

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik

Molekulare Entschlüsselung des nicht-flüchtigen Sensometaboloms
von Parmesankäse und Balsamico Essig

Hedda Hillmann

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Th. F. Hofmann
2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 20.03.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.07.2013 angenommen.

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Hofmann danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die immerwährende Unterstützung. Zudem möchte ich mich für die Ermöglichung der wissenschaftlichen Kooperationen bedanken, die sehr interessant und lehrreich waren.

Bei Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel möchte ich mich für die Ermöglichung der mikrobiologischen Untersuchungen bedanken. Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Dr. Jürgen Behr und PD Dr. Matthias Ehrmann für die Einarbeitung und hilfreichen Ratschläge.

Vielen Dank an Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof für die Möglichkeit, die Messungen zur Aktivierung des Süßrezeptors am DfE durchzuführen. In diesem Rahmen sei vor allem Juliane Bojahr und Dr. Anne Brockhoff für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken, ihre vielen hilfreichen Hinweise und ihre Unterstützung ganz herzlich gedankt.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster sowie des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik der Technischen Universität München für die gute Zusammenarbeit und stetige Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Dr. Gesa Gröhnke möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit innerhalb des Projektes und ihre Fahrkünste auf den Serpentine Norditaliens bedanken.

Herzlichen Dank an die Kollegen des Raubvogellabors in Münster sowie Labor 1 in Freising für die gute Arbeitsatmosphäre, die konstruktiven Diskussionen und vielen schönen Gesprächen und Aktivitäten abseits des Laboralltags.

Bei Dr. Timo Stark, Dr. Roman Lang und Dr. Corinna Dawid möchte ich mich für die Einarbeitung in LC-MS bedanken. Vielen Dank an das NMR-Team für die Messung der Spektren und hilfreichen Ratschläge bei deren Auswertung.

Ein großes Dankeschön an Barbara Süß und Stefanie Meyer für die schöne gemeinsame Zeit im „Harmonie-Büro“, den regen fachlichen (und auch nicht-fachlichen) Austausch, die gegenseitigen Ratschläge für das Schreiben der Doktorarbeit und das, manchmal notwendige, Wiederfinden der inneren Mitte.

Bei Dr. Kristin Lang, Dr. Corinna Dawid, Dr. Roman Lang und Dr. Gesa Gröhnke bedanke ich mich sehr herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit sowie die konstruktiven und hilfreichen Anmerkungen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich jederzeit unterstützt hat, Kristin für ihre liebevolle Motivation und Geduld und insbesondere meinem Vater, der stets für mich da war und mir durch seine immerwährende, vielfältige Unterstützung diesen Weg erst ermöglicht hat. Danke!

Vorbemerkungen

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde, jeweils unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Thomas Hofmann, von Januar 2007 bis September 2007 am Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität begonnen und von Oktober 2007 bis Mai 2011 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München fortgesetzt.

Die mikrobiologischen Untersuchungen des Parmesankäses wurden ab November 2008 am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München, in Zusammenarbeit mit Dr. Jürgen Behr und PD Dr. Matthias Ehrmann durchgeführt.

Die Messung der zellbasierten Rezeptorassays erfolgte im Juni 2010 am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE) in Potsdam-Rehbrücke, Abteilung Molekulare Genetik, in Zusammenarbeit mit Juliane Bojahr und Dr. Anne Brockhoff.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in einer international anerkannten Zeitschrift veröffentlicht:

Hillmann, H.; Mattes, J.; Brockhoff, A.; Dunkel, A.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Sensomics Analysis of Taste Compounds in Balsamic Vinegar and Discovery of 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyde as a Novel Sweet Taste Modulator. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9974 – 9990.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Parmesankäse</i>	1
1.2	<i>Balsamico Essig</i>	4
1.3	<i>Geschmack und Geschmackswahrnehmung</i>	8
1.3.1	Grundlagen der Geschmackswahrnehmung	8
1.3.2	Süß-, Umami- und Bittergeschmack	13
1.3.3	Saurer und salziger Geschmack	17
1.3.4	Molekulare Grundlagen der Geschmacksverstärkung	18
1.4	<i>Analytik von Geschmacksstoffen</i>	20
1.5	<i>Sensorisch aktive Verbindungen in Käse</i>	23
1.6	<i>Sensorisch aktive Substanzen in Traditionellem Balsamico Essig</i>	31
1.7	<i>Problemstellung</i>	35
2	Ergebnisse und Diskussion	37
2.1	<i>Schlüsselgeschmacksstoffe in Parmesankäse</i>	37
2.1.1	Entschlüsselung des Sensometaboloms von Parmesankäse	37
2.1.1.1	Sensorische Analyse von reifem Parmesankäse und dessen wässrigem Extrakt	37
2.1.1.2	Qualitative und quantitative Analyse von kokumi-aktiven Glutamylpeptiden	40
2.1.1.3	Quantifizierung von Geschmacksstoffen und Berechnung von DoT-Faktoren	54
2.1.1.4	Rekombinations- und Omissionsexperimente	61
2.1.1.5	Diskussion	68
2.1.2	Untersuchungen zur Bildung von Glutamylpeptiden in Parmesankäse	72
2.1.2.1	Einfluss des Reifestadiums auf die Gehalte an α - und γ -Glutamylpeptiden in Parmesankäse	74
2.1.2.2	Untersuchungen zur Herkunft der γ -Glutamyltransferase in Parmesan	79
2.1.2.3	Messung der γ -Glutamyltransferase-Aktivität in Parmesankäse	80
2.1.2.4	Analyse der Mikroflora in Parmesankäse	87
2.1.2.5	Analyse der γ -Glutamyltransferase-Aktivität der Mikroflora und von Milch	91
2.1.2.6	Diskussion	99
2.2	<i>Schlüsselgeschmacksstoffe in Balsamico Essig</i>	103
2.2.1	Entschlüsselung des Sensometaboloms von Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (ABTM)	103
2.2.1.1	Sensorische Analyse von ABTM	103
2.2.1.2	Identifizierung und quantitative Analyse von Sensometaboliten aus der Fasslagerung	106
2.2.1.3	Quantifizierung von Geschmacksstoffen und Berechnung von DoT-Faktoren	109
2.2.1.4	Rekombinations- und Omissionsexperimente	117
2.2.1.5	Aktivitätsorientierte Identifizierung von Süßgeschmacksmodulatoren in ABTM	121
2.2.1.6	Diskussion	144
2.2.2	Vergleich des Sensometaboloms von Traditionellem Balsamico Essig aus Modena (ABTM) und herkömmlichem Balsamico Essig aus Modena (ABM)	148
2.2.2.1	Vergleichende Geschmacksprofilanalyse von ABTM und ABM	148
2.2.2.2	Quantitative Unterschiede im Sensometabolom von ABTM und ABM	150
2.2.2.3	Rekombinationsexperiment mit dem Aceto Balsamico di Modena	155
2.2.2.4	Diskussion	156
2.2.3	Einfluss der Lagerung auf das Sensometabolom von Traditionellem Balsamico Essig aus Modena	158

2.2.3.1	Einfluss der Lagerung auf die Gehalte der Sensometaboliten	159
2.2.3.2	Diskussion	163
2.2.4	Studien zur Aktivierung des hTAS1R2/hTAS1R3-Süßrezeptors	165
2.2.4.1	Süßrezeptor-Aktivierung durch 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd	165
2.2.4.2	Süßrezeptor-Aktivierung durch Furan-, Thiophen- und Pyrrol-Derivate	169
2.2.4.3	Diskussion	176
3	Experimenteller Teil	179
3.1	Untersuchungsmaterial, Reagenzien und Materialien	179
3.1.1	Untersuchungsmaterial	179
3.1.2	Reagenzien	179
3.1.3	Materialien	187
3.2	Mikrobiologische Untersuchungen	188
3.3	Molekularbiologische Untersuchungen	188
3.4	Parmesankäse	188
3.4.1	Herstellung eines Wasserextraktes	188
3.4.2	Quantitative Analysen	189
3.4.3	Untersuchung der Mikroflora von Parmesankäse	201
3.4.4	Inkubationsexperimente mit L-Glutamin-[¹³ C ₅]	203
3.4.5	Sensorische Analyse	205
3.4.6	Synthesen	206
3.5	Balsamico Essig	210
3.5.1	Ultrafiltration von ABTM	210
3.5.2	Gelabsorptionschromatographie (GAC)	210
3.5.3	Quantitative Analysen	211
3.5.4	Sensorische Analyse	218
3.5.5	Zellbasierter Süßrezeptorassay	222
3.5.6	Synthesen	225
3.6	Sensorik	230
3.6.1	Schulung des Sensorikpanels	231
3.6.2	Schwellenwertbestimmung	231
3.7	Chromatographische Methoden	231
3.7.1	Gelabsorptionschromatographie (GAC)	231
3.7.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	232
3.7.3	Hochleistungsenchromatographie (HPIC)	234
3.7.4	Gaschromatographie (GC)	235
3.8	Spektroskopische Methoden	235
3.8.1	UV-Vis-Spektroskopie	235
3.8.2	HPLC-Massenspektrometrie (LC-MS)	235
3.8.3	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	237
3.9	Statistische Methoden	238
4	Zusammenfassung	239
5	Literatur	243
6	Anhang	269

Abkürzungen

ABTM	Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (Traditioneller Balsamico Essig aus Modena)
ABTRE	Aceto Balsamico Tradizionale di Reggio Emilia (Traditioneller Balsamico Essig aus Reggio Emilia)
ABM	Aceto Balsamico di Modena (konventioneller Balsamico Essig)
ACN	Acetonitril
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
amu	Atomic mass unit
CAD	Collision Activated Dissociation
CE	Collision Energy
COSY	Correlated Spectroscopy
CXP	Cell Exit Potential
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
Da	Dalton
D ₂ O	Deuteriumoxid
DAD	Diodenarray-Detektor
dd	Dublett vom Dublett
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DoT	Dose-over-Threshold
DP	Declustering Potential
ELSD	Verdampfungslichtstreuendetektor
ESI	Elektrospray-Ionisation
FLIPR	Fluoreszenz Imaging Plate Reader
GC-FID	Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion
GAC	Gelabsorptionschromatographie
GVA	Geschmacksverdünnungsanalyse
GV-Faktor	Geschmacksverdünnungsfaktor
g.g.A.	geschützte geographische Angabe
g.U.	geschützte Ursprungsbezeichnung
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPIC	Hochleistungsaustauschchromatographie

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IS	Interner Standard
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
m	Multipllett
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MSG	Mononatriumglutamat
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektiert
n.n.	nicht nachweisbar
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PAD	gepulste amperometrische Detektion
PFPP	Pentafluorphenylpropyl-Phase
q	Quartett
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
sCD	supressed Conductivity (unterdrückte Leitfähigkeit)
t	Tripllett
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total Ion Course (Totalionenstrom)
TMSP	Trimethylsilylpropionsäure
UF	Ultrafiltration
UV/VIS	Ultraviolett/Visible Spektroskopie

Symbole

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

1 Einleitung

Sowohl Parmesankäse (*Parmigiano Reggiano*) als auch Traditioneller Balsamico Essig aus Modena oder Reggio Emilia (*Aceto Balsamico Tradizionale di Modena/di Reggio Emilia*) werden durch aufwändige, traditionelle Verfahren hergestellt. Aufgrund ihres charakteristischen Geschmacks und Aromas erfreuen sich beide Lebensmittel weltweit immer größerer Beliebtheit und werden zum Verfeinern und Abrunden verschiedenster Gerichte, insbesondere in der mediterranen Küche, verwendet.

1.1 Parmesankäse

Parmesankäse (*Parmigiano Reggiano*) ist ein traditioneller italienischer Extra-Hartkäse aus roher Kuhmilch und gehört zusammen mit dem *Grana Padano* und *Granone Lodigiano* zur Gruppe der sogenannten Grana-Käse, die sich durch eine lange Reifezeit und eine kompakte, aber dennoch körnige und brüchige Konsistenz auszeichnen und vor allem zum Verfeinern und Würzen verschiedener Speisen verwendet werden (*McSweeney et al.*, 2004). Aufgrund seines intensiv würzigen und leicht scharfen Geschmacks sowie ausgewogenen Aromas ist Parmesankäse nicht nur in Italien, sondern weltweit bei Konsumenten sehr beliebt. Die Produktion betrug im Jahr 2010 ca. 110 000 t (3.018.260 Laibe), von denen insgesamt 37 000 t exportiert wurden (*CRPA*, 2010).

Die erste nachweisliche Erwähnung des Parmesans stammt aus dem Jahr 1579 (*Fox und McSweeney*, 2004). Der Ursprung des Käses, der in der norditalienischen Po-Ebene liegt, lässt sich aber bis ins 13. Jahrhundert zurückverfolgen (*Bartolini*, 2006). Parmesankäse unterliegt in Italien schon seit dem Jahr 1955 den Richtlinien der geschützten Herkunftsbezeichnung (*D.P.R. 1269/1955*) und gehört seit 1996 EU-weit zur Gruppe der Lebensmittel mit geschützter Ursprungsbezeichnung (g.U.) (*Verordnung EG-2081/92*, 1992). Die Herstellung ist auf die Regionen Parma, Reggio Emilia, Modena, Mantua und Bologna beschränkt. Das *Consortio del Formaggio Parmigiano Reggiano*, eine seit 1957 gesetzlich anerkannte Genossenschaft der Parmesanproduzenten, kontrolliert die Einhaltung strenger Auflagen bei der Produktion (*Bartolini*, 2006).

Die Herstellung erfolgt bis heute nicht im industriellen Maßstab, sondern in vielen kleinen Molkereien nach einem traditionellen und klar festgelegten Verfahren. Dabei darf nur Rohmilch von Kühen verwendet werden, die in der Region gehalten werden und deren

Fütterung ebenfalls den Regularien des *Consortiums* unterliegt. Im Gegensatz zu den Regularien für die Herstellung von *Grana Padano* ist z.B. die Verwendung von fermentiertem Futter wie Silage verboten (*Consortio del Formaggio Parmigiano Reggiano*, 2011).

Das im Folgenden erläuterte Herstellungsverfahren für Parmesankäse ist schematisch in **Abbildung 1** dargestellt. Die Milch des abendlichen Melkvorgangs, das sogenannte Abendgemelk, wird über Nacht in offenen Edelstahlbecken gelagert, wobei eine natürliche Aufrahmung stattfindet. Nach dem Abschöpfen der Rahmschicht am nächsten Morgen wird das Abendgemelk in gleichen Teilen mit unbehandeltem Morgengemelk vermischt, wodurch sich ein Fettgehalt von 2,4 – 2,5 % ergibt. Die anschließend zugegebenen Starterkulturen stammen aus der Molke der Produktion des Vortages und setzen sich zumeist aus thermophilen Lactobacillen zusammen, wie z.B. *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii ssp. lactis* und *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (Gobetti, 2004). In konischen Kupferkesseln erfolgt dann durch Zugabe von Kälber-Lab bei 33 – 35 °C das Dicklegen. Nach einer Ruhephase von 30 Minuten wird der entstandene Käsebruch zerkleinert und anschließend für zehn bis zwölf Minuten auf 55 °C erhitzt, um Wasser aus dem Bruch zu verdrängen. Dieser wird dann mittels Leinentüchern aus der Molke gehoben und in runde Plastikformen gefüllt. Diese sind so gestaltet, dass der charakteristische *Parmigiano Reggiano*-Schriftzug, ein numerischer Code der Käseerei sowie Monat und Jahr der Herstellung in den Laib gestanzt werden und später auf der Rinde gut erkennbar sind (*Consortio del Formaggio Parmigiano Reggiano*, 2011).

Aus dem Käsebruch jeden Kessels entstehen zwei Käselaibe, die jeweils 38 – 40 kg wiegen, 18 – 25 cm hoch sind und einen Durchmesser von 33 – 45 cm aufweisen. Durch leichtes Pressen wird weitere Molke aus dem Laib entfernt und als zweites Authentizitätsmerkmal eine Caseinmarke mit einem, für jeden Laib individuellen, alphanumerischen Code aufgebracht. Nach einer Ruhezeit von zwei bis drei Tagen werden die Käselaibe für 20 – 23 Tage bei Raumtemperatur in Salzlake belassen, bevor die bis zu 36 Monate dauernde Reifezeit beginnt. Diese findet in klimatisierten Räumen bei 18 – 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 85 % statt. Der gereifte Käse weist ein Gewicht von 33 – 35 kg/Laib, einen Wassergehalt von 28 – 32 %, einen Proteingehalt von ca. 33 % und einen Fettgehalt von ca. 28 % auf. Ebenfalls charakteristisch ist der ernährungsphysiologisch wertvolle und durch die intensive Proteolyse bedingte hohe Gehalt an essentiellen freien Aminosäuren (Gobetti, 2004).

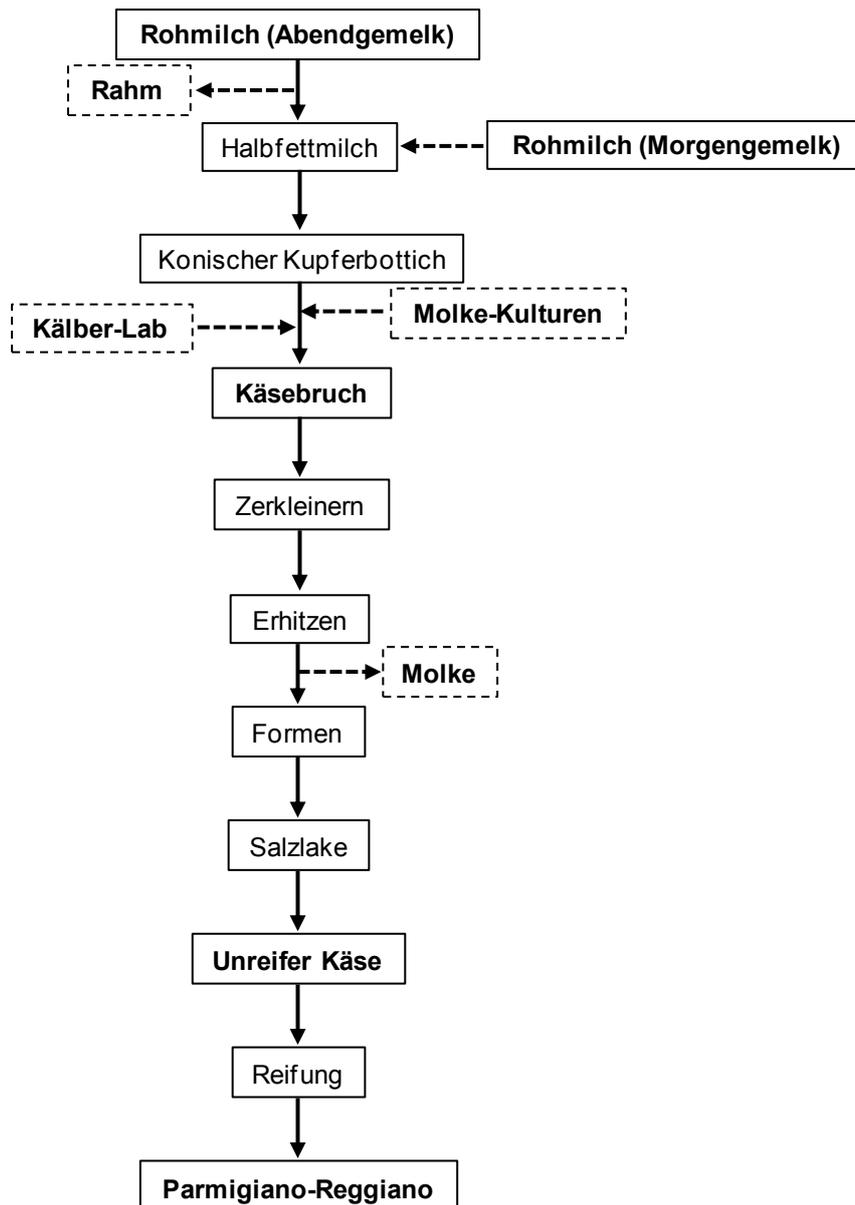


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Parmesankäseherstellung nach *Fox und McSweeney (2004)*.

Parmesankäse ist in verschiedenen Alterungsstufen und Qualitätsklassen erhältlich, die jeweils anhand verschiedener Symbole auf dem Laib oder der Verpackung zu erkennen sind. In den Handel gebracht werden darf der Parmesankäse frühestens nach einer Reifezeit von 12 Monaten und nur nach bestandener Qualitätsprüfung durch das *Consortium*. Weitere handelsübliche Reifestufen, die durch verschiedenfarbige Siegel gekennzeichnet sind, weisen Lagerungszeiten von mindestens 18, 22 und 30 Monaten auf. Der Käse wird nach 18-monatiger Reifezeit einer weiteren Qualitätsprüfung unterzogen und erhält in Abhängigkeit

von der Qualität ein weiteres Gütesiegel (*Consortio del Formaggio Parmigiano Reggiano*, 2011).

Mangelnde Kenntnisse über die, den Geschmack von Parmesankäse ursächlich prägenden Inhaltsstoffe machen eine Geschmacksoptimierung durch gezielte Steuerung von Prozessparametern bisher nicht möglich.

1.2 Balsamico Essig

Unter dem Begriff Essig versteht man ein sauer schmeckendes Würz- oder Konservierungsmittel, das durch Fermentation alkoholhaltiger Flüssigkeiten mit Essigsäurebakterien erhalten wird. Durch die große Vielzahl an vergorenen Flüssigkeiten, die als Rohstoff dienen können, entstehen verschiedenste Essigsorten mit unterschiedlichen sensorischen Eigenschaften. So gibt es Branntweinessige, die z.B. aus Whiskey oder Wodka hergestellt werden, Weinessige aus Rotwein, Weißwein oder Champagner, Obstessige wie den Apfel-, oder Himbeeressig und sogar Gemüseessige aus Gurken-, Spargel- oder Karottensaft (*Briggs*, 2007). Essige, die aus eingedicktem Traubensaft entstehen, werden als Balsam- oder Balsamico-Essige bezeichnet, wobei zwischen drei sehr unterschiedlichen Produkten unterschieden werden muss: dem Balsamico Essig, dem konventionellen Balsamico Essig aus Modena (*Aceto Balsamico di Modena*) und den Traditionellen Balsamico Essig (*Aceto Balsamico Tradizionale*) aus Modena bzw. Reggio Emilia (*Giudici et al.*, 2009).

Da der Begriff „Balsamico“ nicht geschützt ist, wird Balsamico Essig weltweit im industriellen Maßstab aus Wein- oder Branntweinessig sowie Farb- und Aromastoffen hergestellt. Balsamico Essig aus Modena (ABM) hingegen besteht ausschließlich aus Weinessig und eingedicktem Traubenmost und darf nur durch den Zusatz von Zuckercouleur in seiner Farbe stabilisiert werden. Dieser Essig ist ein Produkt mit geschützter geographischer Angabe (g.g.A) (*EG-VO 583/2009*), dessen Herstellung sich auf die norditalienischen Provinzen Modena und Reggio Emilia beschränkt und eine Reifezeit von 60 Tagen vorsieht.

Traditioneller Balsamico Essig (ABT) wird hingegen im kleinen Maßstab und nach traditionellen Verfahren ausschließlich aus Traubenmost hergestellt. Dieser Spezialitätenessig zeichnet sich durch eine lange Reifezeit von mindestens zwölf Jahren in Holzfässern aus, wodurch er eine sirupöse Konsistenz und sehr süßen und fruchtig-sauren Geschmack erhält (Giudici et al., 2009). In Abhängigkeit von der geographischen Herkunft wird zwischen *Aceto Balsamico Tradizionale di Modena* (ABTM) und *Aceto Balsamico Tradizionale di Reggio Emilia* (ABTRE) unterschieden, die beide seit 1986 in Italien (GU 82/9-4-1986) und seit dem Jahr 2000 EU-weit zur Gruppe der Lebensmittel mit geschützter Ursprungsbezeichnung (g.U.) gehören (EG-VO 813/2000). Um ihre Authentizität gewährleisten zu können, unterliegt die Produktion beider Traditioneller Balsamico Essige den Regularien mehrerer gesetzlich anerkannter Genossenschaften (*Consortia*), die die Einhaltung der vorgeschriebenen Parameter kontrollieren und die Qualität der gereiften Produkte bewerten. Dabei unterscheiden sich der ABTM und ABTRE nicht in ihrem Herstellungsprozess, sondern nur in den für den minimalen Säuregehalt und die minimale Dichte festgelegten Werten sowie die im Handel erhältlichen Reifestufen, die anhand von unterschiedlichen Siegeln entsprechend gekennzeichnet sind. ABTM, der in Alterungsstufen von mindestens 12 (*affinato*) und 24 Jahren (*extravecchio*) erhältlich ist, muss einen minimalen Säuregehalt von 4,5 % und eine Dichte von mindesten 1,24 g/ml aufweisen. Beim ABTRE, der in drei Alterungsstufen im Handel ist (12 (*aragosta*), 18 (*argento*) und 25 Jahre (*oro*)), sind 5,0 % Säure und eine Dichte von 1,20 g/ml vorgeschrieben (Giudici et al., 2009).

Für die Herstellung der Traditionellen Balsamico Essige werden vornehmlich weiße Trauben der Sorten Trebbiano und Sauvignon und zu einem geringen Anteil die roten Rebsorten Lambrusco oder Ancellota verwendet, die alle aus regionalem Anbau stammen müssen (Consonni und Gatti, 2004; Giudici et al., 2009). Nach dem Pressen der Trauben und Abtrennen des Trebers wird der erhaltene Most in Kesseln über offener Flamme bei 80 – 90 °C für 12 – 24 Stunden erhitzt, bis er nur noch ca. 30 % seines ursprünglichen Volumens aufweist (**Abbildung 2**). Die dabei entstandenen Kolloide und Schaumstoffe werden abgetrennt und der Most in das sogenannte *Botte Madre*, ein großes, meist aus Eichenholz bestehendes Fass, umgefüllt. Im *Botte Madre* verbleibt der Most über den Winter, wobei zunächst eine Klärung stattfindet, der sich die beginnende, spontane Fermentation durch verschiedene Hefestämme und Essigsäurebakterien anschließt. Die Mikroorganismen stammen dabei ausschließlich aus der Luft, ein gezielter Zusatz ist untersagt. Untersuchungen zur Mikroflora Traditioneller Balsamico Essige ergaben vor allem Hefen der Spezies

Zygosaccharomyces, *Hanseniaspora* und *Candida* (Solieri et al., 2005, 2007) sowie Essigsäurebakterien der Spezies *Gluconacetobacter* und *Acetobacter* (De Vero et al., 2006; Gullo et al., 2006).

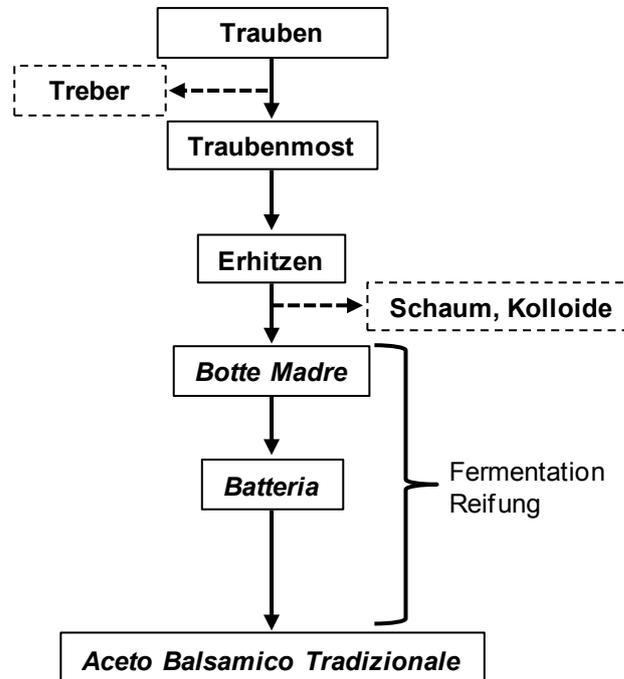


Abbildung 2. Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von Traditionellem Balsamico Essig nach Giudici et al. (2009).

Die weitere Fermentation sowie endgültige Reifung findet in einer Kaskade von Holzfässern, der sogenannten *Bateria*, statt und dauert mindestens zwölf Jahre. Eine *Bateria* besteht aus mindestens fünf Fässern, kann aber auch bis zu zehn Fässer umfassen. Dabei nehmen die Fässer chronologisch in ihren Volumina ab und sind aus verschiedenen Holzarten hergestellt. Häufig verwendete Hölzer sind Kastanie, Akazie, Kirsche, Eiche, Maulbeere, Esche oder Wacholder, wobei die Reihenfolge und Vielfalt der Holzarten jedem Essigproduzenten überlassen ist (Giudici et al., 2009). Einmal jährlich findet ein als *Rincalzo* bezeichneter Umfüllprozess statt (Abbildung 3), der mit dem Entnehmen von reifem Essig aus dem kleinsten Fass beginnt, und sich durch sukzessives Auffüllen bis zum Fass mit dem größten Volumen fortsetzt.

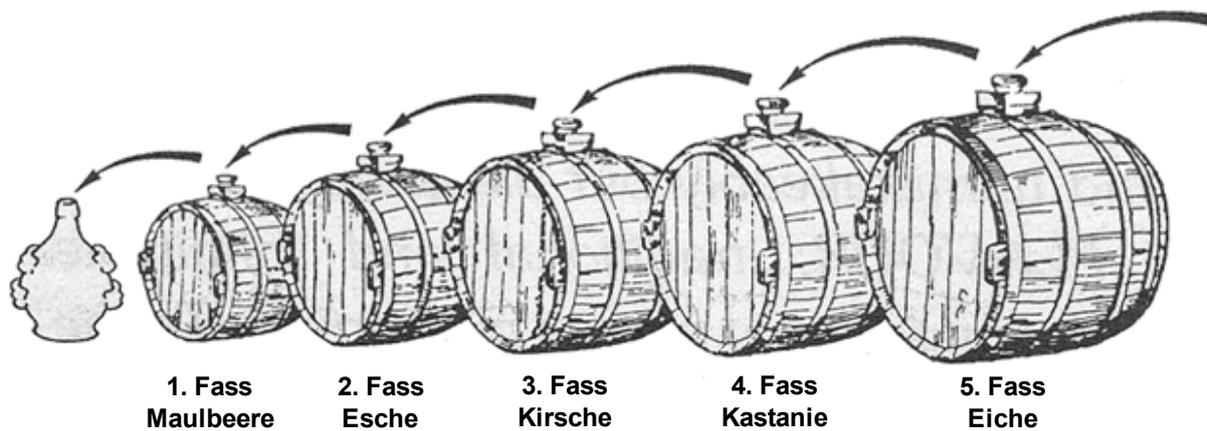


Abbildung 3. Beispiel für eine bei der Herstellung von Traditionellem Balsamico Essig verwendete Fassbatterie und die durchgeführten Umfüllprozesse. Mit leichten Veränderungen übernommen von *Cocchi et al.* (2002).

Dieses wird dann mit dem schon teilweise fermentierten Most aus dem *Botte Madre* aufgefüllt. Auch hier unterliegen die Details in der Durchführung, wie z.B. entnommenes Volumen oder sporadisches Überspringen eines Fasses, dem persönlichen Ermessen des Herstellers (*Cocchi et al.*, 2006b). Der angestammte Platz der Fassbatterien, von denen die meisten Essigproduzenten mehrere besitzen, ist traditionell auf dem Dachboden des Hauses oder einer Scheune. So führen die jahreszeitlich bedingten Temperaturschwankungen während der gesamten Lagerungszeit zu alternierenden Phasen der Ruhe im Winter und erhöhter mikrobiologischer Aktivität und Evaporation von flüchtigen Inhaltsstoffen und Wasser im Sommer (*Caligiani et al.*, 2007). Aufgrund des aufwändigen und zeitintensiven Herstellungsprozesses, der für 1 – 1,5 Liter Essig ca. 100 kg Trauben benötigt, werden pro Jahr insgesamt nur ca. 10 000 Liter der beiden Traditionellen Balsamico Essige erhalten (*Merkle*, 2002).

Im Laufe der Herstellung und Lagerung laufen zahlreiche mikrobiologische, chemische und physikalische Prozesse ab, die zur charakteristischen Konsistenz und Farbe sowie zum Aroma und Geschmack der Traditionellen Balsamico Essige beitragen. So findet während des Einkochen des Mostes, neben einer Aufkonzentrierung, der Abbau von Zuckern und damit verbunden die Entstehung von 5-Hydroxymethylfurfural im Zuge der Maillard-Reaktion sowie die Bildung von Polymeren statt (*Antonelli et al.*, 2004; *Cocchi et al.*, 2007; *Giudici et al.*, 2009). Aufgrund der Metabolisierung von Zuckern durch verschiedene Hefestämme und der sich anschließenden Ethanoloxidation durch Essigsäurebakterien entstehen im *Botte*

Madre sowie in den beiden größten Fässern der *Batteria* neben großen Mengen Essigsäure weitere potentielle Aroma- und Geschmacksstoffe wie z.B. Glycerin, Bernsteinsäure, Ethylacetat, Acetaldehyd, Acetoin oder Gluconsäure (*Plessi et al.*, 1989; *Ciani*, 1998; *Granchi*, 2002). Ab dem dritten Fass der *Batteria* tritt aufgrund des hohen Zuckergehaltes und niedrigen pH-Wertes allerdings keine mikrobiologische Aktivität mehr auf, sondern finden nur noch physikalische und chemische Reifungsprozesse statt (*Cocchi et al.*, 2002). Durch weitere Wasserevaporation setzt sich auch die Aufkonzentrierung der Inhaltsstoffe fort, die wiederum zu Polymerisierungen und Präzipitationen und somit zur Erhöhung der Dichte führt (*Giudici et al.*, 2009).

Da die den typischen Geschmack von Traditionellem Balsamico Essig ursächlich prägenden Moleküle weitestgehend unbekannt sind, ist eine gezielte Steuerung der Prozessparameter mit dem Ziel einer Geschmacksoptimierung bisher nicht möglich.

1.3 Geschmack und Geschmackswahrnehmung

1.3.1 Grundlagen der Geschmackswahrnehmung

Der sensorische Gesamteindruck, der beim Verzehr eines Lebensmittels entsteht setzt sich, neben der Textur, vor allem aus der Aroma- und der Geschmackswahrnehmung zusammen. Das Aroma wird durch die Wechselwirkung unpolarer, flüchtiger Verbindungen mit Rezeptoren in der Riechschleimhaut im Nasendach hervorgerufen. Dabei können Aromastoffe entweder direkt über die Nase (orthonasal) oder beim Zerkauen und Schlucken eines Lebensmittels über den Rachenraum (retronasal) zur Riechschleimhaut gelangen (*Hildebrandt*, 2008). Der Geschmack wird hingegen in erster Linie durch die Wahrnehmung von nicht-flüchtigen, zumeist wasserlöslichen Substanzen im Mundraum induziert. Die Unterscheidung zwischen den fünf Grundgeschmacksqualitäten süß, salzig, sauer, bitter und umami ist inzwischen allgemein akzeptiert, wobei angenommen wird, dass jede Qualität mit einer ernährungsphysiologischen Eigenschaft oder potentiellen Gefahr assoziiert werden kann. So deutet ein süßer Geschmack auf die Anwesenheit von Kohlenhydraten und damit auf energiereiche Nahrung hin. Salziger Geschmack wird mit der Aufnahme von Natrium und weiteren Mineralien, die für den Elektrolythaushalt des Körpers wichtig sind, korreliert. Umamigeschmack weist auf einen hohen Proteingehalt eines Lebensmittels hin. Da viele

Giftstoffe vom Menschen als bitter wahrgenommen werden, soll ein bitterer Geschmack eine Aversion gegen ein bestimmtes Lebensmittel hervorrufen und dadurch die Aufnahme von potentiell toxischen Substanzen verhindern. Ebenfalls aversiv assoziiert ist ein intensiver saurer Geschmack. Dieser soll die Aufnahme von zu viel Säure, die den Säure-Base-Haushalt des Körpers beeinträchtigt sowie den Verzehr unreifer Früchte oder vergorener Nahrung unterbinden. Desweiteren sind sensorische Sinneseindrücke auch an der Aktivierung von Verdauungsvorgängen, beispielsweise der Freisetzung von Enzymen oder Anregung der Darmperistaltik, die für die Absorption der aufgenommenen Nahrung essentiell sind, beteiligt (*Chandrashekar et al.*, 2006; *Chaudhari und Roper*, 2010).

Für die Wahrnehmung aller fünf Grundgeschmacksarten konnten inzwischen spezifische chemosensorische Rezeptoren identifiziert werden, wobei die molekularen Prozesse, auf denen die Wahrnehmung der einzelnen Qualitäten basieren, sehr unterschiedlich sind. So werden saurer und salziger Geschmack ionotrop über Membrankanäle vermittelt. Süßer, bitterer und umami Geschmack hingegen werden metabotrop über G-Protein gekoppelte Rezeptorproteine (GPCR) transduziert. Dabei wird der bittere Geschmack von 25 Rezeptoren der Familie hTAS2R vermittelt, süßer Geschmack durch den heterodimeren hTAS1R2/hTAS1R3-Rezeptor und der Umamigeschmack durch den hTAS1R1/hTAS1R3-Rezeptor (*Chaudhari und Roper*, 2010). Ein weiterer sensorischer Eindruck, der vor allem beim Genuss von Rotwein, Tee oder Whiskey eine Rolle spielt ist die Adstringenz, die als raues und austrocknendes Gefühl im Mundraum wahrgenommen wird. Die molekularen Ursachen dieser Geschmacksempfindung sind jedoch noch nicht abschließend geklärt. Sowohl das Ausfällen von Speichelproteinen durch adstringierende Verbindungen und die damit verbundene Verminderung der Gleitfähigkeit des Speichels als auch eine Beteiligung von Rezeptoren werden in der Literatur diskutiert (*Bajec und Pickering*, 2008; *Lee et al.*, 2012).

Die Geschmacksrezeptoren sind hauptsächlich in den Geschmackspapillen der Zungenschleimhaut (linguale Mucosa) lokalisiert. Diese werden anhand ihrer Form in drei Arten unterteilt (**Abbildung 4 A**): Wallpapillen sind am hinteren Teil der Zunge zu finden und weisen ungefähr 1000 Geschmacksknospen auf. Die Blattpapillen befinden sich am Rand des hinteren Zungenteils und enthalten bis zu 100 Geschmacksknospen. Die Pilzpapillen, die im vorderen Teil der Zunge zu finden sind, besitzen nur einige wenige Geschmacksknospen (*Palmer*, 2007). Geschmacksknospen, weisen eine zwiebelartige Form auf, bestehen aus bis

zu 100 differenzierten, neuroepithalen Geschmackssinneszellen und sind inselartig in die Schleimhaut der Papillen eingebettet (**Abbildung 4 B**). Die apikalen Enden der Geschmackszellen sind eng zusammengefasst und besitzen haarförmige Strukturen (Mikrovilli), die in eine Pore, die Geschmackspore, ragen. Durch die Konzentrierung der spezifischen Geschmacksrezeptoren auf den Mikrovilli können oral aufgenommene Geschmacksstoffe in der Geschmackspore mit den Rezeptoren in Wechselwirkung treten (*Palmer, 2007*).

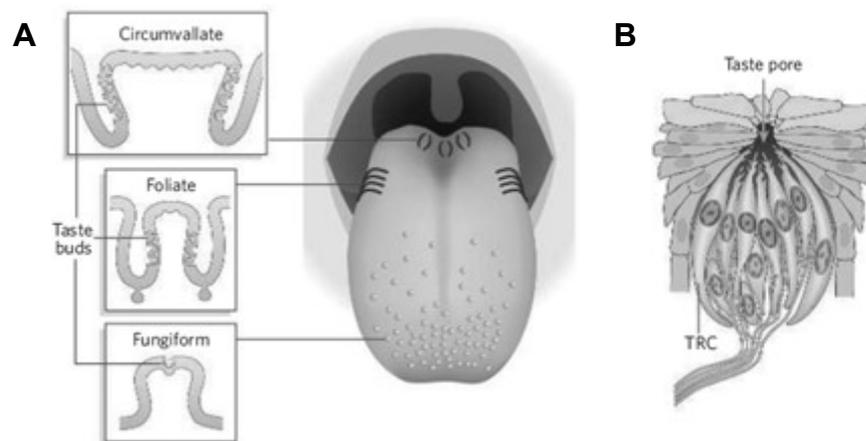


Abbildung 4. (A) Die drei Arten der Geschmackspapillen (Wallpapillen, Blattpapillen, Pilzpapillen) und ihr Vorkommen auf der Zunge. (B) Aufbau einer Geschmacksknospe. Mit leichten Veränderungen übernommen von Chandrashekar et al. (2006).

Bei den Geschmackssinneszellen werden aufgrund von Morphologie, funktionellen Eigenschaften und Genexpressionsmustern drei verschiedene Typen unterschieden: Typ I, Typ II und Typ III (**Abbildung 5**). Daneben existieren noch undifferenzierte Basalzellen und Trägerzellen. Für die am häufigsten vorkommenden Typ I Zellen konnte die selektive Expression von GLAST, NTPDase 2 und ROMK nachgewiesen werden. Bei GLAST (Glutamat/Aspartat Transporter) handelt es sich um ein Protein, das unter anderem in den Stützzellen (Gliazellen) des Innenohrs und der Retina identifiziert wurde und an der Aufnahme von Glutamat beteiligt ist. NTPDase 2 (Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 2) ist eine membrangebundene Nukleotidase, die extrazelluläres ATP hydrolisiert und den Neurotransmitter somit deaktiviert. Dies deutet auf eine Beteiligung der Typ I Zellen an der Unterbindung von synaptischer Reizweiterleitung hin. Dem Kaliumkanal ROMK (Renal Outer Medullary Potassium Channel) wird eine Beteiligung an der K^+ -Homöostase der

Geschmacksknospen durch Elimination überschüssigen Kaliums zugeschrieben. Dadurch wird die Anregbarkeit der Typ II und III-Zellen gewährleistet. Aufgrund der dargestellten Eigenschaften wird eine Funktion der Typ-I Zellen als Gliazellen angenommen. Zusätzlich wird eine Beteiligung an der Salzwahrnehmung vermutet, die aber noch bestätigt werden muss (*Chaudhari und Roper, 2010; Bigiani und Prandi, 2011*).

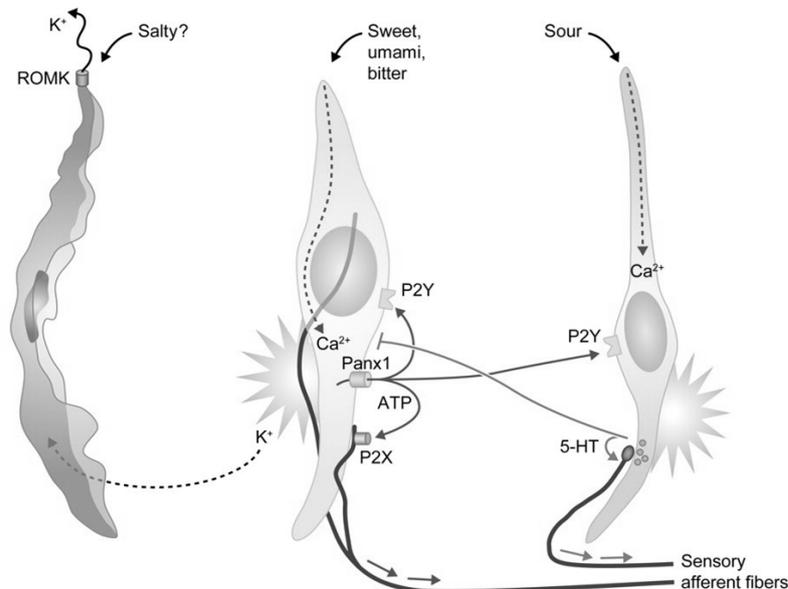


Abbildung 5. Die drei Typen der Geschmackssinneszellen: Glia-ähnliche Zellen (Typ I), Rezeptorzellen (Typ II) und Präsynaptische Zellen (Typ III). ROMK = Renal Outer Medullary Potassium channel; P2Y = ATP-Rezeptor; Panx1 = Pannexin 1; P2X = ATP-Rezeptor; 5-HT = 5-Hydroxytryptamin. Mit leichten Veränderungen übernommen von *Chaudhari und Roper (2010)*.

In den Membranen der auch als Rezeptorzellen bezeichneten Typ II Zellen wurden die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) für Süß-, Bitter- und Umamigeschmack lokalisiert. Dabei bildet jede Rezeptorzelle nur Rezeptoren für eine Geschmacksqualität aus und kann folglich auch nur von Liganden, die diesen bestimmten Rezeptor aktivieren stimuliert werden. Eine Aktivierung von Typ II Zellen durch saure oder salzige Substanzen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Weitere charakteristische Eigenschaften der Typ II Zellen sind die Ausbildung von spannungsgesteuerten Natrium- und Kaliumkanälen, Pannexin I, einem Halbkanal zur ATP-Freisetzung und von verschiedenen Rezeptoren, die für die Geschmackstransduktionskaskade essentiell sind. Interessanterweise bilden Rezeptorzellen keine Synapsen mit afferenten Nerven aus (*Chaudhari und Roper, 2010; Bigiani und Prandi, 2011*).

Typ III Zellen exprimieren Proteine, die die Fähigkeit zur Synapsenbildung mit Nervenenden besitzen, wie z.B. das SNAP-25 (Synaptosomal-assoziiertes Protein 25). Auch spannungsgesteuerte Calciumkanäle, die mit der Ausschüttung von Neurotransmittern assoziiert sind, wurden lokalisiert. Zusätzlich konnte die Freisetzung der Neurotransmitter 5-Hydroxytryptamin und Norepinephrin aus Typ III Zellen nachgewiesen werden. Daher werden diese auch als präsynaptische Zellen bezeichnet. Eine Hauptfunktion der Typ III Zellen ist die Weiterleitung von Signalen der Rezeptorzellen (Typ II). Desweiteren konnte eine unmittelbare Aktivierung durch saure Verbindungen und Kohlensäure nachgewiesen werden (*Chaudhari und Roper, 2010; Bigiani und Prandi, 2011*).

Die Stimulation von Rezeptorzellen durch süß, bitter oder umami schmeckende Substanzen induziert eine Signaltransduktionskaskade, die inzwischen im Detail bekannt ist. Nach Bindung eines Geschmacksstoffes aktivieren die G-Protein gekoppelten Rezeptoren heterotrimere GTP (Guanosintriphosphat)-bindende Proteine. Im Fall des Bitterrezeptors sind dies α -Gustducin und α -Transducin, beim Süß- und Umamirezeptor vor allem $G\alpha_{14}$. Die jeweils freigesetzte dimere $G\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert die Phospholipase $PLC\beta_2$, welche die Spaltung von membrangebundenem Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphat (PIP_2) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3) katalysiert. Im Folgenden induziert IP_3 die Öffnung von IP_3R -Ionenkanälen des Endoplasmatischen Reticulums (ER), wodurch Ca^{2+} Ionen aus dem ER ins Cytosol freigesetzt werden. Die erhöhte Calciumkonzentration bewirkt den Einstrom von Natriumionen durch $TrpM5$ -Kanäle (transient receptor potential channel) in die Zelle, die dadurch depolarisiert wird. Überschreitet das Depolarisationspotential einen bestimmten Schwellenwert, entsteht ein Aktionspotential, das in Kombination mit dem erhöhten Ca^{2+} -Spiegel die Ausschüttung des Neurotransmitters ATP aus der Zelle durch den Halbkanal Pannexin 1 zur Folge hat. ATP aktiviert dann über Rezeptoren ($P2X$, $P2Y$) sowohl die präsynaptischen Zellen der Geschmacksknospen als auch afferente Nervenfasern, die sich in der Nähe der Rezeptorzelle befinden (*Chaudhari und Roper, 2010*). Durch die Weiterleitung über Nervenfasern des *Nervus facialis*, *Nervus glossopharyngeus* und *Nervus vagus* gelangt das Signal zum Hirnnervenkern *Nucleus tractus solitarii* und von dort weiter in die Geschmackfelder der Gehirnrinde im Bereich des *Gyrus postcentralis* (*Bachmanov und Beauchamp, 2007; Hildebrandt, 2008*).

1.3.2 Süß-, Umami- und Bittergeschmack

Die metabotrope Vermittlung von Süß-, Umami- und Bittergeschmack durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren ist inzwischen allgemein anerkannt. Süßer und Umami Geschmack werden durch heterodimere Rezeptorproteine der hTAS1R-Familie transduziert, wobei der Süßrezeptor aus dem Dimeren hTAS1R2/hTAS1R3 und der Umamirezeptor aus den Dimeren hTAS1R1/hTAS1R3 aufgebaut ist. Die Wahrnehmung des Bittergeschmacks erfolgt durch 25 Rezeptoren, die zur hTAS2R-Familie gehören (*Bachmanov und Beauchamp, 2007; Chaudhari und Roper, 2010*).

Süß- und Umamigeschmack

Die hTAS1R-Proteine, die an der Wahrnehmung des Süß- und Umamigeschmacks beteiligt sind, werden zur Klasse C der GPCR gezählt, weisen eine Länge von ca. 850 Aminosäuren auf und zeichnen sich durch einen kurzen intrazellulären C-Terminus, eine heptahelicale Transmembrandomäne (7-TM) sowie einen langen, extrazellulären N-Terminus aus. Letzterer unterteilt sich in die aus ca. 80 Aminosäuren bestehende cysteinreiche Region (CRD) und das Venusflytrap Modul (VFTM) (**Abbildung 6**). Das VFTM ist durch eine zangenähnliche Form charakterisiert, bei der unterer und oberer Flügel durch die sogenannte Scharnierregion verbunden sind (*Pin et al., 2003; Urwyler, 2011*).

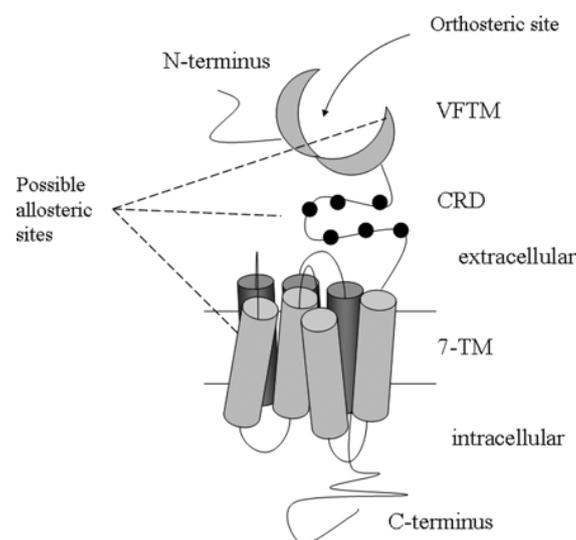


Abbildung 6. Schematische Darstellung eines Rezeptors der Familie T1R. VFTM = Venus Fly Trap Module; CRD = cysteinreiche Domäne; 7-TM = heptahelicale Transmembrandomäne. Abbildung übernommen von *Urwyler (2011)*.

Die Expression von sowohl TAS1R1, TAS1R2 und auch TAS1R3 in den Geschmackssinneszellen verschiedener Säuger wurde um die letzte Jahrtausendwende durch mehrere Arbeitsgruppen nachgewiesen. Da vor allem das Vorkommen von TAS1R3 mit der Wahrnehmung süßer Liganden korreliert werden konnte, wurde für dieses Protein eine Rolle als Süßrezeptor postuliert (Hoon *et al.*, 1999; Bachmanov *et al.*, 2001). Desweiteren wurde die Coexpression von jeweils 2 TAS1R-Proteinen in einzelnen Geschmackssinneszellen nachgewiesen, wobei vor allem TAS1R2 und TAS1R3 sowie TAS1R1 und TAS1R3 gemeinsam vorkamen. Dies wies auf die Bildung von funktionellen Heterodimeren hin (Montmayeur *et al.*, 2001; Max *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2001). Die Annahme, dass das Heterodimer TAS1R2/TAS1R3 für die Vermittlung des Süßgeschmacks verantwortlich ist, wurde von Nelson *et al.* (2001) sowie Li *et al.* (2002) anhand funktioneller Zellassays bewiesen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK-293), die durch Transfektion den TAS1R2/TAS1R3-Rezeptor sowie alle für die Signaltransduktionskaskade notwendigen Faktoren ausbildeten, zeigten eine deutliche Aktivierung durch die Applikation diverser Süßstoffe. Zellen, die jeweils nur eine der beiden TAS1R-Untereinheiten exprimierten, zeigten hingegen keine Aktivierung. Dieses Ergebnis wurde 2003 durch Untersuchungen an TAS1R2- bzw. TAS1R3-Knockout-Mäusen (Zhao *et al.*) bestätigt. Interessanterweise ergeben sich Unterschiede in der Wahrnehmung süßer Liganden durch den Süßrezeptor verschiedener Spezies. So werden z.B. Aspartam, Cyclamat oder verschiedene Proteine vom Menschen als süß empfunden, von Nagern hingegen nicht. Diese Diskrepanz half im Folgenden, um die Bindungsstellen zahlreicher süßer Liganden am Rezeptor genau zu lokalisieren (**Abbildung 7**).

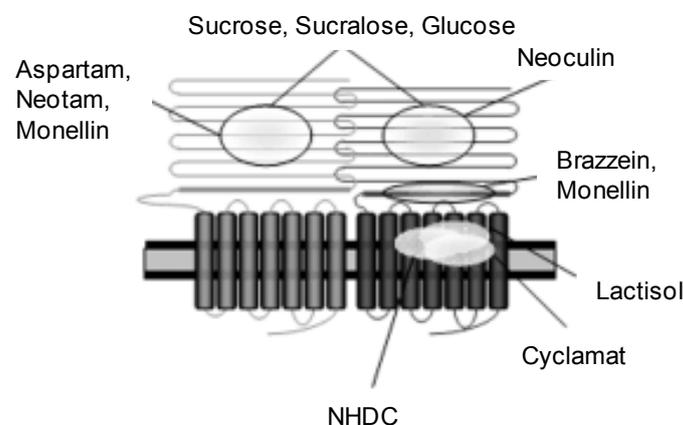


Abbildung 7. Bindungsstellen verschiedener süßer Liganden am TAS1R2/TAS1R3-Rezeptor. NHDC = Neohesperidin-dihydrochalkon. Abbildung übernommen von Behrens *et al.* (2011).

Experimente mit Inter-Spezies-Chimären des Rezeptors oder gezielten Punktmutationen an jeweils einer Untereinheit zeigten, dass die Rezeptorproteine die Süßstoffe Aspartam, Neotam und Monellin an die Venus Fly Trap Domäne der TAS1R2-Untereinheit binden, während Neoculin an entsprechender Stelle der TAS1R3-Einheit bindet (*Xu et al.*, 2004; *Jiang et al.*, 2005a). Als weitere Bindungsstelle für Monellin wurde die Cysteinreiche Region von TAS1R3 identifiziert, an die auch Brazzein bindet (*Jiang et al.*, 2004). Cyclamat und Neohesperidin-dihydrochalcon sowie der Süßinhibitor Lactisol interagieren mit der T1R3-Transmembrandomäne (*Jiang et al.*, 2005b, c; *Winning et al.*, 2007). Biophysikalische Messungen zur Bindungsaffinität zeigten die Notwendigkeit der Venus Fly Trap Domänen beider Untereinheiten für die Detektion der Zucker Glucose und Saccharose sowie des strukturverwandten, nicht-kalorischen Süßstoffes Sucralose (*Nie et al.*, 2005).

Die Deorphanisierung des Umamirezeptors erfolgte auf gleiche Art wie die des Süßrezeptors und führte zur Bestätigung des postulierten Heterodimers TAS1R1/TAS1R3. Funktionelle Zellassays mit dem TAS1R1/TAS1R3 verschiedener Spezies zeigten, dass der Rezeptor von Mäusen durch fast alle der 20 proteinogenen L-Aminosäuren, aber nicht deren D-Enantiomere, stimuliert wurde, wohingegen der humane TAS1R1/TAS1R3 lediglich sensitiv gegenüber L-Glutamat und L-Aspartat war. Dieser Effekt wurde beim Rezeptor beider Spezies durch die bekannten Umamiverstärker Inosin-5'-monophosphat (IMP) und Guanosin-5'-monophosphat (GMP) noch potenziert (*Li et al.*, 2002; *Nelson et al.*, 2002; *Zhao et al.*, 2003). Allerdings zeigten Untersuchungen zur Reizweiterleitung des *Nervus chorda tympani* und *Nervus glossopharyngeus* von T1R3-Knockout-Mäusen konträre Resultate (*Damak et al.*, 2003). Vor allem der *Nervus glossopharyngeus* der Knockout-Mäuse zeigte nach Stimulation mit L-Glutamat und IMP eine ähnlich starke Anregung wie bei den Wildtyp-Mäusen. Auch wenn ein Beitrag des TAS1R1/TAS1R3-Rezeptors bereits verifiziert wurde, weist dieses Ergebnis auf das Vorkommen weiterer Umamirezeptoren hin. Als weitere Kandidaten wurden die ebenfalls G-Protein gekoppelten metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR1 und mGluR4 oder der N-Methyl-D-Aspartate-Type Ion Channel (NMDA) postuliert (*Chaudhari et al.*, 2000; *Delay et al.*, 2000; *Damak et al.*, 2003; *Maruyama et al.*, 2006; *Yoshida et al.*, 2009).

Bittergeschmack

Die Bitterrezeptoren, die der TAS2R-Familie zugeordnet werden, weisen ebenfalls eine 7-helicale Transmembrandomäne auf. Im Gegensatz zu den Rezeptoren der TAS1R-Familie besitzen sie jedoch nur einen sehr kurzen extrazellulären N-Terminus (*Bachmanov und Beauchamp, 2007*). Die Rolle dieser Proteine als Bitter-Rezeptoren wurde erstmals 2000 von *Adler et al.* sowie *Matsunami et al.* beschrieben und durch weitere Autoren bestätigt (z.B. *Chandrashekar et al., 2000; Bufe et al., 2002; Behrens et al., 2004; Kuhn et al. 2004; Pronin et al., 2004*). Inzwischen sind beim Menschen 25 funktionelle TAS2R-Rezeptoren bekannt. Ein umfassendes zellbasiertes Screening zur Aktivierung der einzelnen Bitterrezeptoren ergab, dass die „Generalisten“-Rezeptoren hTAS2R10, hTAS2R14 und hTAS2R46 von jeweils ca. 30 Liganden stimuliert wurden, und in der Summe auf ungefähr 50 % der verwendeten 104 Substanzen ansprachen. Der Großteil der untersuchten Rezeptoren wurde durch eine mittlere Anzahl Liganden aktiviert und nur zwei „Spezialisten“-Rezeptoren wurden durch jeweils eine einzige Verbindung angeregt (*Meyerhof et al., 2010*). Weiterhin zeigte sich, dass genetische Variationen einiger Bitterrezeptoren zu Unterschieden in der Wahrnehmung einzelner Bitterstoffe führen können. Die Fähigkeit die Verbindungen Propylthiouracil (PROP) und Phenylthioharnstoff (PTC) sensorisch wahrzunehmen hängt zum Beispiel von Polymorphismen des TAS2R38-Rezeptors ab, wobei Punktmutationen an drei Positionen (49, 262 und 296) des Rezeptorproteins für die Unterscheidung in „Taster“ und „Non-Taster“ verantwortlich sind (*Kim et al., 2003; Bufe et al., 2005*).

Jüngste Untersuchungen zur Lokalisierung der Bindungsstellen zwischen Bitterrezeptoren und Liganden, basierend auf Einpunktmutationen, funktioneller Expression und Software-gestütztem Modelling, deuten darauf hin, dass diese jeweils in der oberen Hälfte der heptahelicale Transmembrandomäne zu finden sind. Die Annahme, dass wenige Aminosäuren im Bereich der postulierten Bindungstasche für die Interaktion mit einem Liganden verantwortlich sind, bestätigte sich für alle untersuchten Rezeptoren durch gezielte Änderungen der Aminosäuresequenz. Diese hatte jeweils ein verändertes Ligandenspektrum zur Folge. Allerdings kann auch eine Beteiligung der Aminosäurereste der extrazellulären Schleifen 1 und 2 an der Ligandenbindung nicht ausgeschlossen werden (*Brockhoff et al., 2010; Biarnes et al., 2010*).

1.3.3 Saurer und salziger Geschmack

Die molekularen Grundlagen auf denen die ionotrope Wahrnehmung des salzigen und sauren Geschmacks beruht, sind weniger gut charakterisiert als die für süße, bittere und umami Qualität.

Seit langem wurde für die Detektion von salzigen Liganden, vor allem von Natrium-Ionen, die Beteiligung des Ionenkanals ENaC (Epithelial Sodium Channel) vermutet (*Lindemann, 2001*). Dieser besteht aus drei Untereinheiten und ermöglicht den Einstrom von Natriumionen in die Geschmackssinneszelle. Der immunohistochemische Nachweis des Ionenkanals in Wall- und Pilzpapillen und die funktionelle Expression in Oozyten (*Stähler et al., 2008*) sowie Untersuchungen an Knockout-Mäusen, die selektiv in den Geschmackssinneszellen keine ENaCs exprimierten (*Chandrashekar et al., 2010*) konnten diese Vermutungen bestätigen. Weiterhin wurde durch die Autoren gezeigt, dass der Ionenkanal nicht auf den Typ II-Geschmackssinneszellen (Rezeptorzellen für süß, bitter und umami) exprimiert wird, sondern auf einem anderen Typ der Geschmackssinneszellen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Studien von *Vandenbeuch et al. (2008)*, die aufgrund von Patch-Clamp-Versuchen eine Beteiligung der Typ I Geschmackssinneszellen an der Salzwahrnehmung postulierten. Da allerdings salzige Verbindungen, die kein Natrium enthielten, von den ENaC-Knockout-Mäusen wahrgenommen werden konnten, ist das Vorkommen weiterer Rezeptoren zur Transduktion des Salzgeschmacks sehr wahrscheinlich (*Chandrashekar et al., 2010*). Als mögliche Kandidaten wurden eine Variante des Vanilloidrezeptors TRPV1 oder der Ionenkanal TRPML3 postuliert (*Treesukosol, 2007; Moyer et al., 2009*).

Typ III Geschmacksrezeptorzellen werden durch saure Liganden aktiviert (*Tomchik et al., 2007*), allerdings konnte noch keine endgültige Identifizierung der verantwortlichen Rezeptoren erbracht werden. In der Vergangenheit wurden verschiedene Rezeptoren, wie der HCN1 und HCN4 (Hyperpolarization-activated-channel), ASIC (Acid-sensitive ion channel), GPR4 (Protonen-selektiver Kanal) oder K2P (säure-sensitiver Kaliumkanal) angenommen, ihre Beteiligung jedoch nicht abschließend verifiziert (*Stevens et al., 2001; Ludwig et al., 2003; Huang et al., 2006; Dotson, 2010*).

Kürzlich wurden die beiden Proteine PKD1L3 und PKD2L1 (Polycystic Kidney Disease like Proteins) von verschiedenen Autoren als mögliche Sauerrezeptoren postuliert. Die Ionenkanäle dimerisieren *in vitro* zwar zu einem säuresensitiven Kanal (*Ishimaru et al., 2006*), konnten *in vivo* bisher aber nur an unterschiedlichen Bereichen auf der Zunge

lokalisiert werden (*Ishimaru et al.*, 2006; *Huang et al.*, 2006). Untersuchungen mit Mäusen, die aufgrund von gezielter genetischer Veränderung keine PKD2L1-exprimierenden Geschmackssinneszellen aufwiesen und keine Wahrnehmung von sauren Verbindungen zeigten, deuteten stark auf einen Beitrag von PKD2L1 zur Sauerperzeption hin. Diese Annahme wurde 2010 von der Gruppe um *Nelson* untermauert, die anhand von Versuchen mit PKD1L3-Knockout-Mäusen zeigten, dass eine Beteiligung des PKD1L3-Ionenkanals unwahrscheinlich ist. Die endgültige Verifizierung von PKD2L1 als Sauerrezeptor durch Knockout-Mäuse steht allerdings noch aus.

1.3.4 Molekulare Grundlagen der Geschmacksverstärkung

Verbindungen, die selber keinen oder nur einen geringen Eigengeschmack aufweisen, den Geschmack anderer Substanzen aber deutlich erhöhen, werden als Geschmacksverstärker oder positiv allosterische Modulatoren (PAM) bezeichnet. Das wohl bekannteste Beispiel für eine solche Modulation ist der synergistische Effekt der Purin-5'-Ribonukleotide Inosin-5'-Monosphosphat (IMP) und Guanosin-5'-Monophosphat (GMP) auf den umami Geschmack von Mononatriumglutamat (MSG). Dieser wird durch geringe Mengen von IMG oder GMP um ein Vielfaches erhöht, wobei GMP der potentere Geschmacksmodulator ist (*Kuninaka*, 1967; *Yamaguchi*, 1967; *Yamaguchi et al.*, 1971). Durch Kenntnis des umami-vermittelnden Rezeptors hTAS1R1/hTAS1R3 konnten die biomolekularen Grundlagen dieser seit langem bekannten Modulation inzwischen geklärt werden. *Zhang et al.* (2008) generierten chimäre T1R-Rezeptoren, von denen der eine den N-Terminus des T1R1-Rezeptors und die Transmembrandomäne der Süßrezeptoruntereinheit T1R2 und der andere die konträre Konformation aufwies. Diese chimären Rezeptoren wurden jeweils zusammen mit der von Ratten stammenden T1R3-Untereinheit zu einem funktionellen Rezeptor exprimiert und mit umami schmeckenden Liganden stimuliert. Dabei zeigte nur der Rezeptor, der den T1R1-N-Terminus trug eine Aktivierung durch Glutamat und Aspartat, die jeweils durch IMP bzw. GMP deutlich erhöht wurde. Somit konnte erstmals die N-terminale, extrazelluläre Region der T1R1-Untereinheit als Bindungsstelle am Umamirezeptor lokalisiert werden. In Übereinstimmung mit sensorischen Daten führte die alleinige Applikation der Nukleotide hingegen zu keiner Rezeptoraktivierung. Weiterführende Experimente, die auf Molecular Modelling in Kombination mit Mutationen beruhten, erlaubten die Offenlegung des Mechanismus, der dem synergistischen Effekt zugrunde liegt. Während Glutamat nahe der

Scharnierregion des Venus Fly Trap Moduls bindet und eine Schließung der beiden Flügel induziert, stabilisiert IMP bzw. GMP die geschlossene Konformation durch Koordination des negativ geladenen Phosphatrestes an die positiv geladenen Aminosäurereste der beiden Flügel (*Zhang et al.*, 2008).

Für den süßen Geschmack sind zwar synergistische Effekte durch Mischungen zweier oder mehrerer süßer Liganden bekannt (z.B. *Wells*, 1989; *Schiffman et al.*, 1995; *Schiffman et al.*, 2000), natürlich vorkommende PAMs, die eine Süßverstärkung hervorrufen, wurden bisher allerdings noch nicht beschrieben. Kürzlich gelang *Servant et al.* (2010) durch ein umfangreiches, zellbasiertes Screening die Charakterisierung der süßmodulierenden Eigenschaften dreier synthetisierter heterocyclischer Verbindungen. Diese wiesen im Zellassay bei alleiniger Applikation keine Aktivierung des Süßrezeptors auf, verstärkten die Aktivierung durch Sucralose, Saccharose und Neotam jedoch deutlich. Für andere eingesetzte Süßstoffe wie z.B. Saccharin, Steviosid, Cyclamat, Neohesperidin-dihydrochalcon oder Thaumatin konnte hingegen keine Süßverstärkung durch die drei Verbindungen gefunden werden. Diese Ergebnisse wurden durch parallel durchgeführte humansensorische Experimente untermauert. Die gleiche Arbeitsgruppe bestätigte die Vermutung, dass die molekularen Grundlagen der Süßverstärkung, aufgrund der Ähnlichkeit von Süß- und Umami-Rezeptor, denen der umami Verstärkung entsprechen (*Zhang et al.*, 2010). Auch hier stabilisiert der Modulator die geschlossene Konformation der Venus Fly Trap, die durch Bindung des Liganden in der Scharnierregion induziert wird.

Eine weitere Geschmacksqualität, die durch die Wirkung von Geschmacksmodulatoren hervorgerufen wird ist die Kokumi-Qualität. Diese wurde von der japanischen Gruppe um *Ueda* (1990) erstmals beschrieben und definiert einen langanhaltenden, komplexen, vollmundigen Geschmackseindruck in würzigen Lebensmitteln. *Ueda et al.* (1990, 1994, 1997) isolierten verschiedene Verbindungen wie z.B. Glutathion, Alliin und Propenyl-L-Cystein-Sulfoxid aus Knoblauch und Zwiebeln. Diese Substanzen wiesen zwar keinen Eigenschmack auf, modulierten in wässriger Lösung aber den durch Natriumglutamat (MSG) und Inosin-5'-Monophosphat (IMP) hervorgerufenen Geschmack. Als weitere Kokumi-Verbindungen wurde eine Reihe von γ -Glutamyl-Dipeptiden identifiziert, die aus Bohnen und Goudakäse isoliert wurden (*Dunkel et al.*, 2007; *Toelstede et al.*, 2009). Da HEK-Zellen, die den Calcium-sensitiven-Rezeptor (CaSR) exprimierten, durch zahlreiche Kokumi-Verbindungen angeregt wurden, postulierten *Ohsu et al.* (2010) die Beteiligung des ebenfalls zur Klasse C gehörenden GPCR an der Wahrnehmung der Geschmacksmodulation. Anhand

von immunohistochemischen Techniken und Immunofluoreszenz gelang im Folgenden die Identifizierung des Rezeptors in Typ II und Typ III Geschmackssinneszellen von Mäusen (*Maruyama et al.*, 2012). Eine Rolle des CaSR bei der Vermittlung des Kokumi-Effekts kann daher angenommen werden. Die Frage, warum die Aktivierung des Rezeptors nur in Kombination mit der Vermittlung anderer Geschmacksqualitäten wie z.B. Umami zu einer Geschmackswahrnehmung führt, macht allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

1.4 Analytik von Geschmacksstoffen

Die Gesamtheit an niedermolekularen, sensorisch aktiven Verbindungen, die den charakteristischen Geschmack eines Lebensmittels hervorruft, wird als dessen Sensometabolom bezeichnet (*Toelstede und Hofmann*, 2008b). Die Analytik des nicht-flüchtigen Sensometaboloms umfasst sowohl die Strukturidentifizierung und Charakterisierung der sensorischen Eigenschaften der einzelnen Geschmacksstoffe, als auch deren Quantifizierung in einem Lebensmittel. Anhand einer Kombination von instrumentell-analytischen und humansensorischen Verfahren können die Schlüsselgeschmacksstoffe in einer komplexen Lebensmittelmatrix erfasst werden. Die Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA), die von *Frank et al.* (2001) entwickelt wurde, beruht auf einer aktivitätsorientierten Fraktionierung eines Lebensmittels. Dieses wird durch flüssigchromatographische Trennverfahren in mehrere Fraktionen unterteilt, welche nach Gefriertrocknung wieder in ihrer jeweils natürlichen Konzentration in Wasser aufgenommen werden. Nach sukzessiver Verdünnung mit Wasser werden die einzelnen Fraktionen sensorisch evaluiert, wobei die Verdünnungsstufe, bei der gerade noch ein Geschmackseindruck wahrnehmbar ist, als der Geschmacksverdünnungsfaktor (GV) definiert wird. Je geschmacksaktiver eine Fraktion ist, umso höher ist demnach der ermittelte GV-Faktor. Somit können weiterführende Isolierungsarbeiten auf besonders geschmacksaktive Fraktionen konzentriert werden. Durch Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse gelang in der Vergangenheit die erfolgreiche Identifizierung der Schlüsselgeschmacksstoffe in verschiedenen Lebensmitteln, darunter z.B. Kakao (*Stark et al.*, 2005), schwarzem Tee (*Scharbert et al.*, 2004a), Rotwein (*Hufnagel und Hofmann*, 2008a), Goudakäse (*Toelstede und Hofmann*, 2008a) oder Spinat (*Brock und Hofmann*, 2008).

Bei einem isolierten Geschmacksstoff sind neben der jeweiligen Geschmacksqualität die Kenntnisse über dessen Geschmacksaktivität und Konzentration in einem Lebensmittel relevante Faktoren zur Wirkungsbeurteilung der jeweiligen Verbindung. Deshalb wird zunächst der Schwellenwert, der die in wässriger Lösung gerade noch wahrnehmbare Konzentration angibt, ermittelt. Für die genaue und präzise Quantifizierung ist vor allem die massenspektrometrische Analyse unter Verwendung von stabilisotopenmarkierten Standards, die die gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften wie die Analyten aufweisen, geeignet. Bei dieser als Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) bezeichneten Methode können durch Zugabe von isotonenmarkierten Referenzen Verluste an Analyten bei der Aufarbeitung der Proben kompensiert werden (*Rychlik und Assam, 2008; Schieberle und Molyneux, 2012*). Für die anschließende Korrelation des Schwellenwertes mit der in einem Lebensmittel enthaltenen Konzentration einer Verbindung wurde von *Warmke et al. (1996)* der sogenannte Geschmacksaktivitätswert (GAW) eingeführt. Der GAW, der sich aus dem Quotienten von Konzentration und Schwellenwert ergibt, sollte als Maß für den Beitrag dienen, den eine Substanz zum Gesamtgeschmack leistet. Da zwischen Intensität und Konzentration eines Geschmacksstoffes allerdings meistens kein linearer Zusammenhang besteht und zudem auch Wechselwirkungen mit anderen Inhaltsstoffen auftreten können, ist der GAW-Wert nur bedingt zur Beurteilung des Geschmacksbeitrags geeignet. Daher wurde der GAW von *Scharbert et al. (2004b)* durch den Begriff des Dose-over-Threshold Faktors (DoT) ersetzt, der lediglich angibt, um welchen Faktor über oder unter ihrem Schwellenwert eine Verbindung in einem Lebensmittel vorliegt. Dabei wird angenommen, dass nur Substanzen, die einen DoT-Faktor $\geq 1,0$ aufweisen einen direkten Beitrag zum Geschmack leisten. Geschmacksstoffe mit einem DoT $< 1,0$ können jedoch aufgrund additiver Effekte Einfluss auf den Geschmack ausüben, sofern sie den gleichen Geschmacksrezeptor aktivieren.

Der Einfluss der Konzentration auf die Geschmacksintensität einer Substanz wurde erstmals von *Stark und Hofmann (2005b)* durch Aufnahme von Dosis/Wirkungskurven (Dose-Response) für die Schlüsselgeschmacksstoffe in Kakao erfasst. Dosis/Wirkungskurven zeigen oftmals einen sigmoiden Verlauf und erlauben in Kombination mit dem DoT-Faktor eine gute Einschätzung des individuellen Geschmacksbeitrags einzelner Verbindungen.

Eine weitere wichtige Dimension, nämlich der zeitliche Verlauf einer Geschmackswahrnehmung, kann durch die von *Larson-Powers und Pangborn (1979)* etablierte Time-Intensity Methode (TI) dargestellt werden. Die kontinuierliche Bewertung der Intensität einer Geschmacksqualität vom Beginn bis zum völligen Abklingen der

Wahrnehmung führt dabei zum Erhalt von charakteristischen TI-Kurven für einzelne Substanzen. Die Auswertung der Kurven, bei denen die Intensität auf der y- und die Wahrnehmungsdauer auf der x-Achse aufgetragen wird, erlaubt im Folgenden eine genauere Analyse. Durch getrennte Auswertung der ansteigenden Phase der Kurve, Phase um das Intensitätsmaximum herum (Plateau-Phase) und abfallenden Phase der Kurve kann das TI-Verhalten einer Verbindung am besten charakterisiert werden (*Cliff und Heymann, 1993*). Vor allem für süße Verbindungen ist die Time-Intensity Analyse eine geeignete Methode, da sich kalorische Süßungsmittel und artifizielle Süßstoffe oft deutlich in ihrem TI-Profil unterscheiden. So zeigen z.B. Aspartam und Acesulfam K bei gleicher maximaler Intensität eine signifikant länger anhaltende Süße als Saccharose, wobei für Acesulfam K gleichzeitig ein schnelleres Erreichen der maximalen Intensität zu beobachten ist. Sucralose hingegen weist ein zu Saccharose ähnliches Intensitäts/Zeit-Verhalten auf (*Ott et al., 1990; Schiffman et al., 1993; Cjmelova et al., 2009*).

Anhand von Rekombinationsexperimenten kann anschließend die Vollständigkeit und Richtigkeit der ermittelten Daten überprüft werden. Dazu wird unter Berücksichtigung aller erhaltenen quantitativen Daten ein Geschmacksrekombinat generiert und im Vergleich zum authentischen Lebensmittel durch eine Geschmacksprofilanalyse sensorisch beurteilt. Weiterhin können durch Omissionsexperimente, bei denen sukzessive Geschmacksstoffgruppen oder einzelne Verbindungen aus dem Rekombinat weggelassen werden, die Schlüsselgeschmacksstoffe identifiziert werden (*Warendorf et al., 1992; Warmke et al., 1996; Schlichtherle-Cerny und Grosch, 1998*).

Die erfolgreiche Etablierung von funktionellen Zellassays erlaubt inzwischen die Korrelation physiologischer mit human-sensorischen Daten. Dazu werden HEK-Zellen verwendet, die die entsprechenden GPCR anhand von Induktion oder Transfektion exprimieren. Durch die G-Protein-Chimäre Ga15Gai3 sind diese an die Signaltransduktionskaskade gekoppelt. Die intrazelluläre Calciumausschüttung, die durch eine Rezeptoraktivierung induziert wird, kann anhand eines vorher applizierten, Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht werden. Die Größe des detektierten Fluoreszenzsignals ist dabei von der Menge an Calcium und somit der Stärke der Rezeptoraktivierung abhängig. Automatisierte Analyseabläufe und die Verwendung von 96-Well-Platten ermöglichen systematische und umfangreiche *in-vitro* Experimente zur Rezeptoraktivierung durch verschiedene Liganden (*Nelson et al., 2001; Bufe et al., 2002; Li et al., 2002*). Diese als Fluorescence-Imaging-Plate-Reading (FLIPR) bezeichnete Methode erlaubte in der Vergangenheit bereits die Identifizierung der

molekularen Grundlagen, die dem bitteren Nachgeschmack der Süßstoffe Acesulfam K und Saccharin sowie vieler Steviolglykoside zugrunde liegen. Neben dem Süßrezeptor werden durch erstere auch die Bitterrezeptoren hTAS2R43 und hTAS2R44 und durch letztere hTAS2R4 und hTAS2R14 aktiviert (Kuhn *et al.*, 2004; Hellfritsch *et al.*, 2012). Intelmann *et al.* (2009) konnten humansensorische Daten für iso- α -Säuren, die am Bittergeschmack von Bier beteiligt sind, mit *in vitro* Daten zur Rezeptoraktivierung korrelieren. Die molekularen Grundlagen der umami-verstärkenden Eigenschaften verschiedener GMP-Amide, die während der Maillardreaktion durch Glykierung von GMP gebildet werden, konnten ebenfalls durch FLIPR-Experimente untermauert werden (Festring und Hofmann, 2010; Festring *et al.*, 2011).

1.5 Sensorisch aktive Verbindungen in Käse

Käse wird nicht nur aufgrund seines hohen Nährwerts und seiner vielfältigen Zubereitungsmöglichkeiten, sondern auch wegen seiner angenehmen sensorischen Eigenschaften weltweit als Nahrungsmittel geschätzt und konsumiert. Aufgrund der Verwendung verschiedener Milchsorten, unterschiedlicher Herstellungsverfahren und Reifezeiten ist eine sehr große Anzahl verschiedener Sorten erhältlich, die eine ebenso große sensorische Vielfalt aufweisen (Delahunty und Drake, 2004). Letztere ist vor allem auf den durch die verschiedenen Verfahren bedingten, variierenden Abbau der Milchinhaltsstoffe zurückzuführen. Somit resultieren unterschiedliche Metabolisierungen von Lactose (Glykolyse), Proteinen und deren Spaltpeptiden (Proteolyse und Peptidolyse) sowie Fett (Lipolyse) in einer Vielzahl an verschiedenen Aroma- und Geschmacksstoffen in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen (McSweeney, 1997).

Erste Untersuchungen über die für den Geruch verantwortlichen, flüchtigen Aromastoffe in Käse stammen aus den 1960er und 1970er Jahren (Le Quere, 2004). Seitdem ist eine große Anzahl an flüchtigen Verbindungen in verschiedenen Käsesorten identifiziert, charakterisiert und ihr individueller Beitrag zum Aroma untersucht worden. So konnten zum Beispiel die Schlüsselaromastoffe in Cheddar (Milo und Reineccius, 1997), Emmentaler (Preininger und Grosch, 1994; Preininger *et al.*, 1996), Camembert (Kubickova und Grosch, 1997, 1998a, b), Ziegenkäse (Le Quere *et al.*, 1996; Le Quere und Salles, 2001) oder auch Parmesankäse (Gröhnke, 2010) umfassend beschrieben werden. Die für Parmesankäse relevanten,

aromaaktiven Verbindungen und ihre jeweiligen Geruchsqualitäten sind in **Abbildung 8** dargestellt.

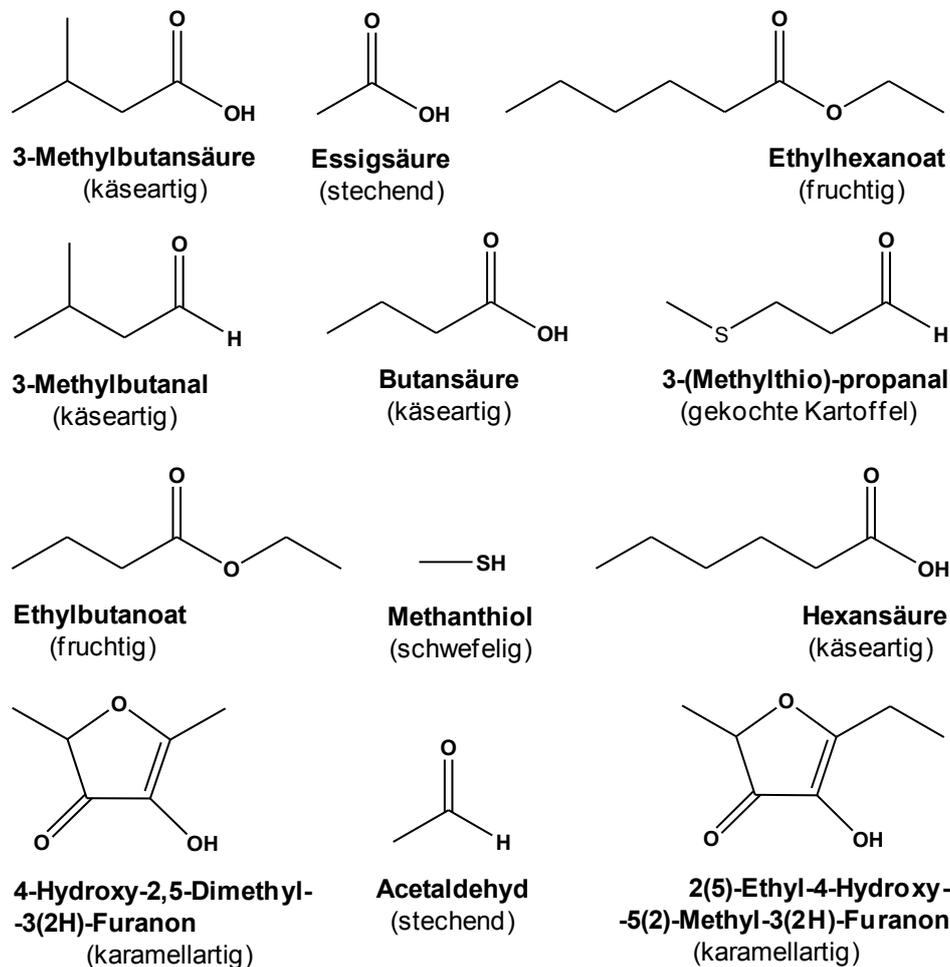


Abbildung 8. Schlüsselaromastoffe in Parmesankäse, in Anlehnung an *Gröhnke (2010)*.

Den größten Beitrag leisten die stechend-saure Essigsäure, die nach Käse riechende Butter- und Hexansäure, das fruchtige Ethylbutanoat, die schwefeligen Substanzen Methanthiol und 3-(Methylthio)-propanal sowie die karamellartigen Verbindungen 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanon und 2(5)-Ethyl-4-Hydroxy-5(2)-Methyl-3(2H)-Furanon.

Im Gegensatz zu den Aromastoffen lag die Charakterisierung der nicht-flüchtigen, geschmacksaktiven Verbindungen in Käse bisher weniger im Fokus der Forschung. Arbeiten an unterschiedlichen Käsesorten, wie z.B. Cheddar (*McGugan et al., 1979; Aston und Creamer, 1986; Drake et al., 2007*), Schweizer Käse (*Biede und Hammond, 1979a, b; Drake et al., 2007*), Ziegenkäse (*Engel et al., 2000a, b*) oder Camembert (*Kubickova und Grosch,*

1998a, b; Engel et al., 2001a, b, c) führten zur Postulierung zahlreicher Geschmacksstoffe. Diese sind im nächsten Abschnitt zusammengefasst und einige, wie das umami schmeckende Mono-Natriumglutamat, das süße L-Prolin, das kokumi-modulierende γ -L-Glutamyl-L-Leucin, oder das bittere Amin Cadaverin in **Abbildung 9** dargestellt. Mit Ausnahme von Emmentaler (Warmke, 1997) und Goudakäse (Toelstede und Hofmann, 2008a, b; Toelstede et al., 2009) sind in der Literatur jedoch keine umfassenden Untersuchungen über den individuellen Beitrag der jeweiligen nicht-flüchtigen Verbindungen zum charakteristischen Geschmack einzelner Käsesorten zu finden. Angaben zur Konzentration potentieller Geschmacksstoffe in Parmesankäse, wie z.B. Aminosäuren, Milchsäure und weiterer organischer Säuren sind zwar vorhanden (Virgili et al., 1994; Careri et al., 1996), allerdings fehlen Korrelationen zum jeweiligen Geschmacksbeitrag.

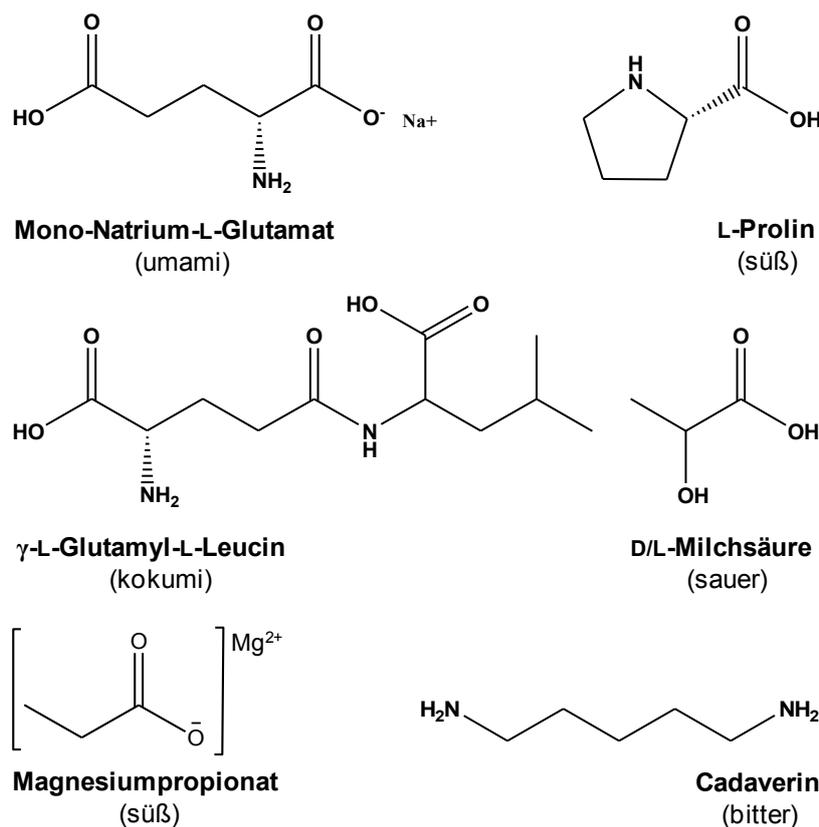


Abbildung 9. Schlüsselgeschmacksstoffe verschiedener Käsesorten (in Anlehnung an Hintz et al., 1956; Warmke et al., 1996; Kubickova und Grosch, 1998; Engel et al., 2000b; Toelstede und Hofmann, 2008b; Toelstede et al., 2009).

Der Geschmackseindruck, den der Verzehr von Käse auslöst, wird vornehmlich durch eine Kombination der Geschmacksqualitäten salzig, sauer, umami und bitter hervorgerufen. Desweiteren kann vor allem bei Schweizer Käse eine süße Geschmacksnote oder bei anderen Sorten, darunter auch Parmesan, ein brennender Eindruck wahrgenommen werden. Extraktionen verschiedener Käsesorten zeigten, dass die geschmacksaktiven Substanzen wasserlöslich sind und Molekulargewichte von > 1000 Da aufweisen. Dabei wurden als potentielle Geschmackstoffe Mineralien, freie Aminosäuren, organische Säuren, freie Fettsäuren, Nukleotide sowie diverse Peptide und auch biogene Amine postuliert. (z.B. *McGugan et al.*, 1979; *Aston und Creamer*, 1986; *Engels und Visser*, 1994; *Salles et al.*, 1995; *McSweeney*, 1997; *Engel et al.*, 2000a; *Taborda et al.*, 2003).

Salzgeschmack

Der salzige Geschmack von Käse wird in erster Linie durch Natriumchlorid (NaCl) ausgelöst, wobei ein Großteil des Salzes erst während der Herstellung in den Käse gelangt (*McSweeney*, 1997). *Engel et al.* (2000b) führten Weglassversuche mit verschiedenen Geschmacksstoffen von Ziegenkäse durch und postulierten, dass ein additiver Effekt von Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumionen ebenfalls einen Einfluss auf die Salzigkeit hat. Im Kontrast dazu fanden *Fitzgerald und Buckley* (1985), dass erhöhte Konzentrationen von KCl und $MgCl_2$ zu einer forcierten, unerwünschten Bitterkeit führten. Desweiteren zeigten Omissionsexperimente mit wässrigen Lösungen von für Goudakäse relevanten Geschmacksstoffen, dass die Aminosäure L-Arginin verstärkend auf den Salzgeschmack des Käses wirkt (*Toelstede und Hofmann*, 2008b).

Sauergeschmack

Die majore Säure in Käse ist Milchsäure, die durch Abbau von Milchzucker entsteht und in ihrer Konzentration stark von Art der Herstellung und verwendeten Starterkulturen abhängt (*McSweeney*, 1997). Allerdings konnten *Biede und Hammond* (1979b) keinen Zusammenhang zwischen dem sauren Geschmack von Schweizer Käse und dessen pH-Wert und Milchsäurekonzentration herstellen, sondern postulierten freie Aminosäuren sowie Di- und Tripeptide als sauer schmeckende Komponenten. Auch kurz- und mittelkettigen Fettsäuren wurde ein Einfluss auf den sauren Geschmack zugeschrieben (*Horwood*, 1975; *McSweeney*,

1997). Jüngere Ergebnisse aus Omissionsexperimenten mit wässrigen Geschmacksrekombinaten von Ziegen- und Goudakäse zeigten deutlich, dass Milchsäure und Hydrogenphosphat hauptsächlich für den Sauergeschmack verantwortlich sind (*Engel et al.*, 2000b; *Toelstede und Hofmann*, 2008b). *Engel et al.* (2000b) fanden außerdem einen sauerverstärkenden Einfluss von Natriumchlorid auf die Milchsäure, wohingegen *Toelstede und Hofmann* (2009b) eine Unterdrückung des sauren Geschmacks durch NaCl beschrieben. Für beide dieser gegensätzlichen Resultate finden sich ähnliche Ergebnisse in der Literatur. So zeigten *Stampanoni und Noble* (1991) eine Verstärkung des sauren Geschmacks von Modelkäsemischungen durch NaCl, wobei hohe Konzentrationen an Citronensäure (1,2 %) und NaCl (2 %) den intensivsten Sauergeschmack hervorriefen. *Hellemann* (1992) untersuchte den Geschmack von wässrigen Lösungen, aus 0 – 1,6 % NaCl und jeweils 0 – 0,9 % Milchsäure oder Essigsäure und von Broten mit sehr ähnlichen Gehalten der drei Substanzen. Dabei war im Wässrigen die Unterdrückung des Sauergeschmacks bei Mischungen mit geringeren Konzentrationen an NaCl (0,4 %) und Milchsäure (0,1 – 0,3 %) am höchsten, wohingegen nur ein marginaler Einfluss des Salzes auf den Geschmack der Essigsäure festgestellt wurde. Der Sauergeschmack der Brotmatrix wurde überhaupt nicht durch Salzzugabe beeinflusst. Diese Ergebnisse deuten auf eine unterschiedliche Modulation des Sauergeschmacks von Käse in Abhängigkeit von Milchsäure- und Salzkonzentration der jeweiligen Sorte hin.

Umamigeschmack

Der Umamigeschmack wird in Käse vor allem auf die Anwesenheit von Natriumglutamat, dem Salz der L-Glutaminsäure zurückgeführt (*Salles et al.*, 1995; *Drake et al.*, 2007; *Toelstede und Hofmann*, 2008b). Da L-Glutaminsäure die majore Aminosäure in der Caseinsequenz ist und durch Proteolyse während der Käsereifung freigesetzt wird, nimmt auch der Gehalt an freier L-Glutaminsäure und somit die Umamiintensität vieler Käsesorten mit steigendem Alter zu (*Drake*, 2007; *Toelstede und Hofmann*, 2008b). Weitere Substanzen, die einen Umamigeschmack aufweisen sind L-Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Glutamin, Milchsäure, Bernsteinsäure, Propionsäure, Inosin-5'-monophosphat oder Guanosin-5'-monophosphat. Diese geschmacksaktiven Verbindungen sind mit Ausnahme von Milchsäure in Käse allerdings meistens in Konzentrationen unterhalb ihres jeweiligen Geschmacksschwellenwertes zu finden und haben daher nur einen geringen oder auch keinen

Einfluss auf den Umamigeschmack (*Preininger et al.*, 1996; *Engel et al.*, 2000a; *Ferreira et al.*, 2001; *Drake*, 2007; *Toelstede und Hofmann*, 2008b).

Bittergeschmack

Bei der Bitterkeit von Käse wird zwischen einer gewünschten, wenig intensiven Bitternote einiger Käsesorten und einer unerwünschten, unangenehmen und somit als Fehlgeschmack eingestuften Bittere unterschieden (*Combes et al.*, 2002; *Fallico et al.*, 2005). Dabei lag der Fokus der Forschung in den vergangenen Jahrzehnten auf der Aufklärung von Faktoren, die den Fehlgeschmack hervorrufen. Zahlreiche Untersuchungen an unterschiedlichen Käsesorten (z.B. *Guigoz und Solms*, 1974; *Richardson und Creamer*, 1979; *Visser et al.*, 1983a, b; *Engel et al.*, 2001b; *Fallico et al.*, 2005) zeigten, dass dieser Fehlgeschmack durch eine große Anzahl verschiedener Bitterpeptide hervorgerufen wird, die aufgrund übermäßiger Proteolyse der Milchproteine α_{s1} - und β -Casein und nachfolgendem, unzureichendem Abbau der Spaltpeptide entstehen. Ein daraus resultierendes Ungleichgewicht zwischen bitteren und nicht-bitteren Peptiden sowie additive und synergistische Effekte der ersteren werden als Hauptursache für den bitteren Fehlgeschmack angenommen (*Lemieux und Simard*, 1991; *Visser*, 1993; *Sousa et al.*, 2001). So konnten zum Beispiel in Gouda (*Visser*, 1983b, 1993) und Cheddar (*Kelly et al.*, 1996; *Lee et al.*, 1996b) das C-terminale Fragment β -CN(193-209) sowie in Cheddar die Fragmente β -CN(46-90), α_{s1} -CN(1-13) und α_{s1} -CN(14-24) (*Lee et al.*, 1996b; *Sousa et al.*, 2001) direkt mit einem bitteren Fehlgeschmack korreliert werden. Hervorgerufen wird diese Proteolyse durch Proteinase aus dem Lab und verschiedenen, bei der Reife beteiligten, Mikroorganismen (*Visser*, 1993).

