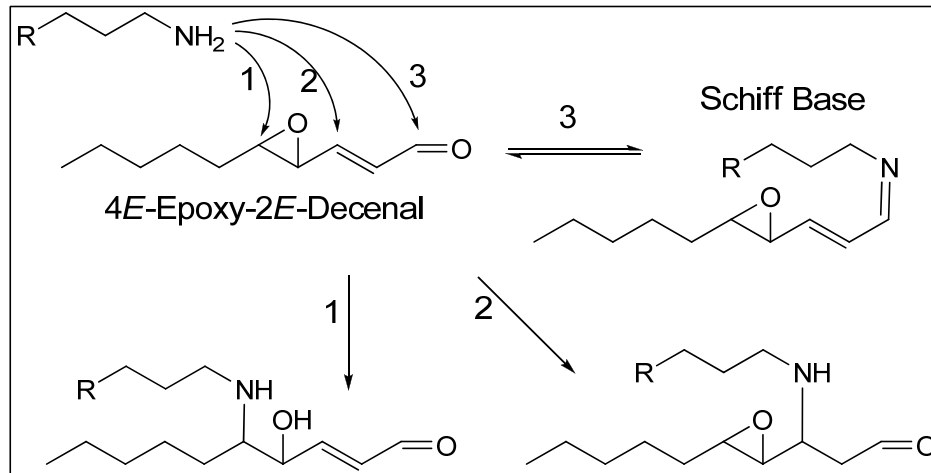


Abb. 11: Nucleophile Reaktionsmöglichkeiten ungesättigter Epoxy-carbonyl am Beispiel einer Lysin-Seitenkette (R=Protein-Lysin)

Carbonyl können als Schiff-Base an Aminogruppen binden (Nr. 3 in Abb. 11) und so ins Bier transportiert und dort freigesetzt werden. Ungesättigte Epoxy-carbonyl können zusätzlich zu Schiff-Basen auch noch Michaeladdukte (Nr. 2 in Abb. 11) und Reaktionsprodukte aus der Öffnung des Epoxidringes (Nr. 1 in Abb. 11) bilden. Dabei ist die Bildung von Michaeladdukten aufgrund der elektronischen Gegebenheiten in ungesättigten Epoxy-carbonylen erleichtert.

Insbesondere die 4,5-Epoxy-2E-decenale sind äußerst potente Aromakomponenten. Die beiden möglichen Isomere, *Z*- und *E*-Epoxid, unterscheiden sich in ihren Aroma-Eigenschaften, wobei das *E*-Epoxid einen typisch metallischen Geschmackseindruck hervorruft, das *Z*-Epoxid jedoch eine eher malzige Note besitzt. Für das 4E-Epoxy-2E-decenal ist ein extrem niedriger Schwellenwert von 15×10^{-4} ng/L (Luft) berichtet. Diese Epoxydecenale werden aus den Hydroperoxiden der Linolsäure in Hefen während des Maischvorganges gebildet (Abb. 12).

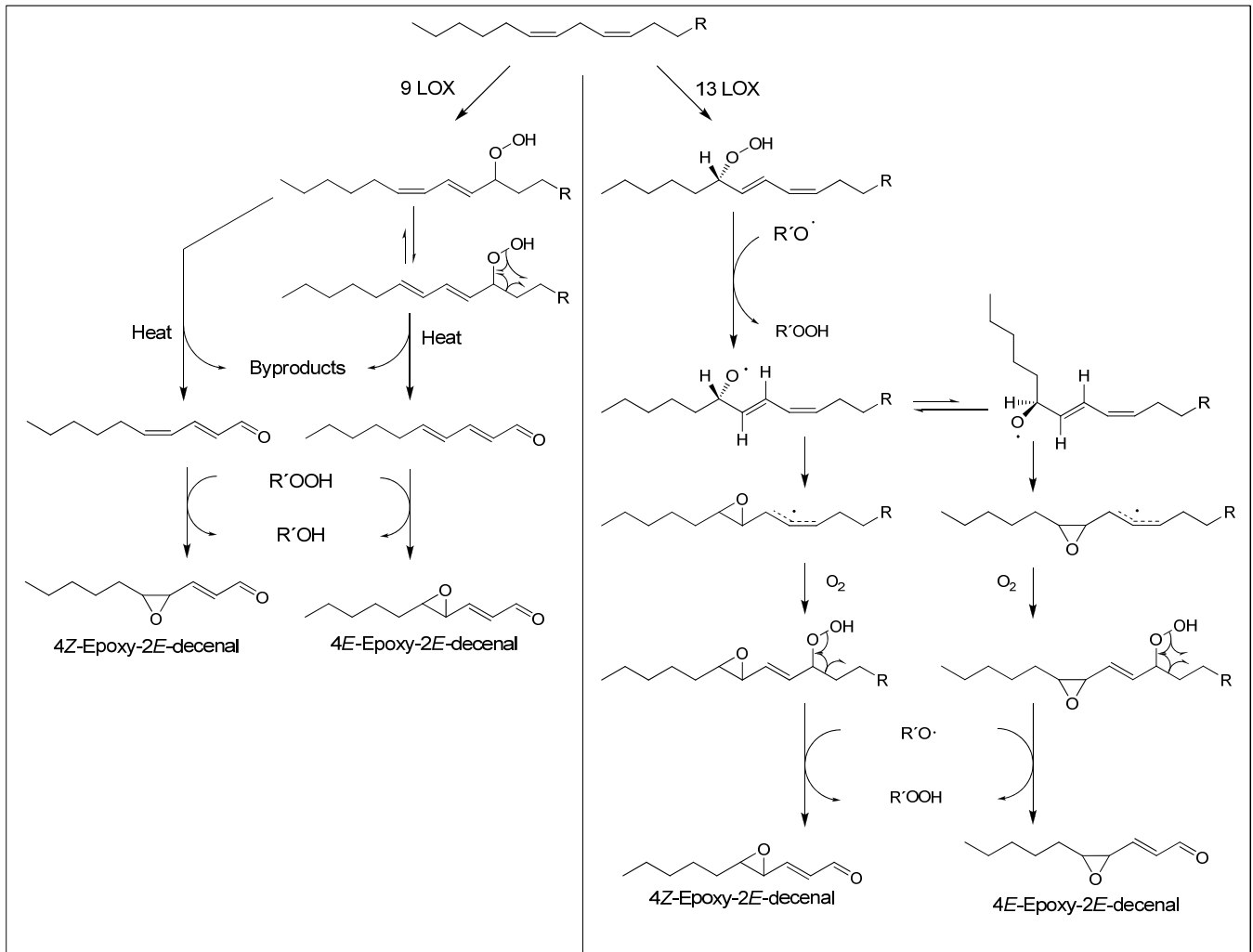


Abb. 12 Entstehung der Epoxydecenale aus Linolsäure (LOX = Lipoxygenase)

Andererseits ist auch ein rein chemischer Abbauweg unabhängig von Enzymen möglich (Abb. 13). Diese Art der Bildung der Epoxydecenale legt einen Zusammenhang zwischen dem Alter einer Bierprobe und der Konzentration an Epoxydecenalen und damit der Beeinträchtigung des Geschmacks über einen bestimmten Zeitraum nahe.

