

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Chemie

Identifizierungs- und Bildungsstudien zur Entschlüsselung des Aromas von glutenfreiem Reisbrot

Anke Rosa Rohleder

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Rychlik

Prüfende/-r der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Peter Köhler

2. Prof. Dr. Karl-Heinz Engel

Die Dissertation wurde am 20.11.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.02.2020 angenommen.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Peter Köhler für das Anvertrauen dieses sehr interessanten Themas, die wertvollen fachlichen Diskussionen, die stets interessierte und begeisterte Betreuung der Arbeit und die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Fachtagungen präsentieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Peter Schieberle danke ich sehr für den intensiven wissenschaftlichen Austausch im Bereich der Aromaforschung, die guten Ratschläge und wichtigen Denkanstöße.

Frau Prof. Dr. Katharina Scherf danke ich für Ihre Unterstützung in fachlicher und menschlicher Hinsicht, ihre Geduld und Zuverlässigkeit.

Ebenso gilt mein Dank den Projektpartnern von der KU Leuven (u.a. Hanne Masure und Prof. Dr. Jan Delcour) und vom DIL (u.a. Dr. Knut Franke) sowie dem FEI Bonn und Flanders Food.

Bei allen Mitarbeitern des Leibniz-Instituts für Lebensmittel-Systembiologie an der TU München möchte ich mich für die sehr herzliche Atmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Für die Unterstützung bei zahlreichen Back- und Laborversuchen danke ich Stefanie Hackl und Katharina Schiesser. Außerdem danke ich Sami Kaviani-Nejad und Ines Otte für ihre Hilfe bei der GC- und LC-MS-Analytik. Bei Patrick Röhl bedanke ich mich für die Hilfe bei der Aminosäureanalytik, die er im Rahmen seiner wissenschaftlichen Abschlussarbeit geleistet hat.

Besonders meinen Kollegen aus dem Arbeitskreis Biopolymere Dr. Claudia Vogel, Dr. Sabrina Geißlitz, Barbara Lexhaller, Tanja Schirmer, Darina Pronin, Angelika Gabler, Marina Schopf, Gerold Rebholz, Dr. Verena Knorr, Dr. Eva Müller, Dr. Kathrin Schalk, Dr. Markus Schmidt, Marie Lay und Clemens Schuster danke ich für die gute Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Instituts.

Danksagung

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Aroma möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Teilnahme an meinen Sensorikprüfungen danken. Vor allem danke ich Dr. Johanna Kreißl und Dr. Veronika Mall für ihr stets offenes Ohr für Fragen zur GC-O, GC-MS und Sensorik, Dr. Michael Meitinger und Dr. Klaas Reglitz für ihre wertvollen Ratschläge zur Aromastoffanalytik und Jörg Stein für sein Interesse und seine kreativen Ideen zu allen analytischen Fragen.

Mein allergrößter Dank gilt meinem Ehemann Eric Rohleder für seine uneingeschränkte Unterstützung, seine Liebe, seine Geduld und dass er mir stets den Rücken freigehalten hat. Meinen Eltern Karin und Udo Böswetter und meiner Schwester Christina Bartsch, die mich mein Leben lang begleitet haben, mir meine Ausbildung ermöglicht und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt haben danke ich von Herzen.

Zuletzt möchte ich allen meinen Freunden und meiner Familie für die schönen Stunden und die Ablenkung außerhalb der Promotion danken.

VORBEMERKUNG

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2015 bis Dezember 2018 am Leibniz-Institut für Lebensmittelsystembiologie (ehemals Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie) durchgeführt.

VORABVERÖFFENTLICHUNGEN

Böswetter, A.; Köhler, P.: Studien zur Charakterisierung des Aromas von Reis- und Stärkebasierten Glutenfreien Backwaren, *Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie*, Bericht **2016**, S. 122-125, ISBN 978-3-00-056386-7

Böswetter, A.; Scherf, K.; Schieberle, P.; Köhler, P.: Studien zur Aromastofffreisetzung aus glutenfreien Broten im Vergleich zu Weizenbrot, *Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie an der TU München*, Bericht **2017**, S. 40 – 42, ISBN 978-3-00-058295-0

Boeswetter, A. R.; Scherf, K. A.; Schieberle, P.; Koehler, P.: Identification of the Key Aroma Compounds in Gluten-Free Rice Bread, *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67 (10) 2963-2972

Rohleder, A. R.; Scherf, K. A.; Schieberle, P.; Koehler, P.: Quantitative Analyses of Key Odorants and Their Precursors Reveal Differences in the Aroma of Gluten-Free Rice Bread and Wheat Bread. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67 (40), 11179-11186.

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung	I
Vorabveröffentlichungen.....	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungen	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation	1
1.2 Eigenschaften und Qualitätsparameter von glutenfreiem Reisbrot und Weizenbrot im Vergleich.....	2
1.2.1 Der Rohstoff Reis und Unterschiede zu Weizen.....	2
1.2.2 Qualitätsanforderungen an Weizenbrot.....	3
1.2.3 Qualitätsstandards von glutenfreiem Reisbrot	4
1.3 Aromastoffe und deren Wahrnehmung.....	6
1.4 Methoden zur Analyse des Aromas von Lebensmitteln.....	7
1.4.1 Schonende Isolierung.....	7
1.4.2 Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)	8
1.4.3 Identifizierung von Aromastoffen	8
1.4.4 Quantifizierung von Aromastoffen	8
1.4.5 Berechnung von Aromawerten	9
1.4.6 Aromarekombination und Omissionsversuche	9
1.5 Mehrdimensionale Chromatographie zur Aromastoffanalytik	10
1.6 Aromastoffe in Weizenbrot	12
1.6.1 Brotherstellung und deren Einfluss auf das Aroma.....	12

1.6.2	Schlüsselaromastoffe der Weizenbrotkrume	16
1.6.3	Schlüsselaromastoffe der Weizenbrotkruste	17
1.7	Aromastoffuntersuchungen in Reisbrot und gekochtem Reis	18
1.7.1	Aromastoffe in Reisbrot	18
1.7.2	Aromastoffe in gekochtem Reis.....	19
1.7.3	Alterung von Reis und Reismehl	20
1.7.4	Entstehung des Reisaromastoffs 2-Aminoacetophenon.....	21
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	23
3	Ergebnisse und Diskussion	25
3.1	Allgemeine Charakterisierung von Weizen- und Reisbrot.....	25
3.1.1	Brotvolumen, Krumentextur und optische Einschätzung	25
3.1.2	Aromaprofilanalysen	27
3.2	Aromastoffe in Weizen- und Reisbrot	28
3.2.1	Identifizierung relevanter Aromastoffe	28
3.2.2	Quantitative Untersuchungen und Bestimmung von Aromawerten	35
3.2.2.1	Weizenbrot	35
3.2.2.2	Reisbrot	39
3.2.2.3	Vergleich zwischen Weizen- und Reisbrot	42
3.3	Studien zur Bildung von Aromastoffen in Reisbrot	45
3.3.1	Untersuchung von Reismehl.....	45
3.3.1.1	Identifizierung der Aromastoffe des Reismehls	45
3.3.1.2	Quantitative Untersuchungen und Berechnung der Aromawerte	51

3.3.2	Quantitative Bestimmung freier Aminosäuren und Zusammenhang mit den Konzentrationen ihrer Hefemetaboliten der Weizen- und Reisbrotkrume ...	53
3.3.2.1	Freie Aminosäuren in den Rohstoffen	53
3.3.2.2	Veränderung der Aminosäurekonzentrationen während der Mehlquellung	56
3.3.2.3	Veränderung der Aminosäurekonzentrationen während der Teigfermentation.....	58
3.3.2.4	Gegenüberstellung der Konzentrationen freier Aminosäuren in Teigen und aromaaktiver Hefemetaboliten in Brotkrumen.....	60
3.3.3	Bildung des für Reisbrot charakteristischen Aromastoffs 2-Aminoacetophenon.....	63
3.3.3.1	Mögliche Vorstufen und deren Konzentrationen in den Rohstoffen.....	63
3.3.3.2	Bildung von 2-Aminoacetophenon aus dem direkten Vorläufer 2-Formamidoacetophenon	67
3.3.3.3	Einfluss der Teigfermentationszeit	71
3.3.3.4	Modellstudien zur Bildung von 2-Formamidoacetophenon aus Indol-3-essigsäure.....	72
3.3.3.5	Backversuche mit Zusatz von Indol-3-essigsäure	76
3.3.3.6	Übersicht der Einflussfaktoren auf die Bildung von 2-Aminoacetophenon in Reisbrot.....	78
3.4	Einfluss des Mehllalters auf das Reisbrotaroma.....	81
3.4.1	Generelle Charakterisierung von Reisbrot in Abhängigkeit vom Mehllalter .	81
3.4.1.1	Optimaler Wasserzusatz bei der Reisbrotherstellung in Abhängigkeit vom Mehllalter.....	81
3.4.1.2	Brotvolumen und Krumentextur der Reisbrote in Abhängigkeit vom Mehllalter.....	83

3.4.1.3	Sensorische Untersuchungen der Reisbrote in Abhängigkeit vom Mehllalter.....	85
3.4.2	Identifizierung relevanter Aromastoffe im Reisbrot der gelagerten Reismehlcharge R2	87
3.4.3	Quantitative Untersuchungen und Bestimmung von Aromawerten im Reisbrot der gelagerten Reismehlcharge R2.....	92
3.4.4	Identifizierung relevanter Aromastoffe in der gelagerten Reismehlcharge R2	98
3.4.5	Quantitative Untersuchungen und Bestimmung von Aromawerten im gelagerten Reismehl R2	100
3.4.6	Quantitative Bestimmung von freien Aminosäuren als Vorstufen wichtiger Aromastoffe im gelagerten Reismehl.....	103
4	Experimenteller Teil.....	107
4.1	Chemikalien und Materialien	107
4.2	Synthesen.....	111
4.2.1	Aldolkondensationsprodukte.....	111
4.2.2	2-Formamidoacetophenon.....	112
4.3	Brotrezepturen.....	113
4.4	Allgemeine Charakterisierung von Mehl und Brot.....	113
4.4.1	Feuchtebestimmungen von Mehlen und Brotkrumen	113
4.4.2	Wasseraufnahmefähigkeit von Weizenmehl.....	114
4.4.3	Bestimmung des Brotvolumens	114
4.4.4	Untersuchung der Brotkrumentextur.....	114
4.5	Sensorische Untersuchungen.....	115
4.5.1	Triangeltest zur Untersuchung eines signifikanten Unterschieds	115

4.5.2	Sensorische Aromaprofilanalysen	115
4.5.3	Bestimmung von Geruchsschwellen.....	116
4.6	Untersuchung von Aromastoffen	117
4.6.1	Probenvorbereitung und Hochvakuumdestillation	117
4.6.2	Aromaextraktverdünnungsanalyse	117
4.6.3	Aromastoffidentifizierung und Berechnung des Retentionsindexes	118
4.6.4	Quantifizierung von Aromastoffen mittels	
	Stabilisotopenverdünnungsanalyse	119
4.6.5	Enzymatische Quantifizierung von Essigsäure	122
4.6.6	Unterscheidung von Isomeren.....	122
4.6.7	Bestimmung des Aromawertes.....	124
4.7	Quantifizierung freier Aminosäuren	125
4.7.1	Probenvorbereitung	125
4.7.2	Derivatisierung mit Benzoylchlorid.....	125
4.7.3	Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA).....	126
4.8	Quantifizierung von Indol-3-essigsäure	127
4.8.1	Probenvorbereitung	127
4.8.2	Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA).....	128
4.8.3	Wiederfindungsrate	128
4.9	Modellexperimente zur Untersuchung des Bildungswegs von 2-Aminoacetophenon.....	129
4.9.1	Bestimmung des Teig-pH-Wertes.....	129
4.9.2	Vorversuche:	130

4.9.3	Modellversuche in wässrigen Lösungen	130
4.9.4	Modellversuche mit Reisbrotteig.....	131
4.9.5	Backzusatzversuche.....	131
4.10	Apparativer Teil	132
4.10.1	GC-O/FID	132
4.10.2	GC-FID	132
4.10.3	GC-MS.....	133
4.10.4	Comprehensive 2D-GCxGC-TOF-MS	133
4.10.5	2D-„Heart-Cut“-GCxGC-MS	134
4.10.6	HRGC-qTOF-MS	135
4.10.7	HPLC-MS/MS (I).....	135
4.10.8	HPLC-MS/MS (II).....	136
5	Zusammenfassung	137
6	Literatur	141

ABKÜRZUNGEN

2-AAP	2-Aminoacetophenon
AEVA	Aromaextraktverdünnungsanalyse
au	Arbitrary Units
AW	Aromawert (odor activity value)
BG	Bestimmungsgrenze
CI	Chemische Ionisierung
EI	Elektronenstoßionisation
FAP	2-Formamidoacetophenon
FD-Faktor	Aromaverdünnungsfaktor (Flavor Dilution-Faktor)
FFAP	Free Fatty Acid Phase
FID	Flammenionisationsdetektor
GC-O/FID	Gaschromatographie-Olfaktometrie/Flammenionisationsdetektor
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Indol-3-essigsäure
i.d.	Innendurchmesser
MCSS	Moving Capillary Stream Switching
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
RI	Retention Index
RT	Raumtemperatur (ca. 22 °C)
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SAFE	Hochvakuumdestillation (Solvent assisted flavor evaporation)
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
TM	Trockenmasse
TOF	Flugzeit-Massenanalysator (time of flight)

1 EINLEITUNG

1.1 Motivation

Bei der Herstellung konventioneller Brote haben vor allem Mehle aus Weizen und Roggen, aufgrund ihres Speicherproteins Gluten, eine große Bedeutung. Aus Weizengluten entsteht, durch das Kneten mit Wasser während der Teigbereitung ein viskoelastisches Netzwerk, der so genannte Kleber, welcher die Ausbildung eines großen Teig- bzw. Brotvolumens, einer weichen, feinporigen Krumtextur und einer gleichmäßigen Kruste ermöglicht.¹ Trotz der zahlreichen positiven Eigenschaften des Glutens stieg die Nachfrage der Konsumenten nach glutenfreien Alternativen in den letzten Jahren stetig.

Bei den Betroffenen der Zöliakie bewirkt die Aufnahme von Gluten eine Entzündung der Dünndarmschleimhaut und eine Rückbildung der Darmzotten, sodass es in der Folge zu Störungen der Resorption essenzieller Nährstoffe kommt. Zöliakie betrifft ca. 1 % der Bevölkerung und ist somit eine der am häufigsten auftretenden Lebensmittelintoleranzen. Die derzeit einzige wirksame Therapie stellt der Verzicht von Gluten dar. Ähnlich verhält es sich mit Personen, die an Nicht-Zöliakie-Glutensensitivität (NCGS) und Weizenallergie leiden.² Ein veränderter Lebensstil und die Assoziation glutenfreier Produkte mit gesunder Ernährung oder einer Gewichtsreduktion bewegen darüber hinaus auch zunehmend gesunde Menschen dazu, Gluten zu vermeiden.

Zur Entwicklung glutenfreier Brotrezepturen stehen eine Vielzahl glutenfreier Getreide (z.B. Reis, Mais), Pseudocerealien (z.B. Buchweizen), glutenfreier Stärken (z.B. Reis- und Maisstärke) und Proteine (z.B. Soja, Eiklar) sowie deren Mischungen zur Verfügung.³ Darunter zählt Reismehl, aufgrund seiner weltweiten Verfügbarkeit und umfangreicher Kenntnisse der technofunktionalen Eigenschaften,⁴⁻⁶ zu den gebräuchlichsten Rohstoffen. Brote aus Reismehl weisen jedoch, wie die meisten glutenfreien Brote, sehr starke Mängel in der Qualität, insbesondere im Aroma, verglichen mit glutenhaltigen Backwaren, wie z.B. Weizenbrot, auf. Gründe hierfür liegen in der stofflichen Zusammensetzung und den schlechten funktionellen Eigenschaften des Reismehls im Vergleich zu glutenhaltigen Mehlen. Um diese

qualitativen Mängel des Reisbrot es genau definieren und kompensieren zu können, bedarf es systematischer Untersuchungen zum Vorkommen und der Bildung der darin enthaltenen geruchsaktiven Verbindungen sowie deren Vorstufen.

1.2 Eigenschaften und Qualitätsparameter von glutenfreiem Reisbrot und Weizenbrot im Vergleich

1.2.1 Der Rohstoff Reis und Unterschiede zu Weizen

Als Getreide werden Körnerfrüchte (Karyopsen) tragende Pflanzen der Familie der Süßgräser (*Poaceae*) bezeichnet, aber auch die Körner selbst. Die Reispflanze *Oryza sativa* wird dabei der Unterfamilie der *Oryzaceae* zugeordnet, der Weizen *Triticum aestivum* der Unterfamilie *Pooideae*.⁷ Weltweit zählen Getreide und ihre Produkte zu den wichtigsten Grundnahrungsmitteln. Laut der Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) lag die Reisernte im Jahr 2017 mit 769 Millionen Tonnen (Rohreis) nicht weit unter der Ernte von Weizen mit 779 Millionen Tonnen. Die Hauptanbaugebiete von Reis liegen im asiatischen Raum (China, Indien, Indonesien und Bangladesch).⁸

Zur Verarbeitung von Rohreis (auch Paddyreis) müssen zuerst die Spelzen abgeschält werden, welche beim Reis, im Gegensatz zum Weizen, fest mit der Frucht verwachsen sind. Ein anschließender Polierschritt entfernt die Frucht- und Samenschale, den Keimling und die Aleuronschicht des sogenannten Braunreises. Als Nebenprodukt des polierten Reises (auch Weißreis), fällt der Bruchreis an, welcher durch Nass- oder Trockenvermahlung zu Reismehl verarbeitet wird.⁷

Reis und Reismehl zeichnen sich, wie andere Getreidearten, durch einen hohen Anteil an Kohlenhydraten von mehr als 70 %, darunter vorrangig Stärke, aus.⁷ In seiner Nährstoffzusammensetzung (Tabelle 1) unterscheidet sich Reismehl von Weizenmehl durch einen höheren Kohlenhydratgehalt und geringere Anteile an Proteinen, Fetten und Ballaststoffen.⁹

Tabelle 1 Nährstoffgehalte [%] von Reismehl und Weizenmehl Typ 550 im Vergleich⁹

	Reismehl	Weizenmehl Typ 550
Kohlenhydrate	79,6 ^a	72,0 ^a
Proteine	6,7	9,8
Fett	0,7	1,1
Wasser	12,5	12,3
Mineralstoffe	0,6	0,5
Ballaststoffe	-	4,3

^a Differenzberechnung

Der Proteinfraction von Reis fehlt es zudem an der Fähigkeit, ein viskoelastisches Netzwerk beim Kneten mit Wasser auszubilden, wie es beim Gluten des Weizens der Fall ist. Die Ausbildung der Krumentextur von Reisbrot basiert daher vorrangig auf der Verkleisterung der Stärke während des Backens.