Die für den angenehmen, leicht bitteren Geschmack mancher Käsesorten verantwortlichen Verbindungen sind bisher nicht umfassend untersucht worden. Substanzen, denen ein Beitrag zum Bittergeschmack zugesprochen wurde sind Aminosäuren, Amine, Amide und Monoglyceride (*Ney et al.*, 1979; *Roudot-Algaron et al.*, 1993). *Roudot-Algaron et al.* (1993) identifizierten desweiteren verschiedene bittere Diketopiperazine und *N*-Acyl-Aminosäuren in Comtekäse, schlossen aufgrund ihrer geringen Konzentrationen allerdings einen direkten Beitrag zur Bitterkeit aus. *Kubickova und Grosch* (1998) konnten die Bitterkeit von Camembert mit der Anwesenheit des biogenen Amins Cadaverin sowie den Aminosäuren Citrullin und Ornithin korrelieren. Omissionsexperimente mit den Sensometaboliten von Ziegenkäse zeigten einen deutlichen Einfluss von Magnesiumchlorid und Calciumchlorid auf

die Bitterkeit (Engel et al., 2000b). Dieses wurde durch ähnliche Experimente an Goudakäse bestätigt, wobei durch weiterführende Weglassversuche ein Einfluss des Gegenions Chlorid ausgeschlossen und somit ein Großteil der Bitterkeit auf die Anwesenheit der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zurückgeführt werden konnte. Weiterhin wurde ein direkter Einfluss der bitteren Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin, L-Tyrosin und L-Tryptophan sowohl zur Bitterintensität als auch zur Bitterqualität des Goudas festgestellt (Toelstede und Hofmann, 2008b). Im Gegensatz dazu schlossen andere Autoren den direkten Einfluss von bitteren Aminosäuren aus (Warmke et al., 1996; Engel et al., 2000b). Ebenfalls durch Omissionsexperimente wurde eine suppressive Wirkung von Natriumglutamat und Natriumchlorid auf die Bitterkeit gezeigt (Warmke und Belitz, 1993; Breslin und Beauchamp, 1995; Engel et al., 2000b; Toelstede und Hofmann, 2008b). Auch ein Beitrag von kurz- und mittellangen Peptiden zur angenehmen Bitterkeit wird angenommen (Combes et al., 2002). Allerdings sind in der Literatur ebenso Untersuchungen zu Comte (Salles et al., 1995), Cheddar (Lee et al., 1996a) sowie Kuh-, Schafs- und Ziegenkäse (Molina et al., 1999) zu finden, die keine Korrelation zwischen Peptiden und angenehmer Bitterkeit aufweisen. Erst kürzlich konnten aus dem wässrigen Extrakt von gereiftem Goudakäse elf mittelkettige, aus β - und α_{s1} -Casein stammende Peptide isoliert werden, die jeweils einen bitteren Geschmack aufwiesen und nicht zur Bitterintensität, sondern nur zur langanhaltenden Bitterqualität des Käses beitrugen (Toelstede und Hofmann, 2008a, b).

Süßgeschmack

Ein süßer Geschmack geht oft mit einem Mangel an Säure einher und wird bei den meisten Käsesorten als Fehlgeschmack angesehen. Nur für einige Sorten, wie z.B. Schweizer Käse oder Emmentaler, ist eine süße Geschmacksnote charakteristisch und gewünscht (McSweeney, 1997). Als mögliche süß schmeckende Faktoren werden die Aminosäure L-Prolin, Mischungen aus verschiedenen anderen süßen Aminosäuren (Virtanen et al., 1949; Hintz et al., 1956; Langler et al., 1967), ein Zusammenwirken von Calcium- und Magnesiumionen mit Aminosäuren und kleinen Peptiden (Biede und Hammond, 1979b) sowie eine Interaktion zwischen Calcium- und Magnesiumionen und Propionsäure (Warmke et al., 1996) angenommen.

Brennender Eindruck

Ein leicht brennender Geschmackseindruck der bei einigen Käsesorten wie z.B. Parmesan oder Roquefort auftritt, wird mit hohen Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren, z.B. Buttersäure, Caprylsäure und Caprinsäure in Verbindung gebracht (*De La Fuente*, 1993; *Güler*, 2005). *Warmke et al.* (1996) detektierten die biogenen Amine Histamin und Tyramin in Emmentaler und fanden einen brennenden sensorischen Eindruck für wässrige Lösungen der Substanzen. Zwar wurde für beide Verbindungen ein GAW > 1,0 gefunden, allerdings war im Käse keine brennender Geschmackseindruck wahrnehmbar.

Kokumigeschmack

Obwohl seit langem ein Beitrag von Peptiden zum gesamten, harmonischen Geschmack von Käse angenommen wurde, konnte dieser auf molekularer Ebene jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden (z.B. *Aston und Creamer*, 1986; *McSweeney*, 1997; *Sommerer et al.*, 1998). Jüngst durchgeführte Untersuchungen an Goudakäse führten zur Isolierung und Identifizierung von insgesamt zehn γ -L-Glutamyl-dipeptiden, die in Rekombinationsexperimenten einen volleren und länger anhaltenden Gesamtgeschmack des Käses hervorriefen, wohingegen die korrespondierenden α -Peptide keinen Einfluss hatten (*Toelstede et al.*, 2009). Diese nicht durch Viskosität verursachte Mundfülle wird durch den Begriff „kokumi“ beschrieben (*Ueda et al.*, 1990, 1994, 1997). In wässriger Lösung wiesen die einzelnen Peptide zumeist adstringierende Geschmackqualitäten mit Schwellenwerten von 1000 – 10000 $\mu\text{mol/l}$ auf. Im Kontrast dazu wurden Zusätze der geschmacksmodulierenden Peptide in wässriger Goudamatrix schon in Konzentrationen zwischen 5 und 17,5 $\mu\text{mol/l}$ wahrgenommen (*Toelstede et al.*, 2009).

Die Literaturübersicht zeigt, dass der charakteristische Geschmack eines Käses stark von den bei der Reifung entstehenden Inhaltsstoffen und vor allem deren Verhältnissen untereinander abhängig ist. Diese Faktoren wiederum werden essentiell von der verwendeten Milch und den Parametern der Herstellung und der Reifezeit beeinflusst.

1.6 Sensorisch aktive Substanzen in Traditionellem Balsamico Essig

Obwohl Traditioneller Balsamico Essig aus Modena und Reggio Emilia (ABTM, ABTRE) und Balsamico Essig aus Modena (ABM) weltweit geschätzte Lebensmittel sind, gibt es in der Literatur keine umfassenden Untersuchungen über die zum typischen Geschmack beitragenden Inhaltsstoffe. Der Fokus quantitativer Analysen von Verbindungen in ABTM, ABTRE und ABM lag in den letzten drei Jahrzehnten vornehmlich auf der Identifizierung und Charakterisierung von Qualitäts- und Authentizitätsmarkern (Cocchi *et al.*, 2006a).

Plessi *et al.* (1988) untersuchten erstmals die Gehalte an Glucose, Fructose und einigen Zuckeralkoholen in ABTM, ABM und Weinessig und korrelierten die signifikant höheren Glycerinkonzentrationen im ABTM mit dessen Qualität. Als weitere majore Verbindungen in beiden Essigen wurden verschiedene organische Säuren, darunter Essigsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure und Gluconsäure (Plessi *et al.*, 1989; Cocchi *et al.*, 2002, 2006b; Sanarico *et al.*, 2003; Masino *et al.*, 2008) sowie das Furanderivat 5-Hydroxymethylfurfural (Theobald *et al.*, 1998; Chinnici, 2003) gefunden (**Tabelle 1**). Auch hohe Gehalte an Gluconsäure, die vor allem durch die Aktivität von Essigsäurebakterien entsteht und im ABTM in sehr viel größeren Konzentrationen als im ABM vorliegt, sind mit einer guten Qualität korreliert (Sanarico *et al.*, 2003).

Tabelle 1. Aus der Literatur entnommene Konzentrationsbereiche für die majoren Inhaltsstoffe von ABTM, ABTRE und ABM (Plessi *et al.*, 1988, 1989; Cocchi *et al.*, 2002, 2006; Sanarico *et al.*, 2003; Masino *et al.*, 2008).

Substanz	Konzentrationsbereich [g/l] in	
	ABTM/ABTRE	ABM
Glucose	210 – 351	43 – 203
Fructose	192 – 338	41 – 139
Essigsäure	12 – 30	25 – 64
Äpfelsäure	4,0 – 15,2	0,5 – 2,7
Bernsteinsäure	0,5 – 18	0,4 – 0,8
Weinsäure	4,1 – 9,6	n.b.
Gluconsäure	0,9 – 66,8	0,5 – 10,8
Milchsäure	0,4 – 1,2	0,1 – 1,1
5-HMF	1,4 – 5,5	0,3 – 3,3

n.b. nicht bestimmt

Wie aus **Tabelle 1** ersichtlich, variieren die Konzentrationen der einzelnen Inhaltsstoffe in einem weiten Bereich, was auf verschiedene Variablen im Herstellungsverfahren, wie z.B. die Lagerung in der Fassbatterie oder den Umfüllprozess, zurückzuführen ist (*Giudici, 2009*).

Der Geschmack eines Traditionellen Balsamico Essigs wird vor allem durch die Qualitäten süß und sauer beschrieben, wobei der Sauergeschmack überwiegend fruchtig ist und nicht stechend sein darf (*Plessi et al., 1989; Chinnici et al., 2003*). Auch eine sirupöse Konsistenz und die damit einhergehende Mundfülle ist eine charakteristische organoleptische Eigenschaft des ABT und wichtig für die Geschmackswahrnehmung (*Falcone et al., 2007; Giudici et al., 2009*). Bei ABM hingegen dominiert eine stechende Sauerqualität. Die für den Geschmack von ABT als relevant postulierten Inhaltsstoffe resultieren aus der Korrelation verschiedener chemischer und physikalischer Parameter mit der Qualität und dem Gesamtgeschmack (z.B. *Plessi et al., 1988, 1989; Masino et al., 2005, 2008*). Weder für ABT, noch für ABM wurde bisher der Beitrag einzelner Inhaltsstoffe zum Geschmack auf Basis von Rekombinations- und Omissionsexperimenten untersucht.

Es ist jedoch im Allgemeinen akzeptiert, dass der süße Geschmack von ABT durch die hohen Konzentrationen der Monosaccharide Glucose und Fructose hervorgerufen wird und das Verhältnis zur Säurekonzentration wichtig für die richtige süß-sauer Balance ist (*Sanarico et al., 2003; Giudici et al., 2009*). *Giudici et al. (2009)* postulierten, dass die charakteristische fruchtige Sauerqualität von der Gesamtmenge an titrierbarer Säure, dem pH-Wert, der relativen Menge an dissoziierter und nicht-dissoziierter Säure, der Pufferkapazität und den relativen Mengen der einzelnen Säuren abhängig ist. *Masino et al. (2008)* korrelierten mittels PCA verschiedene chemische und physikalische Parameter einzelner ABTRE-Proben mit deren Qualität und fanden, dass diese vor allem vom Zuckergehalt, der Dichte, dem °Brix-Wert sowie der Trockenmasse und nur in zweiter Linie von der Säurekonzentration abhing. Auch ein unterschiedlicher Einfluss der einzelnen Holzfässer auf die sensorischen Eigenschaften wird angenommen, konnte aber bisher noch nicht verifiziert werden (*Plessi et al., 2006; Caligiani et al., 2007; Giudici et al., 2009*). Als Ursache für die Mundfülle wird nicht nur der große Anteil an bis zu 60 % Monosacchariden (*Sanarico et al., 2003*), sondern auch die polymere Melanoidinfraktion vermutet (*Verzelloni et al., 2007; Falcone und Giudici, 2008; Tagliazucchi et al., 2008*).

Im Gegensatz zu den nicht-flüchtigen Inhaltsstoffen, sind die flüchtigen Aromastoffe von ABM und ABTM kürzlich umfassend untersucht worden. Dabei spielen vor allem Alkohole, Ester und Ketone eine Rolle (Ugliano, 2003). Gröhnke (2010) analysierte unter Verwendung von Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O), Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) und Rekombinationsexperimenten die flüchtigen Fraktionen von ABM und ABTM und fand, dass zwar viele der Aromastoffe in beiden Essigen präsent sind, das jeweils typische Aroma aber aufgrund der verschiedenen Konzentrationen und Verhältnisse zueinander hervorgerufen wird. Schlüsselaromastoffe in beiden untersuchten Essigen waren die in **Abbildung 10** dargestellten Verbindungen 2-Phenylethanol, 2,3-Butandion, 2-Methylpropanal, Ethyl-3-methylbutanoat, Acetaldehyd, 3-Methylbutansäure, 3-Methylbutanal, Essigsäure, 3-Methylbutanol, Weinlacton und (*E*)- β -Damascenon.

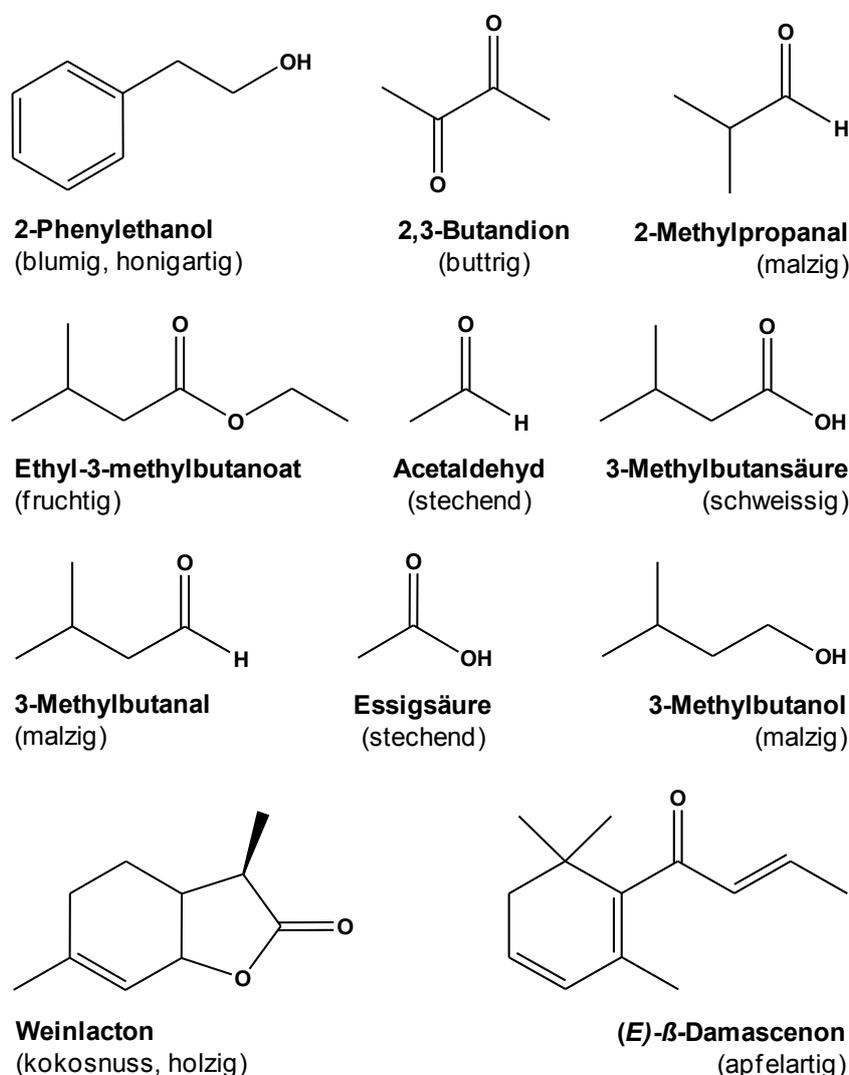


Abbildung 10. Schlüsselaromastoffe in ABM und ABTM, nach Gröhnke (2010).

Dabei lagen das apfelartig riechende (*E*)- β -Damascenon, das fruchtige Ethyl-3-methylbutanoat, das malzige 3-Methylbutanol sowie die stechend riechenden Verbindungen Acetaldehyd und Essigsäure im ABM in deutlich höheren Konzentrationen als im ABTM vor. Im Gegensatz dazu trugen das buttrige 2,3-Butandion und das kokosnuss- und holzartig riechende Weinlacton vor allem zum charakteristischen Aroma des Traditionellen Balsamico Essigs (ABTM) bei.

1.7 Problemstellung

Parmesankäse und Traditioneller Balsamico Essig aus Modena sind Produkte mit geschützter Herkunftsbezeichnung, die sich durch aufwändige Herstellungsprozesse und lange Reifezeiten auszeichnen. Ihr jeweils charakteristischer Geschmack wird weltweit von Konsumenten geschätzt. Umfassende Kenntnisse über die Sensometabolome beider Lebensmittel, die die gezielte Steuerung der Herstellungsprozesse zur Geschmacksoptimierung ermöglichen würden, liegen bisher jedoch nicht vor. Daher ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Sensometabolom von sowohl Parmesankäse als auch Traditionellem bzw. konventionellem Balsamico Essig aus Modena zu charakterisieren.

Im ersten Teil der Arbeit sollte Parmesankäse auf Basis der bisherigen Erkenntnisse umfassend quantitativ-analytisch untersucht und eine Beurteilung der detektierten Verbindungen aufgrund von Dose-over-Threshold Faktoren vorgenommen werden. Zur Verifizierung der Vollständigkeit und Richtigkeit der erhaltenen Daten sollten Rekombinationsexperimente durchgeführt werden. Die sensorische Relevanz einzelner Substanzen oder Substanzgruppen sollte nachfolgend durch Omissionsexperimente evaluiert werden. Desweiteren sollten Faktoren, die die Bildung potenter Geschmacksstoffe und -modulatoren in Parmesankäse beeinflussen, offengelegt werden. Dazu sollten Inkubationsexperimente mit stabilisotopenmarkierten Präkursoren und quantitative Studien zu den gebildeten Reaktionsprodukten erfolgen.

Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit sollte die Identifizierung der Substanzen sein, die maßgeblich zum Geschmack von Traditionellem Balsamico Essig beitragen. Dazu sollte zunächst ein Screening nach und die quantitative Analyse von Basisgeschmacksstoffen durchgeführt werden. Weiterhin sollte eine sensorisch orientierte Fraktionierung des Traditionellen Balsamico Essigs mittels flüssigchromatographischer Trenntechniken durchgeführt werden. Durch Anwendung verschiedener human-sensorischer Methoden wie der Geschmacksverdünnungsanalyse und der vergleichenden Geschmacksprofilanalyse sollten bisher unbekannte geschmacksaktive und geschmacksmodulierende Verbindungen in den Fraktionen lokalisiert werden. Nach der präparativen Isolierung der Geschmacksstoffe und -modulatoren und deren Identifizierung durch spektroskopische und gegebenenfalls synthetische Methoden sollte eine Quantifizierung im Untersuchungsmaterial erfolgen. Die sensorische Charakterisierung anhand von Schwellenwertbestimmungen und Profilsensoriken

sollte durch weiterführende Analysen der Geschmacksmodulatoren mittels humaner Time-Intensity-Studien und zellbasierten Rezeptorassays ergänzt werden. Wiederum sollten Rekombinations- und Omissionsexperimente zur Überprüfung auf Vollständigkeit und Bewertung des Beitrags verschiedener Verbindungen zum Gesamtgeschmack durchgeführt werden. Um die sensorischen Veränderungen des Traditionellen Essigs während des langen Reifeprozesses in der Fassbatterie auch auf molekularer Ebene zu erfassen, sollte anschließend die Quantifizierung aller Geschmacksstoffe in Proben einer kompletten, aus acht Fässern bestehenden *Batteria* erfolgen. Basierend auf den Kenntnissen, die über das Sensometabolom von Traditionellem Balsamico Essig gewonnen werden, sollten zudem die sensorischen Unterschiede zwischen Traditionellem und konventionellem Balsamico Essig aus Modena auch auf molekularer Ebene untersucht werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Schlüsselgeschmacksstoffe in Parmesankäse

2.1.1 Entschlüsselung des Sensometaboloms von Parmesankäse

Die Literaturübersicht zeigt, dass, im Vergleich zu anderen Käsesorten, noch keine umfassenden Kenntnisse über die Schlüsselgeschmacksstoffe von gereiftem Parmesankäse vorliegen. Daher wurden im Folgenden humansensorische und instrumentell-analytische Methoden zur Entschlüsselung des Sensometaboloms von 24 Monate gereiftem Parmesan (P-24) eingesetzt.

2.1.1.1 Sensorische Analyse von reifem Parmesankäse und dessen wässrigem Extrakt

Um einen ersten Einblick in das Geschmacksprofil von reifem Parmesankäse zu erhalten, wurde der für die Untersuchungen ausgewählte, 24 Monate gereifte Parmesan (P-24) in kleine Würfel zerteilt und dem geschulten Sensorikpanel zur Geschmacksprofilanalyse angeboten. Dieses bewertete die Geschmacksqualitäten sauer, bitter, umami, salzig, süß, kokumi und brennend auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar). Das resultierende Geschmacksprofil ist in **Abbildung 11 (A)** dargestellt und zeigt, dass die Salzigkeit mit einem Wert von 2,8 die dominierende Geschmacksqualität war, gefolgt von einem brennenden (2,5) und kokumiartigen Eindruck (2,2). Sauergeschmack und Bitterkeit wurden mit moderaten Werten von 1,7 bzw. 1,5 bewertet. Umami- (1,2) und Süßgeschmack (1,0) wurden am schwächsten wahrgenommen.

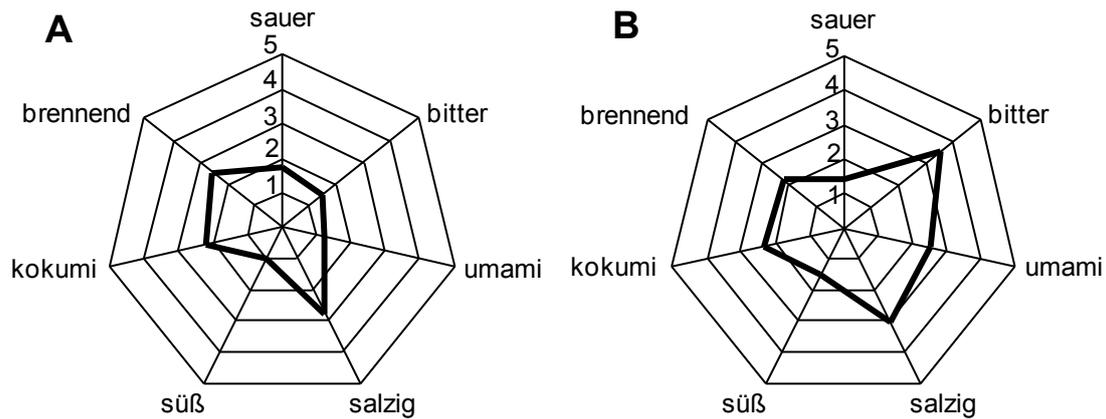


Abbildung 11. Geschmacksprofile von (A) reifem Parmesankäse (P-24) und (B) dessen wässrigem Extrakt (WE-24).

Da der majore Anteil der Käsegeschmacksstoffe wasserlöslich ist (*McGugan et al.*, 1979; *Aston und Creamer*, 1984; *Salles et al.*, 1995; *McSweeney*, 1997; *Engel et al.*, 2000b) und die Käsematrix ebenfalls einen Einfluss auf die Geschmackswahrnehmung hat (*Warmke*, 1997; *Engel et al.*, 2001a), wurden im zweiten Schritt die geschmacksaktiven Verbindungen aus P-24 extrahiert. Dazu wurde dieser mit der fünffachen Menge an deionisiertem Wasser versetzt und mittels Ultra-Turrax für fünf Minuten homogenisiert. Die erhaltene Suspension wurde durch Zentrifugation in den wässrigen Anteil sowie eine Protein- und eine Fettschicht aufgetrennt, die festen Bestandteile ein weiteres Mal extrahiert und die wässrigen Phasen vereinigt und anschließend gefriergetrocknet. Der pH-Wert des wässrigen Extraktes vor der Lyophilisation betrug 5,30, die Ausbeute an wässrigem Extrakt (WE-24) nach Gefriertrocknung belief sich auf 17,28 g/100 g und die Ausbeute an Protein und Fett lag bei 28,00 g/100 g bzw. 26,58 g/100 g Käse. Der durch Trocknung bestimmte Wassergehalt ergab einen Wert von 28,15 g/100 g (**Tabelle 2**).

Tabelle 2. Gehalte [g/100 g] an Wasserextrakt (WE-24), Fettschicht, Proteinschicht und Wasser in P-24 sowie der pH-Wert des wässrigen Extraktes WE-24.

Fraktion	g/100 g Käse
WE-24	17,28
Fettschicht	26,58
Proteinschicht	28,00
Wassergehalt	28,15
pH-Wert (WE-24)	5,30

Für die nachfolgende sensorische Analyse wurde der WE-24 in seiner natürlichen Konzentration in mineralstoffarmem Wasser aufgenommen und der pH-Wert der Lösung mit 1 %iger Ameisensäure auf den natürlichen Wert von 5,30 eingestellt. Aufgrund des intensiven Geschmacks der Lösung war eine Verdünnung mit Wasser (1:3) notwendig, um eine individuelle Beurteilung der einzelnen Geschmacksqualitäten zu ermöglichen. Der verdünnte WE-24 wurde vom Sensorikpanel im Vergleich zu P-24 bewertet. Das so erhaltene Geschmacksprofil (**B** in **Abbildung 11**) zeigte, dass Bitter und Salzig mit Werten von 3,5 bzw. 3,0 die dominanten Geschmacksqualitäten des WE-24 waren, gefolgt von Umami (2,5), Kokumi (2,3) und brennendem Eindruck (2,2). Süßer und saurer Geschmack wurden jeweils mit einer Intensität von 1,4 bewertet. Die Qualitäten Bitter (+2,0) und Umami (+1,3) wurden im wässrigen Extrakt sehr viel stärker als im authentischen Käse wahrgenommen und auch für die Süße (+0,4), Salzigkeit (+0,2) und Kokumi (+0,1) konnten leichte Zunahmen in der Intensität beobachtet werden. Der saure (-0,3) und brennende (-0,3) Geschmackseindruck des WE-24 hingegen zeigte jeweils eine Abnahme der Intensität im Vergleich zu P-24. Diese Unterschiede waren wahrscheinlich auf das Fehlen der Käsematrix zurückzuführen, die durch verzögerte Freisetzung eine maskierende Wirkung auf die Wahrnehmung von Geschmacks- und Aromastoffen hat (*Delahunty und Piggot, 1995; McSweeney, 1997; Piparez et al., 1998*). Dies wurde bereits für andere Käsesorten und deren wässrige Extrakte gezeigt. Für die Zunahme der Salzigkeit ist das vorliegende Ergebnis im Einklang mit Daten von *Engel et al. (2001a)* sowie *Toelstede und Hofmann (2008b)*, wenn auch der Umfang der Intensitätszunahme für Parmesankäse geringer war als für Goudakäse und Camembert beschrieben. Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse für die Wahrnehmung des Bittergeschmacks, für den eine Intensitätsabnahme in den wässrigen Extrakten von Goudakäse und Camembert gefunden wurde (*Engel et al., 2001a; Toelstede und Hofmann, 2008b*). Die für den WE-24 beobachtete, deutliche Zunahme der Bitterkeit ist möglicherweise auf die in Parmesan vergleichsweise hohen Gehalte der bitter schmeckenden Kationen Calcium und Magnesium (*Gobetti, 2004*) zurückzuführen, die durch das Fehlen der Matrix nicht mehr in ihrem Geschmack maskiert werden. Diese Vermutung bedarf allerdings einer Verifizierung durch instrumentell-quantitative Analysen und Rekombinationsexperimente.

Um die erhaltenen sensorischen Daten mit quantitativ-analytischen Werten korrelieren zu können, erfolgten im Weiteren umfassende qualitative und quantitative Untersuchungen im Hinblick auf potentielle Sensometaboliten in Parmesankäse.

2.1.1.2 Qualitative und quantitative Analyse von kokumi-aktiven Glutamylpeptiden

Bevor die Gesamtheit an potentiellen Geschmacksstoffen quantitativ analysiert wurde (vgl. Kapitel 2.1.1.3), erfolgte zunächst ein Screening nach α - und γ -Glutamylpeptiden, die in anderen Käsesorten kürzlich schon charakterisiert wurden (*Toelstede und Hofmann, 2009*). Über deren Vorkommen in Parmesankäse sind allerdings nur unvollständige Informationen publiziert (*Sforza et al., 2004, 2009*).

Screening nach α - und γ -Glutamylpeptiden und Synthese von Referenzen

Die γ -Glutamylpeptide weisen in würziger Lebensmittelmatrix geschmacksverstärkende Eigenschaften auf, die in einer komplexen, langanhaltenden Mundfülle, die als Kokumi bezeichnet wird, resultieren (*Dunkel et al., 2007; Toelstede et al., 2009*). Diese Peptide konnten in der Vergangenheit zusammen mit ihren korrespondierenden α -Formen in verschiedenen Käsesorten, darunter Gouda, Camembert, Leerdammer oder auch Blauschimmelkäse nachgewiesen und quantifiziert werden, wobei die in **Abbildung 12** dargestellten acht α - und elf γ -Glutamylpeptide (**1 – 15, 17 – 20**) analysiert wurden (*Toelstede und Hofmann, 2009*). *Sforza et al. (2009)* gelang erstmals die Identifizierung von sechs γ -Glutamylpeptiden in gereiftem Parmesankäse: γ -Glu-Val (**6**), γ -Glu-Tyr (**10**), γ -Glu-Leu (**15**), γ -Glu-Ile (**16**), γ -Glu-Met (**18**) und γ -Glu-Phe (**20**). Eine Untersuchung des Einflusses dieser Verbindungen auf den Geschmack von Parmesan erfolgte bisher allerdings nicht.

Auf Basis dieser Kenntnisse wurde der vorliegende Parmesankäse mittels LC-MS/MS ebenfalls auf die Anwesenheit der verschiedenen in Käse bekannten α - und γ -Glutamylpeptide hin analysiert (**Abbildung 12**). Dazu wurde eine geringe Menge an P-24 unter Verwendung eines Ultra-Turrax und der 5-fachen Menge an Wasser für eine Minute extrahiert (siehe Kapitel 2.1.1.1), die wässrige Phase durch Filtration von den festen Bestandteilen getrennt, anschließend adäquat mit Wasser verdünnt und zur Analyse verwendet. Nach Trennung an einer PFP-Phase erfolgte die massenspektrometrische Detektion der α - und γ -Glutamylpeptide im MRM-Modus, wobei die Identifizierung der Analyten durch Vergleich mit den charakteristischen Massenübergängen und Retentionszeiten der Referenzsubstanzen erfolgte. Neben den bereits von *Sforza et al. (2009)* in Parmesan beschriebenen Verbindungen konnten erstmals weitere sieben α - und sechs γ -Glutamylpeptide

detektiert werden, die kürzlich in Gouda beschrieben wurden (Toelstede *et al.*, 2009; Toelstede und Hofmann, 2009). Diese waren α -Glu-Gly (1), α -Glu-Ala (3), α -Glu-Val (5), α -Glu-Glu (7), α -Glu-Asp (11), α -Glu-Trp (12), α -Glu-Thr (13), γ -Glu-Gly (2), γ -Glu-Ala (4), γ -Glu-Glu (8), γ -Glu-Tyr (10), γ -Glu-Lys (14), γ -Glu-Gln (17) und γ -Glu-His (19).

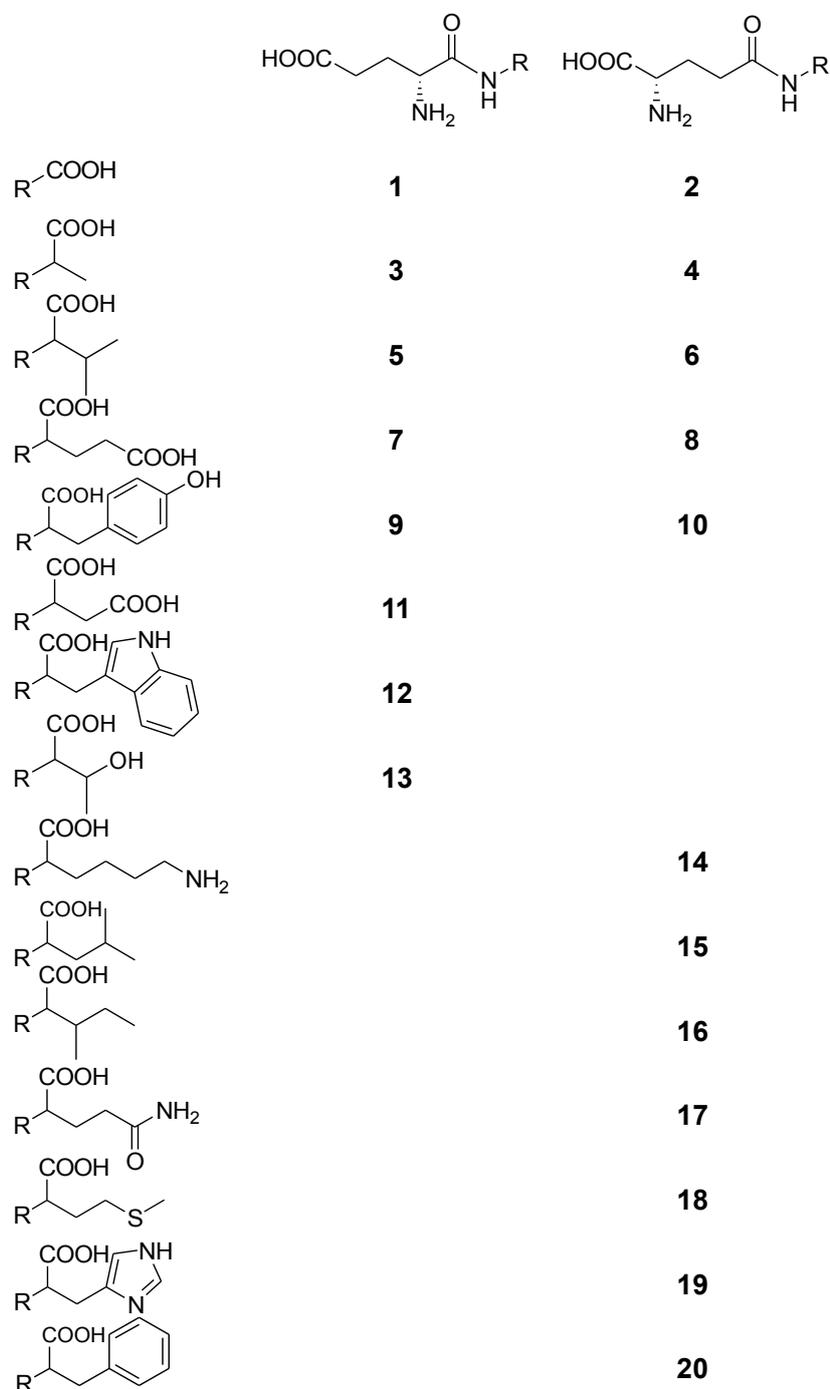


Abbildung 12. Strukturformeln der bisher in Käse identifizierten Glutamyldipeptide: α -Glu-Gly (1), γ -Glu-Gly (2), α -Glu-Ala (3), γ -Glu-Ala (4), α -Glu-Val (5), γ -Glu-Val (6), α -Glu-Glu (7), γ -Glu-Glu (8), α -Glu-Tyr (9), γ -Glu-Tyr (10), α -Glu-Asp (11), α -Glu-Trp (12), α -Glu-Thr (13), γ -Glu-Lys (14), γ -Glu-Leu (15), γ -Glu-Ile (16), γ -Glu-Gln (17), γ -Glu-Met (18), γ -Glu-His (19) und γ -Glu-Phe (20). In Anlehnung an Sforza *et al.* (2009) und Toelstede *et al.* (2009).

Daneben wurden im frischen Extrakt des Parmesans weitere Peaks detektiert, die zwar die charakteristischen Massenübergänge von den in der Referenzlösung enthaltenen Analyten α -Glu-Asp (**11**), α -Glu-Trp (**12**), α -Glu-Thr (**13**), γ -Glu-Lys (**14**) und γ -Glu-Leu (**15**) (**A**, **C**, **E**, **G**, **I** in **Abbildung 13**) aufwiesen, jedoch zu einem anderen Zeitpunkt von der Säule eluierten (**B**, **D**, **F**, **H**, **K** in **Abbildung 13**).

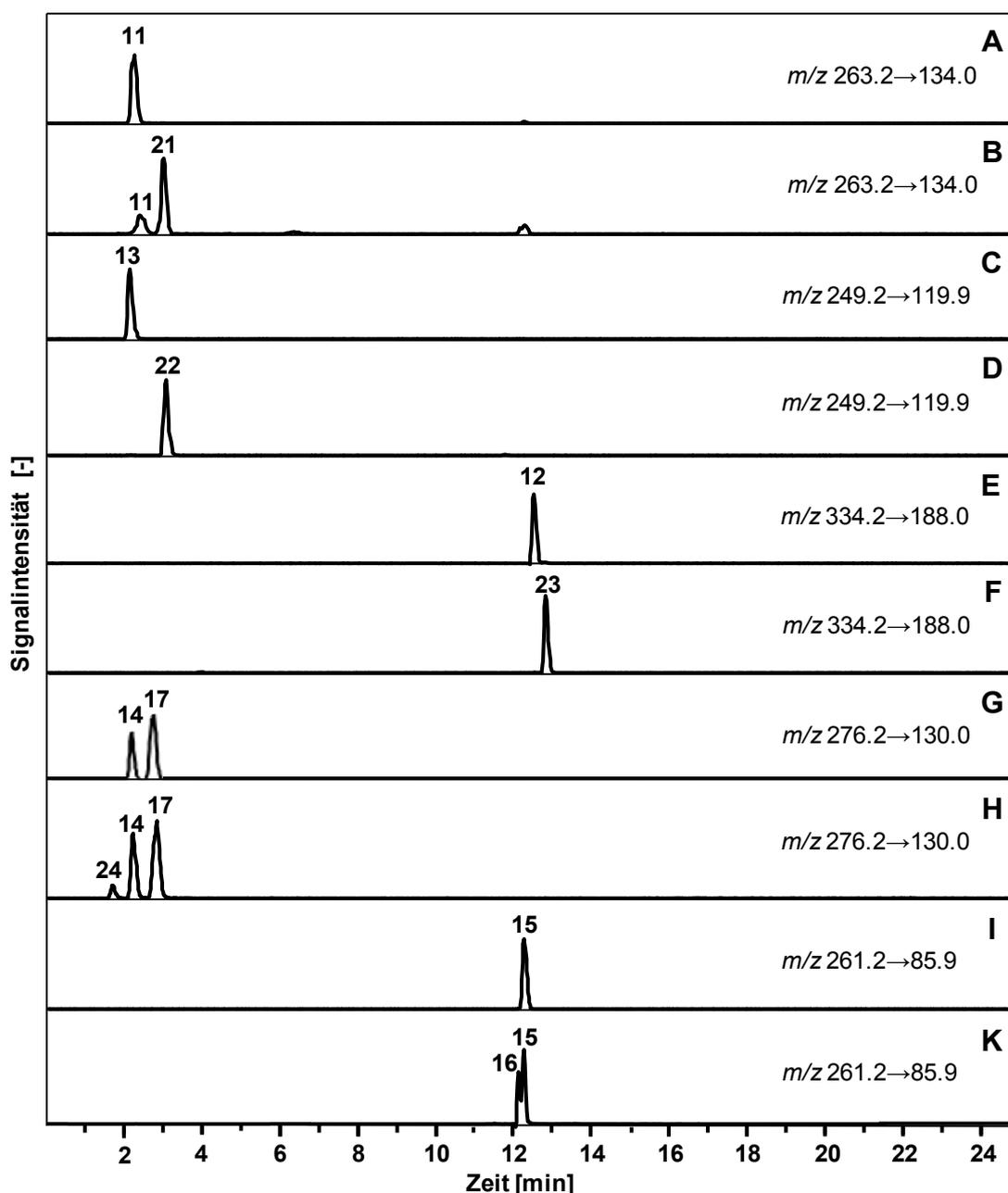


Abbildung 13. LC-MS/MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren (ESI^+) von α -Glu-Asp (**11**) in Referenzlösung (**A**), in Parmesanextrakt (**B**), von α -Glu-Thr (**13**) in Referenzlösung (**C**), in Parmesanextrakt (**D**), von α -Glu-Trp (**12**) in Referenzlösung (**E**), in Parmesanextrakt (**F**), von γ -Glu-Lys (**14**) und γ -Glu-Gln (**17**) in Referenzlösung (**G**), in Parmesanextrakt (**H**) und von γ -Glu-Leu (**15**) in Referenzlösung (**I**) und in Parmesanextrakt (**K**). Nummerierungen der Peaks beziehen sich auf **Abbildung 12** und **Abbildung 17**.

Da die chromatographische Trennung von α -/ γ -Glutamylpeptidpaaren an einer PFP-Phase in einer früheren Elution des α -Peptids resultiert, deutete die spätere Retentionszeit der unbekannt Peaks im Parmesanextrakt bei den Übergängen von **11** (m/z 263.2 \rightarrow 134.0), **12** (m/z 334.2 \rightarrow 188.0) und **13** (m/z 249.2 \rightarrow 119.9) auf die Anwesenheit der bis dahin nicht in Käse beschriebenen korrespondierenden γ -Glutamylpeptide hin (**Abbildung 13**). Die frühere Retentionszeit beim Übergang von **14** (m/z 276.2 \rightarrow 130.0) hingegen ließ auf das Vorhandensein von α -Glu-Lys schließen. Der Doppelpeak beim Massenübergang von **15** (m/z 261.2 \rightarrow 85.9) wies auf das bereits durch *Sforza et al.* (2009) identifizierte γ -Glu-Ile (**16**) hin.

Um die postulierte Identität der unbekannt Peptide zu verifizieren, war ein Vergleich ihrer Retentionszeiten mit denen von Referenzsubstanzen nötig. Referenzmaterial von γ -Glu-Asp (**21**), γ -Glu-Thr (**22**) und γ -Glu-Ile (**16**) wurde durch Festphasenpeptidsynthese (*Chan und White, 2000*) erhalten (**Abbildung 14**).

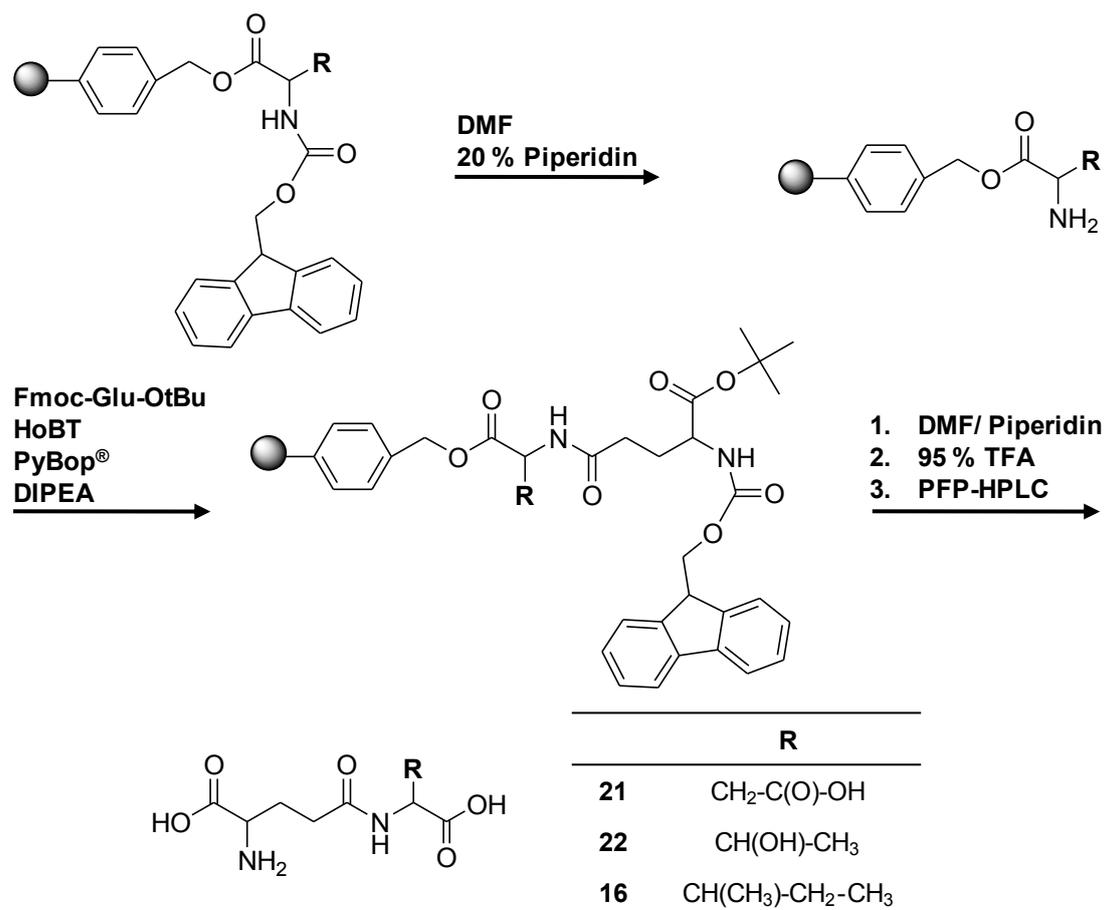


Abbildung 14. Festphasenpeptidsynthese von γ -Glu-Ile (**16**), γ -Glu-Asp (**21**) und γ -Glu-Thr (**22**), in Anlehnung an *Chan und White* (2000).

Ausgehend von der jeweiligen C-terminalen Aminosäure, die zunächst geschützt und an Polymerharz (Wang-Harz) gebunden vorlag, erfolgte nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin in Dimethylformamid (DMF) die Kopplung des Glutamylrestes. Dabei wurde die Fmoc-geschützte L-Glutaminsäure unter Anwesenheit von (Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphoniumhexafluoro-phosphat (PyBop[®]) und der tertiären Base Diisopropylethylamin (DIPEA) an der γ -Carboxylfunktion in den entsprechenden, reaktiven Benzotriazolylester überführt, der dann mit der am Wang-Harz gebundenen Aminosäure über eine Säureamidbindung gekoppelt wurde (*Chan und White, 2000*). Nach Abspaltung der zweiten Fmoc-Schutzgruppe wurde das jeweilige Dipeptid unter gleichzeitiger Entfernung der O-tert-Butyl-Schutzgruppe vom Wang-Harz freigesetzt. Die Aufreinigung der Syntheseprodukte wurde an einer präparativen Monochrom-Phase unter Verwendung eines Wasser/Acetonitril-Gradienten (Gradient 1, Kapitel 3.7.2) durchgeführt und die Strukturen der erhaltenen Verbindungen **16**, **21** und **22** mittels Massenspektrometrie sowie 1D- und 2D-NMR-Experimenten verifiziert. Dies wird im Folgenden beispielhaft für γ -Glu-Thr (**22**) dargestellt.

Abbildung 15 zeigt das Fragmentationenspektrum (ESI⁺) von γ -Glu-Thr (**22**). Das Pseudomolekülion mit einem m/z -Verhältnis von 248,9 deutete auf das angestrebte Molekulargewicht vom 248 Da hin. Die erhaltenen Fragmentserien, die nach der von *Roepstorff* (1984) etablierten Nomenklatur für Peptidfragmente gekennzeichnet sind, untermauerten das Vorliegen von γ -Glu-Thr (**22**). Die Fragmentionen mit m/z von 130,0, 101,7 und 83,9 deuteten auf einen N-terminalen Glutamylrest hin, wobei m/z 130,0 dem b_1 -Fragment zuzuordnen war und durch Spaltung der Säureamidbindung entstand. Damit einhergehend entsprach das Fragment mit m/z 101,7 dem korrespondierenden Immonium-Ion a_1 und das mit m/z 83,9 der decarboxylierten Form des b_1 -Fragmentes. Das zum b_1 -Fragment komplementäre y_1 -Immonium-Ion (m/z 120,1) sowie dessen decarboxylierte Form (m/z 73,9) entsprachen somit einem C-terminalen Threonin-Rest.

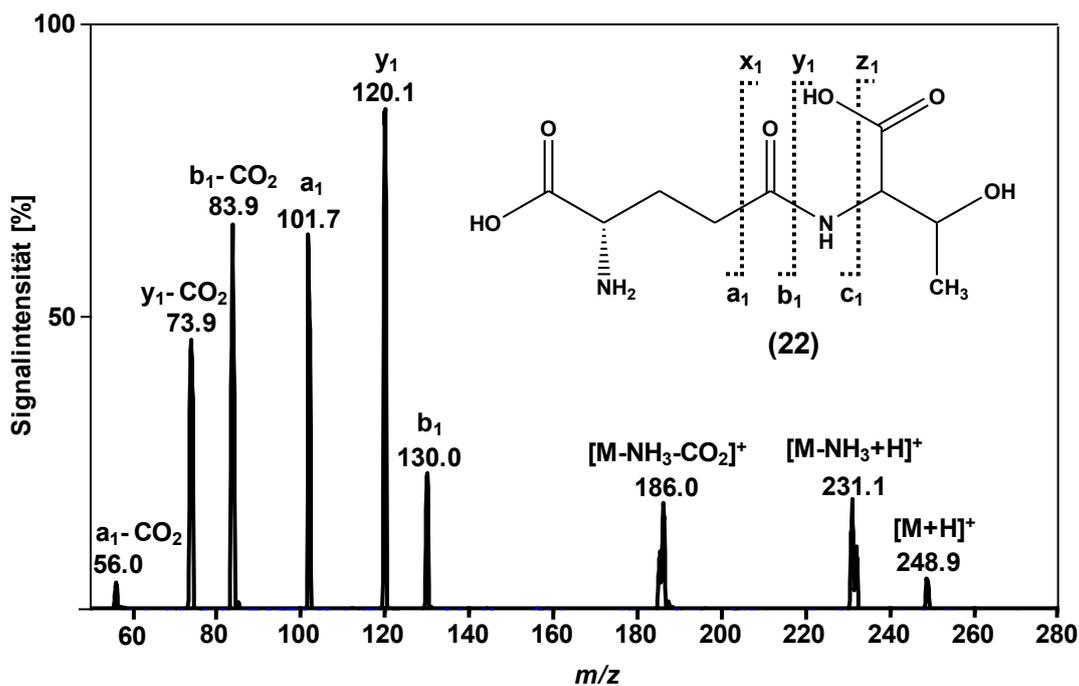


Abbildung 15. MS²-Spektrum (ESI⁺) von γ -Glu-Thr (22) sowie die Zuordnung der einzelnen Fragmentationen.

Die weitere Absicherung der Struktur sowie Verifizierung der γ -Position der Peptidbindung wurde durch 1D- und 2D-NMR-Experimente erbracht. **Abbildung 16** zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von γ -Glu-Thr (22), bei dem die $J^{2,3}$ -Kopplungen zwischen Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen eines Moleküls sichtbar gemacht werden. Dabei ist die Kopplung zwischen dem α -Proton des Threoninrestes und dem γ -ständigen Carboxyl-Kohlenstoff des Glutamyrestes über die Säureamidbindung hinweg deutlich zu erkennen, wohingegen die α -Carboxylgruppe des Glutamyrestes nur Kopplungen zu den benachbarten Protonen an Position C(2) und C(3) aufwies.

Analog wurden die Strukturen der anderen beiden Syntheseprodukte γ -Glu-Asp (21) und γ -Glu-Ile (16) mittels MS- und NMR-Experimenten abgesichert (vgl. Kapitel 3.4.6.1 und Kapitel 3.4.6.3).

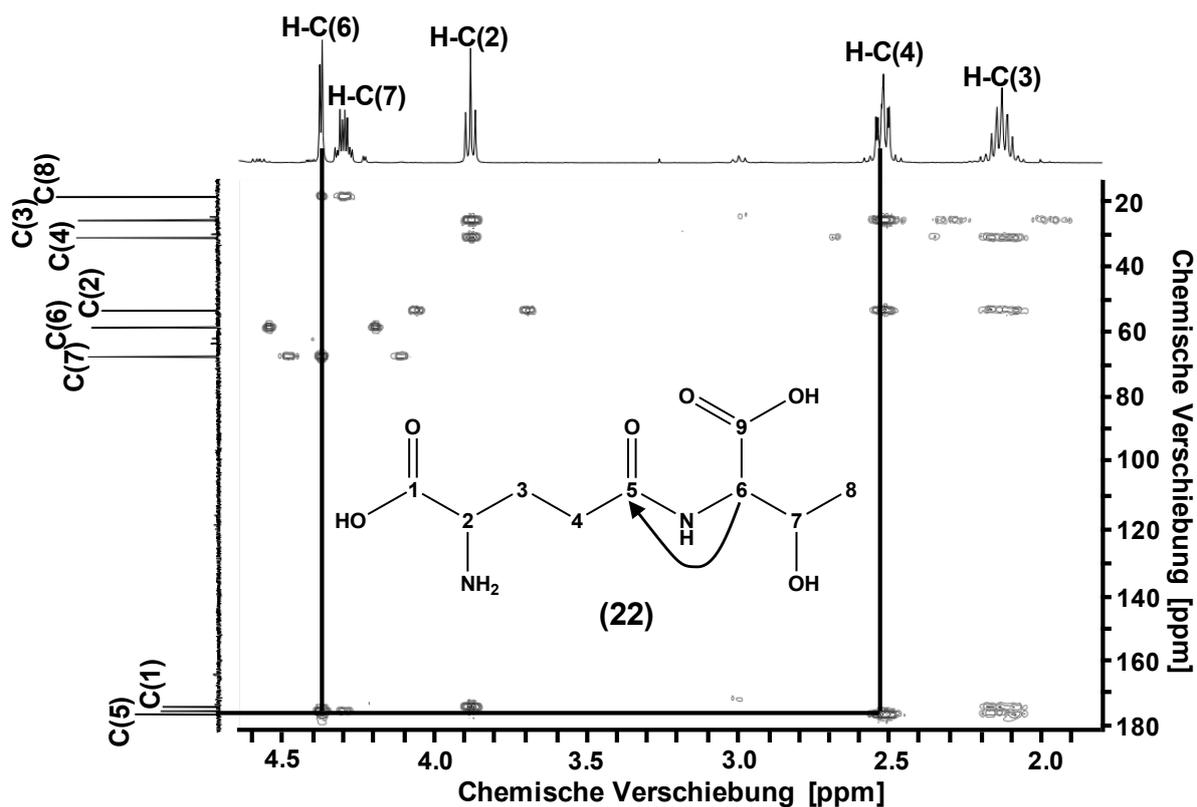


Abbildung 16. Ausschnitt aus dem HMBC-NMR-Spektrum (500 MHz; D_2O) von γ -Glu-Thr (22).

Nach Zugabe der synthetisierten Glutamyldipeptide zur Referenzlösung und erneuter massenspektrometrischer Analyse konnte durch Vergleich der spezifischen Fragmente und Retentionszeiten zum ersten Mal die Anwesenheit von γ -Glu-Asp (21) und γ -Glu-Thr (22) in Parmesan nachgewiesen werden. Die Detektion von γ -Glu-Ile (16) bestätigte Angaben aus der Literatur (Sforza *et al.*, 2009). Im Fall der unbekanntenen Peaks bei den Übergängen von α -Glu-Trp (12) und γ -Glu-Lys (14) erfolgte die Identifizierung mit kommerziell erhältlichen Referenzen und führte zur erstmaligen Identifizierung von γ -Glu-Trp (22) und α -Glu-Lys (24) (Daten nicht gezeigt). Die Strukturformeln der erstmals identifizierten Peptide 21, 22, 23 und 24 sind in **Abbildung 17** dargestellt.

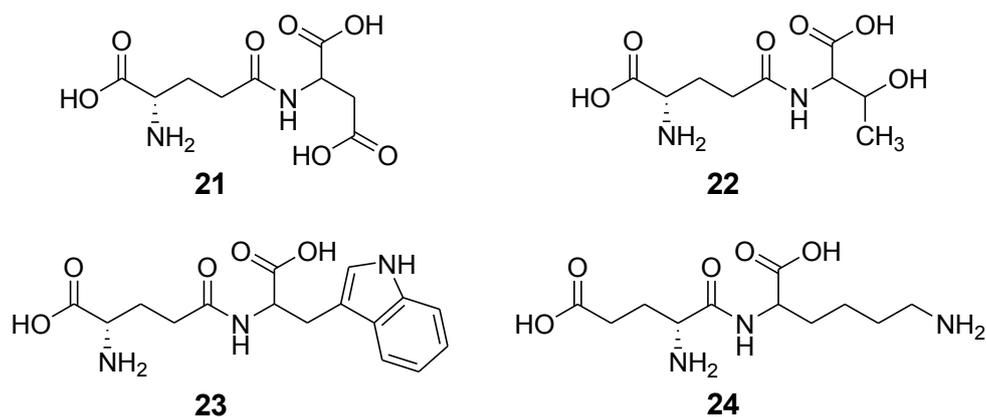


Abbildung 17. Strukturformeln der erstmals in Parmesan identifizierten Peptide: γ -Glu-Asp (21), γ -Glu-Thr (22), γ -Glu-Trp (23) und α -Glu-Lys (24).

Um die erstmals beschriebenen Glutamylpeptide **21**, **22**, **23** und **24** sowie die bislang sensorisch nicht bewerteten Peptide γ -Glu-Ile (**16**) und γ -Glu-Lys (**14**) psychophysikalisch zu charakterisieren, wurden deren intrinsische Geschmacksqualitäten und Geschmacksschwellenwerte ermittelt. Desweiteren wurden für die γ -Peptide Schwellenwerte für die Kokumi-Qualität in einer wässrigen NaCl/MSG-Lösung aufgenommen (**Tabelle 3**).

Tabelle 3. Schwellenwerte von γ -Glu-Lys (**14**), γ -Glu-Ile (**16**), γ -Glu-Asp (**21**), γ -Glu-Thr (**22**), γ -Glu-Trp (**23**) und α -Glu-Lys (**24**) für einen intrinsischen Geschmackseindruck in wässriger Lösung (pH 5,3) und für die Kokumi-Qualität in NaCl/MSG-Lösung.

Verbindung	Geschmacksqualität	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$] in	
		wässriger Lösung	NaCl/MSG ^a
γ -Glu-Lys (14)	adstringierend	2000	225
γ -Glu-Ile(16)	umami	5000	360
γ -Glu-Asp(21)	adstringierend	900	170
γ -Glu-Thr(22)	adstringierend	300	430
γ -Glu-Trp(23)	adstringierend	2000	250
α -Glu-Lys(24)	adstringierend	1300	n.b.

^a 10 mmol/l NaCl/30 mmol/l MSG, pH 5,5; n.b. nicht bestimmt.

Die Schwellenwerte für einen intrinsischen Geschmackseindruck in wässriger Lösung lagen zwischen 300 $\mu\text{mol/l}$ für γ -Glu-Thr (**22**) und 5000 $\mu\text{mol/l}$ für γ -Glu-Ile (**16**), was mit dem Konzentrationsbereich von Schwellenwerten für die bereits untersuchten Glutamylpeptide

übereinstimmte (Toelstede *et al.*, 2009). Dabei wies γ -Glu-Ile (**16**) eine leicht umamiartige Geschmacksqualität auf, alle anderen Peptide hingegen einen unspezifischen, leicht adstringierenden Geschmackseindruck. Die Schwellenwerte für den Kokumieffekt in der NaCl/MSG-Lösung lagen zwischen 170 – 430 $\mu\text{mol/l}$.

Zur präzisen Quantifizierung aller in Parmesankäse detektierten Glutamylpeptide wurde im nächsten Schritt eine LC-MS/MS-Methode unter Verwendung eines isotope-markierten internen Standards entwickelt und validiert.

Entwicklung und Validierung einer SIVA-Methode zur Quantifizierung der α - und γ -Glutamyl-dipeptide

Um die α - und γ -Glutamylpeptide in Parmesankäse quantitativ zu bestimmen, sollte eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) mit LC-MS/MS-Detektion entwickelt werden. Zur Verwendung als interner Standard wurde zunächst γ -Glu-Ala- $^{13}\text{C}_3$ (**25**) mittels Festphasensynthese hergestellt und die Struktur mittels LC-MS/MS verifiziert. **Abbildung 18** zeigt die Produktionenspektren von (**A**) unmarkiertem γ -Glu-Ala (**4**) und (**B**) γ -Glu-Ala- $^{13}\text{C}_3$ (**25**). Der Vergleich der m/z -Verhältnisse der Pseudomolekülonen sowie der y_1 -Fragmente zeigte mit der Erhöhung der Molekülmasse um drei Masseneinheiten deutlich die eingebrachte Isotopenmarkierung. Zudem wurde anhand von NMR-Experimenten die erfolgreiche Synthese des internen Standards sichergestellt (siehe Kapitel 3.4.6.4).

Um eine adäquate Empfindlichkeit der Methode zu gewährleisten, wurden die spezifischen Ionisierungs- und Fragmentierungsparameter aller Analyten (**1** – **24**) und des internen Standards (**25**) softwaregestützt optimiert. Die jeweils optimalen Parameter sind in Kapitel 3.4.2.2.2 (**Tabelle 34**) zusammengefasst. Die beste chromatographische Trennung der Analyten zeigte sich auf einer PFP (Pentafluorphenylpropyl)-Phase unter Verwendung eines Wasser (0,1 % Ameisensäure)/Acetonitril (0,1 % Ameisensäure)-Gradienten.

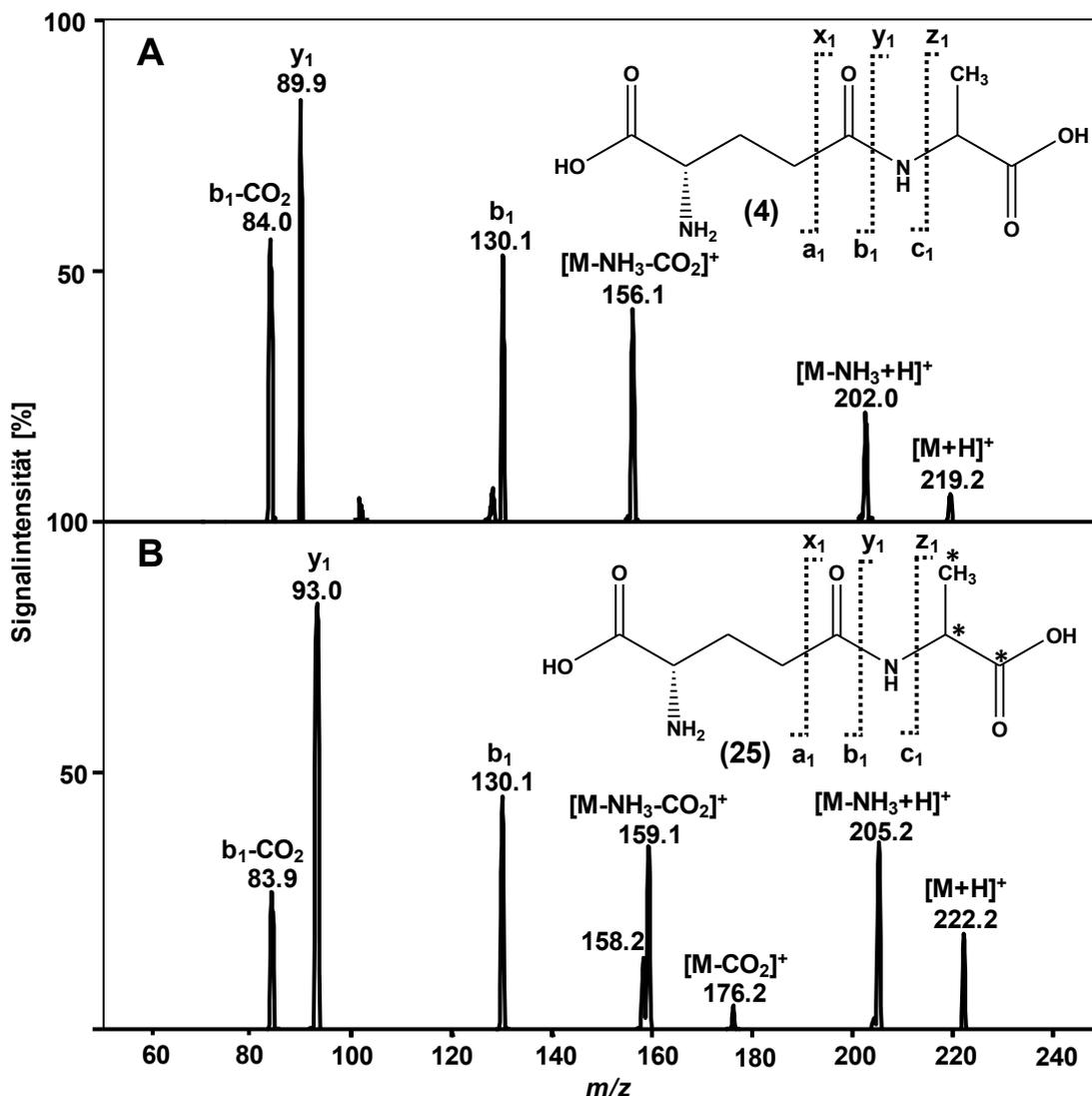


Abbildung 18. MS²-Spektren (ESI⁺) von (A) γ -Glu-Ala (4) und (B) γ -Glu-Ala-[¹³C₃] (25); *¹³C-Kohlenstoffatom.

Vor der Extraktion wurde den Parmesan-Proben jeweils eine definierte wässrige Lösung des internen Standards zugegeben und die Proben für 30 Minuten unter leichtem Schütteln equilibriert. Anschließend wurden die Käseproben mit Salzsäure (0,1 M) extrahiert und die erhaltenen Suspensionen zentrifugiert. Nach Filtration der wässrigen Phasen in Messkolben und einem weiteren Verdünnungsschritt wurden die Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS verwendet.

Um die Eignung der Methode zur Quantifizierung der Glutamylopeptide in Parmesankäse sicherzustellen, wurden Validierungsexperimente durchgeführt. Da die Selektivität einer Methode, d.h. die Fähigkeit verschiedene Analyten nebeneinander ohne gegenseitige Störung

zu erfassen, Grundvoraussetzung für deren Richtigkeit ist (Kromidas, 2011), wurde zunächst eine mögliche Überlagerung von Peptiden mit inverser Aminosäuresequenz überprüft. Dazu wurden exemplarisch das Peptidpaar α -/ γ -Glu-Ala (**3**, **4**) sowie Ala-Glu (**26**) verwendet. Letzteres unterscheidet sich in der Aminosäuresequenz, nicht aber im Molekulargewicht von den anderen beiden Analyten (**Abbildung 19**).

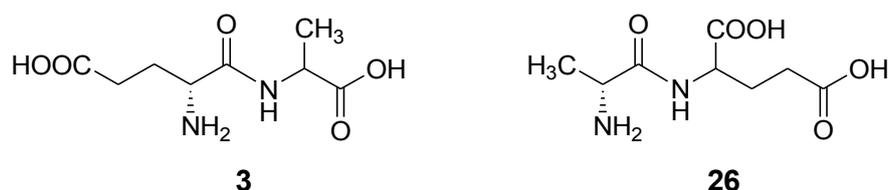


Abbildung 19. Strukturformeln von α -Glu-Ala (**3**) und Ala-Glu (**26**).

Die Injektion des korrespondierenden Glutamylopeptid-Paares α -/ γ -Glu-Ala (**3**, **4**) und von Ala-Glu (**26**) in das LC-MS-System und Detektion im MRM-Modus ergab zum einen eine abweichende Retentionszeit und zum anderen nur einen marginalen Peak des Ala-Glu beim Übergang m/z 219,0 \rightarrow 90,0 (**A** und **C**, **Abbildung 20**). Dieser Übergang repräsentiert das Pseudomolekülion sowie das bei der Fragmentierung entstehende y_1 -Fragment, dessen m/z -Verhältnis von der C-terminalen Aminosäure abhängt. Im Gegensatz dazu konnte für alle drei Analyten beim Übergang m/z 219,0 \rightarrow 84,0 ein deutlich erkennbarer Peak detektiert werden, da dieser unspezifisch durch den bei der Fragmentierung aller drei analysierten Peptide entstehenden Glutamyrest erzeugt wird (**B** und **D** in **Abbildung 20**). Folglich wurden für alle in der Methode enthaltenen Glutamylopeptide die charakteristischen Massenübergänge $[\text{M}+\text{H}]^+ \rightarrow [\text{y}_1\text{-Fragment}]$ für die Quantifizierung verwendet, um eine spezifische Detektion zu gewährleisten.

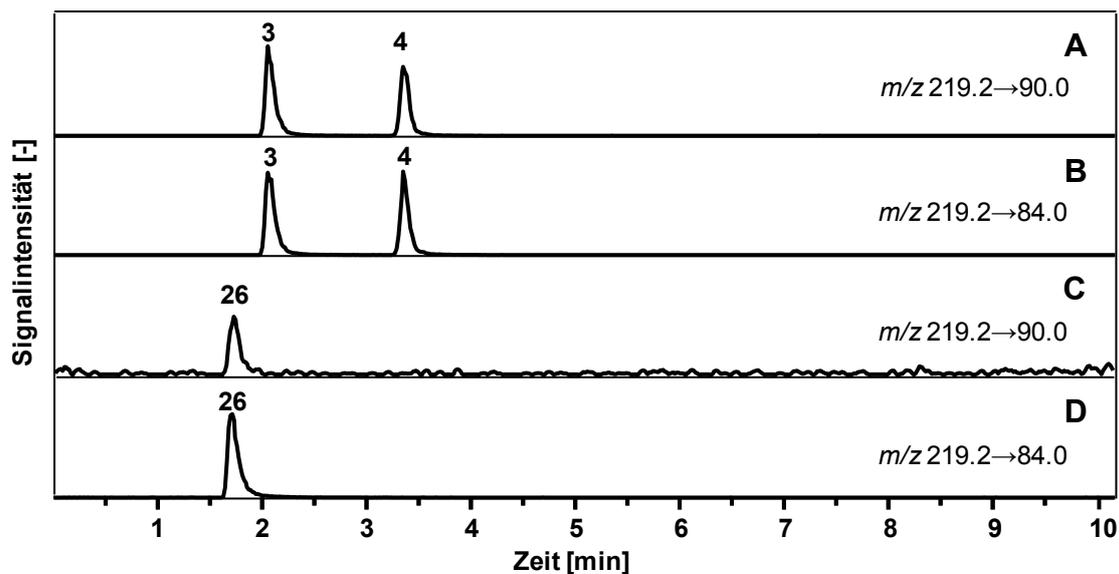


Abbildung 20. LC-MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren (ESI^+) von α - und γ -Glu-Ala (3, 4) (A) und (B) sowie von Ala-Glu (26) (C) und (D).

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision, die ein Maß für die Streuung der Analyseergebnisse ist und durch Angabe der relativen Standardabweichung (RSA) ausgedrückt wird (Kromidas, 2011), wurden fünf einzelne Einwaagen eines größeren Parmesanstückes aufgearbeitet und in das LC-MS-System injiziert. Die in geringen Konzentrationen vorliegenden Peptide α -Glu-Ala (3), α -Glu-Val (5), α -Glu-Asp (11), α -Glu-Trp (12), γ -Glu-Gln (17) und α -Glu-Lys (24) wiesen relative Standard-Abweichungen zwischen 6,09 und 11,83 % auf. Für alle anderen Analyten ergaben sich präzise Werte (RSA = 2,00 – 4,69 %) (Tabelle 4).

Tabelle 4. Bestimmung der Wiederholpräzision der entwickelten LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der α -/ γ -Glutamyl-dipeptide 1 – 24 in Parmesankäse P-24.

Peptid	Gehalt [μ mol/kg Frischgewicht] in Probe					Mittelwert	RSA ^b [%]
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a		
α -Glu-Gly (1)	29,27	27,46	27,85	27,41	27,07	27,81	3,10
γ -Glu-Gly (2)	1089,48	1047,72	1063,14	1020,95	1037,05	1051,67	2,49
α -Glu-Ala (3)	8,20	8,38	7,28	8,98	7,70	8,11	8,11
γ -Glu-Ala (4)	219,56	220,06	209,62	217,18	221,44	217,57	2,16
α -Glu-Val (5)	31,78	32,14	33,04	34,54	37,78	33,86	7,21
γ -Glu-Val (6)	1377,19	1265,10	1300,53	1245,50	1342,86	1306,23	4,16
α -Glu-Glu (7)	136,47	128,04	133,50	124,60	132,67	131,06	3,60
γ -Glu-Glu (8)	3346,60	3270,26	3268,60	3147,47	3269,79	3260,54	2,19
γ -Glu-Tyr (10)	205,41	191,33	201,48	198,52	204,70	200,29	2,85
α -Glu-Asp (11)	10,56	9,84	10,45	10,18	11,63	10,53	6,41
α -Glu-Trp (12)	2,34	1,89	2,58	2,07	2,25	2,23	11,83
α -Glu-Thr (13)	34,17	35,94	36,50	33,92	37,91	35,69	4,69
γ -Glu-Lys (14)	1179,48	1154,90	1075,09	1188,96	1096,73	1139,03	4,45
γ -Glu-Leu (15)	1302,07	1255,30	1312,48	1239,17	1372,08	1296,22	4,03
γ -Glu-Ile (16)	989,25	921,08	955,61	989,59	914,32	953,97	3,77
γ -Glu-Gln (17)	165,98	140,41	156,03	150,25	151,27	152,79	6,09
γ -Glu-Met (18)	650,83	641,13	623,53	636,42	620,04	634,39	2,00
γ -Glu-His (19)	6520,39	6450,04	6005,73	6035,90	6005,98	6203,61	4,17
γ -Glu-Phe (20)	1177,45	1124,18	1129,14	1127,14	1156,79	1142,94	2,04
γ -Glu-Asp (21)	290,66	276,32	274,10	265,68	287,80	278,91	3,69
γ -Glu-Thr (22)	2513,82	2441,10	2533,16	2451,69	2584,00	2504,75	2,37
γ -Glu-Trp (23)	60,89	58,82	60,83	59,27	61,82	60,33	2,06
α -Glu-Lys (24)	192,63	157,84	184,35	182,35	156,54	174,74	9,44
Summe	21536,7	20861,2	20607,2	20399,8	20742,4	20829,4	2,10

^a Proben 1 – 5 wurden jeweils einzeln aufgearbeitet und dreimal injiziert; ^b RSA = relative Standardabweichung. Nummerierung der Proben bezieht sich auf **Abbildung 12** und **Abbildung 17**.

Im nächsten Schritt erfolgten auf Basis der zuvor erhaltenen Daten Wiederfindungsexperimente, die der Überprüfung der Richtigkeit dienten. Dazu wurden jeweils drei Einwaagen des Parmesans mit allen Analyten in drei verschiedenen Konzentrationen aufgestockt und die Gehalte nach Probenaufarbeitung bestimmt. Die Wiederfindungsrate, die sich nach *Kromidas* (2011) aus der Steigung der Regressionsgeraden

bei Auftragung der Ist/Soll-Gehalte ergibt und neben der Richtigkeit auch einen Beweis für die Selektivität und Robustheit der Methode darstellt, betrug für die Summe aller Analyten 107,4 %. Die Wiederfindungsraten der einzelnen Analyten sind in **Tabelle 5** zusammengefasst und lagen im Bereich von 85,6 – 118,8 %.

Tabelle 5. Wiederfindungsraten für die einzelnen α - und γ -Glutamylpeptide 1 – 24 in Parmesankäse P-24.

Analyt	Ist/Soll [%]	Steigung (Wiederfindungsrate [%]) ^a
α -Glu-Gly (1)	100,2 – 111,9	1,098 (109,8)
γ -Glu-Gly (2)	97,9 – 102,7	0,996 (99,6)
α -Glu-Ala (3)	102,0 – 104,7	1,036 (103,6)
γ -Glu-Ala (4)	98,1 – 103,8	1,015 (101,5)
α -Glu-Val (5)	98,9 – 110,9	1,039 (103,9)
γ -Glu-Val (6)	97,7 – 109,2	1,054 (105,4)
α -Glu-Glu (7)	100,3 – 118,8	1,096 (109,6)
γ -Glu-Glu (8)	97,1 – 102,8	1,006 (100,6)
γ -Glu-Tyr (10)	98,5 – 111,4	1,066 (106,6)
α -Glu-Asp (11)	96,1 – 105,9	1,022 (102,2)
α -Glu-Asp (12)	104,8 – 107,6	1,051 (105,1)
α -Glu-Thr (13)	100,9 – 112,8	1,081 (108,1)
γ -Glu-Lys (14)	102,5 – 117,8	1,102 (110,2)
γ -Glu-Leu (15)	103,5 – 110,8	1,086 (108,6)
γ -Glu-Ile (16)	97,8 – 112,9	1,075 (107,5)
γ -Glu-Gln (17)	96,8 – 107,9	1,032 (103,2)
γ -Glu-Met (18)	99,5 – 112,3	1,072 (107,2)
γ -Glu-His (19)	101,6 – 116,3	1,098 (109,8)
γ -Glu-Phe (20)	99,0 – 116,3	1,043 (104,3)
γ -Glu-Asp (21)	103,0 – 107,1	1,055 (105,5)
γ -Glu-Thr (22)	99,7 – 108,7	1,050 (105,0)
γ -Glu-Trp (23)	85,6 – 97,5	0,903 (90,3)
α -Glu-Lys (24)	103,5 – 107,9	1,064 (106,4)
Summe	99,8 – 107,2	1,074 (107,4)

^aSteigung \times 100 = Wiederfindungsrate [%] aus n = 3. Nummerierung der Analyten bezieht sich auf **Abbildung 12** und **Abbildung 17**.

Die durchgeführten Validierungsexperimente zeigen, dass die entwickelte LC-MS/MS-Methode die selektive und präzise Quantifizierung der α - und γ -Glutamylpeptide in Parmesankäse ermöglichte.

2.1.1.3 Quantifizierung von Geschmacksstoffen und Berechnung von DoT-Faktoren

Im nächsten Schritt wurde eine umfassende Quantifizierung aller potentiellen Sensometaboliten (**Abbildung 21**) durchgeführt, um auf quantitativen Daten basierende Geschmacksrekombinate von WE-24 und P-24 herstellen zu können.

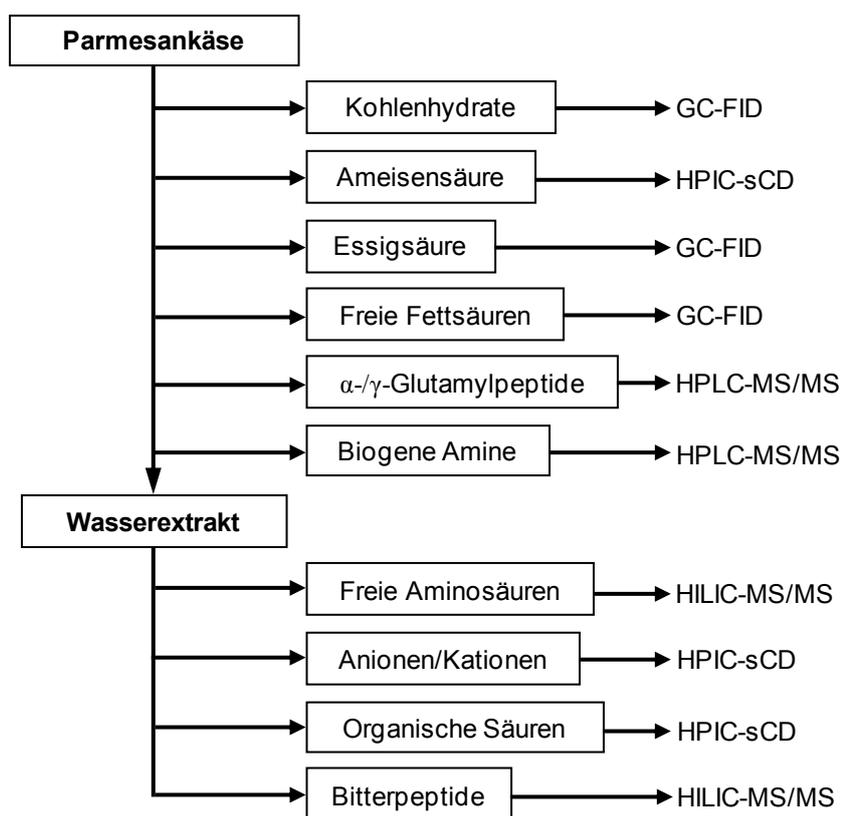


Abbildung 21. Schema zur Analyse potentieller Geschmacksstoffe in Parmesankäse.

Kohlenhydrate, Essigsäure und freie Fettsäuren wurden mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID), Ameisensäure mittels Ionenchromatographie mit unterdrückter Leitfähigkeit (HPIC-sCD), α - und γ -Glutamylpeptide mittels HPLC-MS/MS und biogene Amine nach Derivatisierung mittels HPLC-MS/MS direkt aus dem Käse bestimmt. Freie Aminosäuren wurden anhand HILIC-MS/MS, mineralische Anionen und Kationen sowie organische Säuren mit HPIC-sCD und bittere Caseinspaltpeptide (*Toelstede und Hofmann, 2008a*) mit Hilfe von HPLC-MS/MS-Messungen aus wässrigen Lösungen von WE-24 quantifiziert. Die Analyse von Kohlenhydraten ergab die Abwesenheit jeglicher Zucker. Unter den bitteren Caseinspaltpeptide wurden kürzlich identifizierten Verbindungen LVYPPFGPIHN, YPFPGPIHN, VYPPFGPIP, YPFPGPIP, YQQPVLGPVRGP oder

EIVPN (Toelstede und Hofmann, 2008a) jeweils um den Faktor >1000 unterhalb ihres jeweiligen Schwellenwertes detektiert, so dass diese Verbindungen im Weiteren nicht berücksichtigt wurden (Daten nicht gezeigt).

Ein HPIC-Chromatogramm der mineralischen Anionen und Säureanionen in P-24 ist in **Abbildung 22** dargestellt. **Abbildung 23** zeigt exemplarisch die LC-MS/MS-Chromatogramme der mit Dansylchlorid derivatisierten biogenen Amine und der isotopenmarkierten Standards Tyramin- d_4 und Histamin- d_4 in P-24.

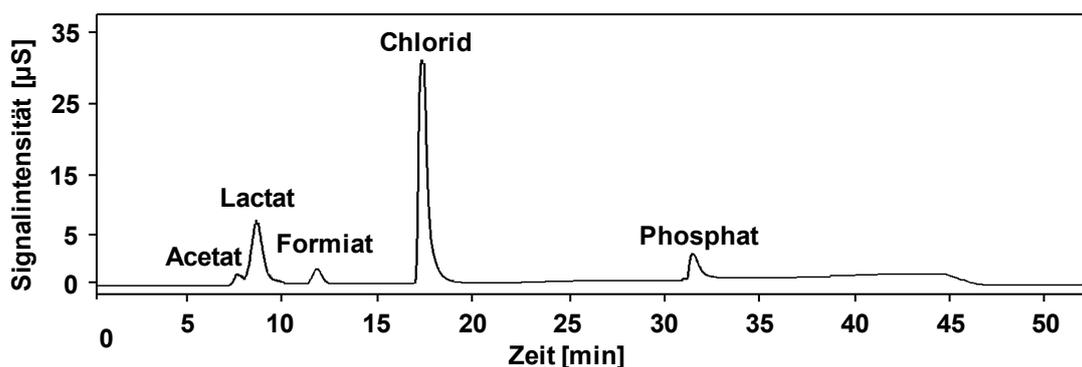


Abbildung 22. HPIC-Chromatogramm der mineralischen Anionen und Säureanionen in P-24.

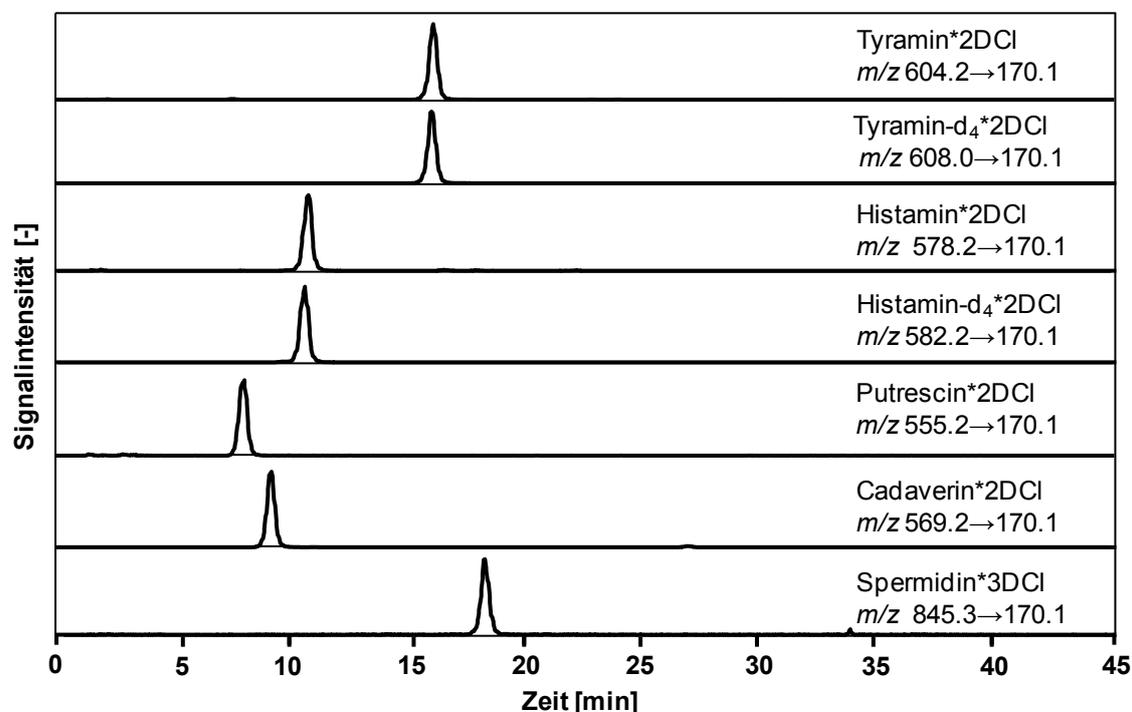


Abbildung 23. LC-MS/MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren (ESI^+) der Dansylchlorid-Derivate von Tyramin, Histamin, Putrescin, Cadaverin und Spermidin sowie der isotopenmarkierten Standards Tyramin- d_4 und Histamin- d_4 ; DCI = Dansylchlorid.

Um die Verbindungen zu identifizieren, die vornehmlich für das Hervorrufen der einzelnen Geschmacksqualitäten verantwortlich sind, wurden alle quantifizierten Geschmacksstoffe in Abhängigkeit von ihrer Geschmacksqualität in Gruppen eingeteilt. Falls keine Literaturwerte vorhanden waren, wurden Schwellenwerte für den intrinsischen Geschmack durch das Sensorikpanel bestimmt. Basierend auf den quantitativen Daten wurde für jede Verbindung der Dose-over-Threshold-Faktor (DoT) als Quotient aus Konzentration im Parmesan und Geschmacksschwellenwert berechnet. Alle analysierten Verbindungen, ihre Konzentrationen und korrespondierenden DoT-Faktoren sind in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Insgesamt wurden 65 Sensometabolite quantifiziert, von denen elf in der Gruppe der bitter schmeckenden Verbindungen (Gruppe I) zusammengefasst wurden, darunter neun Aminosäuren und die bivalenten Kationen Calcium und Magnesium. Calcium wies mit 142653 $\mu\text{mol/kg}$ die höchste Konzentration unter den bitteren Substanzen auf, gefolgt von den Aminosäuren L-Lysin (103486 $\mu\text{mol/kg}$), L-Leucin (88212 $\mu\text{mol/kg}$), L-Valin (87377 $\mu\text{mol/kg}$) und L-Isoleucin (76479 $\mu\text{mol/kg}$). Die restlichen bitteren Aminosäuren sowie Magnesium wurden in Konzentrationen von 3378 – 24790 $\mu\text{mol/kg}$ gefunden.

Die umami schmeckenden Aminosäuren wurden in Gruppe II zusammengefasst, wobei L-Glutaminsäure mit einer Konzentration von 152708 $\mu\text{mol/kg}$ die majore Verbindung darstellte. L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutamin wurden mit deutlich geringeren Gehalten von 48449, 31763 und 5956 $\mu\text{mol/kg}$ detektiert.

Die Kationen Natrium und Kalium sowie die Anionen Chlorid und Phosphat repräsentieren die salzig schmeckenden Verbindungen in Gruppe III. Dabei wurden Natrium und Chlorid mit Gehalten von 232601 und 104429 $\mu\text{mol/kg}$ in deutlich höheren Konzentrationen gefunden als Kalium (28917 $\mu\text{mol/kg}$) und Phosphat (9643 $\mu\text{mol/kg}$). In der Gruppe der sauren Sensometaboliten (Gruppe IV) wurden die Säureanionen Lactat, Acetat und Citrat zusammengefasst. Lactat war mit 17726 $\mu\text{mol/kg}$ die Hauptverbindung in dieser Gruppe und entsteht während des Herstellungsprozesses durch mikrobielle Aktivität aus Lactose (*Fox et al.*, 1990).

Tabelle 6. Geschmacksschwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$], Konzentrationen [$\mu\text{mol/kg}$] und DoT-Faktoren aller in P-24 und WE-24 quantifizierten Geschmacksstoffe.

Verbindung	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$] ^a	Konzentration [$\mu\text{mol/kg}$ Käse] ^b	DoT ^c
Gruppe I: bitter			
Calcium	6200 ^{d,e}	142653	23,0
Magnesium	6400 ^{d,e}	14775	2,4
L-Leucin	11000 ^f	88212	8,0
L-Isoleucin	10000 ^f	76479	7,6
L-Valin	30000 ^e	87377	2,9
L-Tyrosin	4000 ^f	9151	2,3
L-Lysin	80000 ^f	103486	1,3
L-Tryptophan	4000 ^f	3823	0,9
L-Histidin	45000 ^f	21700	0,5
L-Arginin	75000 ^f	24790	0,3
L-Phenylalanin	45000 ^f	3378	<0,1
Gruppe II: umami			
L-Glutaminsäure	1100 ^e	152708	138,8
L-Asparaginsäure	600 ^e	48449	80,7
L-Asparagin	50000 ^e	31763	0,6
L-Glutamin	50000 ^e	5956	0,1
Gruppe III: salzig			
Natrium	3900 ^{d,e}	232601	59,6
Chlorid	3900 ^{h,e}	104429	26,8
Kalium	13000 ^{d,e}	28917	2,2
Phosphat	5000 ^{h,j}	9653	1,9
Gruppe IV: sauer			
Lactat	11890 ^{g,h,e} /23770 ^{i,h,e}	17726	1,5/0,7
Acetat	3100 ^e	3602	1,2
Citronensäure	2600 ^k	314	0,1
Gruppe V: süß			
L-Prolin	25000 ^m	126621	5,1
L-Methionin	5000 ^l	22570	4,5
L-Alanin	12000 ^m	46486	3,9
L-Serin	25000 ^m	89787	3,6

Glycin	25000 ^m	51781	2,1
L-Threonin	35000 ^m	39028	1,1
Gruppe VI: Freie Fettsäuren			
Buttersäure	4000 ^{g,e}	4639	1,2
Capronsäure	3400 ^{g,e}	1815	0,5
Caprylsäure	5200 ^{g,e}	1236	0,2
Caprinsäure	15500 ^{g,e}	1720	0,1
Laurinsäure	n.b.	1031	n.b.
Myristinsäure	n.b.	3744	n.b.
Palmitinsäure	n.b.	8576	n.b.
Stearinsäure	n.b.	1611	n.b.
Ölsäure	670 ^{o,e} /2650 ^{p,e}	6447	9,8/2,5
Gruppe VII: Biogene Amine			
Histamin	600 ^{h,r} /10000 ^{f,s}	1170	2,0
Tyramin	500 ^{h,r} /2000 ^{f,s}	540	1,1
Cadaverin	130 ^{e,t}	304	2,3
Putrescin	100 ^{e,t}	89	0,9
Spermidin	n.b.	16	n.b.
Gruppe VIII: α-/γ-Glutamylpeptide			
α -Glu-Gly (1)	2500 ^{u,v}	27	<0,1
α -Glu-Ala (3)	10000 ^{u,v}	8	<0,1
α -Glu-Val (5)	5000 ^{u,v}	33	<0,1
α -Glu-Glu (7)	2500 ^{u,v}	131	<0,1
α -Glu-Asp (11)	1250 ^{u,v}	11	<0,1
α -Glu-Trp (12)	5000 ^{s,v}	3	<0,1
α -Glu-Thr (13)	2500 ^{u,v}	35	<0,1
α -Glu-Lys (24)	1300 ^u	175	0,1
γ -Glu-Gly (2)	1250 ^{u,v}	1055	0,8
γ -Glu-Ala (4)	900 ^{u,v}	216	0,2
γ -Glu-Val (6)	3300 ^{u,v}	1290	0,4
γ -Glu-Glu (8)	5000 ^{u,v} , 10000 ^{i,v}	3299	0,6/0,3
γ -Glu-Tyr (10)	2500 ^{u,v} , 5000 ^{s,v}	200	<0,1
γ -Glu-Lys (14)	2000 ⁱ	1156	0,6
γ -Glu-Leu (15)	9400 ^{u,v}	1296	0,1

γ -Glu-Ile (16)	5000 ^u	952	0,2
γ -Glu-Gln (17)	2500 ^{u,v}	152	<0,1
γ -Glu-Met (18)	2500 ^{u,v}	626	0,2
γ -Glu-His (19)	2500 ^{u,v}	6204	2,4
γ -Glu-Phe (20)	2500 ^{u,v}	1146	0,5
γ -Glu-Asp (21)	900 ^u	276	0,3
γ -Glu-Thr (22)	300 ^u	2538	8,5
γ -Glu-Trp (23)	2000 ^u	60	<0,1

^a Geschmacksschwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] wurden in mineralstoffarmem Wasser bei pH 5,3 ermittelt oder aus der Literatur übernommen; ^b Konzentration ($\mu\text{mol/kg}$ Frischgewicht) in Parmesankäse; ^c Dose-over-Threshold (DoT)-Faktor: Quotient aus Konzentration im Käse und Geschmacksschwellenwert (*Scharbert et al.*, 2004b); ^d Schwellenwert wurde für das korrespondierende Chlorid ermittelt; ^e *Toelstede und Hofmann*, 2008b; ^f *Wieser et al.*, 1975; ^g Schwellenwert für sauer; ^h Schwellenwert für das korrespondierende Natriumsalz; ⁱ Schwellenwert für umami; ^j *Warmke*, 1997; ^k *Hufnagel und Hofmann*, 2008b; ^l *Warendorf*, 1991; ^m *Wieser et al.*, 1977; ^o Schwellenwert für belegende Adstringenz; ^p Schwellenwert für einen fettigen Geschmackseindruck; ^r Schwellenwert für einen brennenden Geschmackseindruck; ^s Schwellenwert für Bitterkeit; ^t *Kubickova und Grosch*, 1998b; ^u Schwellenwert für unspezifischen, adstringierenden Geschmackseindruck; ^v *Toelstede et al.*, 2009. Nummerierung der Glutamylpeptide bezieht sich auf **Abbildung 12** und **Abbildung 17**.

Gruppe V bestand aus sechs süßen Aminosäuren, von denen L-Prolin (126621 $\mu\text{mol/kg}$) mit der höchsten Konzentration detektiert wurde und die weiteren Substanzen Gehalte von 22570 – 89787 $\mu\text{mol/kg}$ aufwiesen. Freie Fettsäuren (Gruppe VI) wurden in Konzentrationen von 1031 – 8576 $\mu\text{mol/kg}$ gefunden. Unter den biogenen Aminen (Gruppe VII) waren Histamin (1170 $\mu\text{mol/kg}$) und Tyramin (540 $\mu\text{mol/kg}$) die majoren Verbindungen. Putrescin, Cadaverin, sowie Spermidin waren in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen enthalten.

Die mit 23 Verbindungen größte Gruppe VIII fasste die α - und γ -Glutamylpeptide zusammen, wobei acht α - und 15 γ -Peptide detektiert werden konnten. Die α -Glutamylpeptide waren in geringen Gehalten von 3 – 175 $\mu\text{mol/kg}$ vorhanden, wohingegen die meisten der γ -Glutamylpeptide in deutlich höheren Konzentrationen gefunden wurden. Die Hauptverbindungen waren dabei γ -Glu-His (**19**) mit 6204 $\mu\text{mol/kg}$, γ -Glu-Glu (**8**) mit 3299 $\mu\text{mol/kg}$ und γ -Glu-Thr (**22**) mit 2538 $\mu\text{mol/kg}$. Desweiteren lagen γ -Glu-Lys (**14**), γ -Glu-Phe (**20**), γ -Glu-Val (**6**), γ -Glu-Leu (**15**) und γ -Glu-Gly (**2**) in Konzentrationen über 1000 $\mu\text{mol/kg}$ vor.