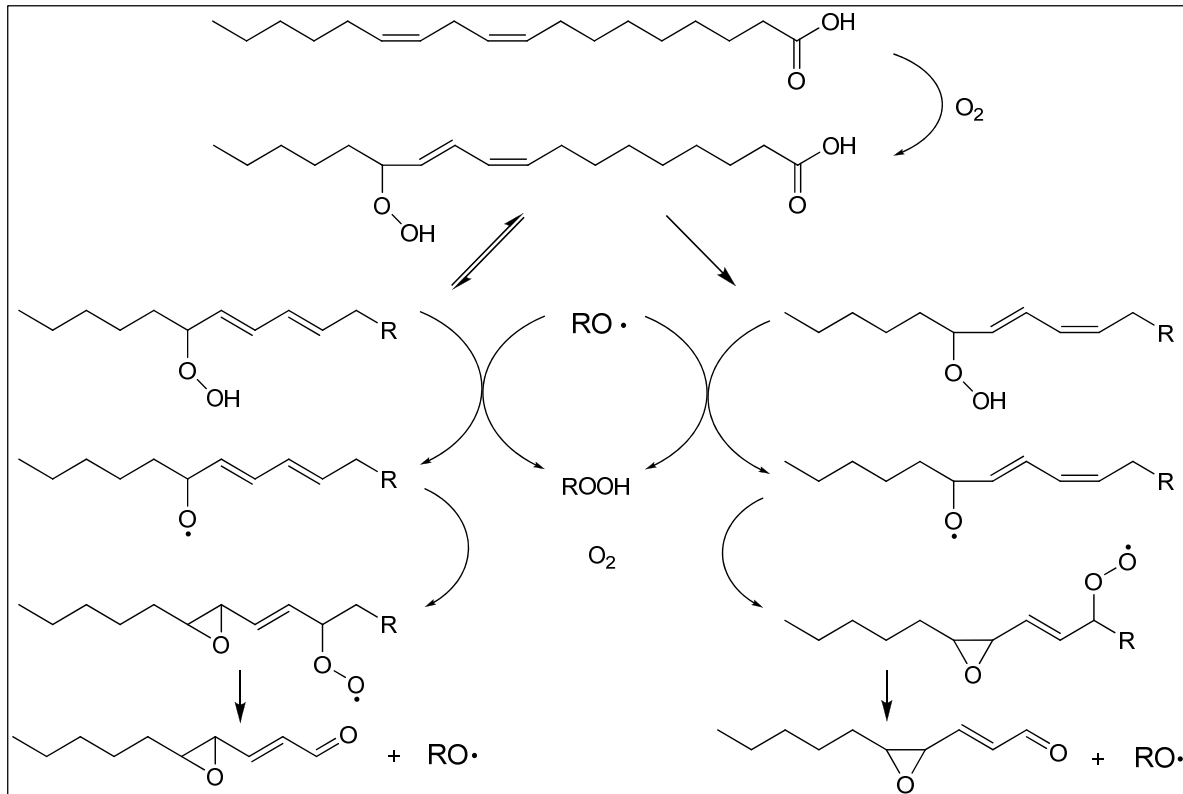


Abb. 13: Chemischer Abbauweg der Linolsäure zu den Epoxydecenalen

3.1.1 SYNTHESE

Um diese Zusammenhänge nachvollziehen zu können, ist es nötig, diese beiden Spezies in chemisch reiner Form vorliegen zu haben. Um deren Reaktionsverhalten zu charakterisieren ist das Einbringen geeigneter Isotopenmarkierungen erforderlich. Um die Aromaeigenschaften untersuchen zu können, sind unmarkierte Standards synthetisiert und mittels GC-O untersucht worden. Über das Einbringen einer ^{13}C -Markierung an geeigneter Stelle im Molekül kann mit ^{13}C -NMR-Experimenten der Reaktionsmechanismus aufgeklärt werden. Mit dem Einbringen von 2H -Markierungen an verschiedenen Stellen des Moleküls, können dann mit GC-MS-Methoden über geeignete Fragmente Quantifizierungen vorgenommen werden.

Dabei ist es wichtig, dass das Analytmolekül geeignete Fragmentierungsreaktionen durchläuft. So muss sich das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Fragment-Ionen des markierten Standards hinreichend von dem des unmarkierten Analyten unterscheiden, d.h., die beiden Fragmente sollten möglichst keine oder wenig Satellitenpeaks zeigen. Wobei sich

dies nicht immer berücksichtigen lässt, da der natürliche Anteil des ^{13}C -Isotops 1,1% beträgt. Damit ergibt sich in jedem Falle eine Peakschar M+1, M+2, M+3 usw., wobei je nach Anzahl der Kohlenstoffatome in der Verbindung die Isotopenpeaks den Molpeak überragen können. Dies ist ab 90 Kohlenstoffatomen für M+1 der Fall: Aus der binomischen Formel

$$(^{12}\text{C}+^{13}\text{C})^n$$

mit n =Anzahl der Kohlenstoffatome, ^{12}C =relativer natürlicher Isotopenanteil des ^{12}C -Isotopes und ^{13}C =relativer natürlicher Isotopenanteil des ^{13}C -Isotopes ergibt sich für $n > 90$ ein relativer Anteil des ^{12}C -Peaks von $< 50\%$. Sind noch andere Elemente im Molekül vorhanden, so überlagern sich ihre Isotopenanteile entsprechend.

Daher ist es für die Detektion eines Analytmoleküls Peaks wichtig Signale mit genügend hoher Intensität und im umliegenden Bereich M-2 bis M+2 möglichst schwach ausgeprägten Begleitpeaks auszuwählen.

Die Massenspektren des unmarkierten, des 1- ^{13}C - und des 1,4,5- ^2H -4*E,Z*-Epoxydecanals legen die Vermutung nahe, dass sich die EI-MS Fragmente m/z 70, 71 und 72, die als die prominenten Peaks auftreten (siehe Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16), durch den letzten Syntheseschritt, der Desaturierung, durch Verlust zweier Wasserstoffatome als Fragmente mit den m/z-Verhältnissen 68, 69 und 70 nachweisen lassen.

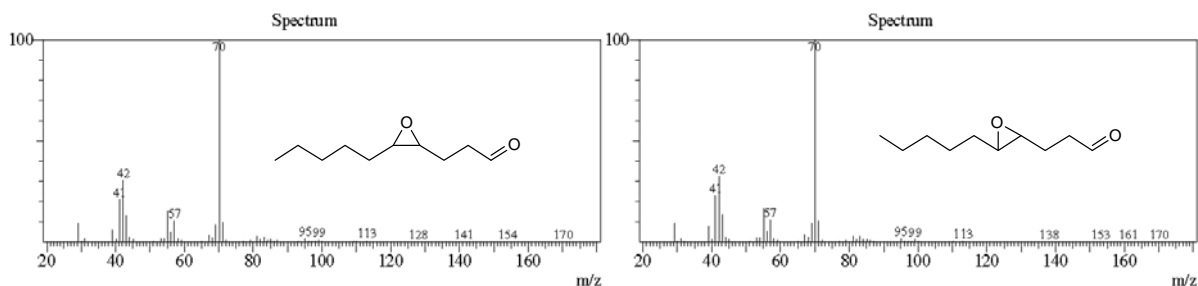


Abb. 14: Massenspektren des 4*Z*- (links) und 4*E*-Epoxydecanals

Das Fragment mit der Masse 70 wird entsprechend Abb. 17 gebildet. Auf dem gleichen Weg werden diese Fragmente auch bei den isotopenmarkierten Spezies gebildet. Dieser Fragmentierungsweg gilt gleichermaßen für die *Z*- und *E*-Isomere.

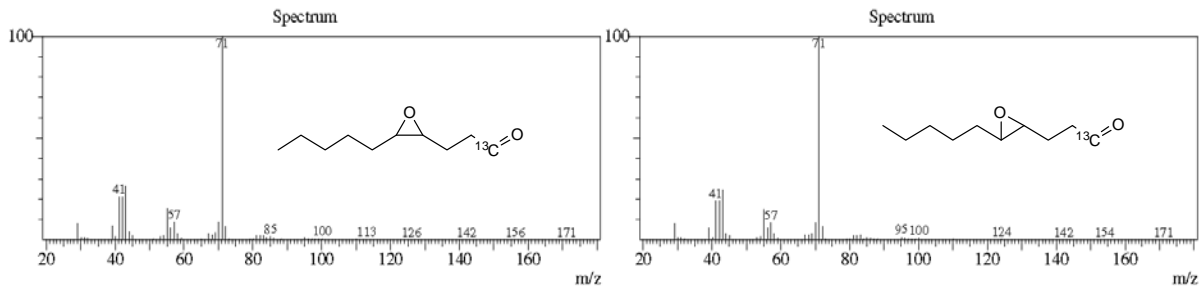


Abb. 15: Massenspektren des 1-¹³C-4Z- (links) und 1-¹³C-4-E-Epoxydecanals

Man erkennt in Abb. 15 gut die um 1 amu (atomic mass unit = Masseneinheit) höhere Masse des Hauptfragmentes, was darauf schließen lässt, dass es die ¹³C-Markierung trägt. Wenn die so ist, dann muss das Massenspektrum des dreifach deuterierten Decanals das Hauptfragment mit der Masse 72 bilden. Obwohl dreifach markiert, erhält man ein nur um 2 amu schwereres Fragment, da sich das dritte Deuteriumatom am 5. Kohlenstoffatom befindet, das, wie in Abb. 17 zu sehen, nicht in dem Fragment m/z 72 enthalten ist.

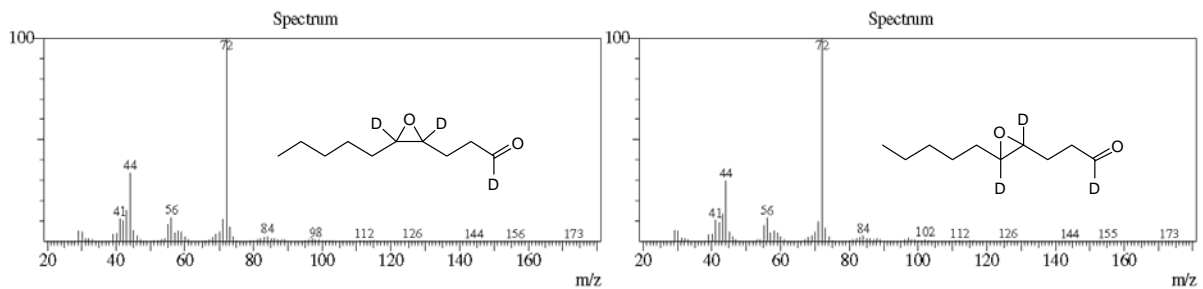


Abb. 16: Massenspektren des 1,4,5-²H-4Z (links) und 1,4,5-²H-4E-Epoxydecanals

Es zeigt sich, dass die Annahmen hinsichtlich der Markierungen des Hauptfragmentes zutreffend sind.