1.2.2 Qualitätsanforderungen an Weizenbrot

Um qualitativ hochwertige Weizenbrote herstellen zu können, bedarf es eines Weizenmehls mit guten Backeigenschaften. Diese hängen unter anderem von der Weizensorte ab sowie von der Menge und Zusammensetzung des Kleberproteins Gluten.^{1,10} Zur Charakterisierung von Weizenmehl werden üblicherweise rheologische Tests durchgeführt, anhand derer die Backeigenschaften abgeschätzt werden. Zu den wichtigsten rheologischen Testsystemen zählt der Farinograph, welcher die Wasseraufnahmefähigkeit und Teigentwicklungszeit des Mehles bestimmt. Anhand dieser Werte ist es möglich, die optimale Teigkonsistenz zur Brotherstellung einzustellen. Der Extensograph überprüft die Dehneigenschaften des Teiges. Diese lassen Rückschlüsse auf das Gashaltvermögen zu.^{1,11}

Die rheologischen Teigeigenschaften korrelieren sehr stark mit der Backqualität, die vorrangig an dem Brotvolumen und der Krumentextur des Weizenbrotes festgemacht wird.^{10,11} Letztere beinhaltet die Krumenhärte, die Elastizität und die Porung. Auch die Oberflächenbeschaffenheit des Brotes spielt eine wichtige Rolle. Um diese zu

bestimmen, werden standardisierte Backtests, wie der Rapid Mix-Test (RMT) oder verschiedene Mikrobacktests (MBT, MOMT) genutzt.^{10,12}

Die Verbrauchererwartung an qualitativ hochwertiges Weizenbrot bezieht sich vorrangig auf die Parameter Textur, Aroma, Geschmack und Farbe. Die Brotkrume muss eine weiche, saftige Textur aufweisen. Von der Brotkruste wird hingegen eine trockene, knusprige Textur erwartet. Ein frisches Brot erinnert in seinem Aroma an Hefe und Weizen und weist die Geschmacksnoten süß, salzig und teilweise sauer auf.¹³ Sensorische Prüfungen besitzen daher einen hohen Stellenwert in der Qualitätskontrolle von Weizenbrot. Die Akzeptanz eines Produkts ist zudem subjektiv und hängt von verschiedenen Parametern, wie Herkunft und Alter der Konsumenten, ab.¹³

Zuletzt muss ein Weizenbrot eine gewisse Lagerbeständigkeit besitzen. Es ist bekannt, dass sich das Aroma und die Textur des Brotes nach dem Backen verändern. Die Migration des Wassers von der Krume zur Kruste, einhergehend mit der Retrogradation, der Veränderung der Stärkestruktur, führen zum Anstieg der Krumenhärte und zu einer weichen, lederartigen Kruste.^{14,15} Auch der Verlust des Aromas und geschmackliche Veränderungen führen zu einer sinkenden Verbraucherakzeptanz.¹⁶ Die guten wasserbindenden Eigenschaften des Glutens verlangsamen diesen Prozess im Vergleich zu glutenfreien Backwaren.¹⁷ Darüber hinaus kann die Alterung durch Variation der Herstellungsparameter, wie beispielsweise einer verlängerten Fermentationszeit, verlangsamt werden.¹⁵

1.2.3 Qualitätsstandards von glutenfreiem Reisbrot

Die Einschätzung der Backeigenschaften von Reismehl, bzw. generell von glutenfreien Rohstoffen, unterscheidet sich sehr stark von Weizenmehl. Die Konsistenz eines Reisbrotteigs ist, aufgrund des fehlenden Klebereiweißes, eher flüssig bis viskos. Folglich ist die Charakterisierung mit den für Weizenteig beschriebenen, rheologischen Tests mittels Farinograph und Extensograph nicht möglich. Die Bestimmung der Wasseraufnahmefähigkeit kann daher nur empirisch durch Bestimmung des Brotvolumens nach dem Backen, erfolgen.¹⁸ Bei Reismehl liegt der optimale Wasserzusatz bei 120 % bezogen auf die Mehlmasse. Dieser übersteigt den

Wasserzusatz bei Weizenmehl (63 %) deutlich und geht mit einem höheren Backverlust einher.¹⁸ Zudem werden zunehmend Bemühungen angestellt, Zusammenhänge zwischen den Eigenschaften des Reismehls, der Rheologie und der Brotqualität aufzuklären. In einer Studie von Feizollahi et al. wurden verschiedene Reissorten auf ihre Backqualität untersucht und eine positive Korrelation zwischen der Wasseraufnahme des Mehls und der Krumenhärte festgestellt.¹⁹ Ein negativer Einfluss einer zu kleinen Partikelgröße des Reismehls auf die Gasrückhaltung und das Brotvolumen wurden von de la Hera et al. beschrieben.²⁰ Matos und Rosell untersuchten die Rheologie von Reisteigen mittels Mixolab, einer Drehmomentmessung während des Mischvorgangs von Teigen bei verschiedenen Temperaturen, und konnten die Ergebnisse mit der Krumenhärte korrelieren.²¹

Untersuchungen der Qualität verschiedener Reisbrote ergaben stets ein geringeres Volumen, eine härtere Krume und eine schnellere Brotalterung im Vergleich zu Weizenbrot.^{1,17,18} Masure et al. nutzten erstmals einen Electrical Resistance Oven (ERO), um die Vorgänge bei der Herstellung glutenfreier Brote zu untersuchen.²² Das System des ERO dient der Beobachtung thermischer Vorgänge, wie der Stärkeverkleisterung und der Ausbildung der Brotkrume während des Backens, und ermöglicht die online-Messung des freigesetzten Kohlenstoffdioxids und des Volumens. Dadurch konnte die schlechte Gashaltekapazität des Reisbrotteiges für die harte Krume und das niedrige Brotvolumen verantwortlich gemacht werden. Die Stabilität der Gasblasen im Teig sollte in einem guten Gleichgewicht mit der Verkleisterung der Stärke stehen, damit der Teig nicht zusammenfällt, bevor sich die Krumenstruktur ausbildet.

Sensorische Untersuchungen glutenfreier Brote auf Reismehlbasis führten stets zu einer schlechteren Akzeptanz des Aromas, Geschmacks und Mundgefühls im Vergleich zu Weizenbrot.^{18,23} Hager et al. beschrieben diese mittels Aromaprofilanalysen als Mangel der charakteristischen hefigen, an Teig erinnernden Geruchsnote der Weizenbrotkrume in Produkten aus Reismehl.¹⁸ Matos und Rosell untersuchten mit einem Sensorikpanel den Geruch und Geschmack von Broten aus verschiedenen Reisbrotrezepturen sowie deren Farbintensität und Krumeneigenschaften, mit dem Resultat einer stets niedrigen bis mittleren Akzeptanz der Panelisten.²¹ Auch konnten sie keinen Zusammenhang

zwischen sensorischen und instrumentell bestimmten Parametern feststellen. Um die qualitativen Mängel von Reisbrot auszugleichen, sind Backzusätze, wie Proteine, Hydrokolloide und Fette üblich. Dies erfolgte jedoch bisher zumeist nur mittels Versuch und Irrtum, anstatt durch systematische Studien.

1.3 Aromastoffe und deren Wahrnehmung

Aromastoffe sind niedermolekulare, meist unpolare Verbindungen. Abhängig von ihrer Struktur sind sie in der Lage, vielfältige Geruchseindrücke auszulösen. Unter den vermutlich mehr als 10 000 bekannten flüchtigen Verbindungen in Lebensmitteln sind allerdings nur etwa 3 % geruchsaktiv.^{24,25} Das charakteristische Aroma eines Lebensmittels wird in der Regel durch die Kombination von 3 bis zu 40 Schlüsselaromastoffen ausgelöst, die entweder aus den Rohstoffen stammen oder bei verschiedenen Prozessierungsschritten (z.B. thermische Behandlung) entstehen.^{24,26} Aromastoffe, welche aus häufig vorkommenden Inhaltsstoffen (z.B. Aminosäuren und Fettsäuren) gebildet werden, beeinflussen das Aroma einer Vielzahl verschiedener Lebensmittelgruppen (Generalisten), wohingegen zahlreiche Aromastoffe eher selten auftreten (Individualisten).²⁴

Für eine olfaktorische Wahrnehmung (Geruchswahrnehmung) müssen die Aromastoffe zu den Geruchsrezeptoren der im oberen Rachenraum lokalisierten Regio olfactoria gelangen. Dies kann sowohl orthonasal durch die Nase als auch retronasal über die Mundhöhle durch den Rachen erfolgen. Letzteres findet während der Nahrungsaufnahme statt und ist bei dem „swallowing-breath“, dem ersten Ausatmen nach dem Schlucken am intensivsten.²⁷ In der Regio olfactoria lösen sich die Aromastoffe in der Nasenschleimhaut und bewirken durch die Interaktion mit den in die Cilien eingebetteten Geruchsrezeptoren die Signalübertragung und somit den Geruchsreiz.²⁸ Um einen Geruch wahrzunehmen, müssen die Aromastoffe eine gewisse Lipophilie aufweisen, damit sie sich in der Nasenschleimhaut lösen, und in ausreichender Konzentration (Geruchsschwelle) verfügbar sein. Die Geruchsschwellen verschiedener Aromastoffe können um mehrere Zehnerpotenzen variieren, werden aber auch von den Wechselwirkungen mit der jeweiligen Matrix beeinflusst.⁷

1.4 Methoden zur Analyse des Aromas von Lebensmitteln

Die Flüchtigkeit von Aromastoffen sowie die Nachbildung und Artefaktbildung bei thermischer Behandlung stellen hohe Ansprüche an die Gewinnung authentischer Aromaextrakte zur Analytik. Darüber hinaus lassen Konzentrationen flüchtiger Verbindungen keine direkten Rückschlüsse auf ihre Aromarelevanz zu. Als State-of-the-Art, um diese Anforderungen zu erfüllen, gilt der Sensomics Ansatz,^{26,29} welcher im Folgenden beschrieben wird.

1.4.1 Schonende Isolierung

Extrakte von Aromastoffen lassen sich, aufgrund des lipophilen Charakters, durch Kaltextraktion mit einem niedrig siedenden Lösungsmittel (z.B. Dichlormethan) gewinnen. Anschließend wird die flüchtige Fraktion des Extrakts mittels SAFE-Destillation (Solvent Assisted Flavor Evaporation, Abbildung 1) isoliert. Eine thermische Beanspruchung der Probe wird dabei durch die Nutzung von Hochvakuum vermieden.³⁰ Während die nicht-flüchtigen Bestandteile des Extrakts (z.B. Lipide, Geschmacksstoffe) im ersten Destillationskolben (2a) zurückbleiben, gelangen die flüchtigen in den zweiten Kolben (2b), in welchem sie durch den flüssigen Stickstoff (6) kondensieren oder gefrieren.

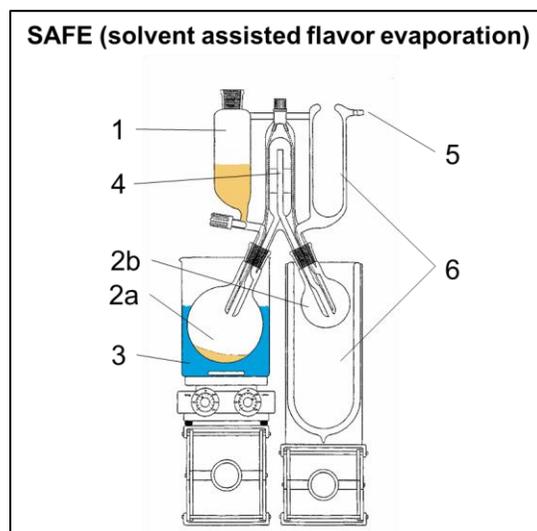


Abbildung 1 Schematische Darstellung der SAFE-Apparatur: 1 Tropftrichter; 2a, b Destillationskolben; 3 Wasserbad (40°C); 4 temperierte Destillationsbrücke 40 °C; 5 Hochvakuum; 6 flüssiger Stickstoff (-196°C)

1.4.2 Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

Die Analyse mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie/Flammenionisationsdetektion (GC-O/FID) ermöglicht, neben der instrumentellen Detektion aller flüchtigen Komponenten der Probe mittels FID, eine olfaktorische Detektion aller aromaaktiven Verbindungen der Probe und ihrer zugehörigen Geruchsqualitäten. Dieses Verfahren wird bei der AEVA zur Bestimmung relevanter Aromastoffe genutzt. Bei der Messung einer Verdünnungsreihe des Extrakts ergibt sich ein FD-Faktor („Flavor Dilution“) jedes Aromastoffs entsprechend der höchsten Verdünnung, in welcher dieser noch wahrgenommen werden kann³¹. Die AEVA dient als Screening-Methode, gibt jedoch keine Auskünfte über Wechselwirkungen von Aromastoffen mit der jeweiligen Matrix.

1.4.3 Identifizierung von Aromastoffen

Zur eindeutigen Identifizierung von Aromastoffen, werden die Geruchsaktivität, die chromatographischen Eigenschaften (Retentionsindizes (RI) auf zwei verschiedenen GC-Säulen) und massenspektrometrische Daten mit Referenzsubstanzen verglichen.

Die Komplexität der Probenextrakte erfordert oft eine mehrdimensionale chromatographische Auftrennung, um auswertbare Massenspektren aufzunehmen, worauf in Kapitel 1.5 näher eingegangen wird.

1.4.4 Quantifizierung von Aromastoffen

Um eine präzise Bestimmung von Aromastoffgehalten in Lebensmitteln zu garantieren, eignet sich die Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA).³² Das Verfahren basiert auf der Annahme, dass sich isotopenmarkierte Substanzen in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften nicht von den entsprechenden, nicht-isotopenmarkierten Substanzen unterscheiden. Die Zugabe bekannter Mengen der mit stabilen Isotopen markierten Analyten zu Beginn der Probenaufarbeitung führt zur Einstellung eines konstanten Verhältnisses zwischen Analyt und Standard (Abbildung 2). So können Verluste während des Aufarbeitungs- und Messverfahrens kompensiert werden. Die Analytkonzentration ergibt sich durch die massenspektrometrische Bestimmung des

Verhältnisses der Intensitäten zwischen dem Analyten und dem isotonenmarkierten Standard und dem Vergleich mit Kalibriergermischen bekannter Konzentrationen.

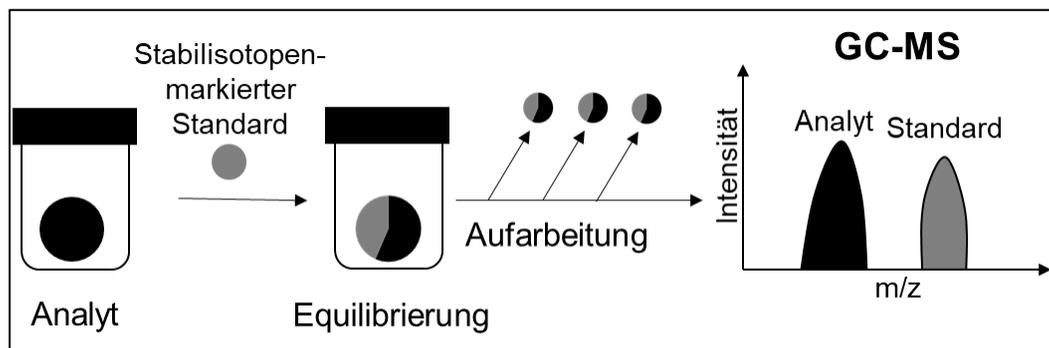


Abbildung 2 Schematischer Ablauf der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA)

1.4.5 Berechnung von Aromawerten

Die Relevanz der jeweiligen Aromastoffe hängt nicht nur von deren Konzentration, sondern vor allem von deren Wahrnehmungsschwelle in der jeweiligen Matrix ab (siehe Kapitel 1.3). Um diese Abhängigkeit einzubeziehen, wurde der Aromawert (AW) eingeführt, welcher sich als Quotient der Konzentration und der Geruchsschwelle definiert. Bei dem Untersuchungsmaterial Brot wird zur Berechnung näherungsweise die Geruchsschwelle in Stärke, dem Hauptbestandteil der Brotmatrix, herangezogen. Ein Modell zur Bestimmung von Geruchsschwellen wurde von Czerny et al. vorgeschlagen, welcher vor allem der Bestimmung der Reinheit der, zur Analyse verwendeten, Aromastoffe einen hohen Stellenwert einräumt.³³ Im Vergleich zu Geruchsschwellen in Wasser sind, aufgrund der geringeren Polarität der Stärke, niedrigere Geruchsschwellen polarer Aromastoffe und höhere Geruchsschwellen unpolarer Aromastoffe zu erwarten.