Die Berechnung der DoT-Faktoren für die einzelnen Verbindungen als Quotient ihrer Konzentration im Parmesan und den Geschmacksschwellenwerten, ergab für 28

Sensometaboliten einen DoT-Faktor $>1,0$ und für 21 Substanzen einen DoT-Faktor von $0,1 - 1,0$ (siehe **Tabelle 6**).

In der Gruppe der bitteren Verbindungen (Gruppe I) wurde der höchste DoT-Faktor (23,0) für Calcium erhalten, wohingegen sich für das ebenfalls bivalente Kation Magnesium ein geringerer Wert von 2,4 ergab. Für die bitter schmeckenden Aminosäuren wurden für L-Leucin (8,0), L-Isoleucin (7,6), L-Valin (2,9), L-Tyrosin (2,3) und L-Lysin (1,3) ebenfalls DoT-Faktoren über 1,0 und somit der Hinweis auf einen direkten Beitrag zum Geschmack des Parmesans erhalten.

In der Gruppe der umami-schmeckenden Verbindungen wiesen L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure die insgesamt höchsten DoT-Faktoren von 138,8 und 80,7 auf, was ihre Relevanz für den Umamigeschmack unterstrich. Im Gegensatz dazu war von L-Glutamin (0,1) und L-Asparagin (0,6) kein direkter Beitrag zum Umamigeschmack zu erwarten.

Für die salzigen Substanzen wurden für alle in dieser Gruppe zusammengefassten Verbindungen DoT-Faktoren größer 1 erhalten, wobei Natrium (59,6) und Chlorid (26,8) die mit Abstand höchsten Werte aufwiesen. Bei den sauren Sensometaboliten wiesen die DoT-Faktoren von Lactat (1,5) und Phosphat (1,9) auf einen direkten Beitrag zum Geschmack hin und für die süßen Aminosäuren kann aufgrund der DoT-Faktoren bei allen detektierten Verbindungen von einem Einfluss auf den Geschmack ausgegangen werden.

In der Gruppe der freien Fettsäuren ergaben sich lediglich für die sauer schmeckende Buttersäure (1,2) und für Ölsäure (9,8/2,5), die sowohl einen adstringierenden als auch einen fettigen Geschmackseindruck hervorruft, DoT-Faktoren über 1,0. Für die homologe Reihe von Capron-, Capryl- und Caprinsäure wurden jeweils DoT-Faktoren $<1,0$ ermittelt. Deswegen sowie aufgrund ihrer geringen Löslichkeit wurden die freien Fettsäuren für alle weiteren sensorischen Experimente in wässriger Lösung nicht berücksichtigt.

Da für die biogenen Amine Histamin und Tyramin, die beide einen brennenden Geschmackseindruck hervorrufen, DoT-Faktoren über 1,0 erhalten wurden, konnte ein direkter Einfluss dieser Verbindungen auf die typische, brennende Geschmacksqualität des Parmesans angenommen werden. Von den beiden bitter schmeckenden Aminen Putrescin und Cadaverin wies letzteres einen DoT-Faktor über 1,0 auf.

In Gruppe VIII wurde lediglich für γ -Glu-His (**19**) (2,4) und γ -Glu-Thr (**22**) (8,5) ein DoT-Faktor über 1,0 erhalten und somit für die meisten der α - und γ -Glutamylpeptide ein direkter Beitrag zum Geschmack des Parmesans ausgeschlossen. Die sensorische Relevanz der γ -Glutamylpeptide beruht auf ihrer geschmacksverstärkenden Wirkung, welche allerdings

stark matrixabhängig ist. So beträgt zum Beispiel der Schwellenwert von γ -Glu-Leu (**15**) für die Wahrnehmung des Kokumi-Effektes in „Double Boiled Chicken Broth“ 800 $\mu\text{mol/l}$ (Dunkel *et al.*, 2007), wohingegen in wässriger Goudamatrix eine Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ dieser Verbindung für eine geschmacksverstärkende Wirkung ausreicht (Toelstede *et al.*, 2009). Zudem konnte von Toelstede *et al.* (2009) eine Abhängigkeit der Kokumi-Intensität vom pH-Wert gefunden werden, die bei pH 6,7 ein Maximum durchläuft. Daher war es nötig, den Umfang des Einflusses dieser Peptide auf den Geschmack des vorliegenden Parmesankäses im Folgenden durch Rekombinations- und Omissionsexperimente zu evaluieren.

2.1.1.4 Rekombinations- und Omissionsexperimente

Basierend auf den quantitativen Daten und den sich daraus ergebenden DoT-Faktoren wurden im Folgenden Rekombinations- und Omissionsexperimente in wässriger Lösung sowie in Parmesanmatrix durchgeführt. Dadurch sollte einerseits die Vollständigkeit und Richtigkeit der instrumentell-analytischen Daten überprüft und andererseits der Beitrag einzelner Geschmacksstoffe und Geschmacksstoffgruppen zum Gesamtgeschmack offengelegt werden.

Rekombinations- und Omissionsexperimente in wässriger Lösung

Um zu untersuchen, ob die Gesamtheit der bisher quantifizierten Geschmacksstoffe zur adäquaten Imitation des Geschmacks von Parmesan ausreichte, wurden zunächst alle erfassten Verbindungen in ihren natürlichen Konzentrationen (**Tabelle 6**) in mineralstoffarmem Wasser aufgenommen und der pH-Wert der Lösung mit 1 %iger Ameisensäure auf 5,3 eingestellt. Anschließend wurde das wässrige Rekombinat um den Faktor zwei verdünnt und vom Sensorikpanel einer vergleichenden Geschmacksprofilanalyse unterzogen, bei der alle Geschmacksqualitäten auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet wurden. Eine gleichfalls verdünnte wässrige Lösung des WE-24 (vgl. Kapitel 2.1.1.1) diente dabei als Referenz.

Abbildung 24 zeigt deutlich, dass authentische Extrakt WE-24 und das Rekombinat rWE-24 nahezu identische Geschmacksprofile aufwiesen. Keine der bewerteten Geschmacksqualitäten des Rekombinates wies einen signifikanten Unterschied zur Referenz auf. Die

Übereinstimmung der Geschmacksprofile von Gesamtrekombinat und WE-24 zeigt die umfassende und erfolgreiche Quantifizierung der geschmacksaktiven Verbindungen in Parmesankäse auf, weswegen im Folgenden auf eine sensorisch-orientierte Fraktionierung des WE-24 zur Lokalisierung und Identifizierung weiterer geschmacksaktiver Verbindungen verzichtet werden konnte. Stattdessen sollten Omissionsexperimente den Einfluss einzelner Verbindungen oder Substanzklassen auf den Geschmack des Parmesans offenlegen. Durch Weglassen von Verbindungen wurden hierfür Teilrekominate angefertigt, die dann jeweils vom Sensorikpanel mittels vergleichender Geschmacksprofilanalyse gegen den WE-24 verkostet und bewertet wurden. **Tabelle 7** gibt einen Überblick über die durchgeführten Omissionsexperimente und die jeweils omittierten Substanzklassen und Verbindungen.

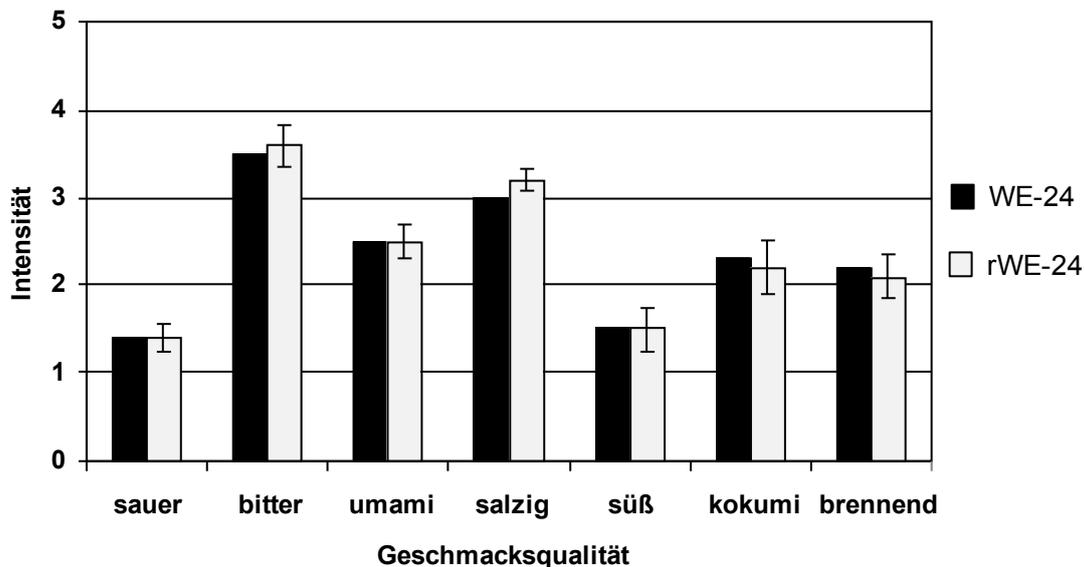


Abbildung 24. Geschmacksprofile von WE-24 und dessen Rekombinat rWE-24. Die Abbildung beruht auf Daten in Tabelle 44 (Kapitel 6).

Tabelle 7. Übersicht über die mit dem rWE-24 durchgeführten Omissionsexperimente sowie omittierte Geschmacksgruppen und -stoffe.

Rekombinat	Omission von	omitierte Substanzen
rWE-24 ^{<0,5}	Verbindungen mit DoT < 0,5	L-Glutamin, L-Arginin, L-Phenylalanin, Citronensäure
rWE-24 ^{<1,0}	Verbindungen mit DoT < 1,0	L-Asparagin, L-Glutamin, L-Arginin, L-Histidin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, Citronensäure, Putrescin
rWE-24 ^{-α/γ}	allen α - und γ -Glutamylpeptiden	α -Glu-Gly, α -Glu-Thr, α -Glu-Val, α -Glu-Glu, α -Glu-Ala, α -Glu-Asp, α -Glu-Trp, α -Glu-Lys, γ -Glu-Glu, γ -Glu-Met, γ -Glu-His, γ -Glu-Gln, γ -Glu-Ala, γ -Glu-Gly, γ -Glu-Leu, γ -Glu-Val, γ -Glu-Met, γ -Glu-Phe, γ -Glu-Tyr, γ -Glu-Asp, γ -Glu-Thr, γ -Glu-Trp, γ -Glu-Ile, γ -Glu-Lys
rWE-24 ^{-α}	allen α -Glutamylpeptiden	α -Glu-Gly, α -Glu-Thr, α -Glu-Val, α -Glu-Glu, α -Glu-Ala, α -Glu-Asp, α -Glu-Trp, α -Glu-Lys
rWE-24 ^{-γ}	allen γ -Glutamylpeptiden	γ -Glu-Glu, γ -Glu-Met, γ -Glu-His, γ -Glu-Gln, γ -Glu-Ala, γ -Glu-Gly, γ -Glu-Leu, γ -Glu-Val, γ -Glu-Met, γ -Glu-Phe, γ -Glu-Tyr, γ -Glu-Asp, γ -Glu-Thr, γ -Glu-Trp, γ -Glu-Ile, γ -Glu-Lys
rWE-24 ^{-BA}	biogenen Aminen	Histamin, Tyramin
rWE-24 ^{-Arg}	L-Arginin	L-Arginin

Nach Definition des Dose-Over-Threshold-Faktors leisten nur die Substanzen einen direkten Beitrag zum Geschmack eines Lebensmittels, deren DoT-Faktoren > 1,0 sind (Scharbert *et al.*, 2004b). In einem ersten Experiment wurden daher zunächst alle Verbindungen, die einen DoT-Faktor > 0,5 aufwiesen und anschließend alle Substanzen mit einem DoT-Faktor > 1,0 omittiert. Die α - und γ -Glutamylpeptide, von denen die γ -Formen für ihre geschmacksverstärkenden Eigenschaften bekannt sind, wurden in diesen beiden Experimenten nicht omittiert. Im ersten Fall fehlten vier Substanzen: die umami schmeckende Aminosäure L-Glutamin, die bitteren Verbindungen L-Arginin und L-Phenylalanin sowie Citronensäure.

Wie in **Abbildung 25 A** dargestellt, hatte das Fehlen dieser Substanzen nur einen marginalen Einfluss auf das Geschmacksprofil dieses Teilrekombinates $rWE24^{>0,5}$.

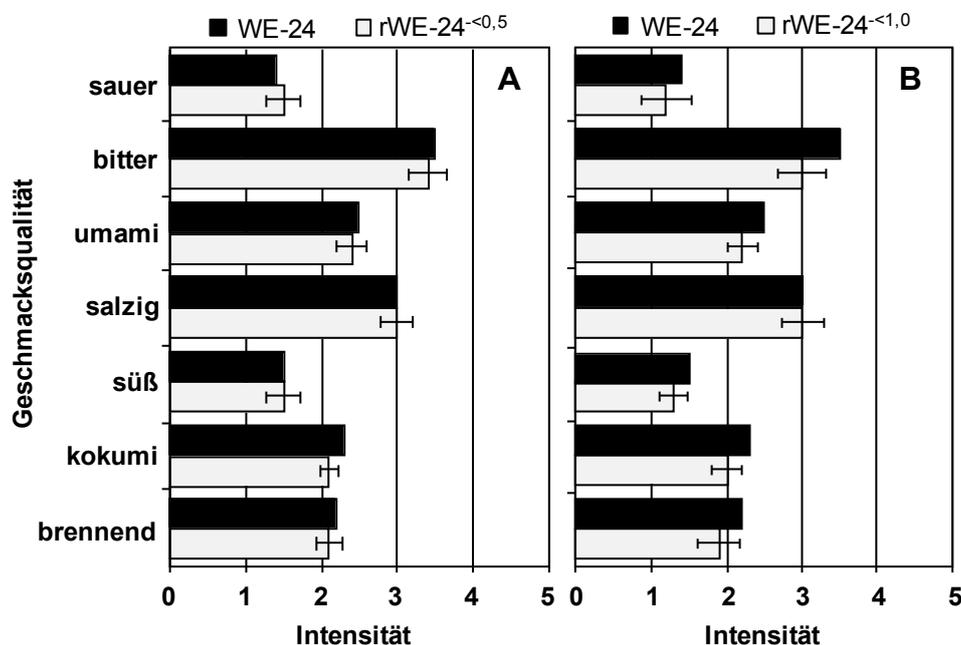


Abbildung 25. Geschmacksprofile von (A) $rWE24$ und $rWE24^{<0,5}$ und (B) $rWE24$ und $rWE24^{<1,0}$. Abbildung beruht auf Daten in Tabelle 44 (Kapitel 6).

Im zweiten Experiment wurden insgesamt acht Verbindungen weggelassen, darunter die beiden umami schmeckenden Aminosäuren L-Asparagin und L-Glutamin, die bitteren Verbindungen L-Arginin, L-Histidin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan und Putrescin sowie Citronensäure. Das aus der Bewertung gegen die Referenz resultierende Geschmacksprofil des Teilrekombinates $rWE24^{<1,0}$ ist in **Abbildung 25 B** dargestellt und weist deutliche Unterschiede zum Geschmacksprofil des WE-24 auf. Bis auf die Salzigkeit, die mit der gleichen Intensität bewertet wurde, nahmen die Panelisten alle übrigen Geschmacksqualitäten im $rWE24^{<1,0}$ mit geringeren Intensitäten als im WE-24 wahr. Die Abnahme der Bitterintensität konnte durch das Fehlen der bitteren Aminosäuren erklärt werden. Diese wiesen zwar einzeln DoT-Faktoren unter 1,0 auf, können aber zusammen durch additive oder synergistische Effekte einen Einfluss auf den Geschmack ausüben. Dies wurde bereits durch wässrige Teilrecombinate von Goudakäse gezeigt (Toelstede und Hofmann, 2009b). Die Abnahme der Intensitäten der anderen Geschmacksqualitäten, wie z.B. der Umamiqualität konnte nicht direkt mit der Abwesenheit bestimmter Substanzen korreliert werden, zeigte

aber, dass bereits das Fehlen von minoren Geschmacksstoffen einen Einfluss auf das gesamte Geschmacksprofil haben kann. Dieses Phänomen wurde bereits 1975 von *Moskowitz* beschrieben und konnte für verschiedene Lebensmittel, wie z.B. Rotwein, Goudakäse oder Morcheln anhand von Rekombinationsexperimenten, bei denen minore Sensometabolite omittiert wurden, bestätigt werden (*Rotzoll et al.*, 2006; *Hufnagel und Hofmann*, 2008b; *Toelstede und Hofmann*, 2009).

In einer zweiten Reihe von Weglassexperimenten wurden einzelne Verbindungsklassen oder Substanzen aus dem Rekombinat omittiert, um die Auswirkung auf einzelne Geschmacksqualitäten zu untersuchen. Zunächst wurde die gesamte Gruppe der α - und γ -Glutamylpeptide weggelassen, was eine starke Abnahme der Kokumi-Qualität von 2,3 auf 1,3 des resultierenden rWE24^{- α/γ} zur Folge hatte (**Abbildung 26 A**). Desweiteren wurden bitterer Geschmack und brennender Eindruck des rWE24^{- α/γ} in höheren Intensitäten wahrgenommen als im WE-24. Ein Einfluss auf den bitteren Geschmack durch das Fehlen der α - und γ -Glutamylpeptide konnte in der Vergangenheit bereits für Goudakäse gezeigt werden (*Toelstede et al.*, 2009). Die Beeinflussung des brennenden Eindrucks hingegen wurde durch die vorliegenden Sensoriken erstmals nachgewiesen.

Im Weiteren wurden entweder nur die α - Glutamylpeptide oder die γ -Glutamylpeptide omittiert, wobei das Fehlen der α - Glutamylpeptide keinen Einfluss auf die Kokumi-Intensität oder eine andere Geschmacksqualität des Rekombinates rWE24^{- α} hatte (**Abbildung 26 B**). Die Abwesenheit der γ -Glutamylpeptide hingegen führte erneut zu einer Abnahme der Kokumi-Intensität um 1,0 Einheiten (**Abbildung 26 C**) und bestätigte somit die geschmacksverstärkenden Eigenschaften dieser Substanzklasse.

In einem vierten Omissionsexperiment wurde ein Rekombinat ohne die biogenen Amine Histamin und Tyramin hergestellt und im Vergleich zu WE-24 sensorisch beurteilt. Das Fehlen der beiden Verbindungen hatte eine deutliche Abnahme des brennenden Geschmackseindruckes im rWE-24^{-BA} von 2,2 auf 0,5 bei gleichzeitigem Anstieg des sauren und salzigen Geschmacks um jeweils 0,3 Einheiten zur Folge (**Abbildung 26 D**). Durch dieses sensorische Experiment konnten somit Histamin und Tyramin erstmals als hauptverantwortliche Verbindungen für den charakteristischen, brennenden Eindruck von Parmesankäse identifiziert werden.

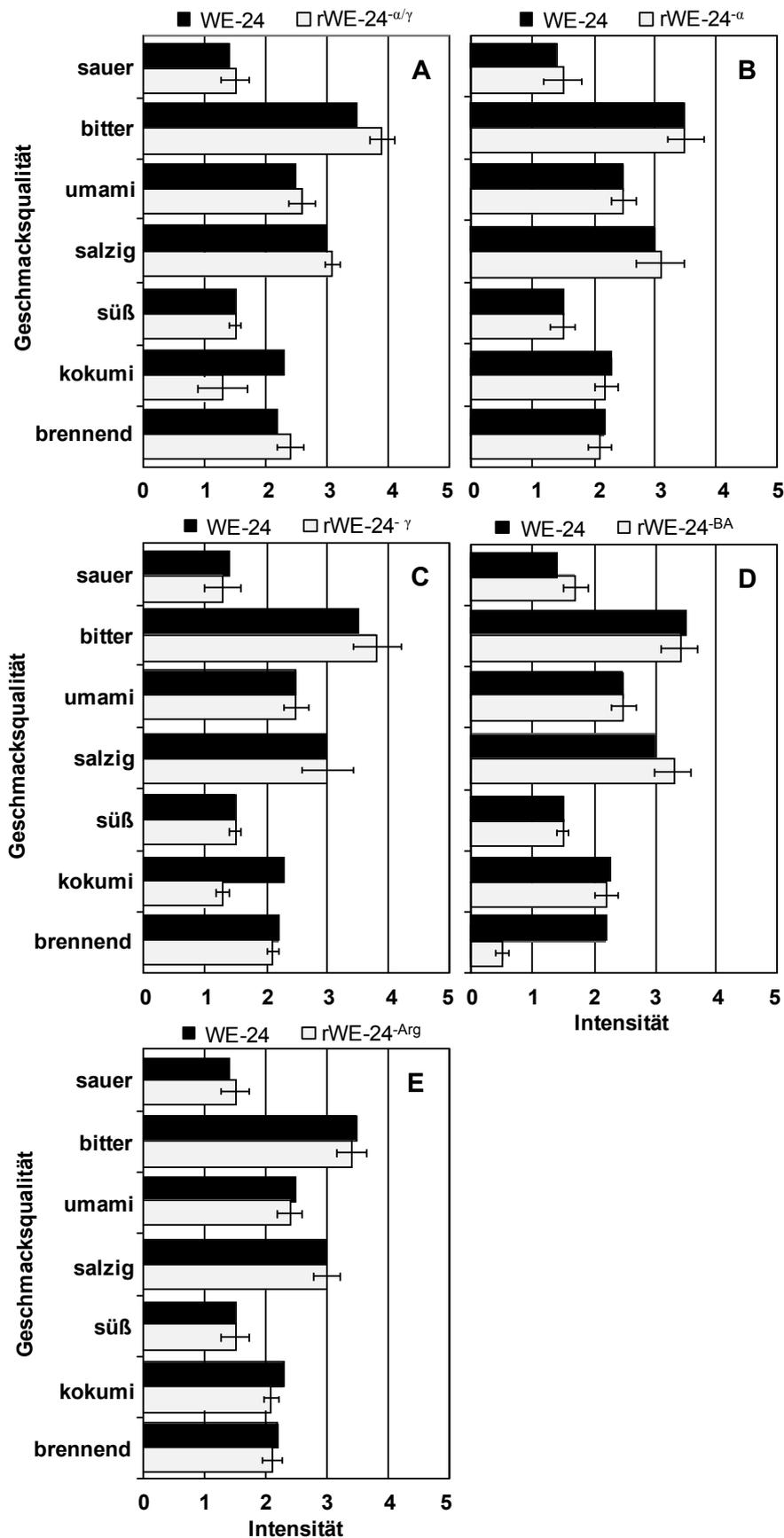


Abbildung 26. Geschmacksprofile von (A) WE-24 und rWE-24^{-α/γ}, (B) WE-24 und rWE-24^{-α}, (C) WE-24 und rWE-24^{-γ}, (D) WE-24 und rWE-24^{-BA} und (E) WE-24 und rWE-24^{-Arg}. Abbildung beruht auf Daten in Tabelle 44 (Kapitel 6).

Im letzten Omissionsexperiment wurde die salzverstärkende Wirkung von L-Arginin untersucht, die bereits von mehreren Autoren beschrieben wurde (*Lee, 1992; Guerrero et al., 1998; Stähler et al., 2008; Toelstede und Hofmann, 2008b*). Allerdings liegen keine detaillierten Kenntnisse über den benötigten Konzentrationsbereich sowohl von L-Arginin als auch der salzigen Verbindungen vor. Das Fehlen dieser eigentlich bitter schmeckenden Aminosäure führte nur zu einer nicht signifikanten Abnahme der Salzintensität des rWE-24^{Arg} um 0,1 Einheiten (**Abbildung 26 E**). Somit konnte eine salzverstärkende Wirkung dieser Aminosäure im Parmesankäse ausgeschlossen werden.

Anhand der Omissionsexperimente in wässriger Lösung wurden die für den Geschmack des Parmesans relevanten Substanzen identifiziert. Neben den Kokumi-aktiven γ -Glutamylpeptiden konnten die biogenen Amine Histamin und Tyramin als Schlüsselverbindungen für den charakteristischen brennenden Eindruck offengelegt werden. Weiterhin zeigte sich der Beitrag von minoren Komponenten zum Gesamtgeschmack. Um den Einfluss der Käsematrix auf das wahrgenommene Geschmacksprofil des Rekombinates zu untersuchen, wurden im Folgenden Rekombinationsexperimente in Parmesanmatrix durchgeführt.

Rekombinationsexperimente in Parmesanmatrix

Um einerseits die Ergebnisse der quantitativen Analysen weiterhin zu verifizieren und andererseits den Einfluss der Käsematrix auf die Geschmackswahrnehmung zu untersuchen, wurde ein Rekombinat des P-24 in Matrix hergestellt (rP-24).

Dazu wurden alle Geschmacksstoffe (**Tabelle 6**) in ihren natürlichen Konzentrationen in der Menge Wasser, die dem Wassergehalt des untersuchten Käses entspricht, aufgenommen und der pH Wert der Lösung auf 5,3 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit den bei der Extraktion abgetrennten Protein- und Fettphasen homogenisiert und über Nacht bei 8 °C physikalisch gereift. Das so erhaltene Rekombinat in Matrix wurde im Folgenden vom Sensorikpanel verkostet und gegen den Parmesan als Referenz bewertet. Änderungen der Textur, die sich durch das Homogenisieren der Matrix mit den Geschmacksstoffen ergaben, wurden durch die gleiche Behandlung der Referenzprobe ausgeglichen. Das resultierende Geschmacksprofil des rP-24 zeigte eine gute Übereinstimmung in allen Geschmacksqualitäten

mit dem des P-24 und bestätigte somit erneut die erfolgreiche und vollständige Quantifizierung der Sensometaboliten in Parmesankäse (**Abbildung 27**).

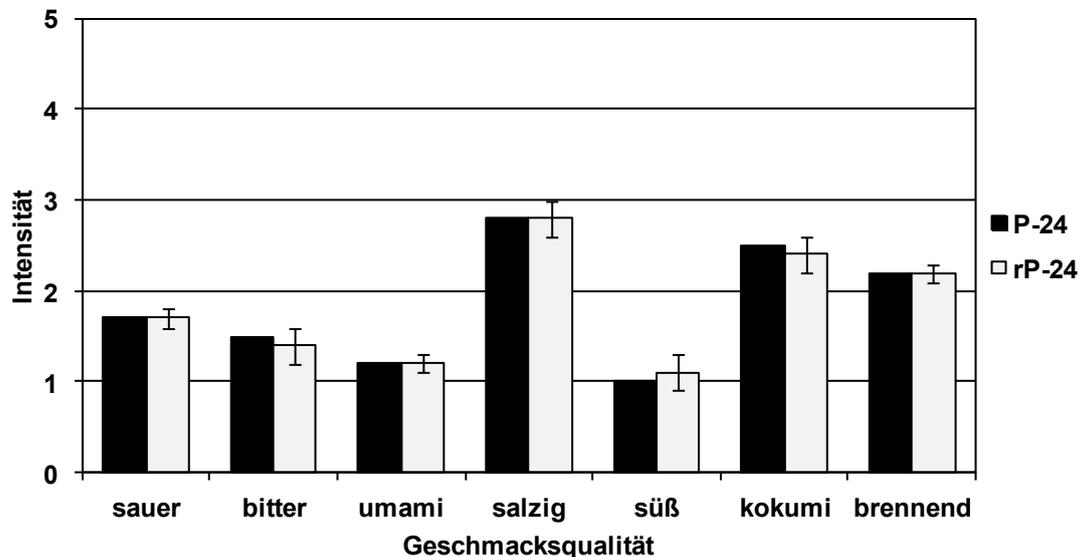


Abbildung 27. Geschmacksprofile von P-24 und rP-24. Abbildung beruht auf Daten in Tabelle 45 (Kapitel 6).

2.1.1.5 Diskussion

Die Geschmacksprofilanalyse eines 24 Monate alten Parmesankäses ergab, dass Salzigkeit, Brennen und die als Kokumi bezeichnete langanhaltende, komplexe Mundfülle (*Ueda et al.*, 1990) die dominierenden Geschmacksqualitäten waren. Da zahlreiche Autoren bereits zeigen konnten, dass die nicht-flüchtigen, geschmacksaktiven Verbindungen in Käse wasserlöslich sind (*McGugan et al.*, 1979; *Aston und Creamer*, 1984; *Salles et al.*, 1995; *McSweeney*, 1997; *Engel et al.*, 2000b) wurde ein wässriger Extrakt des Parmesans hergestellt und ebenfalls sensorisch evaluiert. Dabei wurden bitterer und umami Geschmack mit deutlich stärkeren sowie Salzigkeit und Süße mit moderat größeren Intensitäten als zuvor im Käse wahrgenommen. Der Einfluss der Käsematrix auf die Wahrnehmung von Aroma- und Geschmacksstoffen wurde bereits von *Delahunty und Piggot* (1995), *McSweeney* (1997) oder auch *Piparez et al.* (1998) postuliert und durch Rekombinationsexperimente für Goudakäse (*Toelstede und Hofmann*, 2008b) und Camembert (*Engel et al.*, 2001a) bestätigt. Dabei sind die vorliegenden Ergebnisse für die Wahrnehmung der Salzigkeit im Einklang mit denen der genannten Autoren, wohingegen die intensivere Wahrnehmung der Bitterkeit konträr ist. Die

Ursache hierfür ist in den in Parmesankäse relativ hohen Gehalten der bitter schmeckenden bivalenten Kationen Calcium und Magnesium zu finden, deren Geschmack durch das Fehlen der Käsematrix deutlicher wahrgenommen wird.

Ein im Folgenden durchgeführtes LC-MS/MS-basiertes Screening nach potentiellen Sensometaboliten erlaubte erstmals die umfassende Identifizierung von insgesamt acht α - und 15 γ -Glutamyldipeptiden in Parmesankäse. Nachdem *Roudot-Algaron et al.* (1994) die drei γ -Glutamyldipeptide γ -Glu-Tyr (**10**), γ -Glu-Leu (**15**) und γ -Glu-Phe (**20**) aus Comté-Käse isolieren konnten, gelang *Toelstede et al.* (2009) die Identifizierung weiterer acht γ -Glutamylpeptide und deren korrespondierenden α -Formen in Goudakäse und anderen Käsesorten. Über das Vorliegen der Kokumi-verstärkenden γ -Glutamylpeptide in Parmesankäse waren hingegen bisher nur unvollständige Angaben zu finden. Durch die vorliegenden Untersuchungen konnten neben den bereits in Parmesan bekannten Verbindungen γ -Glu-Val (**6**), γ -Glu-Tyr (**10**), γ -Glu-Leu (**15**), γ -Glu-Ile (**16**), γ -Glu-Met (**18**) und γ -Glu-Phe (**20**) (*Sforza et al.*, 2009) weitere neun γ - und acht α -Glutamyldipeptide detektiert werden. Unter diesen befanden sich die vier Peptide γ -Glu-Asp (**21**), γ -Glu-Thr (**22**), γ -Glu-Trp (**23**) und α -Glu-Lys (**24**), die zuvor noch nicht in Käse beschrieben wurden. Die sensorische Charakterisierung dieser Verbindungen ergab jeweils einen unspezifisch-adstringierenden Geschmackseindruck mit intrinsischen Geschmacksschwellenwerten zwischen 300 und 5000 $\mu\text{mol/l}$. Dies steht im Einklang mit Daten aus der Literatur (*Dunkel et al.*, 2007; *Toelstede et al.*, 2009). Die sich anschließende Quantifizierung führte zur mengenmäßigen Erfassung der 23 Glutamylpeptide mittels LC-MS/MS unter Verwendung von γ -Glu-Ala- $^{13}\text{C}_3$ als internem Standard. Validierungsexperimente belegten die Selektivität und Richtigkeit der Methode. In der Literatur ist zwar eine LC-MS-Methode unter Verwendung von γ -Glu-Met- d_3 , das durch Inkubation von *Penicillium roquefortii* mit den entsprechenden Aminosäuren erhalten wurde, als internem Standard beschrieben, allerdings ohne Angaben zur Validität der Methode (*Toelstede*, 2008). Im Rahmen jener Arbeit zeigte der Vergleich der Ergebnisse, die durch externe und interne Kalibration erhalten wurden, dass die Werte der Quantifizierung mittels internen Standards bis auf wenige Ausnahmen geringer waren als die der externen Quantifizierung. Desweiteren ist eine massenspektrometrische Quantifizierungsmethode unter Verwendung des Dipeptides Phe-Phe als internem Standard in der Literatur zu finden (*Sforza et al.*, 2009). Die in der vorliegenden Arbeit in Parmesankäse gefundenen Gehalte der geschmacksverstärkenden γ -Glutamylpeptide waren verglichen mit Daten für andere Käsesorten sehr hoch und die Konzentration in der Summe mit

28249 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse deutlich höher, als der bisher höchste in der Literatur beschriebene Wert für Blauschimmelkäse (3590 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse) (*Toelstede und Hofmann, 2009*). Die Ursachen dafür werden in Kapitel 2.1.2 behandelt.

Die quantitative Analyse weiterer Sensometabolite führte zur Detektion von 19 Aminosäuren, fünf biogenen Aminen, neun freien Fettsäuren, den Anionen Chlorid und Phosphat, den Kationen Magnesium, Calcium, Natrium und Kalium sowie Essig-, Milch- und Citronensäure. Kohlenhydrate, vor allem Lactose und bittere Caseinspaltpeptide konnten hingegen nicht bzw. nur in Spuren gefunden werden. Unter den Aminosäuren waren L-Glutaminsäure, L-Prolin, L-Lysin, L-Serin, L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin die majoren Verbindungen, was Angaben aus der Literatur (*Engels und Visser, 1994; Careri et al., 1996*) entspricht. Da L-Glutaminsäure mit 23,4 % die am häufigsten auftretende Aminosäure im Milchprotein Casein ist (*Belitz et al., 2001*), und dieses während der Käsereifung durch Enzyme wie Proteinasen und Peptidasen in Peptide und schließlich Aminosäuren gespalten wird, ist L-Glutaminsäure in hoher Konzentration im gereiften Parmesan zu finden (*Upadhyay et al., 2004*). Die quantitativen Daten für freie Fettsäuren, organische Säuren, biogene Amine sowie mineralische Anionen und Kationen waren ebenfalls mit publizierten Daten konform (*Engels und Visser, 1994; Virgilli et al., 1994; Careri et al., 1996; Gobetti, 2004; Custodio et al., 2007*).

Die erste Abschätzung des jeweiligen Geschmacksbeitrags aller quantifizierten Verbindungen erfolgte durch Anwendung des Dose-over-Threshold-Konzepts (*Scharbert et al., 2004b*), wobei sich für 28 der 65 analysierten Substanzen ein DoT-Faktor $>1,0$ ergab. Dies deutete auf einen direkten Beitrag dieser Sensometaboliten zum Geschmack des Parmesankäses hin. Die größten DoT-Faktoren wiesen dabei L-Glutaminsäure (138,7), L-Asparaginsäure (80,7), Natrium (59,6), Chlorid (26,8) und Calcium (23,0) auf, aber auch z.B. L-Leucin (8,0), L-Valin (7,6) oder Histamin (2,0) indizierten aufgrund ihrer DoT-Faktoren einen eindeutigen Geschmacksbeitrag.

Im nächsten Schritt wurde ein biomimetisches Rekombinat in wässriger Lösung angefertigt, das mit Ausnahme der freien Fettsäuren alle quantifizierten Sensometaboliten enthielt. Die vergleichende Geschmacksprofilanalyse ergab eine sehr gute sensorische Übereinstimmung mit dem authentischen Wasserextrakt und zeigte somit die Vollständigkeit und Richtigkeit der durchgeführten instrumentell-analytischen Untersuchungen. Darauf folgende Omissions-experimente legten einerseits die Relevanz von Substanzen mit DoT-Faktoren $< 1,0$ offen und

verifizierten andererseits zum ersten Mal die biogenen Amine Histamin und Tyramin als Schlüsselverbindungen des typischen brennenden Geschmackseindrucks von Parmesankäse. Ein Beitrag von freien Fettsäuren, der von verschiedenen Autoren postuliert wurde (*De La Fuente*, 1993; *Güler*, 2005), konnte somit nicht bestätigt werden. Weitere Omissionsexperimente zeigten den Einfluss der γ -Glutamyl-dipeptide auf den Kokumigeschmack von Parmesankäse und untermauerten dadurch erneut die bereits gezeigte Bedeutung dieser Verbindungsklasse als natürliche Geschmacksverstärker (*Dunkel et al.*, 2007; *Toelstede et al.*, 2009). Im Kontrast zur Literatur stand hingegen das Resultat des Weglassversuches von L-Arginin. Die bekannte und für Goudakäse gefundene salzverstärkende Wirkung dieser Aminosäure (*Guerrero et al.*, 1998; *Stähler et al.*, 2008; *Toelstede und Hofmann*, 2008b) konnte für Parmesankäse nicht bestätigt werden. Dies zeigt die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen über die Konzentrations- und Matrixabhängigkeit dieses Synergismus.

Ein weiterer Faktor, der einen großen Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften eines Käses hat, ist der Anteil und die Struktur der geschmacklosen Matrix. Daher wurde ein abschließendes Rekombinationsexperiment durchgeführt, bei dem die Gesamtheit der quantifizierten Sensometaboliten in ihrer natürlichen Konzentration in der Parmesanmatrix aus Protein- und Fettschicht aufgenommen wurde. Das Geschmacksprofil des Rekombinates in Matrix war nahezu identisch mit dem des entsprechenden Parmesans. Dies zeigte erneut die Richtigkeit der quantitativen Daten und bestätigte zudem die sensorische Relevanz der Matrix (*Warmke et al.*, 1997; *Engel et al.*, 2001b). Diese in Rekombinationsexperimenten vollständig zu simulieren ist allerdings nicht möglich, da durch die Extraktion der Geschmacksstoffe die, während der Reifung entstandenen, Strukturen der Matrix irreversibel aufgebrochen werden (*Engel et al.*, 2001b). *Warmke et al.* (1996) erhielten durch Zugabe der relevanten Geschmacksstoffe und Wasser zu gefriergetrocknetem Mozzarella ein Emmentalerrekombinat, das sich nur in der Textur, nicht aber im Geschmack vom originalen Käse unterschied. *Engel et al.* (2001b) verwendeten für ein Camembertrekombinat die bei der Extraktion erhaltene Fett- und Proteinschicht als Matrix. Dieses Rekombinat wurde allerdings als stärker salzig und weniger bitter als der naturbelassene Camembert empfunden, was von den Autoren auf eine bessere Verfügbarkeit des Salzes, aufgrund der fehlenden typischen Textur zurückgeführt wurde. Ein adäquates Goudarekombinat wurde erhalten, indem die Geschmacksstoffe in unreifem und reifem Gouda quantifiziert und die Differenz der Gehalte dem unreifen Käse zugegeben wurde (*Toelstede und Hofmann*, 2008b). Dadurch wurde ein komplettes Aufbrechen der Käsestruktur vermieden. Änderungen der Textur, die sich durch

das Homogenisieren der Matrix mit den Geschmacksstoffen ergaben, wurden durch die gleiche Behandlung einer Referenzprobe ausgeglichen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das Sensometabolom von reifem Parmesankäse umfassend identifiziert und quantitativ erfasst wurde. Die gefundenen Schlüsselgeschmacksstoffe stimmten dabei qualitativ weitestgehend mit denen für andere Käsesorten postulierten Verbindungen überein (*Engel et al.*, 2001b; *Toelstede und Hofmann*, 2008b). Dies macht deutlich, dass der charakteristische Geschmack eines Käses nicht nur von einzelnen Schlüsselverbindungen sondern insbesondere von den Konzentrationen und relativen Verhältnissen aller Sensometabolite bestimmt wird.

2.1.2 Untersuchungen zur Bildung von Glutamylpeptiden in Parmesankäse

Die quantitative Analyse der Sensometaboliten in gereiftem Parmesankäse (P-24) ergab sehr hohe Konzentrationen an γ -Glutamylpeptiden. Der Gesamtgehalt der γ -Glutamylpeptide in P-24 betrug 28249 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse und lag damit deutlich über dem höchsten bisher publizierten Gehalt an γ -Glutamylpeptiden in Blauschimmelkäse (3590 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse). Der Gesamtgehalt an α -Glutamylpeptiden in P-24 unterschied sich mit einem Wert von 582 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse hingegen nicht von den für andere Käsesorten gefundenen Konzentrationen (*Toelstede und Hofmann*, 2009). Die Bildung von α - und γ -Glutamylpeptiden in Käse erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. Die α -Formen entstehen durch proteolytischen Abbau von Milchproteinen (**Abbildung 28 A**) und werden mit fortschreitender Reifezeit weiter zu Aminosäuren gespalten (*Belitz et al.*, 2001; *Upadhyay et al.*, 2004). Die Bildung der γ -Glutamylpeptide hingegen erfolgt, unter Ausbildung einer Iso-Peptidbindung durch Übertragung eines Glutamylrestes auf eine Akzeptor-Aminosäure oder ein Peptid (**Abbildung 28 B**) (*Suzuki et al.*, 2002). Katalysator dieser Reaktion ist das Enzym γ -Glutamyltransferase (GGT) (E.C. 2.3.2.2), das in Zellen von Säugetieren und Pflanzen vorkommt, aber auch in Fadenpilzen wie z.B. *Penicillium*- oder *Aspergillus*-Arten (*Tomita et al.*, 1990) und in Bakterien wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas mirabilis* (*Suzuki et al.*, 1986) oder *Bacillus subtilis* (*Shuai et al.*, 2010) identifiziert wurde. Diesem Enzym werden Beteiligungen am Aminosäuretransfer durch Zellmembranen und beim Glutathionstoffwechsel zugeschrieben (*Tate und Meister*, 1981).

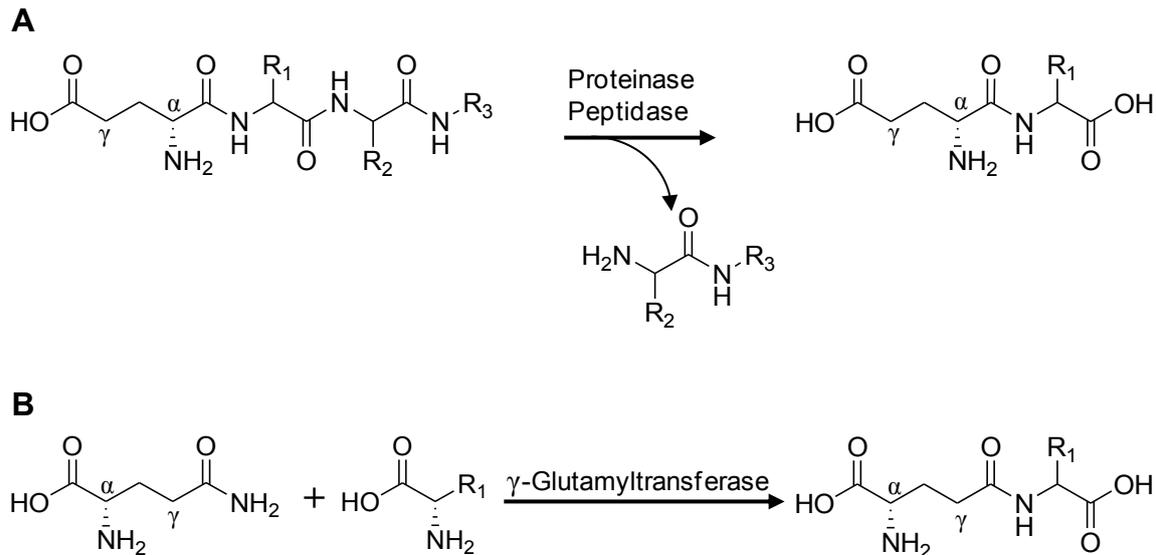


Abbildung 28. Bildungswege von (A) α -Glutamylpeptiden und (B) γ -Glutamylpeptiden. In Anlehnung an Suzuki *et al.* (2002) und Upadhyay *et al.* (2004).

Obwohl das Vorkommen der GGT in Kuhmilch seit langem bekannt ist (Majumder und Ganguli, 1972) und ein Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Anwesenheit von γ -Glutamylpeptiden in Käse vermutet wurde (Fox und Kelly, 2006), konnte diese Annahme erst kürzlich von Toelstede und Hofmann (2009) verifiziert werden. Die Korrelation von quantitativen Daten der γ -Glutamylpeptide in verschiedenen Käsen und deren jeweiliger GGT-Aktivität zeigte vor allem für Käsesorten aus Rohmilch erhöhte Gehalte an γ -Glutamylpeptiden. Eine Ausnahme stellte der bereits zuvor erwähnte Blauschimmelkäse aus pasteurisierter Milch dar, dessen hoher γ -Glutamylpeptidgehalt sich jedoch eindeutig auf die zur Herstellung verwendeten *Penicillium roquefortii* Kulturen zurückführen ließ. Somit waren neben der Rohmilch weitere Quellen für das Enzym GGT in Käse nicht auszuschließen und auch noch nicht in vollem Umfang untersucht. Zwar wurden einige der in der Mikroflora zahlreicher Käsesorten vorkommenden Milchsäurebakterien, darunter zwei *Lactococcus* und zwei *Lactobacillus*-Stämme, von Wiederholt und Steele (1994) auf ihre GGT-Aktivität hin analysiert, jedoch ohne eine Enzym-Aktivität nachweisen zu können. Allerdings können diese Ergebnisse aufgrund der taxonomischen und auch genetischen Vielfalt der zur Käseproduktion eingesetzten Mikroorganismen, die oft unterschiedliche Eigenschaften in der Metabolisierung der Käsematrix aufweisen (Parente und Cogan, 2004), nicht als allgemeingültig angenommen werden. Beispielsweise fanden Tanous *et al.* (2002), dass nur die Hälfte der Stämme von *L. plantarum* und *L. paracasei* das Enzym Glutamatdehydrogenase besitzen, das durch Transaminierungsreaktionen zur Bildung von

Aromastoffen beiträgt. Daher sind Untersuchungen der jeweiligen Mikroflora eines Käses notwendig, um einen möglichen Einfluss dieser auf die Bildung von γ -Glutamylpeptiden zu verifizieren.

2.1.2.1 Einfluss des Reifestadiums auf die Gehalte an α - und γ -Glutamylpeptiden in Parmesankäse

Die im Folgenden durchgeführten Untersuchungen sollten die für die hohen Gehalte der potent geschmacksverstärkenden γ -Glutamylpeptide verantwortlichen Faktoren offenlegen. Um zunächst einen Einblick in die Entwicklung der Gehalte an α - und γ -Glutamylpeptiden während der Reifung zu erhalten, erfolgte die Quantifizierung von acht α - und 15 γ -Glutamylpeptiden sowie deren potentieller Präkursor-Aminosäuren mittels LC-MS/MS in Parmesankäse verschiedener Alterungsstufen. Neben dem bereits analysierten Parmesankäse P-24 wurden ein für 13 Monate (P-13) und ein für 30 Monate (P-30) gereifter Parmesan der gleichen Käserei untersucht. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Glutamylpeptide (**Tabelle 8**) und die der freien Aminosäuren (**Tabelle 9**) sind auf die jeweilige Trockenmasse bezogen.

In der Gruppe der α -Glutamylpeptide wurden α -Glu-Lys (**24**) und α -Glu-Glu (**7**) mit Gehalten von 90,2 (P-13), 243,1 (P-24) und 106,9 (P-30) $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse, bzw. 64,7 (P-13), 178,7 (P-24) und 108,2 (P-30) $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse als die dominierenden Verbindungen gefunden. Für α -Glu-Glu (**7**), das durch Proteolyse von Casein entsteht, war dieses Ergebnis im Einklang mit Daten aus der Literatur (*Toelstede und Hofmann, 2009*). Für α -Glu-Lys (**24**) hingegen, das erstmals in Käse detektiert wurde, gab es keine Vergleichswerte. Da die Aminosäuresequenz α -L-Glutamyl-L-Lysin in bovinem Casein und insbesondere in α_{s1} -Casein zu finden ist (*Belitz et al., 2001*), konnte das Vorkommen des Dipeptides aber ebenfalls durch den proteolytischen Caseinabbau erklärt werden. Insgesamt nahm der Gehalt an α -Glutamylpeptiden von P-13 (239 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse) zu P-24 (582 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse) hin zu, von P-24 zu P-30 (339 $\mu\text{mol/kg}$) hingegen war eine Abnahme der Konzentrationen zu beobachten (**Tabelle 8**). Dieser Verlauf spiegelt den sukzessiven proteolytischen Abbau der Milchproteine zu Dipeptiden und deren weitere Proteolyse zu freien Aminosäuren wider (*Upadhyay et al., 2004*).

Tabelle 8. Konzentrationen [$\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse] an α - und γ -Glutamylpeptiden in Parmesan-Proben P-13, P-24 und P-30.

Peptid	Konzentration [$\mu\text{mol/kg}$ Trm.] ^a in			Verhältnis	
	P-13	P-24	P-30	24/13	30/24
α -Glu-Lys (24)	90,2 \pm 14,0	243,1 \pm 30,9	106,9 \pm 25,6	2,7	0,4
α -Glu-Glu (7)	64,7 \pm 4,7	178,7 \pm 14,9	108,3 \pm 10,4	2,8	0,6
α -Glu-Thr (13)	18,5 \pm 2,9	48,6 \pm 3,8	37,9 \pm 5,3	2,6	0,8
α -Glu-Val (5)	21,0 \pm 1,3	45,1 \pm 3,8	36,2 \pm 3,5	2,1	0,8
α -Glu-Gly (1)	17,4 \pm 4,4	36,9 \pm 3,5	27,6 \pm 5,1	2,1	0,7
α -Glu-Asp (11)	18,1 \pm 2,8	14,7 \pm 1,2	9,5 \pm 0,6	0,8	0,6
α -Glu-Ala (3)	6,4 \pm 1,1	11,5 \pm 1,4	10,1 \pm 1,3	1,8	0,9
α -Glu-Trp (12)	2,6 \pm 0,5	3,4 \pm 0,7	2,6 \pm 0,8	1,3	0,8
γ -Glu-His (19)	2807,8 \pm 120,6	8486,9 \pm 593,2	6075,0 \pm 456,2	3,0	0,7
γ -Glu-Glu (8)	1677,0 \pm 125,2	4564,9 \pm 259,5	3261,4 \pm 198,6	2,7	0,7
γ -Glu-Thr (22)	1026,8 \pm 76,9	3533,0 \pm 178,6	2350,7 \pm 171,2	3,4	0,6
γ -Glu-Val (6)	488,5 \pm 44,4	1785,2 \pm 127,4	1196,0 \pm 84,8	3,7	0,7
γ -Glu-Leu (15)	1028,8 \pm 88,5	1804,2 \pm 75,5	1336,3 \pm 119,5	1,8	0,7
γ -Glu-Lys (14)	384,3 \pm 22,9	1599,0 \pm 72,5	973,8 \pm 98,2	4,1	0,6
γ -Glu-Phe (20)	526,3 \pm 39,2	1595,3 \pm 66,2	1067,5 \pm 61,2	3,0	0,7
γ -Glu-Gly (2)	586,2 \pm 48,8	1449,2 \pm 106,8	1069,8 \pm 41,9	2,5	0,7
γ -Glu-Ile (16)	384,2 \pm 28,8	1325,1 \pm 90,1	915,8 \pm 94,3	3,4	0,7
γ -Glu-Met (18)	459,4 \pm 25,9	866,2 \pm 44,1	600,7 \pm 41,2	1,9	0,7
γ -Glu-Asp (21)	99,1 \pm 11,4	376,2 \pm 32,4	264,2 \pm 11,5	3,8	0,7
γ -Glu-Ala (4)	111,4 \pm 10,5	294,5 \pm 15,9	246,1 \pm 13,3	2,2	0,8
γ -Glu-Tyr (10)	195,9 \pm 8,7	274,7 \pm 14,5	228,9 \pm 18,4	1,4	0,8
γ -Glu-Gln (17)	237,7 \pm 18,3	210,9 \pm 19,4	102,5 \pm 6,5	0,9	0,5
γ -Glu-Trp (23)	26,0 \pm 1,9	83,5 \pm 3,7	52,9 \pm 3,6	3,2	0,6
Σ α -Glu-X	238,9	582,0	339,1	2,4	0,6
Σ γ -Glu-X	10039,5	28248,9	19723,5	2,8	0,7
Σ α/γ -Glu-X	10278,4	28830,9	20062,6	2,8	0,7
Σ γ/Σ α	42,0	48,5	58,2		

^a Konzentration bezieht sich auf die jeweilige Trockenmasse (\pm SD, n=3). Nummerierung der Peptide bezieht sich auf **Abbildung 12** und **Abbildung 17**.

Unter den γ -Glutamylpeptiden war γ -Glu-His (**19**) in allen drei Käseproben mit Konzentrationen von 2807,8 (P-13), 8486,9 (P-24) und 6075,0 (P-30) $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse das majore Peptid, gefolgt von γ -Glu-Glu (**8**), γ -Glu-Thr (**22**) und γ -Glu-Leu (**15**) (**Tabelle 8**). Ähnlich wie für die α -Glutamylpeptide konnte für die γ -Formen mit steigender Reifezeit zunächst eine deutliche Zunahme gefolgt von einer leichten Abnahme der Gesamtkonzentrationen gefunden werden. Für P-13 ergab die quantitative Analyse einen Gesamtgehalt an γ -Glutamylpeptiden von 10039 $\mu\text{mol/kg}$ für P-24, von 28249 $\mu\text{mol/kg}$ und für P-30 von 19724 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse (**Abbildung 29**).

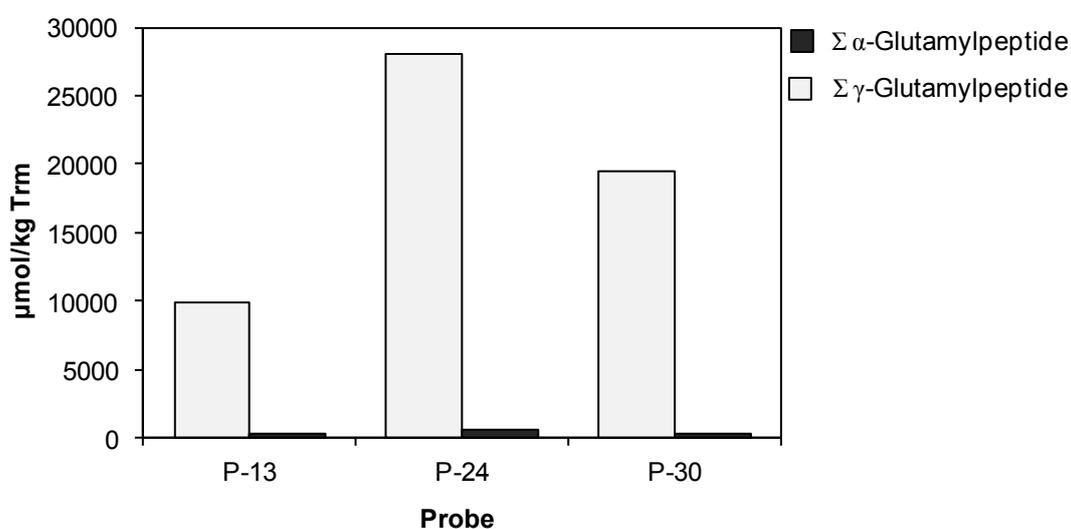


Abbildung 29. Gesamtgehalte ($\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse) an α - und γ -Glutamylpeptiden in Parmesan-Proben P-13, P-24 und P-30.

Dabei zeigten γ -Glu-Lys (**14**), γ -Glu-Asp (**21**), γ -Glu-Val (**6**), γ -Glu-Thr (**22**), γ -Glu-Ile (**16**), γ -Glu-His (**19**) und γ -Glu-Phe (**20**) mit P-24/P-13-Verhältnissen von 4,1 – 3,0 die größten Konzentrationssteigerungen. Die Zunahme von P-13 zu P-24 war auf die Transpeptidaseaktivität der γ -Glutamyltransferase zurückzuführen, wohingegen die spätere Abnahme der ebenfalls beschriebenen Hydrolyseaktivität des Enzyms zugeschrieben werden konnte (*Tate und Meister*, 1981). Interessanterweise war γ -Glu-Gln (**17**) das einzige Peptid, das von P-13 zu P-24 hin in seiner Konzentration nicht zunahm, sondern konstant blieb, bevor zu P-30 hin ebenfalls eine signifikante Abnahme stattfand. Dieser Verlauf wies auf die Rolle von L-Glutamin als Donoraminosäure für die GGT hin. Obwohl sowohl die α - als auch γ -Glutamylpeptide mit fortschreitender Reifezeit von P-24 zu P-30 eine Konzentrationsabnahme zeigten, stieg das Verhältnis von γ - zu α -Peptiden über die gesamte

Reifezeit kontinuierlich an. So ergab sich für P-13 ein γ/α -Verhältnis von 42,0, für P-24 von 48,5 und für P-30 von 58,2. Dieses Resultat spiegelte die unterschiedlichen Bildungswege der beiden Peptid-Formen wider.

Freie Aminosäuren nehmen aufgrund von Proteolyse mit fortschreitendem Reifegrad eines Käses in ihren Konzentrationen zu (*Upadhyay et al.*, 2004) und sind potentielle Präkursoren für die Bildung von γ -Glutamylpeptiden (*Tate und Meister*, 1981; *Suzuki et al.*, 1986). Daher wurden auch diese Verbindungen im Parmesankäse der drei Alterungsstufen (P-13, P-24, P-30) quantitativ erfasst. Die Konzentrationen, bezogen auf die Trockenmasse, sind in **Tabelle 9** zusammengefasst. Dabei wiesen die freien Aminosäuren einen ähnlichen Trend wie die Glutamylpeptide auf und zeigten von P-13 zu P-24 einen Anstieg und von P-24 zu P-30 eine leichte Abnahme in ihren jeweiligen Konzentrationen. Während der Anstieg auf die bereits erwähnte proteolytische Degradation der Milchproteine zurückzuführen war, lag der Grund für die spätere Abnahme in verschiedenen Metabolisierungsreaktionen der einzelnen Aminosäuren, beispielsweise zu Aromastoffen (*Curtin und McSweeney*, 2004). Im Gegensatz zu allen anderen Aminosäuren nahm L-Glutamin über die gesamte untersuchte Reifezeit hin ab, was auf die Rolle dieser Verbindung als Donor für die GGT hinwies. In allen drei Reifestufen waren L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Valin, L-Leucin sowie L-Isoleucin die majoren Aminosäuren (**Tabelle 9**). Die großen Gehalte dieser Verbindungen spiegelten sich in den ebenfalls hohen Konzentrationen an γ -Glu-Glu (**8**), γ -Glu-Lys (**14**), γ -Glu-Val (**6**), γ -Glu-Leu (**15**) und γ -Glu-Ile (**16**) in allen drei Käseproben wider (**Tabelle 8**). Dies deutete darauf hin, dass ein hoher Gehalt an einer Akzeptor-Aminosäure eine vermehrte Bildung des korrespondierenden γ -Glutamylpeptides zur Folge hatte. Diese These wurde bereits von *Toelstede und Hofmann* (2009) für L-Glutaminsäure und γ -Glu-Glu (**8**) aufgestellt und konnte somit auf weitere Aminosäuren ausgedehnt werden. Im Kontrast zu dieser Annahme stand jedoch, dass die korrespondierenden Akzeptoraminosäuren der in Parmesan in großen Mengen vorkommenden Peptide γ -Glu-His (**19**) und γ -Glu-Thr (**22**) in eher moderaten Konzentrationen zu finden waren. Allerdings nahmen L-Histidin und L-Threonin in ihren relativen Gehalten von P-13 zu P-24 stark zu, was auf eine Abhängigkeit der Peptidbildung in Bezug auf die Aminosäurefreisetzung aus Casein hindeutete. Ein ähnliches Verhalten konnte für die korrespondierenden Peptid-Aminosäure-Paare γ -Glu-Asp (**21**) und L-Asparaginsäure sowie γ -Glu-Trp (**24**) und L-Tryptophan beobachtet werden. Im Gegensatz zu dieser These standen allerdings die Konzentrationsänderungen für L-Phenylalanin und γ -Glu-Phe (**20**). Während γ -Glu-Phe (**20**) zu den am stärksten in ihrer Konzentration ansteigenden Peptiden

gehörte (P-24/P-13-Verhältnis: 3,0) war das korrespondierende L-Phenylalanin weder in besonders hohen Konzentrationen im Parmesan enthalten, noch nahm der Gehalt während der Reifung in hohem Umfang zu (P-13: 69,1 mmol/kg, P-24: 90,7 mmol/kg, P-30: 82,7 mmol/kg) (**Tabelle 9**). In diesem Fall konnte eine hohe Substratspezifität der im Parmesan vorkommenden GGT für L-Phenylalanin als Grund für die starke Zunahme von γ -Glu-Phe (**20**) während der Reifung angenommen werden.

Tabelle 9. Konzentrationen [mmol/kg Trm.] an freien Aminosäuren in Parmesan-Proben P-13, P-24 und P-30.

Aminosäure	Konzentration [mmol/kg Trm. \pm SD] ^a			Verhältnis	
	P-13	P-24	P-30	24/13	30/24
L-Glutaminsäure	193,5 \pm 5,9	282,2 \pm 6,4	273,3 \pm 8,2	1,5	0,9
L-Lysin	150,8 \pm 1,1	213,9 \pm 5,7	195,3 \pm 2,7	1,4	0,8
L-Prolin	156,4 \pm 5,5	216,1 \pm 3,8	203,5 \pm 4,2	1,4	0,9
L-Serin	110,7 \pm 3,6	172,8 \pm 2,9	189,8 \pm 1,4	1,6	1,1
L-Valin	109,4 \pm 1,1	150,5 \pm 2,7	138,1 \pm 1,5	1,4	0,9
L-Leucin	96,4 \pm 2,1	114,9 \pm 6,4	110,2 \pm 0,3	1,2	0,9
L-Isoleucin	81,3 \pm 1,9	102,5 \pm 6,4	100,6 \pm 1,5	1,3	1,0
L-Phenylalanin	69,1 \pm 1,0	90,7 \pm 0,9	82,7 \pm 1,3	1,3	0,9
Glycin	59,7 \pm 4,9	83,1 \pm 0,7	68,5 \pm 1,6	1,4	0,8
L-Asparaginsäure	51,5 \pm 0,4	82,1 \pm 0,4	74,8 \pm 1,1	1,6	0,9
L-Asparagin	53,0 \pm 1,3	72,4 \pm 2,5	62,9 \pm 0,3	1,4	0,9
L-Threonin	49,4 \pm 1,5	73,1 \pm 0,7	68,1 \pm 0,9	1,5	0,9
L-Arginin	58,7 \pm 3,7	60,6 \pm 3,1	70,7 \pm 0,4	1,0	1,2
L-Histidin	31,1 \pm 0,8	47,8 \pm 0,9	40,1 \pm 0,2	1,5	0,8
L-Alanin	43,9 \pm 0,6	52,0 \pm 0,7	45,9 \pm 0,4	1,2	0,9
L-Methionin	26,7 \pm 0,2	35,1 \pm 0,3	33,5 \pm 1,2	1,3	1,0
L-Tyrosin	21,1 \pm 0,9	20,3 \pm 0,7	21,7 \pm 1,0	1,0	1,1
L-Tryptophan	4,4 \pm 0,1	6,7 \pm 0,1	6,1 \pm 0,1	1,5	0,9
L-Glutamin	11,3 \pm 0,1	7,4 \pm 0,1	3,5 \pm 0,2	0,7	0,5
Σ	1378,3	1884,2	1789,3	1,4	0,9

^aKonzentration bezieht sich auf die jeweilige Trockenmasse (\pm SD, n = 3).

Die erhaltenen Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Bildung der γ -Glutamylpeptide in Parmesankäse vor allem von der Verfügbarkeit der jeweiligen Präkursor-Aminosäure und nur in zweiter Linie von der charakteristischen Substratspezifität der vorhandenen GGT abhing. Um diese Annahme zu bestätigen, war im Weiteren die Identifizierung der GGT-Quelle im Parmesan, gefolgt von der Charakterisierung der Substratspezifität des vorliegenden Enzyms notwendig.

2.1.2.2 Untersuchungen zur Herkunft der γ -Glutamyltransferase in Parmesan

Wie durch Untersuchungen an verschiedenen Käsesorten bereits gezeigt wurde, kann das Enzym γ -Glutamyltransferase je nach Sorte unterschiedlicher Herkunft sein (*Toelstede und Hofmann, 2009*). Auch für den Ursprung der GGT in Parmesankäse können mehrere Quellen in Betracht gezogen werden: einerseits die zur Herstellung verwendete Rohmilch und andererseits Bakterienstämme der während der Herstellung und später bei der Reifung vorhandenen Mikroflora. Um die in Parmesankäse vorhandene GGT genauer zu charakterisieren sowie deren Quelle zu identifizieren, wurden sowohl die vorliegenden Parmesanproben P-13, P-24 und P-30 als auch rohe und erhitzte Milchproben durch ein photometrisches Nachweisverfahren sowie durch Inkubation mit stabilisotopenmarkiertem L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] auf ihre GGT-Aktivität hin untersucht. Dabei diente das photometrische Nachweisverfahren zur Quantifizierung der Enzymaktivität, wohingegen die Inkubation mit der Donoraminosäure L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] Aufschluss über die Substratspezifität geben sollte. Desweiteren wurde die Zusammensetzung der Mikroflora des Parmesankäses analysiert und, zusammen mit weiteren aus der Mikroflora von ungerieftem Parmesan bekannten Bakterienstämmen, ebenfalls auf eine mögliche GGT-Aktivität hin untersucht. Das Vorgehen zur umfassenden Charakterisierung der GGT in Parmesan ist in **Abbildung 30** veranschaulicht.

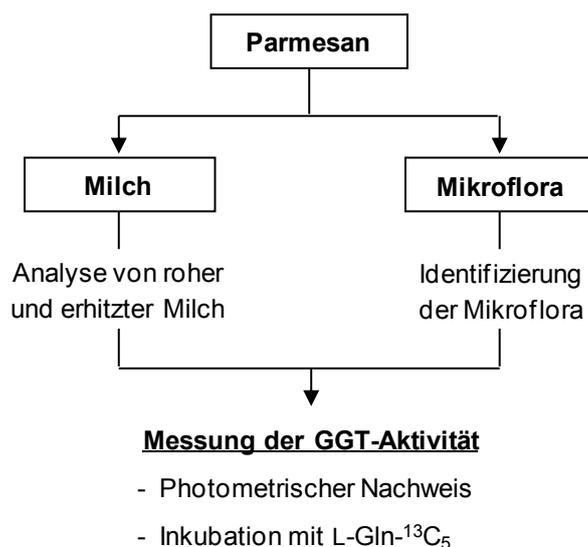


Abbildung 30. Vorgehensweise zur Charakterisierung der γ -Glutamyltransferase in Parmesankäse.

2.1.2.3 Messung der γ -Glutamyltransferase-Aktivität in Parmesankäse

Um den Umfang der GGT-Aktivität im vorliegenden Parmesankäse zunächst quantitativ zu erfassen, wurde ein in der Literatur beschriebener Enzymassay (Blel *et al.*, 2002) verwendet. Dieser beruht auf der GGT-katalysierten Übertragung eines Glutamylrestes aus der Verbindung γ -L-Glutamyl-nitroanilid auf Glycylglycin unter Bildung von γ -L-Glutamyl-glycylglycin und freiem *p*-Nitroanilid, dessen Konzentration im Weiteren photometrisch bei einer Wellenlänge von 410 nm erfasst wird (Abbildung 31).

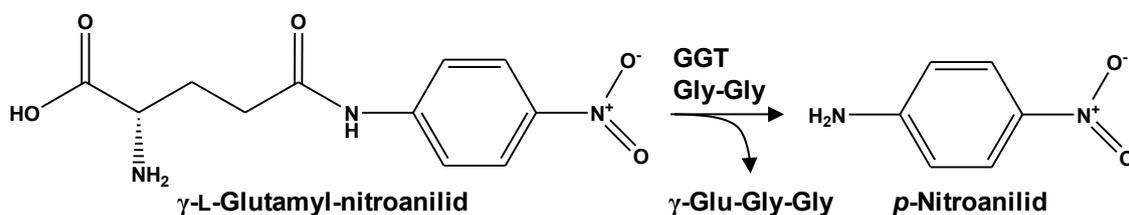


Abbildung 31. Prinzip der photometrischen Erfassung der GGT-Aktivität nach Blel *et al.* (2002).

Die gemessenen GGT-Aktivitäten für P-13, P-24 und P-30 zeigten Werte von 14,6 U/g Trockenmasse für P-13 und P-30 bzw. 15,3 U/g Trockenmasse für P-24 (Tabelle 10). Für andere Käsesorten, deren GGT-Aktivität auf die gleiche Weise bestimmt wurde, sind in der

Literatur Werte zwischen 0,12 U/g Trockenmasse für einen gereiften Ziegenkäse (*Toelstede und Hofmann, 2009*) und 11,68 U/g Trockenmasse für einen aus Rohmilch hergestellten Camembert (*Blel et al., 2002*) angegeben. Für weitere untersuchte Käseproben, bei deren Herstellung pasteurisierte Milch verwendet wurde, konnte größtenteils keinerlei GGT-Aktivität nachgewiesen werden. Eine Ausnahme war der zuvor schon erwähnte Blauschimmelkäse „Blue Shropshire“, dessen GGT-Aktivität von 0,54 U/g Trockenmasse allerdings auf die Anwesenheit von *Penicillium roquefortii*-Stämmen zurückgeführt werden konnte (*Toelstede und Hofmann, 2009*). Die somit vergleichsweise hohe GGT-Aktivität, die für die vorliegenden Parmesankäse-Proben gemessen wurde, spiegelten sich in den ebenfalls hohen Gehalten an γ -Glutamylpeptiden wider, erlaubten allerdings noch keine Rückschlüsse auf die Substratspezifität des Enzyms im Untersuchungsmaterial.

Tabelle 10. GGT- Aktivität [U/g Trockenmasse] der Parmesanproben P-13, P-24 und P-30.

Probe	GGT Aktivität ^a [U/g Trm.±SD]
P-13	14,6±1,7
P-24	15,3±1,4
P-30	14,6±1,8

^aKonzentration bezieht sich auf die jeweilige Trockenmasse (±SD, n = 3).

Um einen ersten Einblick in die Eigenschaften, wie z.B. die Substratspezifität der im Käse vorliegenden GGT zu erhalten, wurden im Folgenden Inkubationsexperimente mit P-24 und isotopenmarkiertem L-Glutamin-[¹³C₅] als Donoraminosäure durchgeführt. Dazu wurde eine genau eingewogene Menge an P-24 in einem zuvor sterilisierten Schraubdeckelgefäß mit einer wässrigen Lösung von L-Glutamin-[¹³C₅] versetzt und der Käse im geschlossenen Gefäß für 21 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Blindwert, dem nur Wasser zugesetzt wurde, wurde parallel mitgeführt. Die Käseproben wurden anschließend wie in Kapitel 2.1.1.2 beschrieben mit internem Standard versetzt, extrahiert und analysiert.

Die Analyse auf eventuell gebildete, isotopenmarkierte γ -[¹³C₅]-Glutamylpeptide erfolgte mittels LC-MS/MS im MRM-Modus, wobei die spezifischen Massenübergänge für die einzelnen Peptide entsprechend der durch die Isotopenmarkierung entstehenden

Massendifferenz modifiziert wurden. Wie in **Abbildung 32** dargestellt, wurde das m/z -Verhältnis der Pseudomolekülonen um 5 amu und das m/z -Verhältnis des durch den Glutanyl-Rest entstehenden b_1 -CO₂-Fragments entsprechend um 4 amu erhöht. Das y_1 -Fragment, das sich aus der jeweiligen N-terminalen Aminosäure eines γ -Glutamylpeptids ergibt, wies zwar keine Isotopenmarkierung auf, wurde aufgrund der höheren Spezifität (vgl. Kapitel 2.1.1.2) im Weiteren allerdings zur Quantifizierung verwendet. **Tabelle 11** gibt einen Überblick über die modifizierten MRM-Übergänge, anhand derer die isotopenmarkierten γ -Glutamylpeptide in inkubiertem Parmesankäse detektiert wurden.

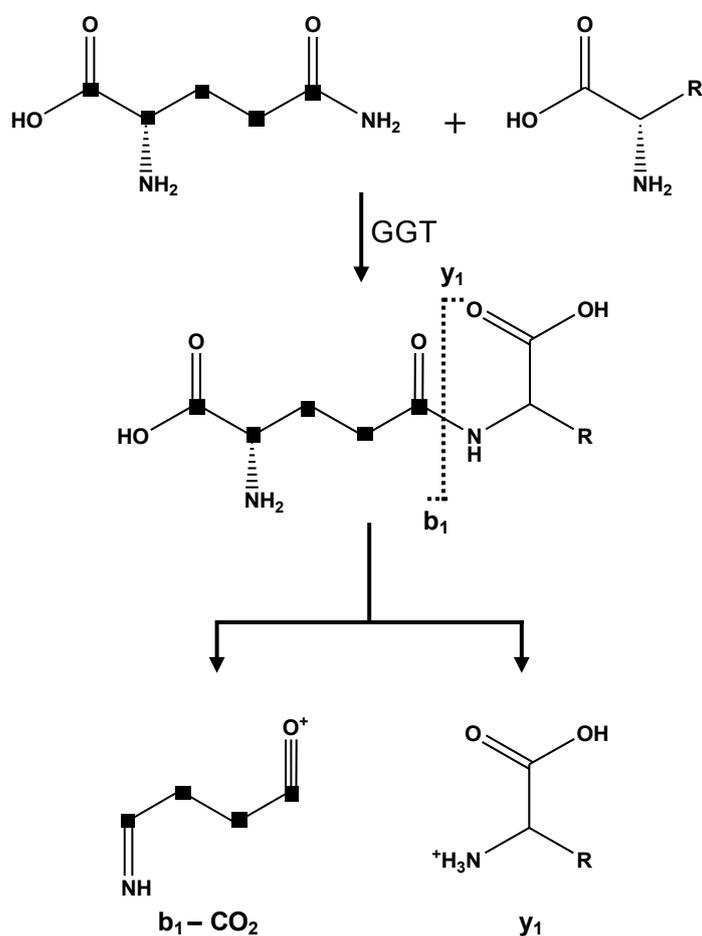


Abbildung 32. Schema zur Berechnung der modifizierten Massenübergänge für die massenspektrometrische Detektion der isotopenmarkierten γ -Glutamylpeptide, die durch Inkubation von Parmesankäse mit L-Glutamin-[¹³C₅] entstehen. ■ = ¹³C-Kohlenstoff-Atom.

Tabelle 11. Verwendete Massenübergänge (Q1/Q3) zur Detektion der unmarkierten und ¹³C-markierten γ -Glutamylpeptide in Parmesankäse.

Peptid	Q1/Q3-Übergang, unmarkiertes Peptid [<i>m/z</i>] ^a	Q1/Q3-Übergang, [¹³ C ⁵]-markiertes Peptid [<i>m/z</i>] ^b
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Gly	205→76 ^c ; 205→84	210→76 ^c ; 210→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Ala	219→90 ^c ; 219→84	224→90 ^c ; 224→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Val	247→118 ^c ; 247→84	252→118 ^c ; 252→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Thr	249→119 ^c ; 249→84	254→119 ^c ; 249→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Asp	263→134 ^c ; 263→84	268→134 ^c ; 268→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Lys	276→130 ^c ; 276→84	281→130 ^c ; 276→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Glu	277→130 ^c ; 277→84	282→130 ^c ; 282→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Trp	334→188 ^c ; 334→145	339→188 ^c ; 339→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Leu/Ile	261→86 ^c ; 261→84	266→86 ^c ; 266→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Gln	276→130 ^c ; 276→84	281→130 ^c ; 281→88
γ -Glu-Gln-[¹³ C ₁₀]	276→130 ^c ; 276→84	286→135 ^c ; 286→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Met	279→150 ^c ; 279→84	284→150 ^c ; 284→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-His	285→156 ^c ; 285→110	290→156 ^c ; 290→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Phe	295→166 ^c ; 295→84	300→166 ^c ; 300→88
γ -Glu-[¹³ C ₅]-Tyr	311→165 ^c ; 311→84	316→165 ^c ; 316→88

^a optimierte Massenübergänge zur Detektion der unmarkierten γ -Glutamylpeptide; ^b berechnete Massenübergänge zur Detektion der isotonenmarkierten γ -Glutamylpeptide; ^c zur Quantifizierung verwendeter Massenübergang.

Wie in **Abbildung 33** exemplarisch für das korrespondierende Paar γ -Glu-Val (**6**) und γ -Glu-[¹³C₅]-Val dargestellt, ermöglichte die massenspektrometrische Analyse des mit L-Glutamin-[¹³C₅] inkubierten Parmesans die deutliche Detektion eines Peaks bei dem entsprechend modifizierten Massenübergang (**B**), dessen Retentionszeit mit dem der unmarkierten Referenzsubstanz (**A**) übereinstimmte. Im Blindwert (**C**) hingegen war kein Signal bei dem entsprechenden Übergang zu sehen. Desweiteren konnte für α -Glu-Val (**5**) kein Peak im Inkubationsansatz detektiert werden, was die unterschiedlichen Bildungswege der α - und γ -Peptide erneut bestätigte.

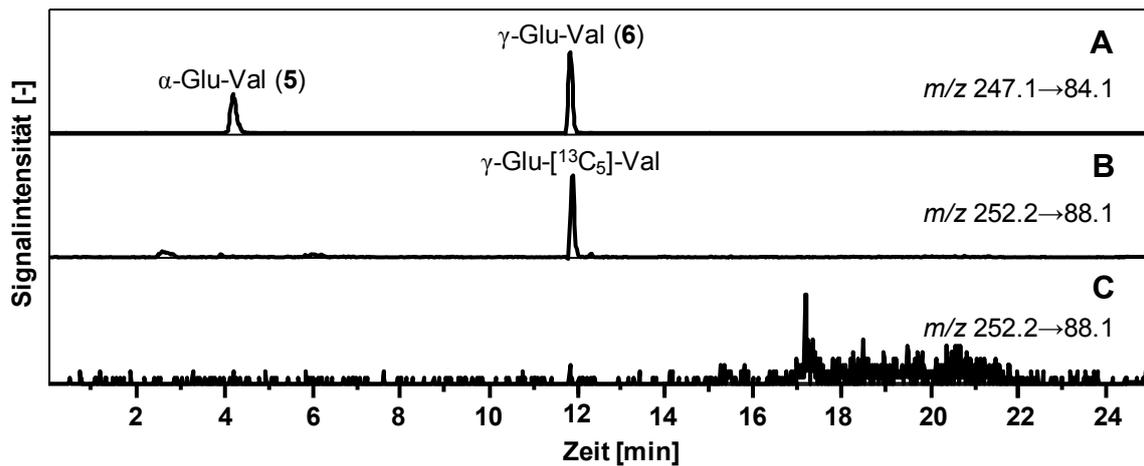


Abbildung 33. HPLC-MS/MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren (ESI⁺) der entsprechenden MRM-Übergänge von (A) α -Glu-Val (5) und γ -Glu-Val (6) in wässriger Referenzlösung, (B) von γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Val im L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$]-dotierten Parmesankäse und (C) von γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Val im Blindwert.

Weitere HPLC-MS/MS Chromatogramme von γ -Glu-Gly (2), γ -Glu-Glu (8), γ -Glu-Met (18), γ -Glu-His (19) und γ -Glu-Phe (20) sowie deren korrespondierenden γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Peptiden sind in **Abbildung 34** dargestellt.

Insgesamt wurden dreizehn γ -[$^{13}\text{C}_5$]-Glutamylpeptide, sowie das 10-fach markierte γ -Glu-Gln-[$^{13}\text{C}_{10}$], das durch die Verknüpfung zweier L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$]-Moleküle entsteht, detektiert. Somit konnte die GGT-Aktivität des Parmesans nicht nur durch das photometrische Assay, sondern auch durch die *in-situ* Bildung der entsprechenden Peptide nachgewiesen werden. Nicht detektiert wurden γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Ala und γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Ile, was einen ersten Hinweis auf eine geringe Substratspezifität der vorhandenen GGT gegenüber L-Alanin und L-Isoleucin als Akzeptoraminosäuren gab.

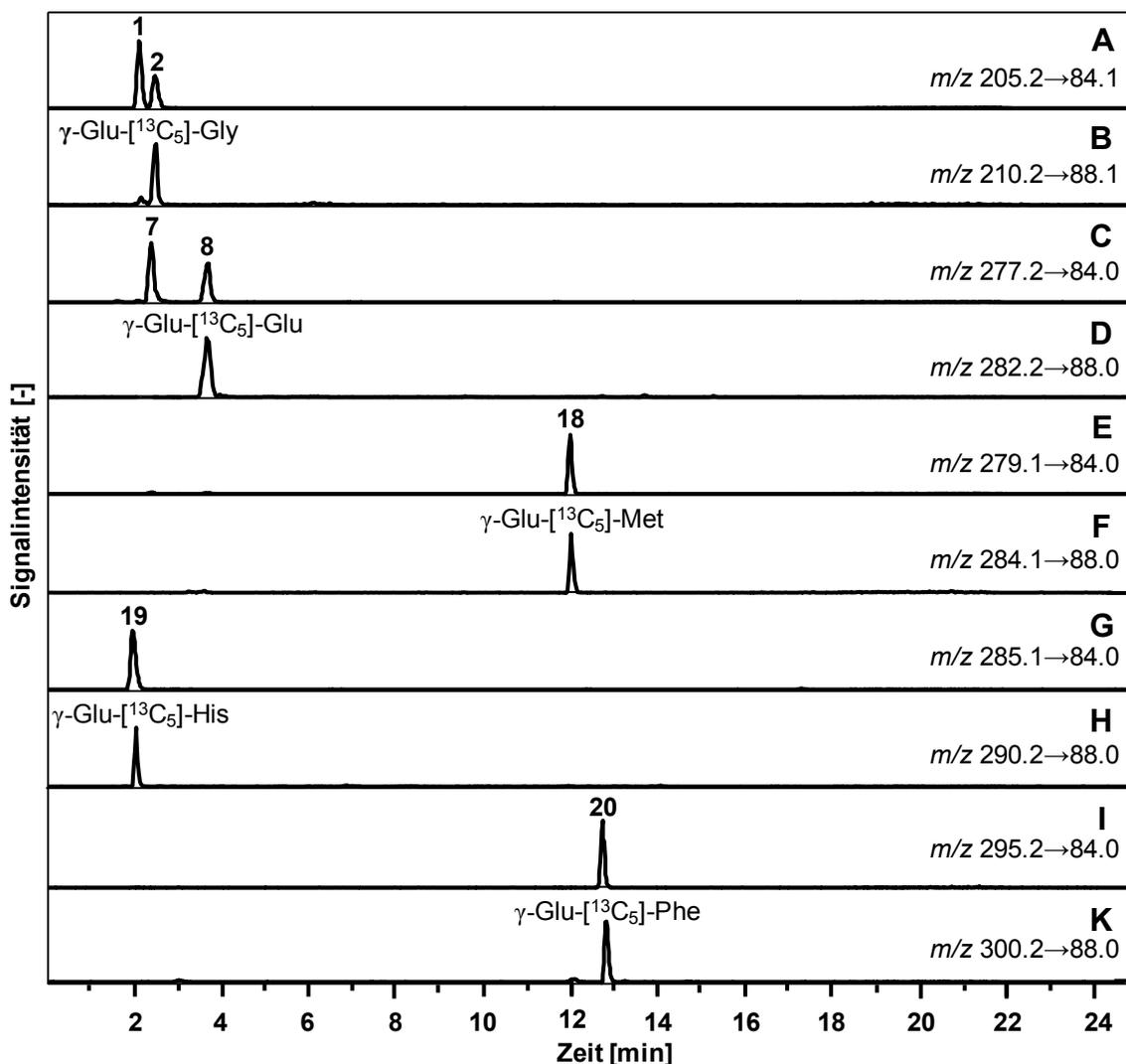


Abbildung 34. HPLC-MS/MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren (ESI⁺) von (A) α -Glu-Gly (1) und γ -Glu-Gly (2), (C) α -Glu-Glu (7) und γ -Glu-Glu (8), (E) γ -Glu-Met (18), (G) γ -Glu-His (19) und (I) γ -Glu-Phe (20) in wässriger Referenzlösung sowie (B) γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Gly, (D) γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Glu, (F) γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Met, (H) γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -His und (K) γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Phe in mit L-Glutamin- $^{13}\text{C}_5$ für 21 Tage inkubierten Parmesankäse P-24. Nummerierung der Peaks bezieht sich auf Abbildung 12.

Die quantitative Analyse der isotopenmarkierten Peptide in inkubiertem P-24 ergab ein teilweise ähnliches Verteilungsmuster wie die Quantifizierung der natürlich vorkommenden Verbindungen. Wie aus **Tabelle 12** ersichtlich, waren γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Lys und γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -His mit 37,35 und 10,30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ Trockenmasse die konzentriertesten Peptide, was das Vorkommen bzw. die Konzentrationszunahme ihrer natürlichen Formen im Parmesan widerspiegelte (vgl. **Tabelle 8**). Auch γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Phe und γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Glu, deren korrespondierende ^{12}C -Formen mit fortschreitender Reifezeit stark in ihren Konzentrationen zunahm bzw. in höheren Mengen vorkam, waren mit Gehalten von 3,36 und

2,04 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse unter den majoren $\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-X}$ Peptiden. Im Kontrast zu den quantitativen Daten der natürlich vorkommenden $\gamma\text{-Glutamylpeptide}$, bei denen $\gamma\text{-Glu-Gln}$ (**17**) nur in geringen Gehalten gefunden wurde, stand die vergleichsweise hohe Konzentration von $\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Gln}$. Dieses wies mit 5,20 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse die dritthöchste Konzentration unter den $\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-X}$ Peptiden auf. Dieses Resultat konnte durch die in der Literatur bereits beschriebene, allgemein hohe Präferenz von GGT für L-Glutamin als Akzeptor erklärt werden (*Sobiech et al.*, 1974; *Karkowsky und Orłowski*, 1978), wobei von einer gleichzeitigen Hydrolyse des gebildeten Dipeptides ausgegangen werden konnte, um L-Glutamin als Donoraminosäure zur Umsetzung mit anderen Akzeptoren verfügbar zu machen. Ebenfalls gegensätzlich ist der Gehalt an $\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Asp}$, der mit 0,63 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse als drittgeringster gefunden wurde und auf eine limitierte Substratspezifität der präsenten GGT gegenüber L-Asparaginsäure hindeutete.

Tabelle 12. Konzentrationen und Standardabweichungen an $\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-X}$ Peptiden in Parmesanprobe P-24, die für 21 Tage bei Raumtemperatur mit L-Gln- $^{13}\text{C}_5$ (20 mmol/l) inkubiert wurde.

Peptid	Konzentration	Konzentration
	$[\mu\text{mol/kg Trm. } \pm\text{SD}]^a$	$[\mu\text{mol/mmol L-Gln-}^{13}\text{C}_5] \pm\text{SD}]^b$
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Lys}$	37,35 \pm 3,45	2,67 \pm 0,24
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-His}$	10,30 \pm 0,97	0,73 \pm 0,07
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Gln}$	5,20 \pm 0,22	0,24 \pm 0,02
$\gamma\text{-Glu-Gln-}^{13}\text{C}_{10}$	0,07 \pm 0,02	0,005 \pm 0,001
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Phe}$	3,36 \pm 0,29	0,24 \pm 0,02
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Glu}$	2,04 \pm 0,02	0,14 \pm 0,001
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Met}$	1,67 \pm 0,12	0,12 \pm 0,01
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Thr}$	1,53 \pm 0,10	0,11 \pm 0,01
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Gly}$	1,16 \pm 0,04	0,08 \pm 0,003
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Val}$	0,92 \pm 0,08	0,07 \pm 0,01
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Leu}$	0,79 \pm 0,07	0,06 \pm 0,005
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Asp}$	0,63 \pm 0,05	0,04 \pm 0,003
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Trp}$	0,42 \pm 0,03	0,03 \pm 0,002
$\gamma\text{-Glu-}^{13}\text{C}_5\text{-Tyr}$	0,38 \pm 0,05	0,03 \pm 0,004
Σ	65,82	4,67

^a Konzentrationen beziehen sich auf die Trockenmasse ($\pm\text{SD}$, n = 3). ^b Konzentrationen beziehen sich auf mmol L-Gln- $^{13}\text{C}_5$ ($\pm\text{SD}$, n = 3).

Die vorliegenden Resultate implizierten eine hohe GGT-Aktivität in Parmesankäse und gaben erste Hinweise auf die Substratspezifität des Enzyms, erlaubten allerdings noch keine Rückschlüsse auf die Quelle des Enzyms im Untersuchungsmaterial. Daher wurden im Folgenden die Mikroflora des Käses sowie Rohmilch als potentielle GGT-Quellen auf ihre Enzymaktivität hin untersucht

2.1.2.4 Analyse der Mikroflora in Parmesankäse

Im Folgenden war die Identifizierung der im untersuchten Parmesankäse vorliegenden Mikroorganismen notwendig, um diese als potentielle Quelle für die GGT in Parmesankäse genauer untersuchen zu können. Hierzu wurde von allen drei Reifestufen des Parmesans mittels eines Stomachers Pepton-Extrakte hergestellt, die jeweils in seriellen Verdünnungsreihen auf zwei verschiedenen Kulturmedien, M-17 und MRS-Agar, ausgestrichen wurden (**Abbildung 35**). Alle Ausstriche wurden in Triplikaten angefertigt, um eine Inkubation für fünf Tage bei Raumtemperatur, 30 °C und 37 °C durchzuführen.

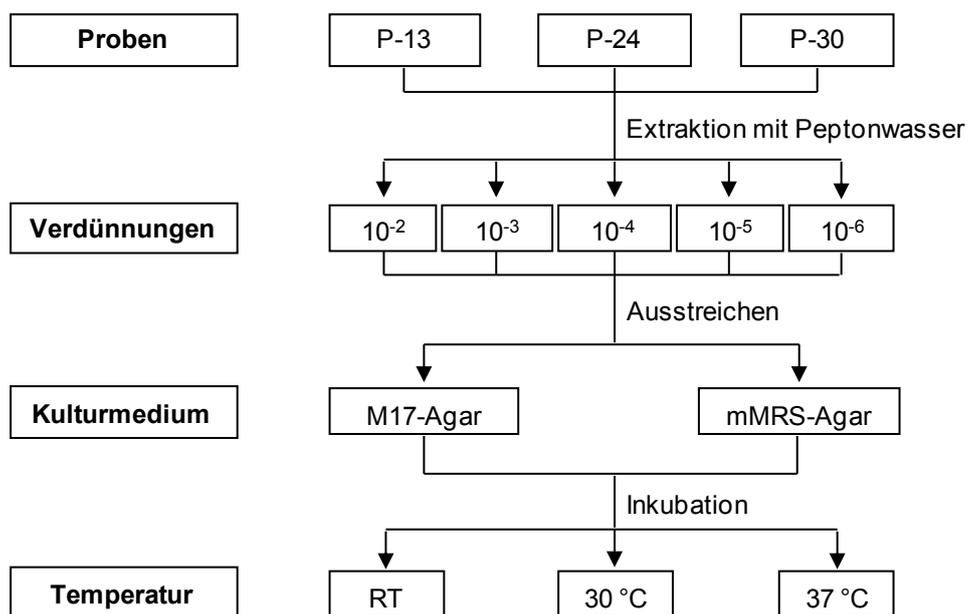


Abbildung 35. Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Isolierung der Mikroflora aus Parmesankäse.

Nach fünftägiger Inkubationszeit konnte ausschließlich bei den am höchsten konzentrierten Verdünnungsstufen des P-13, die bei 30 °C und 37 °C belassen wurden, ein mikrobielles

Wachstum beobachtet werden. Dabei ergaben sich für die Inkubationsansätze auf M17 Medium 80 koloniebildende Einheiten (KBE) bei einer Temperatur von 30 °C und 91 KBE bei 37 °C, wohingegen bei den Inkubationsansätzen auf mMRS-Agar 98 KBE bei 30 °C und 65 KBE bei 37 °C gezählt wurden. Aus diesen insgesamt 334 KBE wurden von sieben Kolonien aufgrund ihrer unterschiedlichen Koloniemorphologie (**Tabelle 13**) Vereinzelungsausstriche angefertigt. Die lichtmikroskopische Analyse der Kolonien zeigte die Ausbildung von rauhen, ausgefransten Kolonien für K1, K3 und K6, wohingegen für K2, K4, K5 und K7 ein glattes, rundes Koloniewachstum gefunden wurde. Eine weitere Vergrößerung der Vereinzelungsausstriche im Lichtmikroskop führte zur Sichtbarkeit der Bakterienform, die bei allen Kolonien stäbchenartig war.

Tabelle 13. Morphologie, Kulturbedingungen (Medium, Temperatur) sowie taxonomische Identität der aus Parmesanprobe P-13 isolierten Kolonien K1 – K7.

Kolonie Nr. ^a	Morphologie	Medium	Temperatur [°C]	Identifizierte Spezies ^b
K1	raue, ausgefranste Kolonien; Stäbchen	MRS	37	<i>Lb. harbinensis</i>
K2	glatte, runde Kolonien; Stäbchen	MRS	37	<i>Lb. casei</i>
K3	raue, ausgefranste Kolonien; Stäbchen	MRS	30	<i>Lb. harbinensis</i>
K4	glatte, runde Kolonien; Stäbchen	MRS	30	<i>Lb. casei</i>
K5	glatte, runde Kolonien; Stäbchen	M17	37	<i>Lb. casei</i>
K6	raue, ausgefranste Kolonien; Stäbchen	MRS	37	<i>Lb. harbinensis</i>
K7	glatte, runde Kolonien; Stäbchen	M17	30	<i>Lb. casei</i>

^a Codierung der Kolonien erfolgte zufällig. ^b Identifizierung der isolierten Kolonien erfolgte mittels 16S- rRNA-Amplifizierung und -Sequenzierung, mit anschließendem Multiplen-Sequenzabgleich über die CLUSTALW Software.

Die Evaluation von phänotypischen, also zellmorphologischen und biochemischen Eigenschaften sind zwar grundlegende Methoden zur taxonomischen Beurteilung von Mikroorganismen, führen aber nicht immer zu eindeutigen Ergebnissen (*Clarridge, 2004; Rosetti und Giraffa, 2005*). Daher wurde im Weiteren auf mittlerweile ebenfalls etablierte

molekularbiologische Verfahren, wie die RAPD- und 16S-PCR zur Identifizierung der isolierten Bakterienstämme zurückgegriffen (*Medlin et al.*, 1988; *Williams et al.*, 1990).

Im nächsten Schritt wurde die DNA jeder Kolonie isoliert (siehe Kapitel 3.4.3.2), mittels M13-PCR partiell vervielfältigt und die amplifizierten Segmente anschließend elektrophoretisch in einem Agarose-Gel getrennt. Um einen ersten Hinweis auf die Identität zu erhalten, wurden die resultierenden DNA-Banden mit denen verschiedener *Lactobacillen* verglichen. Bei dieser sogenannten RAPD-Methode (randomly amplified polymorphic DNA = zufällig vervielfältigte polymorphe DNA), die erstmals von *Williams et al.* (1990) beschrieben wurde, werden polymorphe Abschnitte der genomischen DNA durch Verwendung kurzer, unspezifischer Primer vervielfältigt. Die polymorphen Segmente dienen dann als genetische Marker, die elektrophoretisch mit auf gleiche Weise erhaltenen DNA-Segmenten anderer Bakterienstämme auf identische Proteinbanden hin untersucht werden. Vorteile dieser Methode sind unter anderem der Einsatz von universellen Primern für eine große Bandbreite an Spezies, das Wegfallen aufwändiger DNA-Isolierungsschritte sowie keine Notwendigkeit der genauen Kenntnis über die DNA der zu untersuchenden Spezies (*Williams et al.*, 1990). Da die RADP-Analyse jedoch keine eindeutige Identifizierung der isolierten Kolonien zuließ (Daten nicht gezeigt), wurde im Folgenden eine 16S-rRNA-Sequenzierung unter Verwendung von 616V und 630R Primern durchgeführt.