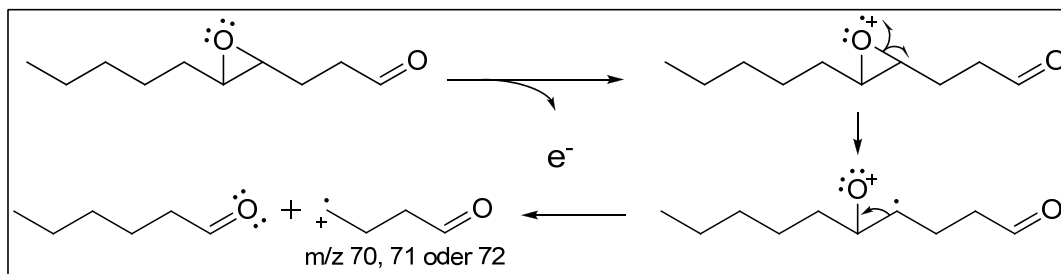


Abb. 17: Fragmentierungsreaktion der Epoxydecanale zum Hauptfragment mit m/z 70, 71 oder 72, je nach Markierung

Da die Desaturierung zwar unter sehr milden Bedingungen stattfindet, allerdings Wasser freigesetzt wird und die Reaktionsdauer mit 36-40h relativ lang ist, war zunächst unklar, ob die Epoxidfunktion diese Prozedur ohne Zersetzung überstehen würde und ihre Konfiguration erhalten bleibt. Epoxide können im wässrigen Medium zu den Diolen hydrolysiert werden, zumal die ebenfalls entstehende Iodosobenzooesäure säurekatalytisch wirksam werden kann. (Zum Reaktionsmechanismus siehe Abb. 18.)

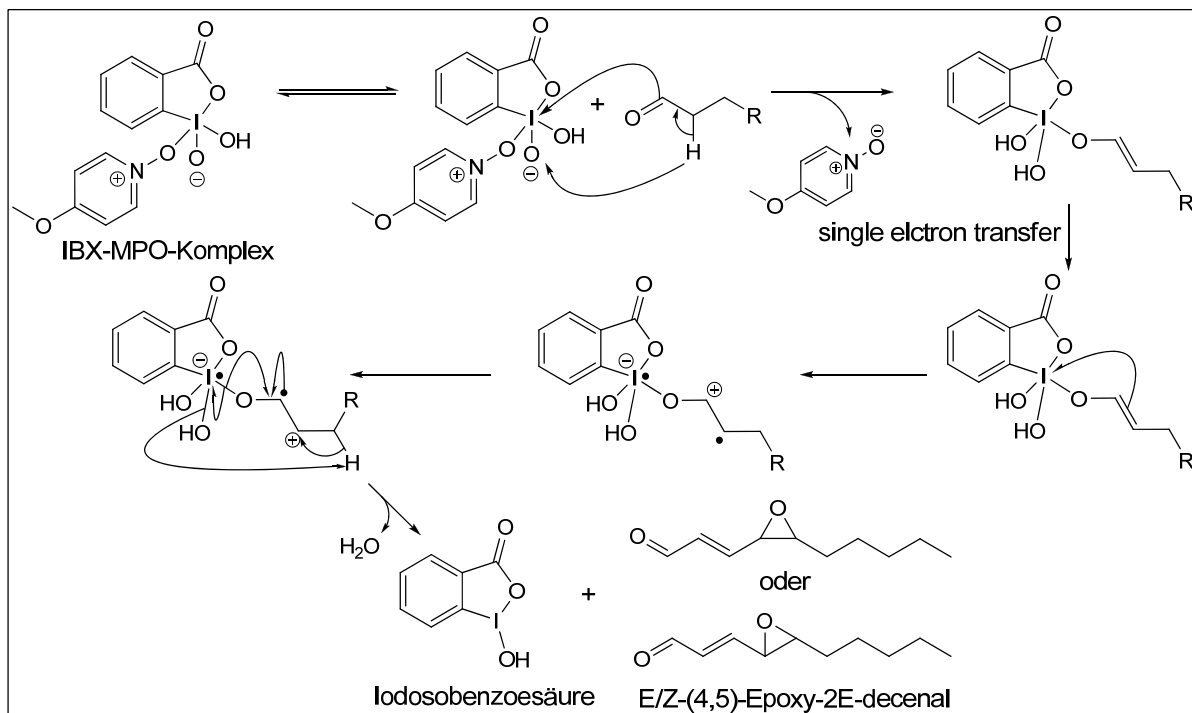


Abb. 18: Reaktionsweg der Desaturierung mit dem IBX-MPO-Komplex

Wie sich herausstellte, läuft die Desaturierung ab, ohne das Epoxid zu öffnen oder die Konfiguration zu ändern. Dabei wurde das Epoxydecanal zu 75-85% umgesetzt. Durch chromatographische Trennung kann die Ausgangsverbindung Epoxydecanal abgetrennt und weiterverwendet werden, so dass die isopenmarkierten Vorstufen nicht verloren gehen. Wie man der Abb. 19 entnehmen kann, eluieren das Reaktionsprodukt und der Ausgangsstoff in der GC zeitlich sehr nahe beieinander (bei 11,106 und 11,358 Minuten).

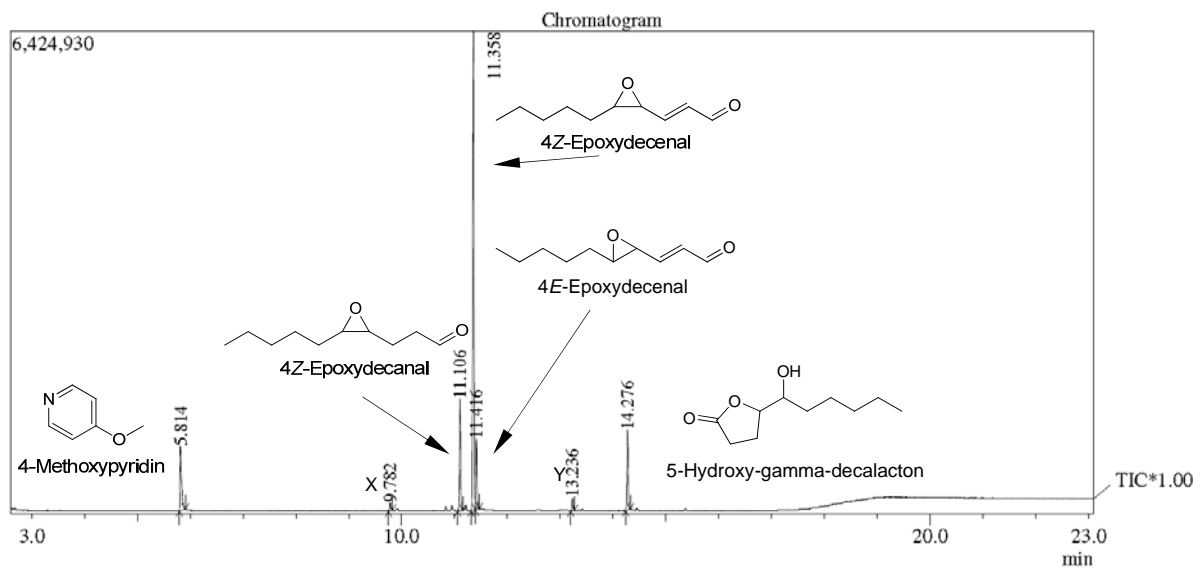


Abb. 19 Chromatogramm der aufgearbeiteten Desaturierung

Das 4-Methoxypyridin bei 5,814 min entsteht während der Aufarbeitung aus dem 4-Methoxypyridin-N-oxyd (siehe Abb. 18). Das 5-Hydroxy- γ -decalacton entsteht während der Desaturierung durch Zyklisierung der Epoxysäure (siehe Abb. 20). Dies geschieht allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß, als bei der Epoxidierung.