1.4.6 Aromarekombination und Omissionsversuche

Zur Überprüfung der analytischen Daten ist der sensorische Vergleich von Aromamodellen mit dem originalen Lebensmittel hilfreich.³⁴ Solche Modelle enthalten die Schlüsselaromastoffe des Lebensmittels in den ermittelten Konzentrationen und liegen idealerweise in einer dem Lebensmittel ähnlichen Matrix vor. Als Prüfverfahren eignet sich dafür die vergleichende Bestimmung von Aromaprofilen, eine sensorische

Bewertung charakteristischer Geruchsqualitäten der Proben auf einer vorgegebenen Skala. Bei guter Übereinstimmung können darüber hinaus Omissionsversuche durchgeführt werden. Hierfür wird mittels Triangeltests die Abweichung vom ursprünglichen Aromamodell bei Abwesenheit eines Aromastoffs untersucht.

1.5 Mehrdimensionale Chromatographie zur Aromastoffanalytik

Die Anwendung einer zweidimensionalen Chromatographie ermöglicht, trotz der hohen Komplexität der Aromaextrakte, die Aufnahme von gut aufgelösten Massenspektren zahlreicher Aromastoffe, welche bei eindimensionalen Systemen co-eluieren würden. Das Prinzip der 2D-comprehensive GC×GC-TOF-MS wird in Abbildung 3 verdeutlicht. Die nach der Auftrennung auf der ersten Säule eluierenden Verbindungen werden im Modulator, durch mit flüssigem Stickstoff gekühlte Druckluft, jeweils als 4 Sekunden-Fractionen ausgefroren, fokussiert und gebündelt auf die zweite Säule gegeben (Abbildung 3, rechts). Die Auftrennung auf der kürzeren zweiten Säule muss innerhalb von 4 Sekunden abgeschlossen sein, bevor die nächste Fraction vom Modulator auf die Säule gegeben wird. Die hohe Scanzahl des Time of Flight (TOF) Massenanalysators ermöglicht die Aufnahme des vollständigen zweidimensionalen Chromatogramms.

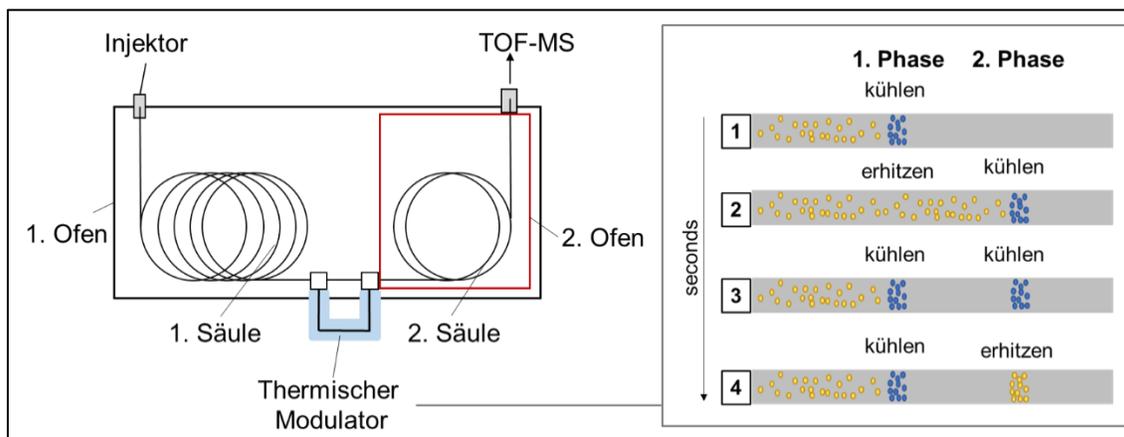


Abbildung 3 Prinzip der 2D-comprehensive GC×GC-TOF-MS

Eine Alternative für besonders gering konzentrierte Analyten bietet das zweidimensionale Heart-cut-GC×GC-MS-System (Abbildung 4), welches eine vollständige Auftrennung eines, auf der ersten Dimension gewählten, Elutionsbereiches auf einer zweiten Dimension ermöglicht. Dazu eignet sich die Kombination einer polaren und einer unpolaren stationären Phase. Zum Transfer des gewählten Elutionsbereiches auf die zweite Kapillarsäule dient das Moving Capillary Stream Switching (MCSS) System mit nachfolgender Kryofokussierung.³⁵ Da ausschließlich die Komponenten des transferierten Bereiches in das Massenspektrometer gelangen, können höhere Extraktkonzentrationen und Injektionsvolumina verwendet werden, als im zuvor erwähnten System, wodurch eine höhere Empfindlichkeit erreicht wird. Durch zusätzliche Verwendung eines Sniffing Ports eignet sich das System darüber hinaus zur Identifizierung geruchsaktiver Minorkomponenten.

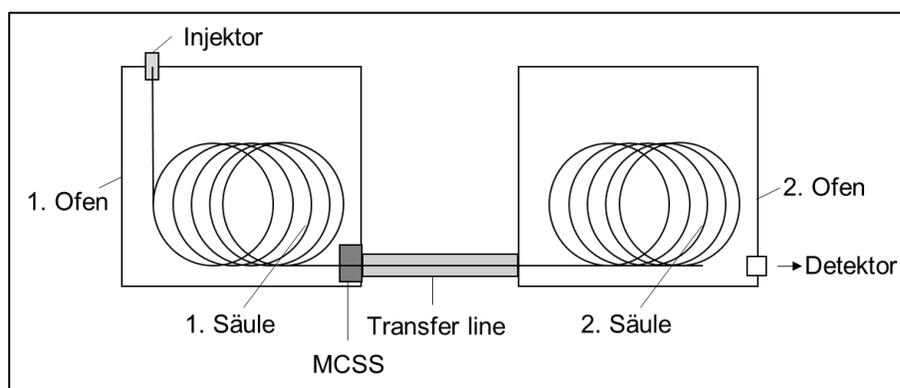


Abbildung 4 Schematischer Aufbau des Heart-cut-GC×GC-MS-Systems

1.6 Aromastoffe in Weizenbrot

Das Aroma von Weizenbrot wurde in früheren Studien bereits umfassend untersucht. Von den mehr als 540 bekannten flüchtigen Verbindungen in Weizenbrot³⁶ sind jedoch nur etwa 45 Verbindungen aromaaktiv³⁷. Zu den wichtigsten Substanzgruppen zählen Aldehyde, Alkohole, Ketone, Ester, Säuren, Pyrazine, Pyrroline, Kohlenwasserstoffe, Furane und Lactone. Die Entstehung der Schlüsselaromastoffe von Weizenbrot wird maßgeblich von dessen Herstellung beeinflusst, welche im Folgenden detailliert betrachtet wird.

1.6.1 Brotherstellung und deren Einfluss auf das Aroma

Weizenmehl, Backhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Kochsalz und Wasser zählen zu den Grundzutaten von traditionellem Weizenbrot. Zudem sind Zusätze von Zucker oder Fetten möglich. Dem Rohstoff *Weizenmehl* wird ein geringer Einfluss auf das Brotaroma nachgesagt. Nach Czerny und Schieberle enthält Weizenmehl der Type 550, welches zumeist zur Herstellung von Brot verwendet wird, hauptsächlich Lipidoxidationsprodukte, worunter (*E*)-2-Nonenal, trans-(4,5)-Epoxy-(*E*)-2-decenenal sowie Sotolon und Vanillin die höchsten FD Faktoren bei einer AEVA erreichten.³⁸ Dennoch enthält das Weizenmehl wichtige Inhaltsstoffe, welche bei der Brotherstellung als Vorstufen für die Aromastoffbildung gelten.¹³

Die *Hefe* stellt, trotz ihres geringen Anteils im Teig von üblicherweise 1,5-3 % der Mehlmasse, eine wesentliche Quelle für Aromastoffe dar.³⁹ Mittels AEVA konnten v.a. kurzkettige organische Säuren (z.B. 2- und 3-Methylbuttersäure und Buttersäure), aber auch 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, 2-Methoxy-4-vinylphenol und Phenylacetaldehyd als wichtigste Aromastoffe der Hefe identifiziert werden.^{39,40} Zudem sind in der Hefe hohe Mengen von Aromastoffvorstufen enthalten, wie z.B. freie Aminosäuren.

Als erster Schritt der Brotherstellung gilt die Teigbereitung, wobei, während des Knetens, Gluten und Stärke mit dem Wasser ein viskoelastisches Netzwerk bilden und Luft, bzw. Sauerstoff eingetragen wird. Der Sauerstoff begünstigt die Oxidation von Lipiden, welche sowohl enzymatisch durch Lipoxygenasen als auch radikalisch durch

Autoxidation stattfindet. Dabei entstehen zunächst Hydroperoxide, die enzymatisch durch Hydroperoxidlyasen oder nicht-enzymatische Reaktionen zu zahlreichen flüchtigen Verbindungen, darunter auch aromaaktive Aldehyde, zerfallen.³⁷ Bei der in Weizenmehl am häufigsten vorkommenden Linolsäure zählen Hexanal (grün, grasig), (*Z*)-2-Octenal (fettig, nussig) und (*E*)-2-Nonenal (grün, fettig) zu den wichtigsten, durch Lipidoxidation gebildeten Aromastoffen, aber auch 1-Octen-3-on (pilzig) und (*E,E*)-2,4-Decadienal (fettig, frittiert).³¹

Die darauffolgende Hefefermentation dient vorrangig der Teiglockerung, durch Bildung von Kohlenstoffdioxid während der alkoholischen Gärung. Darüber hinaus hat diese Phase eine große Bedeutung für die Bildung von Aromastoffen durch Sekundärstoffwechselwege der Hefe. Der wichtigste dieser Metabolismen ist der Ehrlich-Abbau, die Metabolisierung freier Aminosäuren zu den korrespondierenden Aldehyden, Alkoholen und Säuren.⁴¹⁻⁴³ Als Quelle freier Aminosäuren dient sowohl das Mehl als auch die Hefe selbst. Der Reaktionsmechanismus wird in Abbildung 5 beispielhaft für die Aminosäure Leucin verdeutlicht. Durch Transaminierung und Decarboxylierung entsteht der korrespondierende Aldehyd 3-Methylbutanal, welcher anschließend zum Alkohol 3-Methyl-1-butanol oxidiert wird. Durch Dotierung isotope markierter Aminosäuren beschrieben Czerny und Schieberle sowie Opperer einen sehr effizienten Ablauf dieser Reaktion während der Teigfermentation von Weizen- bzw. Maisbrotteigen.^{42,43} Dabei wurde für Leucin, Isoleucin und Phenylalanin eine bevorzugte Bildung des jeweiligen Alkohols im Vergleich zum Aldehyd und der Säure beobachtet.

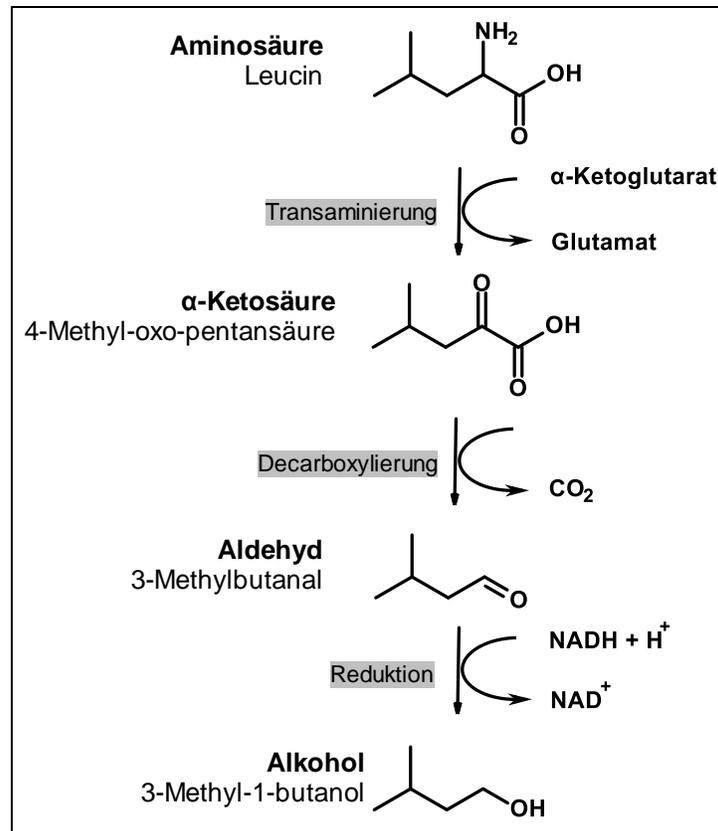


Abbildung 5 Ablauf der Metabolisierung von Aminosäuren via Ehrlich Abbau in der Hefezelle am Beispiel von Leucin

Die Fermentationsparameter Dauer, Temperatur und Hefemenge haben einen erheblichen Einfluss auf die Bildung von Aromastoffen. So korreliert die Menge an gebildeten Ehrlich-Metaboliten 3-Methyl-1-butanol (malzig) und 2-Phenylethanol (blumig, nach Honig) mit der Fermentationsdauer und höheren Fermentationstemperaturen (Optimum: 35°C).^{44,45} Auch die Lipidoxidation wird bei höherer Gärtemperatur begünstigt, wohingegen bei niedrigeren Temperaturen eine verstärkte Bildung von Estern und Ehrlich-Aldehyden beobachtet wurde.^{46,47} Eine Erhöhung der Hefemenge resultierte in einem Anstieg des, an Butter erinnernden, Diacetyls und des blumig, nach Honig riechenden Phenylacetaldehyds.^{45,46} Auch der Einfluss des Hefestammes und weiterer Mikroorganismen ist maßgeblich für das Gesamtaroma von Teigen und Broten. So zeigte eine Studie von Opperer deutliche sensorische Unterschiede von Teigen verschiedener Mehle nach der Fermentation mit fünf verschiedenen Hefe- und fünf verschiedenen Milchsäurebakterienstämmen.⁴³ Eine

Kombination verschiedener Mikroorganismen bei der Teigfermentation, wie sie bei Sauerteigen vorliegt, führt zu einer größeren Vielfalt an Aromastoffen und wird häufig mit einer Verbesserung der Brotqualität in Verbindung gebracht.^{13,48}

Im letzten Schritt der Brotherstellung, dem Backprozess, werden die Brotkrume und Kruste durch das Verdampfen von Wasser, die Stärkequellung und -verkleisterung, die Denaturierung von Proteinen und zahlreiche andere thermische Reaktionen, ausgebildet. Der langsame Temperaturanstieg in der Brotkrume führt zu einer letzten Aktivitätssteigerung der Hefe (Ofentrieb), bevor diese abstirbt und das Brotvolumen durch Verfestigung der Brotkruste definiert wird.⁷ Thermische Reaktionen zur Aromastoffbildung finden vor allem an der Oberfläche der Teige statt. Die *Maillard*-Reaktion, eine nicht-enzymatische Bräunungsreaktion zwischen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern, generiert neben braunen Pigmenten (Melanoidine) vielfältige flüchtige und aromaaktive Verbindungen mit zumeist röstigen und an Karamell erinnernden Geruchsnoten. Strukturell handelt es sich bei flüchtigen *Maillard*-Produkten häufig um heterozyklische Verbindungen, wie beispielsweise Pyrazine, Pyrroline, Furanone und Pyranone. Eine wichtige Rolle bei der thermischen Aromastoffbildung spielt der *Strecker*-Abbau, eine Reaktion von Aminosäuren mit α -Dicarbonylverbindungen, die während der *Maillard*-Reaktion entstehen. Die resultierenden *Strecker*-Aldehyde besitzen eine, um ein Kohlenstoffatom verkürzte, der Aminosäure entsprechende Struktur.^{7,49} Die hohen Temperaturen an der Teigoberfläche führen darüber hinaus zur Karamellisierung des Zuckers, sowie zu thermischen Abbaureaktionen von Zuckern und Aminosäuren, sodass aromaaktive Substanzen, wie beispielsweise heterozyklische Verbindungen, aber auch Essigsäure und Acetaldehyd entstehen.⁴⁹

1.6.2 Schlüsselaromastoffe der Weizenbrotkrume

Das Aroma der Weizenbrotkrume wurde bereits von mehreren Autoren, durch Anwendung des Sensomics Konzeptes, untersucht.^{44,45,50} Dabei identifizierte Verbindungen stammen hauptsächlich aus der Hefefermentation und der Oxidation der Mehllipide. Der Einfluss von Aromastoffen, die während des Backprozesses beispielsweise durch die *Maillard*-Reaktion gebildet werden, kann als gering betrachtet werden. Solche Verbindungen gelangen vorrangig während der Lagerung, durch Migration aus der Brotkruste in die Krume.