Die 16S-rRNA ist eine Untereinheit der 30S-rRNA und somit Teil der nicht-kodierenden Ribonukleinsäuren prokaryotischer Ribosomen. Sie ist unter anderem am Aufbau und der enzymatischen Aktivität des Ribosoms beteiligt und besitzt eine Länge von ca. 1550 Basenpaaren (*Clarridge*, 2004). Aufgrund von sowohl stark konservierten als auch hypervariablen Regionen, von denen letztere für verschiedene Spezies sehr unterschiedlich sind, wird die am Ende der 1980er Jahre etablierte 16S-rRNA Gensequenzierung (z.B. *Medlin et al.*, 1988; *Boettger*, 1989) heutzutage als schnelle, robuste, reproduzierbare und objektive Methode zur Identifizierung von Bakterien eingesetzt (*Clarridge*, 2004). Die erhaltenen PCR-Amplifikate wurden mittels Elektrophorese auf ihre Länge hin überprüft (ca. 1200 Basenpaare) und anschließend zu einem kommerziellen Anbieter zur Sequenzierung gegeben. Die Basenpaarabfolge der einzelnen Kolonien (siehe Kapitel 6, **Tabelle 48**) wurde mit Hilfe des Programms Blast Search gegen die GenBank Datenbank sowie durch multiplen Sequenzenvergleich über die Software ClustalW mit Sequenzen anderer Spezies abgeglichen (**Abbildung 36**).

Dies führte zur Identifizierung von K2, K4, K5 und K7 als *Lactobacillus casei* und von K1, K3 und K7 als *Lactobacillus harbinensis* (Abbildung 36). Während ersterer in der Mikroflora zahlreicher Käsesorten, darunter auch der von Parmesankäse während der frühen und auch fortgeschrittenen Reifeperiode beschrieben ist (Coppola et al., 1997, 2000), ist *Lb. harbinensis* bisher nicht in Parmesan bekannt. Hingegen wurde *Lb. harbinensis* in jüngerer Vergangenheit in asiatischen Lebensmitteln wie z.B. fermentiertem Chinakohl (Suan chai) (Miyamoto et al., 2006) oder koreanischem Reiswein (Jianbo et al., 2008) nachgewiesen.

Nachdem die Mikroflora des vorliegenden Parmesankäses identifiziert wurde, erfolgten im nächsten Schritt Analysen zur potentiellen GGT-Aktivität der Mikroorganismen.

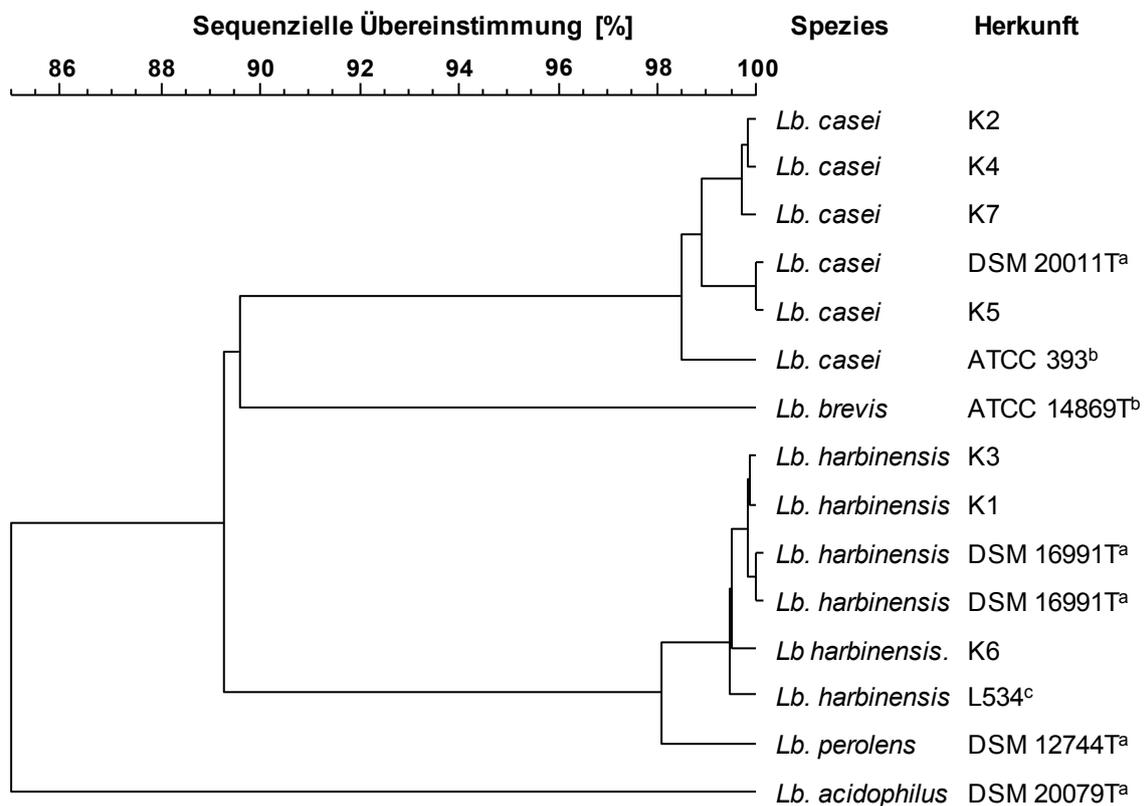


Abbildung 36. Neighbor-Joining-Dendrogramm für die aus Parmesanprobe P-13 isolierten Kolonien K1 – K7. ^a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ^b American Type Culture Collection; ^c Stammsammlung Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Prof. Dr. W. Back, TU München. Die Abbildung wurde in Kooperation mit Dr. Jürgen Behr und Dr. Matthias Ehrmann (Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, TU München) erstellt und beruht auf Daten in Tabelle 48 (Kapitel 6).

2.1.2.5 Analyse der γ -Glutamyltransferase-Aktivität der Mikroflora und von Milch

Um die GGT-Aktivität in den aus P-13 isolierten *Lactobacillen* sowie in weiteren aus der Mikroflora von Parmesan bekannten Bakterienstämmen zu messen, wurden die Kolonien K1 – K7 sowie das in den Starterkulturen vorhandene *Lb. delbrueckii* und die während der frühen Reifezeit präsenten Stämme *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *Lb. paracasei ssp. tolerans* und *Lb. rhamnosus* (Coppola et al., 1997, 2000) in flüssigem mMRS-Medium kultiviert. Die GGT-Aktivität sollte zum einen mittels des unter 2.1.2.3 beschriebenen photometrischen Nachweisverfahrens und zum anderen durch Inkubation mit L-Glutamin- $^{13}\text{C}_5$ und verschiedenen Akzeptoraminosäuren und anschließendem massenspektrometrischen Nachweis der gebildeten γ -Glutamylpeptide analysiert werden (vgl. Kapitel 2.1.2.2).

Für den photometrischen Assay wurden die kultivierten und anschließend lyophilisierten Bakterienstämme einerseits mit Essigsäure behandelt und andererseits mittels Lysozym- und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Allerdings konnte auf diesem Weg bei keinem der beiden Aufschlussverfahren eine GGT-Aktivität für einen der identifizierten Mikroorganismen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis sollte durch das Inkubationsexperiment mit L-Glutamin- $^{13}\text{C}_5$ verifiziert werden.

Für die Inkubationsexperimente wurden die Bakterienstämme nach Kultivierung in mMRS Medium mit Phosphatpuffer (pH 6,5) gewaschen und anschließend im gleichen Puffer mit einer Lösung von L-Glutamin- $^{13}\text{C}_5$, L-Histidin, L-Methionin, L-Leucin, L-Glutaminsäure und L-Alanin suspendiert. Gleichzeitig wurden zwei Blindwerte, von denen der eine keine Aminosäurelösung und der zweite keine Mikroorganismen enthielt, mitgeführt. Die Suspensionen wurden für 21 Tage bei Raumtemperatur belassen und in regelmäßigen Abständen (0, 1, 3, 7, 14 und 21 Tage), Aliquote entnommen. Diese wurden mittels LC-MS/MS, wie in Kapitel 2.1.2.3 beschrieben, auf die Anwesenheit von γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -X-Peptiden und γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$ hin untersucht. Allerdings konnte in keinem Inkubationsansatz eine Bildung der markierten γ -Glutamylpeptide nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Experimente bestätigten die Ergebnisse des photometrischen Assays und schlossen die Mikroflora des Parmesans als potentielle Quelle für die γ -Glutamyltransferase aus.

Deswegen konzentrierten sich die nachfolgenden Arbeiten auf eine nähere Untersuchung von Rohmilch als potentielle GGT-Quelle. Auch hier sollte sowohl der photometrische Nachweis

als auch die Inkubation mit L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] mit anschließender LC-MS/MS-Analyse durchgeführt werden.

Die Messung der GGT-Aktivität über die photometrische Erfassung von freigesetztem *p*-Nitroanilid erfolgte für verschiedene Milchproben. Untersucht wurden frische Rohmilch sowie Rohmilch-Proben, die für jeweils 10 Minuten bei verschiedenen Temperaturen zwischen 55 °C und 75 °C behandelt wurden (**Tabelle 14**). Zudem wurde eine Rohmilchprobe analysiert, die für 60 Minuten bei 55 °C belassen wurde und somit den Parametern bei der Parmesanherstellung entspricht sowie eine Milchprobe, die für 1 Minute bei 100 °C behandelt wurde. Für Rohmilch wurde eine Enzymaktivität von 5,3 U/ml gefunden, was mit Daten aus der Literatur übereinstimmte (z.B. *Toelstede und Hofmann, 2009; Stanciuc et al., 2011*). Die Milchprobe, die wie der Käsebruch während der Parmesanherstellung für 60 Minuten bei 55 °C gehalten wurde, zeigte mit 4,5 U/ml eine nur marginal geringere GGT-Aktivität als die Rohmilch. Die Enzymaktivität der Milch-GGT während der Parmesanherstellung bleibt also nahezu vollständig erhalten. Ein Erhitzen der Rohmilch bei höheren Temperaturen führte zur beständigen Abnahme der GGT-Aktivität und betrug nach Behandlung bei 75 °C nur noch 0,2 U/ml. In bei 100 °C für 1 Minute erhitzter Milch war keinerlei GGT-Aktivität mehr detektierbar.

Tabelle 14. GGT-Aktivität (U/ml) von Rohmilch und erhitzten Milchproben.

Probe	GGT-Aktivität ^a [U/ml±SD]
Rohmilch	5,3±0,5
Milch (55 °C, 60 min)	4,5±0,2
Milch (55 °C, 10 min)	4,8±0,04
Milch (60 °C, 10 min)	4,8±0,05
Milch (65 °C, 10 min)	3,4±0,1
Milch (70 °C, 10 min)	1,4±0,03
Milch (75 °C, 10 min)	0,2±0,07
Milch (100 °C, 1 min)	n.n.

^a Die GGT Aktivität (±SD; n = 3) wurde mittels photometrischem Nachweis bestimmt (*Blel et al., 2002*); n.n. nicht nachweisbar.

Im Weiteren wurden ebenfalls Inkubationsexperimente mit L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] und verschiedenen Aminosäuren durchgeführt (vgl. Kapitel 2.1.2.3), die eine funktionelle Charakterisierung der Milch-GGT ermöglichen sollten. Da bereits 1978 von *Karkowsky und Orłowski* die Relevanz von *in-vivo* Bedingungen zur Untersuchung des spezifischen Verhaltens der GGT postuliert und auch bestätigt werden konnte, wurden die Inkubationen nicht in einem gepufferten, optimierten System durchgeführt. Stattdessen wurden die jeweiligen Milchproben mit einem möglichst geringen Volumen einer Aminosäurelösung versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C gerührt (**Tabelle 15**). Nach Abkühlen in Eiswasser wurde eine genau definierte Menge des internen Standards γ -Glu-Ala-[$^{13}\text{C}_3$] (**25**) zugesetzt und nach angemessener Equilibrierung erfolgte die Präzipitation der Milchproteine durch Zugabe von Acetonitril. Die ausgefallenen Proteine wurden mittels Zentrifugation vom wässrigen Überstand abgetrennt und dieser nach Auffüllen auf ein definiertes Volumen für die LC-MS/MS-Analyse verwendet.

Tabelle 15. Übersicht über die durchgeführten Inkubationen verschiedener Milchproben mit L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] und weiteren L-Aminosäuren.

Experiment Nr.	Verwendete Proben	Inkubation mit
1	Rohmilch, erhitzte Milch (55 – 100 °C)	Binärer Lösung von L-Gln-[$^{13}\text{C}_5$] (5 mmol/l) und L-Glu (5 mmol/l)
2	Rohmilch	Binären Lösungen von L-Gln-[$^{13}\text{C}_5$] (5 mmol/l) und L-Glu, L-His, L-Met, L-Phe, L-Lys, L-Leu, L-Asp oder L-Thr (je 5 mmol/l)
3	Rohmilch	Lösung von L-Gln-[$^{13}\text{C}_5$] (40 mmol/l) und allen in Experiment 2 aufgeführten Aminosäuren (je 5 mmol/l)
4	Rohmilch	keiner Aminosäure

In einer ersten Reihe von Versuchen wurden sowohl Rohmilch als auch Milchproben, die wie im vorherigen Abschnitt angegeben erhitzt worden waren, mit einer äquimolaren, binären Mischung (5 mmol/l) von L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] und L-Glutaminsäure inkubiert und anschließend auf die Anwesenheit von γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Glu und γ -Glu-Gln-[$^{13}\text{C}_{10}$] hin analysiert. Die resultierenden LC-MS/MS-Chromatogramme der entsprechenden Massenübergängen im wässrigen Standard (**A**), in einer inkubierten Rohmilch-Probe (**B**) sowie im Blindwert, der

durch nicht inkubierte Rohmilch repräsentiert wird (C), sind in **Abbildung 37** dargestellt und zeigen deutlich die *in situ*-Bildung der ^{13}C -markierten γ -Glutamylpeptide. Die daraufhin durchgeführte Quantifizierung der beiden Dipeptide in allen Proben der Versuchsreihe ergab eine Abnahme der Iso-Peptidbildung mit zunehmender Erhitzungstemperatur, die gut mit der gemessenen Abnahme der GGT-Aktivität korrelierte (**Abbildung 38**). Desweiteren zeigte sich, dass die Menge an gebildetem $\gamma\text{-Glu-Gln-}[^{13}\text{C}_{10}]$, bei dem L-Glutamin- $[^{13}\text{C}_5]$ gleichzeitig als Akzeptor- und als Donoraminosäure für die GGT fungiert, stets höher war als die an $\gamma\text{-Glu-}[^{13}\text{C}_5]\text{-Glu}$. Diese Ergebnisse indizierten deutlich, dass die Milch-GGT gegenüber L-Glutamin eine höhere Spezifität als gegenüber L-Glutaminsäure aufwies. Dies bestätigte Angaben aus der Literatur für sowohl Milch-GGT (*Sobiech et al.*, 1974; *Baumrucker*, 1979) als auch für GGT aus anderen Quellen, wie z.B. Fadenpilzen (*Tomita et al.*, 1990).

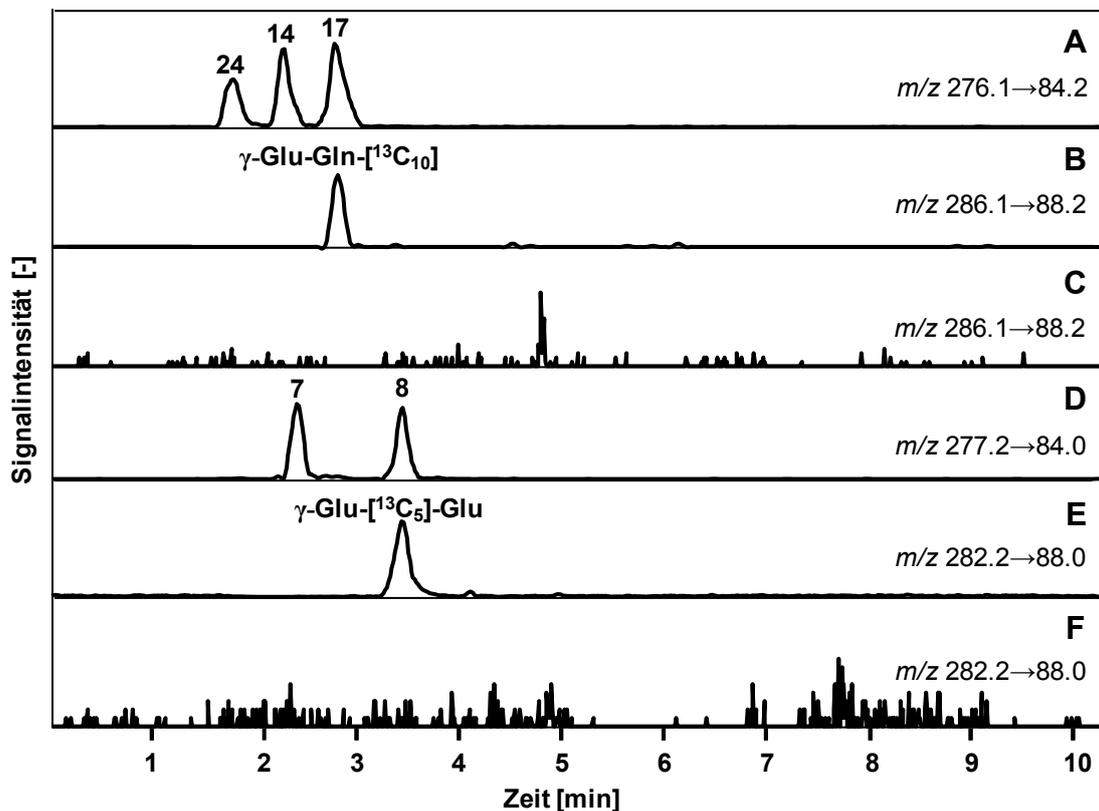


Abbildung 37. LC-MS/MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren (ESI^+) von (A) einer wässrigen Lösung der Referenzsubstanzen $\alpha\text{-Glu-Lys}$ (24), $\gamma\text{-Glu-Lys}$ (25) und $\gamma\text{-Glu-Gln}$ (17), (B) dem entsprechenden Massenübergang der korrespondierenden ^{13}C -markierten Form $\gamma\text{-Glu-Gln-}[^{13}\text{C}_{10}]$ in inkubierter Rohmilch und (C) in nicht inkubierter Rohmilch (Blindwert), von (D) einer wässrigen Lösung der Referenzsubstanzen $\alpha\text{-Glu-Glu}$ (7) und $\gamma\text{-Glu-Glu}$ (8), (E) dem entsprechenden Massenübergang der korrespondierenden ^{13}C -markierten Form $\gamma\text{-Glu-}[^{13}\text{C}_5]\text{-Glu}$ in inkubierter Rohmilch und (F) in nicht inkubierter Rohmilch (Blindwert). Nummerierung der Peaks bezieht sich auf **Abbildung 12** und **Abbildung 17**.

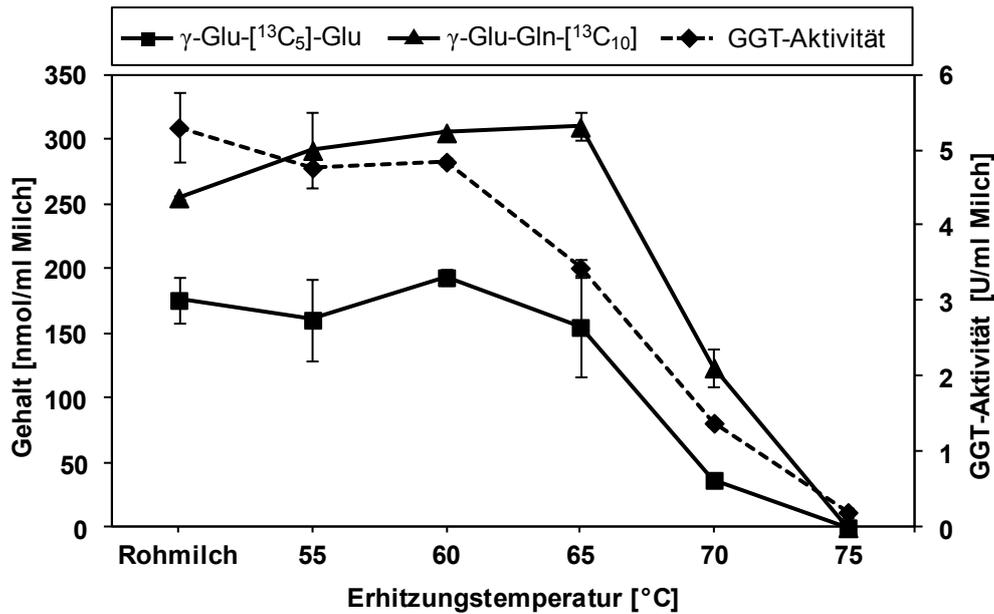


Abbildung 38. Gebildete Mengen [nmol/ml Milch \pm SD] ($n = 3$) an γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Glu und γ -Glu-Gln-[$^{13}\text{C}_{10}$] sowie der im photometrischen Assay gemessenen GGT-Aktivität in Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur.

Um die Substratspezifität von L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] gegenüber anderen Aminosäuren im Vergleich zu untersuchen, wurden in einer zweiten Reihe von Experimenten verschiedene binäre, äquimolare Lösungen (5 mmol/l) von L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] und L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Lysin, L-Leucin, L-Asparaginsäure oder L-Threonin zur Inkubation mit Rohmilch verwendet. Die anschließende quantitative Analyse der gebildeten, korrespondierenden γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-X Peptide (A – H in **Abbildung 39**) ergab, dass γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Met und γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Phe in Gehalten von 1437 nmol/ml bzw. 1433 nmol/ml Milch im jeweiligen Inkubationsansatz gebildet wurden, wohingegen das Homotranspeptidationsprodukt γ -Glu-Gln-[$^{13}\text{C}_{10}$] in beiden Proben in deutlich geringeren Konzentrationen von 201,8 nmol/ml und 45,0 nmol/ml Milch zu finden war. Auch für die Inkubationsansätze mit L-Lysin bzw. L-Histidin konnte eine bevorzugte Bildung der Heterotranspeptidationsprodukte gegenüber γ -Glu-Gln-[$^{13}\text{C}_{10}$] gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Inkubationsansätze mit L-Leucin, L-Asparaginsäure, L-Threonin und L-Glutaminsäure eine vermehrte Bildung von γ -Glu-Gln-[$^{13}\text{C}_{10}$] im Vergleich zu den jeweiligen γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-X Peptiden. Diese wurden nur in geringen Konzentrationen zwischen 6,1 und 28,1 nmol/ml Milch gefunden. Diese Ergebnisse implizierten eine gute Substratspezifität der Milch-GGT gegenüber L-Methionin und L-Phenylalanin und eine moderate Spezifität für L-Lysin und L-Histidin. L-Leucin, L-Asparaginsäure, L-Threonin und

L-Glutaminsäure hingegen erschienen als weniger geeignete Akzeptoren. L-Methionin ist unabhängig von der Herkunft der GGT als guter Akzeptor beschrieben (*Karkowski und Orłowski, 1978; Tate und Meister, 1981; Tomita, 1990*), was durch die vorliegenden Ergebnisse untermauert wurde. In Kontrast dazu wurde L-Phenylalanin von *Baumrucker (1979)* als weniger guter Akzeptor für Milch-GGT gefunden, da es nur etwas weniger als die Hälfte an Reaktivität im Vergleich zu L-Methionin aufwies. Auch die bessere Umsetzung von L-Lysin und L-Histidin im Vergleich zu L-Leucin, L-Asparaginsäure, L-Threonin und L-Glutaminsäure ist konträr zu den Resultaten von *Baumrucker (1979)*, der vergleichbare geringe Umsatzraten für die genannten Substrate durch die Milch-GGT feststellen konnte.

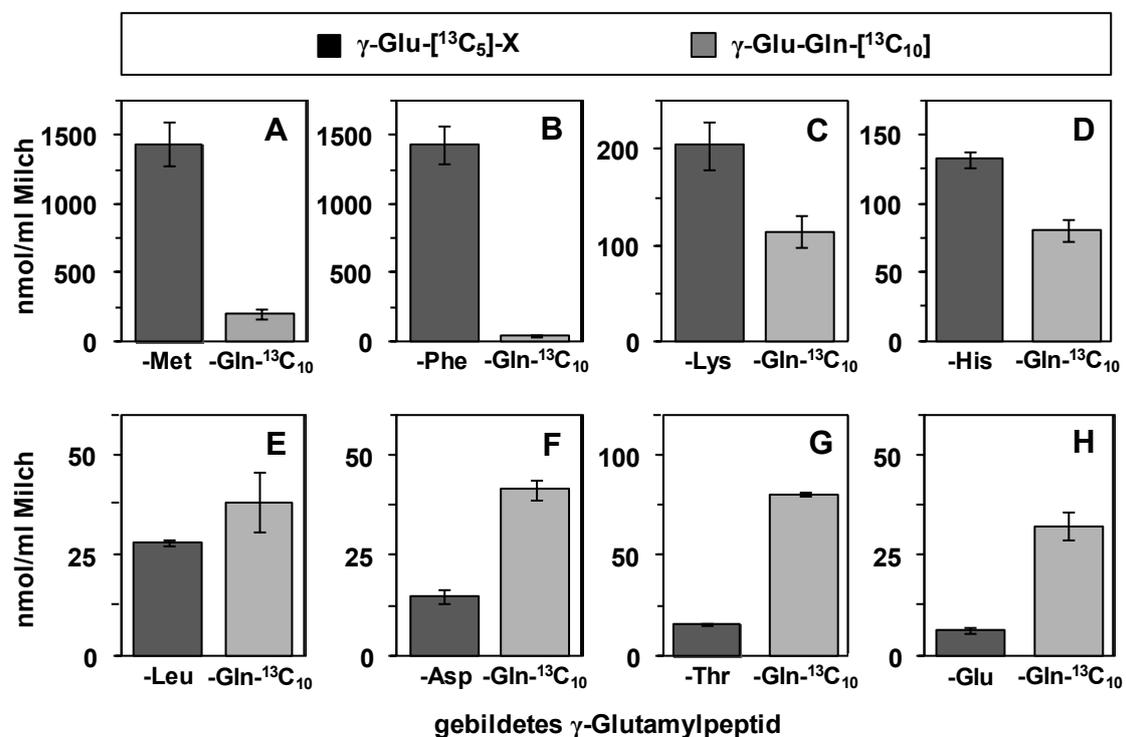


Abbildung 39. Gehalte und Standardabweichungen [nmol/ml Milch \pm SD] ($n = 3$) an γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-X und γ -Glu-Gln-[$^{13}\text{C}_{10}$]-Peptiden, die durch Inkubation von Rohmilch mit binären, äquimolaren Lösungen von L-Glutamin- $^{13}\text{C}_5$ (5 mmol/l) und einer der entsprechenden L-Aminosäuren (je 5 mmol/l) gebildet wurden: (A) mit L-Methionin; (B) mit L-Phenylalanin; (C) mit L-Lysin; (D) mit L-Histidin; (E) mit L-Leucin; (F) mit L-Asparaginsäure; (G) mit L-Threonin; (H) mit L-Glutaminsäure.

Dass die Reaktivität der γ -Glutamyltransferase nicht ausschließlich von den vorhandenen Substraten, sondern auch von im Medium anwesenden Kationen und dessen pH-Wert abhängt, wurde bereits 1978 von *Karkowski und Orłowski* gezeigt. Die Autoren fanden eine Verschiebung der relativen Reaktivität gegenüber dem Akzeptorpaar L-Methionin/L-Alanin,

wenn die Inkubationen mit GGT und γ -Glutamyl-Donor nicht in einem optimierten Puffersystem sondern unter *in-vivo* Bedingungen durchgeführt wurden. Da die vom *Baumrucker* (1979) durchgeführten Inkubationen ebenfalls im optimierten Puffersystem und nicht unter *in-vivo* Bedingungen stattfanden, ist das Vorliegen der unterschiedlichen Medien als Grund für die abweichenden Resultate wahrscheinlich.

Desweiteren ließ sich ein Einfluss der verschiedenen Akzeptoraminosäuren auf die Bildung des Homotranspeptidationsproduktes γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$ beobachten. Während z.B. im Inkubationsansatz von L-Glutamin- $^{13}\text{C}_5$ und L-Methionin neben der großen Menge an γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Met (1437,4 nmol/ml) γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$ in einer Konzentration von 201,8 nmol/ml gefunden wurde, war der Gehalt dieses Peptids im Ansatz mit L-Phenylalanin, das mit 1433,1 nmol/ml ebenfalls einen großen Anteil des entsprechenden Heterotranspeptidationsproduktes aufwies, mit einem Wert von 45,1 nmol/ml um den Faktor vier kleiner (**A** und **B** in **Abbildung 39**). Im Inkubationsansatz mit L-Histidin zeigte sich ein wiederum ein anderes Verhalten. Der Gehalt an γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$ war in diesem Ansatz mit 80,8 nmol/ml Milch fast doppelt so hoch, wie im Ansatz mit L-Phenylalanin. Gleichzeitig war die Bildung von γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -His im Vergleich zu γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Phe um den Faktor zehn geringer (132 nmol/ml) (**D** in **Abbildung 39**). Auch im Ansatz mit L-Threonin wurde ein Gehalt von 80,6 nmol/ml an γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$ gefunden, allerdings führte hier die Umsetzung mit L-Threonin nur zur Bildung von 15,5 nmol/ml γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Thr. Im Fall von L-Glutaminsäure ging die geringe Bildung des korrespondierenden Dipeptides (6,1 nmol/ml) mit einer ebenfalls vergleichsweise geringen Bildung von γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$ (32,4 nmol/ml) einher (**G** und **H** in **Abbildung 39**). Somit schien neben der Substratspezifität auch die Aktivität der GGT im Allgemeinen von den anwesenden Akzeptormolekülen abzuhängen. L-Methionin, L-Lysin oder auch L-Histidin waren gute Akzeptoren und beeinflussen gleichzeitig auch die Bildung des Homotranspeptidationsproduktes positiv. Hingegen war z.B. L-Threonin selbst ein schlechter Akzeptor, inhibierte aber nicht die Bildung von γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$. Im Gegensatz dazu schien sich L-Glutaminsäure im Allgemeinen inhibierend auf die Aktivität der GGT auszuwirken. Ein bekannter kompetitiver Inhibitor der GGT ist die äquimolare Mischung von L-Serin und Borat (*Revel und Ball*, 1959). Anhand von Experimenten, bei denen Milch-GGT vor Inkubation mit dem Donor γ -Glutamyl- α -naphthylamid mit verschiedenen Effektoren, darunter Glutathion, L-Methionin, D-Methionin, L-Alanin und γ -Glu-Gly-Gly, versetzt wurde, postulierten *Sobiech et al.* (1974) eine aktivierende oder auch inhibierende Wirkung der jeweiligen Substanzen. Dabei wurde für

Glutathion und γ -Glu-Gly-Gly eine starke Inhibition und für Gly-Gly und L-Methionin eine deutliche Aktivierung gefunden, wohingegen die anderen verwendeten Aminosäuren L-Glutamin, L-Alanin und Glycin kaum Einfluss auf die GGT-Aktivität hatten. Die Wirkung der in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Aminosäuren auf die GGT-Aktivität ist bisher nicht beschrieben.

In einem dritten Experiment wurde Rohmilch mit einer Lösung von L-Glutamin- $^{13}\text{C}_5$ (40 mmol/l) und allen anderen bereits im vorherigen Experiment verwendeten Aminosäuren (je 5 mmol/l) inkubiert, um einen Einfluss der Mehrkomponentenmischung auf die Substratspezifität zu analysieren. Die erhaltenen quantitativen Daten (**Abbildung 40**) zeigten, dass γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Phe und γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Met mit Konzentrationen von 797 und 653 nmol/ml auch in diesem Experiment die dominierenden Peptide waren. Die geringen Mengen an generiertem γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Leu, γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Asp, γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Thr und γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Glu standen ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen der vorherigen Versuche. Im Gegensatz dazu wurden γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Lys und γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -His in deutlich geringeren Mengen als γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$ gefunden. Bei Inkubation mit den binären Mischungen erschien die Bildung dieser beiden Heterotranspeptidationsprodukte gegenüber γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$ bevorzugt. Der Grund für dieses konträre Ergebnis kann darin angenommen werden, dass die Umsetzung durch die GGT nicht nur von der Spezifität gegenüber einem Substrat sondern auch von dessen vorliegender Konzentration abhängt (*Karkowsky und Orłowski, 1978*).

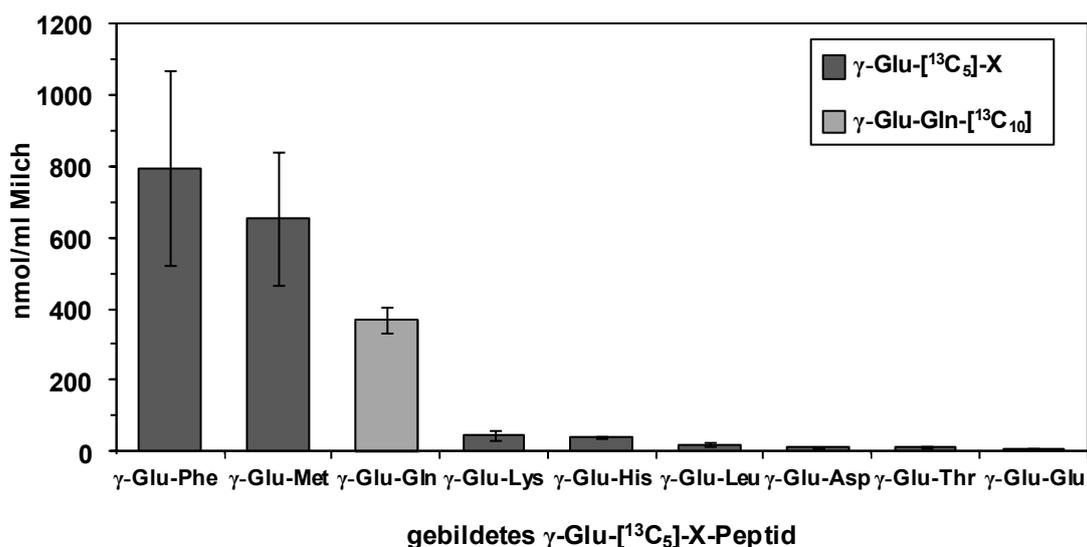


Abbildung 40. Gehalte und Standardabweichungen [nmol/ml Milch] an γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -X und γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$ -Peptiden, die durch Inkubation von Rohmilch mit einer Lösung von L-Glutamin- $^{13}\text{C}_5$ (40 mmol/l) und den entsprechenden L-Aminosäuren gebildet wurden (je 5 mmol/l) (n = 3).

Die Ergebnisse der Inkubationsexperimente mit Rohmilch spiegelten die der Inkubation mit dem Parmesankäse P-24 (vgl. Kapitel 2.1.2.2) nur bedingt wider. Die Peptide, die im stärksten Umfang gebildet wurden, waren in beiden Versuchsreihen zwar die gleichen, allerdings wurden bei letzterer L-Lysin, L-Histidin und L-Glutamin in stärkerem Maße umgesetzt als L-Phenylalanin und L-Methionin. Diese Umsetzungen korrelierten mit den im P-24 gefundenen Gehalten der Aminosäuren, die für L-Lysin und L-Histidin deutlich höher waren als für L-Phenylalanin und L-Methionin (vgl. Kapitel 2.1.2.1). Bei den Inkubationen in Rohmilch hingegen, bei denen die Substrate in äquimolaren Konzentrationen vorlagen, war ein genau gegensätzlicher Trend zu beobachten. Dadurch wurde neben der Substratspezifität der GGT, die Verfügbarkeit der jeweiligen Akzeptoren als relevanter Faktor zur *in-vivo* Bildung der γ -Glutamylpeptide deutlich. Dies wurde bereits von anderen Autoren postuliert (*Toelstede und Hofmann, 2009*) und konnte durch die vorliegenden Resultate untermauert werden.

Unter Berücksichtigung aller zur Identifizierung der GGT-Quelle in Parmesan sowie zur Charakterisierung des Enzyms durchgeführten Experimente, konnte die zur Herstellung des Käses verwendete Rohmilch als Ursprung des Enzyms identifiziert werden. Erhitzungsexperimente, die die Behandlung der Milch während des Produktionsprozesses simulierten, zeigten keinen negativen Einfluss auf die GGT-Aktivität der Milch. Die Substratspezifität der Milch-GGT, die neben L-Methionin oder L-Glutamin auch L-Phenylalanin als guten Akzeptor offenbarte, scheint zusammen mit der Verfügbarkeit der verschiedenen Akzeptoraminosäuren wie L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Leucin oder L-Histidin die Bildung der geschmacksverstärkenden γ -Glutamylpeptide zu beeinflussen. Daneben trägt die lange Reifezeit dieser Käsesorte zur Bildung der außergewöhnlich hohen Mengen an γ -Glutamylpeptiden sowie zur Umsetzung von eigentlich weniger bevorzugten Akzeptormolekülen wie L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure oder L-Threonin bei.

2.1.2.6 Diskussion

Die quantitative Analyse der geschmacksverstärkenden γ -Glutamylpeptide in gereiftem Parmesankäse (P-24) mittels LC-MS/MS ergab einen außergewöhnlich hohen Gesamtgehalt dieser Verbindungen, wohingegen die Konzentrationen der korrespondierenden α -Formen denen anderer Käsesorten entsprachen (*Toelstede und Hofmann, 2009*).

Zur Klärung der Ursachen für die hohen Gehalte an γ -Glutamylpeptiden in Parmesankäse wurde zunächst eine umfassende Quantifizierung der α - und γ -Peptide sowie freien Aminosäuren in diesem Käse verschiedener Reifestufen (P-13, P-24, P-30) durchgeführt. Der gefundene Anstieg der Gesamtkonzentration an γ -Peptiden um den Faktor drei von P-13 zu P-24 hin indizierte eine vermehrte Bildung der Verbindungen mit zunehmender Reife, die mit weiter fortschreitendem Alter jedoch rückläufig war. Dieses Ergebnis korrelierte gut mit den quantitativen Daten für die potentiellen Präkursoren der Substanzen, den freien Aminosäuren, die durch die proteolytische Spaltung aus Casein freigesetzt werden. Weiterhin deuteten die Resultate der Analysen darauf hin, dass der Umfang der Bildung eines γ -Peptides in direktem Zusammenhang mit der Menge der entsprechenden Präkursor-Aminosäure steht. Dies zeigte sich beispielsweise besonders deutlich für die korrespondierenden Aminosäure-Peptid-Paare L-Glutaminsäure und γ -Glu-Glu (**8**), L-Lysin und γ -Glu-Lys (**14**) oder L-Valin und γ -Glu-Val (**6**), die jeweils einen starken Anstieg in der Konzentration von P-13 zu P-24 hin aufwiesen. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits 2009 von *Toelstede und Hofmann* für L-Glutaminsäure und γ -Glu-Glu in Goudakäse gefunden. Zudem wurde aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine Korrelation von Peptidbildung und relativer Zunahme der Präkursor-Aminosäure postuliert, die unter anderem für L-Histidin und γ -Glu-His gefunden wurde.

Die durchgeführte photometrische Analyse der γ -Glutamyltransferase-Aktivität (GGT) in den drei Parmesan-Proben (P-13, P-24 und P-30) legte jeweils eine hohe GGT-Aktivität mit Werten zwischen 14,6 und 15,3 U/g Trockenmasse offen. Dieses Ergebnis spiegelte die zuvor erhaltenen quantitativen Daten der γ -Glutamylpeptide wider. Für andere Käsesorten aus Rohmilch sind geringere Werte zwischen 3,9 U/g Trockenmasse (Gouda aus Rohmilch) und 11,7 U/g Trockenmasse (Camembert aus Rohmilch) publiziert (*Blel et al.*, 2002; *Toelstede und Hofmann*, 2009).

Weiterhin konnte durch Inkubation von Parmesankäse mit der isotopenmarkierten Donoraminosäure L-Glutamin- $^{13}\text{C}_5$ und anschließender massenspektrometrischer Detektion der gebildeten Peptide erstmals die *in-situ*-Generation von γ -Glutamylpeptiden in Käse gezeigt werden, die parallel einen ersten Eindruck der bevorzugt gebildeten Peptide vermittelte. Die Detektion der mengenmäßig dominierenden Verbindungen γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Lys, γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -His, γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Phe und γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Glu spiegelten die Ergebnisse der quantitativen Analyse der natürlich vorkommenden ^{12}C -Formen wider und untermauerten somit einen Einfluss der Verfügbarkeit der jeweiligen Präkursor-Aminosäure.

Zur Offenlegung der GGT-Quelle in Parmesankäse wurden Untersuchungen mit der Mikroflora des vorliegenden Käses sowie mit Rohmilch und verschiedenen erhitzten Milchproben durchgeführt. Die Charakterisierung der Mikroflora der vorliegenden Käseproben mittels Extraktion, Vereinzelung und taxonomischer Einordnung anhand des M13- und 16S-Genoms führte zur Identifizierung von *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus harbinensis* in P-13, wohingegen in den reiferen Proben P-24 und P-30 keine vitalen Mikroorganismen mehr nachgewiesen werden konnten. Allerdings zeigten weder die isolierten *Lactobacillen* noch weitere aus der frühen Mikroflora von Parmesan bekannten Stämme, wie z.B. *Lb. delbrueckii*, *Lb. paracasei* oder *Lb. rhamnosus* (Coppola et al., 1997, 2000) eine nachweisbare GGT-Aktivität. Dieses Resultat ist mit Angaben aus der Literatur konform (Wiederholt und Steele, 1994) und schließt die Mikroflora als GGT-Quelle in Parmesankäse aus. Konsequenterweise wurde die zur Herstellung verwendete Rohmilch als GGT-Quelle angenommen, was im Folgenden durch Messung der GGT-Aktivität sowie Nachweis der *in-situ* Bildung von γ -Glutamylpeptiden bestätigt werden sollte.

Die Analyse der GGT-Aktivität anhand des photometrischen Assays zeigte, dass die GGT-Aktivität einer Milchprobe, die unter produktionsspezifischen Parametern für Parmesankäse behandelt wurde (55 °C für 60 min) nur eine geringfügig schwächere Enzymaktivität als Rohmilch aufwies, wohingegen höhere Temperaturen (60 – 75 °C) zu einer sukzessiven Abnahme der GGT-Aktivität führten. Die Daten bestätigten bereits publizierte Ergebnisse (Blel et al., 2002; Toelstede und Hofmann, 2009; Stanciuc et al., 2011). Inkubationen der gleichen Milchproben mit binären Lösungen von L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] und L-Glutaminsäure, die in der Bildung der entsprechenden isotopenmarkierten Peptide resultierten, spiegelten die Ergebnisse des photometrischen Nachweises wider und bestätigten den Erhalt der GGT-Aktivität während des Herstellungsprozesses von Parmesankäse. Weitere Inkubationen von Rohmilch mit binären Lösungen von L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] und verschiedenen Akzeptoraminosäuren legten eine gute Substratspezifität der GGT gegenüber L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Lysin und L-Histidin unter natürlichen Bedingungen offen. Während eine gute Spezifität der Milch-GGT gegenüber L-Methionin bereits von Baumrucker (1979) beschrieben wurde, sind L-Phenylalanin und L-Histidin eher als gute Akzeptoren für das Enzym aus *Penicillium roquefortii* und *Bacillus subtilis* bekannt (Tomita et al., 1990; Shuai et al., 2011). Die zusätzlich detektierten unterschiedlichen Umsatzraten der verschiedenen binären Lösungen untermauerten die bereits postulierte inhibierende oder aktivierende Wirkung verschiedener Substrate auf die GGT (Sobiech et al., 1974).

Die Inkubation von Rohmilch mit L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] und einer Lösung von acht weiteren Aminosäuren zeigte eine leicht veränderte Reihenfolge der Substratspezifität, bei der L-Lysin und L-Histidin im Vergleich mit L-Glutamin-[$^{13}\text{C}_5$] weniger bevorzugt umgesetzt wurden. Dieses Ergebnis machte den Einfluss der vorliegenden Substrate aufeinander deutlich und bestätigte bereits publizierte Daten (*Karkowsky und Orłowski, 1978*).

Die dargestellten Ergebnisse zeigten die für die Herstellung von Parmesankäse verwendete Rohmilch als GGT-Quelle auf. Die Umsetzung verschiedener Akzeptoraminosäuren mit dem Donor L-Glutamin zu den γ -Glutamylpeptiden hängt dabei einerseits von der Substratspezifität aber auch von der Verfügbarkeit der einzelnen Substrate ab. Weiterhin ist die lange Reifezeit dieser Käsesorte ein entscheidender Faktor, der zur Bildung der außergewöhnlich hohen Mengen an γ -Glutamylpeptiden sowie zur Umsetzung von eigentlich weniger bevorzugten Akzeptormolekülen wie z.B. L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure oder L-Threonin beiträgt.

2.2 Schlüsselgeschmacksstoffe in Balsamico Essig

2.2.1 Entschlüsselung des Sensometaboloms von Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (ABTM)

Die Literaturübersicht zeigt, dass der Fokus quantitativ-analytischer Untersuchungen von Traditionellem Balsamico Essig vor allem auf der Identifizierung von Authentizitäts- und Alterungsmarkern lag. Umfassende Kenntnisse über die Verbindungen, die für den charakteristischen Geschmack des Lebensmittels verantwortlich sind liegen hingegen nicht vor. Daher wurden im Folgenden humansensorische und instrumentell-analytische Methoden zur Offenlegung des Sensometaboloms von Traditionellem Balsamico Essig eingesetzt.

2.2.1.1 Sensorische Analyse von ABTM

Um einen ersten Einblick in das sensorische Profil von Traditionellem Balsamico Essig di Modena (ABTM) zu erhalten, wurde eine Geschmacksprofilanalyse durchgeführt. Aufgrund des sehr intensiven Gesamtgeschmackseindrucks des Essigs war eine vorherige Verdünnung mit Sensorikwasser um den Faktor drei notwendig. Anschließend wurden die einzelnen Geschmacksqualitäten Süß, Sauer, Bitter, Adstringierend, Salzig, Umami sowie der Eindruck der viskosen Mundfülle vom Sensorikpanel auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet. Das resultierende Geschmacksprofil ist in Abbildung 41 dargestellt. Mit einer Intensität von 3,6 war Sauer der dominierende Geschmack des ABTM, wobei die Sauerqualität vom Panel als rund und fruchtig beschrieben wurde. Ebenfalls deutlich wahrgenommen wurden die Süße (2,3), die Adstringenz (2,2) und die Mundfülle (1,7), wohingegen der bittere Geschmack sehr moderat (0,6) und die Salzigkeit sowie der Umamigeschmack nur marginal (je 0,2) detektiert wurden.

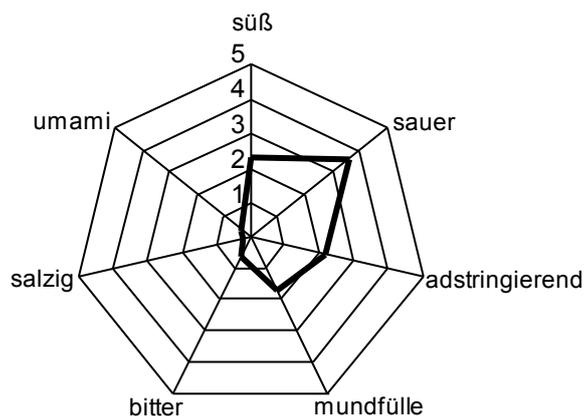


Abbildung 41. Geschmacksprofil von ABTM.

Zur Lokalisierung der geschmacksaktiven Verbindungen wurde der ABTM im nächsten Schritt einer molekulargewichtsorientierten Fraktionierung mittels Ultrafiltration unterzogen. Durch Verwendung einer Ultrafiltrationszelle mit einer Polyethersulfonmembran (Molekulargewichts-Cut-Off: 5 kDa) wurde der ABTM in ein niedermolekulares Filtrat (NMF, ≤ 5 kDa) und ein hochmolekulares Retentat (HMF, > 5 kDa) getrennt. Die Ausbeuten an niedermolekularer und hochmolekularer Fraktion nach Gefriertrocknung betrugen 65,63 bzw. 0,87 g/100 ml Essig (**Tabelle 16**).

Tabelle 16. Ausbeuten (g/100 ml) der durch Ultrafiltration von ABTM erhaltenen Niedermolekularen Fraktion (NMF) und Hochmolekularen Fraktion (HMF).

Fraktion	Ausbeute (g/100 ml)
NMF (≤ 5 kDa)	65,63
HMF (> 5 kDa)	0,87

Um ihren Beitrag zum Geschmack des ABTM zu evaluieren, wurden beide Fraktionen jeweils in ihrer natürlichen Konzentration in mineralstoffarmem Sensorikwasser aufgenommen, der pH-Wert mit HCl (1 M) auf den des ABTM eingestellt und die Lösungen um den Faktor drei verdünnt. Die anschließend durchgeführte vergleichende Geschmacksprofilanalyse gegen den ebenfalls verdünnten ABTM als Referenz deutete darauf hin, dass der majore Anteil der geschmacksaktiven Substanzen in der Fraktion NMF lokalisiert war (**Tabelle 17**).

Tabelle 17. Geschmacksprofile der Niedermolekularen Fraktion (NMF) und Hochmolekularen Fraktion (HMF) im Vergleich zum ABTM.

Geschmacksqualität	Intensitäten (\pm SD) der einzelnen Geschmacksqualitäten in		
	ABTM	NMF	HMF
süß	2,3	2,4 (\pm 0,3)	0,2 (\pm 0,2)
sauer	3,6	1,8 (\pm 0,3)	0,3 (\pm 0,3)
adstringierend	2,2	1,4 (\pm 0,3)	0,9 (\pm 0,3)
mundfülle	1,7	1,1 (\pm 0,3)	0,2 (\pm 0,2)
bitter	0,6	0,5 (\pm 0,1)	0,0 (\pm 0,0)
umami	0,2	0,2 (\pm 0,1)	0,0 (\pm 0,0)
salzig	0,2	0,2 (\pm 0,1)	0,0 (\pm 0,2)

Geschmacksprofile der NMF und HMF wurden gegen den ABTM als Referenz ermittelt, wobei die erhaltenen Werte aller Panelisten gemittelt wurden (\pm SD; n = 12).

Die Süße der NMF sowie die weniger bedeutenden Geschmacksqualitäten bitter, salzig und umami wurden mit den gleichen Intensitäten bewertet wie die des ABTM. Auch saurer (1,8) und adstringierender (1,4) Geschmackseindruck sowie die Mundfülle (1,1) wurden deutlich wahrgenommen, wenn auch in geringerem Maße als beim ABTM. Während für den Sauergeschmack diese Diskrepanz durch den Verlust von Essigsäure während der Gefriertrocknung zu erklären war, schien bei der Adstringenz das Fehlen der Hochmolekularen Fraktion (HMF) für die geringere Intensität verantwortlich zu sein. Diese wies mit einem Wert von 0,9 ebenfalls einen deutlich wahrnehmbaren adstringierenden Eindruck auf. Die geringere Mundfülle (1,1) der NMF hingegen ließ sich nicht direkt durch die Abwesenheit der HMF erklären, da diese selber keine Mundfülle aufwies (**Tabelle 17**). Diese Ergebnisse zeigten, dass die meisten geschmacksaktiven Verbindungen des ABTM ein geringes Molekulargewicht aufweisen. Nur einige adstringierende Substanzen besaßen Molekulargewichte über 5 kDa. Ähnliche Resultate wurden bereits für die hochmolekulare Fraktion von Amarone-Rotwein gefunden (*Hufnagel und Hofmann, 2008b*).

Um den Fokus der nachfolgenden Untersuchungen auf noch unbekannte Verbindungen konzentrieren zu können, wurden zunächst aus der Literatur bekannte Basisgeschmacksstoffe qualitativ und quantitativ erfasst und ihr Beitrag zum Geschmack von ABTM evaluiert.

2.2.1.2 Identifizierung und quantitative Analyse von Sensometaboliten aus der Fasslagerung

Das Vorkommen von Glucose, Fructose, organischen Säuren oder auch phenolischen Verbindungen in Traditionellen Balsamico Essigen sowie Balsamico Essig di Modena wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (z.B. *Plessi et al.*, 1988, 1989, 2006; *Theobald et al.*, 1998; *Chinnici et al.*, 2003; *Sanarico et al.*, 2003; *Cocchi et al.*, 2006b). Literaturangaben über Inhaltsstoffe anderer Essigsorten oder Spirituosen, die einer Fasslagerung unterzogen werden, lassen jedoch die Anwesenheit weiterer geschmacksaktiver Verbindungen wie z.B. Ellagttannine oder Flavonole, vermuten (*Glabasnia und Hofmann*, 2006; *Cerezo et al.*, 2009; *Stark et al.*, 2010). Aufgrund dieser Kenntnisse wurde vor der quantitativen Analyse zunächst eine Screening nach potentiellen, literaturbekannten Sensometaboliten durchgeführt.

Screening nach Vescalagin, Castalagin und (+)-Dihydrorobinetin

Die Ellagttannine Vescalagin (**27**) und Castalagin (**28**) (**Abbildung 42**) wurden 2006 von *Glabasnia und Hofmann* als adstringierende Verbindungen in Whiskey beschrieben. Sie gehen durch Eichenfasslagerung in die Spirituose über und weisen beide einen Geschmacksschwellenwert von 1,1 $\mu\text{mol/l}$ auf. Das Dihydroflavonol (+)-Dihydrorobinetin (**29**) (**Abbildung 42**) hingegen wurde als Marker für die Lagerung von Essig in Akazienfässern postuliert (*Cerezo et al.*, 2009; *Sanz et al.*, 2011). Über die sensorischen Eigenschaften dieser Substanz liegen bisher keine Angaben vor, strukturähnliche Verbindungen wie Quercetin oder Catechin und Epicatechin rufen allerdings einen adstringierenden Geschmack hervor (*Stark et al.*, 2005).

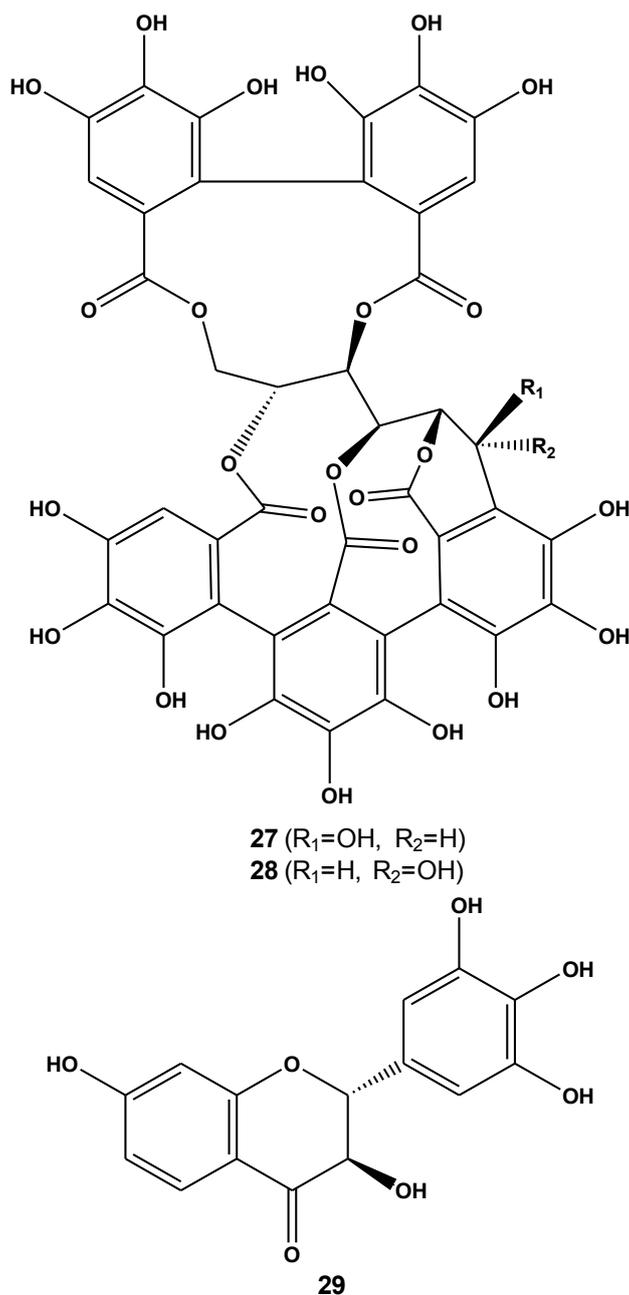


Abbildung 42. Strukturformeln von Vescalagin (27), Castalagin (28) und (+)-Dihydrorobinetin (29).

Da Traditioneller Balsamico Essig ebenfalls in Fässern aus Eichenholz und teilweise auch Akazienholz gelagert wird, wurde zunächst eine qualitative Analyse dieser Verbindungen in den vorliegenden Essigproben mittels LC-MS/MS im negativen MRM-Modus durchgeführt. Zur Abtrennung polarer Inhaltsstoffe wie Zuckern oder organischer Säuren sowie zur Aufkonzentrierung der Analyten wurden sowohl der traditionelle ABTM als auch der konventionelle ABM über eine RP-18-Festphasen-Kartusche fraktioniert. Nach Konditionierung der Kartusche mit Methanol und Wasser wurde je ein Aliquot der

Essigproben aufgegeben und diese im Folgenden zunächst mit reinem Wasser, dann mit reinem Methanol eluiert. Die zuerst erhaltenen wässrigen Phasen wurde verworfen, die Methanolphasen bis zur Trockene eingengt, die Rückstände in einem definierten Volumen von 20 %igem Methanol aufgenommen und die Lösungen zur LC-MS/MS-Analyse verwendet. Durch den Vergleich mit den spezifischen, optimierten Massenübergängen und Retentionszeiten der entsprechenden Referenzsubstanzen in wässriger Lösung erfolgte die Identifizierung von **27**, **28** und **29** in den Essigproben.

Abbildung 43 zeigt die extrahierten Massenspuren von Vescalagin (**27**), Castalagin (**28**) (m/z 933.1→301.0) und (+)-Dihydrorobinetin (**29**) (m/z 303.0→174.9) im Methanolextrakt des ABM (**A** und **B**), im Methanolextrakt des ABTM (**C** und **D**) und in wässriger Referenzlösung (**E** und **F**). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass keiner der Analyten im ABM detektiert wurde, wohingegen beide Ellagttannine sowie (+)-Dihydrorobinetin im ABTM vorkamen. Somit konnten diese Verbindungen erstmals in Traditionellem Balsamico Essig nachgewiesen werden. Die Abwesenheit der Analyten im herkömmlichen Balsamico Essig di Modena war auf dessen fehlende Fasslagerung zurückzuführen und zeigte somit den ABM als geeignete Matrix für einmatrixkalibrierte Quantifizierung der Verbindungen auf. Die quantitativen Daten der Analyten sowie die Korrelation mit deren Geschmacksschwellenwerten sind in Kapitel 2.1.1.3 aufgeführt (**Tabelle 18**) und werden dort diskutiert.

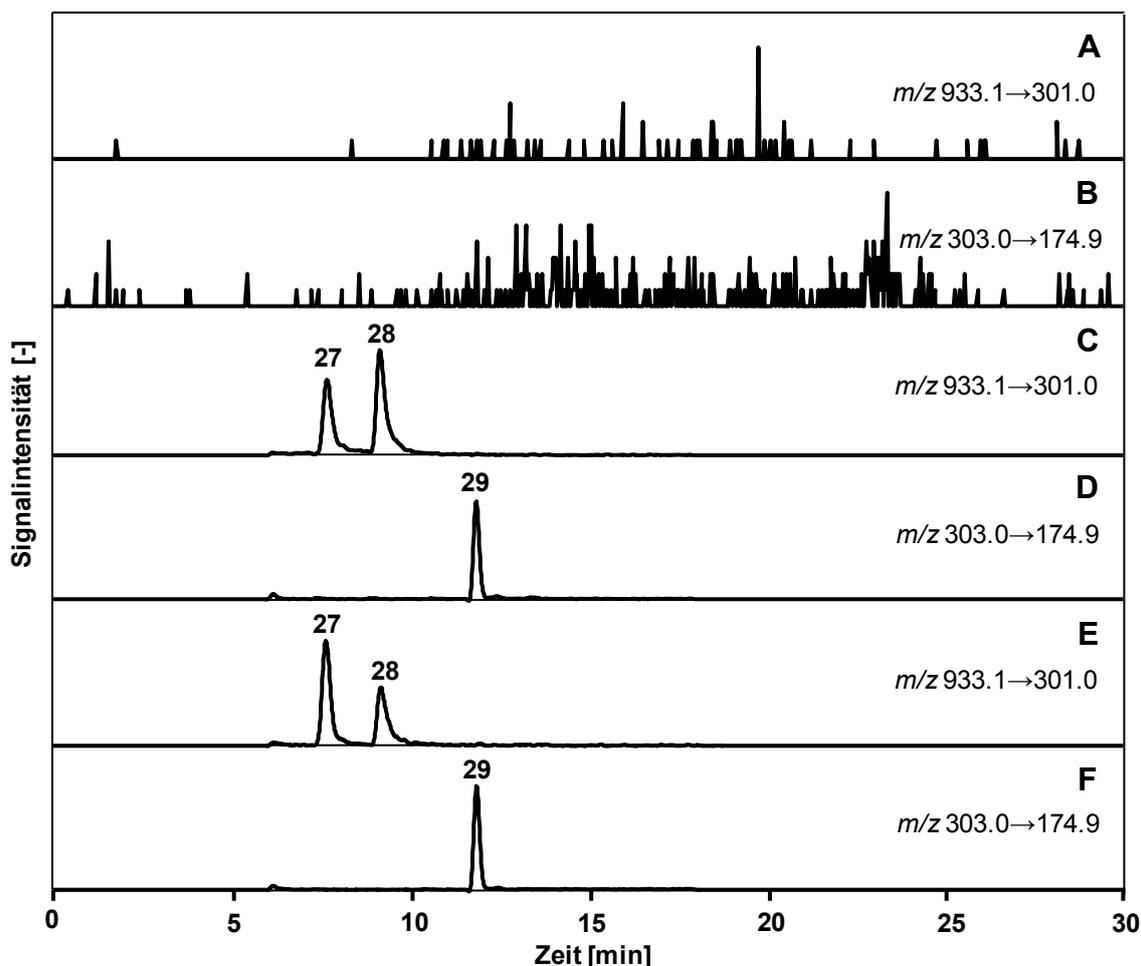


Abbildung 43. LC-MS/MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren (ESI) von Vescalagin (27) und Castalagin (28) im Methanolextrakt des ABM (A), ABTM (C) und in wässriger Referenzlösung (E) sowie von (+)-Dihydrorobinetin (29) im Methanolextrakt des ABM (B), ABTM (D) und in wässriger Referenzlösung (F). Die Nummerierung der Peaks bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 42.

Nach der erfolgreichen Identifizierung von 27 – 29 im ABTM wurde im Folgenden die Quantifizierung der Analyten sowie weiterer potentieller Geschmacksstoffe angestrebt, um auf Basis der instrumentell-analytischen Daten ein biomimetisches Geschmacksrekombinat erstellen zu können.

2.2.1.3 Quantifizierung von Geschmacksstoffen und Berechnung von DoT-Faktoren

Die quantitative Analyse potentieller Sensometaboliten des ABTM erfolgte entweder direkt aus wässrigen Verdünnungen der Proben oder aus deren methanolischen Festphasenextrakten. **Abbildung 44** gibt eine Übersicht über die erfassten Analyten und verwendeten Methoden.

Die Monosaccharide Glucose und Fructose sowie Gluconsäure wurden enzymatisch bestimmt. Die Quantifizierung der mineralische Anionen und Kationen sowie organischen Säuren erfolgte mittels Ionenchromatographie und unterdrückter Leitfähigkeitsdetektion, die Zuckeralkohole wurden nach Ionenaustauschromatographie durch gepulste amperometrische Detektion erfasst. Freie Aminosäuren wurden unter Verwendung einer SIVA-HILIC-MS/MS-Methode im positiven Elektrospray-Ionisationsmodus ebenfalls in wässrigen Verdünnungen der Proben quantifiziert. Die Bestimmung der Phenolcarbonsäuren, der Ellagtannine **27** und **28** sowie (+)-Dihydrorobinetin (**29**) erfolgte nach SPE-Fraktionierung jeweils mittels HPLC-MS/MS.

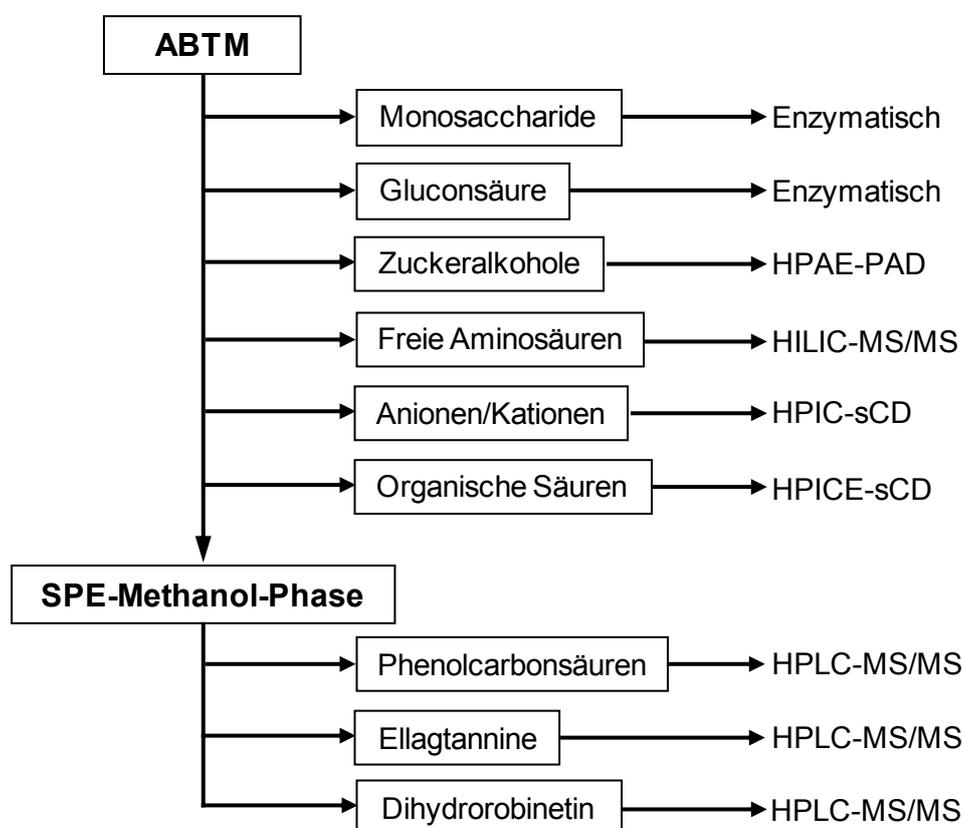


Abbildung 44. Schema zum Vorgehen bei der Quantifizierung von potentiellen Geschmacksstoffen in ABTM.

Abbildung 45 zeigt das HPIC-Chromatogramm der organischen Säuren in verdünntem ABTM, das zur quantitativen Erfassung von Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure, Äpfelsäure, Glykolsäure, Essigsäure und Bernsteinsäure führte. Exemplarisch sind die extrahierten MRM-Spuren der phenolischen Verbindungen Gallussäure, Vanillinsäure,

Kaffeensäure, Vanillin, Syringinsäure, Syringinaldehyd, Methylgallat und Ferulasäure, die in der SPE-Methanolphase des ABTM detektiert wurden, in **Abbildung 46** dargestellt.

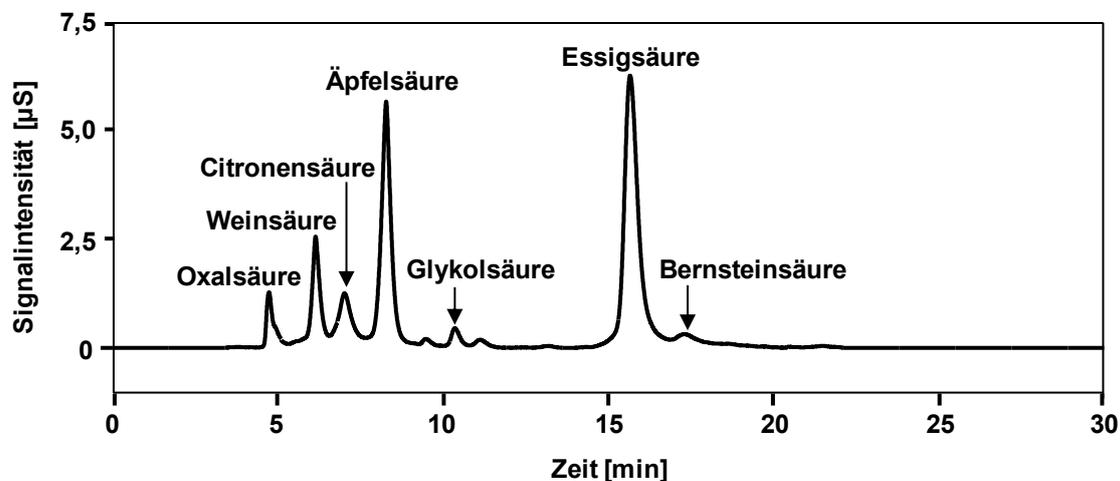


Abbildung 45. HPIC-Chromatogramm der organischen Säuren in verdünntem ABTM

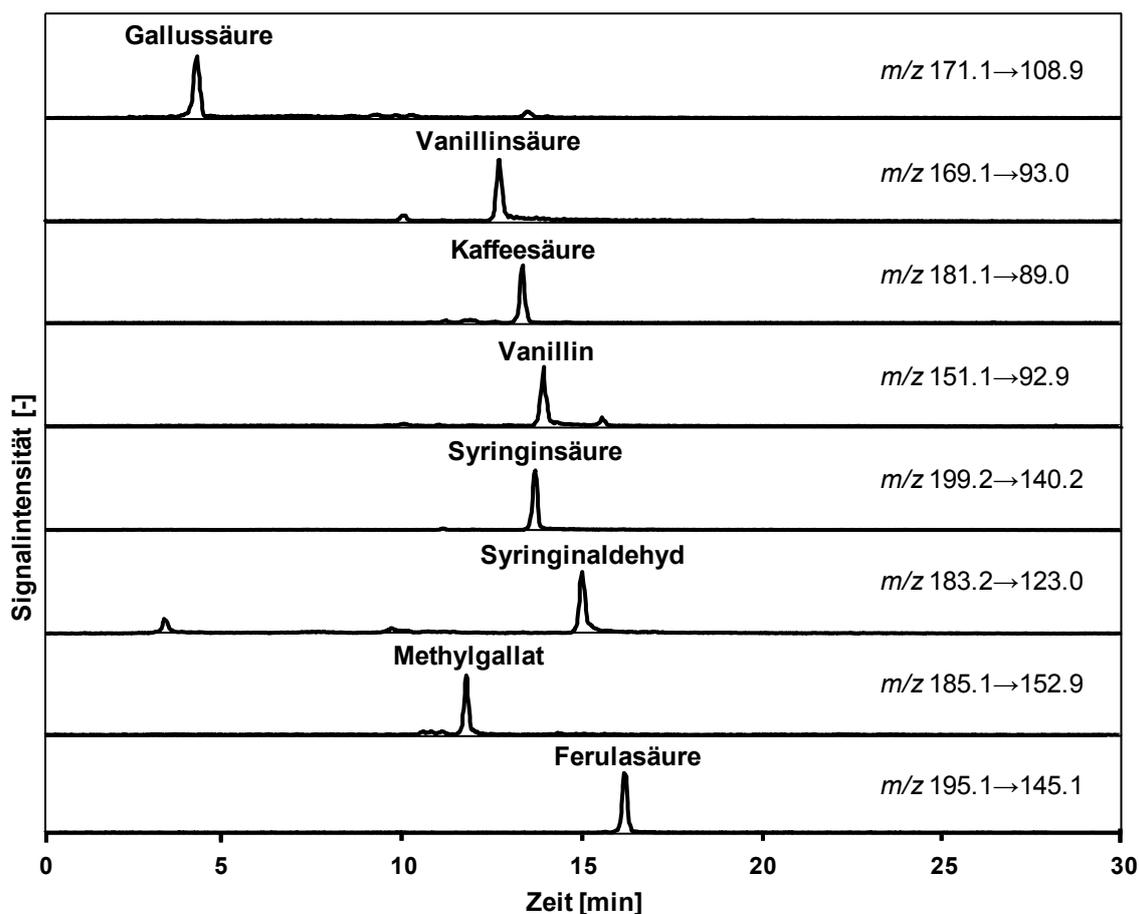


Abbildung 46. HPLC-MS/MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren (ESI^+) einiger phenolischer Verbindungen aus der SPE-Methanolphase von ABTM.

Insgesamt wurden zwei Monosaccharide, acht Zuckeralkohole, acht organische Säuren, zwei Anionen, vier Kationen, 15 Aminosäuren, 17 Phenolcarbonsäuren und -aldehyde sowie die Ellagatannine Vescalagin (**27**) und Castalagin (**28**) und das Flavonol (+)-Dihydrorobinetin (**29**) quantitativ im vorliegenden ABTM erfasst. **Tabelle 18** gibt, unterteilt nach Geschmacksqualitäten, eine Übersicht über die in ABTM ermittelten Gehalte, Geschmacksschwellenwerte und sich daraus ergebenden DoT-Faktoren der einzelnen Sensometaboliten.

Tabelle 18. Geschmacksschwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$], Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] und DoT-Faktoren aller in ABTM quantifizierten Geschmacksstoffe.

Substanz	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$] ^a	Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] ^b	DoT ^c
Gruppe I: süß			
D-Fructose	10200 ^d	1601111	157,0
D-Glucose	18000 ^d	1818333	101,0
Glycerin	81100 ^d	134377	1,7
L-Prolin	25000 ^d	10830	0,4
Inositol	17700 ^d	5372	0,3
Sorbitol	33800 ^d	10534	0,3
Erythritol	36300 ^d	6612	0,2
Xylitol	12500 ^d	1766	0,1
Mannitol	40000	2900	<0,1
Arabitol	43100	2200	<0,1
Ribitol	45300	1400	<0,1
L-Methionin	5000 ^f	17	<0,1
L-Alanin	12000 ^g	563	<0,1
L-Serin	25000 ^g	575	<0,1
Glycin	25000 ^g	268	<0,1
L-Threonin	35000 ^g	19	<0,1
Gruppe II: sauer			
Weinsäure	292 ^d	31450	107,7
Gluconsäure	900	60302	67,0
Glykolsäure	600	23946	39,9
Äpfelsäure	3690 ^d	107315	29,0

Essigsäure	19900 ^d	371161	18,7
Citronensäure	2600 ^d	11929	4,6
Bernsteinsäure	900 ^d	2420	2,7
Milchsäure	15480 ^d	7302	0,5
Gruppe III: bitter			
Calcium	6200 ^{h,i}	24578	4,0
Magnesium	6400 ^{h,i}	20024	3,1
L-Arginin	75000 ^f	7691	0,1
L-Leucin	11000 ^f	143	<0,1
L-Tyrosin	4000 ^f	77	<0,1
L-Isoleucin	10000 ^f	193	<0,1
L-Valin	30000 ^h	226	<0,1
L-Phenylalanin	45000 ^f	88	<0,1
L-Histidin	45000 ^f	29	<0,1
Gruppe IV: adstringierend			
Vescalagin (27)	1,1 ^l	38	34,5
Castalagin (28)	1,1 ^l	51	46,4
(+)-Dihydrorobinetin (29)	23	1,1	<0,1
<i>trans</i> -Kaffeesäure	72 ^l	29	0,4
Gentisinsäure	122 ^l	38	0,3
<i>p</i> -Coumarsäure	139 ^l	35	0,2
Gallussäure	292 ^l	32	0,1
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	665 ^l	17	<0,1
Chinasäure	579	15	<0,1
Protocatechusäure	206 ^l	10	<0,1
Vanillinsäure	315 ^l	20	<0,1
Ferulasäure	67 ^l	2,4	<0,1
Vanillin	829 ^l	7,2	<0,1
Gallussäuremethylester	232 ^l	3,3	<0,1
Gallussäureethylester	185 ^l	2,9	<0,1
Syringaldehyd	330 ^l	8,7	<0,1
Gruppe V: salzig			
Kalium	13000 ^{h,i}	58025	3,1
Phosphat	5000 ^{g,k}	12230	2,4
Natrium	3900 ^{h,i}	7608	2,0

Chlorid	3900 ^{h,k}	6025	1,5
Gruppe VI: umami			
L-Asparaginsäure	600 ^h	528	0,9
L-Glutaminsäure	1100 ^h	179	0,1
Gruppe VII: adstringierende Polymere			
HMF (> 5 kDa)	n.d.	8,7 g/l	n.b.

^a Geschmacksschwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] wurden in Sensorik-Wasser bei pH 3,0 ermittelt oder aus der Literatur übernommen; ^b Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in ABTM, RSD jeweils $\leq 10\%$; ^c Dose-over-Threshold (DoT)-Faktor: Quotient aus Konzentration im Essig und Geschmacksschwellenwert; ^d Scharbert und Hofmann, 2005; ^e Wieser et al., 1977; ^f Warendorf, 1991; ^g Warmke, 1997; ^h Toelstede und Hofmann, 2008b; ⁱ Schwellenwert für das korrespondierende Chlorid; ^k Schwellenwert für das korrespondierende Natriumsalz; ^l Glabasnia und Hofmann, 2006.

16 Substanzen wurden in der Gruppe der süß schmeckenden Verbindungen zusammengefasst (Gruppe I), darunter Glucose und Fructose, acht Zuckeralkohole und sechs Aminosäuren, wobei Glucose und Fructose mit 1818333 und 1601111 $\mu\text{mol/l}$ mengenmäßig deutlich dominierten. Unter den Zuckeralkoholen war Glycerin mit einem Gehalt von 134377 $\mu\text{mol/l}$ die majore Substanz. Die anderen Verbindungen dieser Substanzklasse wurden mit Gehalten zwischen 1400 und 10534 $\mu\text{mol/l}$ detektiert. Unter den süßen Aminosäuren wurde L-Prolin mit 10830 $\mu\text{mol/l}$ als Hauptverbindung gefunden, die anderen fünf Aminosäuren wiesen deutlich geringere Gehalte auf (**Tabelle 18**).

Unter den acht sauer schmeckenden Substanzen der Gruppe II war Essigsäure mit 371161 $\mu\text{mol/l}$ die am höchsten konzentrierte, gefolgt von Äpfelsäure (107315 $\mu\text{mol/l}$), Gluconsäure (60301 $\mu\text{mol/l}$) und Weinsäure (31450 $\mu\text{mol/l}$). Glykol- und Citronensäure wiesen moderate Gehalte von 23946 bzw. 1192 $\mu\text{mol/l}$ auf, während für Milchsäure (7302 $\mu\text{mol/l}$) und Bernsteinsäure (2420 $\mu\text{mol/l}$) die geringsten Konzentrationen gefunden wurden.

Die Gruppe der bitteren Sensometaboliten (Gruppe III) umfasste neun Verbindungen, darunter die beiden bivalenten Kationen Calcium und Magnesium sowie sieben freie Aminosäuren. Die Konzentrationen an Calcium und Magnesium betragen für den ABTM 24578 bzw. 20024 $\mu\text{mol/l}$ und waren damit die dominierenden Substanzen in dieser Gruppe. Mit 7691 $\mu\text{mol/l}$ war L-Arginin die dominierende Aminosäure. Die anderen bitteren Aminosäuren wurden jeweils im geringen $\mu\text{mol/l}$ -Bereich detektiert (**Tabelle 18**).

Die größte Gruppe (Gruppe IV) war die der adstringierenden Substanzen, die 16 Verbindungen umfasste, darunter die Ellagtannine Vescalagin (**27**) und Castalagin (**28**), (+)-Dihydrorobinetin (**29**) sowie 12 Phenolcarbonsäuren und ein Phenolcarbonaldehyd. Die erstmals in ABTM detektierten Ellagtannine (vgl. Kapitel 2.2.1.2) wurden mittels LC-MS/MS-Analyse unter Anwendung externer Matrixkalibration in Gehalten von 38 $\mu\text{mol/l}$ (**27**) und 51 $\mu\text{mol/l}$ (**28**) gefunden. (+)-Dihydrorobinetin (**29**) wies eine Konzentration von 1,1 $\mu\text{mol/l}$ auf. Die weiteren phenolischen Verbindungen wurden mit Werten von 2,9 – 38 $\mu\text{mol/l}$ in eher geringen Gehalten detektiert.

Gruppe V enthielt die salzig schmeckenden Substanzen Kalium, Natrium, Chlorid und Phosphat. Dabei war Kalium mit 58025 $\mu\text{mol/l}$ die majore Verbindung, gefolgt von Natrium (7608 $\mu\text{mol/l}$). Die beiden mineralischen Anionen Phosphat und Chlorid wiesen Gehalte von 12330 bzw. 6025 $\mu\text{mol/l}$ auf.

Die Gruppe der umami-schmeckenden Substanzen (Gruppe VI) bestand aus den Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure, die mit Konzentrationen von 179 und 528 $\mu\text{mol/l}$ detektiert wurden (**Tabelle 18**). Desweiteren wurde unter Gruppe VII die adstringierende, polymere Ultrafiltrationsfraktion HMF des ABTM aufgeführt, für die ein Gehalt von 8,7 g/l gefunden wurde.

Zur Beurteilung des Geschmacksbeitrags der einzelnen Verbindungen im ABTM wurden Dose-over-Threshold-Faktoren (DoT-Faktoren) für alle Substanzen als Quotient aus Konzentration und Geschmacksschwellenwert berechnet (**Tabelle 18**). Dabei ergab sich für 18 Verbindungen ein DoT-Faktor $> 1,0$, für 13 ein DoT-Faktor zwischen 0,1 – 1,0 und für 24 Substanzen ein DoT-Faktor $< 0,1$. Die Verbindungen mit den höchsten DoT-Faktoren waren Fructose (157,0) und Weinsäure (107,7), gefolgt von Glucose (101,0).

Unterteilt nach Geschmacksqualitäten wies in Gruppe I (süß) neben Glucose und Fructose, für die aufgrund der hohen DoT-Faktoren ein deutlicher Beitrag zum Süßgeschmack zu erwarten war, nur der Zuckeralkohol Glycerin einen DoT-Faktor $> 1,0$ auf. Für alle anderen Polyole ergaben sich DoT-Faktoren $< 1,0$, für die Aminosäuren mit Ausnahme von L-Prolin (0,4) sogar nur DoT-Faktoren $< 0,1$. Somit konnte ein direkter Beitrag der meisten süßen Verbindungen zum Geschmack des ABTM ausgeschlossen werden.

In der Gruppe der sauren Verbindungen (Gruppe II) wies Weinsäure den höchsten DoT-Faktor auf (107,7). Mit Ausnahme von Milchsäure (DoT: 0,5) konnte von allen anderen

organischen Säuren aufgrund ihrer hohen DoT-Faktoren ein direkter Beitrag zum sauren Geschmack des ABTM erwartet werden. (**Tabelle 18**).

Unter den bitter schmeckenden Substanzen (Gruppe III) wiesen nur die Kationen Calcium (4,0) und Magnesium (3,1) aufgrund ihrer DoT-Faktoren auf einen direkten Geschmacksbeitrag hin. Für L-Arginin ergab sich ein geringer DoT-Faktor von 0,1. Für alle weiteren bitteren Aminosäuren, die DoT-Faktoren $< 0,1$ aufwiesen, konnte ein unmittelbarer Einfluss auf die Bitterkeit ebenfalls ausgeschlossen werden.

Der adstringierende Eindruck des ABTM konnte vor allem den Ellagtanninen Vescalagin (**27**) und Castalagin (**28**) zugeschrieben werden, für die DoT-Faktoren von 34,3 und 36,4 kalkuliert wurden. (+)-Dihydrorobinetin (**29**), für das ein Geschmacksschwellenwert von 23 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt wurde, leistete hingegen keinen direkten Beitrag (DoT: 0,1). Auch alle weiteren Verbindungen der Gruppe IV wiesen mit ihren geringen DoT-Faktoren auf eine untergeordnete Rolle im Geschmacksbeitrag hin. Hier waren höchstens additive oder synergistische Effekte anzunehmen.

Unter den in Gruppe V zusammengefassten salzigen Ionen ergab sich für Kalium der höchste DoT-Faktor (3,1), gefolgt von Phosphat (2,4) und Natrium (2,0). Aufgrund dieser Werte war ein direkter Beitrag zum Geschmack zu erwarten.

Bei den Umami schmeckenden Aminosäuren der Gruppe VI implizierten die geringen DoT-Faktoren keinen direkten sensorischer Einfluss.

Für die in Gruppe VII eingeordnete hochmolekulare Ultrafiltrationsfraktion des ABTM wurde kein Schwellenwert aufgenommen. Der sensorische Einfluss dieser Fraktion sollte anhand von Rekombinations- und Omissionsexperimenten evaluiert werden.

Zur Überprüfung der quantitativen Daten auf Richtigkeit und Vollständigkeit sowie zur Identifizierung der Schlüsselgeschmacksstoffe wurden im nächsten Schritt Rekombinations- und Omissionsexperimente durchgeführt.

2.2.1.4 Rekombinations- und Omissionsexperimente

Rekombinationsexperimente

Im Folgenden wurde ein biomimetisches Rekombinat des ABTM angefertigt, das der Überprüfung der instrumentell-quantitativen Analysen auf Vollständigkeit und Richtigkeit dienen sollte. Zwar sollten theoretisch nur Geschmacksstoffe mit einem DoT-Faktor $> 1,0$ einen direkten Beitrag zum Geschmack leisten, dennoch können minore Verbindungen aufgrund von additiven oder synergistischen Effekten das Gesamtgeschmacksprofil eines Lebensmittels beeinflussen. Dies wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach, z.B. für Rotwein oder Goudakäse, gezeigt (*Hufnagel und Hofmann, 2008b; Toelstede und Hofmann, 2008b*).

Daher wurden alle 55 in ABTM quantifizierten, in den Gruppen I – VII zusammengefassten Verbindungen (**Tabelle 18**) jeweils in ihrer natürlichen Konzentration in Wasser gelöst und der pH-Wert auf den des authentischen Essigs korrigiert. Anschließend wurde das Rekombinat nach Verdünnung um den Faktor drei mittels vergleichender Geschmacksprofilanalyse gegen den authentischen Essig auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) sensorisch beurteilt.

Das resultierende Geschmacksprofil ist in **Abbildung 47** dargestellt. Die sensorischen Profile von ABTM und dessen Rekombinat Rek^{ABTM} zeigten sehr gute Übereinstimmungen für alle Geschmacksqualitäten. Allerdings wurde die Wahrnehmung des Süßgeschmacks für den ABTM im Vergleich zum Rekombinat als länger anhaltend beschrieben.

Die sensorische Beurteilung des Rekombinates des vorliegenden ABTM zeigte, dass die geschmacksaktiven Verbindungen, die zum typischen sensorischen Profil von Traditionellem Balsamico Essig beitragen, erfolgreich identifiziert und quantifiziert wurden. Die einzige Diskrepanz stellte die länger anhaltende Süße des authentischen Essigs im Vergleich zum Rekombinat dar. Die Identifizierung und Charakterisierung der für diesen sensorischen Eindruck verantwortlichen Verbindungen im ABTM wird in Kapitel 2.2.1.5 behandelt.

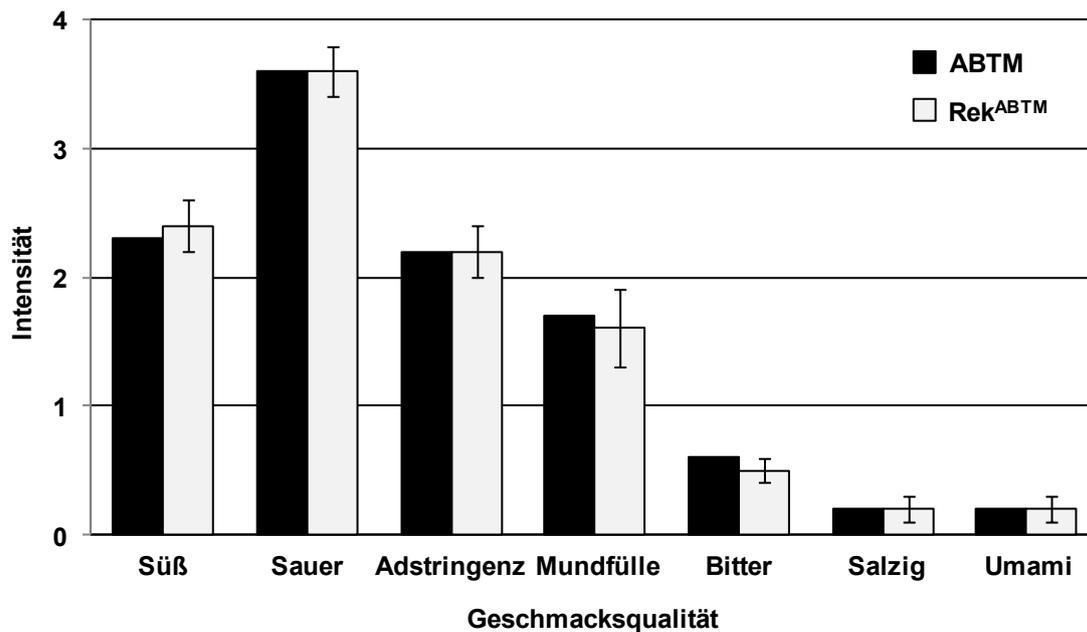


Abbildung 47. Geschmacksprofile von ABTM und dessen Rekombinat Rek^{ABTM}. Die Abbildung beruht auf Daten in Tabelle 49 (Kapitel 6)

Um die für den charakteristischen Geschmack des ABTM relevanten von den weniger wichtigen Verbindungen unterscheiden zu können, erfolgten im nächsten Schritt verschiedene Omissionsexperimente.

Omissionsexperimente

Im Weiteren wurden Omissionsexperimente mit dem Rekombinat des ABTM durchgeführt, um die Schlüsselgeschmacksstoffe sowie additive, synergistische oder auch unterdrückende Effekte zwischen verschiedenen Sensometaboliten offenzulegen. Dabei wurden einzelne Verbindungen oder Substanzklassen aus dem Rekombinat Rek^{ABTM} omittiert und die so erhaltenen Teilrekominate sensorisch gegen Rek^{ABTM} im Triangeltest evaluiert. Für den Fall, dass die Panelisten die abweichende Probe erkannten, bewerteten sie den Unterschied zum Geschmacksprofil der Referenzlösung. **Tabelle 19** gibt eine Übersicht über die durchgeführten Omissionsexperimente sowie den detektierten sensorischen Einfluss der omittierten Verbindungen.

Aus der Gruppe der süßen Verbindungen wurden zunächst alle Substanzen, die einen DoT-Faktor $< 0,1$ aufwiesen omittiert, was keinen Einfluss auf die Süßintensität oder -qualität des erhaltenen Teilrekombinates hatte. Das gleiche Ergebnis wurde auch durch zusätzliches Weglassen der süß schmeckenden Verbindungen mit DoT-Faktoren $< 1,0$ erhalten. Dies zeigt, dass weder die süß schmeckenden Aminosäuren noch die Mehrheit der Zuckeralkohole einen Beitrag zum intensiv süßen Geschmack des ABTM leisteten, sondern dieser ausschließlich durch die majoren Inhaltsstoffe Glucose, Fructose und Glycerin hervorgerufen wurde.

Tabelle 19. Übersicht über die durchgeführten Omissionsexperimente, omittierten Geschmacksgruppen und -stoffe sowie des sensorischen Einflusses auf das Geschmacksprofil des jeweiligen Teilrekombinates des ABTM.

Omission von	sensorischer Unterschied
allen süßen Verbindungen mit DoT $< 0,1$	kein Unterschied
allen süßen Verbindungen mit DoT $< 1,0$	kein Unterschied
Vescalagin (27) und Castalagin (28)	Abnahme der Adstringenz (2,2 \rightarrow 1,8)
allen Phenolcarbonsäuren und -aldehyden	kein Unterschied
allen bitteren Aminosäuren	kein Unterschied
allen salzigen Verbindungen	Zunahme der Sauerintensität (3,6 \rightarrow 3,9), Änderung der Sauerqualität (fruchtig-rund \rightarrow stechend)
Hochmolekularer Fraktion	Abnahme der Mundfülle (1,7 \rightarrow 1,1), Abnahme der Adstringenz (2,2 \rightarrow 2,0)
allen Verbindungen mit DoT $< 1,0$	kein Unterschied

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde der Beitrag verschiedener Substanzklassen zum adstringierenden Geschmackseindruck untersucht. Die Omission der Ellagttannine Vescalagin (**27**) und Castalagin (**28**), die beide einen DoT-Faktor $> 1,0$ aufwiesen, führte zu einer um 0,4 Einheiten geringeren Intensität der Adstringenz im Teilrekombinat, was den Beitrag dieser beiden Verbindungen deutlich machte. Im Gegensatz dazu hatte das Weglassen der ebenfalls adstringierenden Phenolcarbonsäuren und -aldehyde sowie von (+)-Dihydrorobinetin (**29**) keinen Einfluss auf die Adstringenz.

Ebenfalls keinen Einfluss auf den Geschmack des ABTM hatten die bitteren Aminosäuren. Ihre Omission veränderte die Bitterkeit des Teilrekombinates nicht, die daher der Anwesenheit der oberhalb ihres Geschmacksschwellenwertes vorliegenden bitteren Kationen Calcium und Magnesium zugeschrieben werden konnte.

In einem weiteren Experiment wurden die salzigen Ionen Natrium, Kalium, Chlorid und Phosphat aus dem Rekombinat omittiert. Zwar konnte kein Einfluss auf den marginalen Salzgeschmack detektiert werden, allerdings beschrieb das Sensorikpanel den Sauergeschmack dieses Teilrekombinates als intensiver (3,6 → 3,9), bei gleichzeitiger Veränderung der Sauerqualität von fruchtig-rund hin zu stechend. Somit schienen die salzigen Ionen im Essig weniger einen Beitrag durch ihren Eigengeschmack zu leisten, sondern vielmehr anhand ihrer puffernden Eigenschaften einen Einfluss auf die Wahrnehmung anderer Geschmacksstoffe, vor allem der organischen Säuren, auszuüben.

Das Weglassen der durch Ultrafiltration erhaltenen Hochmolekularen Fraktion (HMF) hatte neben einer Abnahme des adstringierenden sensorischen Eindrucks auch einen deutlichen Verlust der Mundfülle zur Folge (1,7 → 1,1). Während die Adstringenz der Hochmolekularen Fraktion in wässriger Lösung bereits detektiert wurde (vgl. Kapitel 2.2.1.1), zeigte sich in ABTM-Matrix erstmals der Einfluss dieser Fraktion auf die Mundfülle. Ein Beitrag von Polymeren zum sensorischen Profil wurde für ABTM zwar postuliert (*Giudici et al.*, 2009), aber durch die vorliegenden Untersuchungen erstmals bestätigt.

In einem abschließenden Omissionsexperiment wurde ein sogenanntes Basisrekombinat (bRek^{ABTM}) angefertigt, aus dem alle Verbindungen mit einem DoT-Faktor < 1,0 weggelassen wurden. In diesem fehlten alle Aminosäuren, alle Polyole außer Glycerin, die Phenolcarbonsäuren und -aldehyde sowie Milchsäure, so dass die Zahl der eingesetzten Verbindungen im Vergleich zum Gesamtrekombinat (Rek^{ABTM}) von 55 auf 18 reduziert wurde. Die sensorische Evaluierung des Basisrekombinates gegen das Gesamtrekombinat als Referenz ergab keinen signifikanten Unterschied im Geschmacksprofil. Dadurch wurde deutlich, dass der charakteristische Geschmack von ABTM, der sich vor allem durch einen intensiven süßen sowie fruchtig-sauren Geschmack und eine viskose Mundfülle auszeichnet, durch die hoch konzentrierten, majoren Sensometaboliten sowie die hochmolekularen Inhaltsstoffe adäquat imitiert werden konnte. Ähnliche Ergebnisse wurden auch schon bei Omissionsexperimenten mit Whiskey oder auch Rotwein erhalten (*Glabasnia und Hofmann*, 2006; *Hufnagel und Hofmann*, 2008b).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass anhand der durchgeführten instrumentell-analytischen und human-sensorischen Experimente die Schlüsselgeschmacksstoffe von ABTM erfolgreich identifiziert wurden. Die Verbindungen, die für eine verlängerte Süßwahrnehmung des ABTM verantwortlich sind, konnten durch Analyse von Basisgeschmacksstoffen allerdings nicht offengelegt werden. Weiterführende Untersuchungen (Kapitel 2.2.1.5) sollten zur Identifizierung des Süßmodulators führen.

2.2.1.5 Aktivitätsorientierte Identifizierung von Süßgeschmacks-modulatoren in ABTM

Glucose und Fructose sowie Glycerin konnten zwar als Schlüsselverbindungen des süßen Geschmacks von ABTM identifiziert werden (vgl. Kapitel 2.2.1.4), allerdings zeigte die Geschmacksprofilanalyse des Rekombinates Rek^{ABTM} im Vergleich zum authentischen Essig eine Diskrepanz in der Länge der Süßwahrnehmung auf. Daher wurden im Folgenden weitere Experimente zur Lokalisierung und Identifizierung von noch unbekanntem, süßmodulierenden Verbindungen im vorliegenden ABTM durchgeführt.