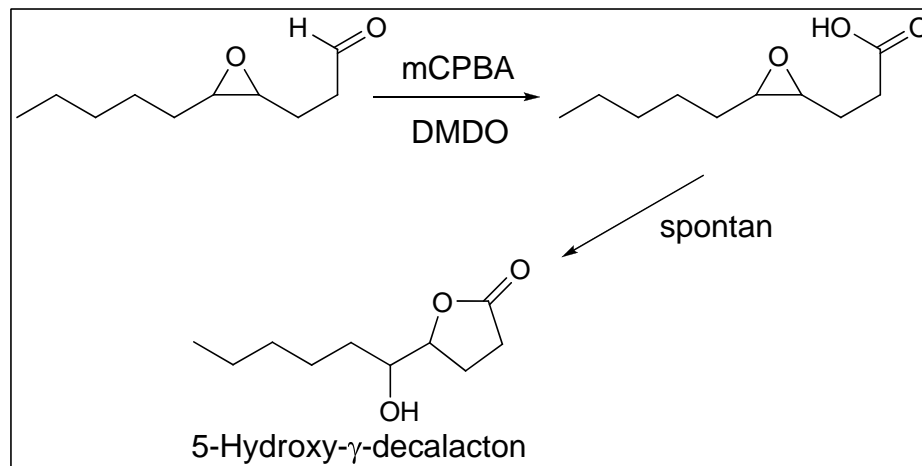


Abb. 20: Lactonisierung zum 5-Hydroxy- γ -decalacton während der Epoxidierung mit meta-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) oder Dimethyldioxiran (DMDO)

Diese Reaktion lief bei der Epoxidierung z.T. so stark ab, dass unter ungünstigen Bedingungen 50-60% des Lactons (5-Hydroxy- γ -decalacton) entstanden. Dieses Problem ließ sich nicht bewältigen und trat mit allen bekannten Epoxidierungsmethoden auf. Diese Nebenreaktion ist auf die Reaktivität der Carbonylfunktion zurückzuführen. Sie ist leicht

durch Oxydantien, wie das DMDO und oder mCPBA, zu der entsprechenden Säure oxidierbar, was dann zu der Zyklisierung führt. Die standardmäßig verwendete Methode mit meta-Chlorperbenzoesäure führt zur Bildung von meta-Chlorbenzoesäure, die oxidierend wirkt. Daher wurde eine andere Methode der Epoxidierung, die ohne Persäuren funktioniert etabliert (Abb. 21). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sich das Decenal sowie das Epoxydecenal in der organischen Phase aufhalten, während das eigentliche Oxidans, das Kaliumpersulfat, in der wässrigen Phase gelöst vorliegt. Das *in situ* gebildete Dimethyldioxiran ist phasengängig und epoxidiert dann in der organischen Phase das Decenal.

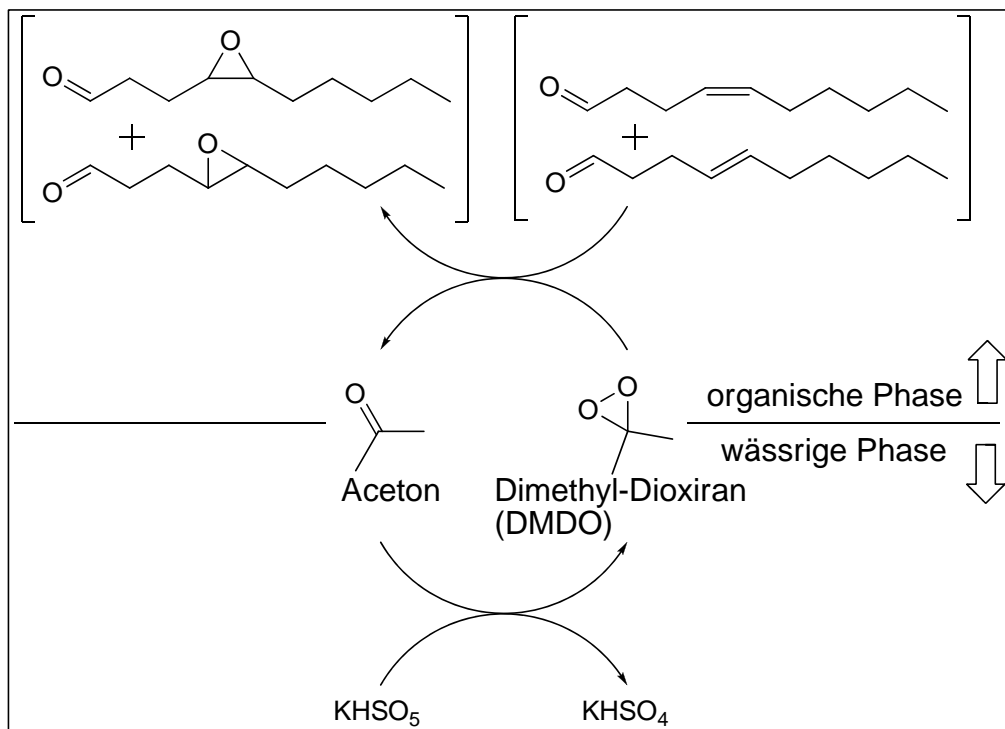


Abb. 21: Reaktionsschema der Epoxidierung mit DMDO

Da jedoch das DMDO ebenfalls oxidierende Eigenschaften besitzt, findet auch hier eine Oxidation und Zyklisierung statt.

Die in Abb. 19 sichtbaren Produkte X und Y (bei 9,782 und 13,236 min) konnten nicht zugeordnet werden, da Y jedoch unabhängig von der Markierung immer identische Spektren hatte, ist anzunehmen, dass es nicht aus dem Epoxydecenal entsteht, sondern es sich um ein Neben- oder Abbauproduktprodukt aus den übrigen Reaktanden handelt.

Die dicht beieinander liegenden Retentionszeiten in der GC der Epoxydecanale bzw. -decanale von 0,3 s Differenz (wobei das Decanal vor dem Decenal eluiert, siehe Abb. 19) ließ eine Aufreinigung mittels Adsorptionschromatographie zunächst schwierig erscheinen. Eine Kombination von Petroleumbenzin und Ethylacetat im Verhältnis 6:1 brachte jedoch eine sehr gute und schnelle Trennung (siehe Abb. 22).

Interessanter Weise eluierten die Epoxydecanale bei der Adsorptionschromatographie vor den Epoxydecanalen. Das war so nicht zu erwarten, da diese Art der Trennung auf unterschiedlichen Polaritäten beruht, wobei polare Substanzen stärker vom polaren Kieselgel zurückgehalten werden als unpolare, während das Trennprinzip bei der Gaschromatographie an unpolaren bis mittelpolaren Phasen (die hier benutzte Rxi 5-ms gehört zu den schwach polaren Phasen) überwiegend auf unterschiedlichen Siedetemperaturen beruht. Der Einfluss der Polarität ist zwar vorhanden, bei diesen Analytmolekülen spielt er jedoch nur eine untergeordnete Rolle.

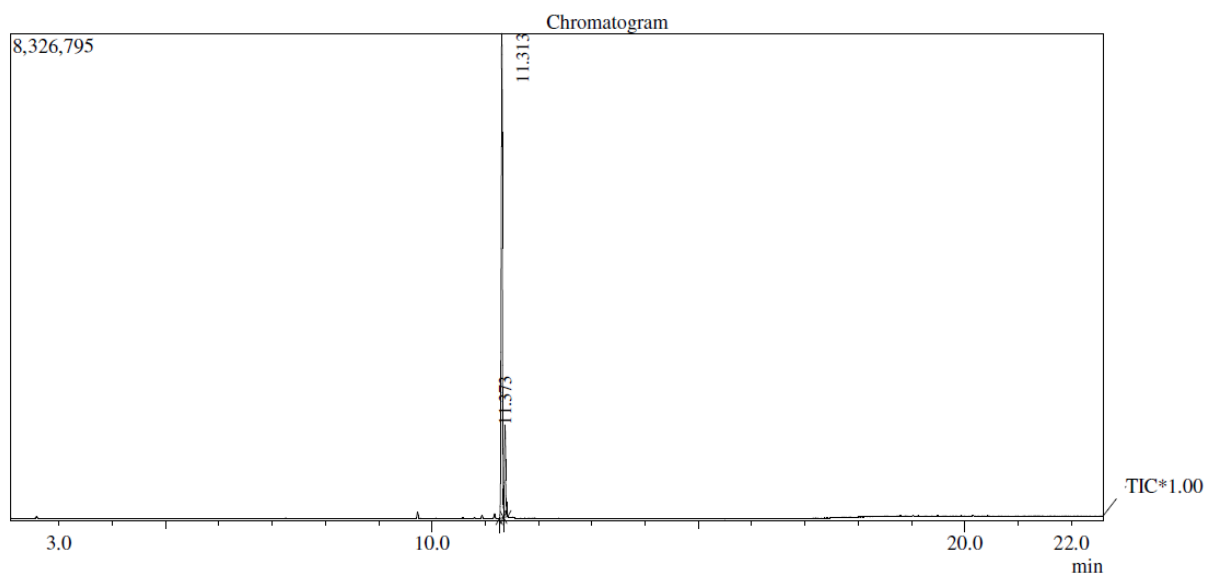


Abb. 22 GC- Chromatogramm des 4Z-Epoxydecanals nach chromatographischer Aufreinigung

Um eine möglichst exakte und empfindliche Quantifizierung durchzuführen, bietet sich die Isotopenverdünnungsanalyse (SIDA von: Stable Isotope Dilution Assay) an, bei der die zu untersuchende Probe mit einem isotopenmarkierten Standard bekannter Konzentration versetzt wird. Dieser Standard zeigt nahezu identische chemische und physikalische Eigenschaften und verhält sich während der Aufarbeitung genau so, wie der Analyt. Deshalb kann man über die in der Analyse wiedergefundenen Menge Standard und die bekannte

zugesetzte Menge am Anfang, die in der Probe vorhandene Menge des Analyten bestimmen.