Mittels AEVA identifizierten Schieberle und Grosch Diacetyl, Methional, 1-Octen-3-on, (*Z*)- und (*E*)-2-Nonenal, (*E,E*)-2,4-Decadienal und trans-4,5-Epoxy-(*E*)-2-decenal als wichtigste Verbindungen in der neutral/basischen Fraktion eines Weizenbrotkrumenextrakts.⁴⁴ Die Ehrlich-Abbauprodukte 3-Methyl-1-butanol und 2-Phenylethanol stiegen bei längerer Gare an und intensivierten das Aroma der Brotkrume. Gassenmeier und Schieberle bestätigten die Ergebnisse bei der Analyse der Krume von französischem Baguette, welches mit Vorteigen auf zwei verschiedene Weisen hergestellt wurde.⁴⁵ In dieser Studie wurde zusätzlich Ethyloctanoat mit einem hohen FD-Faktor identifiziert sowie die Aromastoffe der sauren Fraktion Essigsäure, Buttersäure, 2- und 3-Methylbuttersäure und Vanillin. Sahin und Schieberle untersuchten die Schlüsselaromastoffe eines gegarten Hefegebäcks, welches der Weizenbrotkrume sehr ähnelt. Sie identifizierten ebenfalls die meisten bereits genannten Aromastoffe mit relevanten FD Faktoren (≥ 16) und konnte (*E,Z*)-2,6-Nonadienal, (*E,E*)-2,4-Nonadienal, Phenylacetaldehyd und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(*2H*)-furanon ergänzen.⁵⁰

Nachdem in früheren Studien nur ausgewählte Aromastoffe mittels Stabilisotopenverdünnungsanalysen (SIVA) quantifiziert wurden, erreichten in der umfassenden Studie von Sahin und Schieberle 17 von 21 untersuchten Aromastoffen relevante Aromawerte ($AW > 1$).⁵⁰ Die Berechnung der Aromawerte erfolgte auf der Basis der Geruchsschwellen in Stärke. Danach besaßen trans-4,5-Epoxy-(*E*)-2-decenal, γ -Nonalacton, 2-Acetyl-1-pyrrolin und 3-Methylbuttersäure die höchsten AW (> 100). In einer anderen Arbeit bestimmten Birch et al. mittels dynamischer Headspace-GC-MS

Konzentrationen und Aromawerte geruchsaktiver Verbindungen in der Weizenbrotkrume. 3-Methylbutanal, (*E*)-2-Nonenal, 3-Methyl-1-butanol, und Diacetyl erreichten dabei die höchsten Aromawerte.⁴⁶

1.6.3 Schlüsselaromastoffe der Weizenbrotkruste

Das Aroma der Weizenbrotkruste wird weniger von Reaktionen der Hefefermentation beeinflusst, sondern vorrangig durch die Aromastoffbildung während des Backprozesses.^{47,49} Zahlreiche Studien beschreiben 2-Acetyl-1-pyrrolin als wichtigsten Aromastoff in der Kruste.^{32,51–53} Diese röstige, an Popcorn erinnernde Substanz entsteht durch *Maillard*-Reaktion aus den Aminosäuren Prolin und Ornithin und konnte in Modellversuchen durch das Erhitzen einer Hefe-Zucker-Suspension nachgewiesen werden.^{39,54}

Schieberle und Grosch detektierten mittels AEVA zudem (*E*)-2-Nonenal, 3-Methylbutanal, Diacetyl, Methylpropanal, 1-Octen-3-on und 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin als relevante Verbindungen der Kruste^{51,55} und definierten den Unterschied zur Krume anhand signifikant höherer Mengen der *Maillard*-Produkte 2-Acetyl-1-pyrrolin, 2-Acetyltetrahydropyridin und 3-Methylbutanal.⁴⁴ Zehentbauer et al. zählten darüber hinaus auch 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, Methional, und 2-Methylbutanal zu den Schlüsselaromastoffen der Weizenbrotkruste.⁵² Die Quantifizierung der Krustenaromastoffe mittels SIVA mit anschließender Berechnung der AW wurde in zahlreichen Literaturstellen beschrieben.^{32,44,52,55,56} Zehentbauer und Grosch führten die umfangreichste Studie durch und bestimmten die AW von 20 Aromastoffen in der Kruste von französischem Baguette bei zwei verschiedenen Herstellungsverfahren.⁵² Mit einem AW >1000 ist 2-Acetyl-1-pyrrolin in beiden Proben der wichtigste Schlüsselaromastoff, gefolgt von Vanillin, Diacetyl, Methional, (*E*)-2-Nonenal und 1-Octen-3-on (AW >100), jedoch wurden deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von den verschiedenen Herstellungsverfahren verzeichnet.

Bei der Brotalterung ist, neben den Veränderungen in der Textur, auch das Aroma betroffen. Besonders die Weizenbrotkruste verliert sehr schnell ihren charakteristischen, frischen Geruch. Untersuchungen von Schieberle und Grosch zur Lagerung brachten

diesen Sachverhalt mit drastischen Verlusten des 2-Acetyl-1-pyrrolins von beinahe 90 % und des 3-Methylbutanals um 65 %, nach einer Lagerdauer von 96 h, in Zusammenhang.⁵⁵ Das Lipidabbauprodukt (*E*)-2-Nonenal blieb während dieser Lagerdauer beinahe unverändert. In diesem Zusammenhang wurde eine Korrelation zwischen Lipidabbauprodukten, wie (*E*)-2-Nonenal, mit einem faden Fehl aroma diskutiert.^{47,55}

1.7 Aromastoffuntersuchungen in Reisbrot und gekochtem Reis

1.7.1 Aromastoffe in Reisbrot

Zur Aromastoffzusammensetzung in Reisbrot sind bisher kaum Daten verfügbar, und es wurde bisher keine Untersuchung der Schlüsselaromastoffe mit Hilfe des Sensomics Ansatzes durchgeführt. Pico et al. untersuchten die flüchtigen Verbindungen der Teige und der Brotkrumen bei Verwendung verschiedener glutenfreier Mehle (u.a. Reis, Hafer und Buchweizen) mittels statischer Headspace-GC-MS. Vorwiegend wurden Verbindungen des Hefemetabolismus und der Lipidperoxidation detektiert, wobei Erstere im Teig und Letztere in der Brotkrume dominierten. Zwischen den verschiedenen Brotsorten wurden vorwiegend quantitative, jedoch keine qualitativen Unterschiede der wichtigsten flüchtigen Verbindungen detektiert.²³ In einer weiteren Studie von Pico et al. wurde ein besonders hoher Gehalt der flüchtigen Lipidabbauprodukte Nonanal and 2,4-Decadienal in der Brotkrume des Reismehls im Vergleich zu Brotkrumen aus Weizenmehl oder aus anderen glutenfreien Mehlen bestimmt.⁵⁷ Da Aromaabweichungen des Reisbrotes von Weizenbrot vorwiegend mit dem Rohstoff in Verbindung stehen, werden im Folgenden Studien zu Geruchsstoffen in gekochtem Reis vorgestellt.

1.7.2 Aromastoffe in gekochtem Reis

Nach zahlreichen Untersuchungen der flüchtigen Verbindungen in Reis trafen erstmals Buttery et al. eine Aussage über die Aromaaktivität der flüchtigen Verbindungen. Durch Quantifizierungsexperimente und die Berechnung von Aromawerten (AW) identifizierten sie Hexanal, 2-Acetyl-1-pyrrolin, Octanal, Nonanal, (*E*)-2-Nonenal und (*E,E*)-2,4-Decadienal als relevante Aromastoffe.⁵⁸ Neben herkömmlichem Reis zeichnet sich der sogenannte Duftreis (z.B. Basmati und Jasmin Reis) durch sein spezielles Aroma nach dem Kochen aus. Dafür sind besonders hohe Gehalte des röstig, popcornartigen Aromastoffs 2-Acetyl-1-pyrrolin verantwortlich.⁵⁹ Im Vergleich des Aromas von traditionellem Reis und Duftreis wurden von Petrov et al. Hexanal, 1-Octen-3-ol, Octanal, (*E*)-2-Octenal und (*E,E*)-2,4-Decadienal als gleichwertig relevant in allen untersuchten Reissorten beschrieben, hingegen 2-Acetyl-1-pyrrolin mit einem sehr hohen AW ausschließlich in Duftreissorten. Untersuchungen von, mittels schonender Kaltextraktion und Hochvakuumdestillation, erzeugten Extrakten von traditionellem Indica-Reis sowie drei Duftreissorten wurden erstmals von Jezussek et al. durchgeführt. Die Analysen mittels AEVA standen im Einklang mit vorherigen Untersuchungen und 2-Aminoacetophenon wurde erstmals als relevanter Aromastoff in Reis beschrieben.⁶⁰ Quantifizierungs- und Weglassversuche im Aromarekombinat bestätigten die Relevanz von 2-Aminoacetophenon für das Reisaroma.⁶¹ Weiterhin wurden (*E,E*)-2,4-Decadienal, Vanillin, 2-Methoxy-4-vinylphenol, trans-4,5-Epoxy-(*E*)-2-decenal, 4-Vinylphenol und (*E*)-2-Nonenal als wichtige Aromastoffe in traditionellem Reis genannt. Vergleichende Untersuchungen von gekochtem und ungekochtem Reis zeigten zudem deutliche Anstiege der Konzentrationen einiger Aromastoffe nach dem Kochen, u.a. 4-Vinylphenol und 2-Acetyl-1-pyrrolin, wobei Letzteres auch in dieser Studie in traditionellem Reis nur in geringen Konzentrationen gefunden wurde.⁶¹

1.7.3 Alterung von Reis und Reismehl

Die Lagerbedingungen und -dauer haben einen großen Einfluss auf die Protein- und Lipidfraktion von Weißreis und Reismehl. Die vorrangig enzymgesteuerten Abbaureaktionen bewirken Veränderungen der technofunktionalen Eigenschaften (z.B. Wasserbindung), haben aber auch einem beträchtlichen Einfluss auf das Aroma.^{62,63} Dhaliwal et al. beschrieben einen Anstieg der Konzentrationen freier Amino- und Fettsäuren im Reismehl einhergehend mit der Lagerung, welche sie auf die Aktivität von Proteasen, Lipasen und Lipoxygenasen zurückführten.⁶² Durch weitere enzymatische und nicht enzymatische Prozesse entstehen aus freien Fettsäuren zahlreiche aromaaktive Lipoxidationsprodukte, welche dem Reis ein fades Fehl aroma verleihen.

Als mengenmäßig intensivster aromaaktiver Alterungsindikator gilt Hexanal.⁶³⁻⁶⁵ In einer dreimonatigen Lagerstudie von verschiedenen stark verarbeiteten Reis- bzw. Reismehlproben beobachteten Widjaja et al. den Anstieg einer Vielzahl verschiedener Lipoxidationsprodukte. Unter diesen waren vorrangig Aldehyde, wie z.B. die aromaaktiven Verbindungen (*E*)-2-Nonenal und (*E,E*)-2,4-Decadienal.⁶⁴ Der Verarbeitungsgrad des Reises spielte dabei eine entscheidende Rolle. So wurde ein verstärkter Lipidabbauprozess bei der Lagerung als Weißreis im Vergleich zu unbehandeltem Rohreis und Braunreis beobachtet. Eine Lagerung im Vakuum führte zur Vermeidung von Oxidationsprozessen, sodass sich die Reisproben kaum veränderten.⁶⁴ Folglich können, durch die Variation der Lagerbedingungen und des Grades der Reisverarbeitung, die Veränderungen des Aromas während der Lagerung beeinflusst werden.

Das Alter des Reismehls kann zudem Einfluss auf Aromastoffvorstufen haben. Da die Konzentration freier Aminosäuren im gelagerten Reismehl als Folge des Proteinabbaus ansteigen,⁶² ist zu erwarten, dass der Hefe eine größere Menge an Nährstoffen zur Bildung aromaaktiver Metaboliten zur Verfügung steht als in Teigen bzw. Broten aus frischem Reismehl

1.7.4 Entstehung des Reisaromastoffs 2-Aminoacetophenon

Als intermediär häufig vorkommender Aromastoff wurde 2-Aminoacetophenon (2-AAP) in 12 von 227 verschiedenen Lebensmitteln identifiziert.²⁴ Neben dem Vorkommen in Reis wurde der Geruchsstoff unter anderem in Shrimps, Maisprodukten, Bier und Wein gefunden.^{66–69} Die Beschreibung der Geruchsqualität variiert zwischen den Studien. Zumeist wurde die Verbindung mit phenolisch-medizinischen sowie blumigen Noten assoziiert oder mit der Geruchsnote „foxy“ beschrieben.^{60,66,68,70}

In Wein wird 2-AAP mit einem Fehl aroma, der sogenannten „untypischen Alterungsnote“ (UTA) in Verbindung gebracht, weshalb umfangreiche Untersuchungen zum Bildungsmechanismus dieser Verbindung durchgeführt wurden.^{69,71–73} Als mögliche Vorstufen wurden die beiden Tryptophanmetaboliten, Kynurenin und Indol-3-essigsäure (IAA) diskutiert, wobei der Kynurenin-Weg, ein Metabolismus tierischer Organismen, als weniger wahrscheinlich gilt.⁷¹ IAA ist ein wachstumssteuerndes Pflanzenhormon, welches durch enzymatische Prozesse in Samen und Pflanzen aus Tryptophan gebildet wird.⁷⁴ In Untersuchungen des Hefemetabolismus wurde darüber hinaus die Fähigkeit von *Saccharomyces* Arten beobachtet, IAA durch Deaminierung von Tryptophan über Indol-3-pyruvat und Indol-3-acetaldehyd zu bilden.⁷⁵ Ciolfi et al. postulierten eine verstärkte Bildung von 2-AAP während des Hefemetabolismus bei Nährstoffmangel,⁷⁶ wobei die Untersuchungen auf synthetischen Nährmedien mit Tryptophanzusatz durchgeführt wurden. Durch die Synthese vermuteter Aufgangsstoffe und Intermediate der Bildungsreaktion von 2-AAP leiteten Hoenicke et al. den in Abbildung 6 dargestellten Reaktionsmechanismus, anhand der Durchführung von Fermentation und Schwefelung von Modellsystemen und Wein, ab.⁷³ Es handelt sich um eine oxidative Abbaureaktion von IAA durch Superoxidradikale, welche am nukleophilen Kohlenstoffatom angreifen. Das durch die Pyrrolringsspaltung entstehende Intermediat 3-(2-Formylaminophenyl)-3-oxopropansäure decarboxyliert anschließend spontan. Als letzter Schritt wird 2-Formamidoacetophenon zu 2-AAP hydrolysiert. Modelluntersuchungen konnten die Schwefelung als verantwortlichen Prozessierungsschritt des oxidativen Abbaus der IAA definieren.^{71,73}

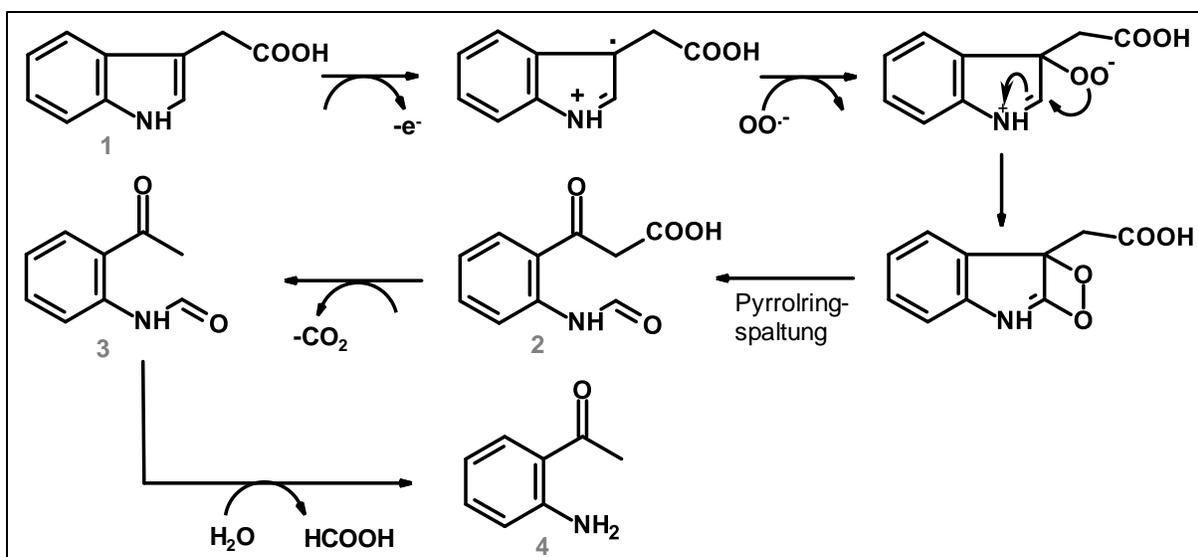


Abbildung 6 Vermuteter Bildungsweg von 2-Aminoacetophenon (4) aus Indol-3-essigsäure (1) in Wein (2: 3-(2-Formylaminophenyl)-3-oxopropansäure; 3: 2-Formamidoacetophenon) nach Hoenicke et al.⁷³

Generell handelt es sich bei dieser Reaktion jedoch um einen sehr langsamen Prozess, sodass bei Lagerstudien nur ein Umsatz von 0,9 mol% bestimmt wurde.⁷³ Eine Korrelation zwischen den IAA-Gehalten der Trauben und den 2-AAP-Gehalten im Wein konnte nicht bestätigt werden, sodass verschiedene Einflussfaktoren auf den Reaktionsmechanismus diskutiert wurden. Die Tatsache, dass die untypische Alterungsnote vorrangig in Weißweinen auftritt, wurde den im Rotwein enthaltenen Radikalfängern (u.a. Tannine, Procyanidine) zugeschrieben.^{71,72}

Über mögliche Bildungsmechanismen von 2-AAP in Reis sind bisher keine Informationen verfügbar. Kato et al. beschrieben das Vorkommen des Vorläufers Indol-3-essigsäure in Reisspelzen, sowie deren inhibierende Eigenschaften der Keimung.^{74,77} Aufgrund eines Vermahlungsprozesses sowie durch den intensiven Kontakt mit Wasser, wurde die Bildung verschiedener Oxidationsprodukte beobachtet. Der Reaktionsmechanismus wurde einer enzymatischen Reaktion zugeschrieben. Ein Abbauprodukt der IAA war 2-Formamidoacetophenon, der direkte Vorläufer des 2-AAPs. Folglich ist ein dem in Abbildung 6 aufgeführten Mechanismus ähnlicher Bildungsweg von 2-AAP in Reis naheliegend.