Die durch Ultrafiltration erhaltene Niedermolekulare Fraktion (NMF) (siehe Kapitel 2.2.1.1) wurde mittels Gel-Absorptionschromatographie (GAC) fraktioniert und die resultierenden Fraktionen wurden im Weiteren anhand von Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) sowie vergleichender Geschmacksprofilanalyse sensorisch-orientiert analysiert.

2.2.1.5.1 Gelabsorptionschromatographie der Niedermolekularen Fraktion

Die niedermolekulare Fraktion (NMF), die in ihrem Geschmacksprofil große Ähnlichkeit mit dem ABTM aufwies (vgl. Kapitel 2.2.1.1), wurde zunächst mittels Gel-Absorptionschromatographie (GAC) an LH-20-Material und unter Verwendung eines Wasser-Methanol-Gradienten mit steigendem Methanolanteil fraktioniert. Das bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm erhaltene UV-Chromatogramm ist in **Abbildung 48** dargestellt und führte zu einer Trennung des Eluates in zehn Fraktionen. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen wurden nach Gefriertrocknung gravimetrisch bestimmt und sind zusammen mit ihrer jeweiligen optischen Erscheinung in **Tabelle 20** aufgeführt.

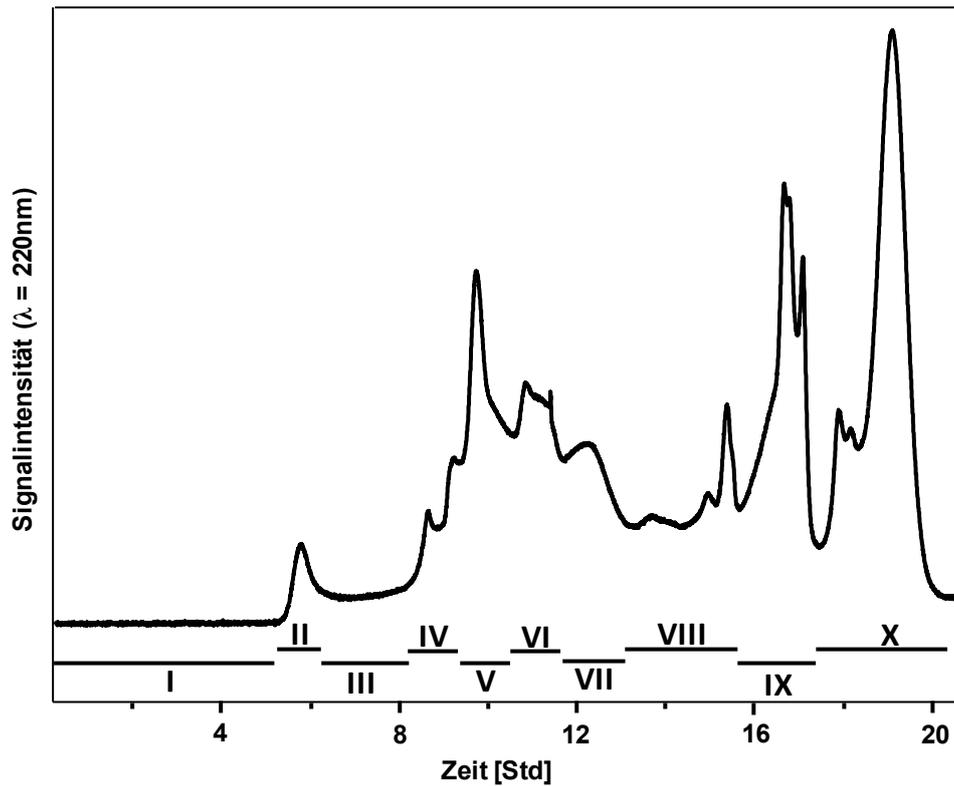


Abbildung 48. Resultierendes GAC-Chromatogramm ($\lambda = 220 \text{ nm}$) der durch Ultrafiltration von ABTM erhaltenen Niedermolekularen Fraktion (NMF).

Zur Lokalisierung von süß schmeckenden und vor allem süßmodulierenden Verbindungen wurden die erhaltenen GAC-Fractionen im nächsten Schritt einer sensorischen Analyse mittels Geschmacksverdünnungsanalyse und vergleichender Geschmacksprofilanalyse unterzogen.

Tabelle 20. Ausbeuten und optische Erscheinung der durch Fraktionierung von 1 g NMF erhaltenen GAC-Fractionen I – X.

Fraktion	Ausbeute [mg]	Anteil an Gesamtauswaage [%]	Optische Erscheinung
I	---	---	---
II	0,3	< 0,1	hellbraun, kristallin
III	4,8	0,5	gelb-braun, kristallin
IV	7,9	0,7	gelb-braun, amorph
V	150,5	14,1	hellbraun, kristallin
VI	847,4	79,6	hellbraun, sirupös
VII	25,2	2,4	hellbraun, kristallin
VIII	15,5	1,5	braun, kristallin
IX	11,8	1,1	braun, kristallin
X	1,1	0,1	braun, kristallin

2.2.1.5.2 Lokalisierung von Geschmacksstoffen/Geschmacksmodulatoren in GAC-Fractionen

Um süß schmeckende bzw. süßmodulierende Verbindungen in den erhaltenen GAC-Fractionen der niedermolekularen Fraktion des ABTM zu lokalisieren, wurden diese zunächst einer Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) (*Frank et al.*, 2001) unterzogen. Dazu wurde das Lyophilisat jeder Fraktion in seiner „natürlichen“ Konzentration in mineralstoffarmem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 3,0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung jeder Fraktion sukzessive 1:1 bis zum Erreichen eines Faktors von 512 verdünnt. Alle Verdünnungsstufen der einzelnen Fraktionen wurden vom Sensorikpanel in aufsteigenden Konzentrationen im Triangeltest gegen Wasser (pH 3,0) als Blindwert verkostet, wobei die Detektion eines sensorischen Unterschiedes zwischen Blindwert und Fraktion angegeben werden sollte. Dabei gilt per Definition die Verdünnungsstufe, bei der gerade noch ein Unterschied zwischen Probe und Blindwert wahrgenommen wurde, als Geschmacksverdünnungsfaktor dieser Fraktion. Die so erhaltenen GV-Faktoren sind zusammen mit den jeweils wahrgenommenen Geschmacksqualitäten in **Tabelle 21** zusammengefasst.

Tabelle 21. Ergebnisse der Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) der GAC-Fractionen II – X in Wasser und der vergleichenden Geschmacksprofilanalyse (vGPA) der GAC Fractionen II – X in Basisrekombinat (bRek^{ABTM}).

Fraktion		GVA in Wasser ^b		vGPA in bRek ^{ABTMc}
Nr. ^a	GV Faktor	Geschmacksqualität		Änderungen im Geschmack
II	16	sauer		n.d.
	16	adstringierend		
	1	bitter		
III	64	sauer		n.d.
	2	bitter		
IV	32	adstringierend		n.d.
	16	sauer		
	16	bitter		
V	32	adstringierend		n.d.
	16	sauer		
	16	bitter		
VI	16	sauer		n.d.
	4	bitter		
	2	adstringierend		
	1	süß		
VII	256	süß		erhöhte Süße ^d
	16	sauer		
VIII	16	sauer		erhöhte Sauerkeit ^d
	8	adstringierend		
	2	bitter		
	1	süß		
IX	128	süß		erhöhte Sauerkeit und Adstringenz ^d
	64	adstringierend		
X	16	sauer		länger anhaltende Süße ^d
	8	adstringierend		
	4	bitter		

^a Nummerierung der GAC Fractionen bezieht sich auf **Abbildung 48**. ^b Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) der Fractionen wurde in mineralstoffarmem Wasser (pH 3,0) durchgeführt. ^c Die GAC-Fractionen wurden jeweils in verdünntem Basisrekombinat (1+2) aufgenommen. Die Angaben aller Panelisten wurden ausgewertet und nur diejenigen berücksichtigt, die von mindestens 9 der 12 Panelisten angegeben wurden. Das Basisrekombinat diente dabei als Referenz. n.d. nicht detektiert. ^d p<0,05.

Der höchste GV-Faktor von 256 wurde dabei in Fraktion VII für die Geschmacksqualität Süß ermittelt, gefolgt von einem ebenfalls für die Süße erhaltenen GV-Faktor von 128 in Fraktion IX. Weitere Fraktionen, die einen süßen Geschmack aufwiesen waren VI und VIII, allerdings nur mit einem geringen GV-Faktor von jeweils 1 (**Tabelle 21**). Ein saurer Geschmack wurde mit Ausnahme der Fraktionen I und IX in allen Fraktionen detektiert, wobei dieser mit einem GV-Faktor von 64 am intensivsten in Fraktion III wahrgenommen wurde. Für die übrigen Fraktionen ergab sich für die Geschmacksqualität Sauer jeweils ein moderater GV-Faktor von 16. In sieben der insgesamt neun evaluierten Fraktionen war ein adstringierender Geschmackseindruck vorhanden, der in Fraktion IX am intensivsten war (GV-Faktor 64). Für alle anderen Fraktionen wurden GV-Faktoren zwischen 2 und 32 ermittelt. Ebenfalls wurde in sieben Fraktionen eine bittere Geschmacksqualität detektiert. Dabei lagen die GV-Faktoren mit Werten zwischen 1 – 16 im unteren Bereich. Ein salziger oder umami Geschmack wurde in keiner Fraktion wahrgenommen.

Im zweiten Schritt erfolgte die sensorische Evaluierung der GAC-Fraktionen mittels vergleichender Geschmacksprofilanalyse (vGPA) (*Dunkel et al.*, 2007). Dazu wurden die Fraktionen jeweils in ihrer natürlichen Konzentration im Basisrekombinat des ABTM (bRek^{ABTM}) (siehe Kapitel 2.2.1.4) aufgenommen und das Geschmacksprofil dieser Lösung gegen das Basisrekombinat als Referenz bewertet. Dieses diente der Lokalisierung von geschmacksverstärkenden und geschmacksmodulierenden Verbindungen, die in wässriger Lösung nicht oder kaum detektiert werden können. Die Ergebnisse der vergleichenden Geschmacksprofilanalyse sind ebenfalls in **Tabelle 21** dargestellt. Nur vier der neun analysierten GAC-Fraktionen zeigten einen modulierenden Effekt auf das Geschmacksprofil von bRek^{ABTM}. Dabei führte die Zugabe von Fraktion VIII zu einer intensiveren Sauerkeit und die von Fraktion IX neben erhöhter Sauerkeit zu einer stärkeren Adstringenz. Lediglich die Fraktionen VII und X beeinflussten den süßen Geschmack des Basisrekombinates, wobei Fraktion X interessanterweise in wässriger Lösung keinen süßen Eigengeschmack aufwies. Da die Geschmacksprofilanalyse des Gesamtrekombinates im Vergleich zum ABTM eine längere Wahrnehmung der Süße aufwies (siehe Kapitel 2.2.1.4), konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die süßmodulierenden GAC-Fraktionen VII und X.

2.2.1.5.3 Identifizierung der süßen bzw. süßmodulierenden Sensometaboliten in GAC-Fraktion VII

Die vergleichenden Geschmacksprofilanalysen der GAC-Fraktionen II – X im Basisrekombinat (bRek^{ABTM}) ergaben für die Fraktionen VII und X süßverstärkende bzw. süßmodulierende Effekte, weswegen diese beiden Fraktionen im Folgenden weiter chromatographisch aufgetrennt und analysiert wurden.

Chromatographische Fraktionierung und Analyse von GAC-Fraktion VII

Zunächst wurde GAC-Fraktion VII, die in wässriger Lösung einen süßen Eigengeschmack aufwies und auch die Süßintensität des ABTM Basisrekombinates deutlich steigerte, durch Hydrophile-Liquid-Interaction-Chromatographie (HILIC) an einer semipräparativen Säule weiter fraktioniert. Die Detektion mittels Lichtstredetektor (ELSD) führte zur Unterteilung des Eluates in fünf Fraktionen (**Abbildung 49**), die nach Gefriertrocknung weiter analysiert wurden.

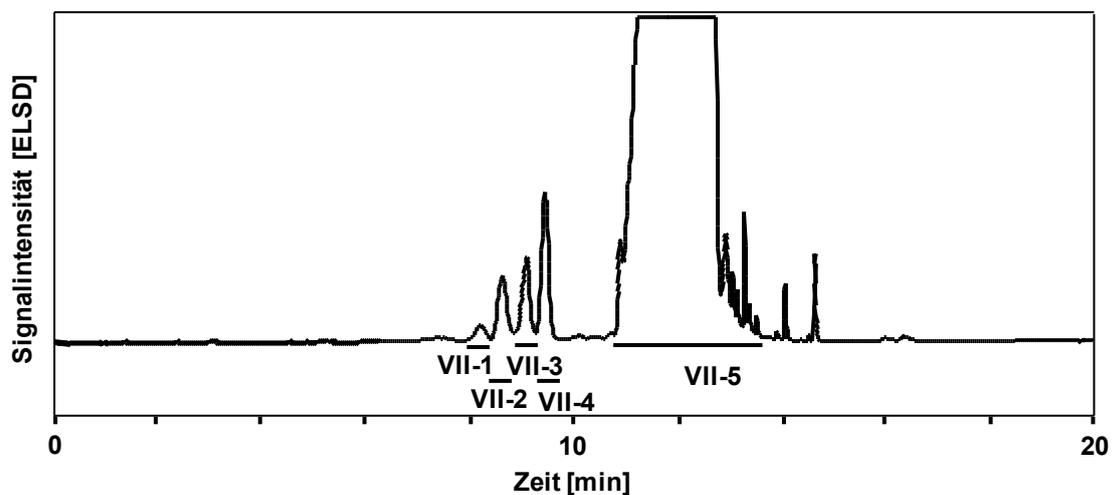


Abbildung 49. HILIC-ELSD-Chromatogramm der GAC-Fraktion VII.

Die ionenchromatographische Untersuchung von Fraktion VII-5 sowie Cochromatographie an einer HILIC-Säule führte zur Identifizierung von D-Glucose und D-Fructose (Daten nicht gezeigt). Die massenspektrometrische Analyse der früher eluierenden Fraktionen VII-1 bis VII-4 im positiven Elektrospray-Ionisationsmodus führte jeweils zur Detektion eines Pseudomoleküls mit m/z 223 Da und des korrespondierenden Ammoniumadduktes mit

m/z 240, was einen Hinweis auf die Anwesenheit von isobaren Verbindungen mit dem gleichen Molekulargewicht von 222 Da gab. Die Masse/Ladungsverhältnisse der isolierten Verbindungen waren um 42 amu höher als die von reiner Glucose und Fructose und wiesen auf die Anwesenheit eines Acetatrestes hin. Zudem zeigten sie im Vergleich zu den Monosacchariden kleinere Retentionszeiten auf einer HILIC-Säule, was zusätzlich auf die Anwesenheit von kürzlich in ABTM und ABM beschriebenen Glucose- und Fructose-Monoacetaten hindeutete (Cirlini *et al.*, 2009).

Synthese und Strukturverifizierung von Referenzsubstanzen

Die Bestätigung dieser Hypothese erfolgte durch synthesegestützte Methoden. Um die entsprechenden Referenzsubstanzen zu erhalten, wurde D-Glucose und D-Fructose jeweils mit Acetanhydrid in THF bei 0 °C umgesetzt. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von Wasser erfolgte die chromatographische Aufreinigung des Syntheseansatzes an einer RP-18-Phase. Die Verifizierung der Strukturen der Syntheseprodukte wurde anhand von Massenspektrometrie, sowie 1- und 2D-NMR-Experimenten erbracht und ist im Folgenden am Beispiel von 6-*O*-Acetyl- α/β -glucopyranose (**30**) dargestellt.

Das ^1H -NMR-Spektrum der aus dem Syntheseansatz von D-Glucose und Acetanhydrid isolierten Verbindung zeigte 20 Resonanzsignale, die eine Intensität von 10 Protonen aufwiesen, was das Vorliegen eines doppelten Spektrensatzes vermuten ließ. Dieses wurde durch die Detektion zweier Dubletts bei 4.54 und 5.10 ppm mit Kopplungskonstanten von 8,0 bzw. 4,0 Hz, die charakteristisch für das β - und α -Glucose-Anomer sind (Hesse *et al.*, 2005), bestätigt. Ein Signal im ^1H -NMR-Spektrum bei 2.03 ppm, das eine Intensität von sechs Protonen aufwies und im HMQC- und HMBC-Spektrum mit ^{13}C -Signalen bei 20.1 und 174.1 ppm koppelte, deutete auf die Verknüpfung jedes Glucose-Anomers mit einem Acetylrestes hin (Daten nicht gezeigt). Dies wurde anhand des HMBC-Spektrums (**Abbildung 50**) verifiziert, das für beide Anomere eine deutliche Kopplung der Methylengruppe an Position C(6) des Glucosekörpers mit dem Carbonylkohlenstoffes C(7) des Acetylrestes zeigte. Somit konnte die aus dem Reaktionsansatz von Glucose und Acetanhydrid isolierte Substanz als das Isomerengemisch 6-*O*-Acetyl- α/β -D-glucopyranose (**30**) (**Abbildung 51**) identifiziert werden.

Für den analog zur Synthese von 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**) durchgeführten und aufgereinigten Reaktionsansatz von D-Fructose und Acetanhydrid ergaben sich aufgrund der höheren Reaktivität der Fructose mehrere Reaktionsprodukte. Anhand von Massenspektrometrie und NMR-Experimenten konnte aus der Vielzahl von entstandenen Verbindungen 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**) (Abbildung 51) als majores Reaktionsprodukt (70 %) isoliert und identifiziert werden (vgl. Spektroskopische Daten, Kapitel 3.5.6.3).

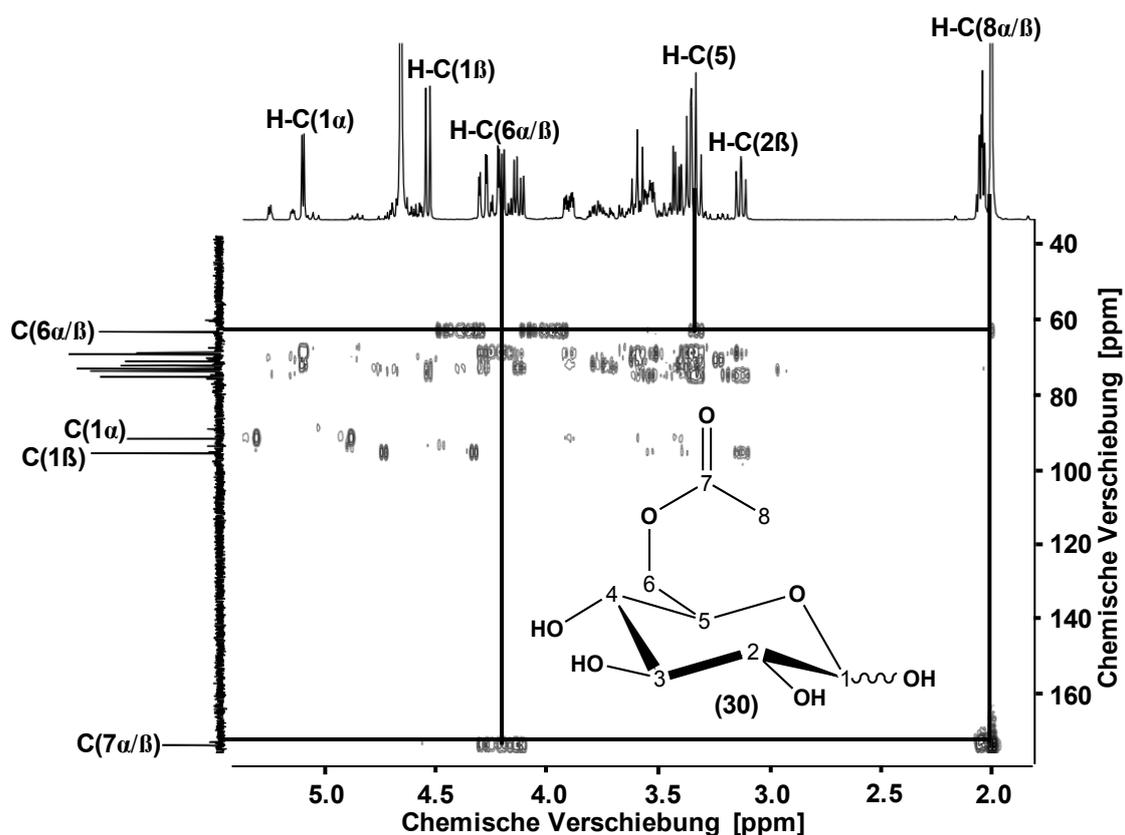


Abbildung 50. HMBC-Spektrum (500 MHz, D₂O) von 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**).

Verifizierung der Verbindungen in den Fraktionen VII-2 bis VII-4

Durch Vergleich von NMR-Daten sowie Cochromatographie an einer HILIC-Phase mit der synthetisch hergestellten Referenz **30** konnte im Folgenden das von *Cirlini et al.* (2006) beschriebene Anomerengemisch 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**) in den Fraktionen VII-3 und VII-4 identifiziert werden. 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**) wurde auf gleichem Weg in Fraktion VII-2 lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

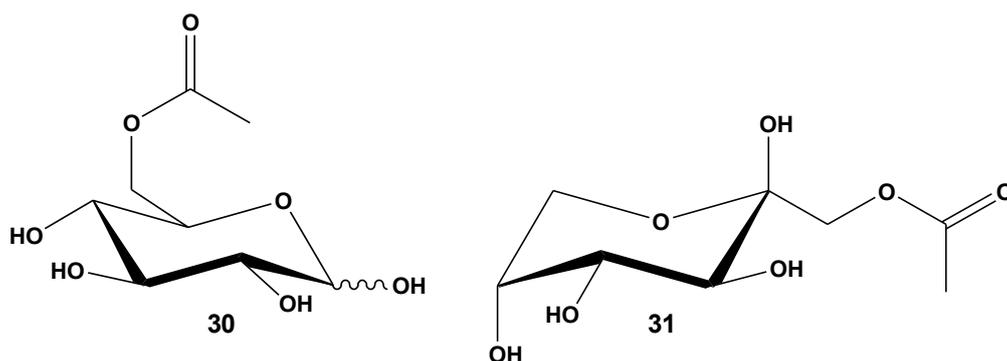


Abbildung 51. Strukturformeln von der Fraktion VII-3 und VII-4 identifizierten 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**) und der in Fraktion VII-II identifizierten 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**).

Sensorische Charakterisierung der identifizierten Verbindungen

Im nächsten Schritt wurden zur sensorischen Charakterisierung von **30** und **31** Geschmacksschwellenwerte mittels Triangeltest in wässriger Lösung aufgenommen. Dabei ergab sich für das Isomerenmisch 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**) ein Wert von 12300 $\mu\text{mol/l}$ für das Hervorrufen eines süßen sowie bitteren Geschmacks. Für 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**) wurde ein Schwellenwert von 16900 $\mu\text{mol/l}$ für einen süßen und von 21200 $\mu\text{mol/l}$ für einen bitteren Geschmackseindruck ermittelt (**Tabelle 22**).

Tabelle 22. Geschmacksschwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$], Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in ABTM und DoT-Faktoren von 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**) und 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**).

Substanz	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$] ^a	Konzentration [$\mu\text{mol/l}$ ($\pm\text{SD}$)] ^b	DoT ^c
6- <i>O</i> -Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (30)	12300 ^{d,e}	8329 ($\pm 40,0$)	0,7
1- <i>O</i> -Acetyl- β -D-fructopyranose (31)	16900 ^d	13823 ($\pm 102,8$)	0,8
	21200 ^e		0,7

^a Geschmacksschwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] wurden in Sensorik-Wasser bei pH 3,0 ermittelt. ^b Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in ABTM; SD = Standardabweichung ($n = 3$). ^c Dose-over-Threshold (DoT)-Faktor: Quotient aus Konzentration und Geschmacksschwellenwert. ^d Schwellenwert für Süße; ^e Schwellenwert für Bitterkeit; Nummerierung der Substanzen bezieht sich auf **Abbildung 51**.

Quantifizierung der identifizierten Verbindungen

Um die ermittelten Geschmacksschwellenwerte der Verbindungen **30** und **31** mit den in ABTM vorliegenden Konzentrationen zu korrelieren sowie die Zucker-Acetate in ihren natürlichen Konzentrationen in einer vergleichenden Geschmacksprofilanalyse evaluieren zu können, erfolgte abschließend die Quantifizierung von 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**) und 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**). Dazu wurde eine LC-MS/MS Methode im MRM-Modus unter Verwendung des synthetisierten internen Standards 6-*O*-Acetyl- α -/ β -[$^{13}\text{C}_6$]-D-glucopyranose (**32**) entwickelt. Um eine adäquate Empfindlichkeit der Methode zu gewährleisten wurden die spezifischen Ionisierungs- und Fragmentierungsparameter der Analyten **30** und **31** und des internen Standards (**32**) softwaregestützt optimiert. Die jeweils optimalen Parameter sind in Kapitel 3.5.3.2.4 (**Tabelle 41**) zusammengefasst. Die beste chromatographische Trennung der Analyten ergab sich auf einer Amino-Phase bei isokratischer Elution mit Ammoniumacetatpuffer und Ameisensäure in Wasser (89 %) und Acetonitril (11 %) (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sowie die Korrelation mit den intrinsischen Geschmacksschwellenwerten sind in **Tabelle 22** zusammengefasst und zeigen dass beide Verbindungen mit Konzentrationen von 8329 $\mu\text{mol/l}$ (**30**) und 13823 $\mu\text{mol/l}$ (**31**) unterhalb ihrer Schwellenwertkonzentrationen vorlagen. Ein direkter Einfluss auf den süßen Geschmack des ABTM war daher nicht zu erwarten.

Die vergleichende Geschmacksprofilanalyse, bei der **30** und **31** in ihren jeweils natürlichen Konzentrationen dem Basisrekombinat zugegeben wurden, ergab keinen sensorischen Unterschied zur Referenz ($\text{bRek}^{\text{ABTM}}$) (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die identifizierten Zucker-Acetate zwar einen intrinsischen Geschmackseindruck aufwiesen, aber in den vorliegenden Konzentrationen weder direkt noch durch Modulation zur Süße des ABTM beitrugen. Die erhöhte Süße, die die Zugabe von GAC-Fraktion VII zum Basisrekombinat zur Folge hatte (vgl. Kapitel 2.2.1.5.2), war somit auf einen additiven Effekt der großen Mengen an Glucose und Fructose in dieser Fraktion zurückzuführen.

2.2.1.5.4 Identifizierung eines Süßmodulators und sensorische Studien zu 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd

Da die aus GAC-Fraktion VII isolierten und identifizierten 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**) und 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**) keine süßmodulierenden Eigenschaften aufwiesen, wurde im Folgenden GAC-Fraktion X auf süßmodulierende Verbindungen hin analysiert. Die Fraktion zeigte in wässriger Lösung keinen süßen Eigengeschmack, führte in einer Lösung des Basisrekombinates allerdings zu einer länger anhaltenden Wahrnehmung der Süße. Daher wurde diese Fraktion ebenfalls weiter chromatographisch aufgetrennt und untersucht.

Chromatographische Fraktionierung und Analyse von GAC-Fraktion X

Die Fraktionierung von GAC-Fraktion X an einer präparativen RP-18-Phase unter Verwendung eines Wasser/Methanolgradienten führte bei einer Wellenlänge von 280 nm zur Detektion von zwei Peaks (**Abbildung 52**).

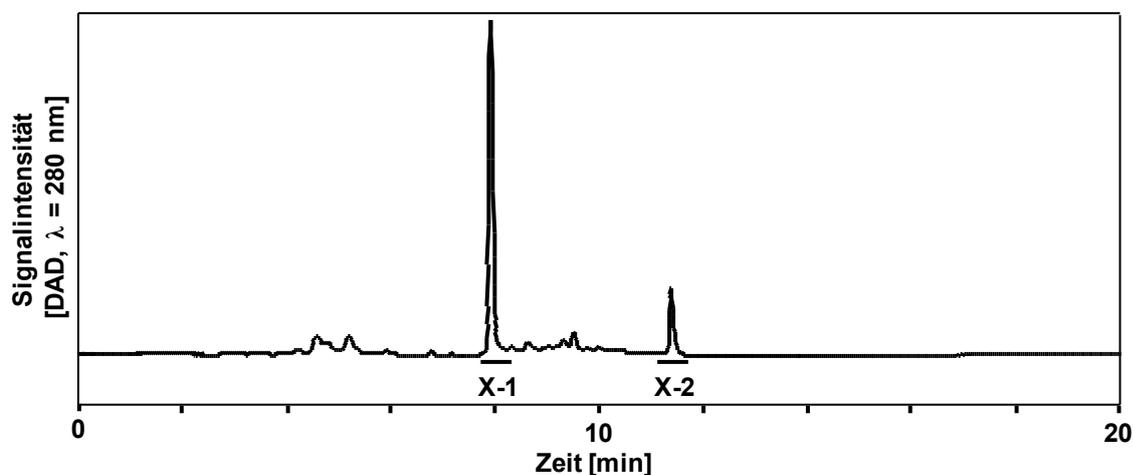


Abbildung 52. RP-HPLC-UV-Chromatogramm von GAC-Fraktion X.

Die massenspektrometrische Analyse von Fraktion X-1 führte im positiven Elektrospray-Ionisations-Modus zu Detektion eines Pseudomolekülions mit m/z 126,9 und Fragmentionen mit m/z 109,0 und 81,0 (Daten nicht gezeigt). Dies deutete auf das Vorliegen des bereits mehrfach in ABTM beschriebenen 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyds (**33**) (Hydroxymethylfurfural) hin (*Theobald et al.*, 1998; *Chinnici et al.*, 2003; *Masino et al.*,

2005) (**Abbildung 53**). Cochromatographie und Vergleich mit NMR-Daten einer kommerziell erhältlichen Referenz bestätigten die Identität des literaturbekannten Maillard-Reaktionsproduktes. Während ein Beitrag der Verbindung zum Aroma postuliert wurde (Ugliano *et al.*, 2003), sind über einen Einfluss auf den Geschmack von ABTM keine Angaben in der Literatur zu finden.

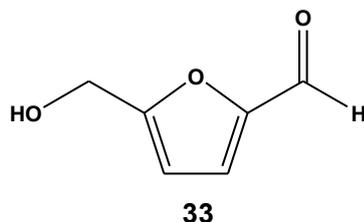


Abbildung 53. Strukturformel von 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33), isoliert aus Fraktion X-1.

Die massenspektrometrische Analyse von Fraktion X-2 ergab im positiven Elektrospray-Ionisations-Modus ein Pseudomolekülion mit m/z 168,9 und wies auf ein Molekulargewicht von 168 Da hin. Die majoren Fragmentationen von m/z 109 und m/z 81 stimmten mit denen der Verbindung aus Fraktion X-1 überein und deutete somit das Vorliegen einer Methylfurfural-Struktur hin. Die im Vergleich zu 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33) um 42 Da höhere Masse des Pseudomolekülions wies auf die Anwesenheit eines Acetylrestes hin (Daten nicht gezeigt).

Die endgültige Verifizierung der Struktur wurde mittels 1D- und 2D-NMR-Experimenten erbracht. Dabei zeigte das ^1H -NMR-Spektrum fünf Resonanzsignale, die eine Intensität von acht Protonen aufwiesen. Das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 2.02 ppm besaß eine Intensität von drei Protonen und zeigte somit die Anwesenheit einer Methylgruppe an. Die Protonen-Signale, die bei chemischen Verschiebungen von 5.17, 6.71, 7.39 und 9.59 ppm detektiert wurden, konnten dem Furan-Körper zugeordnet werden (**Abbildung 54**).

Im ^{13}C -NMR-Spektrum wurde neben dem Signal bei 178.2 ppm, das der Aldehydgruppe des Furankörpers zugeordnet wurde, ein weiteres tieffeldverschobenes Signal bei 170.5 ppm detektiert, das auf einen weiteren Carbonyl-Kohlenstoff deutete. Das in **Abbildung 54** dargestellte HMBC-Spektrum zeigt deutlich die heteronukleare Kopplung der Protonen der Methylgruppe H-C(8) sowie der zum Methylfurfural-Körper gehörigen Methylengruppe H-C(6) mit dem Carbonyl-Kohlenstoff C(7) bei 170.5 ppm und erlaubte somit die

Verifizierung von 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) in Fraktion X-2. Diese Verbindung wurde bereits in Traditionellem Balsamico Essig identifiziert und als Authentizitäts- sowie Alterungsmarker in ABTM vorgeschlagen (*Del Signore, 2001*). Zudem wurde für **34** eine Aromaaktivität mit einer Kräutertee-ähnlichen Note beschrieben (*Ugliano et al., 2003*). Über eine süßmodulierende Wirkung dieser Substanz sind hingegen keine Angaben zu finden.

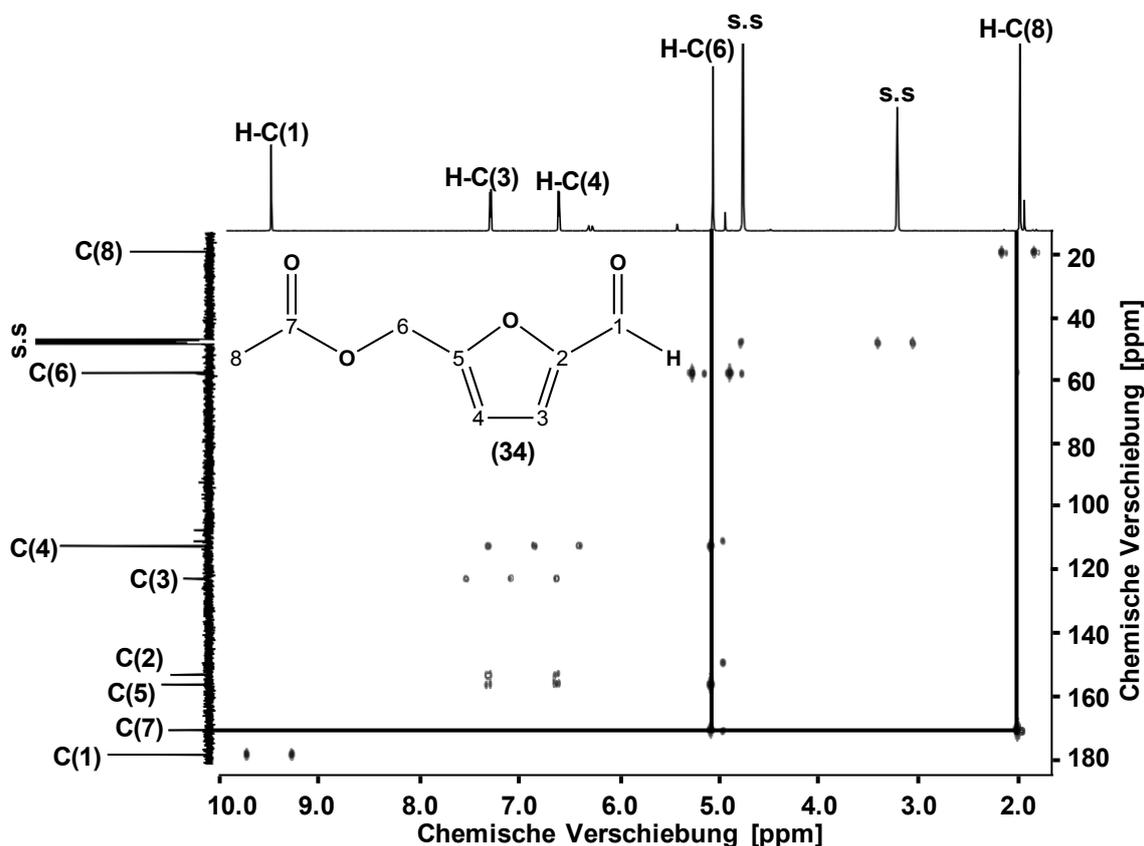


Abbildung 54. HMBC-Spektrum (500 MHz; MeOD) von 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**), isoliert aus GAC-Fraktion X-2; s.s = Lösungsmittelsignal; Spektroskopische Daten der Verbindung sind in Tabelle 51 (Kapitel 6) zusammengefasst.

Sensorische Charakterisierung der isolierten Furanderivate

Zur weiteren Charakterisierung der identifizierten Verbindungen **33** und **34** wurden zunächst intrinsische Geschmacksschwellenwerte aufgenommen. Eine bessere Löslichkeit der Analyten wurde durch Versetzen des Sensorikwassers (pH 3,0) mit 1 % Ethanol erreicht. Die Schwellenwertbestimmung zeigte, dass 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) ab einer Konzentration von 10000 $\mu\text{mol/l}$ einen unspezifischen, adstringierenden Geschmackseindruck

hervorrief, während 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) auch in der höchsten, noch löslichen Konzentration (2000 $\mu\text{mol/l}$) sensorisch nicht vom Blindwert zu unterscheiden war (**Tabelle 23**).

Tabelle 23. Gehalte [$\mu\text{mol/l}$] an 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33**) und 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) in ABTM.**

Substanz	Schwellenwert	Gehalt	DoT ^c
	[$\mu\text{mol/l}$] ^a	[$\mu\text{mol/l}$ ($\pm\text{SD}$)] ^b	
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33)	10000 ^d	29419 ($\pm 518,9$)	2,9
5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (34)	n.d.	314,7 ($\pm 9,1$)	n.b.

^a Geschmacksschwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] wurden in Sensorik-Wasser (1% Ethanol) bei pH 3,0 ermittelt

^b Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in ABTM; SD = Standardabweichung ($n = 3$); ^c Dose-over-Threshold (DoT)-Faktor: Quotient aus Konzentration und Geschmacksschwellenwert; ^d Schwellenwert für unspezifischen, adstringierenden Geschmackseindruck; n.d. nicht detektierbar; n.b. nicht bestimmt; Nummerierung der Substanzen bezieht sich auf **Abbildung 53** und **Abbildung 54**.

Quantifizierung der isolierten Furanderivate in ABTM

Die nachfolgende Quantifizierung der beiden Verbindungen erfolgte mittels LC-MS/MS im MRM-Modus unter Trennung an einer PFP-Phase. Als isotopenmarkierter interner Standard wurde 5- $^{13}\text{C}_2$ -Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**35**) synthetisiert und verwendet (vgl. Kapitel 3.5.6.3.1). Die resultierenden LC-MS-Chromatogramme der beiden Analyten sowie des internen Standards sind in **Abbildung 55** dargestellt.

Die in ABTM gefundenen Gehalte an **33** betragen 29419 $\mu\text{mol/l}$ und an **34** 314,7 $\mu\text{mol/l}$ (**Tabelle 23**). Für **33** konnte aufgrund des resultierenden DoT-Faktors ein Beitrag zum adstringierenden Geschmack des Essigs angenommen werden.

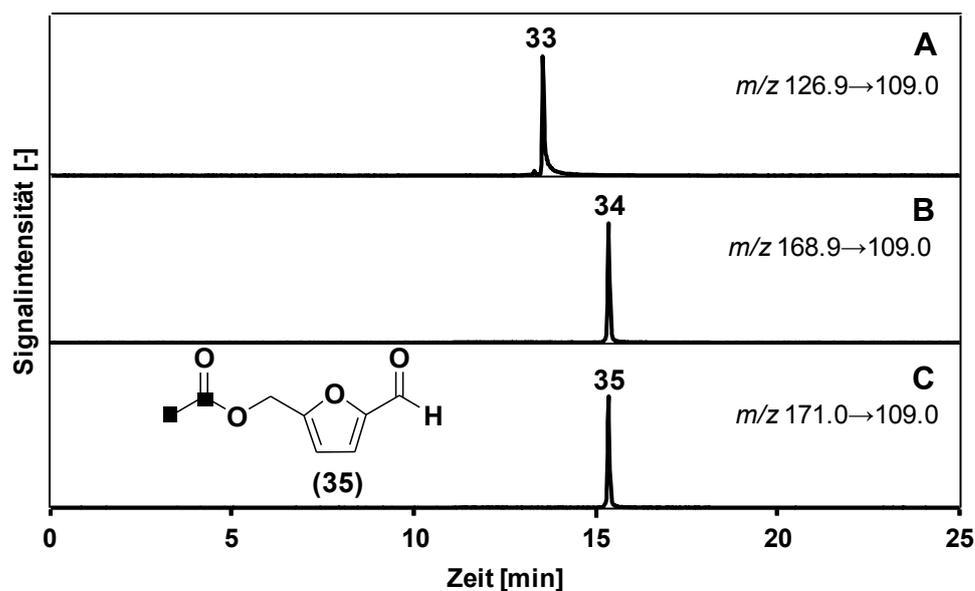


Abbildung 55. LC-MS/MS-Chromatogramme: Extrahierte Massenspuren (ESI^+) von (A) 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**), (B) 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**34**) und (C) 5- $^{13}\text{C}_2$ -Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**35**). Nummerierung der Substanzen bezieht sich auf Abbildung 53 und Abbildung 54; \blacksquare = ^{13}C -Kohlenstoff-Atom.

Die Evaluierung einer möglichen süßmodulierenden Wirkung der Verbindungen **33** und **34** erfolgte wiederum mittels vergleichender Geschmacksprofilanalyse im Basisrekombinat ($\text{bRek}^{\text{ABTM}}$). Dabei zeigte das Basisrekombinat, dem die natürliche Konzentration an 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**34**) zugegeben wurde ($\text{bRek}^{\text{ABTM}+34}$), im Gegensatz zum reinen Basisrekombinat, die auch im authentischen ABTM beschriebene, länger wahrnehmbare Süße. Die Süßintensität von $\text{bRek}^{\text{ABTM}+34}$ änderte sich dabei nicht signifikant. Die Zugabe von 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) hatte hingegen keinen Einfluss auf die Länge des Süßgeschmacks von $\text{bRek}^{\text{ABTM}}$ (Tabelle 24). Die Ergebnisse der durchgeführten analytischen und sensorischen Experimente legten erstmals 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**34**) als eine natürliche, süßmodulierende Verbindung offen.

Tabelle 24. Geschmacksprofile des ABTM, des Basisrekombinates (bRek^{ABTM}), des Basisrekombinates mit natürlicher Konzentration an 33 (bRek^{ABTM+33}) und des Basisrekombinates mit natürlicher Konzentration an 34 (bRek^{ABTM+34}).

Geschmacksqualität	Intensitäten (\pm SD) der einzelnen Geschmacksqualitäten in			
	ABTM	bRek ^{ABTM}	bRek ^{ABTM+33}	bRek ^{ABTM+34}
süß	2,3	2,4 (\pm 0,3)	2,4 (\pm 0,3)	2,4 (\pm 0,1)*
sauer	3,6	3,5 (\pm 0,4)	3,5 (\pm 0,3)	3,5 (\pm 0,2)
adstringierend	2,2	2,2 (\pm 0,2)	2,3 (\pm 0,1)	2,3 (\pm 0,1)
mundfülle	1,7	1,6 (\pm 0,1)	1,5 (\pm 0,2)	1,7 (\pm 0,1)
bitter	0,6	0,5 (\pm 0,0)	0,5 (\pm 0,0)	0,5 (\pm 0,0)
umami	0,2	0,2 (\pm 0,0)	0,2 (\pm 0,0)	0,2 (\pm 0,0)
salzig	0,2	0,2 (\pm 0,0)	0,2 (\pm 0,0)	0,2 (\pm 0,0)

* längere Wahrnehmung der Süße. Die Reinsubstanzen **33** und **34** wurden jeweils in verdünntem Basisrekombinat (1+2) aufgenommen. Die Angaben aller Panelisten wurden ausgewertet und nur diejenigen berücksichtigt, die von mindestens 9 der 12 Panelisten angegeben wurden. Das Basisrekombinat diente dabei als Referenz; Nummerierung der Substanzen bezieht sich auf **Abbildung 53** und **Abbildung 54**.

Im Folgenden durchgeführte 3-Alternative Forced Choice (3-AFC)-Tests in einer vereinfachten Matrix aus 4 % Saccharose/1 % Ethanol (pH 3,0) untermauerten die zuvor erhaltenen Resultate der vergleichenden Geschmacksprofilanalysen. Während **33** in keiner der eingesetzten Konzentrationen (1000 – 10000 μ mol/l) den Süßgeschmack der Matrixlösung beeinflusste, rief **34** ab einer Konzentration von 1000 μ mol/l eine verlängerte Wahrnehmung des Süßgeschmacks sowie eine Veränderung der Qualität hin zu einer süßstoffähnlichen Süße hervor (**Tabelle 25**).

Interessanterweise war die in vereinfachter Matrix zu Süßmodulation notwendige Konzentration an **34** um den Faktor drei höher, als der in ABTM-Matrix ausreichende Gehalt. Als Ursache für diese Diskrepanz kann die höhere Komplexität der ABTM-Matrix angenommen werden. Diese wies zum einen deutlich höhere Konzentrationen an Agonisten, die mit dem Süßmodulator interagieren könnten, auf und besitzt zum anderen einen bereits sehr intensiven Süßgeschmack, der eine Detektion von Änderungen der Geschmacksqualität erschwerte. Die Relevanz der vorliegenden Matrix für die Wahrnehmung einer Geschmacksmodulation wurde bereits für die Kokumi-modulierenden γ -Glutamylpeptide gezeigt. So lag beispielsweise der Kokumi-Schwellenwert des potenten Peptids γ -Glu-Leu (**16**) in einer Modell-Hühnerbrühe bei 800 μ mol/l (*Dunkel et al.*, 2007), während er in komplexerer Gouda-Matrix nur noch 5 μ mol/l betrug (*Toelstede und Hofmann*, 2009).

Tabelle 25. Einfluss von 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33) und 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (34) auf die Süßqualität einer 4 % Saccharoselösung (pH 3.0, 1 % EtOH).

Konzentration [µmol/l]	Unterschied im Süßgeschmack in 4 % Saccharose ^a
	5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33)
1000	n.d.
5000	n.d.
10000	n.d.
	5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (34)
200	n.d.
1000	länger anhaltend, süßstoffartig*
1500	länger anhaltend, süßstoffartig**
2000	länger anhaltend, süßstoffartig*

^a Bestimmung des Einflusses auf den Süßgeschmack wurde mittels 3-AFC-Test gegen 4 % Saccharose (pH 3.0; 1 % EtOH) durchgeführt; ** α -level: 0,05; * α -level: 0,1; n.d. nicht detektierbar.

Um die Verlängerung des Süßgeschmacks durch 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (34) nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ erfassen und beurteilen zu können, wurden im Folgenden sensorische Time-Intensity Experimente durchgeführt.

Sensorische Time-Intensity-Experimente mit 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd

Die Durchführung von 3-AFC-Tests mit 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (34) in einer wässrigen Lösung von 4 % Saccharose und 1 % Ethanol resultierte in einer länger wahrnehmbaren Süße, während die Süßintensität nicht signifikant beeinflusst wurde. Dieses Resultat untermauerte die Ergebnisse der zuvor durchgeführten vergleichenden Geschmacksprofilanalyse in ABTM-Matrix, die ebenfalls eine Süßmodulation durch 34 offenlegte. Triangeltests wie der 3AFC-Test sind allerdings nicht das geeignete Verfahren, um die Verlängerung des Süßgeschmacks ausreichend zu evaluieren (*Cliff und Heymann, 1993*). Im Gegensatz dazu erlauben die 1979 eingeführten Time-Intensity-Experimente (TI) die Erfassung sowohl des zeitlichen Verlaufes als auch der Intensität eines sensorischen Eindrucks (*Larson-Powers und Pangborn*). Aus den erhaltenen TI-Kurven können neben den Basisinformationen (maximale Intensität, Gesamtdauer der Wahrnehmung, Gesamtfläche unter der Kurve) auch weitere Parameter extrahiert und verglichen werden. Darunter sind z.B.

die Onset-Zeit (Dauer vom Beginn der Wahrnehmung bis zum Erreichen der maximalen Intensität), die Fläche unter ansteigendem und abfallendem Teil der Kurve oder die Dauer der maximalen Intensität (*Cliff und Heymann, 1993*). **Tabelle 26** gibt eine Übersicht über die am häufigsten evaluierten Parameter, die anhand einer Beispielkurve in **Abbildung 56** veranschaulicht sind.

Durch Extraktion der verschiedenen Parameter können detaillierte Informationen über das Time-Intensity-Profil eines Geschmacksstoffes erhalten und mit denen anderer Verbindungen verglichen werden. Vor allem für die sensorische Bewertung von süß-schmeckenden Substanzen hat sich die Anwendung von TI-Experimenten als sinnvoll herausgestellt. So ergaben sich beispielsweise für die nichtkalorischen Süßstoffe Aspartam, Acesulfam K und Neotam TI-Profile, die sich deutlich von dem der Saccharose unterschieden. Dabei wurde die Süße von Aspartam und Neotam als deutlich länger anhaltend und die anfängliche Intensitätszunahme von Acesulfam K als schneller ansteigend gegenüber der von Saccharose evaluiert (*Ott et al., 1991; Schiffman und Gatlin, 1993; Schiffman et al., 2007; Cjmelova et al., 2009*).

Tabelle 26. Häufig aus TI-Kurven extrahierte Parameter und deren Abkürzungen, in Anlehnung an *Cliff und Heymann (1993)*.

Parameter	Abkürzung
maximale Intensität	I_{\max}
90 % der maximalen Intensität	$I_{90\%}$
5 % der maximalen Intensität	$I_{5\%}$
Gesamtfläche unter der Kurve	$Area_{\text{Total}}$
Fläche unter ansteigendem Teil der Kurve	$Area_{\text{Inc}}$
Fläche unter Plateau der Kurve	$Area_{\text{Plat}}$
Fläche unter abfallendem Teil der Kurve	$Area_{\text{Dec}}$
Gesamtdauer der sensorischen Wahrnehmung	T_{Total}
Dauer der Wahrnehmung vom Anfang bis zum Plateau	T_{Inc}
Dauer der Wahrnehmung unter dem Plateau	T_{Plateau}
Dauer der Wahrnehmung nach dem Plateau bis zum Ende	T_{Dec}

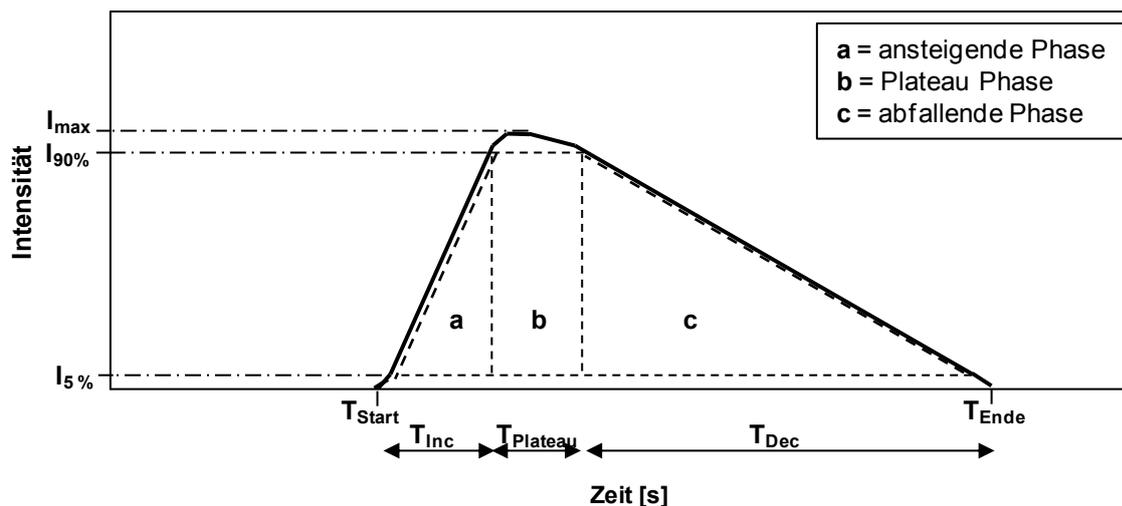


Abbildung 56. Beispiel einer TI-Kurve und daraus extrahierte Parameter, in Anlehnung an *Lallemand et al.* (1999).

Um die süßmodulierenden Eigenschaften von 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) genauer charakterisieren zu können, erfolgte zunächst die Etablierung einer computergestützten TI-Methode mittels der FIZZ-Sensorik-Software. Die Schulung des Panels in Hinsicht auf den Umgang mit der Software und die Wahrnehmung von Unterschieden im TI-Profil wurde mit Lösungen von Saccharose (4 %) und Saccharose (4 %) mit Zusatz von Natrium-Saccharin (5 oder 10 mg/l) durchgeführt.

Für die Evaluation des TI-Profiles von **34** wurden im Folgenden Lösungen von Saccharose (4 %)/Ethanol (1 %) (= Referenz) und Saccharose (4 %)/Ethanol (1 %) mit Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an **34** (= Probe) verwendet. Die untersuchten Gehalte an **34** betragen dabei 200, 1000, 1500, 2000 oder 2500 $\mu\text{mol/l}$. Jeder Panelist erhielt jeweils ein definiertes Volumen (10 ml) der Referenz und der Probenlösung. Diese waren je durch einen Zahlencode verschlüsselt und wurden in zufälliger, durch die Software vorgegebener Reihenfolge verkostet. Nach Aufnahme des gesamten Probenvolumens begann die Bewertung der wahrgenommenen Süßintensität durch Berührung und Abfahren einer vertikalen Skala (0 – 10) mit dem Finger auf dem Bildschirm. Sobald der Panelist auf den Nullpunkt der Skala zurückgekehrt war, galt die Bewertung als beendet. Nach einer Pause von 30 Sekunden wurde die zweite Lösung in gleicher Weise verkostet und bewertet. Jede Konzentration von **34** wurde in zwei Sensoriken an verschiedenen Tagen evaluiert. Die Auswertung mittels FIZZ-Software zeigte, dass ab einer Konzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) Unterschiede in den resultierenden Mittelwertkurven von Referenz und Probe detektiert

werden konnten (**Abbildung 57**). Dies gab einen ersten Hinweis auf die süßmodulierenden Eigenschaften der Verbindung.

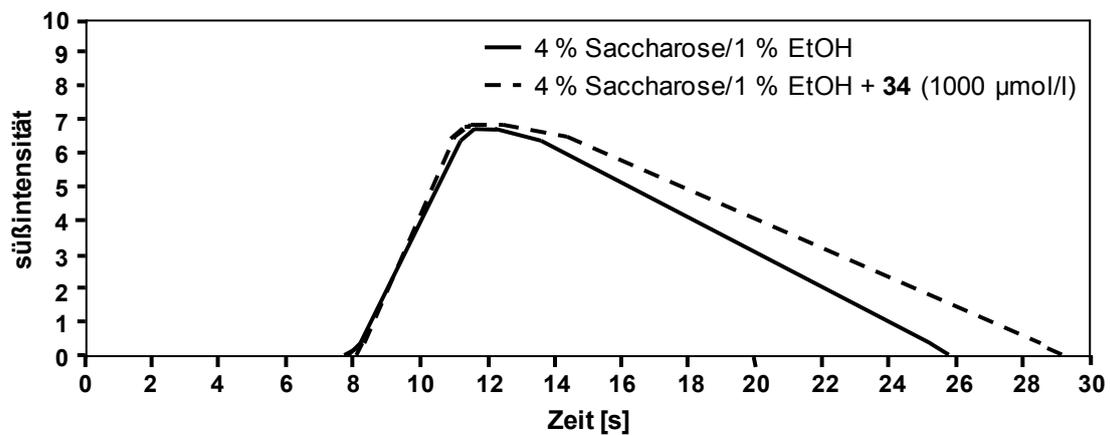


Abbildung 57. Resultierende TI-Kurven (Mittelwerte aller Panelisten) von Referenzlösung gegen Probenlösung (Konzentration (34) = 1000 µmol/l).

Allerdings ergeben sich häufig starke, individuelle, aber für einzelne Panelisten reproduzierbare Unterschiede im Kurvenverlauf, die als „Signatur“ eines Panelisten bezeichnet wird (*Van Buuren, 1992*). Diese führen dazu, dass allein aufgrund von kalkulierten Mittelwerten und Standardabweichungen für einzelne Parameter keine Aussagen über die Signifikanz von Unterschieden im TI-Verhalten getroffen werden können. Daher ist eine statistische Auswertung von extrahierten Parametern durch z.B. Varianzanalyse (ANOVA) oder Prinzipielle Komponentenanalyse (PCA) notwendig. Desweiteren konnten in der Vergangenheit wiederholt Unregelmäßigkeiten („Artefakte“) für einzelne TI-Kurven, wie z.B. ein plötzliches, kurzes Hochschnellen der Intensität, beobachtet werden. Die Gründe für solche Artefakte sind zumeist unbeabsichtigte Probleme bei der für die Bewertung notwendigen Bedienung einer Maus oder eines Touchscreens und repräsentieren nicht den in dem Augenblick vom Panelisten wahrgenommenen Geschmackseindruck (*Lawless und Heymann, 2010*). Um einen verfälschenden Einfluss von Artefakten auf die erhaltenen Daten zu vermeiden, führten *Lallemant et al. (1999)* die sogenannte Trapezmethode zur Auswertung von TI-Kurven ein. Bei dieser geometrischen Annäherung wird für jede TI-Kurve aus den vier Datenpunkten, die sich aus dem Zeitpunkten bei 5 % und 90 % der maximalen Intensität ergeben, ein Trapez konstruiert, anhand dessen alle weiteren Parameter elegant kalkuliert werden können (vgl. **Abbildung 56**). Die Reduzierung der für die

Auswertung notwendigen Datenpunkte ist vor allem bei umfangreichen Studien ein weiterer Vorteil.

Da sich die o.g. Phänomene auch bei den vorliegenden Untersuchungen detektieren ließen (Daten nicht gezeigt), wurden zur adäquaten Auswertung des TI-Verhaltens von 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) mittels FIZZ die Datenpunkte (Zeit [s] und Intensität) aus allen individuellen TI-Kurven extrahiert, die sich bei 5 % und 90 % der jeweiligen maximalen Intensität ergaben. Anhand dieser Datenpunkte wurden software-gestützt Trapeze konstruiert, aus denen durch entsprechende Kalkulation die Parameter Gesamtdauer der Wahrnehmung, Dauer der ansteigenden Phase, Dauer der Plateauphase, Dauer der abfallenden Phase, Gesamtfläche unter der Kurve, Fläche unter ansteigender Phase, Fläche unter Plateauphase, und Fläche unter abfallender Phase erhalten wurden (**Abbildung 56**). Zur Verifizierung eines signifikanten Unterschiedes zwischen Referenz- und Probenlösung wurde jeder Datensatz einer zweifaktoriellen ANOVA unterzogen. Die prozentualen Anstiege der einzelnen Parameter für alle Probenlösungen im Vergleich zur Referenz (= 100 %) sowie das jeweils erhaltene Signifikanzniveau sind in **Abbildung 58** dargestellt.

Die jeweils für die Probenlösungen erhaltenen maximalen Intensitäten zeigten mit zunehmender Konzentration von **34** einen leichten, aber signifikanten, Anstieg im Vergleich zur Referenz. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Sensoriken war lediglich für die Probenlösung, die 200 $\mu\text{mol/l}$ von **34** enthielt, kein Unterschied zur Referenz zu erkennen. Der größte Unterschied in der maximalen Intensität ergab sich durch den Zusatz von 2500 $\mu\text{mol/l}$ 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (20,3 %).

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich beim Vergleich der Gesamtflächen unter den Kurven. Für die Probenlösung mit 200 $\mu\text{mol/l}$ **34** war erneut kein Unterschied detektierbar, während für die anderen Probenlösungen ein sukzessiver Anstieg der Gesamtflächen von 46,9 % (1000 $\mu\text{mol/l}$) bis 79,8 % (2500 $\mu\text{mol/l}$) beobachtet wurde. Als logische Konsequenz aus dieser deutlichen Zunahme der Fläche, bei gleichzeitiger nur leicht ansteigender Intensität, stieg vor allem die Gesamtdauer der Wahrnehmung mit höherer Konzentration an 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) an. Die größte Zunahme der Wahrnehmungslänge wurde dabei mit 34,8 % Steigerung für die Probenlösung mit 1500 $\mu\text{mol/l}$ an **34** erhalten, was einer Verlängerung der Wahrnehmung um 5,5 Sekunden entsprach (vgl. Kapitel 6, **Tabelle 53**). Bei den höheren Konzentrationen von 2000 und 2500 $\mu\text{mol/l}$ nahm die Dauer der Wahrnehmung im Vergleich zu 1500 $\mu\text{mol/l}$ in geringem Umfang wieder ab. Diese Resultate zeigten deutlich

die Verlängerung der Süßwahrnehmung durch den Zusatz von 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**), wobei der Effekt bei 1500 $\mu\text{mol/l}$ ein Maximum durchlief.

Die individuelle Evaluierung der Flächen unter den Kurven sowie der Wahrnehmungsdauer in ansteigender Phase, Plateau-Phase und abfallender Phase belegten zusätzlich die Konzentrierung des modulierenden Effekts auf den hinteren Teil der Kurve (**Abbildung 58**). Für die Probenlösungen zeigten sowohl Fläche als auch Dauer der ansteigenden Phase (bis 90 % der maximalen Intensität) kein eindeutiges Verhalten im Vergleich zur Referenz, was im Kontrast zur Auswertung von Gesamtfläche und Dauer stand. Zwar waren für alle Probenlösungen leichte Zunahmen in den Flächen unter dem ansteigenden Kurventeil zu beobachten, diese zeigten jedoch keinen eindeutigen Trend. Für die Dauer der ansteigenden Phase indizierten die Proben mit 200, 1000, 1500 und 2000 $\mu\text{mol/l}$ an **34** durch Zunahmen um bis zu 20 % ein leicht verzögertes Erreichen der $I_{90\%}$, während die Anwesenheit von 2500 $\mu\text{mol/l}$ **34** zu einer marginal verkürzten Anfangsphase führte. Im Gegensatz dazu gaben die Flächen unter der Plateau- und abfallenden Phase sowie die Wahrnehmungsdauer dieser Kurvenabschnitte den Gesamteindruck adäquat wider. Die Flächen nahmen mit steigender Konzentration an 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) kontinuierlich zu, während die Wahrnehmungsdauer der Plateau- und abfallenden Phase die gleichen relativen Zunahmen wie die Gesamtwahrnehmungslänge zeigten. Auch hier durchlief der Effekt bei 1500 $\mu\text{mol/l}$ **34** ein Maximum (**Abbildung 58**).

Die dargestellten Ergebnisse belegten eindeutig den süßmodulierenden Effekt von 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**), der sich vor allem in einer Verlängerung der Wahrnehmung und nur bei höheren Konzentrationen in einer leichten Zunahme der Süßintensität auszeichnete. Um den Grund für den süßmodulierenden Effekt auf molekularer Ebene zu evaluieren, wurden nachfolgend Zelleexperimente zur Aktivierung des humanen Süßrezeptors durchgeführt (Kapitel 2.2.4).

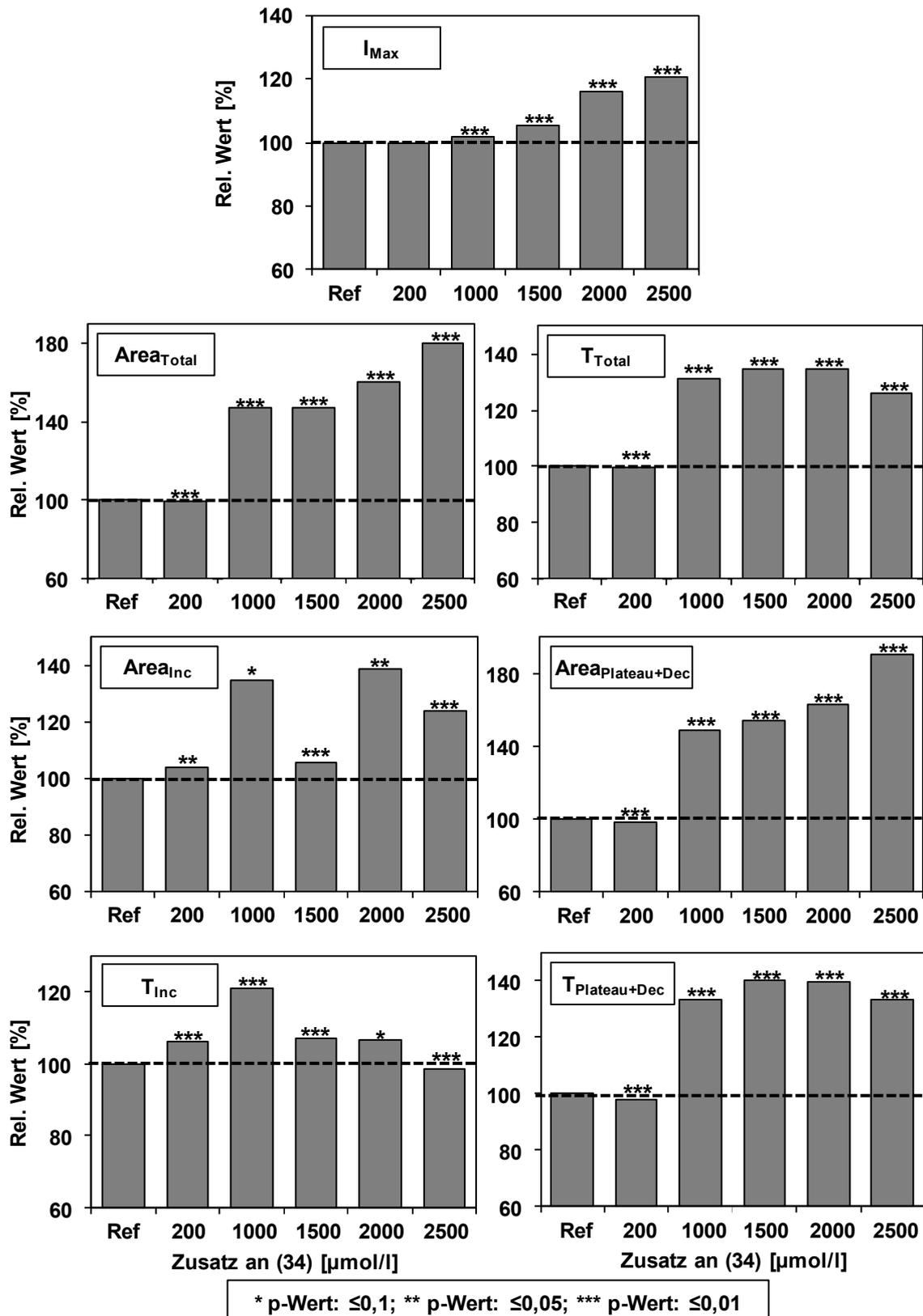


Abbildung 58. Vergleich des prozentualen Anstiegs der einzelnen, extrahierten Parameter für alle Probelösungen von (34) im Vergleich zur Referenzlösung. Die angegebenen Signifikanzniveaus wurden mittels zweifaktorieller ANOVA erhalten. Die Daten auf denen die Abbildung beruht, sind in Tabelle 53 (Kapitel 6) zusammengefasst.

2.2.1.6 Diskussion

Die Geschmacksprofilanalyse von zwölf Jahre gereiftem Traditionellem Balsamico Essig aus Modena (ABTM) zeigte, dass ein fruchtig-runder Sauergeschmack und der Süßgeschmack die intensivsten sensorischen Eindrücke waren. Adstringenz und viskose Mundfülle wurden ebenfalls deutlich wahrgenommen. Die erhaltene Beurteilung entsprach Angaben aus der Literatur, laut derer sich der charakteristische Geschmack von ABTM vor allem durch eine „dichte Textur mit flüssig-sirupöser Konsistenz“ und „eine unnachahmliche Süße und Säure in ausgewogener Balance: [...] intensiv und langanhaltend“ auszeichnet (*Giudici et al.*, 2009). Die im Folgenden durchgeführte Ultrafiltration und sensorische Analyse der daraus resultierenden niedermolekularen (≤ 5 kDa) und hochmolekularen Fraktion (> 5 kDa) zeigte, dass der majore Anteil der geschmacksaktiven Verbindungen des ABTM in der niedermolekularen Fraktion lokalisiert war. Im Gegensatz dazu wies die hochmolekulare Fraktion nur einen adstringierenden sensorischen Eindruck auf, was im Einklang mit Angaben aus der Literatur zur Polymer-Fraktion von Rotwein war (*Hufnagel und Hofmann*, 2008b).

Zur Korrelation der sensorischen Eigenschaften des ABTM mit instrumentell-analytischen Daten erfolgte im nächsten Schritt eine umfassende Analyse von potentiellen, aus der Literatur bereits bekannten Geschmacksstoffen.

Ein zunächst durchgeführtes, gezieltes LC-MS/MS-Screening nach den Ellagttanninen Vescalagin (**27**) und Castalagin (**28**) und dem Dihydroflavonol (+)-Dihydrorobinetin (**29**) erlaubte die erstmalige Detektion dieser aus verschiedenen Holzarten stammenden Verbindungen in ABTM. Erstere rufen einen adstringierenden Geschmackseindruck hervor, stammen aus Eichen- oder Kastanienholz und können durch Lagerung in entsprechenden Fässern in ein Lebens- oder Genussmittel wie z.B. Whiskey übergehen (*Glabasnia und Hofmann*, 2007; *Sanz et al.*, 2010). Für letzteres, das im Rahmen dieser Arbeit erstmals sensorisch charakterisiert und als adstringierend evaluiert wurde, ist Akazienholz als Quelle bekannt (*Cerezo et al.*, 2009; *Sanz et al.*, 2011). Die quantitativen Daten für die Ellagttannine **27** und **28** lagen mit Werten von 38 bzw. 51 $\mu\text{mol/l}$ im gleichen Konzentrationsbereich, der, ebenfalls mittels externer Matrixkalibration, für Rotwein ermittelt wurde (*Stark et al.*, 2010).

Weitere Basisgeschmacksstoffe, die im ABTM quantitativ erfasst wurden waren die Monosaccharide Glucose und Fructose, verschiedene Polyole, organische Säuren und Phenolcarbonsäuren, freie Aminosäuren sowie mineralische Anionen und Kationen. Die

gefundenen Gehalte der verschiedenen Verbindungen lagen dabei jeweils in ähnlichen Konzentrationsbereichen, die schon für andere Traditionelle Balsamico Essige publiziert wurden (z.B. *Plessi et al.*, 1987, 1989, 2006; *Cocchi et al.*, 2002, 2006; *Sanarico et al.*, 2003; *Masino et al.*, 2008).

Die Abschätzung des Geschmacksbeitrages aller 55 quantifizierten Sensometabolite durch Kalkulation von DoT-Faktoren ergab, dass 18 Verbindungen einen DoT-Faktor $> 1,0$ aufwiesen und somit direkt zum Geschmack des ABTM beitrugen. Die höchsten DoT-Faktoren wurden dabei für Fructose (157,0), Weinsäure (107,7) und Glucose (101,0) ermittelt. Auch die Fruchtsäuren Gluconsäure, Glykolsäure und Äpfelsäure indizierten aufgrund ihrer deutlich über 1,0 liegenden DoT-Faktoren einen unmittelbaren Beitrag zum charakteristischen Sauergeschmack. Weiterhin ergab sich für 13 Verbindungen DoT-Faktoren $> 0,1$ und für 24 von $< 0,1$.

Das anschließend zur Verifizierung der analytischen Daten angefertigte biomimetische Rekombinat des ABTM zeigte ein zum authentischen Essig nahezu identisches Geschmacksprofil, das sich nur in der Länge, nicht aber in der Intensität der Süßwahrnehmung unterschied.

Im nächsten Schritt durchgeführte Omissionsexperimente identifizierten die Monosaccharide Glucose und Fructose und den Zuckeralkohol Glycerin als Schlüsselverbindungen des süßen Geschmacks. Auch ein deutlicher Beitrag der Ellagtannine **27** und **28** zur Adstringenz des ABTM wurde erstmals offengelegt. Ein sensorischer Einfluss von Verbindungen, die ihren Ursprung im Holz der Fassbatterie haben, wurde zwar schon von mehreren Autoren postuliert (*Plessi et al.*, 2006; *Caligiani et al.*, 2007; *Giudici et al.*, 2009), konnte aber im Rahmen dieser Arbeit erstmalig verifiziert werden. Ebenfalls einen Beitrag zur Adstringenz sowie zur Mundfülle leistete die Polymer-Fraktion, die Verbindungen mit einem Molekulargewicht > 5 kDa enthielt. Dieses Ergebnis war im Einklang mit publizierten Daten zur sensorischen Relevanz der Polymer-Fraktion von Rotwein (*Hufnagel und Hofmann*, 2008b). Als hochmolekulare Verbindungen in Traditionellem Balsamico Essig, die im Laufe der Herstellung und Reifezeit entstehen, werden Melanoidine mit Molekulargewichten von bis zu 2000 kDa angenommen (*Falcone und Giudici*, 2008). Diese Biopolymere entstehen als Nebenprodukte der nicht-enzymatischen Bräunung während des Einkochens des Traubenmostes bei der Essigherstellung und nehmen mit steigendem Alter in Konzentration sowie Polymerisierungsgrad zu, weswegen sie als Alterungsmarker vorgeschlagen wurden

(*Falcone und Giudici, 2008*). Über einen Beitrag dieser hochmolekularen Verbindungen zu den sensorischen Eigenschaften von ABTM lagen bisher jedoch keine Informationen vor.

Weiterhin wurde erstmals die Relevanz der mineralischen Anionen und Kationen für den fruchtig-runden Sauergeschmack deutlich. Keinen sensorischen Einfluss hingegen zeigten die weiteren Polyole, die freien Aminosäuren oder die Phenolcarbonsäuren und -aldehyde.

Ein abschliessendes Omissionsexperiment, bei dem nur die 18 Geschmacksstoffe mit einem DoT-Faktor $> 1,0$ sowie die hochmolekulare Fraktion für das Rekombinat eingesetzt wurden, zeigte, dass diese majoren Verbindungen in ihren natürlichen Konzentrationen ausreichen, um den Geschmack des ABTM adäquat zu imitieren. Dieses Resultat ist konträr zu Angaben aus der Literatur für andere Basisrekombinate von z.B. Rotwein (*Hufnagel und Hofmann, 2008b*) oder Goudakäse (*Toelstede und Hofmann, 2009b*), bei denen das Fehlen von minoren Verbindungen zu Verlusten in den sensorischen Eigenschaften führte. Als Grund für das gegensätzliche Verhalten des ABTM-Basisrekombinates waren die sehr hohen Mengen an süß und sauer schmeckenden Verbindungen anzunehmen, durch die das Fehlen von weniger relevanten Substanzen vollständig maskiert wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das Sensometabolom von Traditionellem Balsamico Essig aus Modena umfassend identifiziert und quantitativ erfasst wurde. Dabei wurde deutlich, dass die mengenmäßig dominierenden Verbindungen, Monosaccharide und organische Säuren, auch die größte sensorische Relevanz besitzen. Zudem konnte erstmals der Beitrag von Verbindungen, die durch die traditionelle Holzfasslagerung in den Essig gelangen, verifiziert werden. Die Verbindungen, die für eine verlängerte Süßwahrnehmung des ABTM verantwortlich sind, konnten durch Analyse von Basisgeschmacksstoffen allerdings nicht identifiziert werden. Daher sollte im Folgenden eine sensorisch-orientierte Fraktionierung des Traditionellen Balsamico Essigs die für diesen Effekt verantwortlichen Verbindungen offenlegen.

Die zuvor mittels Ultrafiltration erhaltene Niedermolekulare Fraktion (≤ 5 kDa) wurde durch Gel-Absorptionschromatographie (GAC) an LH-20-Material separiert und das Eluat in zehn Fraktionen unterteilt. Die sensorische Analyse der GAC-Fraktionen erfolgte mittels Geschmacksverdünnungsanalyse (*Frank et al., 2001*) und vergleichender Geschmacksprofilanalyse (*Dunkel et al., 2007*) und führte zur Identifizierung von zwei Fraktionen (GAC-VII und GAC-X), die süßmodulierende Eigenschaften zeigten. Durch weitere flüssigchromatographische Fraktionierung, synthetisch gestützte Methoden sowie

MS- und 1- und 2-D-NMR-Experimente konnten in GAC-Fraktion VII neben Glucose und Fructose die Zuckeracetate 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**) und 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**) und in GAC-Fraktion X 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) sowie dessen acetylierte Form 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**) identifiziert werden. Die Monoacetate **30** und **31** wurden kürzlich in ABTM und ABM beschrieben und als möglicher Marker zur Unterscheidung der beiden Essigsorten vorgeschlagen (*Cirlini et al.*, 2009). Auch die Verbindungen **33** und **34** wurden bereits in ABTM nachgewiesen (*Theobald et al.*, 1998; *Del Signore*, 2001; *Chinnici et al.*, 2003; *Masino et al.*, 2005) und letztere als Authentizitätsmarker angenommen (*Del Signore*, 2001). Gustatorische Eigenschaften wurden bisher für keine der vier Verbindungen in der Literatur beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals erbrachte sensorische Analyse der Zuckeracetate **30** und **31** ergab süße und bittere Geschmacksqualitäten mit Schwellenwerten zwischen 12300 und 21200 $\mu\text{mol/l}$, während für 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) ab einer Konzentration von 10000 $\mu\text{mol/l}$ ein unspezifisch adstringierender Eindruck gefunden wurde. Für **34** hingegen konnte kein intrinsischer Geschmack festgestellt werden. Nach LC-MS/MS-Quantifizierung mittels SIVA wurden die Verbindungen **30**, **31**, **33** und **34** jeweils in ihrer natürlichen Konzentration mittels vergleichender Geschmacksprofilanalyse auf süßmodulierende Eigenschaften hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur der Zusatz von 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**) zu einer verlängerten Süßwahrnehmung des Rekombinates führte, die der des authentischen Essigs entsprach. Weiterführende sensorische Experimente mit **33** und **34** in einer vereinfachten Matrix aus 4 % Saccharose/1 % Ethanol untermauerten das zuvor erhaltene Resultat. Die in vereinfachter Matrixlösung zur Süßmodulation notwendige höhere Konzentration an **34** indizierte weiterhin die Relevanz der ABTM-Matrix für diesen sensorischen Effekt.

Da der süßmodulierende Effekt von **34** vor allem die Länge und nicht die Intensität der Süßwahrnehmung betraf, wurden zur adäquaten Charakterisierung der sensorischen Eigenschaften nachfolgend Time-Intensity-Experimente (TI) durchgeführt. Hierbei ergab die Auswertung der erhaltenen TI-Kurven mittels Trapez-Methode (*Lallemand et al.*, 1999) eine im Vergleich zur Referenz (4 % Saccharose) signifikant längere Süßwahrnehmung für wässrige Lösungen, die 4 % Saccharose und 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**) in Konzentrationen von 1000, 1500 und 2000 $\mu\text{mol/l}$ enthielten. Dieser Effekt, der bei einer Konzentration von 1500 $\mu\text{mol/l}$ an **34** ein Maximum von einer um 5,5 Sekunden verlängerten Süßwahrnehmung durchlief, konnte weiterhin durch detaillierte Auswertung im Plateaubereich und hinteren Bereich der TI-Kurve lokalisiert werden. Anhand dieser

weiterführenden sensorischen Experimente konnte der süßverlängernde Effekt von **34** erstmals sowohl qualitativ als auch quantitativ erfasst werden. Die vorliegenden Ergebnisse legten 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) erstmals als natürlichen, nicht-kalorischen Süßmodulator offen, der aus ABTM isoliert und identifiziert wurde.

Nachdem das Sensometabolom von ABTM umfassend charakterisiert wurde, erfolgte im nächsten Schritt die instrumentell-analytische und sensorische Untersuchung von herkömmlichem Aceto Balsamico aus Modena (ABM), um die Unterschiede zwischen beiden Essigsorten auf molekularer Ebene zu definieren.

2.2.2 Vergleich des Sensometaboloms von Traditionellem Balsamico Essig aus Modena (ABTM) und herkömmlichem Balsamico Essig aus Modena (ABM)

Die gewonnenen Kenntnisse über die im ABTM vorliegenden Geschmacksstoffe sollten im Folgenden genutzt werden, um die sensorischen Unterschiede zwischen Traditionellem und herkömmlichem Balsamico Essig (ABM) auf molekularer Ebene zu klären. Die beiden Essigsorten unterscheiden sich vor allem in den zur Herstellung verwendeten Rohmaterialien sowie der Lagerung. Letztere findet für den ABTM in einer Kaskade aus verschiedenen Holzfässern statt und dauert mindestens zwölf Jahre, wohingegen für den ABM lediglich eine Reifezeit von sechs Wochen vorgeschrieben ist, die zumeist in Stahltanks stattfindet (vgl. Kapitel 1.2).

2.2.2.1 Vergleichende Geschmacksprofilanalyse von ABTM und ABM

Zunächst wurde mit dem vorliegenden ABM eine vergleichende Geschmacksprofilanalyse gegen den ABTM als Referenz durchgeführt. Das resultierende Geschmacksprofil, bei dem wiederum die Qualitäten süß, sauer, bitter, adstringierend, mundfülle, salzig und umami auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet wurden, ist in **Tabelle 27** zusammengefasst.

Tabelle 27. Geschmacksprofil von ABM im Vergleich zum ABTM.

Qualität	Intensitäten (\pm SD) der einzelnen Geschmacksqualitäten in	
	ABTM	ABM
sauer	3,6	4,3 (\pm 0,3)
süß	2,3	1,5 (\pm 0,2)
adstringierend	2,2	2,5 (\pm 0,3)
Mundfülle	1,7	1,0 (\pm 0,3)
bitter	0,6	0,8 (\pm 0,2)
salzig	0,2	0,2 (\pm 0,1)
umami	0,2	0,2 (\pm 0,1)

Geschmacksprofil des ABM wurden gegen den ABTM als Referenz ermittelt, wobei die erhaltenen Werte aller Panelisten gemittelt wurden (\pm SD; n = 12).

Analog dem ABTM war beim ABM der Sauergeschmack mit einer Intensität von 4,3 dominierend, wurde jedoch signifikant intensiver als im ABTM wahrgenommen. Zudem wurde die Sauerqualität des ABM vom Panel als stechend und scharf beschrieben. Mit einem Wert von 1,5 wurde die Süße im ABM deutlich schwächer als im ABTM (2,3) wahrgenommen und auch die Mundfülle (1,0) wurde ebenfalls weniger intensiv bewertet. Der adstringierende Eindruck (2,5) und die Bitterkeit (0,8) hingegen waren intensiver als im ABTM, Salzigkeit und Umamigeschmack wurden gleichfalls kaum detektiert.

Der Vergleich der physikalischen Parameter Dichte und Trockenmasse zeigte deutliche Unterschiede zwischen den beiden Essigproben. Die höhere Mundfülle des ABTM spiegelte sich in dessen größerer Dichte und Trockenmasse wider (**Tabelle 28**). Im Gegensatz dazu war interessanterweise der pH-Wert des ABTM mit einem Wert von 2,60 deutlich geringer als der des ABM (3,24) (**Tabelle 28**), obwohl letzterer als deutlich saurer wahrgenommen wurde.

Tabelle 28. Vergleich der physikalischen Parameter (Dichte, pH-Wert, Trockenmasse) von Traditionellem Balsamico Essig aus Modena (ABTM) und Balsamico Essig aus Modena (ABM).

Parameter	ABTM	ABM
Dichte [g/ml \pm SD] ^a	1,31 \pm 0,01	1,12 \pm 0,01
Trockenmasse [g/100 g \pm SD] ^a	65,03 \pm 0,4	30,62 \pm 0,6
pH-Wert	2,60	3,24

^a(\pm SD; n = 3).

Um die sensorischen Unterschiede zwischen ABTM und ABM auf der molekularen Ebene des Sensometaboloms abbilden zu können, wurde im Weiteren eine umfassende Quantifizierung von Sensometaboliten im ABM durchgeführt.

2.2.2.2 Quantitative Unterschiede im Sensometabolom von ABTM und ABM

Um die zwischen ABTM und ABM detektierten Unterschiede in Sauer Geschmack und Sauerqualität sowie die weiteren Attributen süß, adstringierend und bitter mit quantitativ-analytischen Daten korrelieren zu können, wurden im nächsten Schritt alle Verbindungen, die bereits im ABTM detektiert wurden, ebenfalls im ABM qualitativ und quantitativ erfasst (vgl. Kapitel 2.2.1.2). Die im ABM bestimmten Gehalte aller Sensometaboliten, deren Geschmacksschwellenwerte und DoT-Faktoren sowie das Verhältnis der Konzentrationen von ABTM zu ABM sind in **Tabelle 29** zusammengefasst.

Tabelle 29. Geschmacksschwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$], Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$], DoT-Faktoren aller in ABM quantifizierten Geschmacksstoffe sowie das ABTM/ABM-Verhältnis.

Substanz	Schwellenwert [$\mu\text{mol/l}$] ^a	Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] ^b in		DoT ^c ABM	ABTM/ ABM
		ABTM	ABM		
Gruppe I: süß					
D-Fructose	10200 ^d	1601111	642583	69,1	2,49
D-Glucose	18000 ^d	1818333	704760	35,7	2,58
Glycerin	81100 ^d	134377	55191	0,7	2,43
L-Prolin	25000 ^d	10830	12458	0,5	0,86
Inositol	17700 ^d	5372	1298	0,1	4,13
Sorbitol	33800 ^d	10534	490	<0,1	21,49
Erythritol	36300 ^d	6612	1638	<0,1	4,04
Xylitol	12500 ^d	1766	358	<0,1	4,93
Mannitol	40000	2900	2316	<0,1	1,25
Arabitol	43100	2200	536	<0,1	4,10
Ribitol	45300	1400	456	<0,1	3,07
L-Methionin	5000 ^f	17	54	<0,1	0,31
L-Alanin	12000 ^g	563	1042	<0,1	0,54

L-Serin	25000 ^g	575	4722	<0,1	0,12
Glycin	25000 ^g	268	837	<0,1	0,32
L-Threonin	35000 ^g	19	61	<0,1	0,31
Gruppe II: sauer					
Weinsäure	292 ^d	31450	10466	35,8	3,00
Gluconsäure	900	60302	4342	4,8	13,89
Glykolsäure	600	23946	3325	5,5	7,20
Äpfelsäure	3690 ^d	107315	19366	5,2	5,54
Essigsäure	19900 ^d	371161	649564	32,6	0,57
Citronensäure	2600 ^d	11929	2282	0,9	5,23
Bernsteinsäure	900 ^d	2420	n.d	n.b.	n.b.
Milchsäure	15480 ^d	7302	9786	0,6	0,75
Gruppe III: bitter					
Calcium	6200 ^{h,i}	24578	10101	1,6	2,43
Magnesium	6400 ^{h,i}	20024	8335	1,3	2,40
L-Arginin	75000 ^f	7691	14322	0,8	0,54
L-Leucin	11000 ^f	143	531	<0,1	0,27
L-Tyrosin	4000 ^f	77	281	<0,1	0,27
L-Isoleucin	10000 ^f	193	453	<0,1	0,43
L-Valin	30000 ^h	226	410	<0,1	0,55
L-Phenylalanin	45000 ^f	88	336	<0,1	0,26
L-Histidin	45000 ^f	29	175	<0,1	0,17
Gruppe IV: adstringierend					
Vescalagin (27)	1,1 ^l	38	n.d.	n.b.	n.b.
Castalagin (28)	1,1 ^l	51	n.d.	n.b.	n.b.
(+)-Dihydrorobinetin (29)	23	1,1	n.d.	n.b.	n.b.
<i>trans</i> -Kaffeesäure	72 ^l	29	23	0,3	1,26
Gentisinsäure	122 ^l	38	10	<0,1	3,80
<i>p</i> -Coumarsäure	139 ^l	35	23	0,2	1,52
Gallussäure	292 ^l	32	17	<0,1	1,88
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	665 ^l	17	9,1	<0,1	1,87
Chinasäure	579	15	1,3	<0,1	11,54
Protocatechusäure	206 ^l	10	0,7	<0,1	14,29
Vanillinsäure	315 ^l	20	6,3	<0,1	3,17
Ferulasäure	67 ^l	2,4	1,8	<0,1	1,33

Vanillin	829 ^l	7,2	0,7	<0,1	10,29
Gallussäuremethylester	232 ^l	3,3	1,6	<0,1	2,06
Gallussäureethylester	185 ^l	2,9	46	0,2	0,06
Syringaldehyd	330 ^l	8,7	0,4	<0,1	21,75
Gruppe V: salzig					
Kalium	13000 ^{h,i}	58025	71311	5,5	0,81
Phosphat	5000 ^{g,k}	12230	7366	1,5	1,66
Natrium	3900 ^{h,i}	7608	14667	3,8	0,52
Chlorid	3900 ^{h,k}	6025	3640	0,7	1,66
Gruppe VI: umami					
L-Asparaginsäure	600 ^h	528	1776	3,0	0,30
L-Glutaminsäure	1100 ^h	179	591	0,5	0,30
Gruppe VII: adstringierende Polymere					
HMF (> 5 kDa)	n.b.	8,7 g/l	n.d.	n.b.	n.b.
Gruppe VIII: weitere Verbindungen					
6-O-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose(30)	12300 ^{m, n}	8329	2468	0,2/ 0,2	3,37
1-O-Acetyl- β -D-fructopyranose (31)	21200 ⁿ 16900 ^m	13823	5643	0,2/ 0,3	2,45
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33)	10000 ^o	29419	8681	0,9	3,39
5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd(34)	n.b.	314	76	n.b.	4,13

^a Geschmacksschwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] wurden in Sensorik-Wasser bei pH 3,0 ermittelt oder aus der Literatur übernommen; ^b Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) in ABTM und ABM, RSD jeweils $\leq 10\%$; ^c Dose-over-Threshold (DoT)-Faktor: Quotient aus Konzentration im Essig und Geschmacksschwellenwert; ^d *Scharbert und Hofmann*, 2005; ^e *Wieser et al.*, 1977; ^f *Warendorf*, 1991; ^g *Warmke*, 1997; ^h *Toelstede und Hofmann*, 2008b; ⁱ Schwellenwert für das korrespondierende Chlorid; ^k Schwellenwert für das korrespondierende Natriumsalz; ^l *Glabasnia und Hofmann*, 2006; ^m Schwellenwert für Bitterkeit; ⁿ Schwellenwert für Süße; ^o Schwellenwert für einen unspezifischen, adstringierenden Geschmackseindruck; n.d. nicht detektiert; n.b. nicht bestimmt.

In der Gruppe der süß-schmeckenden Substanzen wurden Glucose und Fructose mit Gehalten von 704760 und 642583 $\mu\text{mol/l}$ als die majoren Verbindungen im ABM gefunden, wiesen jedoch jeweils eine um den Faktor 2,5 geringere Konzentration als im ABTM auf. Einen ähnlichen Trend zeigten die Polyole, die mit Werten zwischen 358 – 55191 $\mu\text{mol/l}$ im ABM ebenfalls in niedrigeren Gehalten als im ABTM detektiert wurden. Im Gegensatz dazu wurden für die süßen Aminosäuren im ABM durchweg höhere Konzentrationen als im ABTM

erhalten. Da ABTM während des Herstellungsprozesses erhitzt wird, ist eine Umsetzung von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern durch die Maillardreaktion als Ursache für diese Unterschiede wahrscheinlich.

Aufgrund der sich aus Schwellenwertkonzentration und Gehalt im ABM ergebenden DoT-Faktoren konnte beim vorliegenden herkömmlichen Essig von einem direkten Beitrag von Glucose (DoT: 69,1) und Fructose (DoT: 35,7) zum süßen Geschmack ausgegangen werden. Dies spiegelte sich in dem im Vergleich zum ABTM weniger süßen Geschmack des ABTM wider.

Unter den acht sauer schmeckenden Substanzen der Gruppe II war Essigsäure im ABM mit einem Gehalt von 649564 $\mu\text{mol/l}$ fast doppelt so konzentriert wie im ABTM. Auch Milchsäure wies eine höhere Konzentration auf. Im Gegensatz dazu wurden die weiteren Säuren in deutlich geringeren Mengen gefunden. Die deutlichste Diskrepanz wies Gluconsäure auf (ABTM/ABM: 13,9), gefolgt von Glykolsäure (ABTM/ABM: 7,2), Äpfelsäure (ABTM/ABM: 5,5) und Citronensäure (ABTM/ABM: 5,2). Weinsäure (10466 $\mu\text{mol/l}$) lag im ABM um den Faktor drei geringer konzentriert vor, Bernsteinsäure konnte im herkömmlichen Essig nicht nachgewiesen werden. Der hohe Gehalt an Essigsäure, der mit einem DoT-Faktor von 32,8 einherging und die gleichzeitig geringen Konzentrationen der verschiedenen Fruchtsäuren korrelierten gut mit der für den ABM wahrgenommenen Säureintensität und -qualität. Zwar lagen Weinsäure (DoT: 35,8), Gluconsäure (DoT: 4,8), Glykolsäure (DoT: 5,5) und Äpfelsäure (DoT: 5,2) jeweils oberhalb ihres Geschmacksschwellenwertes vor, wurden aufgrund der geringeren Konzentrationen aber in ihrem Geschmack von der in großen Mengen anwesenden, stechend-sauren Essigsäure maskiert (**Tabelle 29**).

Bei den bitteren Sensometaboliten der Gruppe III wurde im ABM Calcium mit einem Gehalt von 10101 $\mu\text{mol/l}$ und Magnesium mit 8835 $\mu\text{mol/l}$ detektiert. Damit lagen beide Kationen nur halb so konzentriert wie im ABTM vor, wiesen aufgrund ihrer DoT-Faktoren (1,6 bzw. 1,3) aber auf einen direkten Beitrag zum Geschmack hin. Die quantitativen Daten für die bitteren Aminosäuren waren für den ABM höher als für den ABTM und zeigten somit den gleichen Trend wie die süßen Aminosäuren. Dabei wies L-Arginin (14322 $\mu\text{mol/l}$) die größte Konzentration auf. Die für die Aminosäuren kalkulierten DoT-Faktoren lagen jeweils $< 1,0$ und indizierten somit nur einen möglichen additiven Beitrag zum Bittergeschmack.

ABTM und ABM zeigten deutliche Unterschiede in den Konzentrationen der adstringierenden Verbindungen (Gruppe IV) auf. Die potent adstringierenden Ellagannine Vescalagin (**27**) und Castalagin (**28**) sowie (+)-Dihydrorobinetin (**29**) waren im ABM gänzlich abwesend (vgl. Kapitel 2.2.1.2) und könnten somit als Authentizitätsmarker für den fassgelagerten ABTM herangezogen werden. Die weiteren phenolischen Verbindungen konnten zwar im ABM detektiert werden, im Vergleich zum ABTM allerdings in etwas geringeren Gehalten von 0,4 – 46,0 $\mu\text{mol/l}$. Die daraus resultierenden DoT-Faktoren zeigten jeweils Werte $< 0,1$. Somit konnte die Adstringenz des ABM, die der des ABTM entsprach, nicht mit den quantitativen Daten korreliert werden. Allerdings zeigte ein sensorisches Experiment, in dem eine wässrige Lösung von Essigsäure, die der Konzentration im authentischen ABM entsprach, dass die Verbindung neben der stechend-sauren Qualität auch einen austrocknenden, adstringenz-ähnlichen Effekt hervorrief (Daten nicht gezeigt). Dies machte deutlich, dass die von den Panelisten wahrgenommene Adstringenz des ABM im Gegensatz zum ABTM nicht auf phenolische Verbindungen, sondern möglicherweise auf die hohe Konzentration von Essigsäure zurückzuführen war.

Die Gruppe der salzigen mineralischen Anionen (Gruppe V) zeigte hingegen keinen eindeutigen Unterschied zwischen ABTM und ABM. Kalium (71311 $\mu\text{mol/l}$) und Natrium (14667 $\mu\text{mol/l}$) wurden im ABM in höheren Gehalten gefunden, während die beiden mineralischen Anionen Phosphat (6025 $\mu\text{mol/l}$) und Chlorid (3640 $\mu\text{mol/l}$) im herkömmlichen Essig geringere Konzentration als im ABTM aufwiesen.

Die umami-schmeckenden Aminosäuren L-Asparaginsäure (1776 $\mu\text{mol/l}$) und L-Glutaminsäure (519 $\mu\text{mol/l}$) wurden im ABM jeweils in dreifach höheren Konzentrationen als im ABTM detektiert, was im Einklang mit den quantitativen Daten für die süßen und bitteren Aminosäuren ist. Eine hochmolekulare Fraktion (> 5 kDa) (Gruppe VII) konnte aus dem ABM nicht isoliert werden.