Durch das identische Verhalten beider Isotopomere können die Verluste während der Extraktion vernachlässigt werden, da der Isotopenstandard gleichermaßen betroffen ist. Dadurch erhält man ein exaktes Ergebnis bei der Quantifizierung.

Diese Art der Analyse ist ausschließlich mit massenspektrometrischen Methoden möglich, da nur hierbei die unterschiedlichen Massen der Isotopomere erfasst werden können. Dabei benutzt man den SIM-Modus (Single Ion Monitoring), bei dem über die Messzeit nur einzelne Ionen detektiert werden. Da der Detektor pro Zeitintervall nicht alle ankommenden Ionenmassen scannt, sondern eben nur diese wenigen, vorher bestimmten, werden in diesem Zeitintervall auch mehr Fragmente dieser Ionenmasse erfasst und es resultiert daraus eine erhöhte Empfindlichkeit. Für eine Maximierung der Empfindlichkeit, ist es deshalb günstig, wenn das Analytmolekül bevorzugt ein bestimmtes Fragment bildet. Scannt man im SIM-Modus nach diesem Fragment, so ist die Intensität höher, je höher der Anteil dieses Fragmentes am Massenspektrum des Moleküls ist. Bildet nämlich ein Molekül lediglich ein Hauptfragment, so ist die Intensität dieses Peaks im SIM-Modus doppelt so hoch, als würde noch ein zweites Fragment mit gleicher Häufigkeit gebildet.

In Abb. 14 bis Abb. 16 kann man die Spektren der verschiedenen markierten und unmarkierten Epoxydecanale nachvollziehen. Sie bilden bevorzugt die Fragmente m/z 70, 71 und 72 (siehe auch Abb. 17). Nach Möglichkeit sollte dieses Fragmentierungsverhalten durch das Einführen der Doppelbindung nicht verändert werden, um Fragmente mit den Massen 68, 69 und 70 zu erhalten.

Dies wurde erreicht, siehe Abb. 23. - Abb. 25.

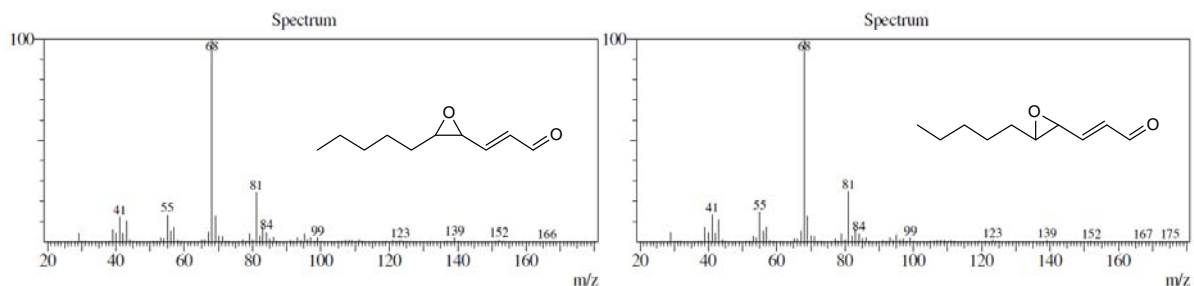


Abb. 23: Massenspektren der unmarkierten Epoxydecanale

Das mit Abstand am häufigsten gebildete und damit intensivste Fragment ist m/z 68, was der Fragmentierungsreaktion wie sie in Abb. 17 zu sehen ist entspricht, allerdings mit der Doppelbindung zwischen dem 2. und 3. Kohlenstoffatom. Daher ist dieses Fragment um 2 amu leichter. Analog gilt dies für die markierten Spezies.

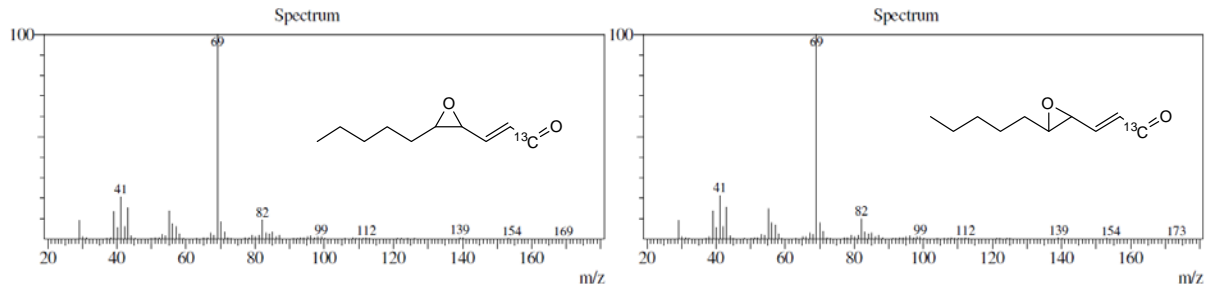


Abb. 24: Massenspektrum der ^{13}C -markierten Epoxydecenale

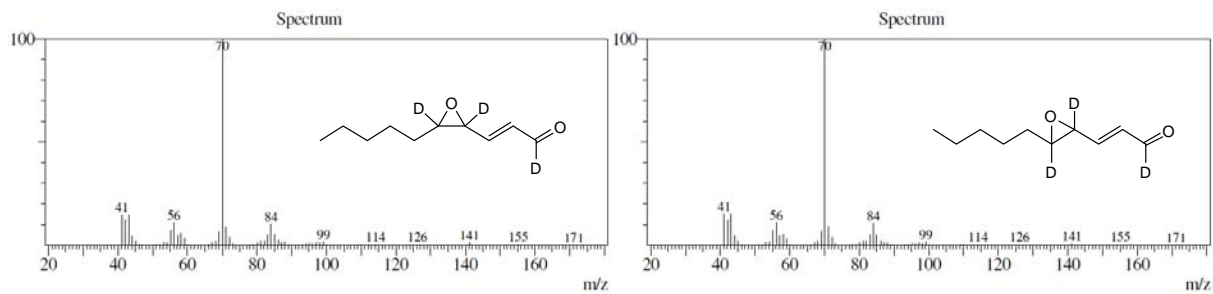


Abb. 25: Massenspektren der ^2H -markierten Epoxydecenale

Die Tatsache, dass sich die Markierungen in den Hauptfragmenten wiederfinden zeigt, dass es sich hier tatsächlich die selbe Fragmentierungsreaktion wie sie in Abb. 17 zu sehen ist abläuft und nicht um eine andere, die zu diesem Fragment mit m/z 68 führt.

3.1.2 BIERANALYSEN UND ALTERUNGSEXPERIMENTE

Für die Bieranalysen und Alterungsexperimente wurden Biere mit isotonenmarkierten Standard mit 0.5 und 1ppb gespiked um die Wiederfindungsrate zu bestimmen. Anschließend wurde über Nacht mittels flüssig/flüssig Extraktion nach Kutscher/Steudel extrahiert. Als Extraktionsmittel diente ein 1:2 Gemisch aus Dichlormethan und Pentan. Nach dieser Extraktion sind sehr viele Bestandteile des Bieres in dem Extrakt enthalten, die Matrix.

Diese Biermatrix überdeckt die schwachen Signale der Analyten, selbst im SIM-Modus beim Scannen der Massen 68 und 70.

Nach einem optimierten Temperaturprogramm erscheint das 4Z-Epoxydecenal bei 8,63 min und das 4E-Epoxydecenal bei 8,67 min. Dieses Zeitfenster befindet sich in Abb. 26 innerhalb des gestrichelten Rahmens.

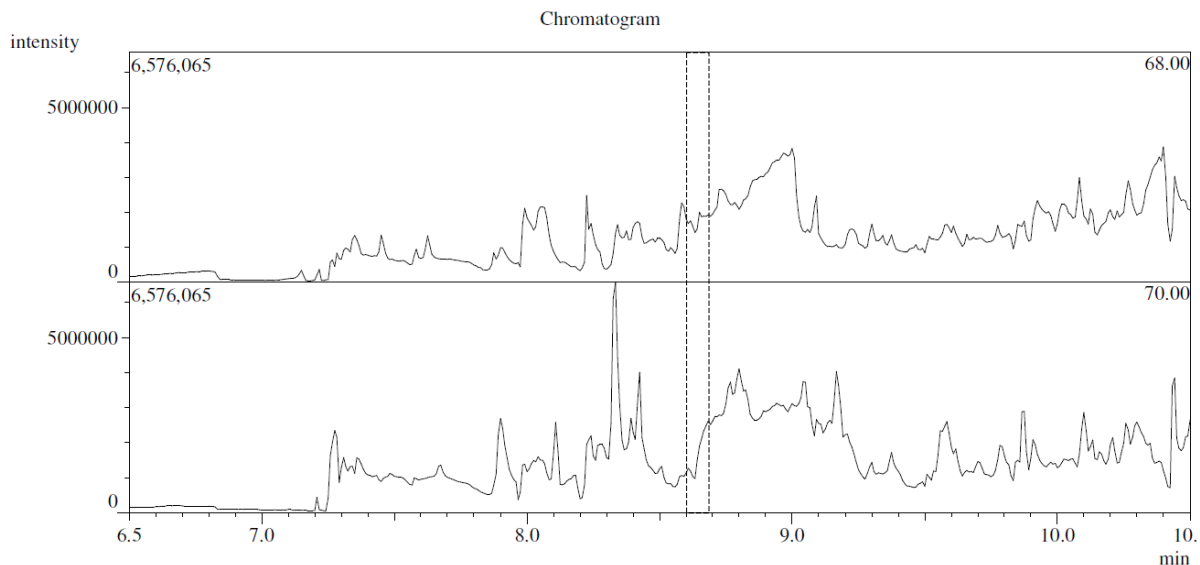


Abb. 26: Chromatogramm des Bierextraktes mit den Massen 68 (oben) und 70 (unten)

Diesem Chromatogramm lässt sich aufgrund des hohen Untergrundrauschens (Bestandteile der Biermatrix) keine Information bezüglich der Epoxydecenale entnehmen.