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Im Vergleich zu Weizenbrot weist glutenfreies Reisbrot ein schlechteres Aroma auf und wird daher vom Konsumenten weniger akzeptiert. Um den Ursachen auf den Grund zu gehen, bedarf es systematischer Untersuchungen des Reisbrotaromas, die im Rahmen dieser Arbeit auf sensorischer und molekularer Basis durchgeführt werden sollten. Dabei diene Weizenbrot bei allen Untersuchungen als Referenz für eine hohe Aromaqualität, sodass zunächst Unterschiede, bzw. Abweichungen des Reisbrotaromas vom Weizenbrotaroma ermittelt und nachfolgend mögliche Ursachen abgeleitet werden konnten. Eine Differenzierung zwischen den beiden Brotbestandteilen, Brotkrume und Brotkruste, war aufgrund herstellungsbedingter Unterschiede unbedingt notwendig. Während das Aroma der Brotkrume vorrangig durch die Rohstoffe, die Teigbereitung und die Teigfermentation geprägt wird, finden in der Brotkruste eine Vielzahl thermischer Reaktionen zur Ausbildung geruchsaktiver Verbindungen statt.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von Reis- und Weizenbrot durch die Erstellung sensorischer Aromaprofile, einhergehend mit der Anwendung eines Sensomics-Ansatzes zur Identifizierung wichtiger Schlüsselaromastoffe. Beginnend mit einem Screening mittels AEVA wurde eine Vorauswahl wichtiger aromaaktiver Verbindungen getroffen. Identifizierungsexperimente erfolgten durch den Vergleich olfaktorischer, gaschromatographischer und massenspektrometrischer Eigenschaften mit Referenzaromastoffen. Unter Anwendung der SIVA sollten wichtige Aromastoffe quantifiziert und deren Aromarelevanz durch Berechnung der Aromawerte eingeschätzt werden. Dies machte die Bestimmung von Geruchsschwellen der jeweiligen Aromastoffe in der Matrix Stärke, dem Hauptbestandteil des Lebensmittels Brot, notwendig. Anhand der erhobenen Daten sollten die Unterschiede zwischen dem Aroma von Reis- und Weizenbrot herausgearbeitet werden.

Der zweite Teil der Forschungsarbeit thematisierte die Untersuchungen zur Bildung der Schlüsselaromastoffe von Reisbrot. Diese beinhalteten die Analyse des Reismehles mit dem Sensomics Ansatz sowie die Bestimmung wichtiger Aromavorstufen in den Rohstoffen Mehl und Hefe. Als solche galten die freien Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Phenylalanin, aus denen während der Fermentation durch den Ehrlich-Abbau

aromaaktive Metaboliten entstehen. Schließlich sollte der Bildungsmechanismus des Reisaromastoffes 2-Aminoacetophenon genauer beleuchtet werden, indem die Vorläuferverbindungen quantifiziert und Modellversuche mit Zusatz der Vorläufer bei der Brotherstellung durchgeführt werden. Der Einfluss der Mehllagerung auf das Aroma des Reisbrottes sollte durch die Untersuchung einer zweiten, gelagerten Mehllagerung aufgeklärt werden.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Allgemeine Charakterisierung von Weizen- und Reisbrot

3.1.1 Brotvolumen, Krumentextur und optische Einschätzung

Die Backqualität des Weizen- und Reisbrotes wurde durch die in Kapitel 4.4 beschriebene Bestimmung des Brotvolumens sowie der Krumentextur zu definierten Zeitpunkten nach dem Backen (2, 4 und 24 h) bewertet (Abbildung 7). Die Volumina der beiden Brotsorten unterschieden sich trotz des fehlenden Glutennetzwerkes im Reisbrot kaum voneinander. Die Ursache dafür lag bei der kurzen Fermentationszeit von nur 40 min, welche aufgrund der Vergleichbarkeit der Herstellungsprozesse für beide Brotsorten gewählt wurde. Eine längere Fermentationszeit hätte zwar zu einem weiteren Anstieg des Weizenbrotvolumens geführt, jedoch wäre der Reisbrotteig aufgrund seines schlechten Gashaltevermögens bei längeren Gärzeiten kollabiert.²²

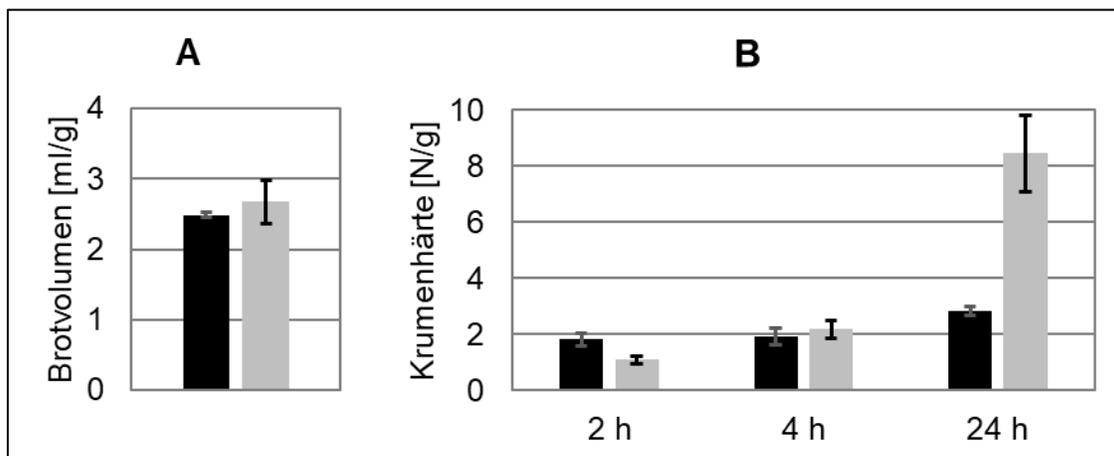


Abbildung 7 Brotvolumen (A) und Krumentextur (B) von Weizenbrot (schwarz) und Reisbrot (hellgrau), hergestellt aus der frischen Mehcharge R1

Auch die Krumentexturen der frisch gebackenen Brote unterschieden sich kaum voneinander. Bei der ersten Messung 2 h nach dem Backen war die Reisbrotkrume geringfügig weicher als die des Weizenbrotes. Jedoch wurde, in Übereinstimmung mit anderen Studien, ein schnellerer Anstieg der Krumentextur des Reisbrotes verglichen

mit dem Weizenbrot beobachtet.^{17,18,78,79} Dieses Phänomen war auf das fehlende Glutennetzwerk im Reisbrot zurückzuführen. Sciarini et al. beschrieben eine durch das Gluten-Netzwerk verlangsamte Wassermobilität, welche einen relevanten Parameter der Brotalterung bzw. Krumenhärtung darstellt.¹⁷ Auch der höhere Stärkeanteil im Reisbrot ist als Ursache für die beschleunigte Brotalterung durch Retrogradation in Betracht zu ziehen. Hager et al. diskutierten zudem den geringen Lipidgehalt im Reismehl als mögliche Ursache für den schnellen Anstieg der Krumenhärte während der Brotlagerung.⁷⁹ Eine Verlangsamung der Brotalterung bzw. der Krumenverfestigung während der Lagerung wird vor allem mit polaren Glycolipiden in Verbindung gebracht, die in Weizenmehl in höherer Konzentration vorliegen als im Reismehl.^{80,81} Dies hängt möglicherweise mit einer Inhibierung der Stärkekristallisation und der Retrogradation zusammen, aber auch Interaktionen mit Proteinen wurden diskutiert.

Optisch unterschieden sich Weizen- und Reisbrot vor allem bei der Betrachtung der Brotkrusten sehr stark voneinander (Abbildung 8). Die Weizenbrotkruste war gleichmäßig und stark gebräunt, die des Reisbrotes hingegen hell und rissig. Als Ursache wurden geringe Gehalte an reduzierenden Zuckern und freien Aminosäuren in Reismehl angenommen, die sowohl für Bräunungsreaktionen wie auch für die Bildung von Aromastoffen erforderlich waren. Ebenso variierte die Farbe der Brotkrumen des Weizen- und des Reisbrotes, entsprechend der Farbunterschiede der Mehle. Die helle Farbe des Reismehls zeugte von einem geringeren Gehalt an Carotinoiden (v.a. β -Carotin und Lutein) im Vergleich zu anderen Getreiden.⁸² Die Pigmente der Reiskörner sind in der äußeren Hülle lokalisiert, sodass sie durch den Schäl- und Mahlprozess größtenteils entfernt werden,^{82,83} wohingegen im Weizenmehl, abhängig vom Ausmahlungsgrad, höhere Mengen der Pigmente im Mehl verbleiben.

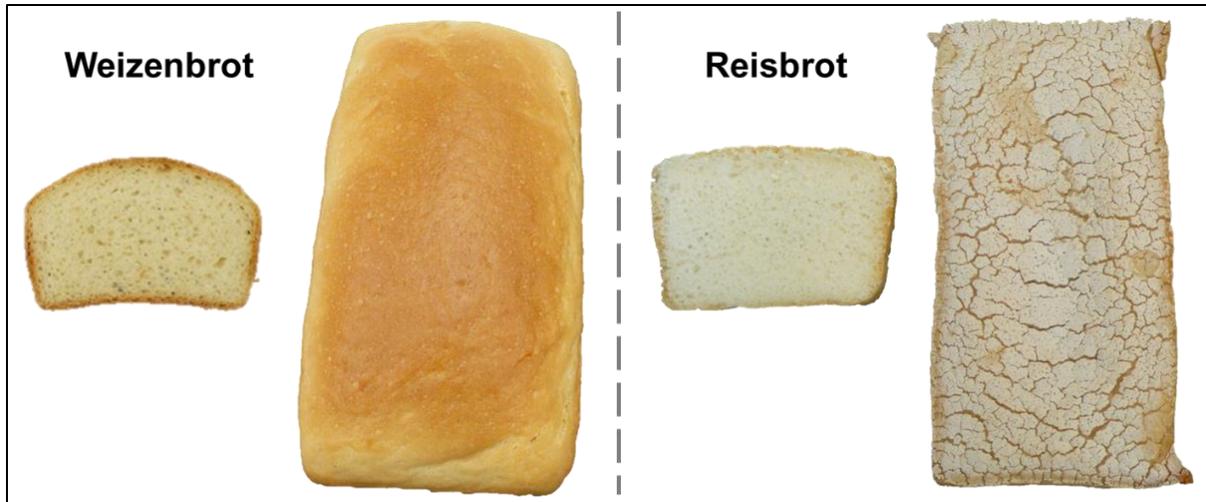


Abbildung 8 Brotkrumen und Brotkrusten von Weizen- und Reisbrot im optischen Vergleich

3.1.2 Aromaprofilanalysen

Sensorisch wahrnehmbare Unterschiede zwischen Weizen- und Reisbrot wurden mittels sensorischer Aromaprofile visualisiert, die durch ein geschultes Panel von 17 Personen nach Kapitel 4.5.2 erstellt wurden (Abbildung 9). Die Weizenbrotkrume zeichnete sich vor allem durch ihren malzigen und hefigen Charakter aus. In den meisten Geruchsqualitäten stimmten die Bewertungen mit denen der Reisbrotkrume überein. Letztere besaß jedoch eine intensive, an Reis erinnernde Geruchsnote und wurde schwächer in den Geruchsqualitäten „röstig, Popcorn“ und „Karamell“ bewertet. Eine hohe Übereinstimmung zwischen den Aromaprofilen der Reis- und Weizenbrotkrume wurde bereits von Hager et al. dargelegt,¹⁸ welche aber eine größere Abweichung in der Geruchsqualität „hefig“ beobachteten als in dieser Studie verzeichnet wurde.

Die Weizenbrotkruste wurde durch intensive röstig/popcornartige, karamellartige und malzige Noten dominiert. Diese Geruchseindrücke waren bei der Reisbrotkruste nur in geringem Maße wahrnehmbar. Hingegen wurden die Geruchsqualitäten „nach Reis“ und „fettig“ stärker in der Reis- als in der Weizenbrotkruste empfunden. Zehentbauer und Grosch beschrieben bereits die Attribute röstig und malzig als wichtigste Geruchsqualitäten der Weizen-Baguettekruste.⁵² Daten zum Aromaprofil der Reisbrotkruste sind bisher nicht verfügbar.

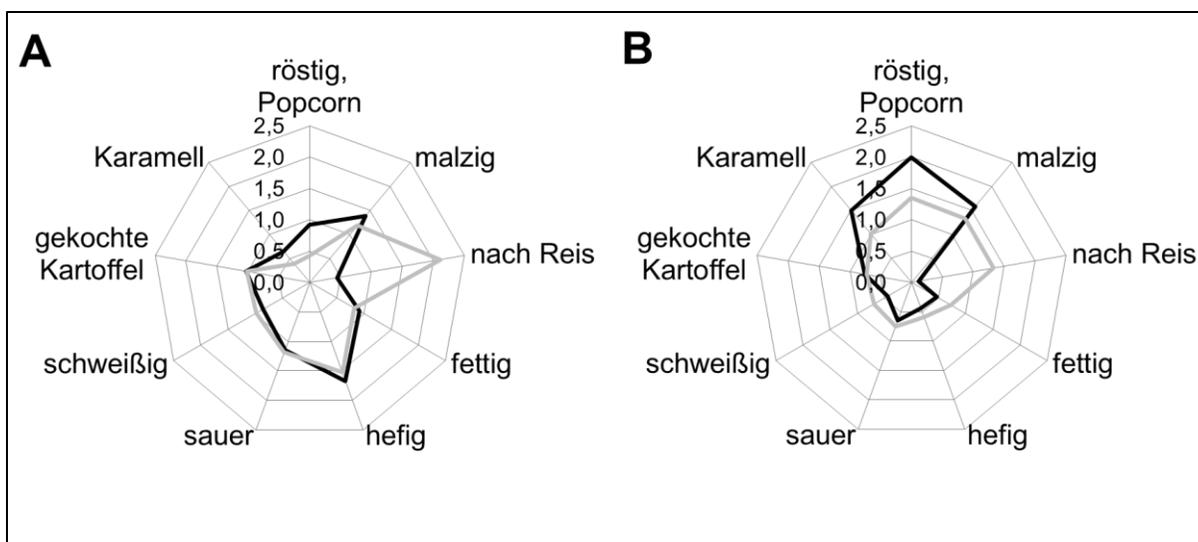


Abbildung 9 Sensorische Aromaprofile der Brotkrumen (A) und Brotkrusten (B) von Weizenbrot (schwarz) und Reisbrot (hellgrau), hergestellt aus der frischen Reismehlcharge R1

3.2 Aromastoffe in Weizen- und Reisbrot

3.2.1 Identifizierung relevanter Aromastoffe

Die AEVA diente als Screeningmethode zur Identifizierung relevanter Aromastoffe in den Krumen und Krusten von Weizenbrot und dem Reisbrot der frischen Mehlcharge R1 (siehe Kapitel 4.6.). Mittels AEVA wurden in den Brotproben 35 - 43 verschiedene aromaaktive Verbindungen detektiert und nach den in Kapitel 4.6.3 genannten Vorgaben identifiziert.

Die Ergebnisse der Weizenbrotkrume und -kruste (Tabelle 2) stimmten sehr gut mit den verfügbaren Literaturdaten überein (siehe Kapitel 1.6). In beiden wurden die höchsten FD-Faktoren von den Aromastoffen **34** (blumig, Honig), **48** (würzig) und **53** (Honig, Bienenwachs) ($FD \geq 512$), **12** (gekochte Kartoffel), **32** (grün, fettig), **39** (metallisch), **47** (rauchig, Nelke) und **54** (Vanille, $FD \geq 256$) sowie **27** (schweißig, $FD \geq 128$) erreicht. Die Weizenbrotkruste grenzte sich von der Krume durch höhere FD-Faktoren der, hitzebedingt gebildeten, Aromastoffe 2-Acetyl-1-pyrrolin (**7**, röstig, Popcorn), Maltol (**38**, Karamell) und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (**41**, Karamell, $FD \geq 128$) ab. Mit geringen FD-Faktoren (≥ 8) wurden auch die *Maillard*-Produkte **17** und **22** in der

Ergebnisse und Diskussion

Weizenbrotkruste detektiert. Diese waren in der Weizenbrotkrume unbedeutend (FD <1).