Konsequenterweise wurden auch die aus ABTM isolierten und identifizierten Verbindungen 6-O-Acetyl- α -/ β -D-glucofuranose (**30**), 1-O-Acetyl- β -D-fructofuranose (**31**), 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) und 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**) (vgl. Kapitel 2.2.1.5.3 und 2.2.1.5.4) im ABM quantitativ erfasst. Die unter Gruppe VIII aufgeführten Substanzen zeigten dabei im herkömmlichen Essig jeweils signifikant geringere Konzentrationen (Faktor 2,45 – 4,13) als im ABTM, die zudem unterhalb des jeweiligen

Geschmacksschwellenwertes lagen (**Tabelle 29**). Somit war ein unmittelbarer Einfluss der Verbindungen **30 – 34** auf das Geschmacksprofil des ABM als unwahrscheinlich anzusehen.

Zur Verifizierung der quantitativen Daten und deren Überprüfung auf Vollständigkeit wurde im nächsten Schritt ein biomimetisches Rekombinat des ABM angerfertigt und sensorisch gegen den authentischen Essig evaluiert.

2.2.2.3 Rekombinationsexperiment mit dem Aceto Balsamico di Modena

Die qualitative und quantitative Analyse von Geschmacksstoffen im ABM führte zur Detektion von insgesamt 56 Sensometaboliten. Dabei lagen 13 Verbindungen mit einem DoT-Faktor $> 1,0$ vor und elf mit einem DoT-Faktor $> 0,1$. Der majore Anteil (27 Substanzen) hingegen wies einen DoT-Faktor $< 0,1$ auf. Weiterhin konnten bis auf Bernsteinsäure, Vescalagin (**27**), Castalagin (**28**) und (+)-Dihydrorobinetin (**29**) alle Verbindungen, die zuvor schon im traditionellen ABTM gefunden wurden auch im konventionellen ABM nachgewiesen werden. Um die analytischen Daten auf Vollständigkeit und Richtigkeit zu prüfen, wurde ein Geschmacksrekombinat des ABM (Rek^{ABM}) angefertigt und sensorisch gegen den authentischen ABM als Referenz analysiert. Dazu wurden alle erfassten Verbindungen in ihrer natürlichen Konzentration in Wasser gelöst, der pH-Wert auf den des authentischen Essigs korrigiert und die Lösung mit Wasser um den Faktor drei verdünnt. Anschließend erfolgte eine vergleichende Geschmacksprofilanalyse gegen den ebenso verdünnten ABM als Referenz. Das daraus resultierende Geschmacksprofil des Rek^{ABM} ist in **Abbildung 59** dargestellt, wobei die weitestgehende Übereinstimmung mit dem Geschmacksprofil des ABM deutlich zu sehen ist.

Die deutlich unterschiedlichen sensorischen Profile von Traditionellem (ABTM) und konventionellem (ABM) Balsamico Essigen resultieren vor allem aus den unterschiedlichen Konzentrationen an einzelnen Geschmacksstoffen und den relativen Verhältnissen der Substanzen zueinander. Einzig die geschmacksaktiven Ellagtannine Vescalagin (**27**) und Castalagin (**28**) sowie das Flavonol (+)-Dihydrorobinetin (**29**) zeigten die Fasslagerung von ABTM an und könnten somit als Authentizitätsmarker herangezogen werden.

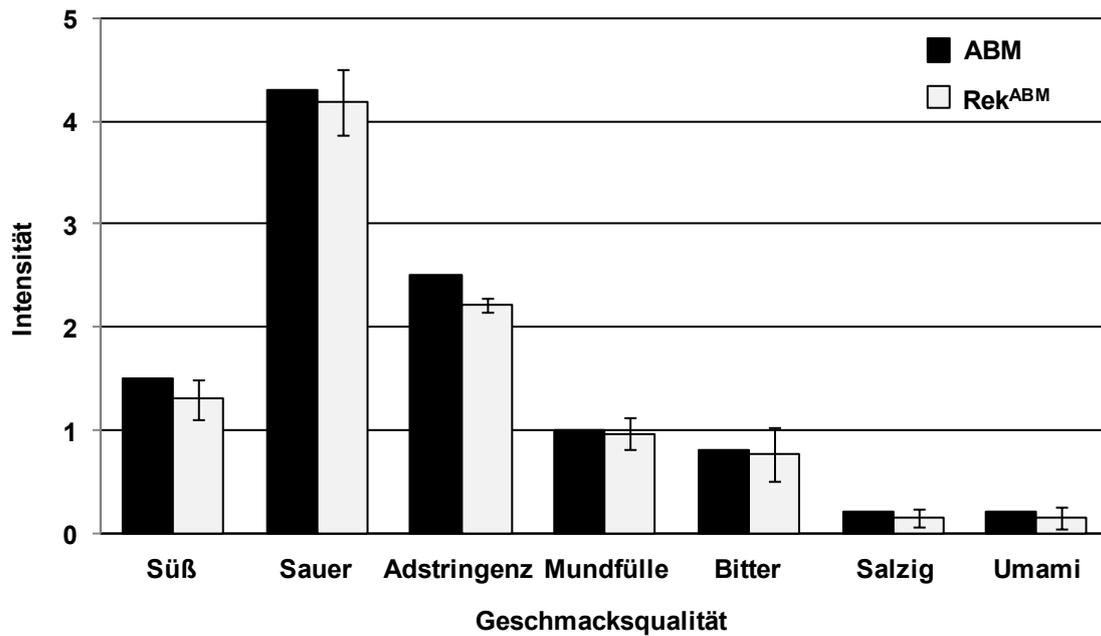


Abbildung 59. Geschmacksprofile von ABM und dessen Rekombinat Rek^{ABM}. Abbildung beruht auf Daten in Tabelle 49 (Kapitel 6)

2.2.2.4 Diskussion

Die Geschmacksprofilanalyse eines herkömmlichen Balsamico Essigs (ABM) gegen den Traditionellen Balsamico Essig aus Modena (ABTM) legte einen stechend sauren Geschmack als dominierende Qualität des ABM offen. Weiterhin wurde der ABM vom Sensorikpanel als deutlich weniger süß und vollmundig wahrgenommen, während die anderen Geschmacksqualitäten adstringierend, bitter, umami und salzig ähnlich intensiv wie für den ABTM bewertet wurden. Dieses Ergebnis entsprach Angaben anderer Autoren über die sensorischen Unterschiede zwischen ABM und ABTM (*Giudici et al.*, 2009).

Die Korrelation der humansensorischen mit den quantitativ-analytischen Daten erlaubte die Klärung der gustatorischen Unterschiede auf molekularer Ebene. So zeigte sich, dass die im Vergleich zum ABTM geringere Mundfülle des ABM auf dessen geringere Trockenmasse und die sich daraus ergebende Dichte zurückzuführen war. Auch der weniger intensive Süßgeschmack spiegelte sich in den jeweils um den Faktor 2,5 niedrigeren Gehalten der Schlüsselverbindungen Glucose, Fructose und Glycerin wider. Weiterhin konnten die unterschiedlichen, charakteristischen Sauerqualitäten des ABM und ABTM mit den

quantitativen Daten für die organischen Säuren korreliert werden. Während der ABM einen doppelt so hohen Gehalt an stechend-saurer Essigsäure aufwies wie der ABTM, waren die Konzentrationen der anderen Fruchtsäuren im herkömmlichen Balsamico Essig deutlich geringer als in der traditionellen Sorte.

Der Grund für die großen Differenzen in den Konzentrationen der Schlüsselgeschmacksstoffe kann in den unterschiedlichen Herstellungsverfahren der beiden Essigsorten gefunden werden. Während der ABTM nur aus Traubenmost hergestellt wird, ist die Grundlage des ABM Weinessig, dem nur etwas Traubenmost zugesetzt wird und daher deutlich weniger Verbindungen enthält, die ihren Ursprung in den Trauben haben (*Giudici et al.*, 2009). Zu diesen Verbindungen zählen unter anderem die süßen Monosaccharide, oder die fruchtig-sauren Weinsäure, Äpfelsäure, Glykolsäure und Citronensäure. Weiterhin entstehen andere Substanzen wie die Gluconsäure oder Bernsteinsäure erst im Laufe der Zeit durch mikrobielle Metabolisierung von Zuckern durch Bakterien und Hefen (Übersicht in *Giudici et al.*, 2009). Da ABM nur einer Essigsäureoxidation unterzogen wird, haben letztere Verbindungen neben dem sensorischen Einfluss auch eine Relevanz als Authentizitätsmarker für ABTM (*Giudici et al.*, 2009).

Der Vergleich der Sensometabolome von ABTM und ABM zeigte außerdem, dass auch Verbindungen, die keinen direkten Einfluss auf den Geschmack haben, zur Unterscheidung der Essige herangezogen werden können. So wurden die freien Aminosäuren im ABM durchweg in höheren Konzentrationen als im ABTM detektiert. Als Grund kann die während des Einkochens des Mostes ablaufende Maillardreaktion angenommen werden, bei der freie Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern reagieren (*Consonni und Gatti*, 2004). Da dieser Schritt in der Herstellung des ABM nicht stattfindet, können folglich mehr freie Aminosäuren gefunden werden. Damit einhergehend ist auch die Konzentration an 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**), das durch die Maillardreaktion entsteht, im ABTM deutlich größer. Auch die signifikant höheren Mengen der acetylierten Verbindungen **30**, **31** und **34** in ABTM besitzen Potential zur Diskriminierung der beiden Essigsorten. Eine eindeutige Unterscheidung von ABM und ABTM wurde jedoch durch die Detektion der aus Holz stammenden Verbindungen Vescalagin (**27**), Castalagin (**28**) und (+)-Dihydrorobinetin (**29**) angezeigt, da diese in ABM aufgrund der fehlenden Fasslagerung gänzlich abwesend waren. Somit können andere, aufwändigere Verfahren zur Überprüfung der Authentizität, die auf Korrelation verschiedener physikalischer und chemischer Parameter beruhen (*Plessi et al.*, 1987, 1989; *Masino et al.*,

2005, 2008; *Cocchi et al.*, 2006) durch den qualitativen, LC-MS/MS-basierten Nachweis dieser spezifischen Inhaltsstoffe vereinfacht werden.

Das abschließend angefertigte Geschmacksrekombinat des ABM stimmte in seinem Profil gut mit dem des authentischen Essigs überein. Dies zeigte, dass die zuvor gewonnenen Kenntnisse über das Sensometabolom von Traditionellem Balsamico Essig ausreichen, um das Sensometabolom von herkömmlichem Balsamico Essig ebenfalls umfassend zu charakterisieren. Damit konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Geschmacksprofile der Essige insbesondere auf quantitative Unterschiede im Sensometabolom zurückzuführen sind.

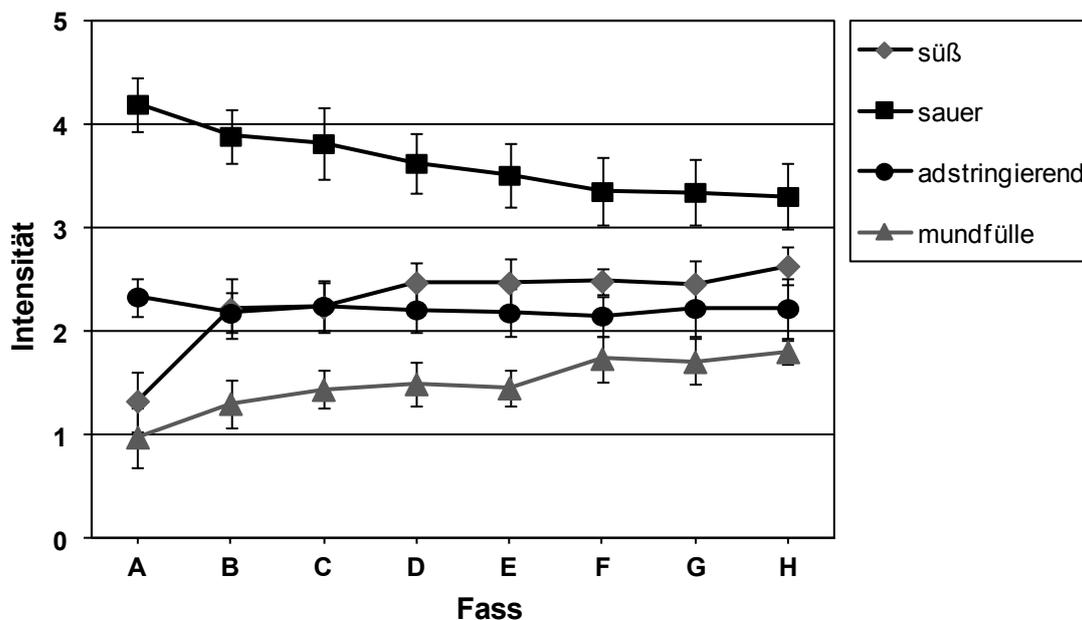
2.2.3 Einfluss der Lagerung auf das Sensometabolom von Traditionellem Balsamico Essig aus Modena

Um genauere Erkenntnisse über die Entwicklung des charakteristischen Geschmacks von ABTM während der mindestens 12-jährigen Lagerung zu gewinnen, wurden Proben einer acht Fässer umfassenden *Batteria* sowohl sensorisch als auch instrumentell-quantitativ analysiert. **Tabelle 30** gibt einen Überblick über Holzart und Volumen der einzelnen Fässer sowie die physikalischen Parameter der jeweils enthaltenen Essig-Intermediate. Die Erfassung der physikalischen Parameter zeigte, dass der pH-Wert mit steigender Lagerungszeit von 2,65 auf 2,49 leicht abnahm, während sich Trockenmasse und Dichte deutlich erhöhten.

Die zunehmende Dichte spiegelte sich direkt in der von Fass A zu Fass H deutlich zunehmenden Mundfülle wider. Weiterhin zeigte die vergleichende Geschmacksprofilanalyse gegen ABTM als Referenz dass die Süße mit steigender Lagerungszeit signifikant zunahm (1,3 → 2,6), während der Sauergeschmack abnahm (4,2 → 3,3) und sich in seiner Qualität von stechend zu fruchtig-rund hin veränderte. Im Gegensatz dazu, veränderte die Adstringenz sich über die gesamte Fasskaskade hinweg nicht (**Abbildung 60**).

Tabelle 30. Holzart und Volumen der einzelnen Fässer A – H sowie physikalische Parameter (pH-Wert, Dichte und Trockenmasse) der Essigzwischenstufen.

Fass Nr.	Holzart	Volumen [l]	pH-Wert	Dichte [g/ml \pm SD] ^a	Trockenmasse [% \pm SD] ^a
A	Akazie	50	2,65	1,17 \pm 0,003	43,91 \pm 0,1
B	Kastanie	40	2,62	1,22 \pm 0,008	55,23 \pm 0,3
C	Kirsche	30	2,58	1,21 \pm 0,006	63,75 \pm 0,3
D	Maulbeere	23	2,52	1,26 \pm 0,005	70,75 \pm 0,3
E	Eiche	13	2,52	1,25 \pm 0,012	70,95 \pm 0,1
F	Kastanie	10	2,48	1,27 \pm 0,006	72,76 \pm 0,3
G	Kastanie	5	2,49	1,27 \pm 0,004	73,98 \pm 0,4
H	Kastanie	5	2,49	1,28 \pm 0,001	74,45 \pm 0,1

^a n = 3Abbildung 60. Durch vergleichende Profilanalyse erhaltene Geschmacksprofile der aus der *Bacteria* stammenden Essigintermediate der Fässer A – H. Abbildung beruht auf Daten in Tabelle 54 (Kapitel 6).

2.2.3.1 Einfluss der Lagerung auf die Gehalte der Sensometaboliten

Mit dem Ziel, die sensorischen Daten mit der Anwesenheit einzelner Geschmacksstoffe korrelieren zu können, wurden 37 ausgewählte Sensometaboliten, darunter die Monosaccharide, Polyole, organischen Säuren, Phenolcarbonsäuren, Ellagtannine **27** und **28**,

(+)-Dihydrorobinetin (**29**), die Zucker-Acetate **30** und **31** und die Furanderivate **33** und **34** in allen Proben quantifiziert. Darauf erfolgte, sowohl auf Frisch- als auch auf Trockenmasse basierend, eine Normalisierung und hierarchische, agglomerative Clusterung der Daten, die anschließend in sogenannten Heatmaps veranschaulicht wurden (**Abbildung 61** und **Abbildung 62**).

Basierend auf dem Frischgewicht führte die hierarchische Clusteranalyse zur Bildung von zwei großen Clustern (1 und 2), die wiederum jeweils in zwei kleinere Cluster unterteilt waren (1a, 1b, 2a, 2b) (**Abbildung 61**). Cluster 1a fasste die Substanzen zusammen, die während der Lagerung stetig in ihrer Konzentration zunahmen, darunter die süß schmeckenden Monosaccharide, die Polyole Glycerin, Sorbitol und Xylitol aber auch den Süßmodulator 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**). Diese Ergebnisse korrelierten gut mit der ebenfalls über die Lagerungszeit zunehmenden Süße (vgl. **Abbildung 60**). Ebenfalls im Einklang mit den sensorischen Daten waren die Zunahmen an Äpfelsäure, Citronensäure und Weinsäure. Weitere Verbindungen des Clusters 1a, nämlich Gallussäure und 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**), konnten hingegen nicht direkt mit dem Geschmack der Proben in Verbindung gebracht werden. Das kleinere Cluster 1b wurde durch Substanzen repräsentiert, die keinen klaren Trend zeigten wie z.B. Vescalagin (**27**), Glykolsäure, Ribitol oder Gluconsäure. So durchlief die Konzentration von Gluconsäure in Fass E ein Maximum, während Vescalagin (**27**) in Fass H eine deutliche Konzentrationssteigerung erfuhr. Da Gluconsäure ein von Essigsäurebakterien produzierter Metabolit ist, konnte ersteres auf die nach Fass E, durch den hohen Zuckergehalt bedingte, inaktive Mikroflora zurückgeführt werden. Der plötzliche Anstieg von **27** in Fass H war wahrscheinlich der Verwendung von Kastanienholz geschuldet, welches als Quelle dieses Ellagtannins bekannt ist (*Sanz et al.*, 2010).

Cluster 2a fasste die Verbindungen zusammen, die zwar tendenziell während der Lagerung abnahmen, aber ebenfalls kein eindeutiges Verhalten aufwiesen. Darunter waren Castalagin (**28**), (+)-Dihydrorobinetin (**29**) und die Phenole Vanillinsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure, die beide in den Fässern C und D die höchsten Konzentrationen zeigten. Im Gegensatz dazu setzte sich das größere Cluster 2b aus den Verbindungen zusammen, die innerhalb der Fasskaskade kontinuierlich in ihrer Konzentration abnahmen. Neben Essigsäure, deren Reduktion gut mit der Abnahme der stechenden Säurequalität übereinstimmte, waren nur phenolische Substanzen in diesem Cluster vertreten (**Abbildung 61**).

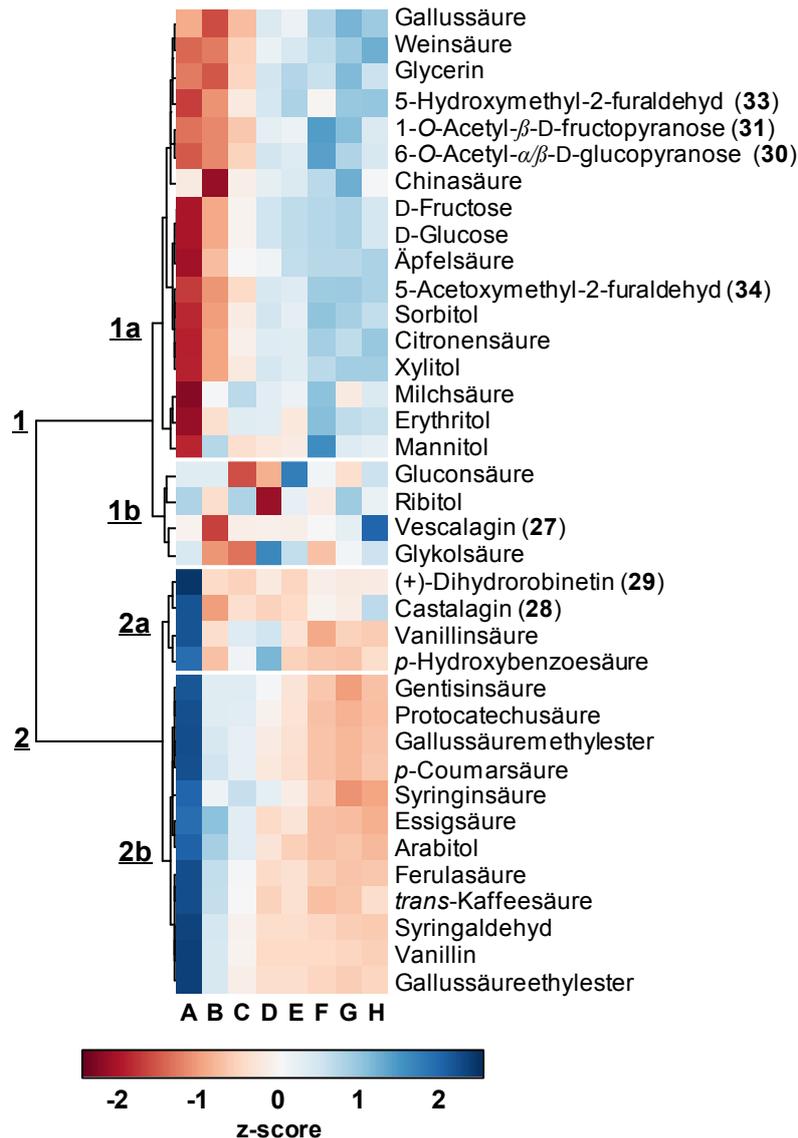


Abbildung 61. Heatmap mit hierarchischer Clusteranalyse für die in den Fassintermediaten A – H quantifizierten Verbindungen, basierend auf dem Frischgewicht. Die Abbildung wurde in Kooperation mit A. Dunkel (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, TU München) angefertigt und beruht auf den Daten in Tabelle 55 (Kapitel 6). Nummerierungen der Substanzen beruhen auf Abbildung 42, Abbildung 51, Abbildung 53 und Abbildung 54.

Um eine Verfälschung der Konzentrationsänderungen aufgrund des ständigen Wasserverlustes während der Lagerung zu vermeiden, wurde im Folgenden eine zweite Clusteranalyse durchgeführt, bei der die Daten auf den jeweiligen Trockenmassen der Proben basierten (**Abbildung 62**).

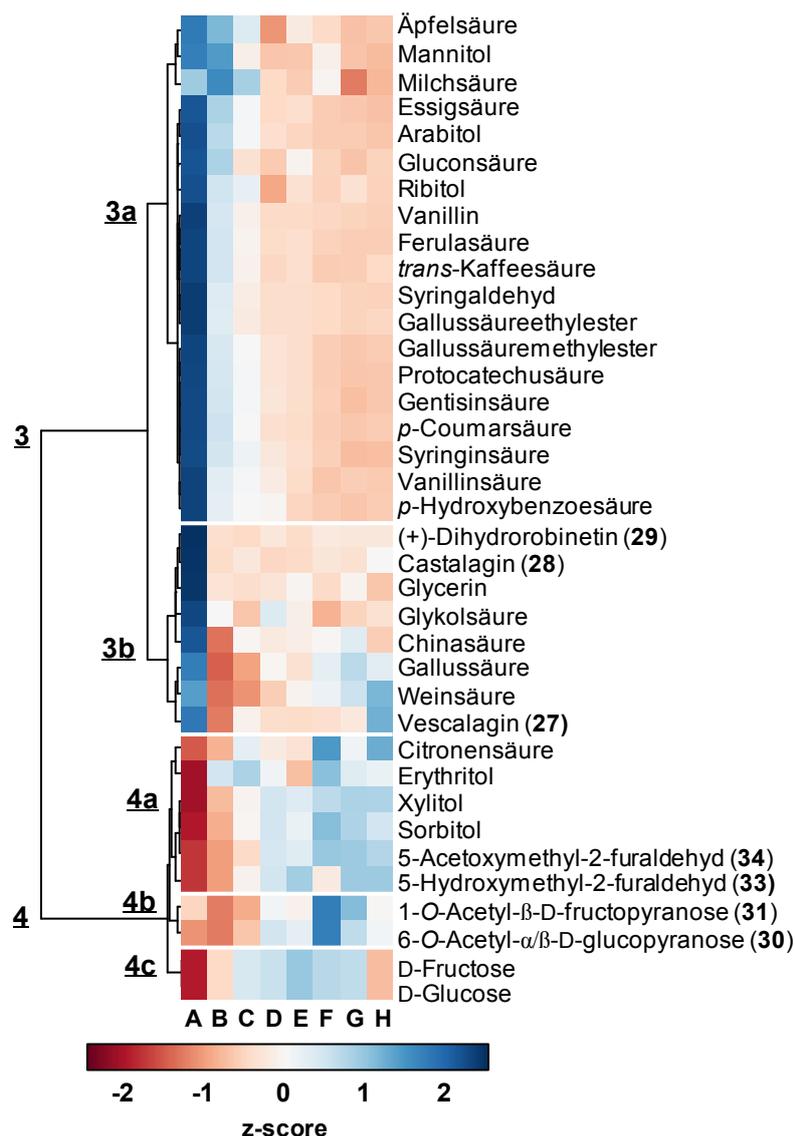


Abbildung 62. Heatmap mit hierarchischer Clusteranalyse für die in den Fassintermediaten A – H quantifizierten Verbindungen basierend auf der Trockenmasse. Die Abbildung wurde in Kooperation mit A. Dunkel (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, TU München) angefertigt und beruht auf den Daten in Tabelle 56 (Kapitel 6). Nummerierungen der Substanzen beruhen auf Abbildung 42, Abbildung 51, Abbildung 53 und Abbildung 54.

Diese offenbarte die Unterteilung in zwei große (3 und 4) sowie zwei (3a, 3b) bzw. drei Untercluster (4a, 4b, 4c), die sich im Vergleich zur vorherigen Analyse in teilweise veränderten Zusammensetzungen zeigten. So enthielt Cluster 3a, das die während der Lagerung abnehmenden Sensometabolite umfasste, neben Essigsäure und den phenolischen Verbindungen nun auch Gluconsäure, Äpfelsäure, Milchsäure, Ribitol, Mannitol und Arabitol. Während für Vescalagin (27) in Cluster 3b das gleiche Verhalten wie zuvor gefunden wurde, zeigte sich auf Basis der Trockenmasse für z.B. Weinsäure und Glycerin

kein eindeutiger Trend mehr. Erstere nahm von Fass A zu Fass B deutlich in ihrer Konzentration ab, zu Fass H hin jedoch auch wieder zu. Letzteres wies im Gegensatz zum Bezug auf das Frischgewicht einen negativen Trend auf. Die Cluster **4b** und **4c** wurden durch Substanzen repräsentiert, die auch mit steigender Trockenmasse in ihren Konzentrationen stiegen und somit erst während der Lagerung gebildet wurden, darunter neben einigen Polyolen, die Zucker-Acetate **30** und **31** sowie das Maillardreaktionsprodukt **33** und der Süßmodulator **34**. Auch Glucose und Fructose in Cluster **4a** zeigten ausgehend von Fass A einen positiven Trend über die gesamte Fassbatterie. Da diese Monosaccharide ihren Ursprung ausschließlich im Traubenmost haben, konnte statt einer Bildung während der Lagerung von einer Aufkonzentrierung ausgegangen werden.

Die Ergebnisse der umfassenden quantitativen Analyse zeigten, dass einige der Schlüsselgeschmacksstoffe zwar über die Lagerungszeit hinweg abgebaut wurden, durch die evaporative Aufkonzentrierung jedoch trotzdem in ihrer Bedeutung für den Geschmack zunahmen.

2.2.3.2 Diskussion

Die sensorische Analyse von Proben einer aus acht Fässern bestehenden Lagerungsreihe eines ABTM ergab, dass der Sauergeschmack mit zunehmender Reifezeit abnahm und sich in seiner Qualität von stechend hin zu fruchtig-rund veränderte. Im Gegensatz dazu nahmen Süße und viskose Mundfülle in ihrer Intensität jeweils signifikant zu, während die Astringenz keiner Veränderung unterlag.

Um die Veränderungen auf sensorischer Ebene mit instrumentell-analytischen Daten korrelieren zu können, wurden ausgewählte Verbindungen in allen Proben der Lagerungsreihe quantitativ erfasst. Die resultierenden Daten für die Zucker, Polyole, organischen Säuren, Phenolcarbonsäuren, Ellagtannine (**27**, **28**), (+)-Dihydrorobinetin (**29**) und acetylierten Verbindungen 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucopyranose (**30**), 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**) und 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) wurden, bezogen auf Frischgewicht bzw. Trockenmasse, softwaregestützt normalisiert, in sogenannten Heatmaps visualisiert und ihr

Verhalten mittels agglomerativer hierarchischer Clusteranalyse auf Ähnlichkeit hin untersucht.

Die Ergebnisse der Datenanalyse zeigten, dass die Zunahme der Süße über die Lagerungsreihe hinweg durch steigende Konzentrationen der Monosaccharide Glucose und Fructose hervorgerufen wurde, während die Änderung des Sauergeschmacks aus einer Kombination von abnehmender Essigsäurekonzentration und zunehmenden Gehalten an Fruchtsäuren resultierte. Die Berücksichtigung der ebenfalls mit steigendem Alter zunehmenden Trockenmassen bzw. abnehmenden Wassergehalte der einzelnen Proben zeigte allerdings, dass die steigende sensorische Relevanz der meisten Sensometaboliten auf einer Aufkonzentrierung und nicht einer Bildung während der Lagerung beruhte. Ausnahmen waren die Polyole Sorbitol, Xylitol und Erythritol, 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) sowie die acetylierten Verbindungen **30**, **31** und **34**, die ebenfalls bezogen auf die Trockenmasse eine kontinuierliche Zunahme in ihren Gehalten mit steigender Lagerungszeit aufwiesen. Dieses Ergebnis untermauerte die bereits postulierte Eignung von 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) und 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) als Alterungsmarker (*Del Signore, 2001; Masino et al., 2005*) und legte eine Erweiterung dieser Substanzgruppe um die Zuckeracetate 6-*O*-Acetyl- α -/ β -D-glucofuranose (**30**) und 1-*O*-Acetyl- β -D-fructofuranose (**31**) nahe.

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, dass einige der Schlüsselgeschmacksstoffe von ABTM über die Reifezeit hinweg zwar abgebaut wurden, durch die evaporative Aufkonzentrierung jedoch trotzdem in ihrer sensorischen Bedeutung zunahmten. Diese Kenntnisse können in Zukunft hilfreich sein, um die Optimierung des typischen Geschmacks von ABTM gezielt durch Eingriffe in die technologischen Abläufe während der Herstellung und Reifezeit zu steuern.

Zur molekularen Charakterisierung des süßverstärkenden Effekts von **34** wurden abschließend wahrnehmungsphysiologische Experimente mit dem humanen Süßrezeptor hTAS1R2/hTAS1R3 durchgeführt. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel 2.2.4 dargestellt und diskutiert.

2.2.4 Studien zur Aktivierung des hTAS1R2/hTAS1R3-Süßrezeptors

2.2.4.1 Süßrezeptor-Aktivierung durch 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd

Umfassende Time-Intensity-Sensoren zeigten, dass die aus ABTM isolierte Verbindung 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**34**) zur signifikanten Verlängerung der Süßwahrnehmung einer 4 %igen Saccharoselösung führte (vgl. Kapitel 2.2.1.5.4). Zur Identifizierung der Ursache dieses süßmodulierenden Effekts auf molekularer Ebene wurden *in vitro* Messungen mit dem humanen Süßrezeptor hTAS1R2/hTAS1R3 unter Verwendung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293 FlpIn T-Rex-Zellen) durchgeführt. Diese exprimieren die Rezeptoruntereinheit hTAS1R2 stabil und die Untereinheit hTAS1R3 nach Induktion mit Tetracyclin. Die Kopplung des Rezeptors an die Signaltransduktionskaskade (vgl. Kapitel 1.3.1) wird durch stabile Expression der G-Protein Chimäre $G_{\alpha 15}G_{\beta 13}$ gewährleistet. Die durch Aktivierung des Rezeptors induzierte Ausschüttung von Calcium im Zellinneren kann im Folgenden mittels eines Calcium-sensitiven fluoreszierenden Farbstoffes detektiert werden, wobei die Menge an cytosolischem Calcium mit dem Umfang der Rezeptoraktivierung korreliert (*Galindo-Cuspinera et al.*, 2006; *Hennings et al.*, 2008) (**Abbildung 63**). Um falsch positive bzw. negative Ergebnisse auszuschließen, mussten die empfindlichen Zellsysteme bei jeder Messung auf ihre Funktion hin überprüft werden. Einerseits wurden parallel zu den induzierten Zellen sogenannte Mock-Zellen, die kein funktionierendes Rezeptordimer aufwies, mit den Liganden inkubiert. So konnten rezeptorspezifische Signale von unspezifischen „Artefakt“-Signalen, die oft bei höher konzentrierten Geschmacksstoffen auftraten, unterschieden werden. Zum anderen erfolgte auf jede Applikation eines Analyten zeitnah eine Isoproterenol-Stimulation. Dieses synthetische Catecholamin aktiviert in der Zellwand lokalisierte, β -androgene Rezeptoren, die auch über $G_{\alpha 15}G_{\beta 13}$ an die Signaltransduktionskaskade gekoppelt sind und führt somit ebenfalls zur Detektion eines Fluoreszenzsignals (**Abbildung 63**). So konnte das Messsystem im Hinblick auf verschiedene Fehlerquellen, wie z.B. nicht-vitale Zellen, eine nicht intakte Signaltransduktionskaskade oder unkorrekte Applikation der Liganden überprüft werden.

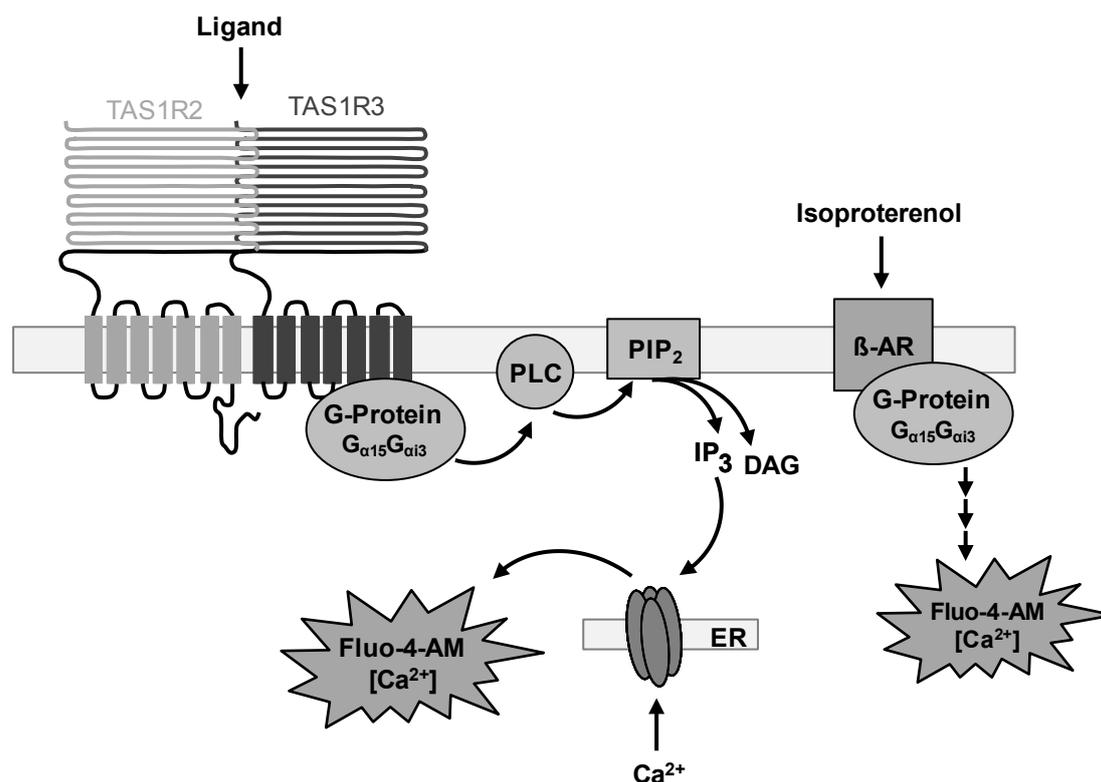


Abbildung 63. Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des zellbasierten Süßrezeptorassays. PLC = Phospholipase C; PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat; IP₃ = Inositoltriphosphat; DAG = Diacylglycerin; ER = Endoplasmatisches Retikulum; β-AR = β-androgener Rezeptor. In Anlehnung an Galindo-Cuspinera et al., 2006.

Die ersten *in vitro*-Messungen mit 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**) in einem Konzentrationsbereich von 300 bis 10000 µmol/l ergaben, dass die Verbindung bis zu einer Konzentration von 3000 µmol/l artefaktfrei appliziert werden konnte. Zellen, die die komplette Rezeptoreinheit hTAS1R2/hTAS1R3 exprimierten, zeigten eine deutliche Aktivierung durch **34**. Im Gegensatz dazu wurde bei mit **34** versetzten Mock-Zellen keine Calcium-Ausschüttung detektiert. Desweiteren führte die kombinierte Zugabe von 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**) (3000 µmol/l) und dem selektiven und potenten Süßinhibitor Lactisol (1000 µmol/l) zu induzierten Zellen zur kompletten Suppression des Signales (**Abbildung 64**). Diese Experimente belegen eindeutig die selektive Aktivierung des humanen Süßrezeptors durch 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**). Dies stand allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen der humansensorischen Experimente, die keinen intrinsischen Süßgeschmack der Substanz ergaben (vgl. Kapitel 2.2.1.5.4).

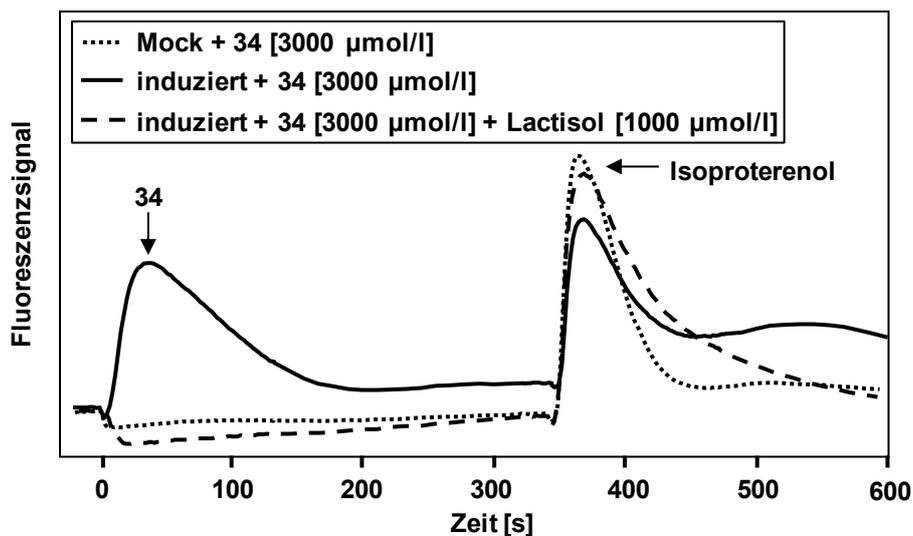


Abbildung 64. Fluoreszenzsignale, hervorgerufen durch Applikation von 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (34) mit und ohne Lactisol auf Zellen, die den humanen Süßrezeptor exprimieren und auf Mock-Zellen. Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Da der messbare Konzentrationsbereich der Verbindung aufgrund von Artefaktsignalen sehr limitiert war, wurde keine Dosis/Wirkungs-Kurve aufgenommen, sondern nur die zur Rezeptoraktivierung notwendige Schwellenwertkonzentration ermittelt. Diese ist definiert als die Konzentration, deren Applikation ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal als das des verwendeten Messpuffers (= C1-Puffer) hervorruft. Die Schwellenwertkonzentration von 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (34) für die Aktivierung des humanen Süßrezeptors betrug $100 \mu\text{mol/l}$. Weiterhin legte der Vergleich der Signalgrößen, die durch äquimolare Mengen ($1000 \mu\text{mol/l}$) an 34 ($\Delta F/F = 0,66$) und Saccharose ($\Delta F/F = 0,07$) resultierten, das Furan-derivat als potenten Süßrezeptor-Liganden offen (Daten nicht gezeigt).

Eine zweite Reihe von Experimenten diente der genaueren Untersuchung der *in vivo* detektierten Interaktion zwischen Verbindung 34 und Saccharose. Dazu wurden Dosis/Wirkungskurven von Saccharose alleine ($100 - 100000 \mu\text{mol/l}$) sowie Saccharose ($100 - 100000 \mu\text{mol/l}$) in Gegenwart einer konstanten Konzentration an 34 ($500 \mu\text{mol/l}$) aufgenommen. Zusätzlich wurde die Rezeptoraktivierung bei alleiniger Applikation von 34 ($500 \mu\text{mol/l}$) gemessen und der erhaltene Wert zur Kalkulation einer theoretischen Dosis/Wirkungskurve von Saccharose und 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd verwendet. So sollten mögliche synergistische Effekte zwischen den beiden Verbindungen offengelegt werden. Der Vergleich der drei resultierenden Kurven (Abbildung 65) zeigte, dass die

Dosis/Wirkungskurve von Saccharose und **34** sich nicht signifikant von der, die sich durch Addition der Einzelwerte beider Substanzen ergab, unterschied. Dies indizierte eine additive und keine synergistische Wirkung von **34** auf das durch Saccharose erhaltene Signal. Ein Mechanismus zur Geschmacksverstärkung durch Stabilisierung der geschlossenen Venus-Fly-Trap-Konformation, der für allosterische Modulatoren des Umami- und Süßgeschmacks gefunden wurde (Zhang *et al.*, 2008, 2010), ist für 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**34**) somit unwahrscheinlich.

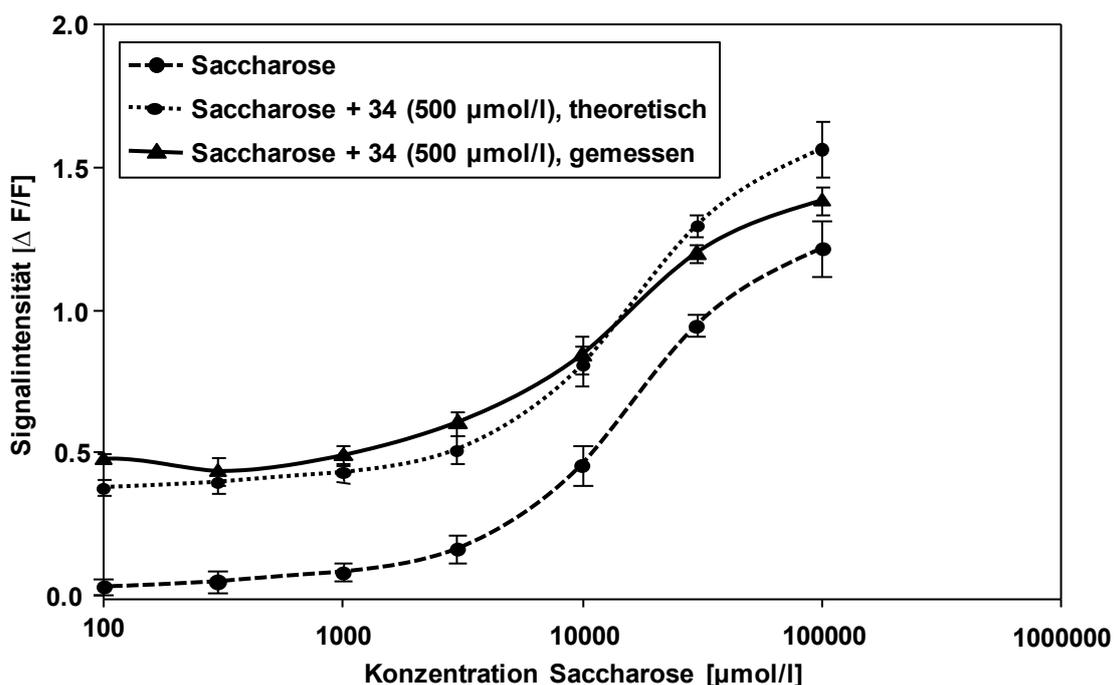


Abbildung 65. Gemessene Dosis-Wirkungskurven zur Aktivierung des Süßrezeptors hTAS1R2/hTAS1R3 von Saccharose, Saccharose + **34** (500 $\mu\text{mol/l}$) und berechnete Dosis-Wirkungskurve von Saccharose + **34** (500 $\mu\text{mol/l}$), die aus der Addition der Einzelsignale der jeweiligen Verbindungen resultierte. Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIFE, Potsdam) durchgeführt.

Die durchgeführten *in vitro* Experimente ließen somit keine endgültige Klärung des süßmodulierenden Effekts von **34** auf molekularer Ebene zu. Aufgrund der eindeutig nachgewiesenen selektiven Aktivierung des Süßrezeptors durch **34** ist möglicherweise ein verlängertes Rezeptorsignal an die afferenten Nerven die Ursache für die *in vivo* gefundene Modulation.

Nachdem die Aktivierung des humanen Süßrezeptors hTAS1R2/hTAS1R3 durch das Furanderivat 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**34**) eindeutig gezeigt werden konnte, sollte im

Weiteren die Aktivierung des Rezeptors durch verschiedene Furan- sowie Pyrrol- und Thiophenderivate untersucht werden, um mögliche Struktur/Wirkungsbeziehungen offenzulegen.

2.2.4.2 Süßrezeptor-Aktivierung durch Furan-, Thiophen- und Pyrrol-Derivate

Zur Evaluierung von Struktur/Wirkungsbeziehungen wurden im Folgenden weitere Furan-, Thiophen- und Pyrrolderivate auf ihr Potential zur Süßrezeptoraktivierung hin analysiert. **Abbildung 66** gibt einen Überblick über die eingesetzten Verbindungen. Neben dem ebenfalls in ABTM detektierten 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) wurden mit Furan-2-carboxaldehyd (**36**) und 5-Methyl-2-furaldehyd (**37**) zwei Furan-2-aldehyde mit verschiedenen Substituenten an Position 5 des Heteroringes untersucht. Die synthetisierten Verbindungen **38**, **39**, **40** und **41** (vgl. Kapitel 3.5.6) sollten einen Einfluss eines im Vergleich zu **34** verlängerten Acyloxy-Restes offenlegen. Substitutionen des Aldehydrestes wurden durch Furan-2-carbonsäure (**42**), Furan-2-carbonsäuremethylester (**43**) und 2-(Hydroxymethyl)-furan (**44**) repräsentiert. Um die Relevanz des Heteroatoms im Fünfringsystem zu analysieren wurden weiterhin die schwefelhaltigen Verbindungen Thiophen-2-carboxaldehyd (**45**), 5-Methyl-thiophen-2-aldehyd (**46**) und Thiophen-2-carbonsäure (**47**) sowie das stickstoffhaltige Pyrrol-2-carboxaldehyd (**48**) im Zellaassay eingesetzt.

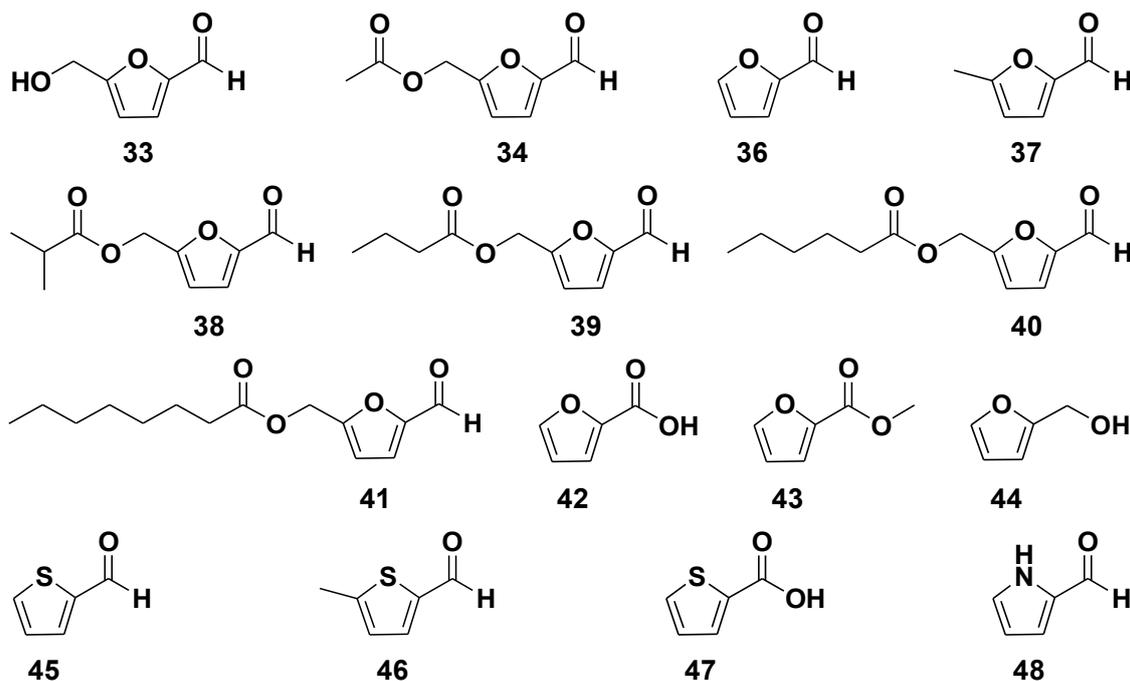


Abbildung 66. Strukturformeln von 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33), 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (34), Furan-2-carboxaldehyd (36), 5-Methyl-2-furaldehyd (37), 5-(Isobutanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (38), 5-(Butanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (39), 5-(Hexanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (40), 5-(Octanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (41), Furan-2-carbonsäure (42), Furan-2-carbonsäuremethylester (43), 2-(Hydroxymethyl)-furan (44), Thiophen-2-carboxaldehyd (45), 5-Methyl-thiophen-2-aldehyd (46), Thiophen-2-carbonsäure (47) und Pyrrol-2-carboxaldehyd (48).

Abbildung 67 zeigt die resultierenden Fluoreszenzsignale der Inkubation nicht induzierter und induzierter HEK-Zellen mit den Verbindungen **33 – 48** sowie von induzierten Zellen mit dem entsprechenden Liganden und Lactisol. Neben 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**) aktivierten neun weitere der insgesamt 15 untersuchten Verbindungen den humanen Süßrezeptor. Die Spezifität des Signals wurde jeweils durch Applikation der jeweiligen Verbindung auf Mockzellen sowie kombinierte Applikation mit dem Süßinhibitor Lactisol bestätigt. Eine Übersicht über einen möglichen Aktivierungsbereich des Rezeptors, den zur Analyse eingesetzten Konzentrationsbereich sowie die jeweils höchste artefaktfrei messbare Konzentration für die einzelnen Substanzen gibt **Tabelle 31**.

Unter den Furanderivaten aktivierten außer **34** auch 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**), Furan-2-carboxaldehyd (**36**), 5-Methyl-2-furaldehyd (**37**), 5-(Isobutanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (**38**) und Furan-2-carbonsäure (**42**) den Süßrezeptor. Furan-2-carbonsäuremethylester (**43**) und 2-(Hydroxymethyl)-furan (**44**) aktivierten den Rezeptor nicht, was einen

ersten Hinweis auf die Relevanz einer Aldehyd- bzw. freien Carboxylgruppe für die Rezeptoraktivierung gab. Allerdings induzierten 5-(Butanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (**39**), 5-(Hexanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (**40**) und 5-(Octanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (**41**), die jeweils eine Aldehydgruppe in ihrer Struktur aufwiesen, kein Fluoreszenzsignal. Da diese Verbindungen sich nur in der Länge des Acyloxyrestes von **34** und **38** unterschieden, schienen auch weitere Faktoren, wie die Polarität oder sterische Größe weiterer Seitenketten einer Substanz ihr Potential zur Süßrezeptoraktivierung zu beeinflussen. Die Substitution des Sauerstoffatoms im Fünfring durch Schwefel oder Stickstoff ergab keine qualitativen Veränderungen im Bezug auf die Aktivierung. Die Applikation sowohl von Thiophen-2-carboxaldehyd (**45**), 5-Methylthiophen-2-aldehyd (**46**) und Thiophen-2-carbonsäure (**47**) als auch Pyrrol-2-carboxaldehyd (**48**) ergab jeweils ein rezeptorspezifisches Signal (**Abbildung 67**).

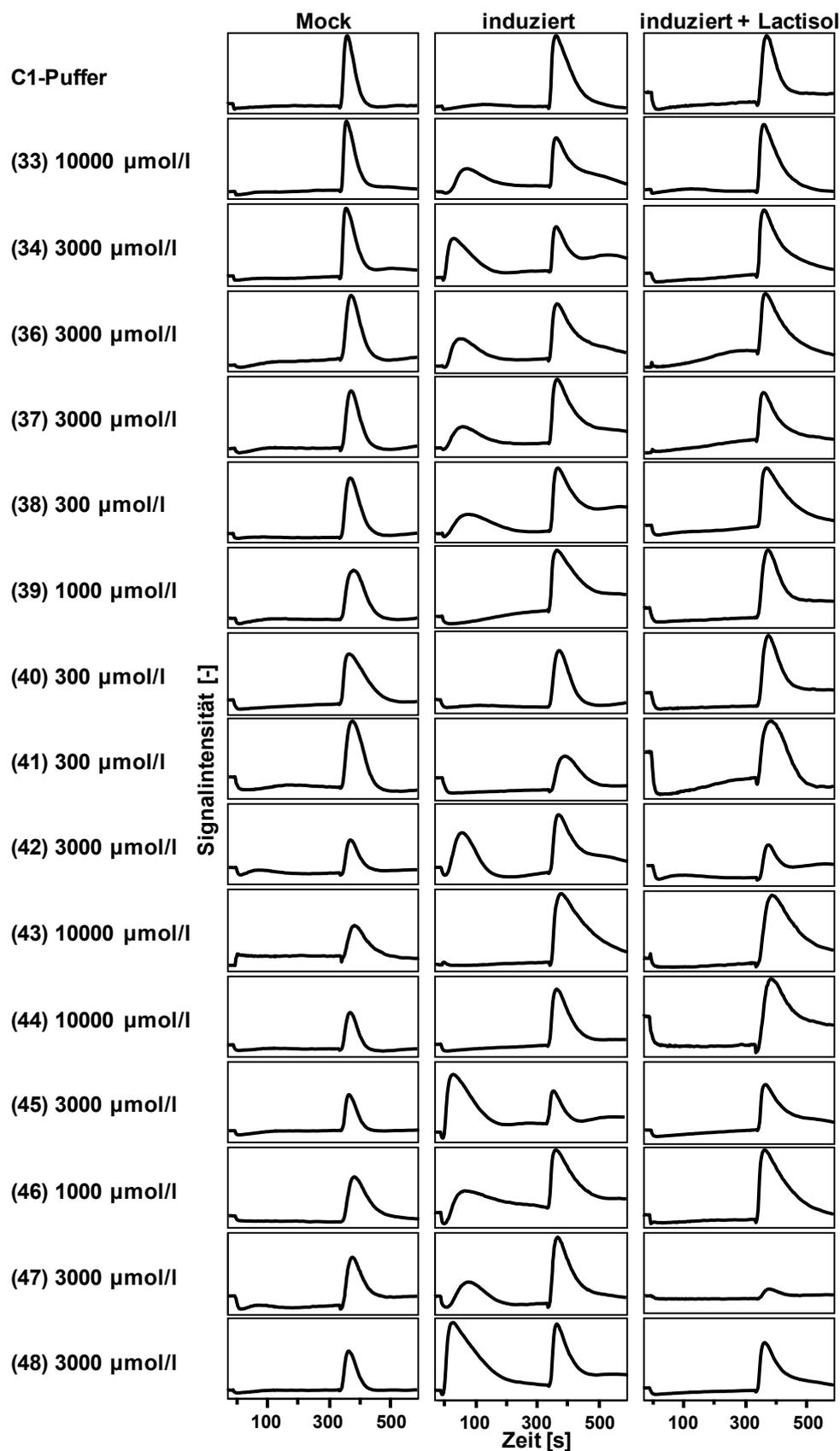


Abbildung 67. Detektierte Fluoreszenzsignale, die durch Applikation der Verbindungen 33 – 48, mit und ohne Lactisol, auf Mockzellen und auf Zellen, die den humanen Süßrezeptor hTAS1R2/hTAS1R3 exprimieren, resultieren. Die Nummerierung der Verbindungen bezieht sich auf Abbildung 66. Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DIfE, Potsdam) durchgeführt.

Tabelle 31. In FLIPR-Experimenten detektierte Aktivierung des humanen Süßrezeptors hTAS1R2/hTAS1R3, gemessener Konzentrationsbereich und jeweilige Artefaktkonzentrationen für die Verbindungen 33 – 48.

Verbindung	Aktivierung des humanen Süßrezeptors hTAS1R2/hTAS1R3	gemessener Konzentrationsbereich [$\mu\text{mol/l}$]	höchste artefaktfreie Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]
33	+	30 – 100000	10000
34	+	3 – 10000	3000
36	+	10 – 30000	3000
37	+	10 – 30000	3000
38	+	3 – 3000	900
39	-	30 – 3000	300
40	-	100 – 3000	300
41	-	10 – 3000	100
42	+	30 – 10000	3000
43	-	1000 – 30000	10000
44	-	300 – 100000	30000
45	+	3 – 10000	3000
46	+	100 – 10000	2000
47	+	100 – 10000	3000
48	+	3 – 10000	5000

Die Nummerierung der Substanzen bezieht sich auf **Abbildung 66**; Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DifE, Potsdam) durchgeführt.

Um die Aktivierung des Süßrezeptors durch die verschiedenen Verbindungen quantitativ erfassen zu können und dadurch detaillierte Einblicke in Struktur/Wirkungsbeziehungen zu bekommen, wurden im Folgenden Schwellenwertkonzentrationen für alle Verbindungen ermittelt. Zudem erfolgte ein Vergleich der erhaltenen Signalgrößen bei Inkubation der HEK-Zellen mit jeweils 1000 $\mu\text{mol/l}$ jeder Verbindung. Die in **Abbildung 68** dargestellten Ergebnisse zeigen die Unterschiede in der Rezeptoraktivierung durch die einzelnen Verbindungen.

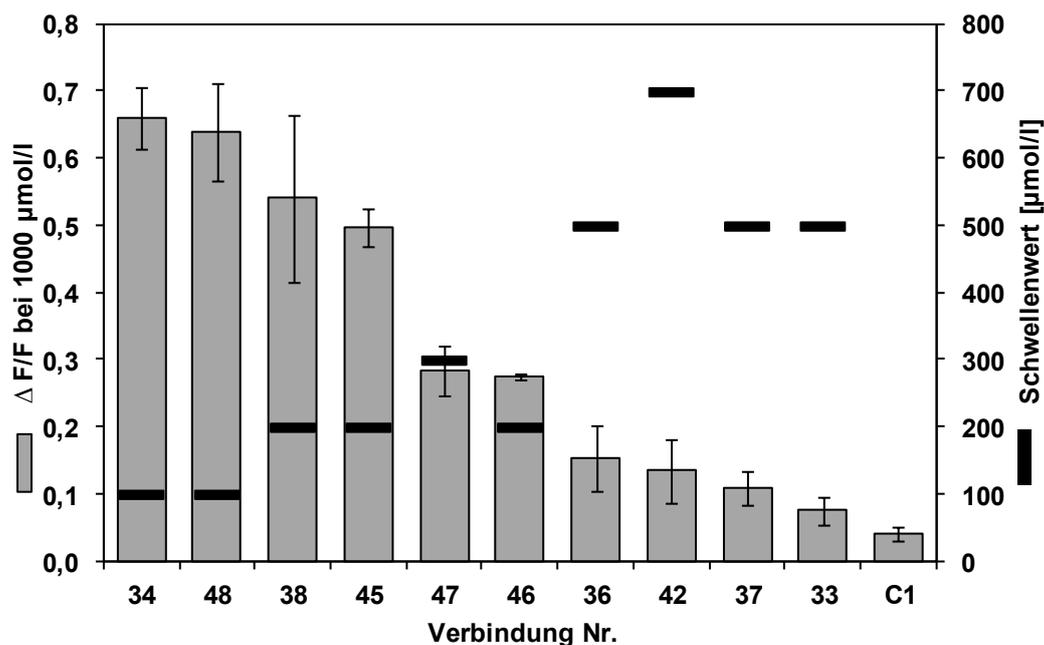


Abbildung 68. Resultierende $\Delta F/F$ -Werte bei Applikation von 1000 $\mu\text{mol/l}$ sowie Schwellenwerte [$\mu\text{mol/l}$] zur Rezeptoraktivierung der Verbindungen 33, 34, 36, 37, 38, 42, 45, 46, 47 und 48. Nummerierung der Verbindungen bezieht sich auf Abbildung 66. Die Messungen zur Rezeptoraktivierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Meyerhof (DfE, Potsdam) durchgeführt.

Die größten Signale ergab die Applikation von je 1000 $\mu\text{mol/l}$ 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) und Pyrrol-2-carboxaldehyd (**48**) gefolgt von 5-(Isobutanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (**38**) und Thiophen-2-carboxaldehyd (**45**). Für diese vier Substanzen wurden zudem mit Werten von 100 (**34**, **48**) und 200 $\mu\text{mol/l}$ (**38**, **45**) die geringsten Schwellenwerte gefunden. Mit $\Delta F/F$ -Werten von 0,28 und 0,27 riefen Thiophen-2-carbonsäure (**47**) und 5-Methylthiophen-2-aldehyd (**46**) eine moderatere Aktivierung des Süßrezeptors hervor. Noch geringer war die Aktivierung durch die vier Furanderivate **33**, **36**, **37** und **42**, die zudem auch die höchsten Schwellenwerte (500 – 700 $\mu\text{mol/l}$) aufwiesen. Die sehr schwache Wirkung von 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) spiegelt die Ergebnisse der humansensorischen Experimente wider, bei denen selbst hohe Konzentrationen keinen süßmodulierenden Effekt aufwiesen (vgl. Kapitel 2.2.1.5.4).

Die Resultate belegten die Korrelation von Struktur und Stärke der Rezeptoraktivierung, wobei vor allem drei Elemente relevant erschienen: Die Carbonylfunktion an Position 2 des Ringes zeigte sich schon bei der qualitativen Analyse als wichtiges Merkmal. Der Vergleich der Rezeptoraktivierung durch äquimolare Mengen an z.B. Thiophen-2-carboxaldehyd (**45**) und Thiophen-2-carbonsäure (**47**) zeigte, dass die Aldehydfunktion eine stärkere

Rezeptoraktivierung zur Folge hatte als die Carboxylfunktion. Diese Annahme ließ sich allerdings nicht auf die entsprechenden Furanderivate **36** und **42** übertragen, da diese keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des Fluoreszenzsignals zeigten.

Als zweiten Faktor zeigten die Verbindungen, die Schwefel oder Stickstoff im Fünfring aufwiesen, ein größeres Potential zur Rezeptoraktivierung als die entsprechenden Oxa-Analoga. So führten Pyrrol-2-carboxaldehyd (**48**) und Thiophen-2-carboxaldehyd (**45**) zu um den Faktor 3 – 4 höheren Fluoreszenzsignalen als Furan-2-carboxaldehyd (**36**). Für die korrespondierenden Substanzen 5-Methyl-thiophen-2-aldehyd (**46**) und 5-Methyl-2-furaldehyd (**37**) sowie Thiophen-2-carbonsäure (**47**) und Furan-2-carbonsäure (**42**) wurden analoge Ergebnisse gefunden (**Abbildung 68**). Da weiterhin **48** gegenüber **45** eine leicht, aber signifikant höhere Rezeptoraktivierung sowie einen geringeren Schwellenwert aufwies, wurde für die Heteroatome im Fünfring im Hinblick auf die Stärke der Rezeptoraktivierung die Reihenfolge $N > S > O$ postuliert.

Allerdings ergaben die Furanderivate 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (**34**) und 5-(Isobutyloxy)-methyl-2-furaldehyd (**35**) eine genauso große Rezeptoraktivierung wie **48** bzw. **45**. Das Strukturmerkmal, das erstere Verbindungen aufwiesen und das sie gleichzeitig von den anderen beiden Verbindungen unterschied, war die Acyloxygruppe an Position 5 des Ringes. Die Tatsache, dass die weiteren eingesetzten Acyloxy-Furan-Derivate **39** – **41** keine Rezeptoraktivierung hervorriefen, deutete darauf hin, dass neben der Carbonylfunktion auch die Länge bzw. Polarität dieser Seitenkette eine Rolle spielten. Weiterhin zeigte sich auch ein sterischer Faktor, da 5-(Isobutyloxy)-methyl-2-furaldehyd (**38**) zwar den Rezeptor aktivierte, die geradkettige Form der Verbindung 5-(Butyloxy)-methyl-2-furaldehyd (**39**) hingegen nicht.

Weiterhin wurde die Relevanz der Seitenketten an Position 5 des Heterorings für die Rezeptoraktivierung untermauert. Beispielsweise sind zwar die Schwellenwerte für Thiophen-2-carboxaldehyd (**45**) und 5-Methyl-thiophen-2-aldehyd (**46**) gleich groß, bei Applikation einer äquimolaren Konzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ ergaben sich allerdings signifikante Unterschiede in den rezeptorspezifischen Signalgrößen. Ein ähnliches, wenn auch nicht so deutliches Verhalten zeigten die entsprechenden Furanderivate **36** und **37**. Dies zeigte den Beitrag von weiteren Seitenketten am Ring, der sich je nach Polarität und Länge positiv oder negativ auf die Stärke der Rezeptoraktivierung auswirken kann.

Um neben **33** und **34** auch für weitere Verbindungen die Daten der *in vitro*-Experimente mit humansensorischen Daten korrelieren zu können, wurden abschließend für einige der untersuchten Verbindungen Geschmacksqualitäten und -schwellenwerte ermittelt (**Tabelle 32**). Dabei zeigte sich, dass in Übereinstimmung mit den für 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) gefundenen Ergebnissen keines der weiteren Furanderivate **36**, **37**, **39** und **42** einen süßen Geschmack aufwies, auch wenn eine schwache Aktivierung des Süßrezeptors detektiert wurde. Lediglich Furan-2-carboxaldehyd (**36**) rief ab einer Konzentration von 6000 $\mu\text{mol/l}$ einen bitteren Geschmackseindruck hervor. Von den Acyloxy-Furanderivaten **38**, **40** und **41**, die den Rezeptor nicht aktivierten, wurden für **40** und **41** bittere Geschmackseigenschaften mit Schwellenwerten von 1000 und 470 $\mu\text{mol/l}$ gefunden. Einzig Thiophen-2-carboxaldehyd (**45**) und Pyrrol-2-carboxaldehyd (**48**) wurden ab Konzentrationen von 650 bzw. 860 $\mu\text{mol/l}$ als süßschmeckend beschrieben.

Tabelle 32. Geschmacksqualitäten und psychophysikalische Geschmacksschwellenwerte einiger im Zellassay untersuchten Verbindungen.

Verbindung ^a	Geschmacksqualität ^b	Geschmacksschwellenwert ($\mu\text{mol/l}$) ^b
36	bitter	6000
37	n.d.	n.d.
38	n.d.	n.d.
39	n.d.	n.d.
40	bitter	1000
41	bitter	470
42	n.d.	n.d.
45	süß	650
48	süß	860

^a Nummerierung der Verbindungen bezieht sich auf **Abbildung 66**. ^b Geschmacksqualitäten und Geschmacksschwellenwerte wurden in Sensorikwasser (pH 3,0; 1 % EtOH) bestimmt; n.d. nicht detektierbar.

2.2.4.3 Diskussion

Um die sensorischen Eigenschaften des Süßmodulators 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) auf Rezeptorebene zu klären, wurden Untersuchungen am humanen Süßrezeptor hTAS1R2/hTAS1R3 durchgeführt. Eine erste Reihe von Experimenten zeigte, dass die

alleinige Applikation von **34** auf induzierte HEK293-Zellen bereits ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ zu einer Aktivierung des Süßrezeptors führte. Hingegen wies **34** bei der humansensorischen Analyse bis 2000 $\mu\text{mol/l}$ keinerlei Eigengeschmack auf. Gründe hierfür können in den Unterschieden zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Bedingungen für das Heterodimer hTAS1R2/hTAS1R3 liegen. In der Literatur sind verschiedene Beispiele publiziert, die die Relevanz von natürlich vorkommenden Begleitproteinen oder verschiedenen G-Proteinen für die Funktionalität und Aktivierung von Geschmacksrezeptoren verdeutlichen (Behrens *et al.*, 2006; Ilegems *et al.*, 2010; Reichling *et al.*, 2010).

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurden rezeptorvermittelte Dosis-Wirkungskurven von Saccharose mit und ohne Zusatz von 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass die Wirkung von **34** auf die Rezeptoraktivierung durch Saccharose keinem synergistischen, sondern einem additiven Mechanismus unterlag. Ein Mechanismus zur Geschmacksverstärkung durch die Stabilisierung der geschlossenen Venus-Fly-Trap-Konformation, der für allosterische Modulatoren des Umami- und Süßgeschmacks gezeigt wurde (Zhang *et al.*, 2008, 2010), war für 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) somit als unwahrscheinlich anzusehen. Die durchgeführten *in vitro* Experimente ließen somit keine endgültige Klärung des süßmodulierenden Effekts von **34** auf molekularer Ebene zu. Aufgrund der eindeutig nachgewiesenen selektiven Aktivierung des Süßrezeptors durch **34** war möglicherweise ein verlängertes Rezeptorsignal an die afferenten Nerven die Ursache für die Modulation, die in den humansensorischen Time-Intensity-Experimenten gefunden wurde. Zur endgültigen Klärung der Ursachen, die der verlängerten Süßwahrnehmung durch **34** zugrunde liegen, sind zukünftig weitere rezeptorbasierte Experimente unter Verwendung chimärer Rezeptoren oder gezielter Punktmutationen notwendig.

Nachdem die spezifische Aktivierung des humanen Süßrezeptors durch 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) gezeigt wurde, konnten durch weitere Experimente mit verschiedenen Furan-, Thiophen- und Pyrrolderivaten Struktur-Wirkungsbeziehungen im Hinblick auf eine Aktivierung des hTAS1R2/hTAS1R3-Rezeptorpaars offengelegt werden. Die Applikation von elf Furanderivaten (**33** – **44**), drei Thiophenderivaten (**45** – **47**) und Pyrrol-2-carboxaldehyd (**48**) im Zellassay zeigte nicht nur für **34** sondern auch für neun weitere Verbindungen eine spezifische Rezeptoragonist-Aktivität. Dabei wurde deutlich, dass die Anwesenheit einer Aldehyd- oder Carboxylfunktion essentiell für die Rezeptoraktivierung war. Weiterhin legten die Aufnahme von Schwellenwerten und ein Vergleich der Signalgrößen bei äquimolaren Mengen die Abhängigkeit der Signalgröße von der Polarität der

zweiten Seitenkette und der Elektronegativität des Heteroatoms offen. Als bester Agonist für den Süßrezeptor wurde 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) gefunden, gefolgt von 5-(Isobutanoyloxy)-methyl-2-furaldehyd (**38**) und Thiophen-2-carboxaldehyd (**45**).

3 Experimenteller Teil

3.1 Untersuchungsmaterial, Reagenzien und Materialien

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Der für die Untersuchungen verwendete Parmesankäse wurde in drei Reifestufen (13, 24 und 30 Monate = P-13, P-24 und P-30) von einer lokalen Käserei aus der Region Parma, Italien erhalten (Käserei Orlandini, Vio Campo del Fico 36, 43024 Campora di Neviano degli Arduini, Parma, Italien) und in 1 kg Stücken geliefert, welche bis zur Verwendung bei - 20 °C gelagert wurden.

Rohmilch wurde von einem Landwirt aus der Region Ebersberg erhalten und bis zur zeitnahen Verwendung bei 4 °C gelagert.

Der verwendete Aceto Balsamico di Modena (= ABM) war kommerziell erhältlich und stammte aus der Acetaia Belli (Via Nouva 55/C, 41017 Casoni di Ravarino, Modena, Italien). Der untersuchte Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (= ABTM) („*affinato*“- Qualität, mindestens 12 Jahre gelagert) sowie die einzelnen Lagerungsstufen einer aus 8 Fässern bestehenden *Batteria* (Fass A (Akazie, 50 l), Fass B (Kastanie, 40 l), Fass C (Kirsche, 30 l), Fass D (Maulbeere, 23 l), Fass E (Eiche, 13 l), Fass F (Kastanie, 10 l), Fass G (Kastanie, 5 l), Fass H (Kastanie, 5 l)) wurden von der „Acetaia La Noce“ erhalten (Via Giardini Nord 9771, 9764 Montagnana di Serramazzone, Modena, Italien). Die Lagerung der Essigproben erfolgte bei 4 °C unter Lichtausschluss.

3.1.2 Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien waren, sofern nicht anders angegeben, von p.a.-Qualität. Lösungsmittel für die HPLC-Analysen waren von HPLC-Qualität, Lösungsmittel für die LC-MS-Analysen waren von LC-MS-Qualität. Wasser für die HPLC- und LC-MS-Analyse sowie zur Extraktion des Käses und Ultrafiltration des Essigs wurde einer Millipore-Station (Gradient A System, Millipore, Billerica, USA) entnommen. Für sensorische Experimente wurde, wenn nicht anders angegeben, kommerziell erhältliches, stilles Mineralwasser (Evian[®]) verwendet.

Lösungsmittel

2-Propanol, Merck, Darmstadt
Acetanhydrid, Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetonitril, HPLC grade, Merck, Darmstadt
Acetonitril, LC-MS grade, Mallinckrodt-Baker, Griesheim
Ameisensäure (98 – 100 %), Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat-Lösung, 10 M, Sigma-Aldrich, Steinheim
Dichlormethan, Merck, Darmstadt
Diethylether, Merck, Darmstadt
Essigsäure (100 %), Merck, Darmstadt
Ethylacetat, Merck, Darmstadt
Heptan, J.T Baker, Deventer, Niederlande
Methanol, p.a., Merck, Darmstadt
Methanol, HPLC grade, Merck, Darmstadt
Methanol, LC-MS grade, Mallinckrodt-Baker, Griesheim
Pyridin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure, 1 M, Merck, Darmstadt
Toluol, Merck, Darmstadt
Triethylamin, Fluka, Steinheim
Trifluoressigsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

Aminosäuren

Glycin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Alanin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Arginin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Asparagin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Asparaginsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutaminsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Histidin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Isoleucin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Leucin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Lysin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Methionin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Phenylalanin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Prolin, Sigma-Aldrich, Steinheim

L-Serin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Threonin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Tryptophan, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Tyrosin, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Valin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin-(U-¹³C₂, ¹⁵N, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Arginin*HCl-(U-¹³C₆, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Asparagin*H₂O-(¹⁵N₂, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Asparaginsäure-(U-¹³C₄, -¹⁵N, 97–99 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Glutamin-(U-¹³C₅, 97–99 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Glutaminsäure-(U-¹³C₅, -¹⁵N, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Histidin*HCl*H₂O-(U-¹³C₆, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Isoleucin-(U-¹³C₆, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Leucin-(1,2-¹³C₂, 99 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Lysin*2 HCl-(U-¹³C₆, U-¹⁵N₂, 97–99 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Methionin-(Methyl-d₃, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Phenylalanin-(Ring-d₅, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Prolin-(U-¹³C₅, -¹⁵N), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Serin-(U-¹³C₃, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Threonin-(U-¹³C₄, -¹⁵N, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Tryptophan-(Indol-d₅, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Tyrosin-(Ring-d₄, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
L-Valin-(U-¹³C₅, -¹⁵N, 98 %), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA

Biogene Amine

1,4-Diaminobutan*HCl, Acros Organics, Geel, Belgien
1,5-Diaminopentan, Acros Organics, Geel, Belgien
2-Phenylethylamin, Merck, Darmstadt
Dansylchlorid, Acros Organics, Geel, Belgien
Histamin*HCl, Merck, Darmstadt
Histamin-d₄*HCl, CDN Isotopes, Quebec, Kanada
Isopentylamin, Merck, Darmstadt
Spermidin*3HCl, Fluka, Buchs, Schweiz
Spermin*4HCl, Fluka, Buchs, Schweiz
Tryptamin*HCl, Merck, Darmstadt
Tyramin*HCl, Fluka, Buchs, Schweiz

Tyramin-d₄*HCl, CDN Isotopes, Quebec, Kanada

Glutamylpeptide

H-Glu-(Ala-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Gln-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Glu-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Gly-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(His-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Leu-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Lys-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Met-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Phe-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Trp-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Tyr-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-(Val-OH), Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-Ala-OH, Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-Asp-OH, Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-Glu-OH, Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-Gly-OH, Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-Lys-OH, Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-Thr-OH, Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-Trp-OH, Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-Tyr-OH, Bachem, Weil am Rhein

H-Glu-Val-OH, Bachem, Weil am Rhein

H-Gly-Gly-OH, Bachem, Weil am Rhein

1,3-Diisopropylcarbodiimid, Sigma-Aldrich, Steinheim

4-Dimethylaminopyridin, Fluka, Neu-Ulm

Benzoessäureanhydrid, Sigma-Aldrich, Steinheim

Benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat (PyBop®), Sigma-Aldrich, Steinheim

Fmoc-L-Ala-[¹³C₃], Sigma-Aldrich, Steinheim

Fmoc-L-Asp(OtBu)-Wang-Harz, Sigma-Aldrich, Steinheim

Fmoc-L-Glu-OtBu, Bachem, Weil am Rhein

Fmoc-L-Ile-Wang-Harz, Sigma-Aldrich, Steinheim

Fmoc-L-Thr(tBu)-Wang-Harz, Sigma-Aldrich, Steinheim

Hydroxybenzotriazol, Sigma-Aldrich, Steinheim

N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA), Fluka, Neu-Ulm
N,N-Dimethylformamid zur Synthese, Merck, Darmstadt
Ninhydrin, Merck, Darmstadt
Piperidin, Fluka, Neu-Ulm

Zucker und Polyole

1,2-Propandiol, Sigma-Aldrich, Steinheim
2,3-Butandiol, Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Fructose, Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Glucose, Merck, Darmstadt
D-Glucose-[¹³C₆], Silantes, München
D-Sorbitol, Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Mannitol, Aldrich, Taufkirchen
meso-Erythritol, Sigma-Aldrich, Steinheim
meso-Inositol, Riedel-De Haën, Seelze-Hannover
Ribitol, Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylitol, Sigma-Aldrich, Steinheim

Freie Fettsäuren

Buttersäure, Merck, Darmstadt
Caprinsäure, Roth, Karlsruhe
Capronsäure, Merck, Darmstadt
Caprylsäure, Fluka, Buchs, Schweiz
Heptadecansäure, Fluka, Buchs, Schweiz
Isobuttersäure, Fluka, Buchs, Schweiz
Laurinsäure, Fluka, Buchs, Schweiz
Myristinsäure, Roth, Karlsruhe
Natriumsulfat, wasserfrei, Grüssing, Filsum
Ölsäure, Fluka, Buchs, Schweiz
Palmitinsäure, Merck, Darmstadt
Pelargonsäure, Merck, Darmstadt
Propionsäure, Fluka, Buchs, Schweiz
Stearinsäure, Fluka, Buchs, Schweiz
Tridecansäure, Fluka, Buchs, Schweiz
Valeriansäure, Fluka, Buchs, Schweiz

Phenolische Verbindungen

(+)-Dihydrorobinetin, Extrasynthese, Genay, Frankreich
5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetylchlorid-[¹³C₂], Sigma-Aldrich, Steinheim
Castalagin, Dr. Timo Stark, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Freising
Chinasäure, Fluka, Neu-Ulm
Coniferylaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim
Ellagsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
Ferulasäure, Fluka, Neu-Ulm
Furan-2-carbonsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
Gallussäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
Gallussäureethylester, Fluka, Neu-Ulm
Gallussäuremethylester, Fluka, Neu-Ulm
Gentisinsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
para-Hydroxybenzoesäure, Merck, Darmstadt
Protocatechusäure, Roth, Karlsruhe
Sinapinaldehyd, Extrasynthese, Genay Cedex, Frankreich
Sinapinsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
Syringaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim
Syringinsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
trans-Kaffeesäure, Merck, Darmstadt
trans-p-Coumarsäure, Fluka, Neu-Ulm
Vanillin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Vanillinsäure, Fluka, Neu-Ulm
Vanillinsäureethylester, Apin Chemicals, Oxon, Großbritannien
Vescalagin, Dr. Timo Stark, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Freising

Organische Säuren

Ammoniumcitrat, Fluka, Neu-Ulm
Bernsteinsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure, Grüssing, Filsum
DL-Äpfelsäure, Riedel-De Haën, Seelze-Hannover
Gluconsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

Glykolsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

L-Milchsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

L-Weinsäure, Grüssing, Filsum

Oxalsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

Mineralische Anionen und Kationen

Calciumchlorid, Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid, Sigma-Aldrich, Seelze

Kaliumphosphat tribasisch Monohydrat, Sigma-Aldrich, Steinheim

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Merck, Darmstadt

Natriumchlorid, Grüssing, Filsum

Ionenchromatographie

Heptafluorbuttersäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

Methansulfonsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumhydroxid (50 %), Sigma-Aldrich, Steinheim

Zusätzliche Substanzen für sensorische Untersuchungen

Calciumacetat-Hydrat, Sigma-Aldrich, Steinheim

Calcium-L-Lactat-Pentahydrat, Merck, Darmstadt

di-Kaliumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

di-Kaliumtartrat-Hemihydrat, Fluka, Neu-Ulm

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Merck, Darmstadt

di-Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat, Merck, Darmstadt

Histamin, Sigma-Aldrich, Steinheim

Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

Kalium-L-Glutamat-Monohydrat, Merck, Darmstadt

Magnesiumacetat-Tetrahydrat, Sigma-Aldrich, Steinheim

Magnesium-L-Lactat-Dihydrat, Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumcarbonat, Sigma-Aldrich, Seelze

Natriumhydroxid Plätzchen p.a., Merck, Darmstadt

Natrium-L-Glutamat Monohydrat, Merck, Darmstadt

Natriumsaccharin, Fluka, Neu-Ulm

Saccharose, Sigma-Aldrich, Steinheim

Tyramin, Symrise, Holzminden

Mikrobiologische Untersuchungen/GGT-Aktivität

Biotin, Merck, Darmstadt

Clarifying Reagent für Milchprodukte, Fluka, Neu-Ulm

Cobalamin, Merck, Darmstadt

Fleischextrakt, Fluka, Neu-Ulm

Folsäure, Merck, Darmstadt

Hefeextrakt, Merck, Darmstadt

L-Glutamin-[¹³C₅], Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA

L-Glutaminsäure- γ -(*p*-nitroanilid), Sigma-Aldrich, Steinheim

M17 Medium, Merck, Darmstadt

Mangansulfat-Monohydrat, Merck, Darmstadt

Nikotinsäure, Merck, Darmstadt

Panthothensäure, Merck, Darmstadt

PBS-Puffer, Sigma-Aldrich, Steinheim

Pepton, Merck, Darmstadt

Pyridoxalphosphat, Merck, Darmstadt

Riboflavin, Merck, Darmstadt

Thiamin, Merck, Darmstadt

Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Merck, Darmstadt

Tween 80, Merck, Darmstadt

Zellbasierte Rezeptorstudien

2-(Hydroxymethyl)-furan, Sigma-Aldrich, Steinheim

5-Methyl-2-thiophen-2-carboxaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim

5-Methyl-2-furaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim

Buttersäurechlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Invitrogen, Karlsruhe

Fetal-calf-serum (FCS), Biochrom AG, Berlin

Fluo-4-acetoxymethylester, Molecular Probes, Karlsruhe

Furan-2-carbonsäuremethylester, Sigma-Aldrich, Steinheim

Furan-2-carboxaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim

Glutamax-Medium, Invitrogen, Karlsruhe

Hexansäurechlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim

Hygromycin, Sigma-Aldrich, Steinheim

Isobuttersäurechlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim

Isoproterenol, Sigma-Aldrich, Steinheim

N-2-Hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-Ethansulfonsäure (HEPES), Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-2-(4-Methoxyphenoxy)propionat (*Lactisol*), Cargill, Minneapolis, USA
Octansäurechlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin-G, 10000 Units/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin-Streptomycin, Invitrogen, Karlsruhe
Poly-D-Lysin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Probenecid, Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyrrol-2-carboxaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptomycin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetracyclin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Thiophen-2-carboxaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim
Thiophen-2-carbonsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin, Biochrom AG, Berlin

NMR

3-(Trimethylsilyl)propionsäure-d₄, Sigma-Aldrich, Steinheim
Deuteriertes Methanol (MeOD-d₄), Euriso-Top, Gif-Sûr-Yvette, Frankreich
Deuteriumoxid (D₂O), Euriso-Top, Gif-Sûr-Yvette, Frankreich

3.1.3 Materialien

96-Well-Mikrotiterplatten, Greiner Bio-One, Frickenhausen
Bacterial E.Z.N.A-DNA Kit, Omega BioTek, Norcross, GA, USA
Bond Elut NH₂, 1 g/3ml, Varian, Darmstadt
Enzytec D-Glucose/D-Fructose Kit, R-Biopharm, Darmstadt
Enzytec Gluconsäure Kit, R-Biopharm, Darmstadt
QIAquick PCR Purification kit, Qiagen, Hilden
RC-S Membranfilter, 0,45 µm, Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel
Sephadextm LH-20, GE-Healthcare, München
Strata C18, 55 µm, 10 g/60 ml Giga Tubes, Phenomenex, Aschaffenburg
Vivaflow 200, 5000 MWCO PES Membran, Sartorius, Göttingen
Wang-Harz, Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Die Untersuchungen zur Mikroflora des Parmesankäses (siehe Kapitel 3.4.3) wurden am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der TU München (Prof. Dr. Rudi F. Vogel) in Freising in Zusammenarbeit mit Dr. Jürgen Behr und PD Dr. Matthias A. Ehrmann durchgeführt. Neben den aus dem vorliegenden Parmesankäse isolierten Bakterienstämmen wurden weitere Untersuchungen mit folgenden Bakterienstämmen durchgeführt: *Lactobacillus rhamnosus* (DSM8744, DSM8745, DSM8746), *L. paracasei ssp. paracasei* (DSM5622^T), *L. paracasei ssp. tolerans* (DSM20258^T) und *L. delbrueckii* (TMW1.442; TMW: Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, TU München, Freising-Weihenstephan).

3.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Untersuchungen zur Aktivierung des Süßrezeptors durch verschiedene Furan-, Thiophen- und Pyrrolderivate (siehe Kapitel 3.5.5) wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. Meyerhof am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke mit Unterstützung von Dr. Anne Brockhoff und Juliane Bojahr durchgeführt.

3.4 Parmesankäse

3.4.1 Herstellung eines Wasserextraktes

Parmesankäse (50 g), der zuvor mit einem Küchenmesser zerkleinert wurde, wird in einem Zentrifugenbecher mit entionisiertem Wasser (300 ml) versetzt und mittels eines Ultra-Turrax T25 digital (Ika Labortechnik, Staufen) für 5 Minuten bei 12000 rpm homogenisiert. Die Suspension wird anschließend bei 4 °C und 9000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert (Avanti J-E, Beckmann-Coulter, Krefeld) und der wässrige Überstand durch Filtration von der Protein- und Fettschicht getrennt. Protein und Fettschicht werden ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen extrahiert, die wässrigen Phasen vereinigt und anschließend gefriergetrocknet. Der so erhaltene wasserlösliche Extrakt (WE) wird im Mörser homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Proteinschicht wird ebenfalls gefriergetrocknet und homogenisiert. Fett- und Proteinphase werden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Quantitative Analysen

3.4.2.1 Quantitative Analysen mittels HPIC

Für die Quantifizierungen mittels Ionenchromatographie wird WE-24 in angemessener Menge eingewogen (25 mg), in Millipore Wasser (50 ml) gelöst, membranfiltriert (0,45 µm, RC-S, Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel) und für die Analyse verwendet.

3.4.2.1.1 Anionen

Die Anionen Chlorid, Phosphat und Lactat werden an HPIC-System 1 (siehe Kapitel 3.7.3) unter Verwendung der folgenden Parameter bestimmt.

Stationäre Phase:	Ion Pac [®] AS 11-HC, 250 × 2 mm (Dionex, Idstein)
Vorsäule:	Ion Pac [®] AG 11-HC, 5 × 2 mm (Dionex, Idstein)
Temperatur:	30 °C
Detektion:	Leitfähigkeit
Suppressor:	ASRS [®] Ultra II (2mm)
Suppressorstrom:	76 mA
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	0,38 ml/min
Mobile Phase:	A: H ₂ O B: 5 mM NaOH C: 100 mM NaOH
Gradient:	0 min: 80 % A; 20 % B; 0 % C 8 min: 80 % A; 20 % B; 0 % C 18 min: 85 % A; 0 % B; 15 % C 28 min: 70 % A; 0 % B; 30 % C 38 min: 40 % A; 0 % B; 60 % C 40 min: 80 % A; 20 % B; 0 % C 50 min: 80 % A; 20 % B; 0 % C

Die Quantifizierung erfolgt extern mittels 6-Punkt-Kalibration (0,1 – 100 mg/l) unter Verwendung der Referenzsubstanzen Natriumchlorid, Natriumphosphat und Natriumlactat.

3.4.2.1.2 Mineralische Kationen

Mineralische Kationen werden an HPIC-System 2 (siehe Kapitel 3.7.3) unter Verwendung der folgenden Parameter bestimmt.

Stationäre Phase:	IonPac [®] CS16, 250 × 3 mm (Dionex)
Vorsäule:	IonPac [®] CG16, 50 × 3 mm (Dionex)
Temperatur:	40 °C
Detektion:	Leitfähigkeitsdetektion
Suppressor:	CSRS [®] Ultra II (2 mm)
Suppressorstrom:	37 mA
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	0,36 ml/min
Mobile Phase:	30 mM Methansulfonsäure
Gradient:	isokratisch, 20 min

Die Quantifizierung erfolgt extern mittels 6-Punkt-Kalibration (0,1 – 100 mg/l) unter Verwendung der Referenzsubstanzen Calciumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid und Natriumchlorid.

3.4.2.2 Quantitative Analysen mittels LC-MS/MS

3.4.2.2.1 Freie Aminosäuren

Der WE aus Käse der verschiedenen Reifestufen wird in angemessener Menge eingewogen (20 mg), in Millipore-Wasser (50 ml) gelöst, membranfiltriert, ein Aliquot (990 µl) mit einer Lösung der internen Standards (10 µl; je 1 mg/l) versetzt und für die Analyse verwendet. Die Bestimmung der freien Aminosäuren erfolgt mittels der jeweiligen isotope markierten Standards an LC-MS-System 1 (siehe Kapitel 3.8.2.1).

Polarität:	positiv
Scan Modus:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Quellenspannung:	+5500 V
Curtain gas:	25 (N ₂)
Temperatur:	650 °C
Nebulizer gas:	50 (Druckluft)
Heater gas:	60 (N ₂)
CAD:	Medium
EP:	10
Stationäre Phase:	TSKgel Amide 80, 150 × 4,6 mm, 3 µm (Tosoh Bioscience, Stuttgart)
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	1 ml/min
Mobile Phase:	A: 5 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/H ₂ O (95/5, v/v, pH 3,5) B: 5 mM Ammoniumacetat in H ₂ O (pH 3,5)
Gradient:	0 min: 85 % A; 15 % B 3 min: 85 % A; 15 % B 10 min: 75 % A; 25 % B 15 min: 50 % A; 50 % B 18 min: 0 % A; 100 % B 22 min: 0 % A; 100 % B 25 min: 85 % A; 15 % B 35 min: 85 % A; 15 % B

Unmarkierte und markierte Referenzen werden in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von 0,04 bis 5 gemischt, wobei die Konzentration der internen Standards konstant bleibt (1 mg/l). Kalibriergeraden und Responsefaktoren werden durch das Auftragen der Flächenverhältnisse (Fläche Analyt/Fläche IS) gegen die Konzentrationsverhältnisse (Konzentration Analyt/Konzentration IS) erhalten (8 Messpunkte).

Tabelle 33. Für die Quantifizierung der einzelnen Aminosäuren verwendeten Massenübergänge (m/z), Dwell time (msec), Declustering Potential (DP in V), Collision Energy (CE in V), Cell Exit Potential (CXP in V) sowie jeweils ermittelter Responsefaktor (Rf).

Aminosäure	m/z	Dwell time	DP	CE	CXP	Rf
Glycin	76,0→76,0	10	+31	+5	+6	1,46
Glycin-[¹³ C ₂]	78,1→78,0	10	+37	+6	+5	
L-Alanin	90,1→90,0	10	+26	+5	+6	0,82
L-Alanin-[¹³ C ₃]	93,0→93,0	10	+41	+5	+5	
L-Serin	106,1→60,0	10	+26	+17	+4	1,17
L-Serin-[¹³ C ₃]	109,1→62,0	10	+38	+16	+5	
L-Prolin	116,0→70,0	10	+21	+21	+4	1,44
L-Prolin-[¹³ C ₅ - ¹⁵ N]	122,0→75,0	10	+73	+25	+5	
L-Valin	118,1→72,1	10	+21	+15	+6	1,07
L-Valin-[¹³ C ₅]	124,0→77,0	10	+64	+14	+10	
L-Threonin	120,1→73,9	10	+36	+17	+6	0,93
L-Threonin-[¹³ C ₄]	125,0→78,0	10	+32	+14	+5	
L-Leucin	132,1→86,0	10	+41	+15	+6	1,01
L-Leucin-[¹³ C ₂]	134,1→87,9	10	+46	+15	+6	
L-Isoleucin	132,2→86,1	10	+41	+15	+6	1,58
L-Isoleucin-[¹³ C ₆]	138,0→91,0	10	+47	+14	+10	
L-Asparagin	132,9→73,9	10	+46	+19	+6	0,85
L-Asparagin-[¹⁵ N ₂]	135,0→89,0	10	+39	+14	+5	
L-Asparaginsäure	134,1→87,9	10	+46	+15	+6	1,71
L-Asparaginsäure-[¹³ C ₄ - ¹⁵ N]	139,0→93,0	10	+76	+31	+10	
L-Glutamin	147,0→130,0	10	+46	+23	+6	0,96
L-Glutamin-[¹³ C ₅]	152,0→135,0	10	+43	+14	+10	
L-Glutaminsäure	148,1→84,0	10	+31	+23	+6	1,23
L-Glutaminsäure-[¹³ C ₅ - ¹⁵ N]	154,0→89,0	10	+41	+5	+5	
L-Lysin	147,0→84,0	10	+46	+23	+6	1,68
L-Lysin-[¹³ C ₆ - ¹⁵ N ₂]	155,0→90,0	10	+44	+23	+10	
L-Methionin	150,1→104,0	10	+31	+15	+8	1,27
L-Methionin-[d ₃]	153,1→107,0	10	+50	+14	+10	
L-Histidin	156,1→110,0	10	+41	+21	+8	1,36
L-Histidin-[¹³ C ₆]	162,0→115,0	10	+46	+21	+10	
L-Phenylalanin	166,0→120,0	10	+51	+19	+10	1,16
L-Phenylalanin-[d ₅]	171,0→125,0	10	+48	+19	+10	
L-Arginin	175,1→70,1	10	+36	+33	+4	1,22
L-Arginin-[¹³ C ₆]	181,0→74,0	10	+78	+36	+5	
L-Tyrosin	182,1→136,0	10	+26	+19	+10	1,32
L-Tyrosin-[d ₄]	186,1→140,0	10	+38	+19	+10	
L-Tryptophan	205,1→146,0	10	+41	+25	+12	1,99
L-Tryptophan-[d ₅]	210,1→150,0	10	+40	+26	+10	

3.4.2.2.2 α - und γ -Glutamylpeptide

Zerkleinerter Parmesankäse (2 g) wird genau in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml, Roth, Karlsruhe) eingewogen, mit einer Lösung des internen Standards γ -Glu-Ala- $^{13}\text{C}_3$ (**25**) (325 μl ; 0,2 mg/l) versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte (GFL, Burgwedel) behandelt. Anschließend wird die Probe mit Salzsäure (0,1 M; 20 ml) versetzt und für 1 Minute mittels Ultra Turrax extrahiert. Nach Zentrifugation wird die wässrige Phase in einen Messkolben (50 ml) überführt, mit Wasser aufgefüllt, membranfiltriert (0,45 μm) und nach weiterer Verdünnung (1+3; v/v) zur Analyse verwendet.