Daher wurde der Extrakt einer SAFE-Destillation unterzogen. Bei der SAFE-Destillation (Solvent Assisted Flavor Evaporation) wird das Extraktionsmittel und alle flüchtigen Komponenten unter Hochvakuum bei 30°C verdampft und durch Kühlung mittels flüssigen Stickstoffs kondensiert und aufgefangen. Dabei bleiben die schwerflüchtigen Matrixkomponenten zurück. Allerdings zeigt sich auch hier, dass die verbleibenden Bestandteile des Bieres eine quantitative GC/MS-Analyse im Elektronenstoßmodus (EI) unmöglich machen (Abb. 27). Auch hier müssten im markierten Zeitfenster die Signale für die Epoxydecenale erscheinen.

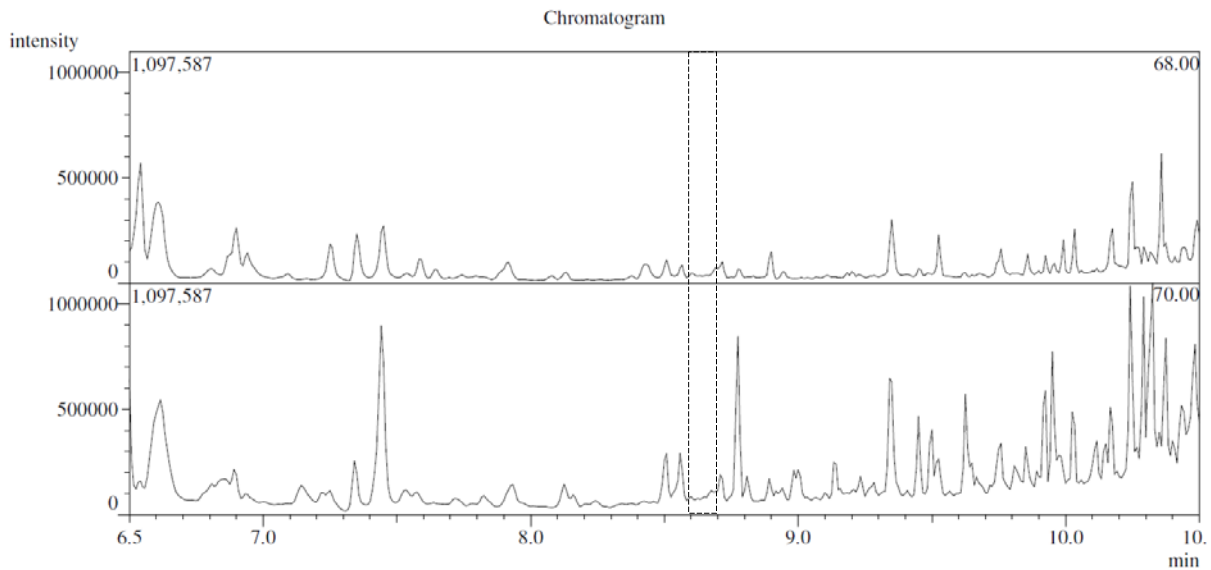


Abb. 27 Chromatogramm eines Bierextraktes nach SAFE-Destillation

Abhilfe schafft die Analytik mittels GC-MS im NCI (Negative Chemical Ionization) Modus. Dabei wird die Ionsierungskammer mit einem Reaktandgas geflutet. Durch Stöße der Elektronen mit den Molekülen des Reaktandgases werden sie abgebremst (thermische Elektronen), sodass sie von dem Analytmolekül eingefangen werden können, ohne oder zumindest mit verminderter Fragmentierung. Es resultiert ein negativ geladenes Ion, das dann registriert werden kann. Die Fragmentierungsmuster unterscheiden sich von denen des EI-Modus, bei dem die Elektronen direkt mit den Analytmolekülen kollidieren. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die dreifach deuterierten Epoxydecenale unter NCI/MS-Bedingungen ein Hauptfragment bilden, welches alle drei Deuteriumatome trägt (Abb. 28).

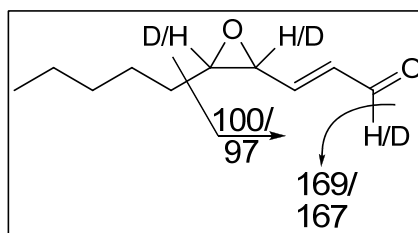
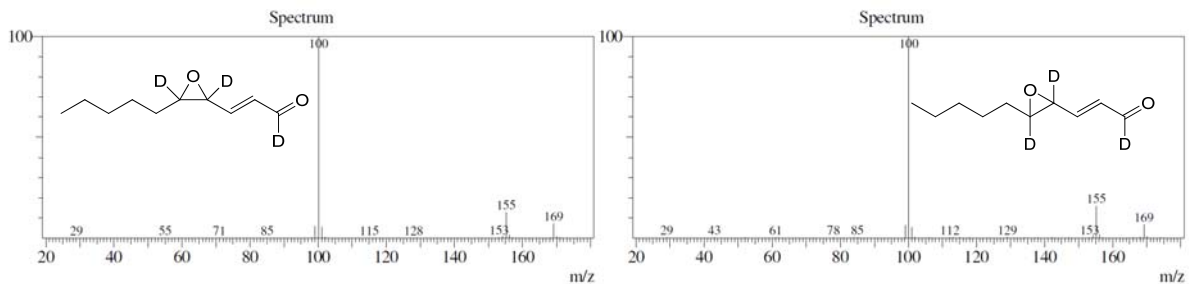


Abb. 28 Fragmentierungsmuster der Epoxydecenale im NCI/MS-Modus

Die Massenspektren der deuterierten *cis*- und *trans*-Epoxydecenale sind in Abb. 29 dargestellt. Auch in diesem Messmodus unterscheiden sich die Massenspektren der *cis-trans*-Form nicht.

Abb. 29 NCI/MS-Spektren der 1,4,5-²H-4E,Z-Epoxydecenale

Durch die Massendifferenz von 3 amu zwischen dem deuterierten Isotopenstandard und dem Analyten, nimmt der Einfluss der natürlichen Isotopenverteilung weiter ab, da die Wahrscheinlichkeit der Existenz von Epoxydecenalmolekülen mit drei durch natürliche Isotopenverteilung eingebauten ¹³C-Atomen gegen Null geht.

Ein weiterer Vorteil ist, dass sich nur wenige Spezies auf diese Weise ionisieren lassen. Diejenigen Moleküle, die sich nicht ionisieren lassen, können nicht registriert werden, was zu einer dramatischen Abnahme des Rauschens, hier verursacht durch Matrixbestandteile, führt. Zum Vergleich siehe Abb. 27 und Abb. 30. Hier wurde das Temperaturprogramm für diese Art der Ionisierung optimiert, die Epoxydecenale erscheinen bei 9,07 (4Z-) und 9,12 min (4E-Epoxydecenal).