Tabelle 2 Ergebnisse der AEVA der Weizenbrotkrume und –kruste. Identifizierte Aromastoffe, olfaktorische und gaschromatographische Daten

Nr. Aromastoff ^a	Geruchsqualität ^b	RI ^c		FD-Faktor ^d	
		FFAP	DB5	Krume	Kruste
1 Diacetyl	Butter	991	605	32	64
2 Hexanal	grün, grasig	1084	810	4	4
3 2- und 3-Methyl-1-butanol	malzig	1204	732	16	16
4 (Z)-4-Heptenal ^e	fischig	1240	894	8	8
5 Acetoin	Butter, Karotte	1284	711	32	8
6 1-Octen-3-on	pilzig	1298	973	16	16
7 2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig, Popcorn	1326	916	64	512
8 (Z)-1,5-Octadien-3-on ^e	metallisch, Geranie	1372	976	4	<1
9 2,3,5-Trimethylpyrazin	erdig	1398	1000	4	<1
10 (E)-2-Octenal	grün, fettig	1425	1055	1	<1
11 Essigsäure	sauer	1445	611	8	64
12 Methional	gekochte Kartoffel	1455	898	256	256
13 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	erdig, röstig	1484	1153	8	16
15 (Z)-2-Nonenal	grün, fettig	1500	1143	16	8
16 (E)-2-Nonenal	grün, fettig	1529	1157	64	8
17 6-Acetyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin ^e	röstig, Popcorn	1549	1049	<1	8
19 Methylpropansäure	sauer, käsig	1562	800	4	8
21 (E,Z)-2,6-Nonadienal ^e	Gurke	1581	1153	4	8
22 2-Acetylpyridin	röstig, Popcorn	1605	1031	<1	32
23 Buttersäure	schweißig	1627	825	8	8
24 Phenylacetaldehyd	Honig	1644	1039	4	16
25 (E,Z)-2,4-Nonadienal	grün	1656	1191	4	<1
26 (Z)-2-Butyl-2-octenal	Zitrus, seifig, grün	1663	1374	8	8
27 2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig	1666	873	256	128
28 (E,E)-2,4-Nonadienal	Gurke	1695	1214	16	32
30 (E,Z)-2,4-Decadienal	grün, fettig	1755	1298	4	4
31 2-Acetyl-2-thiazolin	röstig, Popcorn	1758	1100	4	16
32 (E,E)-2,4-Decadienal	grün, fettig	1811	1319	256	256

Ergebnisse und Diskussion

33	Hexansäure	sauer, stechend	1843	1004	8	<1
34	2-Phenylethanol	blumig, Honig	1920	1109	512	512
38	Maltol	Karamell	1986	1113	<1	512
39	tr-4,5-Epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	metallisch	2003	1378	256	256
40	γ -Nonalacton	Kokos	2032	1360	64	16
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	Karamell	2041	1065	64	4096
43	4-Hydroxy-2-nonensäurelacton	Kokos	2076	1345	4	<1
46	γ -Decalacton	Kokos	2148	1470	2	8
47	2-Methoxy-4-vinylphenol	rauchig, Nelke	2209	1311	256	512
48	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon ^e	würzig	2213	1106	512	1024
49	2-Aminoacetophenon	foxy	2223	1302	8	4
50	4-Vinylphenol	phenolisch	2395	1215	16	<1
51	Indol	fäkalisch	2452	1291	1	<1
52	3-Methylindol	fäkalisch	2507	1385	4	<1
53	Phenylelessigsäure	Honig, Bienenwachs	2568	1267	512	1024
54	Vanillin	Vanille	2586	1398	256	512

^a Aromastoffe wurden nach den Kriterien aus 4.6.3 identifiziert; ^b wahrgenommen am Sniffing Port; ^c Retentionsindex auf den genannten GC-Säulenmaterialien; ^d Flavor Dilution Faktor (Verdünnungsfaktor), mittels AEVA auf der FFAP-Säule bestimmt; ^e Das MS-Signal war zu schwach für eine sichere Identifizierung, die Verbindung wurde mit den übrigen, in Fußnote a angegebenen Kriterien identifiziert; ^f keine Referenzverbindung verfügbar, die Verbindung wurde durch den Abgleich mit Literaturdaten identifiziert⁸⁴

In der Krume und der Kruste des Reisbrottes wurden die höchsten FD-Faktoren von den Aromastoffen **32** (grün, fettig), **34** (blumig, Honig), **48** (würzig), **49** (foxy) und **54** (Vanille, $FD \geq 512$), **12** (gekochte Kartoffel), **27** (schweißig), **41** (Karamell), **50** (phenolisch) und **53** (Honig, Bienenwachs, $FD \geq 256$) sowie **39** (metallisch, $FD \geq 128$) erreicht (Tabelle 3). Darüber hinaus besaßen **6** (Pilz), **7** (röstig, Popcorn) und **40** (Kokos) vorrangig in der Reisbrotkruste relevante FD-Faktoren ($FD \geq 128$). Unter den in Tabelle 3 aufgeführten Verbindungen, wurden **37**, **43** (Kokos) und **45** (Minze) erstmals in Reis, bzw. darauf basierenden Produkten nachgewiesen. Zur Identifizierung dieser Verbindungen war die Anwendung des 2D-“Heart-Cut“-GCxGC-MS (Kapitel 4.10.5) notwendig.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3 Ergebnisse der AEVA der Reisbrotkrume und -kruste, hergestellt aus der frischen Reismehlcharge R1: olfaktorische und gaschromatographische Daten

Nr. Aromastoff ^a	Geruchsqualität ^b	RI ^c		FD-Faktor ^d	
		FFAP	DB5	Krume	Kruste
1 Diacetyl	Butter	991	605	8	64
2 Hexanal	grün, grasig	1084	810	1	8
3 2- und 3-Methyl-1-butanol	malzig	1204	732	64	64
4 (<i>Z</i>)-4-Heptenal ^e	fischig	1240	894	8	8
5 Acetoin	Butter, Karotte	1284	711	4	1
6 1-Octen-3-on	pilzig	1298	973	32	128
7 2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig, Popcorn	1326	916	64	128
8 (<i>Z</i>)-1,5-Octadien-3-on ^e	metallisch, Geranie	1372	976	4	64
10 (<i>E</i>)-2-Octenal	grün, fettig	1425	1055	<1	1
11 Essigsäure	sauer	1445	611	16	64
12 Methional	gekochte Kartoffel	1455	898	256	1024
13 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	erdig, röstig	1484	1153	4	8
15 (<i>Z</i>)-2-Nonenal	grün, fettig	1500	1143	8	8
16 (<i>E</i>)-2-Nonenal	grün, fettig	1529	1157	32	128
19 Methylpropansäure	sauer, käsig	1562	800	8	8
21 (<i>E,Z</i>)-2,6-Nonadienal ^e	Gurke	1581	1153	16	8
23 Buttersäure	schweißig	1627	825	8	8
24 Phenylacetaldehyd	Honig	1644	1039	32	4
26 (<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	Zitrus, seifig, grün	1663	1374	8	2
27 2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig	1666	873	256	256
28 (<i>E,E</i>)-2,4-Nonadienal	Gurke	1695	1214	32	64
30 (<i>E,Z</i>)-2,4-Decadienal	grün, fettig	1755	1298	<1	1
31 2-Acetyl-2-thiazolin	röstig, Popcorn	1758	1100	1	8
32 (<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	grün, fettig	1811	1319	512	1024
33 Hexansäure	sauer, stechend	1843	1004	1	1
34 2-Phenylethanol	blumig, Honig	1920	1109	1024	1024
35 γ -Octalacton	Kokos	1917	1251	2	<1
36 Heptansäure	sauer, stechend	1951	1102	<1	2
37 4-Hydroxy-2-octensäurelacton ^f	Kokos	1969	1243	1	<1
39 tr-4,5-Epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	metallisch	2003	1378	128	1024

Ergebnisse und Diskussion

40	γ -Nonalacton	Kokos	2032	1360	64	128
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	Karamell	2041	1065	256	2048
42	Octansäure	sauer, muffig	2056	1279	<1	1
43	4-Hydroxy-2-nonensäurelacton	Kokos	2076	1345	8	2
44	4-Methylphenol	phenolisch	2079	1076	8	8
45	4-Methylchinazolin	Minze	2091	1353	8	64
46	γ -Decalacton	Kokos	2148	1470	8	32
47	2-Methoxy-4-vinylphenol	rauchig, Nelke	2209	1311	64	64
48	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon ^e	würzig	2213	1106	1024	1024
49	2-Aminoacetophenon	foxy	2223	1302	512	1024
50	4-Vinylphenol	phenolisch	2395	1215	512	256
51	Indol	fäkalisch	2452	1291	4	8
52	3-Methylindol	fäkalisch	2507	1385	8	8
53	Phenylelessigsäure	Honig, Bienenwachs	2568	1267	256	256
54	Vanillin	Vanille	2586	1398	1024	1024

^{a-f} siehe Tabelle 2

Das ungesättigte Lacton 4-Hydroxy-2-octensäurelacton (**37**) konnte anhand des in der Literatur verfügbaren EI-Massenspektrums identifiziert werden.⁸⁴ Ein Vorkommen dieser Verbindung in Lebensmitteln war bisher jedoch nicht bekannt. Das strukturell ähnliche 4-Hydroxy-2-nonensäurelacton (**43**) und 4-Methylchinazolin (**45**) wurden durch Vergleich mit den verfügbaren Referenzsubstanzen eindeutig identifiziert. In einer Studie von Guth wurde der Aromastoff **43** bereits in Hafer detektiert und es wurde ein Konzentrationsanstieg im Hafermehl durch die Extrusion beschrieben.⁸⁵ Die Entstehung dieses Aromastoffs beruht auf dem thermischen Abbau von Linolsäure und wird mit der Ausbildung eines angenehmen Frittiergeschmacks in Zusammenhang gebracht.⁷ Daten zum Vorkommen von **45** in Lebensmitteln waren kaum verfügbar. Es wurde als Aromastoff in Champignons detektiert,⁸⁶ und es existieren mehrere Studien zur Bildung dieser Verbindung durch den Abbau des Tryptophan-Metaboliten Indol-3-essigsäure durch *Pseudomonas aeruginosa*,^{87,88} welche auch zur Bildung von 2-Aminoacetophenon

(49) fähig sind. Der höhere FD-Faktor von **45** in der Reisbrotkruste im Vergleich zur Krume deutete zudem auf einen hitzeabhängigen Bildungsweg hin.

Der Vergleich der AEVA-Daten von Weizenbrot (Tabelle 2) und Reisbrot (Tabelle 3) ergab eine teilweise Übereinstimmung der identifizierten Aromastoffe und ihrer Intensitäten. In beiden Brotkrumen erreichten **12, 27, 32, 34, 39, 48, 53** und **54** ähnliche FD-Faktoren mit hoher Relevanz ($FD \geq 128$). Jedoch wurden signifikant höhere FD-Faktoren der Verbindungen 2-Aminoacetophenon (**49**) und 4-Vinylphenol (**50**) in der Reisbrotkrume verglichen mit der Weizenbrotkrume erreicht. Beide Substanzen wurden bereits als wichtige Aromakomponenten in verschiedenen Reissorten identifiziert.⁶⁰ Insbesondere **49** wurde bereits von Jezussek durch Aromarekombinate und Omissionsversuche als signifikant wichtiger Aromastoff für das Aroma von gekochten Reis beschrieben.⁶¹

Somit standen die Ergebnisse der AEVA der Brotkrumen in guter Übereinstimmung mit den Daten der sensorischen Aromaprofile (Abbildung 9, A). Die übereinstimmenden Bewertungen der meisten Geruchsqualitäten kann mit den vergleichbaren FD-Faktoren der im vorherigen Absatz genannten Aromastoffe begründet werden. Die starke an Reis erinnernde Geruchsnote der Reisbrotkrume hingegen könnte von den Verbindungen **49** und **50** sowie weiteren Aromastoffen ausgelöst worden sein, da diese in der AEVA der Weizenbrotkrume nur mit geringen Intensitäten wahrgenommen wurden. Möglicherweise überlagerten diese Aromastoffe darüber hinaus die Geruchsnoten „malzig“ und „röstig, popcornartig“, welche im Weizenbrot stärker hervorkamen. Um genauere Aussagen diesbezüglich treffen zu können, waren Quantifizierungsexperimente notwendig, welche im nachfolgenden Kapitel vorgestellt wurden.

Auch die Brotkrusten stimmten in gewissem Maße in den Intensitäten der relevanten Aromastoffe ($FD \geq 128$) überein, darunter **12, 27, 32, 34, 39, 41, 48, 53** und **54** (Tabellen 2 und 3). Sie variierten jedoch stärker als die Brotkrumen. So waren es vor allem *Maillard*-Produkte, an welchen es der Reisbrotkruste, im Vergleich zur Weizenbrotkruste, mangelte. Hervorzuheben war hier der Aromastoff Maltol (**38**), welcher in der Weizenbrotkruste einen FD-Faktor von 512 erreichte, hingegen in der

Reisbrotkruste mittels AEVA nicht detektiert wurde, aber auch die Aromastoffe **7**, **17** und **22**. Die Unterschiede in den Intensitäten der *Maillard*-Produkte zwischen den Brotkrusten stand in Zusammenhang mit der Krustenbräunung (siehe Abbildung 8) und deutete auf eine sehr geringe Verfügbarkeit an freien Aminosäuren und/oder reduzierenden Zuckern, den Ausgangsstoffen der *Maillard*-Reaktion, im Reismehl hin. Weiterhin erreichte 2-Methoxy-4-vinylphenol (**47**) einen signifikant höheren FD-Faktor in der Weizenbrotkruste. Die Aromastoffe 1-Octen-3-on (**6**) (*E*)-2-Nonenal (**16**), 4-Methylchinazolin (**45**), 2-Aminoacetophenon (**49**) und 4-Vinylphenol (**50**) waren hingegen signifikant intensiver in der Reisbrotkruste (FD \geq 128; \geq 3 Verdünnungsstufen Abweichung) vertreten.

Die Unterschiede in den aromaaktiven Verbindungen der beiden Brotkrusten spiegelten sich sehr gut in den sensorischen Aromaprofilen (Abbildung 9, B) wider. Die in der Weizenbrotkruste stärker wahrnehmbaren karamellartigen, röstigen, popcornartigen und malzigen Geruchsnoten stimmten mit den höheren FD-Faktoren der *Maillard*-Produkte verglichen mit der Reisbrotkruste, überein. Wie die Krume erinnerte die Reisbrotkruste stark an Reis und hatte eine starke fettige Note, welche mit signifikant höheren FD-Faktoren von **6**, **16**, **45**, **49** und **50** in Verbindung gebracht werden konnte. Die vergleichbar bewerteten Geruchsnoten gekochte Kartoffel, sauer, schweißig und hefig könnten mit den übereinstimmenden Intensitäten der Aromastoffe **12**, **16**, **27**, **34**, **53** und **54** in beiden Brotkrusten, welche die entsprechenden Geruchsnoten vorwiesen, zusammenhängen.

Um genauere Aussagen zum Einfluss der relevanten Aromastoffe auf das Gesamtaroma der Weizen- und Reisbrotproben treffen zu können, waren quantitative Daten und die Bestimmung von Aromawerten notwendig. Diese wurden im nachfolgenden Kapitel aufgeführt und diskutiert.

3.2.2 Quantitative Untersuchungen und Bestimmung von Aromawerten

3.2.2.1 Weizenbrot

Anhand der Ergebnisse der AEVA wurden 18 Aromastoffe ausgewählt und mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) nach Kapitel 4.6.4. quantifiziert. Die ausgewählten Verbindungen deuteten entweder aufgrund hoher FD-Faktoren in mindestens einer Probe eine hohe Relevanz an oder ein deutlicher Unterschied zwischen den Brotproben wurde vermutet.

In der Weizenbrotkrume (Tabelle 4) wurde die höchste Konzentration für Essigsäure (ca. 100 mg/kg) ermittelt, gefolgt von den Hefemetaboliten 2-Phenylethanol und 3-Methyl-1-butanol (>1 mg/kg), 2- und 3-Methylbuttersäure sowie 2-Methyl-1-butanol (0,5-1 mg/kg). Darüber hinaus waren Vanillin und Phenylessigsäure sowie die Lipidabbauprodukte Hexanal und (*E,E*)-2,4-Decadienal mit Konzentrationen >100 µg/kg vertreten.

Die Weizenbrotkruste (Tabelle 4) beinhaltete alle untersuchten Aromastoffe in ähnlicher Größenordnung wie die Krume mit Ausnahme des an Karamell erinnernden *Maillard*-Reaktionsprodukts Maltol. Diese Verbindung überstieg in der Brotkruste mit 7472 µg/kg deutlich die Konzentration in der Krume (45 µg/kg) und galt folglich als mengenmäßig wichtigster Aromastoff zur Charakterisierung der Weizenbrotkruste. Zudem überstiegen die Gehalte der Essigsäure und des 2-Methoxy-4-vinylphenols, deren Bildung unter anderem während des Backprozesses durch hitzebedingte Reaktionen erfolgte,^{49,89} in der Brotkruste deutlich die Gehalte in der Brotkrume. Auch die Konzentration des Lipidabbauproduktes (*E*)-2-Nonenal war, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Lipidabbauprodukten (Hexanal und (*E,E*)-2,4-Decadienal), in der Brotkrume merklich geringer.

Tabelle 4 Konzentrationen ausgewählter Aromastoffe in Weizenbrotkrume und -kruste

Aromastoff	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] ^a	
	Brotkrume	Brotkruste
Essigsäure ^b	97863	154199
2-Phenylethanol	2715	1712
3-Methyl-1-butanol	2711	1509
2-Methylbuttersäure	1016	638
3-Methylbuttersäure	900	622
2-Methyl-1-butanol	899	553
Vanillin	336	167
Phenylelessigsäure	330	302
Hexanal	111	132
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	102	33
γ -Nonalacton	96	72
2-Methoxy-4-vinylphenol	74	113
Maltol	45	7472
(<i>E</i>)-2-Nonenal	19	32
4-Vinylphenol	15	18
2-Aminoacetophenon	1,3	n.d. ^c
1-Octen-3-on	0,90	0,99
(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	n.d. ^c	n.d. ^c

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen; relative Standardabweichungen <20 %; ^b Enzymatische Bestimmung nach 4.6.5; ^c Nicht detektierbar

Die oben genannten Hefemetaboliten kamen in der Brotkruste in geringeren Mengen vor, sodass sie eher als charakteristisch für die Brotkrume galten. Dies hing mit der höheren Temperatur in der Brotkruste während des Backens zusammen, wodurch die Hefe schneller abstarb und somit der Hefemetabolismus schneller unterbunden wurde. Auch spielte die Flüchtigkeit der Aromastoffe eine Rolle, sodass diese auf der großen Oberfläche der Brotkruste verstärkt verdampften.

Die Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Aromastoffe in der Weizenbrotkrume- und kruste stimmten gut mit den Ergebnissen der AEVA (Tabelle 2) überein. Um Vergleiche zwischen den Aromastoffen unter Berücksichtigung der Matrix anzustellen und die Bedeutung der Aromastoffe für das Gesamtaroma einschätzen zu können, wurden im nächsten Schritt die Aromawerte (AW) berechnet (siehe Kapitel 4.5.3). Die zur Berechnung verwendeten Geruchsschwellen der Aromastoffe wurden nach Kapitel 4.5.3 mit Hilfe eines Sensorikpanels bestimmt (Tabelle 32).