Milch (0,5 ml) wird in ein Eppendorf-Cap (1,5 ml) überführt, mit einer Lösung des internen Standards γ -Glu-Ala- $^{13}\text{C}_3$ (**25**) (10 μl ; 0,2 mg/l) versetzt und für 30 Sekunden auf einem Vortexer behandelt. Nach Zugabe von Acetonitril (100 μl) wird erneut gevortext und die Probe anschließend zentrifugiert (12000 rpm, 4 °C, 20 min). Der erhaltene klare Überstand wird für die Analyse verwendet.

Die Detektion erfolgt an LC-MS-System 1 (siehe Kapitel 3.8.2.1).

Polarität:	positiv
Scan Modus:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Quellenspannung:	+5500 V
Curtain gas:	25 (N_2)
Temperatur:	400 °C
Nebulizer gas:	45 (Druckluft)
Heater gas:	55 (N_2)
CAD:	Medium
EP:	10
Stationäre Phase:	Luna PFP, 150 \times 2,0 mm, 3 μm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Injektionsvolumen:	5 μl
Mobile Phase:	A: Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure B: H_2O , 0,1 % Ameisensäure
Flussrate:	0,2 ml/min
Gradient:	0 min: 0 % A; 100 % B 14 min: 100 % A; 0 % B 17 min: 100 % A; 0 % B 20 min: 0 % A; 100 % B

30 min: 0 % A; 100 % B

Tabelle 34. Zur Quantifizierung der Glutamylpeptide verwendete Massenübergänge (m/z), Dwell time (msec), Declustering Potential (DP in V), Collision Energy (CE in V) und Cell Exit Potential (CXP in V) sowie der Responsefaktor (Rf).

Peptid	m/z	Dwell time	DP	CE	CXP	Rf
α -Glu-Gly (1)	205,2→76,0	10	+36	+19	+6	0,92
γ -Glu-Gly (2)	205,2→76,0	10	+36	+19	+6	1,04
α -Glu-Ala (3)	219,2→90,0	10	+46	+21	+8	1,61
γ -Glu-Ala (4)	219,2→90,0	10	+46	+21	+8	1,27
α -Glu-Val (5)	247,1→118,2	20	+61	+19	+10	0,89
γ -Glu-Val (6)	247,1→118,2	20	+61	+19	+10	4,69
α -Glu-Glu (7)	277,2→84,0	10	+41	+37	+6	2,03
γ -Glu-Glu (8)	277,2→130,0	10	+41	+37	+6	2,57
α -Glu-Tyr (9)	311,2→136,0	10	+46	+31	+6	1,46
γ -Glu-Tyr (10)	311,2→136,0	10	+46	+31	+6	2,08
α -Glu-Asp (11)	263,2→134,0	10	+36	+25	+10	1,92
α -Glu-Trp (12)	334,2→188,0	10	+56	+25	+6	3,99
α -Glu-Thr (13)	249,2→119,9	10	+51	+23	+10	1,71
γ -Glu-Lys (14)	276,2→129,9	10	+76	+25	+12	0,61
γ -Glu-Leu (15)	261,2→85,9	10	+61	+27	+6	6,28
γ -Glu-Ile (16)	261,2→85,9	10	+61	+27	+6	4,11
γ -Glu-Gln (17)	276,1→130,0	10	+71	+27	+10	2,06
γ -Glu-Met (18)	279,1→150,1	10	+61	+21	+4	2,84
γ -Glu-His (19)	285,2→156,0	10	+46	+19	+14	0,95
γ -Glu-Phe (20)	295,2→166,1	10	+66	+19	+4	6,40
γ -Glu-Asp (21)	263,2→134,0	10	+36	+25	+10	0,94
γ -Glu-Thr (22)	249,2→119,9	10	+51	+23	+10	0,88
γ -Glu-Trp (23)	334,2→188,0	10	+56	+25	+6	3,67
α -Glu-Lys (24)	276,2→129,9	10	+76	+25	+12	0,36
γ -Glu-Ala- $^{13}\text{C}_3$ (25)	222,1→93,0	10	+46	+17	+14	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Gly	210,2→76,0	10	+36	+19	+6	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Ala	224,2→90,0	10	+46	+21	+8	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Val	252,1→118,2	20	+61	+19	+10	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Thr	254,2→119,9	10	+51	+23	+10	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Asp	268,2→134,0	10	+36	+25	+10	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Lys	281,2→129,9	10	+76	+25	+12	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Glu	282,2→130,0	10	+41	+37	+6	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Trp	339,2→188,0	10	+56	+25	+6	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Leu/Ile	266,2→85,9	10	+61	+27	+6	n.b.
γ -Glu- $^{13}\text{C}_5$ -Gln	281,1→130,1	10	+71	+27	+10	n.b.
γ -Glu-Gln- $^{13}\text{C}_{10}$	286,1→135,0	10	+71	+27	+10	n.b.

γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Met	284,1→150,1	10	+61	+21	+4	n.b.
γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-His	290,1→156,0	10	+46	+19	+14	n.b.
γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Phe	300,1→166,1	10	+66	+19	+4	n.b.
γ -Glu-[$^{13}\text{C}_5$]-Tyr	316,1→136,0	10	+46	+31	+6	n.b.

Zur Ermittlung der jeweiligen Responsefaktoren werden unmarkierte Analyten und markierte Referenz in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von 0,02 bis 2,5 gemischt, wobei die Konzentration der internen Standards konstant bleibt (0,2 mg/l). Kalibriergeraden und Responsefaktoren werden durch das Auftragen der Flächenverhältnisse (Fläche Analyt/Fläche IS) gegen die Konzentrationsverhältnisse (Konzentration Analyt/Konzentration IS) erhalten (8 Messpunkte).

3.4.2.2.3 Bitterpeptide

Bitterpeptide werden in Anlehnung an *Toelstede und Hofmann* (2009) mittels externer Kalibration (8 Messpunkte) an LC-MS-System 1 (siehe Kapitel 3.8.2.1) quantifiziert.

Polarität:	positiv
Scan Modus:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Quellenspannung:	+5500 V
Curtain gas:	25 (N ₂)
Temperatur:	400 °C
Nebulizer gas:	50 (Druckluft)
Heater gas:	55 (N ₂)
CAD:	Medium
EP:	10
Stationäre Phase:	Synergi Fusion RP 80, 150 × 2,0 mm, 3 μm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Injektionsvolumen:	10 μl
Mobile Phase:	A: Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure B: Millipore Wasser, 0,1% Ameisensäure
Flussrate	0,2 ml/min
Gradient:	0 min: 0 % A; 100 % B 5 min: 0 % A; 100 % B

10 min: 10 % A; 90 % B
 40 min: 45 % A; 55 % B
 45 min: 100 % A; 0 % B
 50 min: 100 % A; 0 % B
 55 min: 0 % A; 100 % B
 60 min: 0 % A; 100 % B

Tabelle 35. Zur Quantifizierung der Bitterpeptide verwendete Massenübergänge (m/z), Dwell time (msec), Declustering Potential (DP in V), Collision Energy (CE in V) und Cell Exit Potential (CXP in V).

Analyt	m/z	Dwell time	DP	CE	CXP
DIKQM	634,3→84,0	15	+101	+107	+6
EIVPN	571,3→230,3	15	+106	+29	+8
GPVRGPF	413,9→70,1	15	+76	+71	+4
IPPLTQTPVVVPP	679,7→70,1	15	+91	+119	+4
IVPN	442,3→70,2	15	+61	+65	+4
LPPL/IPPL	439,2→70,2	15	+86	+91	+2
SITRINK	416,4→70,0	15	+46	+29	+4
SLVYFPGPIHNS	714,6→70,1	15	+46	+99	+4
VRGPF	672,4→70,0	15	+186	+129	+12
VYFPGPIP	550,9→230,2	15	+71	+25	+6
YFPGPIHN	521,4→70,0	15	+150	+103	+10
YFPGPIHNS	564,0→70,1	15	+150	+113	+4
YFPGPIP	501,4→230,2	15	+76	+21	+6
YFPGPIPNS	545,0→70,0	15	+31	+113	+12
LVYFPGPIHN	627,6→70,1	15	+150	+117	+4
YQQPVLGPVRGPFPIIV	941,1→70,0	15	+121	+125	+10

3.4.2.2.4 Biogene Amine

Die Probenaufarbeitung erfolgt, mit leichten Modifikationen, in Anlehnung an *Bütikhofer et al.* (1990). Parmesankäse (5 g) wird genau in einen Zentrifugenbecher eingewogen, mit einer Lösung der internen Standards Histamin-d₄ und Tyramin-d₄ (1 ml, 10 mg/l) versetzt und mit Acetonitril/Perchlorsäure (0,2 M) (50 ml, 1/1; v/v) extrahiert. Ein Aliquot (10 ml) der erhaltenen Suspension wird zentrifugiert und ein Teil (200 µl) des klaren Überstandes mit Acetonitril (800 µl), Millipore Wasser (700 µl) und Natriumcarbonatlösung (200 µl, 200 mg/ml) versetzt. Dansylchlorid (100 µl, 50 mg/ml in Aceton) wird zugegeben und die Lösung für 30 Minuten bei 40 °C unter Lichtausschluss belassen. Nach Zugabe von Natrium-L-(+)-Glutaminat (200 µl, 50 mg/ml) wird die Lösung für eine weitere Stunde unter gleichen

Bedingungen stehen gelassen. Anschließend wird die Probe mit Ethylacetat (1 ml) extrahiert, die organische Phase separiert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Acetonitril (200 µl) aufgenommen und für die Analyse verwendet.

Die Detektion erfolgt an LC-MS-System 2 (siehe Kapitel 3.8.2.2).

Polarität:	positiv
Scan Modus:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Quellenspannung:	+5500 V
Curtain gas:	20 (N ₂)
Temperatur:	350 °C
Nebulizer gas:	50 (Druckluft)
Heater gas:	60 (N ₂)
CAD:	5
Stationäre Phase:	Synergi Fusion RP 80, 150 × 2,0 mm, 5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Injektionsvolumen:	5 µl
Mobile Phase:	A: Ammoniumacetatpuffer, pH 8,0/Ethanol/Acetonitril/Wasser (2/450/450/100; v/v) B: Ammoniumacetatpuffer, pH 8,0/Ethanol/Wasser (30/200/470; v/v)
Flussrate:	0,25 ml/min
Gradient:	0 min: 5 % A; 95 % B 1 min: 5 % A; 95 % B 25 min: 63 % A; 37 % B 28 min: 100 % A; 0 % B 35 min: 100 % A; 0 % B 37 min: 5 % A; 95 % B 45 min: 5 % A; 95 % B

Zur Aufnahme von Kalibrationsgeraden werden Referenzlösungen, die die Analyten enthalten auf die gleiche Weise derivatisiert. Unmarkierte Analyten und markierte Referenz in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von 0,2 bis 5,0 gemischt, wobei die Konzentration der internen Standards konstant bleibt (1 mg/l). Kalibriergeraden und Responsefaktoren werden durch das Auftragen der Flächenverhältnisse (Fläche Analyt/Fläche

IS) gegen die Konzentrationsverhältnisse (Konzentration Analyt/Konzentration IS) erhalten (6 Messpunkte).

Tabelle 36. Zur Quantifizierung der Biogenen Amine verwendete Massenübergänge (m/z), Dwell time (msec), Declustering Potential (DP in V), Collision Energy (CE in V) und Cell Exit Potential (CXP in V) sowie der Responsefaktor (Rf).

Amin-Derivat	m/z	Dwell time	DP	CE	CXP	Rf
Isopentylamin*DCl	321,3→157,1	80	+61	+35	+4	2,26 ^b
Phenylethylamin*DCl	355,2→156,0	80	+56	+47	+4	1,47 ^b
Putrescin*2DCl	555,2→170,1	80	+61	+45	+4	0,95 ^a
Cadaverin*2DCl	569,2→170,1	80	+71	+47	+4	0,73 ^a
Histamin*2DCl	578,2→170,1	80	+81	+43	+4	0,92 ^a
Tyramin*2DCl	604,2→170,1	80	+66	+47	+4	1,03 ^b
Spermidin*3DCl	845,3→170,1	80	+88	+83	+4	0,30 ^a
Spermin*4DCl	1135,5→84,1	80	+131	+125	+4	0,34 ^a
Histamin-d ₄ *2DCl (IS)	582,1→170,1	80	+71	+41	+4	--
Tyramin-d ₄ *2DCl (IS)	608,0→170,1	80	+81	+47	+4	--

^a Responsefaktor wurde über Histamin-d₄ bestimmt, ^b Responsefaktor wurde über Tyramin-d₄ bestimmt. DCl = Dansylchlorid

3.4.2.3 Weitere quantitative Analysen

3.4.2.3.1 Fettsäuren

Freie Fettsäuren werden wie von *Collomb et al.* (2003) beschrieben analysiert. Parmesankäse (1 g) wird genau eingewogen und mit wasserfreiem Na₂SO₄ (2 g), Schwefelsäure (0,3 ml; 2,5 M) und einer Lösung der internen Standards (1 ml: Iso-Valeriansäure (0,69 mg/ml), Pelargonsäure (0,52 mg/ml), Tridecansäure (0,92 mg/ml) und Heptadecansäure (0,66 mg/ml in Diethylether/Heptan, je 1/1, v/v) in einem Mörser homogenisiert. Die Mischung wird in ein Zentrifugenglas überführt und dreimal mit Diethylether/Heptan (3 ml, 1/1, v/v) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und auf eine Bond-Elut-NH₂-SPE-Kartusche (1 g/3 ml; Varian, konditioniert mit 10 ml Heptan) aufgebracht. Unpolare Verbindungen werden mit Dichlormethan/2-Propanol (7 ml, 3/1, v/v) und freie Fettsäuren mit Diethylether/Ameisensäure (7 ml, 49/1, v/v) eluiert. Die organische Phase wird auf ein Volumen von 5 ml gebracht und 5 µl zur Analyse mittels GC-FID verwendet (siehe Kapitel 3.7.4).

3.4.2.3.2 Fettgehalt

Der Fettgehalt wird mittels der gravimetrischen Mikromethode nach *Schulte* (2001) bestimmt. Parmesankäse (5 g) wird genau in ein Zentrifugenglas eingewogen und mit Millipore Wasser (2 ml), Salzsäure (5 ml; 25 %) und Toluol (5 ml) versetzt. Nach intensivem Schütteln wird die Suspension unter gelegentlichem Schütteln für 2 Stunden bei 120 °C im Trockenschrank belassen. Nach Abkühlen und Zentrifugation (3000 rpm, 4 min; Biofuge primo, Kendro, Langenselbold) wird ein Aliquot der Toluolphase (1 ml) in ein vorgewogenes Vial überführt und auf 110 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Probe ausgewogen und der Fettgehalt nach folgender Formel berechnet:

$$F = \frac{V1 \times 100}{\left(\frac{V2}{A} - \frac{1}{0,92}\right) \times E}$$

F = Fettgehalt [g/100 g]; V1 = Volumen Toluol (5 ml); V2 = abgenommenes Extraktvolumen (1 ml); A = Auswaage in g; E = Probenweinwaage in g.

3.4.2.3.3 Wassergehalt

Der Wassergehalt der Käseproben wird in Dreifach-Bestimmung nach Methode *L 03.00-9* (Februar 2007) des Lebens- und Futtermittelgesetzbuches (§ 64 LFGB) ermittelt.

Reiner Seesand (30 – 40 g) wird, zusammen mit einem Glaspistill genau eine Glasschale eingewogen und im Vakuumtrockenschrank bei 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen im Exsikkator wird die Schale ausgewogen, danach die Käseprobe genau eingewogen (5 g) und mittels des Pistills gleichmäßig verrieben. Anschließend wird die Probe für 2 Stunden bei 70 °C im Vakuumtrockenschrank belassen, im Exsikkator abgekühlt und gewogen. Der Vorgang wird bis zur Gewichtskonstanz wiederholt und der Wassergehalt berechnet.

3.4.2.3.4 GGT-Aktivität

Die γ -Glutamyltransferase-Aktivität (GGT) wird im Parmesankäse aller Reifestufen, in Rohmilch, erhitzten Milchproben und Bakterienstämmen photometrisch nach der Methode von *Blel et al.* (2002) bestimmt.

Thermische Behandlung von Milchproben

Milch (2 ml) wird in Zentrifugenröhrchen pipettiert, unter definierten Bedingungen erhitzt (**Tabelle 37**) und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt.

Tabelle 37. Verwendete Parameter (Temperatur, Zeit und Volumen) für die Erhitzung von Rohmilch.

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Volumen [ml]
55	60	2
55	10	2
60	10	2
65	10	2
70	10	2
75	10	2
100	1	2

Aufarbeitung von Milch- und Käseproben

Milchproben werden mit pasteurisierter Milch verdünnt (1:20; v/v) und ohne weitere Behandlung zur Analyse verwendet.

Käse (5 g) wird in Wasser (100 ml) suspendiert und für 1 Minute mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Die Suspension wird zur Analyse verwendet.

Aufarbeitung von *Lactobacillen*

Lactobacillus-Stämme (vgl. Kapitel 3.4.3) werden für 3 Tage bei 30 °C in mMRS Medium kultiviert, mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet. Die anschließende Aufarbeitung für die photometrische Analyse erfolgt mit zwei unterschiedlichen Methoden:

- In Anlehnung an *Toelstede und Hofmann* (2009) wird das lyophilisierte Zellmaterial in flüssigem Stickstoff homogenisiert, ein Anteil (10 mg) mit Tris-Puffer (pH 8,8; 1 ml) unter Schwenken extrahiert (30 Minuten, Eisbad) und ein Aliquot (200 µl) für die Analyse verwendet.
- Lyophilisiertes Zellmaterial (10 mg) wird mit Lyozym (1 ml; 10 mg/ml) im Wasserbad (1 Stunde, 37 °C) und anschließend im Ultraschallbad behandelt. Zellreste und Zellextrakt werden durch Zentrifugation abgetrennt (6000 g, 10 min) und ein Aliquot (200 µl) des Überstandes für die Analyse verwendet.

Analyse der GGT-Aktivität

In einem Schraubdeckelglas (10 ml) wird Tris-HCl-Puffer (2 ml; 100 mmol/l; pH 8,5), der γ -Glutamyl-*p*-nitroanilid (4 mmol/l) und Glycylglycin (40 mmol/l) enthält, für zwei Minuten bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wird Milch- oder Käseprobe (100 μ l) bzw. *Lactobacillus*-Probe (200 μ l) zugegeben und die Suspension für 15 (Milch) bzw. 30 Minuten (Käse; *Lactobacillen*) bei 37 °C belassen. Anschließend wird Clarifying-Reagenz für Milchprodukte zugegeben und die Suspension weitere zwei (Milch) bzw. fünf Minuten (Käse; *Lactobacillen*) im Wasserbad belassen. Im Falle der *Lactobacillen* wird anstatt Clarifying-Reagenz Essigsäure (2 M) verwendet. Die Messung des freigesetzten *p*-Nitroanilids erfolgt bei einer Wellenlänge von 410 nm am Photometer (UV-2401 PC, Shimadzu, Duisburg). Zur quantitativen Erfassung wird eine Kalibrationsreihe (0,004 – 1,75 mmol/l; 8-Punkt-Kalibration) von *p*-Nitroanilid in pasteurisierter Milch bzw. Essigsäure (2 M) mitgeführt.

3.4.3 Untersuchung der Mikroflora von Parmesankäse

3.4.3.1 Isolierung der Mikroflora

M17-Medium: M-17 (48 g/l); Agar (15 g/l; bei festem Medium)

mMRS-Medium (pH 6,5): Glucose*H₂O (20 g/l), Pepton aus Casein (10 g/l), Fleischextrakt (5 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), Natriumacetat (5 g/l), K₂HPO₄ (2 g/l), (NH₄)₂-Citrat (2 g/l), Tween 80 (10 g/l), MgSO₄*7H₂O (0,1 g/l), MnSO₄*H₂O (0,05 g/l), Biotin (0,2 mg/l), Folsäure (0,2 mg/l), Nikotinsäure (0,2 mg/l), Pyridoxalphosphat (0,2 mg/l), Thiamin (0,2 mg/l), Riboflavin (0,2 mg/l), Cobalamin (0,2 mg/l), Panthothensäure (0,2 mg/l), Agar (15 g/l; bei festem Medium)

Die Isolierung wird mit Parmesan-Proben aller drei Reifestufen durchgeführt. Parmesankäse (10 g) wird zusammen mit Peptonwasser (90 ml; 20 g/l) in einen Stomacher-Beutel gegeben und in einem Stomacher homogenisiert (1 min, Stomacher 400, Colworth, London, Großbritannien). Die Suspension wird 5-mal sukzessive mit Peptonwasser verdünnt (je 1:10) und Aliquote (100 μ l) der erhaltenen Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻⁵ werden jeweils sechsmal auf

Die Amplifizierung erfolgt mit folgendem Temperaturprogramm: 94 °C (2 min); 32 × 94 °C (45 s), 52 °C (90 s), 72 °C (2 min); 72 °C (5 min).

Die PCR-Produkte werden erneut elektrophoretisch analysiert, mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, und die ca. 1200 Basenpaare langen Sequenzen einer Sequenzanalyse unterzogen (GATC Biotech, Konstanz) (Basenpaarabfolge siehe **Tabelle 48**, Kapitel 6). Die Identifizierung der Sequenzen erfolgt über die Software BLASTn (NCBI, Bethesda, MD, USA) und GenBank Datenbank (NCBI, Bethesda, MD, USA) sowie über Multi-Sequenzabgleich mit der ClustalW Software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (EBI, Hinxton, Groß-Britannien).

3.4.4 Inkubationsexperimente mit L-Glutamin-[¹³C₅]

3.4.4.1 Inkubation von Parmesankäse

Parmesankäse (P-24) wird mit einem Küchenmesser zerkleinert und in ein steriles Schraubdeckelglas eingewogen (5 g). Eine wässrige Lösung von L-Glutamin-[¹³C₅] (2,5 ml; 20 mmol/l) wird zugegeben und die Probe unter leichtem Umschwenken für 21 Tage bei Raumtemperatur belassen. Eine gleiche Menge Käse, der Millipore Wasser (2,5 ml) zugegeben wird, wird als Blindwert mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben extrahiert und mittels LC-MS/MS auf die Anwesenheit von ¹³C₅-markierten Glutamylpeptiden hin untersucht (siehe Kapitel 3.4.2.2.2). Für quantitative Untersuchungen werden Probe und Blindwert als Duplikate angesetzt und extrahiert.

3.4.4.2 Inkubationen von Bakterienstämmen

Die isolierten Stämme K1 – K7 von *Lb. casei* und *Lb. harbinensis* sowie die Stämme DSM8744, DSM8745, DSM8746 (*Lb. rhamnosus*), DSM5622^T (*Lb. paracasei ssp. paracasei*), DSM20258^T (*Lb. paracasei ssp. tolerans*) und TMW1.442 (*Lb. delbrueckii*) werden für 3 Tage bei 30 °C in mMRS Medium (siehe Kapitel 3.4.3.1) kultiviert und anschließend je zweimal mit frischem mMRS-Medium (10 ml) und Inkubationspuffer (10 ml; 6,8 g/l KH₂PO₄, 0,1 g/l MgSO₄*7H₂O, 0,05 g/l MnSO₄*H₂O, pH 6,5) gewaschen. Das jeweils erhaltene Zellpellet wird in einem sterilen Plastikröhrchen in Inkubationspuffer (8 ml) suspendiert und eine Lösung (2 ml) verschiedener Aminosäuren zugegeben (L-Glutamin-

[¹³C₅]: 25 mmol/l, L-Histidin, L-Methionin, L-Leucin, L-Glutaminsäure, L-Alanin; je 5 mmol/l). Die Suspensionen werden für 21 Tage bei Raumtemperatur inkubiert, wobei nach 0, 1, 3, 7, 14 und 21 Tagen Aliquote (500 µl) entnommen werden. Diese werden membranfiltriert (0,45 µm) und mittels LC-MS/MS auf die Anwesenheit von ¹³C₅-markierten Glutamylpeptiden hin untersucht (siehe Kapitel 3.4.2.2.2).

3.4.4.3 Inkubationen von Rohmilch

Verschiedene Milchproben (1 ml) werden mit wässrigen Lösungen (25 µl), die unterschiedliche Aminosäuren enthalten (**Tabelle 38**), versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen im Eisbad werden die Proben aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS auf die Anwesenheit von ¹³C₅-markierten γ-Glutamylpeptiden hin untersucht (siehe Kapitel 3.4.2.2.2). Rohmilch (1 ml), der nur Wasser (25 µl) zugesetzt wird, wird als Blindprobe mitgeführt. Für quantitative Untersuchungen werden Probe und Blindwert als Duplikate angesetzt und extrahiert.

Tabelle 38. Zur Inkubation verwendete Milchproben, L-Aminosäuren und deren Konzentrationen [mmol/l].

Probe	L-Aminosäure [mmol/l]								
	Gln- [¹³ C ₅]	Glu	His	Met	Phe	Lys	Leu	Asp	Thr
Rohmilch	5	5	-	-	-	-	-	-	-
55 °C, 60 min	5	5	-	-	-	-	-	-	-
55 °C, 10 min	5	5	-	-	-	-	-	-	-
60 °C, 10 min	5	5	-	-	-	-	-	-	-
65 °C, 10 min	5	5	-	-	-	-	-	-	-
70 °C, 10 min	5	5	-	-	-	-	-	-	-
75 °C, 10 min	5	5	-	-	-	-	-	-	-
100 °C, 1 min	5	5	-	-	-	-	-	-	-
Rohmilch	5	5	-	-	-	-	-	-	-
Rohmilch	5	-	5	-	-	-	-	-	-
Rohmilch	5	-	-	5	-	-	-	-	-
Rohmilch	5	-	-	-	5	-	-	-	-
Rohmilch	5	-	-	-	-	5	-	-	-
Rohmilch	5	-	-	-	-	-	5	-	-
Rohmilch	5	-	-	-	-	-	-	5	-
Rohmilch	5	-	-	-	-	-	-	-	5
Rohmilch	40	5	5	5	5	5	5	5	5
Rohmilch	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.4.5 Sensorische Analyse

Im Folgenden werden nur spezielle Parameter für die sensorischen Analysen zum Parmesankäse dargestellt. Allgemeine Bedingungen zur sensorischen Analyse sind in Kapitel 3.6 zusammengefasst.

3.4.5.1 Schwellenwerte

Schwellenwerte in wässriger Lösung werden wie in Kapitel 3.6.2 dargestellt bei einem, dem WE-24 entsprechenden, pH-Wert von 5,3 (eingestellt mit 1 % Ameisensäure) aufgenommen.

Zur Bestimmung der Schwellenwerte für den Kokumi-Effekt der γ -Glutamylpeptide werden γ -Glu-Ile (**16**), γ -Glu-Asp (**21**), γ -Glu-Thr (**22**) und γ -Glu-Trp (**23**) jeweils in einer wässrigen, binären Lösung aus NaCl (10 mmol/l) und Mono-Natriumglutamat (MSG) (30 mmol/l) gelöst, eine Verdünnungsreihe (1+1; v/v) hergestellt und diese im Triangeltest gegen reine Matrixlösung (NaCl + MSG) verkostet.

3.4.5.2 Geschmacksprofilanalyse

Für die Aufnahme des Geschmacksprofils von Parmesan wird P-24 in kleine Würfel (ca. 1 cm Kantenlänge) geschnitten und dem Panel zu Verkostung angeboten. Die Geschmacksqualitäten salzig, sauer, umami, bitter, süß, brennend und kokumi werden auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet.

Für die Aufnahme des Geschmacksprofils von wasserlöslichem Extrakt (WE) wird WE-24 (siehe Kapitel 3.4.1) in seiner natürlichen Konzentration in mineralstoffarmen Sensorikwasser gelöst und der pH Wert der Lösung mit 1 % Ameisensäure auf pH 5,3 gebracht. Nach Verdünnung mit Sensorikwasser (1+2; v/v) wird die Lösung dem Sensorikpanel zu Bewertung angeboten, wobei ebenfalls die Deskriptoren salzig, sauer, umami, bitter, süß, brennend und kokumi auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet werden.

3.4.5.3 Erstellung und sensorische Beurteilung von Rekombinaten

Ein Geschmacksrekombinat in wässriger Lösung wird hergestellt, indem die in **Tabelle 46** (Kapitel 6) aufgeführten Substanzen in ihren natürlichen Konzentrationen in Sensorikwasser gelöst und der pH Wert der Lösung auf 5,3 eingestellt wird. Nach Verdünnung mit Sensorikwasser (1+2; v/v) wird das Rekombinat vom Sensorikpanel gegen eine ebenfalls verdünnte wässrige Lösung des WE-24 (siehe 3.4.5.2) verkostet und bewertet.

Für die Herstellung eines Rekombinates in Parmesanmatrix werden die in **Tabelle 47** (Kapitel 6) aufgeführten Substanzen in ihrer natürlichen Konzentration in Sensorikwasser (28,15 ml) gelöst und der pH-Wert der Lösung auf 5,3 eingestellt. Die Lösung wird in einem Mörser mit der bei der Extraktion des Parmesans erhaltenen Protein- (28,0 g) und Fettschicht (28,15 g) homogenisiert, in Frischhaltefolie eingeschlagen und über Nacht im Kühlschrank belassen. Das so erhaltene Rekombinat wird vom Sensorikpanel gegen den authentischen Parmesan P-24 als Referenz verkostet und bewertet.

3.4.5.4 Omissionsexperimente

Teilrekombinate des WE-24 werden durch Weglassen einzelner Geschmacksstoffe oder Geschmacksstoffgruppen hergestellt (siehe Kapitel 2.1.1.4) und im Triangeltest gegen wässrige Lösungen des WE-24 verkostet und beurteilt. Für den Fall, dass die Panelisten einen Unterschied zwischen Gesamtrekombinat und Teilrekombinat wahrnehmen, werden die Unterschiede durch vergleichende Geschmacksprofilanalyse bewertet.

3.4.6 Synthesen

3.4.6.1 γ -L-Glutamyl-L-aspartat

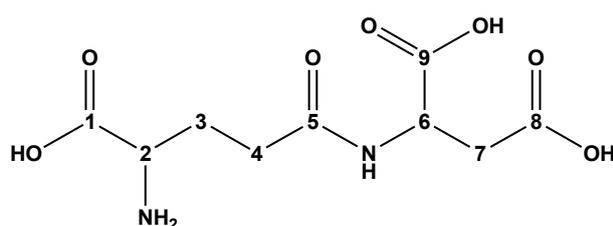
Die Synthese erfolgt nach der von *Chan und White* (2000) beschriebenen Methode der Festphasenpeptidsynthese.

Fmoc-Asp(OtBu)-Wang-Harz (Beladungsdichte: 0,6 – 0,9 mmol/g) (1 g) wird in einen Festphasenreaktor mit Fritte gegeben, 30 Minuten in DMF (5 ml) gequollen und mit DMF (2 × 3 ml) gewaschen. Eine Lösung von Piperidin und DMF (20 ml, 20/80, v/v) wird

zugegeben und die Suspension für 5 Minuten durch Zufuhr von N₂ durchmischt. Das Lösungsmittel wird entfernt, das Harz mit DMF (3 × 3 ml) gewaschen und die Fmoc-Entschützung mittels Ninhydrin-Test überprüft. Dazu wird etwas Wang-Harz entnommen, in einem Vial mit Ninhydrin-Lösung (1 ml; 5 % Ninhydrin in Ethanol) versetzt und bei 110 °C für 3 min erhitzt. Eine blaue Färbung zeigt die Entschützung an. Fmoc-Glu-OtBu (4,5 mmol), Hydroxybenzotriazol (4,5 mmol) und PyBop[®] (4,5 mmol) werden in DMF (5 ml) gelöst und anschließend DIPEA (9 mmol) zugegeben. Die Lösung wird zum Wang-Harz gegeben und die Suspension für 1 Stunde unter N₂-Zufuhr belassen. Die Vollständigkeit der Reaktion wird mittels Ninhydrin-Test überprüft. Die Fmoc-Entschützung des Glutamyl-Restes wird wie oben beschrieben durchgeführt und überprüft. Das Harz wird mit DMF (3 × 3 ml), Dichlormethan (3 × 3 ml) und Methanol (3 × 3 ml) gewaschen und im Luftstrom getrocknet (10 min). Anschließend wird ein Gemisch aus TFA/H₂O (5 ml, 95/5, v/v) zugegeben und die Suspension über Nacht unter N₂-Zufuhr belassen. Die Lösung, die das entschützte γ -L-Glutamyl-Dipeptid enthält, wird abgesaugt, das Harz mit TFA (2 × 3 ml) gewaschen und die Lösungen vereinigt.

Nach Lyophilisation wird das Reaktionsprodukt chromatographisch aufgereinigt (Präparative HPLC mit ELSD-Detektion, Monochrom MS-Phase, Gradient 1 (siehe Kapitel 3.7.2) und nach erneuter Gefriertrocknung als weißes, amorphes Pulver mit einer Reinheit von 99 % erhalten.

Spektroskopische Daten:



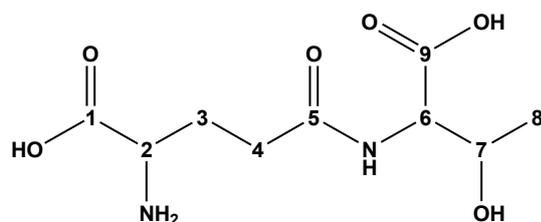
γ -L-Glutamyl-L-aspartat (21): 0,43 mmol; 48 – 72 % Ausbeute; LC-MS (ESI⁺), *m/z* 263 (100, [M+H]⁺), 285 (60, [M+Na]⁺), 200 (20, [M-62]⁺), 134 (70, [M-128]⁺), 130 (25, [M-132]⁺), 84 (80, [M-178]⁺); ¹H-NMR (500

MHz, D₂O, COSY) δ [ppm] 1.71 [m, 2H, *J* = 4.0, 8.0 Hz, H-C(3)], 2.18 [m, 2H, *J* = 4.0, 8.0 Hz, H-C(4)], 2.36 [dd, 1H, *J* = 4.0, 16.0 Hz, H-C(7a)], 2.55 [dd, 1H, *J* = 4.0, 16.0 Hz, H-C(7b)], 3.11 [dd, 1H, *J* = 4.0, 8.0 Hz, H-C(2)], 4.26 [dd, 1H, *J* = 4.0, 12.0 Hz, H-C(6)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC) δ [ppm] 30.9 [C(3)], 32.3 [C(4)], 39.7 [C(7)], 53.1 [C(6)], 55.5 [C(2)], 175.4 [C(5)], 178.8 [C(8)/C(9)], 178.9 [C(9)/C(8)], 182.8 [C(1)].

3.4.6.2 γ -L-Glutamyl-L-threonin

Die Synthese und Aufreinigung erfolgt wie unter 3.4.6.1 beschrieben, als Edukt dient Fmoc-Thr(tBu)-Wang-Harz (Beladungsdichte: 0,4 – 0,6 mmol/g).

Spektroskopische Daten:



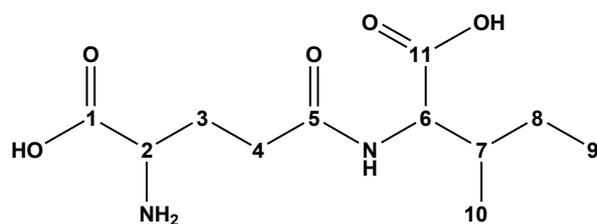
γ -L-Glutamyl-L-threonin (22): 0,32 mmol; 53 – 80 % Ausbeute; LC-MS (ESI⁺), m/z 249 (100, [M+H]⁺), 271 (60, [M+Na]⁺), 186 (18, [M-62]⁺), 130 (28, [M-118]⁺), 120 (60, [M-128]⁺), 84 (60, [M-164]⁺); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY)

δ [ppm] 1.10 [d, 3H, J = 8.0 Hz, H-C(8)], 2.10 [ddd, 2H, J = 4.0, 8.0, 16.0 Hz, H-C(3)], 2.50 [ddd, 2H, J = 4.0, 8.0, 16.0 Hz, H-C(4)], 3.85 [t, 1H, J = 8.0, 12.0 Hz, H-C(2)], 4.28 [m, 1H, J = 4.0, 8.0 Hz, H-C(7)], 4.35 [d, 1H, J = 4.0 Hz, H-C(6)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC) δ [ppm] 18.8 [C(8)], 25.9 [C(3)], 31.1 [C(4)], 53.1 [C(2)], 58.2 [C(6)], 67.0 [C(7)], 172.6 [C(1)], 173.9 [C(9)], 174.9 [C(5)].

3.4.6.3 γ -L-Glutamyl-L-isoleucin

Die Synthese und Aufreinigung erfolgt wie unter 3.4.6.1 beschrieben, als Edukt dient Fmoc-Ile-Wang-Harz (Beladungsdichte: 0,6 mmol/g).

Spektroskopische Daten:



γ -L-Glutamyl-L-isoleucin (16): 0,5 mmol; 92 % Ausbeute; LC-MS (ESI⁺), m/z 261 (100, [M+H]⁺), 283 (30, [M+Na]⁺), 198 (20, [M-62]⁺), 132 (30, [M-128]⁺), 86 (80, [M-174]⁺), 84 (60, [M-176]⁺); ¹H-NMR (500

MHz, D₂O, COSY) δ [ppm] 0.89 [t, 3H, J = 4.0, 8.0 Hz, H-C(9)], 0.93 [d, 3H, J = 8.0 Hz, H-C(10)], 1.22 [m, 1H, J = 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 Hz, H-C(8a/b)], 1.45 [m, 1H, J = 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 Hz, H-C(8b/a)], 1.89 [m, 1H, J = 4.0, 8.0, 12.0 Hz, H-C(7)], 2.13 [ddd, 2H, J = 4.0, 8.0, 12.0 Hz, H-C(3)], 2.50 [dd, 2H, J = 4.0, 8.0 Hz, H-C(4)], 3.79 [t, 1H, J = 4.0 Hz, H-C(2)], 4.22 [d, 1H, J = 4.0 Hz, H-C(6)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC) δ [ppm] 13.7

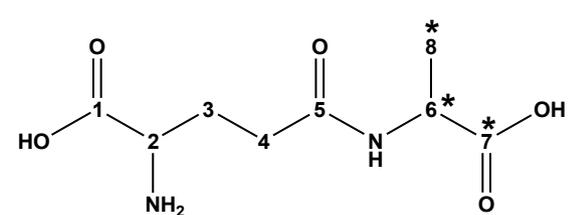
[C(9)], 18.0 [C(10)], 27.6 [C(8)], 29.3 [C(3)], 34.3 [C(4)], 39.3 [C(7)], 57.1 [C(2)], 61.6 [C(6)], 176.8 [C(1)], 177.7 [C(5)], 179.7 [C(11)].

3.4.6.4 γ -L-Glutamyl-L-alanin- $^{13}\text{C}_3$

Im ersten Syntheseschritt erfolgt die Kopplung von Fmoc-Alanin- $^{13}\text{C}_3$ an das Wang-Harz. Dazu wird nicht-beladenes Wang-Harz (1 g) in einen Festphasenreaktor gegeben, für 30 Minuten in Dichlormethan (5 ml) gequollen und anschließend mit Dichlormethan (3 x 3 ml) und DMF (3 x 3 ml) gewaschen. Fmoc-Alanin- $^{13}\text{C}_3$ (0,8 mmol) wird unter Rühren in Dichlormethan (3 ml) gelöst, mit einer Lösung (2 ml) von 1,3-Diisopropylcarbodiimid (0,4 mmol in Dichlormethan) versetzt und das Gemisch für 20 Minuten bei 0 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in DMF (1 ml) gelöst, zum Wang-Harz gegeben und die Suspension mit DMAP (0,2 mmol in DMF, 2 ml) versetzt. Nach 1 Stunde wird das Lösungsmittel aus dem Reaktionsgemisch entfernt, dieses mit DMF (5 x 3 ml) gewaschen und anschließend Benzoesäureanhydrid (0,8 mmol in Pyridin) zugegeben. Nach 30 Minuten wird das Lösungsmittel entfernt und das beladene Harz mit DMF (3 x 3 ml) gewaschen.

Im zweiten Schritt erfolgt die Kopplung des Glutamyl-Restes an das Fmoc-Ala- $^{13}\text{C}_3$ -Wang-Harz sowie die Aufreinigung des Reaktionsproduktes. Dieses wird wie in Kapitel 3.4.6.1 beschrieben durchgeführt.

Spektroskopische Daten:



γ -L-Glutamyl-L-alanin- $^{13}\text{C}_3$ (**25**): 0,21 mmol;
18 % Ausbeute; LC-MS (ESI⁺), m/z 222 (100, [M+H]⁺), 244 (10, [M+Na]⁺), 205 (55, [M-55]⁺), 130 (45, [M-91]⁺), 93 (90, [M-128]⁺), 84 (20,

[M-137]⁺); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY) δ [ppm] 1.25 [dddd, 3H, $J = 4.0, 8.0, 12.0$ Hz, $J_{C,H} = 160,0$ Hz, H-C(8)], 2.03 [m, 2H, $J = 4.0, 8.0, 16.0$ Hz, H-C(3)], 2.36 [dd, 2H, $J = 8.0, 16.0$ Hz, H-C(4)], 3.67 [dd, 1H, $J = 4.0, 8.0$ Hz, H-C(2)], 4.09 [dddd, 1H, $J = 4.0, 8.0, 12.0$ Hz, $J_{C,H} = 180,0$ Hz, H-C(6)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC) δ [ppm] 16.7 [d, $J = 43.8$ Hz, C(8)], 26.2 [C(3)], 31.2 [C(4)], 50.2 [dd, $J = 43.8, 68.8$ Hz, C(6)], 54.2 [C(2)], 173.9 [C(1)], 174.1 [C(5)], 178.9 [d, $J = 68.8$ Hz, C(7)].

3.5 Balsamico Essig

3.5.1 Ultrafiltration von ABTM

System:	Statische Ultrafiltrationsdruckzelle Vivacell 250 (Vivascience, Hannover)
Membran:	Polyethersulfon, Cut-Off: 5 kDa (Vivascience, Hannover)
Druck:	4 bar (Druckluft)

Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (ABTM) (10 ml) wird mit Millipore-Wasser (200 ml) verdünnt und in das Ultrafiltrationssystem, das zuvor mit Millipore Wasser (2 × 200 ml) konditioniert wurde, gegeben. Das System wird auf einer Schüttelplatte (GFL, Burgwedel) bei 200 rpm belassen. Nach der ersten Filtration wird das Retentat erneut mit Millipore Wasser (2 × 200 ml) verdünnt und die Filtration unter gleichen Bedingungen fortgesetzt. Die Filtrate (≤ 5 kDa, = niedermolekulare Fraktion (NMF)) werden vereinigt, das verbleibende Retentat (> 5 kDa, = hochmolekulare Fraktion (HMF)) in Millipore Wasser (50 ml) aufgenommen und beide Phasen gefriergetrocknet.

3.5.2 Gelabsorptionschromatographie (GAC)

Ein Teil der Niedermolekularen Fraktion (NMF) (1 g) wird in Methanol/H₂O (10 ml, 20/80, v/v) gelöst und auf eine Glassäule (XK 50/100, 100 x 5 cm, Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden), gepackt mit LH-20[™] Material (GE Healthcare, München), konditioniert mit Methanol/H₂O (20/80, v/v), gegeben. Die chromatographische Trennung erfolgt durch sukzessive Elution mit Methanol/H₂O (400 ml, 20/80, v/v), Methanol/H₂O (400 ml, 40/60, v/v), Methanol/H₂O (400 ml, 60/40, v/v), Methanol/H₂O (400 ml, 80/20, v/v) und reinem Methanol (400 ml) bei einer Flussrate von 1,2 ml/min (Peristaltikpumpe P-1, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Das Eluat wird in Intervallen von 10 Minuten in Reagenzgläsern gesammelt (2070 Ultrarac II, LKB Bromma, Schweden) und anhand des erhaltenen Chromatogramms ($\lambda = 220$ nm, UV-2075, Jasco, Groß-Umstadt) in 10 Fraktionen unterteilt. Die Aufzeichnung des Chromatogramms erfolgt softwaregestützt (LabView, Version 2.0; National Instruments, Austin, Texas, USA) Die Fraktionen werden in Kolben überführt, das Methanol unter Vakuum entfernt und die wässrigen Phasen anschließend

gefriergetrocknet. Die lyophilisierten GAC-Fractionen werden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.5.3 Quantitative Analysen

3.5.3.1 Quantitative Analysen mittels HPIC

Für alle Quantifizierungen mittels HPIC werden die verschiedenen Essigproben (ABTM, ABM und Lagerungsstufen) angemessen mit Millipore-Wasser verdünnt (1:100 für Polyole; 1:200 für organische Säuren; 1:50 für Kationen und Anionen), membranfiltriert und zur Analyse verwendet.

3.5.3.1.1 Polyole

Polyole werden an HPIC-System 2 (siehe Kapitel 3.7.3) unter Verwendung der folgenden Parameter gemessen.

Stationäre Phase:	Carbo Pac [®] MA-1, 250 × 4 mm (Dionex, Idstein)
Vorsäule:	Carbo Pac [®] MA-1, 50 × 4 mm (Dionex, Idstein)
Temperatur:	30 °C
Detektion:	gepulste Amperometrie
Elektrode:	Gold (Dionex ED50)
Referenzelektrode:	Ag/AgCl
Injektionsvolumen:	5 µl
Flussrate:	0,4 ml/min
Mobile Phase:	480 mM NaOH
Elution:	isokratisch, 70 min

Die Quantifizierung erfolgt extern mittels 6-Punkt-Kalibration (0,1 – 100 mg/l) unter Verwendung der Referenzsubstanzen Arabitol, 2,3-Butandiol, Erythritol, Glycerin, Inositol, Mannitol, 1,2-Propandiol, Ribitol, Sorbitol und Xylitol.

3.5.3.1.2 Organische Säuren

Organische Säuren werden an HPIC-System 2 (siehe Kapitel 3.7.3) unter Verwendung der folgenden Parameter gemessen.

Stationäre Phase:	Ion Pac [®] ICE-AS-6, 250 × 9 mm (Dionex, Idstein)
Temperatur:	30 °C
Detektion:	Leitfähigkeit
Suppressor:	AMMS-ICE II
Regenerant:	5 mM Tetrabutylammoniumhydroxid (3 ml/min)
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	1 ml/min
Mobile Phase:	0,4 mM Heptafluorbuttersäure
Elution:	isokratisch, 30 min

Die Quantifizierung erfolgt extern mittels 6-Punkt-Kalibration (0,1 – 100 mg/l) unter Verwendung der Referenzsubstanzen Essigsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Weinsäure, Oxalsäure und Glykolsäure.

3.5.3.1.3 Mineralische Kationen

Die Quantifizierung der mineralischen Kationen erfolgt wie in Kapitel 3.4.2.1.2 beschrieben.

3.5.3.1.4 Anionen

Die Quantifizierung der Anionen erfolgt wie in Kapitel 3.4.2.1.1 beschrieben.

3.5.3.2 Quantitative Analysen mittels LC-MS/MS

3.5.3.2.1 Ellagtannine und (+)-Dihydrorobinetin

Essig (ABTM und Lagerungsstufen) (1 ml) wird auf eine Strata Gigatube RP18-SPE Kartusche (10 g/60 ml, Phenomenex, Aschaffenburg; equilibriert mit je 100 ml Methanol und

Wasser) aufgegeben, die polaren Bestandteile zunächst mit Wasser (100 ml) und dann die phenolischen Verbindungen mit Methanol (100 ml) eluiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Methanol/Wasser (0,5 ml, 20/80, v/v) aufgenommen und für die Analyse verwendet. Die Quantifizierung wird mittels externer Matrixkalibration (6-Punkt-Kalibration) an LC-MS-System 1 (siehe Kapitel 3.8.2.1) durchgeführt. Dazu wird herkömmlicher Aceto Balsamico di Modena (ABM) (1 ml) mit verschiedenen Volumina einer Lösung von Vescalagin (**27**), Castalagin (**28**) und (+)-Dihydrorobinetin (**29**) versetzt und analog den anderen Essigproben aufgearbeitet.

Polarität:	negativ
Scan Modus:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Quellenspannung:	-4500 V
Curtain gas:	20 (N ₂)
Temperatur:	425 °C
Nebulizer gas:	45 (Druckluft)
Heater gas:	55 (N ₂)
CAD:	Medium
EP:	-10
Stationäre Phase:	Luna Phenylhexyl, 150 × 2,0 mm, 5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Injektionsvolumen:	15 µl
Mobile Phase:	A: Methanol, 1% Ameisensäure B: Wasser, 1% Ameisensäure
Flussrate:	0,25 ml/min
Gradient:	0 min: 5 % A; 95 % B 3 min: 5 % A; 95 % B 20 min: 100 % A; 0 % B 22 min: 100 % A; 0 % B 25 min: 5 % A; 95 % B 30 min: 5 % A; 95 % B

Tabelle 39. Zur Quantifizierung der Ellagannine und (+)-Dihydrorobinetin verwendete Massenübergänge (m/z), Dwell time (msec), Declustering Potential (DP in V), Collision Energy (CE in V) und Cell Exit Potential (CXP in V).

Analyt	m/z	Dwell time	DP	CE	CXP
Vescalagin (27)	933,0→301,0	30	-150	-70	-7
Castalagin (28)	933,0→631,1	30	-150	-40	-29
(+)-Dihydrorobinetin (29)	302,9→174,9	30	-75	-26	-11

3.5.3.2.2 Freie Aminosäuren

Essig wird verdünnt (1:50) und je ein Aliquot (990 μ l) mit einer Lösung, die die isotopenmarkierten Standards enthält (je 1 mg/l; 10 μ l) versetzt. Die Quantifizierung erfolgt mit an LC-MS-System 1 (siehe Kapitel 3.8.2.1) mit den in Kapitel 3.4.2.2.1 angegebenen Parametern.

3.5.3.2.3 Phenolcarbonsäuren und -aldehyde

Die Aufarbeitung des Essigs erfolgt wie in Kapitel 3.5.3.2.1 beschrieben. Die Quantifizierung erfolgt mittels externer Kalibration an LC-MS-System 2 (siehe Kapitel 3.8.2.2).

Polarität:	positiv
Scan Modus:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Quellenspannung:	+5500 V
Curtain gas:	20 (N ₂)
Temperatur:	400 °C
Nebulizer gas:	45 (Druckluft)
Heater gas:	55 (N ₂)
CAD:	5
Stationäre Phase:	Synergi Fusion RP 80, 150 × 2 mm, 5 μ m (Phenomenex, Aschaffenburg)
Injektionsvolumen:	15 μ l
Mobile Phase:	A: Acetonitril, 1% Ameisensäure B: Wasser, 1% Ameisensäure
Flussrate:	0,25 ml/min

Gradient:	0 min: 0 % A; 100 % B
	1 min: 0 % A; 100 % B
	21 min: 50 % A; 50 % B
	22 min: 100 % A; 0 % B
	23 min: 100 % A; 0 % B
	25 min: 0 % A; 100 % B
	30 min: 0 % A; 100 % B

Tabelle 40. Zur Quantifizierung der Phenolcarbonsäuren und-aldehyde verwendete Massenübergänge (m/z), Dwell time (msec), Declustering Potential (DP in V), Collision Energy (CE in V) und Cell Exit Potential (CXP in V).

Analyt	m/z	Dwell time	DP	CE	CXP
2-Furancarbonsäure	113,0→61,1	35	+31	+17	+4
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	139,2→95,1	35	+26	+17	+4
Protocatechusäure	155,1→123,1	35	+41	+15	+4
<i>trans-p</i> -Coumarsäure	165,1→119,2	35	+21	+25	+4
Vanillinsäure	169,1→93,1	35	+21	+19	+4
<i>trans</i> -Kaffeesäure	181,1→89,0	35	+21	+41	+4
Ferulasäure	195,1→145,1	35	+21	+21	+4
Syringinsäure	199,2→140,2	35	+31	+21	+4
Ellagsäure	303,2→201,2	35	+27	+47	+4
Gentisinsäure	155,1→125,0	35	+46	+27	+4
Sinapinsäure	225,1→175,1	35	+21	+19	+4
Vanillin	153,1→92,9	35	+26	+19	+4
Chinasäure	193,1→147,0	35	+26	+13	+4
Gallussäure	171,1→127,1	35	+41	+15	+4
Syringaldehyd	183,2→123,0	35	+26	+17	+4
Coniferylaldehyd	179,1→147,2	35	+31	+19	+4
Sinapinaldehyd	209,1→177,2	35	+31	+17	+4
Gallussäuremethylester	185,2→152,9	35	+36	+17	+4
Gallussäureethylester	199,2→127,1	35	+31	+17	+4

3.5.3.2.4 6-O-Acetyl- α/β -D-glucopyranose und 1-O-Acetyl- β -D-fructopyranose

Verdünnter Essig (1:50; 110 μ l) wird mit einer Lösung des internen Standards 6-O-Acetyl- α/β -D-glucopyranose- $^{13}\text{C}_6$ (**32**) (10 μ l; 58,4 mg/l) und Fließmittel A (880 μ l) versetzt und in LC-MS-System 2 (siehe Kapitel 3.8.2.2) injiziert. Zur Bestimmung der Reponsefaktoren werden markierter Standard und unmarkierte Referenzen in verschiedenen molaren

Verhältnissen zusammengegeben (0,01 – 5; 6 Messpunkte), wobei die Konzentration des internen Standards konstant bleibt.

Polarität:	positiv
Scan Modus:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Quellenspannung:	+5500 V
Curtain gas:	20 (N ₂)
Temperatur:	400 °C
Nebulizer gas:	45 (Druckluft)
Heater gas:	55 (N ₂)
CAD:	5
Stationäre Phase:	TSKgel NH ₂ , 150 × 2,0 mm, 5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Injektionsvolumen:	5 µl
Mobile Phase:	A: Acetonitril/H ₂ O (95/5, v/v), 5 mM Ammoniumformiat, 1 % Ameisensäure B: Wasser, 5 mM Ammoniumformiat, 1 % Ameisensäure
Flussrate:	0,2 ml/min
Gradient:	isokratisch 89 % B, 12 Minuten

Tabelle 41. Zur Quantifizierung der Zuckeracetate verwendete Massenübergänge (*m/z*), Dwell time (msec), Declustering Potential (DP in V), Collision Energy (CE in V) und Cell Exit Potential (CXP in V).

Analyt	<i>m/z</i>	Dwell time	DP	CE	CXP
6- <i>O</i> -Acetyl- α/β -D-glucofuranose (30)	240,1→205,1	100	+11	+20	+4
1- <i>O</i> -Acetyl- β -D-fructofuranose (31)	240,1→205,1	100	+11	+20	+4
6- <i>O</i> -Acetyl- α/β -[¹³ C ₆]-D-glucofuranose (32)	246,1→211,1	100	+11	+28	+4

3.5.3.2.5 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd und 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd

Ein Aliquot (990 µl) einer wässrigen Verdünnung von Essig (1:50) wird mit einer Lösung des internen Standards 5-[¹³C₂]-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**35**) (10 µl; 4,6 mg/l) versetzt und in LC-MS-System 2 (siehe Kapitel 3.8.2.2) injiziert. Zur Bestimmung des Responsefaktors werden markierter und unmarkierte Standards in verschiedenen molaren Verhältnissen

zusammengegeben (0,01 – 5; 6 Messpunkte), wobei die Konzentration des internen Standards konstant bleibt.

Polarität:	positiv
Scan Modus:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Quellenspannung:	+5500 V
Curtain gas:	20 (N ₂)
Temperatur:	400 °C
Nebulizer gas:	45 (Druckluft)
Heater gas:	55 (N ₂)
CAD:	5
Stationäre Phase:	Luna PFP, 150 × 2,0 mm, 5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Injektionsvolumen:	5 µl
Mobile Phase:	A: Acetonitril, 1 % Ameisensäure B: Wasser, 1 % Ameisensäure
Flussrate:	0,2 ml/min
Gradient:	0 min: 0 % A; 100 % B 2 min: 0 % A; 100 % B 15 min: 100 % A; 0 % B 17 min: 100 % A; 0 % B 20 min: 0 % A; 100 % B 25 min: 0 % A; 100 % B

Tabelle 42. Zur Quantifizierung von 5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd und 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd verwendete Massenübergänge (m/z), Dwell time (msec), Declustering Potential (DP in V), Collision Energy (CE in V) und Cell Exit Potential (CXP in V).

Analyt	m/z	Dwell time	DP	CE	CXP
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33)	126,9→109,0	100	+26	+15	+4
5-Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (34)	168,9→109,0	100	+16	+14	+4
5- ¹³ C ₂ -Acetoxy-methyl-2-furaldehyd (35)	171,0→109,0	100	+11	+14	+4

3.5.3.3 Weitere Quantitative Analysen

3.5.3.3.1 D-Glucose und D-Fructose mittels Enzymatik

D-Glucose und D-Fructose werden mittels eines Enzymkits (R-Biopharm, Darmstadt) nach Anleitung des Herstellers quantifiziert.

3.5.3.3.2 Gluconsäure mittels Enzymatik

Gluconsäure wird mittels eines Enzymkits (R-Biopharm, Darmstadt) nach Anleitung des Herstellers quantifiziert.

3.5.3.3.3 Trockenmasse

Die Trockenmasse wird in Dreifachbestimmung nach Methode L 39.00-2 (2002) des Lebensmittelgesetzbuches (§ 64 LFGB) bestimmt.

3.5.4 Sensorische Analyse

Im Folgenden werden nur spezielle Parameter für die sensorische Analysen zum Balsamico Essig dargestellt. Allgemeine Bedingungen zur sensorischen Analyse sind in Kapitel 3.6 zusammengefasst.

3.5.4.1 Schwellenwerte

Schwellenwerte einzelner Geschmacksstoffe werden, wie in Kapitel 3.6.2 dargestellt, in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 3,0 (eingestellt mit 1 % HCl) ermittelt.

3.5.4.2 Geschmacksprofilanalyse

Zur Aufnahme von Geschmacksprofilen werden die für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Essige (ABTM und ABM) jeweils mit mineralstoffarmen Sensorikwasser verdünnt (1+2; v/v) und dem Sensorikpanel zur Verkostung angeboten. Die Intensitäten der Geschmacksdeskriptoren süß, sauer, bitter, umami, salzig, adstringierend sowie die viskose

Mundfülle werden auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet.

Die durch Ultrafiltration von ABTM erhaltenen niedermolekulare und hochmolekulare Fraktionen (NMF und HMF) (siehe Kapitel 3.5.1) werden in ihren natürlichen Konzentrationen in Sensorikwasser aufgenommen, der pH-Wert mit 1 % HCl auf 3,0 eingestellt und die Lösungen nach Verdünnung (1+2; v/v) gegen ABTM als Referenz verkostet und beurteilt.

3.5.4.3 Geschmacksverdünnungsanalyse

Die durch Gelabsorptionschromatographie der NMF erhaltenen Fraktionen (siehe Kapitel 3.5.2) werden in ihren natürlichen Konzentrationen in Sensorikwasser (20 ml, pH 3,0; eingestellt mit 1 % HCl) gelöst und sukzessive 1+1 mit Sensorikwasser (pH 3,0) verdünnt. Die erhaltenen Verdünnungsreihen werden in aufsteigender Konzentration im Triangeltest gegen Sensorikwasser (pH 3,0) als Blindwert verkostet und die Verdünnungsstufe ermittelt, bei der gerade noch ein Unterschied zum Blindwert erkannt wird. Diese Stufe ist als Geschmacksverdünnungsfaktor (GV-Faktor) definiert und ergibt sich für jede Geschmacksqualität in jeder Fraktion aus dem arithmetischen Mittel des individuellen GV-Faktors der einzelnen Prüfer.

3.5.4.4 Vergleichende Geschmacksprofilanalyse

Die durch Gelabsorptionschromatographie der NMF erhaltenen Fraktionen (siehe 3.5.2) werden in ihren natürlichen Konzentrationen jeweils in verdünntem Basisrekombinat (bRek^{ABTM}) und Sensorikwasser (pH 3,0) aufgenommen und im Triangeltest gegen verdünntes Basisrekombinat als Referenz verkostet, wobei die Deskriptoren süß, sauer, bitter, umami, salzig, adstringierend sowie die Mundfülle auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet werden.

3.5.4.5 Herstellung und sensorische Beurteilung von Rekombinaten

Geschmacksrekombinate von ABTM und ABM werden hergestellt, indem jeweils die in **Tabelle 50** und **Tabelle 52** (Kapitel 6) aufgeführten Substanzen in ihren natürlichen

Konzentrationen in Sensorikwasser gelöst, der pH-Wert der Lösung auf den des authentischen Essigs eingestellt und diese über Nacht im Kühlschrank belassen werden. Nach Verdünnung mit Sensorikwasser (1+2; v/v) werden die Geschmacksprofile der einzelnen Rekombinate vom Sensorikpanel gegen ebenfalls verdünnten ABTM oder ABM verkostet und auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet.

3.5.4.6 Omissionsexperimente

Teilrekombinate des ABTM werden durch Weglassen einzelner Geschmacksstoffe oder Geschmacksstoffgruppen hergestellt und im Triangeltest gegen verdünnten ABTM verkostet und beurteilt. Für den Fall, dass die Panelisten einen Unterschied zwischen Gesamtrekombinat und Teilrekombinat wahrnehmen, werden die Unterschiede durch vergleichende Geschmacksprofilanalyse auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet.

3.5.4.7 Bewertung der Süßmodulation von 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd und 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd

5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (**33**) (200 – 10000 $\mu\text{mol/l}$) und 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**34**) (2 – 2000 $\mu\text{mol/l}$) werden jeweils in einer Lösung von 4 % Saccharose/1 % Ethanol gelöst und der pH Wert der Lösungen mit 1 % HCl auf 3,0 eingestellt. Die Probenlösungen werden vom Panel unter Verwendung des 3-Alternative-Forced-Choice-Tests (3-AFC; Methode *L00.90-7*, 2007; § 64 LFGB) gegen 4 % Saccharose/1 % Ethanol (pH 3,0) auf einen Unterschied in der Süße hin bewertet, wobei die Panelisten gezwungen sind, eine Probe zu benennen, auch wenn kein Unterschied wahrgenommen wurde.

3.5.4.8 Time-Intensity-Analyse

Sensorische Time-Intensity-Analysen zur Charakterisierung des süßmodulierenden Effekts von 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**34**) werden unter Verwendung der FIZZ-Sensorik-Software (Version 2.46 A; Biosystemes, Couternon, Frankreich) an einem Touchscreen durchgeführt. Bei allen Bewertungen tragen die Panelisten eine Nasenklammer.

3.5.4.8.1 Methodendesign

Referenzlösung: 4 % Saccharose, 1 % Ethanol (10 ml)

Probenlösung: 4 % Saccharose, 1 % Ethanol + Testsubstanz (10 ml)

Alle Lösungen werden in Einweg-Sensorikbecher aliquotiert (10 ml) und mit einem dreistelligen numerischen Code verschlüsselt. Die Reihenfolge der Verkostung ist zufällig und wird jedem Panelisten durch die FIZZ-Software vorgegeben.

Die Panelisten folgen den Anweisungen auf dem Bildschirm. Nach Aufnahme des gesamten Volumens einer Lösung beginnt sofort die Bewertung der Süßintensität durch kontinuierliches Halten eines Fingers auf einer horizontalen Skala, die am linken Ende einen Anfangspunkt (= 0) und am rechten Ende einen Endpunkt (= 10) aufweist. Fünf Sekunden nach Aufnahme wird die Lösung abgeschluckt und die Intensität der Süße weiterhin bewertet, bis kein Geschmackseindruck mehr wahrnehmbar ist. Pro Sensorik werden von jedem Panelisten eine Referenzlösung und eine Probenlösung in zufällig festgelegter Reihenfolge bewertet.

3.5.4.8.2 Schulung des Panels

Die Schulung des Panels im Hinblick auf Umgang mit dem Touchscreen und Bewertung der Süßintensität und -länge verschiedener Süßstoffe wird mit wässrigen Saccharose-Lösungen (4 %/1 % Ethanol) gegen binäre Lösungen von Saccharose (4 %/1 % Ethanol) und Natriumsaccharin (5 bzw. 10 mg/l) durchgeführt.

3.5.4.8.3 Time-Intensity-Analyse von 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd

5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (**34**) wird in Konzentrationen von 200, 1000, 1500, 2000 und 2500 $\mu\text{mol/l}$ in 4 % Saccharose/1% Ethanol gelöst und diese Lösungen jeweils gegen die Referenz bewertet. Jede Konzentration wird in Doppelbestimmung analysiert.

3.5.4.8.4 Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgt durch Anwendung der Trapezmethode (*Lallemand et al.*, 1999). Mittels FIZZ-Software werden aus jeder erhaltenen TI-Kurve vier Datenpunkte (Zeitpunkte und Intensität bei 5 % und 90 % der maximalen Intensität auf ansteigendem und abfallendem Teil der Kurve) extrahiert, anhand derer in Excel ein Trapez konstruiert wird. Aus jedem Trapez werden im Folgenden verschiedene Parameter extrahiert, die eine genauere Charakterisierung des Süßgeschmacks erlauben (**Tabelle 26**). Anschließend wird mittels

zweifaktorieller ANOVA ermittelt, ob zwischen Referenz- und Probenlösung signifikante Unterschiede in den einzelnen Parametern auftreten.

3.5.5 Zellbasierter Süßrezeptorassay

Für die Untersuchung der Aktivierung des Süßrezeptors durch verschiedene Furan-, Thiophen- und Pyrrolderivate werden humane embryonale Nierenzellen (HEK293 FlpIn T-Rex $G_{\alpha_{15}G_{\beta_{13}}}$ /hTAS1R2, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, die die Untereinheit TAS1R2 des humanen Süßrezeptors und die G-Protein-Untereinheit $G_{\alpha_{15}G_{\beta_{13}}}$ stabil sowie die Untereinheit hTAS1R3 Tetracyclin-induziert exprimieren.

3.5.5.1 Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Puffer

DMEM + Serum:	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose; Fötale Kälber Serum, Tetracyclin-frei (10 %); L-Glutamin (1 %); Penicillin G (1000 U/ml; 1 %); Streptomycin (10 mg/ml); Hygromycin (200 µg/ml); G418 (200 µg/ml); Blasticidin (15 µg/ml); Puromycin (1 µg/ml)
Glutamax + Serum:	D-MEM-Glutamax mit 1 g/l Glucose; Fötale Kälber Serum, Tetracyclin-frei (10 %); L-Glutamin (1 %); Penicillin G (1000 U/ml; 1 %); Streptomycin (10 mg/ml)
Glutamax:	D-MEM-Glutamax mit 1 g/l Glucose
Trypsin-Lösung:	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS (phosphate buffered saline); pH 7,4
PBS:	8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na_2HPO_4 ; 0,24 g/l KH_2PO_4 ; pH 7,4
Tetracyclin-Lösung:	5 mg/ml
Probenecid:	71 mg/1 ml NaOH (0,5 M)
Fluo-4-AM:	50 µg in 22 µl DMSO lösen

C1-Puffer:	NaCl (130 mmol/l); KCl (5 mmol/l); HEPES (10 mmol/l); CaCl ₂ (2 mmol/l); Na-Pyruvat (1 mmol/l); pH 7,4
C2-Medium:	Glutamax-Medium (5 ml); Probenecid-Lösung (50 µl); Fluo-4-AM-Lösung (5 µl)
Isoproterenol-Lösung:	50 µmol/l in C1-Puffer
Lactisol-Lösung:	2,5 mmol/l in C1-Puffer

3.5.5.2 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die Zellen wachsen in Plastik Kulturschalen mit DMEM + Serum (10 ml) bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von ca. 80 %. Um die Zellen zu Vereinzeln, wird das Medium abgesaugt und Trypsinlösung (3 ml) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 – 3 Minuten werden die Zellen durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren vom Boden der Kulturschale gelöst und die Suspension in ein Falconröhrchen (15 ml) überführt. DMEM + Serum (3 ml) wird zugegeben, um das Trypsinieren zu stoppen. Anschließend wird zentrifugiert (900 rpm, 5 min.) und das Medium durch Absaugen vom Zellsediment getrennt. Das Zellpellet wird in DMEM + Serum (10 ml) aufgenommen und die Zellen werden durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. 1 ml der erhaltenen Zellsuspension wird in eine neue Plastik Kulturschale mit DMEM + Serum (10 ml) überführt, mit Antibiotika-Lösungen (20 µl Hygromycin; 20 µl G418; 15 µl Blastidin; 10 µl Puromycin) versetzt und durch Schwenken verteilt. Weitere Aliquote (1,8 ml/96-Well-Platte) werden für die Calcium-Imaging-Experimente verwendet.

3.5.5.3 FLIPR-Calcium Imaging

Trypsinierte Zellsuspension (siehe 3.5.5.2) wird mit DMEM + Serum verdünnt (1:10; v/v) und in mit Poly-D-Lysin (10 µg/ml) beschichtete 96-Well Platten (Greiner Bio One, Frickenhausen) pipettiert (je 100 µl). Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zu einer Konflueszenz von ca. 70 % kultiviert. Anschließend wird das Medium entfernt und in die Hälfte aller Wells Glutamax-Medium + Serum, das Tetracyclin enthält (1,2 µl Tetracyclinlösung auf 5 ml) (je 100 µl) gegeben, um die Expression der hTAS1R3-Untereinheit zu induzieren. In die andere Hälfte der Wells, die als Blindwert (= Mock) dienen, wird nur Glutamax-Medium + Serum pipettiert (100 µl). 24 Stunden nach der

Induktion wird das Medium entfernt und durch C2-Medium (50 µl) ersetzt. Nach Inkubation im Dunkeln (37 °C, 5 % CO₂, 1 Stunde) wird die 96-Well-Platte mittels eines Plattenwaschgerätes mit C1-Lösung gewaschen. Dies wird im Abstand von 30 Minuten zwei weitere Male wiederholt. Nach dem jeweils finalen Waschschrift verbleibt C1-Lösung (100 µl) in jedem Well.

Lösungen der Testsubstanzen in C1-Puffer (**Tabelle 43**) werden in 96-Well-Platten angesetzt. Da beim späteren Pipettieren der Lösungen im Gerät ein Verdünnungseffekt durch den bereits in den Wells vorhandenen C1-Puffer auftritt, müssen die Testsubstanzen zunächst in doppelter Konzentration angesetzt werden. Isoproterenol, das im 2. Applikationsschritt auf die Zellen gegeben wird (finale Konzentration: 10 µmol/l), wird in fünffacher Konzentration in einer 96-Well-Platte angesetzt. Um eine Inhibierung der Rezeptoraktivierung durch Lactisol zu überprüfen, werden binäre Lösungen der entsprechenden Testsubstanzen mit Lactisol (2,5 mmol/l; finale Konzentration: 2 mmol/l) in 96-Well-Platten hergestellt.

Direkt nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen im Gerät (FLIPR^{Tetra}, Molecular Devices, München; Software: Screenworks 2.0.0.19) bei einer Anregungswellenlänge von 470 – 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 – 570 nm vermessen. Um unspezifische Zellantworten und falsch positive Signale auszuschließen, werden die Testsubstanzen einerseits auf induzierte und nicht-induzierte Zellen appliziert. Zweitens wird eine Unterdrückung des, durch eine Testsubstanz hervorgerufenen Signals durch den Süßinhibitor Natrium-2-(4-Methoxyphenoxy)-propionat (Lactisol) überprüft.

Die durch die Mock-Zellen erhaltenen Fluoreszenzsignale werden von den entsprechenden Signalen der induzierten Zellen subtrahiert und die Differenz auf die Hintergrundfluoreszenz normalisiert.

$$\Delta F/F = (F-F_0)/F_0$$

Vor der Ermittlung von Schwellenwerten werden zunächst die artefaktfreien Konzentrationen der einzelnen Testsubstanzen bestimmt, indem nicht-induzierte Zellen mit verschiedenen Konzentrationen inkubiert und auftretende Fluoreszenzsignale von unspezifischen Zellantworten detektiert werden. Ausgehend von der so bestimmten maximal im Zellassay einsetzbaren Konzentration der einzelnen Substanzen werden Verdünnungsreihen hergestellt und auf die induzierten Zellen appliziert. Als Schwellenwert definiert ist die niedrigste Konzentration, bei der die spezifische Zellantwort signifikant größer ist als die, die durch

Applikation von C1-Puffer alleine hervorgerufen wird. Alle Bestimmungen werden in Triplikaten durchgeführt.

Tabelle 43. Für FLIPR-Calcium Imaging eingesetzte Verbindungen, deren Molekulargewicht, der jeweils gemessene Konzentrationsbereich sowie die höchste gemessene, artefaktfreie Konzentration.

Testsubstanz	MW [g/mol]	gemessener Konzentrations- bereich [$\mu\text{mol/l}$]	Konzentration ohne Artefaktsignal [$\mu\text{mol/l}$]
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33)	126,1	300 – 30000	15000
5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (34)	168,1	3 – 10000	5000
Furan-2-carboxaldehyd (36)	96,1	300 – 10000	3000
5-Methyl-2-furaldehyd (37)	110,1	300 – 10000	3000
5-(Butanoyloxy)methyl-2-furaldehyd (38)	196,2	100 – 3000	300
5-(Isobutanoyloxy)methyl-2-furaldehyd (39)	196,2	100 – 3000	900
5-(Hexanoyloxy)methyl-2-furaldehyd (40)	225,2	100 – 3000	300
5-(Octanoyloxy)methyl-2-furaldehyd (41)	252,3	100 – 3000	300
Furan-2-carbonsäure (42)	112,1	300 – 10000	3000
Furan-2-carbonsäuremethylester (43)	126,1	300 – 30000	10000
2-(Hydroxymethyl)-furan (44)	98,1	300 – 100000	n.b.
Thiophen-2-carboxaldehyd (45)	112,2	300 – 10000	5000
5-Methyl-thiophen-2-aldehyd (46)	126,2	300 – 5000	2000
Thiophen-2-carbonsäure (47)	128,2	300 – 5000	3000
Pyrrol-2-carboxaldehyd (48)	95,1	300 – 10000	5000

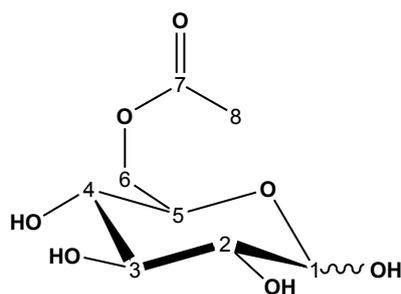
n.b. nicht bestimmt: keine spezifische Zellantwort bei allen gemessenen Konzentrationen.

3.5.6 Synthesen

3.5.6.1 6-O-Acetyl- α/β -D-glucopyranose

Essigsäureanhydrid (1,5 mmol) wird zu einer Lösung von D-Glucose (3 mmol) in Pyridin/THF (5 ml, 4/1, v/v) gegeben und das Reaktionsgemisch für 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Wasser (10 ml) wird zugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Reaktionsprodukt chromatographisch isoliert (Präparative HPLC mit ELSD; Microsorb RP-18, 250 x 21,2 mm; Gradient 3, siehe Kapitel 3.7.2). Nach Gefriertrocknen wird das Produkt als weißes, kristallines Pulver in einer Reinheit von 99 % erhalten.

Spektroskopische Daten:

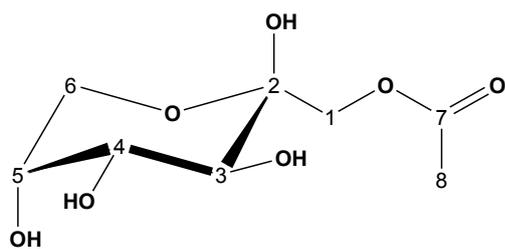


6-O-Acetyl- α/β -D-glucopyranose (30): 0,9 mmol; 30 % Ausbeute; LC-MS (ESI⁺): m/z 223 (20, [M+H]⁺), 240 (100, [M+NH₄]⁺), 150 (40, [M-72]⁺), 85 (15, [M-137]⁺); ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY): δ [ppm] 2.03 [s, 6H, H-C(8 α/β)], 3.14 [dd, 1H, $J = 4.0, 8.0$ Hz, H-C(2 β)], 3.31–3.61 [m, 6H, H-C(4 α), H-C(4 β), H-C(3 β), H-C(2 α), H-C(5 β), H-C(3 α)], 3.92 [ddd, 1H, $J = 4.0, 8.0, 12.0$ Hz, H-C(5 α)], 4.14 [dd, 1H, $J = 4.0, 12.0$ Hz, H-C(6 β/α)], 4.22 [dd, 2H, $J = 4.0, 8.0$ Hz, H-C(6 α)], 4.29 [dd, 1H, $J = 4.0, 12.0$ Hz, H-C(6 β/α)], 4.54 [d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-C(1 β)], 5.10 [d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H-C(1 α)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HSQC, HMBC): δ [ppm] 20.1 [C(8 α/β)], 20.2 [C(8 β/α)], 63.4 [C(6 α/β)], 63.6 [C(6 β/α)], 69.1 [C(5 α)], 69.5 [C(4 α/β)], 69.6 [C(4 β/α)], 71.4 [C(2 α)], 72.6 [C(5 β)], 73.3 [C(3 α)], 74.0 [C(2 β)], 75.5 [C(3 β)], 92.0 [C(1 α)], 96.0 [C(1 β)], 174.09 [C(7 α/β)], 174.11 [C(7 β/α)].

3.5.6.2 1-O-Acetyl- β -D-fructopyranose

Die Synthese und Aufreinigung erfolgt wie in Kapitel 3.5.6.1 beschrieben, als Edukt wird D-Fructose (3 mmol) eingesetzt. Nach Gefriertrocknen wird das Produkt als weißes, kristallines Pulver in einer Reinheit von 99 % erhalten.

Spektroskopische Daten:

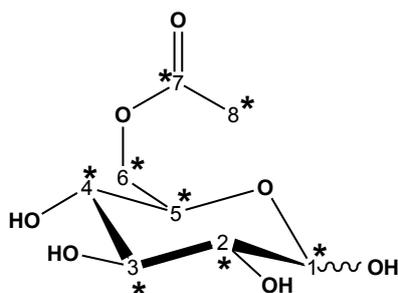


1-O-Acetyl- β -D-fructopyranose (31): 0,8 mmol; 30 % Ausbeute; LC-MS (ESI⁺): m/z 240 (100, [M+NH₄]⁺), 223 (20, [M+H]⁺), 150 (40, [M-72]⁺), 85 (15, [M-137]⁺); ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY): δ [ppm] 2.08 [s, 3H, H-C(8)], 3.63 [dd, 1H, $J = 4.0, 12.0$ Hz, H-C(6 α)], 3.71 [d, 1H, $J = 8.0$ Hz H-C(4)], 3.84 [dd, 1H, $J = 4.0, 12.0$ Hz, H-C(5)], 3.93–3.99 [m, 2H, H-C(6 β), H-C(3)], 4.12 [d, 2H, $J = 4.0$ Hz, H-C(1)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HSQC, HMBC): δ [ppm] 20.1 [C(8)], 63.4 [C(6)], 65.6 [C(1)], 67.8 [C(4)], 68.8 [C(3)], 69.2 [C(5)], 96.8 [C(2)], 173.6 [C(7)].

3.5.6.3 6-O-Acetyl- α/β -D-glucopyranose-[$^{13}\text{C}_6$]

Die Synthese und Aufreinigung erfolgt wie in Kapitel 3.5.6.1 beschrieben, als Edukt wird D-Glucose-[$^{13}\text{C}_6$] (3 mmol) eingesetzt. Nach Gefriertrocknen wird das Produkt als weißes, kristallines Pulver in einer Reinheit von 99 % erhalten.

Spektroskopische Daten:

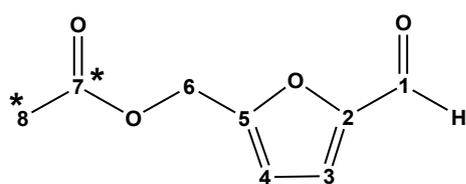


6-O-Acetyl-[$^{13}\text{C}_6$]- α/β -D-glucopyranose (32): 0,6 mmol; 20 % Ausbeute; LC-MS (ESI⁺): m/z 229 (20, [M+H]⁺), 246 (100, [M+NH₄]⁺), 156 (40, [M-72]⁺), 89 (15, [M-137]⁺); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY): δ [ppm] 2.06 [s, 6H, H-C(8 α/β)], 3.15 [ddd, 1H, $J = 4.0, 12.0$ Hz, $J_{C,H} = 155.0$ Hz, H-C(2 β)], 3.22–3.82 [m, 7H, H-C(2 α), H-C(3 α), H-C(3 β), H-C(4 α), H-C(4 β), H-C(5 α), H-C(5 β)], 4.26 [m, $J_{C,H} = 155.0$ Hz, 4H, H-C(6 α), H-C(6 β)], 4.62 [dd, 1H, $J = 8.0$ Hz, $J_{C,H} = 125.0$ Hz, H-C(1 β)], 5.15 [dd, 1H, $J = 4.0$ Hz, $J_{C,H} = 170.0$ Hz, H-C(1 α)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HSQC, HMBC): δ [ppm] 20.1 [C(8 α/β)], 20.2 [C(8 β/α)], 63.5 [d, $J = 44.0$ Hz, C(6 α), C(6 β)], 68.7–69.8 [m, C(5 α), C(4 α), C(4 β)], 71.0–74.3 [m, C(2 α), C(5 β), C(3 α), C(2 β)], 75.5 [m, C(3 β)], 92.1 [d, $J = 46.2$ Hz, C(1 α)], 96.0 [dt, $J = 3.75, 5.0, 46.2$ Hz, C(1 β)], 174.12/174.13 [C(7 α/β)].

3.5.6.3.1 5-[$^{13}\text{C}_2$]-Acetoxymethyl-2-furaldehyd

Acetylchlorid-[$^{13}\text{C}_2$] (3 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (4 mmol) in THF/Triethylamin (6 ml; 5/1, v/v) gegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei 20 °C gerührt. Wasser (1 ml) wird zugegeben und das Reaktionsprodukt chromatographisch isoliert (präparative HPLC mit DAD-Detektor, Microsorb-RP18, 250 x 21,2 mm, Gradient 3, siehe Kapitel 3.7.2). Nach Gefriertrocknung wird das Produkt als brauner Feststoff in einer Reinheit von 99 % erhalten.

Spektroskopische Daten:

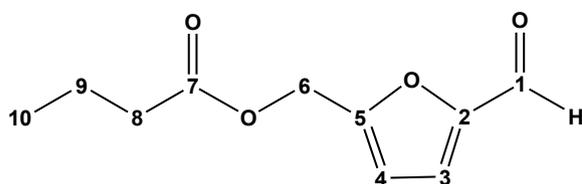


5-[$^{13}\text{C}_2$]-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (35): 0,47 mmol, 15 % Ausbeute; UV-Vis (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 284$ nm; LC-MS (ESI⁺): m/z 271 (70, [M+H]⁺), 293 (100, [M+Na]⁺), 109 (80, [M-61]⁺), 81 (10, [M-89]⁺); ¹H-NMR (400 MHz, MeOD, COSY): δ [ppm] 2.08 [dd, 3H, $J = 8.0$ Hz, $J_{\text{C,H}} = 104.0$ Hz, H-C(8)], 5.51 [d, 2H, $J = 4.0$ Hz, H-C(6)], 6.70 [d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H-C(4)], 7.37 [d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H-C(3)], 9.57 [s, 1H, H-C(1)]; ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD, HSQC, HMBC, DEPT): δ [ppm] 19.1 [d, $J = 200$ Hz, C(8)], 57.3 [C(6)], 112.1 [C(4)], 122.6 [C(3)], 153.0 [C(2)], 156.0 [C(5)], 170.5 [d, $J = 200$ Hz, C(7)], 178.2 [C(1)].

3.5.6.4 5-(Butanoyloxy)methyl-2-furaldehyd

Die Synthese und Aufreinigung erfolgt wie in Kapitel 3.5.6.3.1 beschrieben. Als Edukt wird Butyrylchlorid (3 mmol) verwendet. Nach Gefriertrocknung wird das Produkt als braune, viskose Flüssigkeit in einer Reinheit von 99 % erhalten.

Spektroskopische Daten:

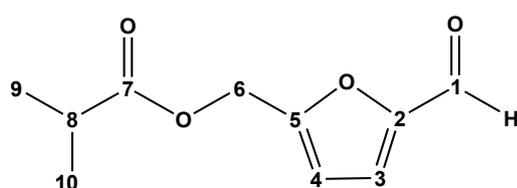


5-(Butanoyloxy)methyl-2-furaldehyd (39): 0,7 mmol; 23 % Ausbeute; UV-Vis (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 284$ nm; LC-MS (ESI⁺), m/z 197 (60, [M+H]⁺), 219 (100, [M+Na]⁺), 109 (46, [M-61]⁺), 81 (10, [M-89]⁺); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY) δ [ppm] 0.93 [d, 3H, $J = 8.0$ Hz, H-C(10)], 1.63 [ddd, 2H, $J = 8.0, 16.0, 24.0$ Hz, H-C(9)], 2.32 [t, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-C(8)], 5.16 [s, 2H, H-C(6)], 6.68 [d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H-C(4)], 7.38 [d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H-C(3)], 9.57 [s, 1H, H-C(1)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC) δ [ppm] 13.9 [C(10)], 19.4 [C(9)], 36.6 [C(8)], 58.7 [C(6)], 113.6 [C(4)], 124.0 [C(3)], 154.4 [C(2)], 157.6 [C(5)], 174.4 [C(7)], 179.6 [C(1)].

3.5.6.5 5-(Isobutanoyloxy)methyl-2-furaldehyd

Die Synthese und Aufreinigung erfolgt wie in Kapitel 3.5.6.3.1 beschrieben. Als Edukt wird Isobutyrylchlorid (3 mmol) verwendet. Nach Gefriertrocknung wird das Produkt als braune, viskose Flüssigkeit in einer Reinheit von 99 % erhalten.

Spektroskopische Daten:



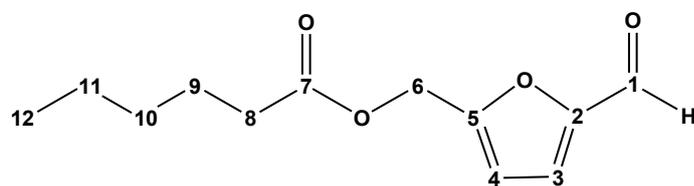
5-(Isobutanoyloxy)methyl-2-furaldehyd (38): 0,7 mmol; 23 % Ausbeute; UV-Vis (MeOH): λ_{\max} = 284 nm; LC-MS (ESI⁺), m/z 197 (60, [M+H]⁺), 219 (100, [M+Na]⁺), 109 (40, [M-61]⁺), 81 (5, [M-89]⁺); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY) δ [ppm] 1.16 [d, 6H, J = 8.0 Hz, H-C(9), H-C(10)], 3.31 [dd, 1H, J = 8.0, 16.0 Hz, H-C(8)], 5.16 [s, 2H, H-C(6)], 6.68 [d, 1H, J = 4.0 Hz, H-C(4)], 7.37 [d, 1H, J = 4.0 Hz, H-C(3)], 9.57 [s, 1H, H-C(1)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC) δ [ppm] 19.3 [C(9), C(10)], 35.0 [C(8)], 58.8 [C(6)], 113.5 [C(4)], 124.0 [C(3)], 154.4 [C(2)], 157.6 [C(5)], 177.9 [C(7)], 179.6 [C(1)].

3.5.6.6 5-(Hexanoyloxy)methyl-2-furaldehyd

Die Synthese und Aufreinigung erfolgt wie in Kapitel 3.5.6.3.1 beschrieben. Als Edukt wird Hexanoylchlorid (3 mmol) verwendet. Nach Gefriertrocknung wird das Produkt als braune, viskose Flüssigkeit in einer Reinheit von 99 % erhalten.

Spektroskopische Daten:

5-(Hexanoyloxy)methyl-2-furaldehyd (40): 1,6 mmol; 53 % Ausbeute; UV-Vis (MeOH):



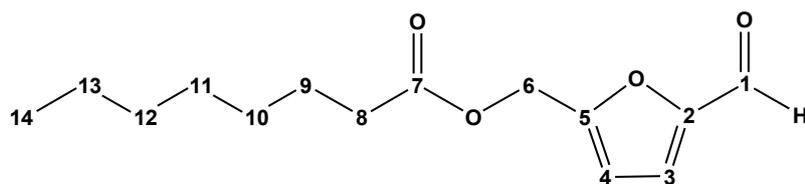
λ_{\max} = 284 nm; LC-MS (ESI⁺), m/z 225 (80, [M+H]⁺), 247 (100, [M+Na]⁺), 109 (45, [M-61]⁺), 81 (10, [M-89]⁺); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY) δ [pp] 0.89 [d, 3H, J = 8.0 Hz, H-C(12)], 1.31 [m, 4H, J = 4.0, 8.0 Hz, H-C(11), H-C(10)], 1.63 [dd, 2H, J = 8.0, 16.0 Hz, H-C(9)], 2.35 [t, 2H, J = 8.0, H-C(8)], 5.16 [s, 2H, H-C(6)], 6.68 [d, 1H, J = 4.0 Hz, H-C(4)], 7.37 [d, 1H, J = 4.0 Hz, H-C(3)], 9.57 [s, 1H, H-C(1)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC) δ [ppm] 12.8 [C(12)], 21.9 [C(11)], 24.4 [C(9)], 30.9 [C(10)], 34.7 [C(8)], 58.7 [C(6)], 113.6 [C(4)], 124.0 [C(3)], 154.4 [C(2)], 157.6 [C(5)], 174.6 [C(7)], 179.6 [C(1)].

3.5.6.7 5-(Octanoyloxy)methyl-2-furaldehyd

Die Synthese und Aufreinigung erfolgt wie in Kapitel 3.5.6.3.1 beschrieben. Als Edukt wird Octanoylchlorid (3 mmol) verwendet. Nach Gefriertrocknung wird das Produkt als braune, viskose Flüssigkeit in einer Reinheit von 99 % erhalten.

Spektroskopische Daten:

5-(Octanoyloxy)methyl-2-furaldehyd (41): 1,4 mmol; 47 % Ausbeute; UV-Vis (MeOH): λ_{\max}



= 284 nm; LC-MS (ESI⁺), m/z 253 (60, [M+H]⁺), 275 (100, [M+Na]⁺), 109 (45, [M-61]⁺), 81 (10, [M-89]⁺);

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY) δ [ppm] 0.89 [t, 3H, J = 8.0 Hz, H-C(14)], 1.28 [m, 8H, H-C(13), H-C(12), H-C(11), H-C(10)], 1.60 [dd, 2H, J = 8.0, 16.0 Hz, H-C(9)], 2.36 [t, 2H, J = 8.0, H-C(8)], 5.16 [s, 2H, H-C(6)], 6.68 [d, 1H, J = 4.0 Hz, H-C(4)], 7.37 [d, 1H, J = 4.0 Hz, H-C(3)], 9.57 [s, 1H, H-C(1)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC) δ [ppm] 14.4 [C(14)], 23.7 [C(13)], 26.0 [C(9)], 30.07 [C(11/10)], 30.08 [C(10/11)], 32.9 [C(12)], 34.7 [C(8)], 58.7 [C(6)], 113.6 [C(4)], 124.0 [C(3)], 154.4 [C(2)], 157.6 [C(5)], 174.6 [C(7)], 179.6 [C(1)].

3.6 Sensorik

Allgemeine Bedingungen und Verfahren zur sensorischen Analyse sind im Folgenden angegeben, spezifisches Vorgehen zu den einzelnen Lebensmitteln sind in den jeweiligen Abschnitten (3.4.5 und 3.5.4) zu finden.

Sensorische Analysen werden in einem Sensorikraum bei 20 – 22 °C durchgeführt. Das Sensorikpanel besteht aus 12 geschulten Prüfern, die während der Verkostungen Nasenklammern tragen, um retronasale Einflüsse auf die Geschmackswahrnehmung zu unterbinden. Wenn nicht anders angegeben wird mineralstoffarmes, stilles Wasser (Evian[®]) verwendet. Jede Analyse wird in Dreifachbestimmung durchgeführt. Isolierte Fraktionen und Substanzen werden vor der Verwendung für die sensorischen Untersuchung dreimal gefriergetrocknet und mittels LC-MS und ¹H-NMR auf ihre Reinheit hin überprüft.

3.6.1 Schulung des Sensorikpanels

Zur Schulung des Panels werden Sensoriken mit wässrigen Lösungen folgender Referenzsubstanzen durchgeführt: Lactose (50 mmol/l) für süßen Geschmack, Milchsäure (20 mmol/l) für sauren Geschmack, Natriumchlorid (20 mmol/l) für salzigen Geschmack, Coffein (1 mmol/l) für bitteren Geschmack und Natrium-L-Glutamat (3 mmol/l, pH 6) für Umamigeschmack, Quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranosid (0,01 mmol/l) für einen samtig adstringierenden Geschmackseindruck und Tannin (0,05 %) für einen rau-adstringierenden Geschmackseindruck.

Für die Schulung der Mundfülle (Kokumi) wird eine wässrige Lösung aus Natriumchlorid (30 mmol/l) und Natrium-L-Glutamat (10 mmol/l) mit und ohne Zusatz von Glutathion (5 mmol/l) verwendet.

3.6.2 Schwellenwertbestimmung

Die zu untersuchende Substanz wird in wässriger Lösung (20 ml; pH 3,0 oder pH 5,3) gelöst, sukzessive 1:1 mit Wasser (pH 3,0 oder 5,3) verdünnt und dem Panel mit je zwei Blindlösungen gereicht (Triangeltest). Die Lösungen werden in aufsteigender Konzentration verkostet und die jeweils abweichende Probe angegeben. Es gilt nur die Probe als richtig erkannt, ab der auch alle folgenden Proben vom Prüfer richtig erkannt werden. Die Berechnung des Schwellenwertes erfolgt auf Basis der amtlichen Untersuchungsmethode ASU L 00.90-9, 1999; § 64 LFGB.

3.7 Chromatographische Methoden

3.7.1 Gelabsorptionschromatographie (GAC)

Säule:	XK 50/100, 100 × 5 cm (Amersham, Uppsala, Schweden)
Säulenmaterial:	Sephadex LH-20 (GE Healthcare, München)
Pumpe:	Peristaltikpumpe P-1 (Amersham, Uppsala, Schweden)
Detektor:	UV-2075 (Jasco, Groß-Umstadt)
Wellenlänge:	220 nm

Fraktionssammler:	2070 Ultrorac II (LKB, Bromma, Schweden)
Sammelrate:	10 min/Reagenzglas
Flussrate:	1,3 ml/min
Mobile Phase:	Methanol/Wasser, pH 4 (20/80; 40/60; 60/40; 80/20; 100/0; v/v); je 400 ml
Datenaufzeichnung:	LabView, Version 2.0; National Instruments, Austin, TX, USA

3.7.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische und präparative HPLC-Trennungen werden unter Verwendung verschiedener HPLC-Säulen, Fließmittel und Gradienten an folgendem System durchgeführt:

HPLC-System

Pumpe:	2 × PU-2087 Plus (Jasco, Groß-Umstadt)
Degasser:	DG-2080-53 (Jasco, Groß-Umstadt)
Mischkammer:	LG-2080-2 (Jasco, Groß-Umstadt)
Autosampler:	AS-2055 Plus mit 100 µl Probenschleife (Jasco, Groß-Umstadt)
Injektionsventil:	Rh 7725i mit 1000 µl Probenschleife (Rheodyne, Bensheim)
Detektor I:	MD-2010 Plus Diodenarraydetektor (Jasco, Groß-Umstadt)
mit Messzelle:	- Präparative Durchflusszelle - Analytische Durchflusszelle
Detektor II:	Sedex 85 LT-ELSD (Sedere, Alfortville, Frankreich)
Software:	Chrompass 1.6.8.1 (Jasco, Groß-Umstadt)

HPLC-Säulen

Analytisch:	HyperClone ODS C18, 250 × 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg) TSKgel Amide-80, 150 × 2,0 mm, 3 µm (Tosoh Bioscience, Stuttgart)
-------------	---

Präparativ: Microsorb RP-18, 250 × 21,2 mm, 5 µm (Varian, Darmstadt)
 Monochrom MS, 250 × 21,2 mm, 5 µm (Varian, Darmstadt)
 TSKgel Amide-80, 300 × 21,5 mm, 10 µm, (Tosoh Bioscience, Stuttgart)

Gradienten

Gradient 1: Fließmittel A: H₂O, 1 % Ameisensäure
 Fließmittel B: Acetonitril, 1 % Ameisensäure
 Flussrate: 18 ml/min
 0 min: 100 % A; 0 % B
 5 min: 100 % A; 0 % B
 15 min: 0 % A; 100 % B
 20 min: 0 % A; 100 % B
 25 min: 100 % A; 0 % B
 30 min: 100 % A; 0 % B

Gradient 2: Fließmittel A: H₂O, 1 % Essigsäure
 Fließmittel B: Acetonitril, 1 % Essigsäure
 Flussrate: 6 ml/min
 0 min: 5 % A; 95 % B
 2 min: 5 % A; 95 % B
 20 min: 100 % A; 0 % B
 25 min: 100 % A; 0 % B
 30 min: 5 % A; 95 % B
 35 min: 5 % A; 95 % B

Gradient 3: Fließmittel A: H₂O; 0,1 % Ameisensäure
 Fließmittel B: Methanol; 0,1 % Ameisensäure
 Flussrate: 18 ml/min
 0 min: 100 % A; 0 % B
 1 min: 100 % A; 0 % B
 15 min: 0 % A; 100 % B
 18 min: 0 % A; 100 % B

25 min: 100 % A; 0 % B

30 min: 100 % A; 0 % B

Gradient 4: Fließmittel A: H₂O; 0,1 % Ameisensäure
Flussrate: 18 ml/min
Isokratisch, 15 Minuten

Gradient 5: Fließmittel A: H₂O, 1 % Ameisensäure
Fließmittel B: Acetonitril, 1 % Ameisensäure
Flussrate: 18 ml/min
0 min: 70 % A; 30 % B
1 min: 70 % A; 30 % B
10 min: 0 % A; 100 % B
12 min: 0 % A; 100 % B
15 Min: 70 % A; 30 % B
20 Min: 70 % A; 30 % B

3.7.3 Hochleistungskationenchromatographie (HPIC)

System 1

System: Dionex ICS-2500 (Dionex, Idstein)
Pumpe: GS50 Gradientenpumpe
Autosampler: AS50 Autosampler
Säulenofen: AS50 Thermal Compartment mit Säulenschaltventil
Detektor: ED50 Electrochemical Detektor
Software: Chromeleon 6.80 (Dionex, Idstein)

System 2

System: Dionex ICS-2000 (Dionex, Idstein)
Autosampler: AS Autosampler
Suppressor: CSRS 300
Eluentengenerator: RFIC 2 EluGen Cartridge EGC II MSA
Detektor: Leitfähigkeitsdetektor
Software: Chromeleon 6.80 (Dionex, Idstein)

3.7.4 Gaschromatographie (GC)

GC System:	HP 6890 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)
Säule:	DB-FFAP, 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm, (J&W, Böblingen)
Trägergas:	H ₂ , 30 cm/s
Injektion:	Split: 1:10
Volumen:	5 µl
Detektor:	FID, 250°C
Ofen Programm:	60 °C (2 min, isotherm) 60 °C – 240 °C (10 °C/min) 240 °C (15 min, isotherm)

3.8 Spektroskopische Methoden

3.8.1 UV-Vis-Spektroskopie

Die Aufnahme von UV-Vis-Spektren erfolgt an HPLC-System 1 mittels eines DAD MD-2010 Diodenarraydetektors (Jasco, Groß-Umstadt).