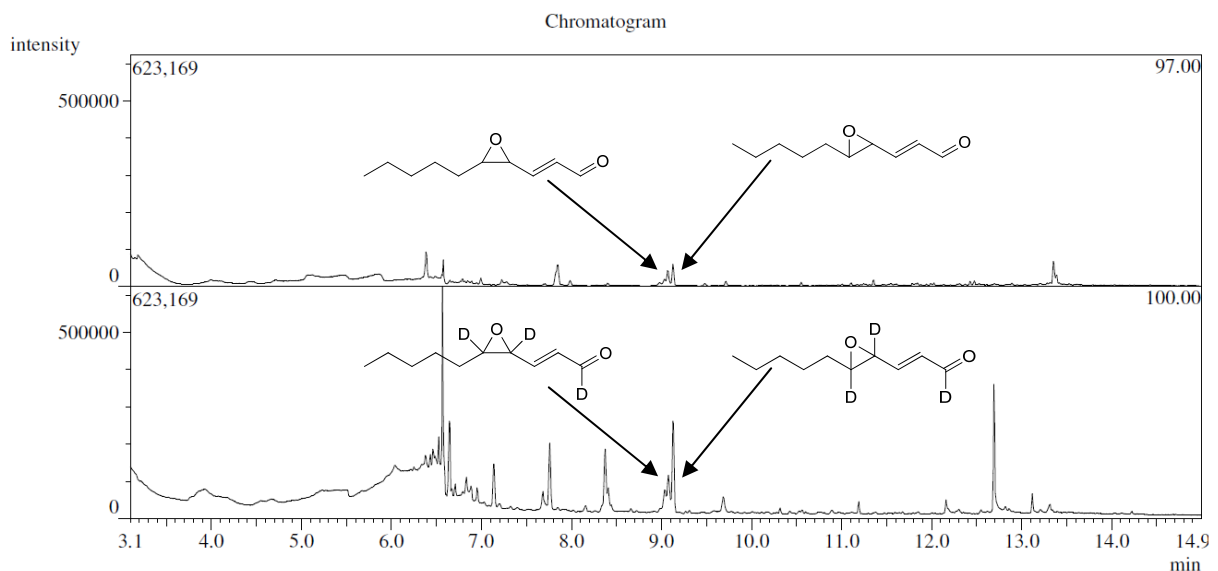


Abb. 30 Chromatogramm eines Bierextraktes im NCI-Modus

Leider werden diese beiden Peaks (besonders der für die 4Z-Epoxydecenale) von einem anderen Peak überlagert. Die Abb. 31 zeigt diesen Effekt.

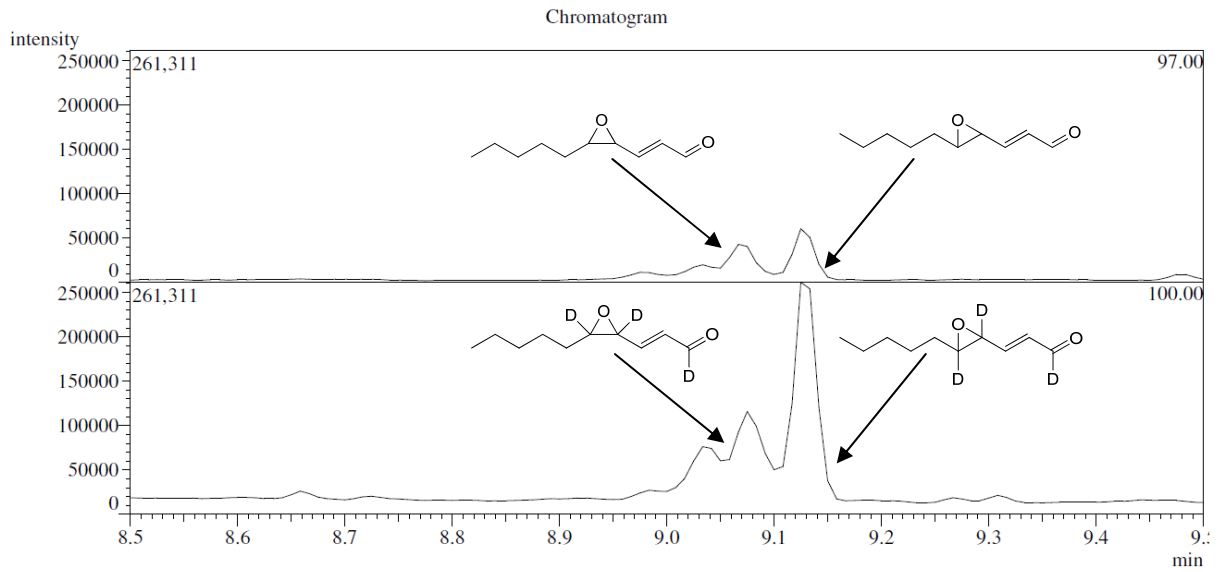


Abb. 31 Ausschnitt aus dem vorherigen Chromatogramm

Daher wurde das Temperaturprogramm noch einmal optimiert.

Nun sind die beiden Peaks gut aufgelöst und werden nicht von anderen Peaks überlagert, wie man den Abbildungen Abb. 32 und Abb. 33 entnehmen kann.

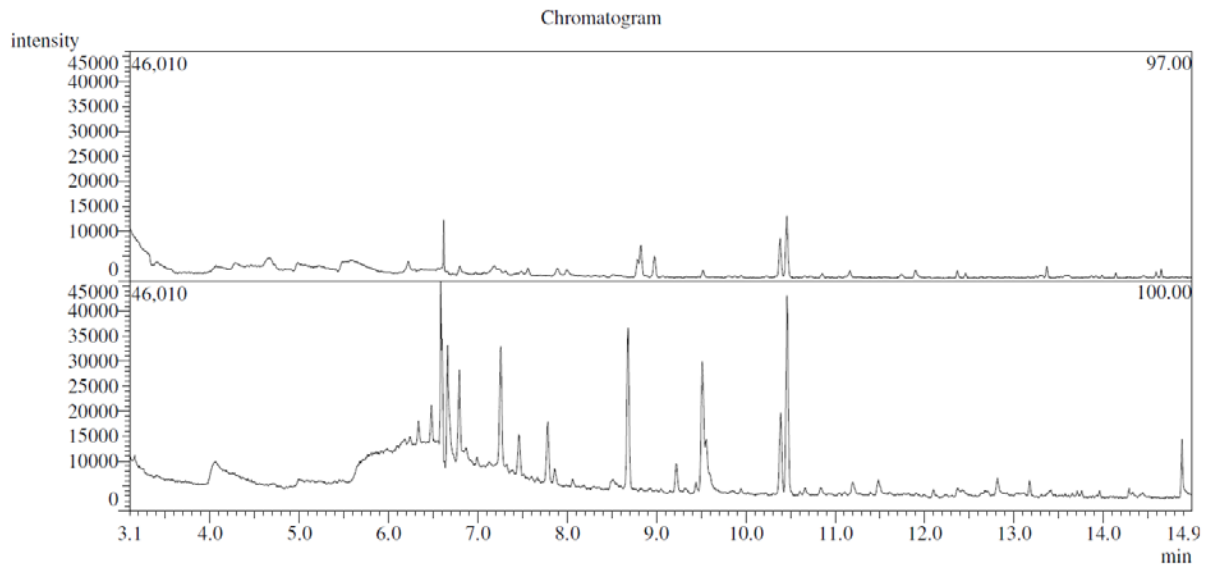


Abb. 32 Chromatogramm des Bierextraktes nach Optimierung des Temperaturprogrammes

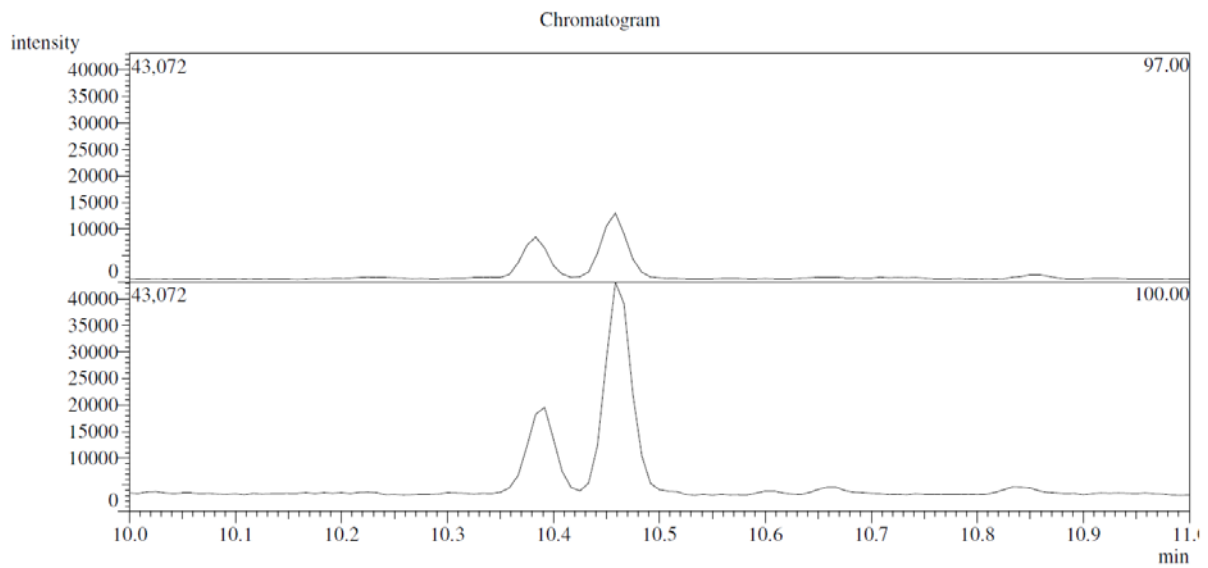


Abb. 33 Ausschnitt aus dem optimierten Chromatogramm

Mit diesen Ergebnissen ist es nun möglich, eine Quantifizierung von *cis*- und *trans*-Epoxydecenal in Bier zu etablieren.