Unter den quantifizierten Verbindungen in Weizenbrot erreichten jeweils 12 Aromastoffe der Krume bzw. der Kruste relevante Aromawerte ($AW > 1$, Tabelle 5). Die höchsten AW besaßen die Leucin-Metaboliten 3-Methylbuttersäure und 3-Methyl-1-butanol, gefolgt von 2-Methoxy-4-vinylphenol, Phenyllessigsäure und 2-Methylbuttersäure (jeweils $AW > 10$). Die Rangordnung der Aromastoffe der Weizenbrotkrume und -kruste unterschied sich nur geringfügig, jedoch waren die Leucin-Metaboliten 3-Methylbuttersäure und 3-Methyl-1-butanol bedeutender für das Aroma der Krume, 2-Methoxy-4-vinylphenol dagegen wichtiger für das Krustenaroma. Darüber hinaus erreichte das *Maillard*-Produkt Maltol, trotz seiner hohen Geruchsschwelle, einen relevanten AW von 5 in der Weizenbrotkruste und war hingegen für das Aroma der Krume nachweislich unbedeutend.

Tabelle 5 Aromawerte der in der Weizenbrotkrume und -kruste quantifizierten Verbindungen

Aromastoff	Aromawert ^a	
	Brotkrume	Brotkruste
3-Methylbuttersäure	69	48
3-Methyl-1-butanol	35	19
2-Methoxy-4-vinylphenol	16	25
Phenylethansäure	14	13
2-Methylbuttersäure	13	8
2-Phenylethanol	6	4
1-Octen-3-on	4	4
Essigsäure	3	5
Hexanal	3	3
(<i>E</i>)-2-Nonenal	2	3
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	2	1
2-Methyl-1-butanol	1	<1
Vanillin	1	<1
Maltol	<1	5
2-Aminoacetophenon	<1	<1
γ -Nonalacton	<1	<1
4-Vinylphenol	<1	<1
(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	<1	<1

^a Bestimmt nach Kapitel 4.5.3 mit den in Tabelle 32 angegebenen Geruchsschwellen in Stärke

3.2.2.2 Reisbrot

Im Reisbrot erreichte ebenfalls Essigsäure die höchste Konzentration in Krume und Kruste (Tabelle 6), gefolgt von den im Hefemetabolismus gebildeten Alkoholen (3-Methyl-1-butanol, 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-butanol, jeweils >1 mg/kg) sowie den korrespondierenden Säuren (3-Methylbuttersäure, 2-Methylbuttersäure und Phenylelessigsäure, je >100 µg/kg).

Tabelle 6 Konzentrationen ausgewählter Aromastoffe in Reisbrotkrume und -kruste, hergestellt aus der frischen Reismehlcharge R1

Aromastoff	Konzentration ^a [µg/kg]	
	Brotkrume	Brotkruste
Essigsäure ^b	674319	856225
3-Methyl-1-butanol	5408	1717
2-Phenylethanol	3635	2071
2-Methyl-1-butanol	1019	344
3-Methylbuttersäure	779	838
2-Methylbuttersäure	677	669
Phenylelessigsäure	287	390
Vanillin	151	104
2-Methoxy-4-vinylphenol	73	70
4-Vinylphenol	43	51
γ-Nonalacton	40	30
(E,E)-2,4-Decadienal	17	4,0
2-Aminoacetophenon	17	17
Hexanal	15	31
Maltol	9,7	37
(E)-2-Nonenal	1,7	3,6
1-Octen-3-on	0,79	1,9
(Z)-2-Butyl-2-octenal	n.d. ^c	n.d. ^c

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, relative Standardabweichungen <20 %, ^b Enzymatische Bestimmung nach 4.6.5 ^c Nicht detektierbar

Dabei überstiegen die Konzentrationen der Alkohole in der Brotkrume deutlich die bestimmten Werte der Kruste. Die Säuren waren in identischen bzw. leicht geringeren Konzentrationen in der Krume vertreten. Unter den in geringeren Mengen vorkommenden Aromastoffen fielen vor allem Abweichungen der Lipidabbauprodukte zwischen der Krume und der Kruste auf. (*E,E*)-2,4-Decadienal war vorwiegend in der Krume vorhanden, Hexanal, (*E*)-2-Nonenal und 1-Octen-3-on waren allerdings stärker in der Reisbrotkruste vertreten.

Die oben aufgeführten Unterschiede zwischen den Aromastoffgehalten der Reisbrotkrume- und Kruste korrelierten gut mit den Ergebnissen der AEVA (Tabelle 3). Um Aussagen zur Relevanz der Aromastoffe auf das Gesamtaroma in der Brotmatrix treffen zu können, war jedoch die Berechnung der Aromawerte (Tabelle 7) notwendig.

Unter den quantifizierten Verbindungen erreichten in der Reisbrotkrume 10 Aromastoffe relevante Aromawerte ($AW > 1$), bzw. 9 in der Brotkruste. In beiden wiesen 3-Methyl-1-butanol, 3-Methylbuttersäure, Essigsäure, 2-Methoxy-4-vinylphenol und Phenylelessigsäure ($AW > 10$) die höchsten AW auf, wobei die Reihenfolge bei der Brotkruste etwas abwich. Entsprechend der Abweichungen der Konzentrationen zwischen den beiden Proben bestätigten die Aromawerte den höheren Einfluss der Alkohole 3-Methyl-1-butanol und 2-Phenylethanol auf die Reisbrotkrume und von Essigsäure, Phenylelessigsäure und 1-Octen-3-on auf das Aroma der Reisbrotkruste.

Tabelle 7 Aromawerte der in der Reisbrotkrume und -kruste quantifizierten Verbindungen

Aromastoff	Aromawert ^a	
	Brotkrume	Brotkruste
3-Methyl-1-butanol	69	22
3-Methylbuttersäure	60	64
Essigsäure	22	29
2-Methoxy-4-vinylphenol	16	15
Phenyllessigsäure	12	17
2-Methylbuttersäure	9	9
2-Phenylethanol	8	4
2-Aminoacetophenon	6	6
1-Octen-3-on	3	8
2-Methyl-1-butanol	1	<1
Hexanal	<1	<1
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	<1	<1
Vanillin	<1	<1
(<i>E</i>)-2-Nonenal	<1	<1
4-Vinylphenol	<1	<1
γ -Nonalacton	<1	<1
Maltol	<1	<1
(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	<1	<1

^a Bestimmt nach Kapitel 4.5.3 mit den in Tabelle 32 angegebenen Geruchsschwellen in Stärke

3.2.2.3 Vergleich zwischen Weizen- und Reisbrot

Die in den Kapiteln 3.2.2.1 und 3.2.2.2 erhobenen Daten ermöglichten den Vergleich zwischen den Weizen- und Reisbrotproben zur Identifizierung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden des Aromas. Bei Betrachtung der Aromastoffkonzentrationen konnten größere Abweichungen zwischen den Brotsorten festgestellt werden, als zwischen den jeweiligen Brotkrumen- und Krusten vorlagen.

Die auffälligsten Abweichungen des Reisbrotes vom Weizenbrot (Krumme und Kruste) lagen in signifikant höheren Gehalten an 2-Aminoacetophenon, Essigsäure (>400 % bezogen auf die Konzentrationen in den korrespondierenden Proben des Weizenbrotes) und 4-Vinylphenol (>200 %), aber auch signifikant niedrigeren Gehalten der Lipidabbauprodukte (*E*-2-Nonenal, Hexanal und (*E,E*)-2,4-Decadienal sowie Maltol (<25 %), Vanillin und γ -Nonalacton (<50 %) (Tabellen 4 und 6).

Darüber hinaus enthielt die Reisbrotkrume höhere Mengen der im Hefemetabolismus gebildeten Alkohole, insbesondere 3-Methyl-1-butanol, jedoch niedrigere Gehalte an 2- und 3-Methylbuttersäure als die Weizenbrotkrume. Bei den Brotkrusten wurde ein teilweise gegenläufiger Trend festgestellt, jedoch in geringerem Ausmaß. Die Reisbrotkruste enthielt zudem höhere Mengen an 1-Octen-3-on und geringere Mengen an 2-Methoxy-4-vinylphenol als die Weizenbrotkruste.

Der Einfluss dieser Unterschiede auf das Gesamtaroma war durch den Vergleich der Aromawerte zwischen den beiden Brotkrumen (Abbildung 10, A) sowie den Brotkrusten (Abbildung 10, B) möglich. Dementsprechend konnte 2-Aminoacetophenon (foxy) als charakteristisch für Reisbrot angesehen werden, da es sowohl in dessen Brotkrume und -kruste einen AW >1 erreichte, jedoch keine Bedeutung für das Aroma von Weizenbrot hat. 2-Aminoacetophenon wurde bereits als Schlüsselaromastoff in verschiedenen Reissorten, insbesondere nach dem Kochen, mit Konzentrationen von 0,8-1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (bis zu 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Trockensubstanz) beschrieben.⁶¹ Die in den Reisbrotproben bestimmten Konzentrationen übertrafen diese etwa um das zehnfache, sodass aufgrund der niedrigen Geruchsschwelle von 2-Aminoacetophenon (2,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in Stärke, bzw. 0,27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in Wasser,³³) eine erhebliche Steigerung der Aromaaktivität zu verzeichnen war. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Bedingungen während der

Brotherstellung die Bildung von 2-Aminoacetophenon begünstigen. Detaillierte Untersuchungen dieses Sachverhalts erfolgen in Kapitel 3.3.3.

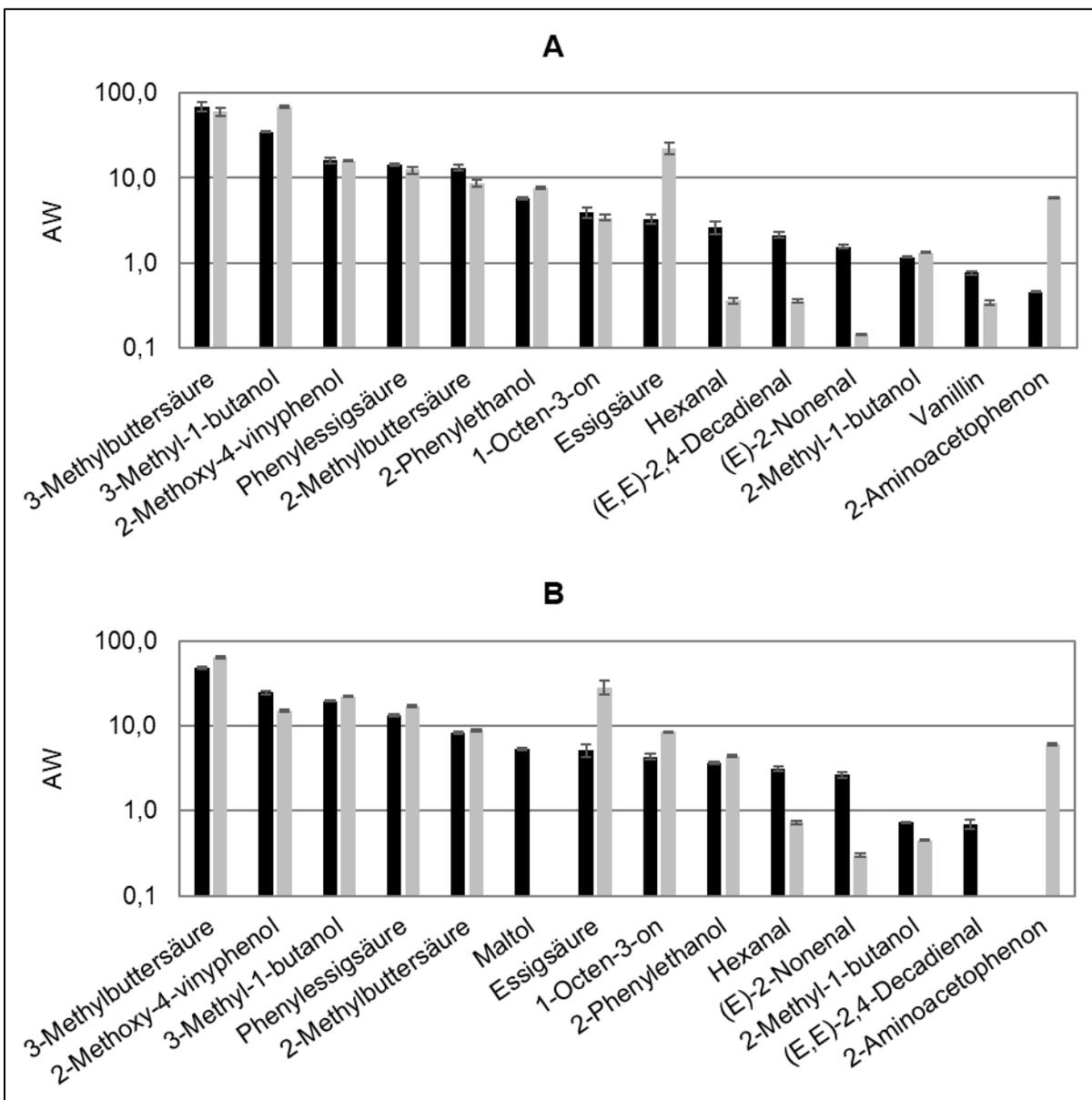


Abbildung 10 Gegenüberstellung der Aromawerte relevanter Aromastoffe der Krumen (A) und Krusten (B) von Weizen- (schwarz) und Reisbrot (hellgrau), logarithmische Aromawert-Skala, Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

Sowohl in der Reisbrotkrume als auch der Kruste wurden deutlich höhere AW der Essigsäure verglichen mit Weizenbrot festgestellt. Hingegen führten die geringeren Konzentrationen der Lipidabbauprodukte in den Reisbrotproben dazu, dass diese

Verbindungen keinen Einfluss auf deren Gesamtaroma besaßen (AW <1), diese jedoch relevante AW >1 in den Weizenbrotproben erreichten. Die Unterschiede der Konzentrationen von Vanillin und γ -Nonalacton zwischen den Proben hatten allerdings keinen Einfluss auf deren AW.

Die Reisbrotkrume unterschied sich von der Weizenbrotkrume durch höhere AW von 3-Methyl-1-butanol sowie geringfügig höhere AW von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-butanol (Abbildung 10, A). Die organischen Säuren 2-Methylbuttersäure, 3-Methylbuttersäure und Phenyllessigsäure erreichten geringere AW in der Reisbrotkrume. Keine Unterschiede aber relevante AW in beiden Brotkrumen besaßen 2-Methoxy-4-vinylphenol und 1-Octen-3-on.

Im Gegensatz zu den Brotkrumen wurden in der Reisbrotkruste höhere AW der organischen Säuren 3-Methylbuttersäure und Phenyllessigsäure bestimmt, als in der Weizenbrotkruste (Abbildung 10, B). Auch 3-Methyl-1-butanol und 1-Octen-3-on beeinflussen das Aroma der Reisbrotkruste stärker. Dafür mangelte es letzterer an dem karamellartigen Maltol, welches ausschließlich in der Weizenbrotkruste einen relevanten AW erreichte, und dem rauchigen, an Nelke erinnernden 2-Methoxy-4-vinylphenol. Die Aromastoffe 2-Methylbuttersäure und 2-Phenylethanol besaßen vergleichbare AW in beiden Krusten, 2-Methyl-1-butanol dagegen war gleichermaßen unbedeutend.

3.3 Studien zur Bildung von Aromastoffen in Reisbrot

3.3.1 Untersuchung von Reismehl

Um Rückschlüsse auf die Herkunft der Aromastoffe in Reisbrot zu bekommen, wurde das Reismehl selbst mit einem Sensomics Ansatz auf seine Aromastoffzusammensetzung untersucht. Dies wurde in den nachfolgenden Abschnitten erläutert.