3.8.2 HPLC-Massenspektrometrie (LC-MS)

3.8.2.1 LC-MS-System 1

MS:	API 4000 QTRAP, Linear Ion Trap Quadrupole Mass Spectrometer (Applied Biosystems, Darmstadt)
HPLC:	Agilent 1200 Serie (Agilent, Waldbronn) mit 1200 G1379A Pumpe G1379 Degasser 1200 G1329A Autosampler
Ionisation:	Electrospray Ionisation (ESI)
Auflösung:	Unit
Curtain Gas:	Stickstoff (20 psi)
Software:	Analyst 1.5.1 (Applied Biosystems, Darmstadt)

3.8.2.2 LC-MS-System 2

MS:	API3200-type LC-MS/MS System (Applied Biosystems, Darmstadt)
HPLC:	Agilent 1100 Serie (Agilent, Waldbronn) mit 1100 G1379A Pumpe G1379 Degasser 1100 G1329A Autosampler
Ionisation:	Electrospray Ionisation (ESI)
Auflösung:	Unit
Curtain Gas:	Stickstoff (20 psi)
Software:	Analyst 1.5.1 (Applied Biosystems, Darmstadt)

3.8.2.3 Aufnahme von Molekül- und Tochterionenspektren

Molekül- und Tochterionenspektren werden an beiden LC-MS-Systemen mittels Elektrosprayionisation (ESI) und direkter Flussinjektion erzeugt. Die Ionensprayspannung beträgt im positiven Modus +5500 V und im negativen -4500 V. Pseudomolekülonen werden im Full Scan Modus detektiert. Tochterionen werden im MS²-Modus nach Kollision des Pseudomolekülonen mit Stickstoff (4×10^{-5} Torr) detektiert.

3.8.2.4 Optimierung der Ionisierungsparameter

Die Optimierung der Ionisierungs- und Fragmentierungsparameter für die Quantifizierung im MRM-Modus erfolgt softwaregestützt unter kontinuierlicher Einleitung (10 µl/min) der einzelnen Analyten mittels Spritzenpumpe (Harvard Syringe Pump II Plus, Harvard Apparatus, Holliston, USA). Optimiert werden: Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP), Cell Entrance Potential (CEP), Collision Energy (CE) und Cell Exit Potential (CXP).

3.8.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahmen von Kernresonanzspektren erfolgen an einem Bruker DRX-400 Spektrometer oder Bruker Avance III-500 Spektrometer mit Cryoprobekopf (Bruker Biospin, Rheinstetten). Die Proben werden in D₂O oder MeOD-d₄ gelöst, in ein NMR-Röhrchen (Schott Economic, 178 × 5 mm, Schott AG, Mainz) überführt und bei 298 K vermessen. Die chemischen Verschiebungen der Signale werden auf den internen Standard Tetramethylsilan (TMS) referenziert. Die Datenprozessierung erfolgt mittels der Software TopSpin (Version 2.0, Bruker, Rheinstetten). Die Auswertung der Spektren wird unter Verwendung der Software MestReNova, V.5.1.0-2940 (Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spanien) durchgeführt.

3.8.3.1 ¹H-NMR-Experiment

Das ¹H-NMR-Experiment gibt Aufschluss über die Anzahl der in der Verbindung enthaltenen Protonen. Die chemischen Verschiebungen (δ in ppm) sowie die Kopplungskonstanten (J in Hz) benachbarter Protonen werden ermittelt. Bei Verwendung protischer Lösungsmittel werden nur die kohlenstoffgebundenen Protonen erfasst.

3.8.3.2 ¹³C-NMR-Experiment

Das ¹³C-Experiment gibt Aufschluss über die Anzahl der in der Verbindung enthaltenen Kohlenstoffatome. Zur Unterdrückung heteronuklearer J -Kopplungen und zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses, erfolgt die Aufnahme der Spektren unter ¹H-Breitbandentkopplung.

3.8.3.3 H,H-COSY-Experiment

Das ¹H-¹H-COSY (Correlated Spectroscopy) Spektrum wird durch die Einstrahlung zweier 90° Pulse, die durch inkrementell veränderte Wartezeiten voneinander getrennt sind, erhalten. Die im 2D-Spektrum auf der Diagonalen erhaltenen Signale entsprechen dem ¹H-Spektrum, während die symmetrisch angeordneten Korrelationssignale die homonuklearen Kopplungen zwischen benachbarten Protonen anzeigen.

3.8.3.4 HMQC-Experiment

Das HMQC-Spektrum (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) wird durch eine Anordnung von Pulsen erhalten, die die Magnetisierung der Protonen auf die Kohlenstoffatome überträgt und nach einer inkrementellen Entwicklungsphase wieder auf die Protonen zurücktransferiert. Durch Signale werden geminale ^1H - ^{13}C -Verknüpfungen ($^1J_{\text{C,H}}$) sichtbar gemacht, wobei im zweidimensionalen Spektrum die Protonen auf der X-Achse und die Kohlenstoffatome auf der Y-Achse dargestellt sind. Quartäre Kohlenstoffatome können nicht detektiert werden.

3.8.3.5 HMBC-Experiment

Das HMBC Experiment (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) ist, wie das HMQC, ein 2D-Experiment, das vicinale Kopplungen zwischen Protonen und Kohlenstoffatomen ($^2J_{\text{C,H}}$; $^3J_{\text{C,H}}$; $^4J_{\text{C,H}}$) sichtbar macht, wohingegen $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplungen unterdrückt werden. Im Gegensatz zum HMQC können daher im HMBC-Spektrum auch quartäre Kohlenstoffatome detektiert werden.

3.9 Statistische Methoden

Die sensorischen Heatmaps samt hierarischer Clusteranalyse der ABTM-Lagerungsstufen (Kapitel 2.2.3) wurden in Zusammenarbeit mit Andreas Dunkel (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, TU München, Freising) erstellt. Die quantitativen Daten (jeweils bezogen auf Frischgewicht und Trockenmasse) wurden mit Hilfe der Software R (Version 2.15.1) normalisiert und durch das Pheatmap-Tool (Version 0.6.1) visualisiert (*R Development Core Team*, 2008). Die anschließende Clusteranalyse erfolgte über die Ward Minimum Variance Methode (*Ward*, 1963), wobei der Abstand zwischen den Analyten über die euklidische Distanz berechnet wurde.

4 Zusammenfassung

Parmesankäse (*Parmigiano Reggiano*) und Traditioneller Balsamico Essig aus Modena (*Aceto Balsamico Tradizionale di Modena*) werden unter Anwendung traditioneller Verfahren hergestellt werden und sind aufgrund ihres charakteristischen und intensiven Geschmacks weltweit hochgeschätzte Lebensmittel. Da die den typischen Geschmack von Parmesan und Traditionellem Balsamico Essig ursächlich prägenden Verbindungen auf molekularer Ebene nicht umfassend definiert sind, existiert bis heute keine Möglichkeit die Herstellung dieser Produkten im Hinblick auf die Einstellung gewünschter Geschmacksprofile zu optimieren bzw. die langen Reifezeiten zu verkürzen.

Daher sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Kombination instrumentell-analytischer Methoden mit humansensorischen Experimenten die Gesamtheit der nicht-flüchtigen Geschmacksstoffe (Sensometabolom) von Parmesankäse und Traditionellem Balsamico Essig umfassend identifiziert und die die Bildung von Schlüsselgeschmacksstoffen während der Reifung maßgeblich beeinflussenden Faktoren auf quantitativer Basis offengelegt werden.

Im ersten Teil der Arbeit konnten das Sensometabolom von 24 Monate altem Parmesankäse, der sich maßgeblich durch einen salzigen, brennenden und kokumiartigen sensorischen Eindruck auszeichnete, erfolgreich identifiziert werden.

Die instrumentelle Analyse von potentiellen Geschmacksstoffen und -modulatoren führte zur erstmaligen und umfassenden Detektion von acht α - und 15 γ -Glutamyllopeptiden in Parmesankäse, wobei die Peptide γ -Glu-Asp (**21**), γ -Glu-Thr (**22**), γ -Glu-Trp (**23**) und α -Glu-Lys (**24**) erstmals überhaupt in Käse identifiziert wurden. Die Quantifizierung von 42 weiteren Geschmacksstoffen erfolgte mittels HPLC-MS/MS und Hochleistungsionenchromatographie, wobei Rekombinationsexperimente die Vollständigkeit und Richtigkeit der instrumentell-analytischen Untersuchungen aufzeigten. Weiterhin konnte anhand von Omissionsexperimenten erstmals die Relevanz der biogenen Amine Histamin und Tyramin für den brennenden Geschmackseindruck und der Beitrag der γ -Glutamyllopeptide zur Kokumiquität des Parmesankäses verifiziert werden.

Die mittels einer validierten LC-MS/MS-Methode durchgeführte Quantifizierung der α - und γ -Glutamyllopeptide ergab, dass die Gesamtkonzentration an γ -Glutamyllopeptiden im vorliegenden Parmesankäse mit einem Wert von 28249 $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse deutlich

größer war, als der bisher in Käse bestimmte höchste Gehalt dieser Verbindungen. Daher sollten die Faktoren untersucht werden, die die Bildung dieser Peptide in Parmesankäse beeinflussen. Da die Bildung der γ -Glutamylpeptide durch das Enzym γ -Glutamyltransferase (GGT) katalysiert wird, war zunächst die Identifizierung der GGT-Quelle notwendig. Unter den potentiellen GGT-Quellen, nämlich der Mikroflora und der zur Herstellung verwendeten Rohmilch, konnte letztere anhand von Enzymaktivitätsmessungen und Inkubationsexperimenten mit ^{13}C -markiertem L-Glutamin zur *in-situ* Bildung der γ -Glutamylpeptide als Ressource des Enzyms in Parmesankäse identifiziert werden. Studien zur Substratspezifität der Milch-GGT, die mit den erhaltenen quantitativen Daten für die γ -Glutamylpeptide und freien Aminosäuren im vorliegenden Käse korreliert wurden, ergaben, dass die bei der Käsereifung proteolytisch freigesetzten Aminosäuren durch die GGT zu γ -Glutamylpeptiden umgesetzt werden, wobei das L-Glutamin als Glutamyl-Donor und die weiteren Aminosäuren mit unterschiedlicher Substratspezifität als Akzeptor-Aminosäuren agierten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Schlüsselgeschmacksstoffe von Traditionellem Balsamico Essig aus Modena identifiziert und charakterisiert. Die sensorisch geleitete Fraktionierung mittels Ultrafiltration lokalisierte den majoren Teil der geschmacksaktiven Verbindungen des Essigs in der niedermolekularen Fraktion. Die instrumentelle Analyse von potentiellen Geschmacksstoffenerlaubte neben der quantitativen Erfassung von 52 Sensometaboliten auch die erstmalige Identifizierung der aus Eichenholz stammenden Ellagtannine Vescalagin (**27**) und Castalagin (**28**) sowie des aus Akazienholz stammenden Flavonols (+)-Dihydrorobinetin (**29**). Rekombinations- und Omissionsexperimente zeigten, dass der typische, intensiv süße und fruchtig-saure Geschmack des Essigs vornehmlich durch die majoren Inhaltsstoffe, wie Glucose und Fructose, Weinsäure, Gluconsäure, Glykolsäure, Äpfelsäure, Essigsäure und Citronensäure hervorgerufen wird. Desweiteren konnte der Einfluss der mineralischen Ionen auf die Säurequalität, der Beitrag der Ellagtannine zur Adstringenz sowie der Polymerfraktion zur Astringenz und charakteristischen Mundfülle herausgearbeitet werden. Einzig die Länge des Süßgeschmacks des authentischen Essigs konnte durch das biomimetische Gesamtrekombinat nicht adäquat rekonstituiert werden.

Die Lokalisierung von süß-modulierenden Verbindungen anhand sensorisch-orientierter Fraktionierung führte zur Identifizierung der Zuckermonoacetate 6-*O*-Acetyl- α/β -D-glucopyranose (**30**) und 1-*O*-Acetyl- β -D-fructopyranose (**31**) sowie von 5-Hydroxymethyl-2-

furaldehyd (**33**) und 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**). Rekombinationsexperimente mit den Verbindungen **30** – **34** in der Essigmatrix zeigten, dass einzig 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) süßmodulierende, jedoch keine intrinsischen sensorischen Eigenschaften aufwies. Erstere wurden durch umfassende Time-Intensity-Sensoriken in einer vereinfachten Matrix aus 4 % Saccharose in Wasser auch quantitativ erfasst, wobei der süßmodulierende Effekt bei einer Konzentration von 1500 $\mu\text{mol/l}$ an **34** ein Maximum durchlief.

Die gewonnenen Kenntnisse über das Sensometabolom von Traditionellem Balsamico Essig konnten im Weiteren erfolgreich angewendet werden, um die sensorischen Unterschiede zwischen dem Traditionellen und einem herkömmlichen Balsamico Essig aus Modena mit instrumentell-analytischen Daten zu korrelieren. So spiegelte sich die weniger intensive Süße des herkömmlichen Essigs in den signifikant geringeren Gehalten an Glucose, Fructose, Glycerin und dem Süßmodulator 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) wider, während die stechende Sauerqualität auf die im Vergleich zum Traditionellen Essig deutlich unterschiedlichen Gehalte der organischen Säuren zurückzuführen war. Auch konnten die Ellagtannine **27** und **28**, die aufgrund der fehlenden Fasslagerung im herkömmlichen Essig gänzlich abwesend waren, als eindeutige Authentizitätsmarker für Traditionellen Balsamico Essig postuliert werden. Zudem wurden die Veränderungen im Sensometabolom von Traditionellem Balsamico Essig während der Lagerung in einer Fasskaskade quantitativ erfasst. Dabei wurde deutlich, dass viele Schlüsselgeschmacksstoffe wie z.B. Glucon- oder Äpfelsäure über die Reifezeit hinweg zwar in ihren absoluten Gehalten abnehmen, aufgrund der Wasserevaporation jedoch aufkonzentriert werden und somit an Bedeutung für den Gesamtgeschmack gewinnen.

Zur Klärung des süßmodulierenden Effekts von 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) auf Rezeptorebene wurden abschließend zellbasierte Messungen zur Aktivierung des humanen Süßrezeptors hTAS1R2/hTAS1R3 durchgeführt. Dabei zeigte sich im Kontrast zu den Ergebnissen der psychophysikalischen Experimente eine spezifische Aktivierung des Heterodimerenpaares hTAS1R2/hTAS1R3 durch die Verbindung **34**, während die kombinierte Applikation von Saccharose und **34** keinen synergistischen Effekt hervorrief. Zusätzlich erfolgten Messungen zur Aktivierung des Süßrezeptors durch verschiedene strukturverwandte Furan-, Thiophen- und Pyrrolderivate, die erste Struktur/Wirkungsbeziehungen im Hinblick auf die Aktivierung von hTAS1R2/hTAS1R3 offenlegten. Da allerdings auch für einige dieser Verbindungen Diskrepanzen zwischen humansensorischen und wahrnehmungsphysiologischen Daten gefunden wurden, wären für

zukünftige Folgeuntersuchungen detaillierte Experimente unter Verwendung von chimären Rezeptoren oder Punktmutationen zur genauen Lokalisierung und Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Süßrezeptor und Liganden interessant.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals das nicht-flüchtige Sensometabolom von Parmesankäse sowie Traditionellem und herkömmlichem Balsamico Essig aus Modena auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Weiterhin wurden wertvolle Kenntnisse über Faktoren, die die Bildung dieser Schlüsselgeschmacksstoffe beeinflussen, gewonnen und somit die Grundlage zur gezielten Optimierung von technologischen Prozessen bei der Herstellung von Parmesankäse und Traditionellem Balsamico Essig gelegt.

5 Literatur

Adler, E.; Hoon, M.A.; Müller, K.L.; Chandrashekar, J.; Ryba, N.J.P.; Zuker, C.S. A novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell* **2000**, *100*, 693–702.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: Bestimmung der Trockenmasse von zuckerhaltigen Lebensmitteln (Vakuumtrocknung): L 39.00-2; Hrsg.: BGA, Beuth Verlag GmbH Berlin, **2002**.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: Bestimmung der Gesamttrockenmasse von Käse und Schmelzkäse: L 03.00-9; Hrsg.: BGA, Beuth Verlag GmbH Berlin, **2007**.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: Sensorische Prüfverfahren: Dreiecksprüfung (nach DIN EN ISO 4120): L 00.90-7; Hrsg.: BGA, Beuth Verlag GmbH Berlin, **2007**.

Antonelli, A.; Chinnici, F.; Masino, F. Heat-induced modification of grape must as related to its concentration during the production of traditional balsamic vinegar: a preliminary approach. *Food Chem.* **2004**, *88*, 63–68.

Aston, J.W.; Creamer, L.K. Contribution of the components of the water-soluble fraction to the flavor of Cheddar cheese. *N.Z.J Dairy Sci. Technol.* **1986**, *21*, 229–248.

Bachmanov A.A.; Li, X.; Reed, D.R.; Ohmen, J.D.; Li, S. Positional Cloning of the mouse saccharin preference (*Sac*) locus. *Chem. Senses* **2001**, *26*, 925–933.

Bachmanov, A.A.; Beauchamp, G.K. Taste receptor genes. *Annu. Rev. Nutr.* **2007**, *27*, 389–414.

Bajec, M. R.; Pickering, G.J. Astringency: Mechanisms and Perception. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 858–875.

Bartolini, L. Il Parmigiano Reggiano - Der König der Käse mit dem einzigartigen Geschmack. Flehsig, Würzburg, **2006**.

Baumrucker, C.R. γ -Glutamyl Transpeptidase of Bovine Milk Membranes: Distribution and Characterization. *J. Dairy Sci.* **1979**, *62*, 253–258.

- Behrens, M.; Bartelt, J.; Reichling, C.; Winnig, M.; Kuhn, C.; Meyerhof, W. Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 20650–20659.
- Behrens, M.; Brockhoff, A.; Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Meyerhof, W. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 479–485.
- Behrens, M.; Meyerhof, W.; Hellfritsch, C.; Hofmann, T. Moleküle und biologische Mechanismen des Süß- und Umamigeschmacks. *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2268–2291.
- Belitz, H.D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag, New York, **2001**.
- Biarnes, X.; Marchiori, A.; Giorgetti, A.; Lanzara, C.; Gasparini, P.; Carloni, P.; Born, S.; Brockhoff, A.; Behrens, M.; Meyerhof, W. Insights into the Binding of Phenylthiocarbamide (PTC) Agonist to Its Target Human TAS2R38 Bitter Receptor. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12394.
- Biede, S.L.; Hammond, E.G. Swiss cheese flavor: I. Chemical Analysis. *J. Dairy Sci.* **1979a**, *62*, 227–237.
- Biede, S.L.; Hammond, E.G. Swiss cheese flavor: II. Organoleptic analysis. *J. Dairy Sci.* **1979b**, *62*, 238–248.
- Bigiani, A.; Prandi, S. Functional diversity of taste cells. A review. *Flavour Fragr. J.* **2011**, *26*, 214–217.
- Blel, M.; Guingamp, M.F.; Gaillard, J.L.; Humbert, G. Studies on the thermal sensitivity of γ -glutamyl transpeptidase measured with a modified test procedure and compared with that of alkaline phosphatase and lactoperoxidase in milk. *Lait* **2002**, *82*, 555–556.
- Boettger, E.C. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FMES Microbiol. Lett.* **1989**, *65*, 171–176.
- Breslin, P.A.S.; Beauchamp, G.K. Suppression of bitterness by sodium: variation among bitter taste stimuli. *Chem. Senses* **1995**, *20*, 609–623.
- Briggs, M. Alles Essig!, Bassermann Verlag, München, **2007**.

- Brock, A.; Hofmann, T. Identification of the Key Astringent Compounds in Spinach (*Spinacia oleracea*) by Means of the Taste Dilution Analysis. *Chem. Percept.* **2008**, *1*, 268–281.
- Brockhoff, A.; Behrens, M.; Niv, M.Y.; Meyerhof, W. Structural requirements of bitter taste receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11110–11115.
- Bufe, B.; Breslin, P.A.S.; Kuhn, C.; Reed, D.R.; Tharp, C.D.; Slack, J.P.; Kim, U.K.; Drayna, D.; Meyerhof, W. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 322–327.
- Bufe, B.; Hofmann, T.; Krautwurst, D.; Raguse, J.D.; Meyerhof, W. The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to β -glucopyranosides. *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 397–401.
- Bütikofer, U.; Fuchs, D.; Hurni, D.; Bosset, J.O. On the determination of biogenic amines in cheese. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **1990**, *81*, 120–133.
- Caligiani, A.; Acquotti, D.; Palla, G.; Bocchi, V. Identification and quantification of the main organic compounds of vinegars by high resolution $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *585*, 110–119.
- Careri, M.; Spagnoli, S.; Panari, G.; Zannoni, M.; Barbieri, G. Chemical Parameters of the Non-volatile Fraction of Ripened Parmigiano-Reggiano Cheese. *Int. Dairy J.* **1996**, *6*, 147–155.
- Cerezo, A.B.; Espartero, J.L.; Winterhalter, P.; Garcia-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. (+)-Dihydrorobinetin: a Marker of Vinegar Aging in Acacia (*Robinia pseudiacacia*) Wood. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9551–9554.
- Chan, W.C.; White, P.D. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A practical Approach. *Oxford University Press*, **2000**.
- Chandrashekar, J.; Hoon, M.A.; Ryba, N.J.P.; Zuker, C.S. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **2006**, *444*, 288–294.

- Chandrashekar, J.; Kuhn, C.; Oka, Y.; Yarmolinski, D.A.; Hummler, E.; Ryba, N.J.P.; Zuker, C.S. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* **2010**, *464*, 297–301.
- Chandrashekar, J.; Müller, K.L.; Hoon, M.A.; Adler, E.; Feng, L.; Guo, W.; Zuker, C.S.; Ryba, N.J.P. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **2000**, *100*, 703–711.
- Chaudhari, N.; Roper, S.D. The cell biology of taste. *J. Cell. Biol.* **2010**, *190*, 285–296.
- Chaudhari, N.; Landin, A.M.; Roper, S.D. A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat. Neurosci.* **2000**, *3*, 113–119.
- Chinnici, F.; Masino, F.; Antonelli, A. Determination of Furanic Compounds in Traditional Balsamic Vinegars by Ion-Exclusion Liquid Chromatography and Diode-Array Detection. *J. Chromatogr. Sci.* **2003**, *41*, 305–310.
- Ciani, M. Wine vinegar production using base wines made with different yeast species. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *78*, 290–294.
- Cirlini, M.; Caligiani, A.; Palla, G. Formation of glucose and fructose acetates during maturation and ageing of balsamic vinegars. *Food Chem.* **2009**, *112*, 51–56.
- Cjmelova, K.; Panovska, Z.; Vachova, A.; Lukesova, D. Time-Intensity Studies of Sweeteners. *Czech J. Food Sci.* **2009**, *27*, 327–329.
- Clarridge, J.E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 840–862.
- Cliff, M.; Heymann, H. Development and use of time-intensity methodology for sensory evaluation: A review. *Food Res. Int.* **1993**, *26*, 375–385.
- Cocchi, M.; Bro, R.; Durante, C.; Manzini, D.; Marchetti, A.; Saccani, F.; Sighinolfi, S.; Ulrici, A. Analysis of sensory data of Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (ABTM) of different ageing by application of PARAFAC models. *Food Qual. Prefer.* **2006a**, *17*, 419–428.

- Cocchi, M.; Durante, C.; Grandi, M.; Lambertini, P.; Manzini, D.; Marchetti, A. Simultaneous Determination of Sugars and Organic Acids in Aged Vinegars and Chemometric Data Analysis. *Talanta* **2006b**, *69*, 1166–1175.
- Cocchi, M.; Ferrari, G.; Manzini, D.; Marchetti, A.; Sighinolfi, S. Study of the Monosaccharides and Furfurals Evolution during the Preparation of Cooked Grape Musts for Aceto Balsamico Tradizionale Production. *J. Food Eng.* **2007**, *79*, 1438–1444.
- Cocchi, M.; Lambertini, P.; Manzini, D.; Marchetti, A.; Ulrici, A. Determination of Carboxylic Acids in Vinegars and in Aceto Balsamico Tradizionale Di Modena by HPLC and GC Methods. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5255–5261.
- Collomb, M.; Malke, P.; Spahni, M.; Sieber, R.; Bütikofer, U. Gas chromatographic determination of free fatty acids in cheese: precision of the method and influence of seasons on lipolysis in different Swiss cheeses. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **2003**, *94*, 212–229.
- Combes, C.; Paterson, E.; Amado, R. Isolation and Identification of low-molecular-weight peptides from Emmental cheese. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 553–559.
- Consonni, R.; Gatti, A. ¹H NMR Studies on Italian Balsamic and Traditional Balsamic Vinegars. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3446–3450.
- Consortio del Formaggio Parmigiano Reggiano, *Specification of the Parmigiano Reggiano Cheese*, **2011**.
- Coppola, R.; Nanni, M.; Iorizzi, M.; Sorrentino, A.; Sorrentino, E.; Grazia, L. Survey of lactic acid bacteria isolated during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *J. Dairy Res.* **1997**, *64*, 305–310.
- Coppola, R.; Nanni, M.; Iorizzi, M.; Sorrentino, A.; Sorrentino, E.; Chiavari, C.; Grazia, L. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first month of the ripening. *Lait* **2000**, *80*, 479–490.
- CRPA, Centro Ricere Produzioni Animali: Systema Informativa filiera Parmigiano Reggiano, *Monthly survey of 2010 production; Export of Parmigiano Reggiano in 2010*, **2010**.
http://www.crpa.it/nqcontent.cfm?a_id=1862&tt=crpa_www&sp=sipr

Curtin, Á.C.; McSweeney, P.L.H. Catabolism of Amino Acids in Cheese during Ripening. In *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology – General Aspects*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: London, U.K., **2004**; 435–454.

Custodio, F.B.; Tavarez, E.; Gloria, M.B.A. Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. *J. Food Comp. Anal.* **2007**, *20*, 280–288.

Damak, S.; Rong, M.; Yasumatsu, K.; Kokrashvili, Z.; Varadarajan, V.; Zou, S.; Jiang, P.; Ninomiya, Y.; Margolskee, R.F. Detection of Sweet and Umami in the Absence of Taste Receptor T1r3. *Science* **2003**, *301*, 850–853.

De la Fuente, M.A.; Fontecha, J.; Juarez, M. Fatty acid composition of the triglyceride and free fatty acid fractions in different cows-, ewes-, and goats-milk cheeses. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *196*, 155–158.

De Vero, L.; Gala, E.; Gullo, M.; Solieri, L.; Landi, S.; Giudici, P. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 809–813.

Del Signore, A. Chemometric Analysis and Chemical and Physical Parameters of Traditional Balsamic Vinegars from Modena. *J. Commodity Sci.* **2001**, *40*, 33–48.

Delahunty, C.M.; Drake, M.A. Sensory Character of Cheese and its Evaluation. In *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology- General Aspects*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: London, U.K., **2004**; 455–487.

Delahunty, C.M.; Piggot, J.R. Current methods to evaluate contribution and interactions of components to flavor of solid foods using hard cheese as an example. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1995**, *30*, 555–570.

Delay, E.R.; Beaver, A.J.; Wagner, K.A.; Stapleton, J.R.; Harbaugh, J.O.; Catron, K.D.; Roper, S.D. Taste Preference Synergy Between Glutamate Receptor Agonists and Inosine Monophosphates in Rats. *Chem. Senses* **2000**, *25*, 507–515.

Dotson, C.D. The Search for Mechanisms Underlying the Sour Taste Evoked by Acids Continues. *Chem. Senses* **2010**, *35*, 545–547.

Drake, S.L.; Whetstone, M.E.C.; Drake, M.A.; Courtney, P.; Fligner, K.; Jenkins, J.; Pruitt, C. Sources of umami taste in Cheddar and Swiss cheeses. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, 360–366.

Dunkel, A.; Köster, J.; Hofmann, T. Molecular and Sensory Characterization of γ -Glutamylpeptides as Key Contributors to the Kokumi Taste of Edible Beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6712–6719.

Engel, E.; Nicklaus, S.; Septier, C.; Salles, C.; Le Quere, J.L. Taste active compounds in a Goat cheese water-soluble extract. 1. Development and Sensory Validation of a Model Water-Soluble Extract. *J. Agric. Food Chem.* **2000a**, *48*, 4252–4259.

Engel, E.; Nicklaus, S.; Septier, C.; Salles, C.; Le Quere, J.L. Taste active compounds in a Goat cheese water-soluble extract. 2. Determination of the relative impact of water-soluble extract components on its taste using omission tests. *J. Agric. Food Chem.* **2000b**, *48*, 4260–4267.

Engel, E.; Tournier, C.; Salles, C.; Le Quéré, J.L. Determination of taste-active compounds of a bitter Camembert cheese by omission tests. *J. Dairy Res.* **2001b**, *68*, 675–688.

Engel, E.; Tournier, C.; Salles, C.; Le Quéré, J.L. Evolution of the Taste of a bitter camembert cheese during ripening: Characterization of a matrix effect. *J. Agric. Food Chem.* **2001a**, *49*, 2930–2939.

Engel, E.; Tournier, C.; Salles, C.; Le Quéré, J.L. Evolution of the composition of a selected bitter camembert cheese during ripening: release and migration of taste-active compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2001c**, *49*, 2940–2947.

Engels, W.J.M.; Visser, S. Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavor of different types of cheese. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, **1994**, *48*, 127–140.

Falcone, P.M.; Chillo, S.; Giudici, P.; Del Nobile, M.A. Measuring rheological properties for applications in quality assessment of Traditional Balsamic Vinegar: Description and preliminary evaluation of a model. *J. Food Eng.* **2007**, *80*, 234–240.

Falcone, P.M.; Giudici, P. Molecular Size and Molecular Size Distribution Affecting Traditional Balsamic Vinegar Aging. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7057–7066.

Fallico, V.; McSweeney, P.L.H.; Horne, J.; Pedigillieri, C.; Hannon, J.A.; Carpino, S.; Licitra, G. Evaluation of bitterness in Ragusano cheese. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 1288–1300.

Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Mendes, E.; Gomes, A.M.P.; Faria, M.A.; Ferreira, M.A. The determination and distribution of nucleotides in dairy products using HPLC and diode array detection. *Food Chem.* **2001**, *74*, 239–244.

Festring, D.; Brockhoff, A.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Stereoselective Synthesis of Amides Sharing the Guanosine 5'-Monophosphate Scaffold and Umami Enhancement Studies using Human Sensory and hT1R1/rT1R3 Receptor Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8875–8885.

Festring, D.; Hofmann, T. Discovery of N²-(1-carboxyethyl)guanosine 5'-monophosphate as an umami-enhancing Maillard-modified nucleotide in yeast extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10614–10622.

Fitzgerald E.; Buckley J. Effect of total and partial substitution of sodium chloride on the quality of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **1985**, *68*, 3127–3134.

Fox, P.F.; Kelly, A.L. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects; Part 2. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 517–532.

Fox, P.F.; Lucey, J.A.; Cogan, T.M. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1990**, *29*, 237–253.

Fox, P.F.; McSweeney, P.L. Cheese - An Overview. In *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology - General Aspects*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: London, U.K., **2004**; 1–18.

Frank, O.; Ottinger, H.; Hofmann, T. Characterization of an intense bitter-tasting 1H,4H-quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and identification of taste-active compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 231–238.

Galindo-Cuspinera, V.; Winnig, M.; Bufe, B.; Meyerhof, W.; Breslin, P.A.S. A TAS1R receptor-based explanation of sweet “water-taste”. *Nature* **2006**, *441*, 354–357.

Gazzeta Ufficiale della Repubblica Italiana, Nr. 82, 9-4-1986.

- Giudici, P.; Gullo, M.; Solieri, L.; Falcone, P.M. Technical and Microbial Aspects of Traditional Balsamic Vinegar and Their Influence on Quality and Sensorial Properties. *Adv. Food Nutr. Res.* **2009**, *58*, 137–182.
- Glabasnia, A.; Hofmann, T. Identification and Sensory Evaluation of Dehydro- and Deoxy-ellagitannins Formed upon Toasting of Oak Wood (*Quercus alba L.*). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4109–4118.
- Glabasnia, A.; Hofmann, T. Sensory-Directed Identification of Taste-Active Ellagitannins in American (*Quercus alba L.*) and European Oak Wood (*Quercus robur L.*) and Quantitative Analysis in Bourbon Whiskey and Oak-Matured Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3380–3390.
- Gobetti, M. Extra-Hard Varieties. In *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology - Major Cheese Groups*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: London, U.K., **2004**; 51–70.
- Granchi, L.; Ganucci, D.; Messini, A.; Vincenzini, M. Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentation of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res.* **2002**, *2*, 403–407.
- Gröhnke, G. Decoding the aroma of Balsamic Vinegar and Parmigiano Reggiano Cheese by concepts of molecular sensory science. Dissertation, Technische Universität München, **2010**.
- Guerrero, A.; Kwon, S.S.; Vadera, D.V. Compositionsto enhance taste of salt used in reduced amounts. U.S. Patent 5711985, **1998**.
- Guigoz, Y.; Solms, J. Isolation of a bitter tasting peptide from Alpkaese, a Swiss-mountain cheese. *Lebensm.-Wiss.-Technol.* **1974**, *7*, 356–357.
- Güler, Z. Quantification of free fatty acids and flavor characteristics of Kasar cheeses. *J. Food Lip.* **2010**, *12*, 209–221.
- Gullo, M.; Caggia, C.; De Vero, L.; Giudici, P. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *106*, 209–212.
- Hellemann, U. Perceived taste of sodium chloride and acid mixtures in water and bread. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1992**, *27*, 201–211.

- Hellfritsch, C.; Brockhoff, A.; Stähler, F.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Human Psychometric and Taste Receptor Responses to Steviol Glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 6782–6793.
- Hennigs, J. K.; Burhenne, N.; Stähler, F.; Winnig, M.; Walter, B.; Meyerhof, W.; Schmale, H. Sweet Taste Receptor Interacting Protein CIB1 Is a General Inhibitor of InsP(3)-dependent Ca(2+)-Release InVivo. *J. Neurochem.* **2008**, *106*, 2249–2262.
- Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- Hildebrandt, G. Geschmackswelten. Grundlagen der Lebensmittelsensorik. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, **2008**.
- Hintz, P.C.; Slatter, W.L.; Harper, W.J. A survey of various free amino acids and fatty acids in domestic Swiss cheese. *J. Dairy Sci.* **1956**, *39*, 235–244.
- Hoon, M.A.; Adler, E.; Lindemeier, J.; Battey, J.F.; Ryba, N.J.; Zuker, C.S. Putative mammalian taste receptors: a class of taste specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* **1999**, *96*, 541–551.
- Horwood, J.F. Cheese flavour: what is it? *CSIRO Food Research Quarterly* **1975**, *35*, 13–17.
- Huang, A.L.; Chen, X.; Hoon, M.A.; Chandrashekar, J.; Guo, W.; Tränker, D.; Ryba, N.J.P.; Zuker, C.S. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* **2006**, *442*, 934–938.
- Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008a**, *56*, 1376–1386.
- Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, *56*, 9190–9199.
- Ilegems, E.; Iwatsuki, K.; Kokrashvili, Z.; Benard, O.; Ninomiya, Y.; Margolskee, R.F. REEP2 enhances sweet receptor function by recruitment to lipid rafts. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 13774–13783.

Intelmann, D.; Batram, C.; Kuhn, C.; Haseleu, G.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Three TAS2R Bitter Taste Receptors Mediate the Psychophysical Responses to Bitter Compounds of Hop (*Humulus lupulus L.*) and Beer. *Chem. Percept.* **2009**, *2*, 118–132.

Ishimaru, Y.; Inada, H.; Kubota, M.; Zhuang, H.; Tominaga, M.; Matsunami, H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12569–12574.

Jianbo, J.; Kim, S.; Jin, Q.; Eom, H.; Han, N. Diversity Analysis of Lactic Acid Bacteria in Takju, Korean Rice Wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 1678–1682.

Jiang, P.; Cui, M.; Ji, Q.; Snyder, L.A.; Liu, Z.; Benard, L.; Margolskee, R.F.; Osman, R.; Max, M. Molecular Mechanisms of Sweet Receptor Function. *Chem. Senses* **2005a**, *30* (Suppl. 1), i17–18.

Jiang, P.; Cui, M.; Zhao, B.; Snyder, L.A.; Benard, L.M.; Osman, R.; Max, M.; Margolskee, R.F. Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R1 to inhibit sweet taste. *J. Biol. Chem.* **2005b**, *280*, 15238–15246.

Jiang, P.; Cui, M.; Zhao, B.; Snyder, L.A.; Benard, L.M.; Osman, R.; Max, M.; Margolskee, R.F. Identification of the Cyclamate Interaction Site within the Transmembrane Domain of the Human Sweet Taste Receptor Subunit T1R3. *J. Biol. Chem.* **2005c**, *280*, 34296–34305.

Jiang, P.; Ji, Q.; Liu, Z.; Snyder, L.A.; Benard, L.M.; Margolskee, R.F.; Max, M. The Cysteine-rich Region of T1R3 Determines Responses to Intensely Sweet Proteins. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45068–45075.

Karkowsky, A.M.; Orłowski, M. γ -Glutamyl-Transpeptidase: Determination of specificity in the presence of multiple amino acid acceptors. *J. Biol. Chem.*, **1978**, *253*, 1574–1581.

Kelly, M.; Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. Effect of salt-in-moisture on proteolysis in Cheddar-type cheese. *Milchwissenschaft* **1996**, *51*, 498–501.

Kim, U.K.; Jorgenson, E.; Coon, H.; Leppert, M.; Risch, N.; Drayna, D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* **2003**, *299*, 1221–1225.

Kromidas, S. Validierung in der Analytik. 2. Auflage, Wiley-VCH, **2011**.

Kubickova, J; Grosch, W. Evaluation of flavor compounds of Camembert cheese. *Int. Dairy J.* **1998a**, *8*, 11–16.

Kubickova, J; Grosch, W. Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *Int. Dairy J.* **1997**, *7*, 65–70.

Kubickova, J; Grosch, W. Quantification of potent odorants in Camembert cheese and calculation of their odour activity values. *Int. Dairy J.* **1998b**, *8*, 17–23.

Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Hofmann, T.; Frank, O.; Behrens, M., Lewtschenko, T.; Slack, J.P.; Ward, C.D.; Meyerhof, W. Bitter taste receptors for saccharin and acesulfam K. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10260–10265.

Kuninaka, A. Flavor Potentiators. In *Symposium on Foods: The Chemistry and Physiology of Flavors*. Hrsg.: Schultz, H. W.; Day, E. A.; Libbey, L. M.; The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, USA, **1967**, 515–535.

Lallemand, M.; Giborau, A.; Rytz, A.; Colas, B. Extraction Parameters from Time-Intensity Curves using a Trapezoid Model: The Example of some Sensory Attributes of Ice Cream. *J. Sens. Stud.* **1999**, *14*, 387–399.

Langler, J.E.; Libbey, L.M.; Day, E.A. Identification and evaluation of selected compounds in Swiss cheese flavour. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 386–391.

Larson-Powers, N.L.; Pangborn, R.M. Paired comparison and time-intensity measurements of the sensory properties of beverages and gelatins containing sucrose or synthetic sweeteners. *J. Food Sci.* **1979**, *43*, 41–46.

Lawless, H.T.; Heymann, H. Time-Intensity Methods. In *Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices*, 2nd ed.; Springer Science and Business Media, New York, **2010**; 179–201.

Lee, C. A.; Baraem, I.; Vickers, Z. M. The Role of Salivary Proteins in the Mechanism of Astringency. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, 381–387.

Le Quere, J.L. Cheese Flavour: Instrumental Techniques. In *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology - General Aspects*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: London, U.K., **2004**; 489–510.

- Le Quere, J.L.; Salles, C. Goat cheese flavor compounds. In *Recent Advances on Goat Milk Quality, Raw Material for Cheesemaking*; ITPLC Editions, Surgeres, Frankreich, **2001**; 115–122.
- Le Quere, J.L.; Septier, C.; Demaizieres, D.; Salles, C. Identification and sensory evaluation of the character-impact compounds of goat cheese flavour. In *Flavour Science. Recent Developments*; The Royal Society of Chemistry; Cambridge, U.K., **1996**; 325–330.
- Lee, K.P.D.; Lo, C.G.; Warthesen, J.J. Preparative Methods of Isolating Bitter peptides from Cheddar Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **1996a**, *44*, 1058–1063.
- Lee, K.P.D.; Lo, C.G.; Warthesen, J.J. Removal of bitterness from the bitter peptides extracted from Cheddar cheese with peptidases from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11. *J. Dairy Sci.* **1996b**, *79*, 1521–1528.
- Lee, T.D. Aspartic acid and arginine as salt enhancers. U.S. Patent 5145707, **1992**.
- Lemieux, L.; Simard, R.E. Bitter flavor in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait* **1991**, *71*, 599–636.
- Li, X.; Staszewski, L.; Xu, H.; Durick, K.; Zoller, M.; Adler, E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 4692–4696.
- Lindemann, B. Receptors and transduction in taste. *Nature* **2001**, *413*, 219–225.
- Ludwig, M.G.; Vanek, M.; Guerini, D.; Gasser, J.A.; Jones, C.E.; Junker, U.; Hofstetter, H.; Wolf, R.M.; Seuwen, K. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* **2003**, *425*, 93–98.
- Majumder, G.C.; Ganguli, N.C. Glutamyl-transpeptidase in milk I. Certain parameters influencing its activity. *Milchwiss.* **1972**, *27*, 296–299.
- Maruyama, Y.; Pereira, E.; Margolskee, R.F.; Chaudhari, N.; Roper, S.D. Umami Responses in Mouse Taste Cells Indicate More than One Receptor. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 2227–2234.
- Maruyama, Y.; Yasuda, R.; Kuroda, M.; Eto, Y. Kokumi Substances, Enhancers of Basic Tastes, Induce Responses in Calcium-Sensing Receptor Expressing Taste Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34489.

Masino, F.; Chinnici, F.; Bendini, A.; Montevecchi, G.; Antonelli, A. A Study on Relationships among Chemical, Physical, and Qualitative Assessment in Traditional Balsamic Vinegar. *Food Chem.* **2008**, *106*, 90–95.

Masino, F.; Chinnici, F.; Franchini, G.C.; Ulrici, A.; Antonelli, A. A Study of the Relationships among Acidity, Sugar and Furanic Compound Concentrations in Set of Casks for Aceto Balsamico Tradizionale of Reggio Emilia by Multivariate Techniques. *Food Chem.* **2005**, *92*, 673–679.

Matsunami, H.; Montmayeur, J.P.; Buck, L.B. A Family of Candidate Taste Receptors in Human and Mouse. *Nature* **2000**, *404*, 601–604.

Max, M.; Shanker, Y.G.; Huang, L.; Rong, M.; Liu, Z. et al. *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 58–63.

McGugan, W.A.; Emmons, D.B.; Larmond, E. Influence of volatile and nonvolatile fractions on intensity of Cheddar cheese flavor. *J. Dairy Sci.* **1979**, *62*, 398–403.

McSweeney, P.L.H. The flavour of milk and dairy products: III. Cheese: Taste. *Int. J. Dairy Technol.* **1997**, *50*, 123–128.

McSweeney, P.L.H.; Ottogalli, G.; Fox, P.F. Diversity of Cheese Varieties: An Overview. In *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology - Major Cheese Groups*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: London, U.K., **2004**; 1–22.

Medlin, L.; Elwood, H.J.; Stickel, S.; Sogin, M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions. *Gene* **1988**, *71*, 491–499.

Merkle, R. Aceto Balsamico Tradizionale. PAL Verlagsgesellschaft, Mannheim, **2002**.

Meyerhof, W.; Batram, C.; Kuhn, C.; Brockhoff, A.; Chudoba, E.; Buße, B.; Appendino, G.; Behrens, M. The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors. *Chem. Senses* **2010**, *35*, 157–170.

Milo, C.; Reineccius, G.A. Identification and Quantification of Potent Odorants in Regular-fat and Low-fat mild Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3590–3594.

- Miyamoto, M.; Seto, Y.; Hai Hao, D.; Teshima, T.; Bo Sun, Y.; Kabuki, T.; Bing Yao, L.; Nakajima, H. *Lactobacillus harbinensis* sp. nov., consisted of strains isolated from traditional fermented vegetables 'Suan cai' in Harbin, Northeastern China and *Lactobacillus perolens* DSM 12745. *Syst. Appl. Microbiol.* **2006**, *28*, 688–694.
- Molina, E.; Ramos, M.; Alonso, L.; Lopez-Fandino, R. Contribution of low molecular weight water soluble compounds to the taste of cheeses made of cows', ewes' and goats' milk. *Int. Dairy J.* **1999**, *9*, 613–621.
- Montmayeur, J.P.; Liberles, S.D.; Matsunami, H.; Buck, L.B. A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 492–498.
- Moskowitz, H.R.; Klarman, L. The tastes of artificial sweeteners and their mixtures. *Chemical Senses & Flavour* **1975**, *1*, 411–421.
- Moyer, B.; Zlotnik, A.; Hevezi, P.; Soto, H.; Kalabat, D.; Lu, M.; Gao, N.; Servant, G.; White, E.C.; Brust, P.; Williams, M. Identification of TRPML3 (MCOLN3) as a salty taste receptor and use in assays for identifying taste (salty) modulators and/or therapeutics that modulate sodium transport, absorption or excretion and/or aldosterone and/or vasopressin production or release. U.S. Pat. Appl. Publ. **2009**, US 2009210953 A1 20090820.
- Nelson, G.; Chandrashekar, J. Hoon, M.A.; Feng, L.; Zhao, G.; Ryba, N.J.P.; Zuker, C.S. An amino-acid taste receptor. *Nature* **2002**, *416*, 199–202.
- Nelson, G.; Hoon, M.A.; Chandrashekar, J.; Zhang, Y.; Ryba, N.J.P.; Zuker, C.S. Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell* **2001**, *106*, 381–390.
- Nelson, T.M.; LopezJimenez, N.D.; Tessarollo, L.; Inoue, M.; Bachmanov, A.A.; Sullivan, S.L. Taste function in Mice with a Targeted Mutation on the *Pkd113* Gene. *Chem. Senses* **2010**, *35*, 565–577.
- Ney, K.H. Bitterness of Lipids. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **1979**, *115*, 467–469.
- Nie, Y.; Vignes, S.; Hobbs, J.R.; Conn, G.L.; Munger, S.D. Distinct Contribution of T1R2 and T1R3 Taste Receptor Subunits to the Detection of Sweet Stimuli. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 1948–1952.

Ohsu, T.; Amino, Y.; Nagasaki, H.; Yamanaka, T.; Takeshita, S.; Hatanaka, H.; Maruyama, Y.; Miyamura, N.; Eto, Y. Involvement of the Calcium-sensing Receptor in Human Taste Perception. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 1016–1022.

Ohsu, T.; Takeshita, S.; Eto, Y.; Amino, Y.; Miyamura, N.; Yamanaka, T.; Nagasaki, T. Kokumi imparting agent. WO/2007/055393, **2007**.

Ott, D.B.; Edwards, C.L.; Palmer, S.J. Percieved Taste Intensity and Duration of Nutritive and Non-nutritive Sweeteners in Water using Time-intensity (T-I) Evaluations. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 535–542.

Palmer, R.K. The Pharmacology and Signaling of Bitter, Sweet, and Umami Taste Sensing. *Molecular Interventions* **2007**, *7*, 87–98.

Parente, E.; Cogan, T.M. Starter Cultures: General Aspects. In *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology - General Aspects*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: London, U.K., **2004**; 123–147.

Pin, J.P.; Galvez, T.; Prezeau, L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *98*, 325–254.

Piparez, G.; Herent, M.F.; Collins, S. Flavour retention by lipids measured in a fresh cheese matrix. *Food Chem.* **1998**, *61*, 119–125.

Plessi, M.; Bertelli, D.; Miglietta, F. Extraction and Identification by GC-MS of Phenolic Acids in Traditional Balsamic Vinegar from Modena. *J. Food Comp. Anal.* **2006**, *19*, 49–54.

Plessi, M.; Monzani, A.; Coppini, D. Determination of the Monosaccharide and Alcohol Content of Balsamic and other Vinegars by Enzymatic Methods. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 25–30.

Plessi, M.; Monzani, A.; Coppini, D. Quantitative Determination of Acids and Derivatives in Balsamic and other Vinegars. *Sciences des Aliments* **1989**, *9*, 179–183.

Preininger, M.; Grosch, W. Evaluation of key odorants of the neutral volatiles of Emmentaler Cheese by the calculation of odour activity values. *Z. Lebensm.-Wiss.u.Technol.* **1994**, *27*, 237–244.

- Preininger, M.; Warmke, R.; Grosch, W. Identification of the character impact flavor compounds of Swiss cheese by sensory studies of models. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1996**, *202*, 30–34
- Pronin, A.N.; Tang, H.; Connor, J.; Keung, W. Identification of ligands for two human bitter T2R receptors. *Chem. Senses* **2004**, *29*, 583–593.
- Reichling, C.; Meyerhof, M.; Behrens, M. N-Glycosylation is required for bitter taste receptor function. In *Expression of Multidisciplinary Flavour Science*; M. Wust, I. Blank, C. Yeretizian, Ed.; Züricher Hochschule für angewandte Wissenschaften, Winterthur: Zürich, **2010**.
- Revel, J.P.; Ball, E.G. The reaction of Glutathion with Amino Acids and related Compounds as Catalyzed by γ -Glutamyl-Transpeptidase. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 577–582.
- Richardson, B.C.; Creamer, L.K. Casein proteolysis and bitter peptides in Cheddar cheese. *N.Z.J Dairy Sci. Technol.* **1973**, *8*, 46–51.
- Roepstorff, P. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.
- Rossetti, L.; Giraffa, G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J. Microbiol. Methods* **2005**, *63*, 135–144.
- Rotzoll N., Dunkel A., Hofmann T. Quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments on the key taste compounds in morel mushrooms (*Morchella deliciosa Fr.*). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2705–2711.
- Roudot-Algaron, F.; Kerhoas, I.; Le Bars, D.; Einhorn, J.; Gripon, J. C. Isolation of γ -glutamyl peptides from Comté cheese. *J. Dairy Sci.* **1994**, *77*, 1161–1166.
- Roudot-Algaron, F.; Le Bars, D.; Einhorn, J.; Adda, J.; Gripon, J.C. Flavor constituents of aqueous fraction extracted from Comte cheese by liquid carbon dioxide. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 1005–1009.
- Rychlik, M.; Assam, S. Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2404–2408.

Salles, C.; Septier, C.; Roudot-Algaron, F.; Guillot, A.; Etievant, P.X. Sensory and chemical Analysis of fractions obtained by gel permeation of water-soluble Comte cheese extracts. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1659–1668.

Sanarico, D.; Motta, S.; Bertolini, L.; Antonelli, A. HPLC Determination of Organic Acids in Traditional Balsamic Vinegar of Reggio Emilia. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *13*, 2177–2187.

Sanz, M.; Fernandez de Simon, B.; Esteruelas, E.; Munoz, A.M.; Cadahia, E.; Hernandez, T.; Estrella, I.; Pinto, E. Effect of Toasting Intensity at Cooperage on Phenolic Compounds in Acacia (*Robinia pseudoacacia*) Heartwood. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3135–3145.

Sanz, M.; Cadahia, E.; Esteruelas, E.; Munoz, A. M.; Fernandez de Simon, B.; Hernandez, T.; Estrella, I. Phenolic Compounds in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Heartwood. Effect of Toasting at Cooperage. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9631–9640.

Scharbert, S.; Hofmann, T. Molecular Definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution and omission experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5377–5384.

Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *J. Agric. Food Chem.* **2004a**, *52*, 3498–3508.

Scharbert, S.; Jezussek, M.; Hofmann, T. Evaluation of the taste contribution of theaflavins in black tea infusions using the taste activity concept. *Eur. Food Res. Technol.* **2004b**, *218*, 442–447.

Schieberle, P.; Molyneux, R.J. Quantitation of Sensory-Active and Bioactive Constituents of Food: A *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Perspective. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2404–2408.

Schiffman, S.S., Sattely-Miller, E.A., Graham, B.G., Booth, B.J., Gibes, K.M. Synergism among ternary mixtures of fourteen sweeteners. *Chem. Senses* **2000**, *25*, 131–140.

Schiffman, S.S.; Booth, B.J.; Carr, B.T.; Losee, K.L.; Sattely-Miller, E.A.; Graham, B.G. Investigations of Synergism in Binary Mixtures of Sweeteners. *Brain Res. Bull.* **1995**, *38*, 105–120.

Schiffman, S.S.; Gatlin, C.A. Sweeteners: state of knowledge review. *Neurosci. Behav. R.* **1993**, *17*, 313–345.

Schiffman, S.S.; Sattely-Miller, E.A.; Bishay, I.E. Time to maximum sweetness intensity of binary and ternary blends of sweeteners. *Food Qual. Pref.* **2007**, *18*, 405–415.

Schlichtherle-Cerny, H.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1998**, *207*, 369–376.

Schulte, E. Micromethod for the rapid gravimetric analysis of the fat content in food after acidic hydrolysis. *Dt. Lebensm.-Rundschau* **2001**, *97*, 85–89.

Servant, G.; Tachdjian, C.; Tang, X.Q.; Werner, S.; Zhang, F.; Li, X.; Kamdar, P.; Petrovic, G.; Ditschun, T.; Java, A.; Brust, P.; Brune, N.; DuBois, G.E.; Zoller, M.; Karaneswky, D.S. Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 4746–4751.

Sforza, S.; Cavatorta, V.; Galaverna, G.; Dossena A.; Marchelli, R. Accumulation of non-proteolytic aminoacyl derivatives in Parmigiano Reggiano cheese during ripening. *Int. Dairy J.* **2009**, *19*, 582–587.

Sforza, S.; Galaverna, G.; Neviani, E.; Pinelli, C.; Dossena, A.; Marchelli, R. Study of the oligopeptide fraction in Grana Padano and Parmigiano Reggiano cheeses by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2004**, *10*, 421–427

Shuai, Y.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W. Development of efficient enzymatic production of theanine by γ -glutamyltranspeptidase from a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*, SK11.005. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 2563–2567.

Sobiech, K. A.; Ziomek, E.; Szewczuk, A. Purification and some properties of γ -glutamyl transpeptidase from cow's milk. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **1974**, *22*, 645–656.

Sokal, R.R.; Michener, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Sci. Bull.* **1958**, *38*, 236–244.

Solieri, L.; Cassanelli, S.; Giudici, P. A new putative *Zygosaccharomyces* yeast species isolated from traditional balsamic vinegar. *Yeast* **2007**, *24*, 403–417.

Solieri, L.; Castellari, L.; Battagliola, A.R.; Pulvirenti, A.; Landi, S.; Giudici, P. The yeasts of traditional balsamic vinegar. In: *Proceedings, Vinegars and Acetic Acid Bacteria, International Symposium*, Reggio Emilia, Italien. **2005**, 36.

Sommerer, N.; Salles, C.; Prome, D.; Prome, J.; Le Quere, J.L. Isolation of Oligopeptides from the Water-Soluble Extract of Goat cheese and their Identification by Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 402–408.

Sousa, M.J.; Ardo, Y.; McSweeney, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* **2001**, *11*, 327–345.

Stähler, F.; Riedel K.; Demgensky, S.; Neumann, K.; Dunkel, A.; Täubert, A.; Raab, B.; Behrens, M.; Raguse, J.D.; Hofmann, T.; Meyerhof, W. A role of the epithelial sodium channel in human salt taste transduction? *Chemosens. Percept.* **2008**, *1*, 78–90.

Stampanoni, C.R.; Noble, A.C. The influence of fat, acid, and salt on the perception of selected taste and texture attributes of cheese analogs: a scalar study. *J. Texture Studies* **1991**, *22*, 367–380.

Stănciuc, N.; Dumitrascu, L.; Râpeanu, G.; Stanciu, S. γ -Glutamyltransferase inactivation in milk and cream: A comparative kinetic study. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* **2011**, *12*, 56–61.

Stark, T.; Bareuther, S.; Hofmann, T. Sensory-Guided Decomposition of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) and Structure Determination of Taste-Active Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5407–5418.

Stark, T.; Hofmann, T. Isolation, Structure Determination, Synthesis, and Sensory Activity of *N*-Phenylpropenoyl-L-amino Acids from Cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Agric. Food Chem.* **2005a**, *53*, 5419–5428.

- Stark, T.; Hofmann, T. Structures, sensory activity and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). *J. Agric. Food Chem.* **2005b**, *53*, 7222–7231.
- Stark, T.; Wollmann, N.; Wenker, K.; Lösch, S.; Glabasnia, A.; Hofmann, T. Matrix-calibrated LC-MS-MS quantitation and sensory evaluation of oak ellagitannins and their transformation products in redwines. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6360–6369.
- Stevens, D.R.; Seifer, R.; Bufe, B. Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* **2001**, *413*, 631–635.
- Suzuki, H.; Kajimoto, Y.; Kumagai, H. Improvement of the bitter taste of amino acids through the transpeptidation reaction of bacterial γ -glutamyltranspeptidase. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 313–318.
- Suzuki, H.; Kumagai, H.; Tochikura, T. γ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: purification and properties. *J. Bacteriol.* **1986**, 1325–1331.
- Taborda, G.; Molina, E.; Martinez-Castro, I.; Ramos, M.; Amigo, L. Composition of the Water-Soluble Fraction of Different Cheeses. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 270–276.
- Tagliazucchi, D.; Verzelloni, E.; Conte, A. Contribution of Melanoidins to the antioxidant Activity of Traditional Balsamic Vinegar during Aging. *J. Food Biochem.* **2010**, *34*, 1061–1078.
- Tanous, C.; Kecronczyk, A.; Helinck, S.; Chambellon, E.; Yvon, M. Glutamate dehydrogenase activity: major criterion for the selection of flavor-producing lactic acid bacteria strains. *Antonie van Leeuwenhoek* **2002**, *82*, 271–278.
- Tate, S.S.; Meister, A. γ -Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol. Cell. Biochem.* **1981**, *39*, 357–368.
- Theobald, A.; Müller, A.; Anklam, E. Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Vinegar Samples by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1850–1854.
- Toelstede, S. Decoding of the Nonvolatile Sensometabolom of Gouda Cheese. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, **2008**.

Toelstede, S.; Dunkel, A.; Hofmann, T. A Series of Kokumi Peptides Impart the Long-Lasting Mouthfulness of Matured Gouda Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1440–1448.

Toelstede, S.; Hofmann, T. Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogeneration by *penicillium roquefortii*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3738–3748.

Toelstede, S.; Hofmann, T. Quantitative Studies and Taste Re-Engineering Experiments toward the Decoding of the Nonvolatile Sensometabolome of Gouda Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, *56*, 5299–5307.

Toelstede, S.; Hofmann, T. Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolites in Gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2008a**, *56*, 2795–2804.

Tölpel, A. *Chemie und Physik der Milch*, 2. Auflage; Behr's Verlag: Hamburg, **2007**.

Tomchik, S.M.; Berg, S.; Kim, J.W.; Chaudhari, N.; Roper, S.D. Breadth of tuning an taste coding in mammalian taste buds. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 10840–10848.

Tomita, K.; Yano, T.; Tsuchida, T.; Kumagai, H.; Tochikura, T. Purification and properties of γ -glutamyltranspeptidase from *Penicillium roquefortii* IFO 4622. *J. Ferment. Bioeng.* **1990**, *70*, 128–130.

Treesukosol, Y.; Lyall, V.; Heck, G.L.; DeSimone, J.A.; Spector, A.C. A psychophysical and electrophysiological analysis of salt taste in TRPV 1 null mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *292*, R1799–R1809.

Ueda, Y.; Sakaguchi, M.; Hirayama, K.; Miyajima, R.; Kimizuka, A. Characteristic flavor constituents in water extract of garlic. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 163–169.

Ueda, Y.; Tsubuku, T.; Miyajima, R. Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1994**, *58*, 109–110.

Ueda, Y.; Yonemitsu, T.; Tsubuku, T.; Sakaguchi, M.; Miyajima, R. Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1997**, *61*, 1978–1980.

Ugliano, M.; Squillante, E.; Genovese, A.; Moio, L. Investigation on aroma compounds of Modena Balsamic Vinegars. In: Le Quere, J.L.; Etievant, P.X. *Flavour Research at the Dawn*

of the Twenty-First Century. Proceedings of the Weurman Flavor research Symposium, 10th, Beaune, France, June 25–28 2002, **2003**, 733–736.

Urwyler, S. Allosteric Modulation of Family C G-Protein-Coupled Receptors: from Molecular Insights to Therapeutic Perspectives. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 59–126.

Van Buuren, S. Analyzing time-intensity responses in sensory evaluation. *Food Technol.* **1992**, *46*, 101–104.

Vandenbeuch, A.; Clapp, T.R.; Kinnamon, S.C. Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci.* **2008**, *9*:1 doi:10.1186/1471-2202-9-1.

Verordnung (EWG) Nr. 2081/1992 des Rates vom 14.Juli 1992 zum Schutz von geographischen und Ursprungsbezeichnungen für Agrarerzeugnisse und Lebensmittel, **1992**.
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1992R2081:20040501:DE:PDF>

Verzelloni, E.; Tagliacozzi, D.; Conte, A. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavanoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chem.* **2007**, *105*, 564–571.

Virgili, R.; Parolari, G.; Bolzoni, L.; Barbieri, G.; Mangia, A.; Careri, M.; Spagnoli, S.; Panari, G.; Zannoni, M. Sensory-Chemical Relationships in Parmigiano-Reggiano Cheese. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1994**, *27*, 491–495.

Virtanen, A.I.; Kreula, M.S.; Nurmikko, V.T. Investigations on the role of amino acids in the taste of Emmentaler cheese and on the decrease of certain amino acids during the ripening of cheese. *Proc. 12 Intern. Dairy Congr. (Stockholm)* **1949**, *2*, 268–271.

Visser, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: An overview. *J. Dairy Sci.* **1993**, *76*, 329–350.

Visser, S.; Hup, G.; Exterkate, F.A.; Stadhouders, J. Bitter flavor in cheese. 2. Model studies on the formation and degradation of bitter peptides by proteolytic enzymes from calf rennet, starter cells and starter cell fractions. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **1983a**, *37*, 169–180.

Visser, S.; Slangen, K.J.; Hup, G.; Stadhouders, J. Bitter flavor in cheese. 3. Comparative gel-chromatographic analysis of hydrophobic peptide fractions from twelve gouda-type cheeses and identification of bitter peptides isolated from a cheese made with *Streptococcus cremoris* strain HP. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **1983b**, *37*, 181–192.

Warendorf, T. Geschmacksstoffe in Fleischbrühe. Dissertation, Technische Universität München, **1991**.

Warendorf, T.; Belitz, H.D.; Gasser, U.; Grosch, W. Zum Geschmack von Fleischbrühe 2. Sensorische Analyse der Inhaltsstoffe und Imitation einer Brühe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 215–223.

Warmke, R. Identifizierung der Geschmacksstoffe von Emmentaler-Käse und Messung ihrer Konzentrationsänderung bei der Reifung. Dissertation, Technische Universität München, **1997**.

Warmke, R.; Belitz, H.D. Influence of glutamic acid on the bitter taste of various compounds. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *297*, 132–133.

Warmke, R.; Belitz, H.D.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of Swiss cheese (Emmentaler). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 230–235.

Wells, A.G. The use of intense sweeteners in soft drinks. In: *Progress in sweeteners*. Hrsg.: Grenby, T. H.; Elsevier Applied Science, London, **1989**, 169–214.

Wiederholt, K.M.; Steele, J.L. Glutathione Accumulation in *Lactococci*. *J. Dairy Sci.*, **1994**, *77*, 1183–1188.

Wieser, H.; Belitz, H.D. Relation between structure and bitter taste of amino acids and peptides. I. Amino acids and related compounds. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1975**, *159*, 65–72.

Wieser, H.; Jugel, H.; Belitz, H.D. Relationships between structure and sweet taste of amino acids. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **1977**, *164*, 277–282.

Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 6531–6535.

Winnig, M.; Bufo, B.; Kratochwil, N.A.; Slack, J.P.; Meyerhof, W. The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor. *BMC Struct. Biol.* **2007**, *7*:66; doi:10.1186/1472-6807-7-66.

Xu, H.; Staszewski, L.; Tang, H.; Adler, E.; Zoller, M.; Li, X. Different functional roles of T1R subunits in the heterodimeric taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14258–14263.

Yamaguchi, S. The Synergistic Taste Effect of Monosodium Glutamate and Disodium 5'-Inosinate. *J. Food Sci.* **1967**, *32*, 473–478.

Yamaguchi, S.; Yoshikawa, T.; Ikeo, S.; Ninomiya, T. Measurement of the relative taste intensity of some L- α -Amino Acids and 5'-Nucleotides. *J. Food Sci.* **1971**, *36*, 846–849.

Yoshida, R.; Yasumatsu, K.; Shirosaki, S.; Jyotaki, M.; Horio, N.; Murata, Y.; Shigemura, N.; Nakashima, K.; Ninomiya, Y. Multiple Receptor Systems for Umami taste in Mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1170*, 51–54.

Zhang, F.; Klebansky, B.; Fine, R.M.; Liu, H.; Xu, H.; Servant, G.; Zoller, M.; Tachdjian, C.; Li, X. Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 4752–4757.

Zhang, F.; Klebansky, B.; Fine, R.M.; Xu, H.; Pronin, A.; Liu, H.; Tachdjian, C.; Li, X. Molecular Mechanism for the umami taste synergism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 20930–20934

Zhao, G. Q.; Zhang, Y.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Erlenbach, I.; Ryba, N.J.P.; Zuker, C.S. The Receptors for Mammalian Sweet and Umami Taste. *Cell* **2003**, *115*, 255–266.

6 Anhang

Im Anhang sind neben einigen sensorischen Daten (Parmesan und Balsamico Essig), die Rezepturen der Geschmacksrekombinate (Parmesan und Balsamico Essig), die 16S-Basenpaarabfolge der aus P-13 isolierten *Lactobacillen*-Stämme K1 – K7, die spektroskopischen Daten von 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (**34**) sowie die quantitativen Daten der ABTM-Intermediate A – H, die Basis für die Berechnungen der Heatmaps waren, zusammengefasst.

Tabelle 44. Sensorische Beurteilung aller wässrigen Parmesan-Rekombinate im Vergleich zum WE-24.

Probe	Intensitäten (\pm SD) der einzelnen Geschmacksqualitäten						
	sauer	bitter	umami	salzig	süß	kokumi	brennend
WE-24	1,4	3,5	2,5	3,0	1,5	2,3	2,2
rWE-24	1,5 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2	3,1 \pm 0,1	1,5 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3	2,1 \pm 0,3
rWE-24 ^{ω/γ}	1,5 \pm 0,2	3,9 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2	3,1 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,4	2,4 \pm 0,2
rWE-24 ^{α}	1,5 \pm 0,3	3,5 \pm 0,4	2,5 \pm 0,2	3,1 \pm 0,4	1,5 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2
rWE-24 ^{γ}	1,3 \pm 0,3	3,8 \pm 0,3	2,5 \pm 0,2	3,0 \pm 0,4	1,5 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2
rWE-24 ^{BA}	1,7 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3	2,5 \pm 0,2	3,3 \pm 0,3	1,5 \pm 0,1	2,2 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1
rWE-24 ^{Arg}	1,4 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3	2,5 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1
rWE-24 ^{<0,5}	1,5 \pm 0,2	3,4 \pm 0,2	2,4 \pm 0,2	3,0 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2	2,1 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2
rWE-24 ^{<1,0}	1,2 \pm 0,3	3,0 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	3,0 \pm 0,3	1,3 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2	1,9 \pm 0,3

Tabelle 45. Sensorische Beurteilung des Parmesan-Rekombinates in Matrix (rP24) im Vergleich zu P-24.

Geschmacksqualität	Intensitäten der einzelnen Geschmacksqualitäten in	
	P-24	rP24
sauer	1,7	1,7 \pm 0,1
bitter	1,5	1,4 \pm 0,2
umami	1,2	1,2 \pm 0,1
salzig	2,8	2,8 \pm 0,2
süß	1,0	1,1 \pm 0,2
brennend	2,5	2,4 \pm 0,2
kokumi	2,2	2,2 \pm 0,1

Tabelle 46. Rezeptur (mg/100 ml) für das Geschmacksstoffrekombinat rWE-24 (1/3 der Konzentrationen des authentischen WE-24).

Substanz	Einwaage [mg/100 ml]
umami	
L-Asparagin	100,5
L-Asparaginsäure	154,6
L-Glutamin	20,8
Natrium-L-Glutamat*H ₂ O	689,3
bitter	
CaCl ₂	190,1
MgCl ₂ *H ₂ O	104,3
L-Tryptophan	18,7
L-Leucin	277,1
L-Isoleucin	240,3
L-Valin	245,2
L-Tyrosin	39,7
L-Lysin	362,3
L-Phenylalanin	2,2
L-Arginin	103,3
L-Histidin	80,6
sauer/salzig	
NaCl	22,9
CaLactat*5H ₂ O	917,7
KCl	156,4
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	223,2
Citronensäure	20,1
Natriumacetat	100,1
süß	
L-Methionin	80,7
L-Alanin	100,1
L-Prolin	349,2
L-Serin	227,7
L-Threonin	111,4
Glycin	93,0
brennend	
Histamin	4,3
Tyramin	2,5
Glutamylpeptide	
α-Glu-Gly	0,2
α-Glu-Val	0,3
α-Glu-Ala	0,1
α-Glu-Glu	1,2
α-Glu-Lys	1,6
α-Glu-Asp	0,1
α-Glu-Thr	0,3
α-Glu-Trp	0,05
γ-Glu-Gly	7,1
γ-Glu-Val	10,5
γ-Glu-Ala	1,5
γ-Glu-Tyr	2,0

γ -Glu-Glu	30,2
γ -Glu-Lys	10,6
γ -Glu-Asp	2,4
γ -Glu-Thr	21,0
γ -Glu-Trp	0,7
γ -Glu-His	57,8
γ -Glu-Phe	11,3
γ -Glu-Met	5,8
γ -Glu-Leu	11,3
γ -Glu-Gln	1,4
γ -Glu-Ile	8,3

Tabelle 47. Matrixbestandteile (Protein, Fett, Wasser) und Rezeptur (mg/100 g) für das Geschmacksstoffrekombinat rP-24.

Matrixbestandteil	Menge
Proteinpellet	28,15 g
Fettschicht	26,60 g
Wasser	28,15 ml
Substanz	Einwaage [mg/100 g]
umami	
L-Asparagin	301,5
L-Asparaginsäure	463,7
L-Glutamin	62,6
Natrium-L-Glutamat*H ₂ O	1533,5
bitter	
CaCl ₂	570,2
MgCl ₂ *H ₂ O	313,0
L-Tryptophan	56,1
L-Leucin	831,4
L-Isoleucin	720,9
L-Valin	735,5
L-Tyrosin	119,1
L-Lysin	1078,0
L-Phenylalanin	6,44
L-Arginin	309,9
L-Histidin	241,8
sauer/salzig	
NaCl	68,8
CaLactat*5H ₂ O	2753,1
KCl	469,3
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	669,7
Citronensäure	60,4
Natriumacetat	300,4
NaOH	420,2
süß	
L-Methionin	241,9
L-Alanin	300,3
L-Prolin	1047,5
L-Serin	683,2
L-Threonin	334,0
Glycin	279,0
brennend	
Histamin	13,0
Tyramin	7,4
Glutamylpeptide	
α-Glu-Gly	0,7
α-Glu-Val	0,7
α-Glu-Ala	1,4
α-Glu-Glu	1,7
α-Glu-Lys	1,7
α-Glu-Asp	0,3
α-Glu-Thr	0,5

α -Glu-Trp	0,2
γ -Glu-Gly	10,0
γ -Glu-Val	14,0
γ -Glu-Ala	1,7
γ -Glu-Tyr	1,9
γ -Glu-Glu	32,5
γ -Glu-Lys	31,8
γ -Glu-Asp	7,2
γ -Glu-Thr	63,0
γ -Glu-Trp	2,1
γ -Glu-His	37,7
γ -Glu-Phe	33,9
γ -Glu-Met	4,03
γ -Glu-Leu	21,3
γ -Glu-Gln	27,6
γ -Glu-Ile	24,9

Tabelle 48. Basenpaarabfolge der 16S-Gensequenz der Kolonien aus P-13 isolierten *Lactobacillen*-Stämme K1 – K7.

Kolonie (Identität)	Basenpaarabfolge
K1 (<i>L. harbinensis</i>)	AGAGTTTGATNNTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGAT CGTGCCTTGCAACGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCCTTAAGTG GGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAAGAACCGCATGGTCTTGGCTGAAAGATGGCGT AAGCTATCGCTTTGGATGGACCCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTACCAAGCCGATGATACGTA GCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA TCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGTCTGTAACACTCTGTG TTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACCTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAAACCAGAAAGCCACGGCTAACACTG CCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGTTT AAGTCTGATGTGAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACA GTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCCGCTGTCTGGTTCT GTAACCTGACGCTGA
K2 (<i>L. casei</i>)	GAGTTTGATTATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATC GGTGCCTTGACCCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCCTTAAGTGG GGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAAGAACCGCATGGTCTTGGCTGAAAGATGGCGTA AGCTATCGCTTTGGATGGACCCCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTACCAAGCCGATGATACGTA CCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA CTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGTCTGTAACACTCTGTG TGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACCTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAAACCAGAAAGCCACGGCTAACACTG CAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGTTT AGTCTGATGTGAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAG TGGAACTCCAATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCCGCTGTCTGGTTCTGT AACTGACC
K3 (<i>L. harbinensis</i>)	AGAGTTTGATTTGGCTCAGGACGAAACGCTGGCGGGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGTTTGGTCAGTTTG CGTGGTGTTCATCACCATAATCCGATCAACCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCCTTC AGCAGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGTATAATCACGGAGACCGCATGGTCTCCGGTAAAGATG GCCAAGCTATCACTGAAGGATGGACCCCGCGCTATTAGCCAGTTGGTGGGTAAACGGCCTACCAAGCGATGAT ACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA GGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGTCTGTAACACT CTGTTATTGAAGAAGAAGTGGTACAGTAACCTGGTCAATGCAAGTGGTATTCATCAGAAAGTCAAGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTTCCGGATTTATGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGGGG TCTTTAAGTCTGATGTGAAGCCCTCGGCTTAACCGAAGAAAGGCGCATCGGAAACTGGGAGACTTGGAGTGCAGAAG AGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCCGCTCTCT GGTCTGTAACCTGACC

K4 (*L. casei*)

CGTCAGTTACAGACCAGAGCCGCCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTAGCCATTTCAACGGCTACACATGGAGTTCC
 ACTCTCCTTCTGCACCTCAAGTCTCCCAAGTTCCGATGCCCTTCTCGGTAAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAG
 ACCGCCCTGCACCTCGCTTACGCCCAATAAAATCCGGACAACCGCTTGCACCTACGTATTAACCGGGCTGCTGGCACGTTAGTTA
 GCCGTGACTTCTGTGATTGAAATACCGTCACTGCAATGACCAAGTTACTGTCAACACACGCTTCTTCTCAATAACAGAGTTTTACGAC
 CCGAAAGCCTTCTTCACTCACGGGGCTTGCCTCCATCAGACTTGGCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGTGCTCCGCCGTAG
 GAGTTGGGGCGGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATCGCTTTGGTAGGCCGTTACC
 CCACCAACTGGCTAATACGCCGGGGTCCATCCTTCAAGTATAGCTTGGCCCATCTTTTACCCGGAGACCAATGCCGGTCTCCGT
 GATTAACGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCTGCTGAAAGGCGAGGTTACCCACGTTACTCACCCGTCGCCCA
 CTCGGTTGATCGGTAATTGGTGAATGCAAGCACCAACCGCAACTGACCAAACTCGTTCGACTTGCATGTTAGGCACGCC
 GCCAGCTTCGTCTGAGCCATAAATTCAAA

K5 (*L. casei*)

AGAGTTTGATTN'TGGCTCAGGATGAACGGTGGCGGCTGCCATAATACATGCAAGTGC AACGAGTTCCTCGTTGATGATCGGGT
 CTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAACACCTGGTAAACCTGCCCTTAAAGTGGGGATAACA
 TTTGGAAACAGATGCTAAATACCGCATAGATCCAAAGAACCGCATGGTCTTGGCTGAAAAGATGGCTAAGCTATCGCTTTTGG
 ATGGAACCCGGCGTATTAGCTAGTTGGTAGGTAATGGCTCAACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATC
 GGCCACATTTGGACTGAGACAACGGCCAACTCTACGGGAGGACGATAGGAAATCTTCCACAAATGGACGCAAGTCTGA
 TGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGTCTGTA AAAACTCTGTTGTTGGAGAAATGGTCTGGCGCAGATAACTG
 TTGTCGGCGTGAACGGTATCCAAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCGGGTATACTCGTAGGTGGCAAGCGT
 TATCCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCCAGGGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAACCCCTCGGCTTAAACCGAGGAAAGCG
 CATCGGAAACTGGGAAACTTGGAGTGCAGAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGGTAGATATATATGGAAAG
 AACACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAAC

K6 (*L. harbinensis*)

TGAGTTGAATTATGGCTCAGGACGAAACACTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTGC AACGAGTTCCTCGTTGATGATCGGGT
 GGTGCTTGCATCACC AATTAACCGATCAAAACCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGTAAACCTGCCCTTACAGCAGGGG
 ATAAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAATCACGGAGACCGCATGGTCTCCGGTAAAGATGGCGCAAGCTATCA
 CTGAAAGGATGGACCCCGGCGTATTAGCCAGTTGGTGGGTAAACGGCTAACCGCTACCAAGCGATGATACGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTAAATCGGCCACATTTGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGACGAGTAGGGAATCTTCCACAAATGGACGCA
 AGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGTCTGTA AAAACTCTGTTATTGAAGAAGAACGTTGTGACA
 GTAACTGGTCAATGCAGTACGGTATTCAATCAGAAAGTCAACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGTGG
 CAAGCGTTGTCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGTGCAGGGCGTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAACCCCTCGGCTTAAACCGA
 AGAAAGGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAATGCAGAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGGTAGATA
 TATGGAAGAACACACAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAG

K7 (*L. casei*)

AGAGTTTGATTNTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCCTAAATACATGCAAGTCGAAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTG
CTTGCAACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGTAACCTGCCCTTAAAGTGGGGATAACAT
TTGGAAACAGATGCTAATAACCGCATAGATCCAAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAAGATGGCGTAAAGCTATCGCTTTTGGAT
GGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTAGGTAATGGCTCACCAAGGGGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGC
CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCACTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGA
GCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAAGAAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTC
GGCGTGACGGTATCCAAACCAAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCCAGCGGTTTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAAACCGAGGAAAGCGCATCGGA
AACTGGGAAACTTGAGTGCAGAGAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGATATATGGAAAGAACACCCAG
TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTCACCGCTG

Tabelle 49. Sensorische Beurteilung der ABTM- und ABM-Rekombinate im Vergleich zum authentischen ABTM und ABM.

Geschmacksqualität	Intensität in Probe			
	ABTM	Rek ^{ABTM}	ABM	Rek ^{ABM}
süß	2,3	2,4±0,2	1,5	1,3±0,2
sauer	3,6	3,6±0,2	4,3	4,2±0,3
bitter	0,6	0,5±0,1	0,8	0,8±0,2
adstringierend	2,2	2,1±0,2	2,5	2,2±0,3
mundfülle	1,7	1,6±0,2	1,0	1,0±0,2
umami	0,1	0,2±0,1	0,2	0,2±0,1
salzig	0,2	0,2±0,1	0,2	0,2±0,1

Tabelle 50. Rezeptur (mg/100 ml) für das Geschmacksstoffrekombinat Rek^{ABTM} (1/3 der Konzentrationen des authentischen ABTM).

Substanz	Einwaage [mg/100 ml]
süß	
D-Glucose	10910,0
D-Fructose	9610,0
Glycerin	410,0
Inositol	30,0
Erythritol	30,0
Sorbitol	60,0
Xylitol	9,0
Arabitol	11,0
Ribitol	7,0
Mannitol	17,3
L-Prolin	41,5
Glycin	0,7
L-Methionin	0,1
L-Alanin	1,7
L-Serin	2,0
L-Threonin	0,1
sauer/salzig/bitter	
Weinsäure	107,9
Citronensäure	76,4
Äpfelsäure	479,7
Glykolsäure	60,7
Essigsäure	1113,3
Bernsteinsäure	9,5
Oxalsäure	66,2
CaCl ₂	11,1
CaLactat*5H ₂ O	37,8
Natriumacetat	19,9

K ₃ PO ₄ *H ₂ O	94,5
CaAcetat*H ₂ O	92,8
Kaliumtartrat	77,3
Magnesiumacetat*4H ₂ O	141,4
bittere Aminosäuren	
L-Leucin	0,6
L-Isoleucin	0,8
L-Valin	0,9
L-Tyrosin	0,5
L-Lysin	0,4
L-Phenylalanin	0,5
L-Arginin	44,7
L-Histidin	0,2
adstringierend	
Castalagin	1,6
Vescalagin	1,2
(+)-Dihydrorobinetin	0,01
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	0,1
<i>trans-p</i> -Coumarsäure	0,2
Vanillinsäure	0,1
<i>trans</i> -Kaffeesäure	0,2
Syringinsäure	0,2
Gentisinsäure	0,2
Vanillin	0,05
Syringaldehyd	0,05
Chinasäure	0,1
Gallussäure	0,2
umami	
L-Asparaginsäure	2,3
L-Glutaminsäure	0,9

Tabelle 51. NMR-Daten der aus GAC-Fraktion X-2 isolierten Verbindung 5-Acetoxymethyl-2-furaldehyd (34). Die Nummerierung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf Abbildung 54.

Position	δ_C /ppm	HMQC	δ_H /ppm	M[J,Hz]
1	178.2	--	9.59	s
2	153.0	H-C(3); H-C(4)	--	--
3	122.5	H-C(4)	7.39	d, <i>J</i> = 4.0 Hz
4	112.2	H-C(3)	6.71	d, <i>J</i> = 4.0 Hz
5	156.0	H-C(3); H-C(4)	--	--
6	57.4	--	5.17	s
7	170.5	H-C(6); H-C(8)	--	
8	19.1	--	2.20	s

Tabelle 52. Rezeptur (mg/100 ml) für das Geschmacksstoffrekombinat Rek^{ABM} (1/3 der Konzentrationen des authentischen ABM).

Substanz	Einwaage [mg/100 ml]
süß	
D-Glucose	3905,0
D-Fructose	765,5
Glycerin	169,1
Inositol	7,8
Erythritol	6,7
Sorbitol	3,0
Xylitol	1,8
Arabitol	2,9
Ribitol	2,3
Mannitol	14,1
L-Prolin	47,8
Glycin	2,1
L-Methionin	0,3
L-Alanin	3,1
L-Serin	16,5
L-Threonin	0,2
sauer/salzig/bitter	
Weinsäure	51,0
Citronensäure	12,5
Äpfelsäure	83,0
Glykolsäure	12,4
Essigsäure	1289,2
Kaliumacetat	76,6
KCl	9,0
Natriumacetat	38,4
K ₃ PO ₄ *H ₂ O	56,9
CaAcetat*H ₂ O	52,6
Kaliumtartrat	79,8
MgAcetat*4H ₂ O	58,9
bittere Aminosäuren	
L-Leucin	2,3
L-Isoleucin	1,9
L-Valin	1,6
L-Tyrosin	1,7
L-Lysin	3,2
L-Phenylalanin	1,9
L-Arginin	327,9
L-Histidin	0,9
adstringierend	
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	0,8
<i>trans-p</i> -Coumarsäure	2,2
Vanillinsäure	0,9
<i>trans</i> -Kaffeesäure	2,3
Syringinsäure	1,5
Gentisinsäure	1,5
Vanillin	0,2

Syringaldehyd	0,3
Chinasäure	0,6
Gallussäure	1,8
Protocatechusäure	0,3
Ferulasäure	0,2
umami	
L-Asparaginsäure	23,6
L-Glutaminsäure	8,7

Tabelle 53. Mittels Trapezmethode aus TI-Kurven extrahierte Parameter für Referenz- und Probenlösungen mit verschiedenen Konzentrationen an 34.

Parameter		Konzentration (34) [$\mu\text{mol/l}$]				
		200	1000	1500	2000	2500
I_{Max}	Referenz	6,3	5,9	6,5	5,4	5,2
	Probe (+ (34))	6,3	6,0	6,8	6,2	6,3
	Relativer Wert (34) [%]	99,8	101,7	105,4	116,0	120,3
	p-Wert	0,8	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
AUC_{Total}	Referenz	53,8	44,1	53,2	42,9	36,0
	Probe (+ (34))	53,0	64,8	78,2	68,8	64,8
	Relativer Wert (34) [%]	98,7	146,9	147,0	160,1	179,8
	p-Wert	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
AUC_{Inc}	Referenz	5,8	5,7	7,5	5,8	5,7
	Probe (+ (34))	5,8	7,6	7,9	8,0	7,1
	Relativer Wert (34) [%]	100,4	132,3	105,9	139,1	123,5
	p-Wert	0,03	0,07	<0,01	0,02	<0,01
$AUC_{\text{Plateau+D}}$ $_{\text{ec}}$	Referenz	47,9	38,4	45,7	37,2	30,3
	Probe (+ (34))	47,3	57,2	70,2	60,8	57,6
	Relativer Wert (34) [%]	98,5	149,1	153,8	163,4	190,4
	p-Wert	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
DUR [s]	Referenz	16,2	14,1	15,7	15,0	14,7
	Probe (+ (34))	16,0	18,6	21,2	20,1	18,6
	Relativer Wert (34) [%]	99,0	131,5	134,8	133,8	126,6
	p-Wert	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
DUR _{Inc} [s]	Referenz	2,1	2,2	2,5	2,6	2,8
	Probe (+ (34))	2,2	2,6	2,7	2,7	2,8
	Relativer Wert (34) [%]	106,0	120,7	107,0	106,4	98,4
	p-Wert	0,01	0,01	<0,01	0,07	<0,01
DUR _{Plateau+D} $_{\text{ec}}$ [s]	Referenz	14,1	11,9	13,2	12,4	11,9
	Probe (+ (34))	13,8	15,9	18,5	17,3	15,9
	Relativer Wert (34) [%]	97,9	133,4	140,2	139,4	133,3
	p-Wert	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Tabelle 54. Sensorische Beurteilung der intermediären Proben A, B, C, D, E, F, G und H im Vergleich zum ABTM.

Probe	Intensitäten (\pm SD) der einzelnen Geschmacksqualitäten			
	süß	sauer	adstringierend	mundfülle
ABTM	2,3	3,6	2,2	1,7
A	1,3 \pm 0,3	4,2 \pm 0,3	2,3 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3
B	2,2 \pm 0,3	3,9 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2
C	2,2 \pm 0,2	3,8 \pm 0,3	2,3 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2
D	2,5 \pm 0,2	3,6 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2
E	2,5 \pm 0,2	3,5 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2
F	2,5 \pm 0,1	3,4 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2
G	2,5 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3	1,7 \pm 0,2
H	2,6 \pm 0,2	3,3 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3	1,8 \pm 0,1

Tabelle 55. Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] an Sensometaboliten in den Fässern A – H der Fassbatterie.

Verbindung	Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in Fass Nr.							
	A	B	C	D	E	F	G	H
D-Glucose	1243918	1243918	1243918	1243918	1243918	1243918	1243918	1243918
D-Fructose	458	623	0	1288	713	692	99435	1252128
Glycerin	423	756	255	988	1634	1431	95993	1696042
Erythritol	459	698	453	848	2558	1727	109773	2041041
Sorbitol	438	706	637	693	3297	1721	123466	2282299
Arabitol	442	709	603	628	3041	1490	127071	2330550
Xylitol	430	741	702	594	3912	2047	124769	2361914
Mannitol	462	736	751	603	3724	1865	132186	2395690
6-O-Acetyl- α - β -D-glucopyranose (30)	441	730	751	570	3468	1835	124585	2255760
1-O-Acetyl- β -D-fructopyranose (31)	458	623	0	1288	713	692	99435	1252128
Essigsäure	423	756	255	988	1634	1431	95993	1696042
Citronensäure	459	698	453	848	2558	1727	109773	2041041
Weinsäure	438	706	637	693	3297	1721	123466	2282299
Glykolsäure	442	709	603	628	3041	1490	127071	2330550
Äpfelsäure	430	741	702	594	3912	2047	124769	2361914
Milchsäure	462	736	751	603	3724	1865	132186	2395690
Gluconsäure	441	730	751	570	3468	1835	124585	2255760
Castalagin (27)	458	623	0	1288	713	692	99435	1252128
Vescalagin (28)	423	756	255	988	1634	1431	95993	1696042
(+)-Dihydrorobinetin (29)	459	698	453	848	2558	1727	109773	2041041
Kaffeesäure	438	706	637	693	3297	1721	123466	2282299
Gentisinsäure	442	709	603	628	3041	1490	127071	2330550
<i>p</i> -Coumarsäure	430	741	702	594	3912	2047	124769	2361914

Verbindung	A	B	C	D	E	F	G	H
Gallussäure	103.3	4430	0.15	3.5	4.0	11.4	5.2	1.0
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	178.1	10075	0.07	2.4	3.1	8.6	4.2	0.8
Protocatechusäure	248.4	17950	0.04	2.1	3.4	8.6	4.5	1.0
Vanillinsäure	349.3	24279	0.03	1.9	3.4	8.0	4.9	1.3
Vanillin	340.3	27496	0.03	1.9	3.2	7.7	4.3	1.3
Syringaldehyd	404.5	19652	0.03	1.9	3.0	7.1	4.2	1.4
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33)	407.3	28948	0.02	1.9	3.1	6.9	4.2	1.5
5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (34)	394.4	29052	0.02	1.8	3.1	7.1	4.3	1.4
Gallussäuremethylester	103.3	4430	0.15	3.5	4.0	11.4	5.2	1.0
Gallussäureethylester	178.1	10075	0.07	2.4	3.1	8.6	4.2	0.8
Chinasäure	248.4	17950	0.04	2.1	3.4	8.6	4.5	1.0
Syringinsäure	349.3	24279	0.03	1.9	3.4	8.0	4.9	1.3
Ferulasäure	340.3	27496	0.03	1.9	3.2	7.7	4.3	1.3

Tabelle 56. Konzentrationen [$\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse] an Sensometaboliten in den Fässern A - H der Fassbatterie.

Verbindung	Konzentration $\mu\text{mol/kg}$ Trm. in Fass Nr.							
	A	B	C	D	E	F	G	H
D-Glucose	2832725	3050642	3050642	3050642	3050642	3050642	3050642	3050642
D-Fructose	2851422	2851422	2851422	2851422	2851422	2851422	2851422	2851422
Glycerin	226440	226440	226440	226440	226440	226440	226440	226440
Erythritol	1624	1575	1044	1419	0.0	2933	1624	1575
Sorbitol	2959	2591	766	1369	462.3	1788	2959	2591
Arabitol	4013	2710	720	1095	711.3	1329	4013	2710
Xylitol	4661	2432	620	998	900.7	980	4661	2432
Mannitol	4285	2100	623	998	849.4	885	4285	2100
6-O-Acetyl- α / β -D-glucopyranose (30)	5895	202010	17423	89120	28970	1708596	24716	12805
1-O-Acetyl- β -D-fructopyranose (31)	6318	194630	11483	73140	29805	1169855	21672	12416
Essigsäure	5859	185892	9609	74596	31222	875999	22356	14566
Citronensäure	5057	169540	12357	77578	30627	659562	27387	18113
Weinsäure	4976	179466	11065	80632	30447	683919	27770	17416
Glykolsäure	5321	176683	9176	81974	32711	599948	35965	21292
Äpfelsäure	4576	173729	9976	84300	31008	585124	32314	18871
Milchsäure	4858	174434	10433	87780	32453	561157	27981	17252
Gluconsäure	5895	202010	17423	89120	28970	1708596	24716	12805
Castalagin (27)	51.5	135.2	19.6	23.1	23.1	6.0	51.5	135.2
Vescalagin (28)	24.0	42.6	12.5	14.7	11.9	0.2	24.0	42.6
(+)-Dihydrorobinetin (29)	34.6	47.8	10.3	12.7	8.2	0.0	34.6	47.8
Kaffeesäure	31.6	40.8	8.7	11.1	5.6	0.5	31.6	40.8
Gentisinsäure	31.4	41.7	8.4	10.5	6.2	0.1	31.4	41.7
p-Coumarsäure	31.8	47.2	7.8	9.7	5.0	0.5	31.8	47.2

Verbindung	A	B	C	D	E	F	G	H
Gallussäure	235.3	10089	0.3	7.9	9.1	25.9	11.9	2.3
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	322.4	18241	0.1	4.3	5.7	15.6	7.6	1.5
Protocatechusäure	389.6	28156	0.1	3.3	5.3	13.5	7.1	1.6
Vanillinsäure	493.8	34319	0.0	2.7	4.9	11.4	7.0	1.9
Vanillin	479.6	38753	0.0	2.7	4.4	10.9	6.0	1.8
Syringaldehyd	555.9	27009	0.0	2.6	4.1	9.8	5.8	1.9
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd (33)	550.6	39132	0.0	2.5	4.2	9.4	5.7	2.0
5-Acetoxyethyl-2-furaldehyd (34)	529.8	39023	0.0	2.5	4.1	9.5	5.8	1.9
Gallussäuremethylester	235.3	10089	0.3	7.9	9.1	25.9	11.9	2.3
Gallussäureethylester	322.4	18241	0.1	4.3	5.7	15.6	7.6	1.5
Chinasäure	389.6	28156	0.1	3.3	5.3	13.5	7.1	1.6
Syringinsäure	493.8	34319	0.0	2.7	4.9	11.4	7.0	1.9
Ferulasäure	479.6	38753	0.0	2.7	4.4	10.9	6.0	1.8