Die Ergebnisse dieser Quantifizierungen werden im Folgenden dargestellt.

3.1.3 ERGEBNISSE BIERANALYSEN EPOXYCARBONYLE

		ppb (µg/kg)
Flasche	4 Z Epoxydecenal	0,0159
	4 E Epoxydecenal	0,0288
Dose	4 Z Epoxydecenal	0,0242
	4 E Epoxydecenal	0,0632

Tabelle 6. Gehalte von Epoxydecenalen in frischem Bier

Forcierte Alterung 1

		ppb (µg/kg)
Flasche	4 Z Epoxydecenal	0,0430
	4 E Epoxydecenal	0,1462
Dose	4 Z Epoxydecenal	0,1046
	4 E Epoxydecenal	0,4146

Tabelle 7. Gehalte von Epoxydecenalen in Bier nach 48h bei 40°C

Forcierte Alterung 2

		ppb (µg/kg)
Flasche	4 Z Epoxydecenal	0,1161
	4 E Epoxydecenal	0,1731
Dose	4 Z Epoxydecenal	0,1458
	4 E Epoxydecenal	0,3251

Tabelle 8. Gehalte von Epoxydecenalen in Bier nach 120h bei 40°C

Die dargestellten Werte demonstrieren eindeutig die Zunahme der Konzentration der Epoxydecenale mit der Lagerzeit unter forcierten Bedingungen.

Zusammenfassung Bieranalysen

		ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
		frisch	48h 40°	120h 40°
Flasche	4 <i>Z</i> Epoxydecenal	0,02	0,04	0,12
	4 <i>E</i> Epoxydecenal	0,03	0,17	0,17
Dose	4 <i>Z</i> Epoxydecenal	0,02	0,10	0,15
	4 <i>E</i> Epoxydecenal	0,06	0,41	0,33

Tabelle 9. Zusammenfassung der Alterungsexperimente

4 ZUSAMMENFASSUNG

Im Forschungsvorhaben B84 der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft wurden „Epoxyfettsäuren und Epoxy-carbonyl in Gerste und Malz – Analytik, Abbau durch Hefe und Malz sowie Charakterisierung neuer Zwischenprodukte als Markersubstanzen“ erfolgreich untersucht.

Der Metabolismus von Epoxyfettsäuren durch Hefe konnte abschließend aufgeklärt werden. Dabei wurde gezeigt, dass Hefen Epoxy-säuren metabolisieren können und dabei zahlreiche Hydroxylactone entstehen, die als Markersubstanzen bei der Analytik genutzt werden können.

Es konnte eine neue, vergleichsweise einfache chemische Synthese von deuterierten bzw. C-13 markierten 4,5-Epoxy-2E-decenal Isomeren etabliert werden. Die 1,4,5-trideuterierten 4,5-Epoxy-2E-decenale wurden erfolgreich als Isotopenstandards (SIDA) für die exakte Quantifizierung von Epoxydecenalen in frischem und forciert gealtertem Bier genutzt werden. Dabei zeigten sich Werte (Summe beider Epoxydecenalisomere) um 0,05 ppb (Flasche) bzw. 0,08 ppb (Dose) im frischen Bier, die auf über 0,2 ppb (Flasche) bzw. 0,5 ppb (Dose) bei forcierter Alterung ansteigen. Die Gehalte in dieser Größenordnung sind relevant für das Bieraroma.

4.1 AUSBLICK

Durch die nunmehr erfolgreiche Darstellung eines Epoxydecenal-isotopenstandards soll insbesondere die sehr aufwändige Probenvorbereitung vereinfacht werden und sämtliche Einflussparameter auf die Bildung von Epoxydecenal in Bier untersucht werden. Dazu ist ein neues Forschungsvorhaben bei der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft beantragt worden.

5 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Bildung von Epoxyfettsäuren aus ungesättigten Fettsäuren	3
Abb. 2 EI-MS-Spektrum von <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-Epoxyhexadecansäuremethylester	4
Abb. 3 EI-MS-Spektrum von <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-Epoxydodecansäuremethylester	4
Abb. 4 EI-MS-Spektrum von <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-Epoxydecansäuremethylester	4
Abb. 5 postuliertes Fragmentierungsmuster der Epoxysäuremethylester	5
Abb. 6: Postulierter Metabolismus von <i>cis</i> - bzw. <i>erythro</i> -Epoxyssäuren in Hefen zu Dihydroxysäuren, Hydroxylactonen und Lactonen	6
Abb. 7: Postulierter Metabolismus von <i>trans</i> - bzw. <i>threo</i> -Epoxyssäuren in Hefen.....	11
Abb. 8: Postulierter Metabolismus von <i>trans</i> - bzw. <i>threo</i> -Epoxyssäuren in Hefen zum γ -Decalacton.....	12
Abb. 9: Sechs Beispiele von Abbauprodukten ungesättigter Fettsäuren.....	13
Abb. 10: Oxidativer Linolsäurestoffwechsel I-Lipoxygenase, II-Hydroperoxidlyase, III-3Z-Alkenaloxxygenase, IV-Epoxygenase	14
Abb. 11: Nucleophile Reaktionsmöglichkeiten ungesättigter Epoxycarbonyle am Beispiel einer Lysin-Seitenkette (R=Protein-Lysin)	15
Abb. 12 Entstehung der Epoxydecenale aus Linolsäure (LOX = Lipoxygenase)	16
Abb. 13: Chemischer Abbauweg der Linolsäure zu den Epoxydecenalen	17
Abb. 14: Massenspektren des 4Z- (links) und 4E-Epoxydecenals	18
Abb. 15: Massenspektren des 1- ¹³ C-4Z- (links) und 1- ¹³ C-4-E-Epoxydecenals.....	19
Abb. 16: Massenspektren des 1,4,5- ² H-4Z (links) und 1,4,5- ² H-4E-Epoxydecenals.....	19
Abb. 17: Fragmentierungsreaktion der Epoxydecenale zum Hauptfragment mit m/z 70, 71 oder 72, je nach Markierung.....	19
Abb. 18: Reaktionsweg der Desaturierung mit dem IBX-MPO-Komplex.....	20
Abb. 19 Chromatogramm der aufgearbeiteten Desaturierung.....	21
Abb. 20: Lactonisierung zum 5-Hydroxy- γ -decalacton während der Epoxidierung mit meta-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) oder Dimethyldioxiran (DMDO).....	21
Abb. 21: Reaktionsschema der Epoxidierung mit DMDO.....	22
Abb. 22 GC- Chromatogramm des 4Z-Epoxydecenals nach chromatographischer Aufreinigung	23
Abb. 23: Massenspektren der unmarkierten Epoxydecenale	24

Abb. 24: Massenspektrum der ^{13}C -markierten Epoxydecenale	25
Abb. 25: Massenspektren der ^2H -markierten Epoxydecenale	25
Abb. 26: Chromatogramm des Bierextraktes mit den Massen 68 (oben) und 70 (unten)	26
Abb. 27 Chromatogramm eines Bierextraktes nach SAFE-Destillation	27
Abb. 28 Fragmentierungsmuster der Epoxydecenale im NCI/MS-Modus	27
Abb. 29 NCI/MS-Spektren der 1,4,5- ^2H -4 <i>E,Z</i> -Epoxydecanale	28
Abb. 30 Chromatogramm eines Bierextraktes im NCI-Modus	28
Abb. 31 Ausschnitt aus dem vorherigen Chromatogramm	29
Abb. 32 Chromatogramm des Bierextraktes nach Optimierung des Temperaturprogrammes	29
Abb. 33 Ausschnitt aus dem optimierten Chromatogramm	30

6 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Inkubation von <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung von entsprechenden Metaboliten.	7
Tabelle 2: Inkubation von <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung einzelner Isomere und Isotopomere.....	8
Tabelle 3: Inkubation von <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung von Enantiomeren des γ -Decalactons, von Hydroxylactonen un der 2-Hydroxyoctansäure sowie neuer Metabolite (Furansäuren).	9
Tabelle 4: Inkubation von <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung von Enantiomeren des γ -Decalactons (O-18 markiert und unmarkiert).....	10
Tabelle 5 Tabelle: Inkubation von <i>erythro</i> -[9,10- ¹⁸ O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> (Rh) und zeitabhängige Identifizierung und Quantifizierung von Enantiomeren und Isotopomeren des γ -Decalactons sowie des 3-Hydroxy- γ -decalactons...	10
Tabelle 6. Gehalte von Epoxydecenalen in frischem Bier	31
Tabelle 7. Gehalte von Epoxydecenalen in Bier nach 48h bei 40°C	31
Tabelle 8. Gehalte von Epoxydecenalen in Bier nach 120h bei 40°C	31
Tabelle 9. Zusammenfassung der Alterungsexperimente	32