3.3.1.1 Identifizierung der Aromastoffe des Reismehls

Der Rohstoff Reismehl ist ein nur geringfügig prozessiertes Lebensmittel schwachen Geruchs. Folglich war ein weniger komplexes Aroma zu erwarten, als in der prozessierten Reisbrotkrume bzw. -kruste. Dies spiegelte sich in den Ergebnissen der AEVA wider (Tabelle 8). In Reismehl wurden 30 aromaaktive Substanzen detektiert und somit 11 bzw. 13 weniger, als in der Krume bzw. der Kruste des Reisbrotes. Strukturell handelte es sich größtenteils um Lipidabbauprodukte, darunter vorwiegend aliphatische Aldehyde und Säuren, welche jedoch nur teilweise zu den intensivsten Aromastoffen zählten. Die höchsten FD-Faktoren erreichten die Aromastoffe **39** (metallisch), **48** (würzig), **49** (foxy) und **54** (Vanille, FD1024), **53** (FD 256), **11** (sauer) und **16** (grün, fettig, FD 128). Diese Aromastoffe, mit Ausnahme der Essigsäure, wurden bereits in einer Studie von Jezussek und Schieberle, welche gekochten Indica Reis mittels AEVA untersuchten, als wichtigste aromaaktive Verbindungen postuliert.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8 Ergebnisse der AEVA des Reismehls der frischen Mehcharge R1: olfaktorische und gaschromatographische Daten

Nr	Aromastoff ^a	Geruchsqualität ^b	RI ^c		FD-Faktor ^d
			FFAP	DB5	
2	Hexanal	grün, grasig	1084	810	8
6	1-Octen-3-on	pilzig	1298	973	32
11	Essigsäure	sauer	1445	611	128
15	(<i>Z</i>)-2-Nonenal	grün, fettig	1500	1143	32
16	(<i>E</i>)-2-Nonenal	grün, fettig	1529	1157	128
18	2-Butyl-2-heptenal	Zitrus, seifig, grün	1563	1278	4
20	2-Propyl-2-octenal	Zitrus, seifig, grün	1572	1286	1
21	(<i>E,Z</i>)-2,6-Nonadienal ^e	Gurke	1581	1153	8
23	Buttersäure	schweißig	1627	825	16
25	(<i>E,Z</i>)-2,4-Nonadienal	grün	1656	1191	4
26	(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	Zitrus, seifig, grün	1663	1374	32
27	2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig	1666	873	32
28	(<i>E,E</i>)-2,4-Nonadienal	Gurke	1695	1214	32
29	Pentansäure	sauer	1734	925	4
32	(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	grün, fettig	1811	1319	64
33	Hexansäure	sauer, stechend	1843	1004	2
37	4-Hydroxy-2-octensäurelacton ^f	Kokos	1969	1243	1
39	tr-4,5-Epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	metallisch	2003	1378	1024
40	γ -Nonalacton	Kokos	2032	1360	16
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	Karamell	2041	1065	2
43	4-Hydroxy-2-nonensäurelacton	Kokos	2076	1345	4
44	4-Methylphenol	phenolisch	2079	1076	8
45	4-Methylchinazolin	Minze	2094	1344	8
47	2-Methoxy-4-vinylphenol	rauchig, Nelke	2209	1311	16
48	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon ^e	würzig	2213	1106	1024
49	2-Aminoacetophenon	foxy	2223	1302	1024
50	4-Vinylphenol	phenolisch	2395	1215	4
51	Indol	fäkalisch	2452	1291	1
53	Phenyllessigsäure	Honig, Bienenwachs	2568	1267	256
54	Vanillin	Vanille	2586	1398	1024

^{a-f} siehe Tabelle 2

Die Aromastoffe 2-Butyl-2-heptenal (**18**) und 2-Propyl-2-octenal (**20**) wurden erstmals in reisbasierten Lebensmitteln identifiziert. Zur Identifizierung dieser Substanzen wurden zunächst die EI-Massenspektren mittels 2D-„Heart-Cut“-GC×GC-O/MS (siehe Kapitel 4.10.5) generiert. Die dem 2-Butyl-2-octenal (**26**) ähnlichen Massenspektren sowie die identischen Geruchsqualität (Zitrus, seifig, grün) von **18**, **20** und **26** ließen auf eine ähnliche Struktur schließen. Eine Synthese der α,β -ungesättigten Aldehyde mittels Aldolkondensation von Hexanal und Pentanal nach Kapitel 4.2.1 ergab die in Abbildung 11 dargestellten Strukturen. Aus der Reaktion entstanden vier Reaktionsprodukte in gleichen Verhältnissen, darunter die Aldolkondensationsprodukte aus zwei Pentanal- (2-Propyl-2-heptenal) bzw. zwei Hexanalmolekülen (2-Butyl-2-octenal) sowie die beiden möglichen Produkte der Reaktion aus je einem Hexanal- und einem Pentanalmolekül (2-Butyl-2-heptenal und 2-Propyl-2-octenal; Abbildung 11, IV und V).

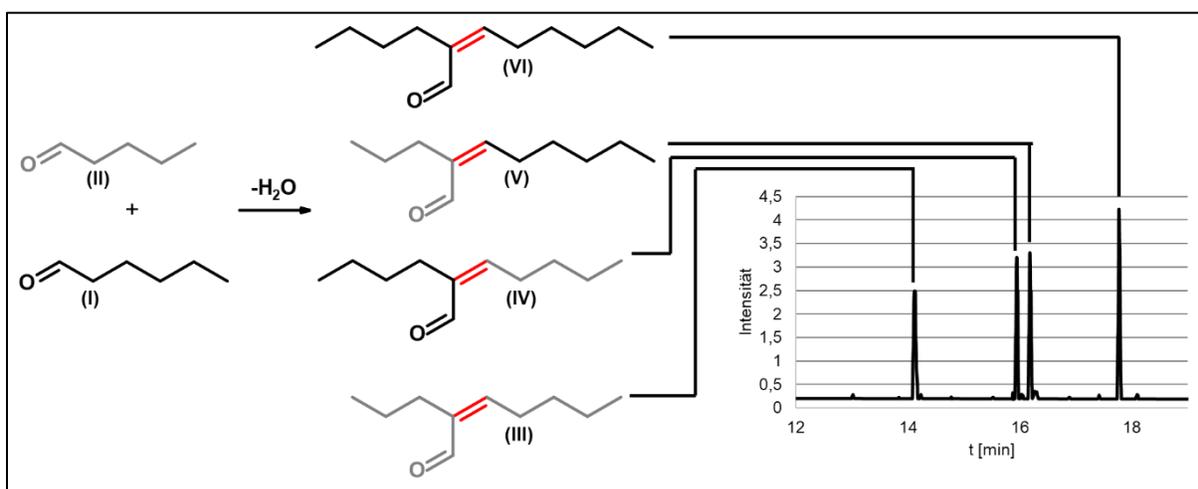


Abbildung 11 Aldolkondensationsreaktion aus Hexanal (I) und Pentanal (II) zu 2-Propyl-2-octenal (III), 2-Butyl-2-heptenal (IV), 2-Propyl-2-octenal (V) und 2-Butyl-2-octenal (VI), und zugehöriges Chromatogramm (aufgenommen mittels HRGC-qTOF-MS auf einer FFAP-Säule)

Zur strukturellen Zuordnung der beiden gemischten Aldolkondensationsprodukte wurden hochauflösende Massenspektren mittels HRGC-qTOF-MS (siehe Kapitel 4.10.6) aufgenommen. Diese wurden mit denen eines zweiten Syntheseansatzes verglichen, in dem isotopenmarkiertes [d₁₂]-Hexanal verwendet wurde (siehe Kapitel 4.2.1). Abbildung 12 zeigt die Massenspektren der zuerst eluierenden Substanz (**18**) und ihres zehnfach deuterierten Äquivalents. In beiden Massenspektren wurde die Abspaltung einer nicht-

isotopenmarkierten C₄-Kette (C₄H₉), resultierend in dem Massensignalen *m/z* 111 bzw. *m/z* 121 erfasst. Eine solche nicht-isotopenmarkierte C₄-Kette war nur im 2-Butyl-2-heptenal vorhanden (Abbildung 11, IV) und ermöglichte die eindeutige Zuordnung der beiden Verbindungen.

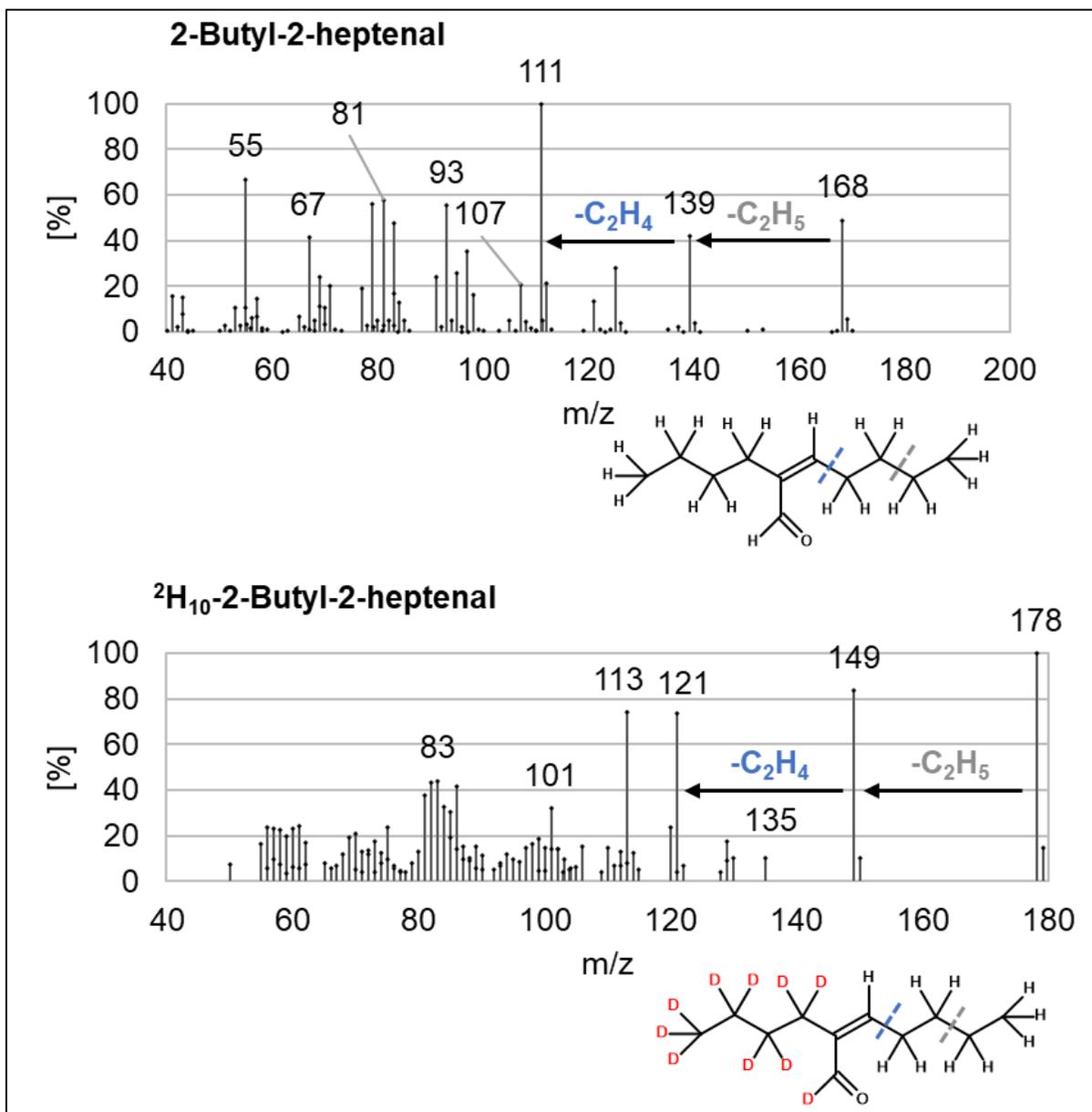


Abbildung 12 EI-Massenspektrum von 2-Butyl-2-heptenal (18, oben) und des [d₁₀]-2-Butyl-2-heptenals (unten) einschließlich vermuteter Fragmente und Spaltstellen

Das Massenspektrum des zweiten gemischten Aldolkondensationsprodukts (**20**) bzw. dessen isotopenmarkierten Äquivalents in Abbildung 13 ergab hingegen eine bevorzugte Abspaltung einer C₃-Kette (C₃H₇) und konnte somit als 2-Propyl-2-octenal identifiziert werden (Abbildung 11, IV) Aus dem Massenspektrum der deuterierten Verbindung ließ sich ebenfalls eine gleichermaßen intensive Abspaltung an beiden Ketten ableiten.

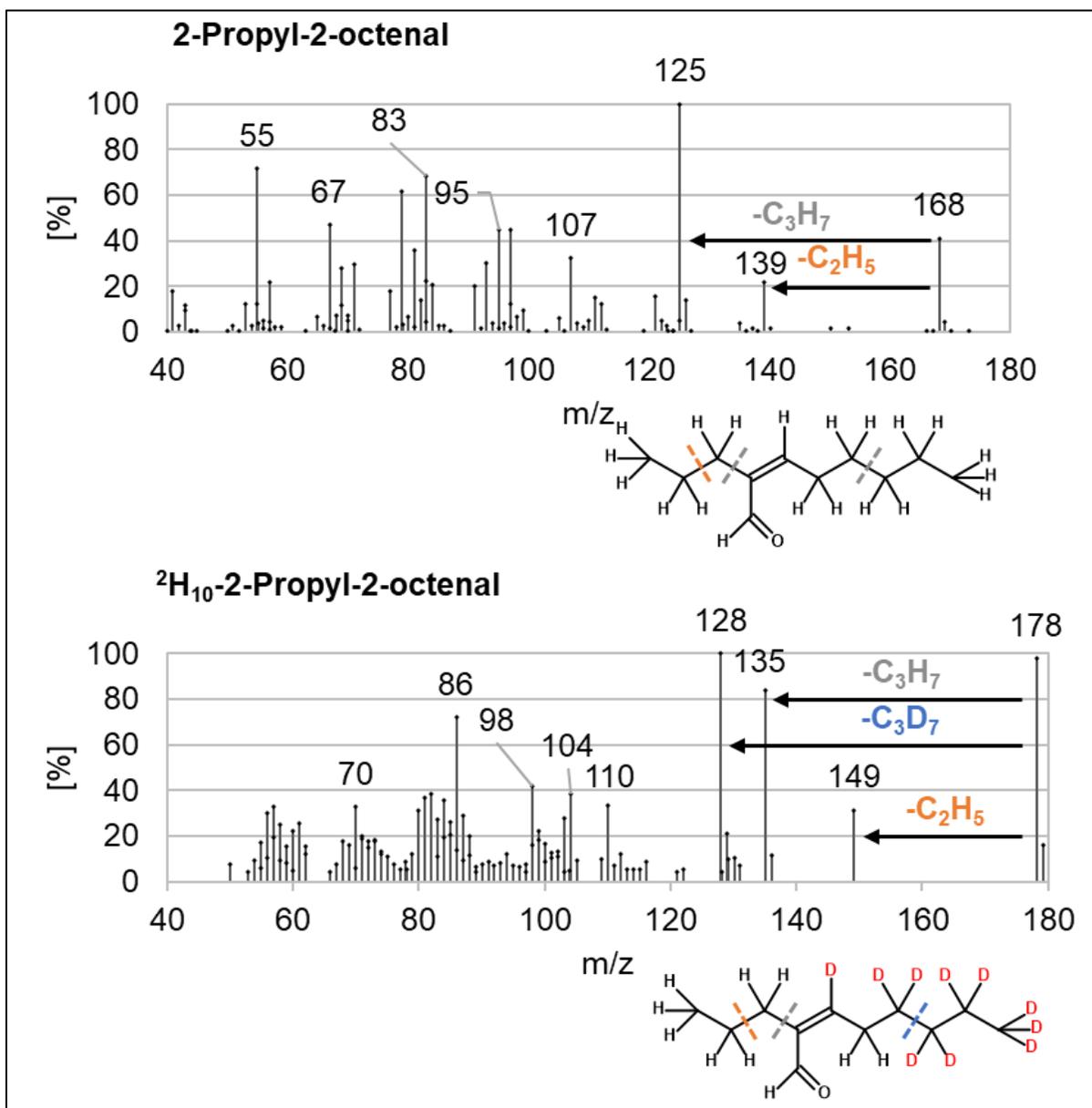


Abbildung 13 EI-Massenspektrum von 2-Propyl-2-octenal (oben) und des [d₁₀]-2-Propyl-2-octenals (unten) einschließlich vermuteter Fragmente und Spaltstellen

Entgegen der erwarteten zwölfwachen Deuterierung, lag nur eine zehnfache Deuterierung vor, welche sich mit einem Wasserstoff-Deuterium-Austausch erklären ließ. Ein solcher H-D-Austausch fand vermutlich an der reaktiven Allylposition neben der Doppelbindung statt.

Die identifizierten Aromastoffe im Reismehl standen in hoher Übereinstimmung mit denen der Reisbrotkrume und -kruste (Abbildung 14). Alle im Reismehl mittels AEVA detektierten Aromastoffe, mit Ausnahme der Aldolkondensationsprodukte **18** und **20** sowie (*E,Z*)-2,4-Nonadienal (**25**) und Pentansäure (**29**), wurden auch in den Brotproben detektiert.

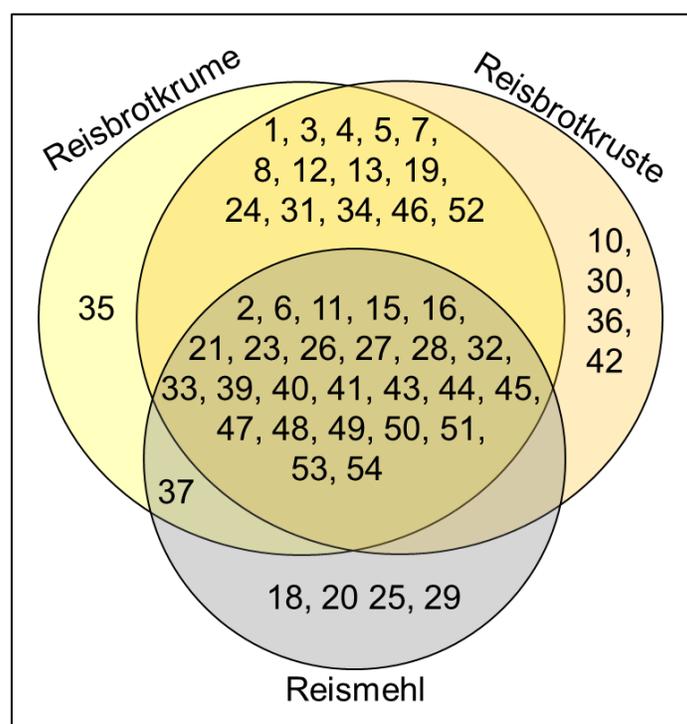


Abbildung 14 Identifizierte Aromastoffe in Reismehl im Vergleich zur Reisbrotkrume und -kruste, Nummerierung entspricht Tabellen 2, 3 und 8

Somit hatten die Aromastoffe, deren Intensitäten in der Reisbrotkrume bzw. -kruste die der Weizenbrotproben überragten (siehe Kapitel 3.2), ihren Ursprung ganz oder teilweise im Reismehl. Unter den wichtigsten Aromastoffen im Reismehl ($FD \geq 128$) erreichten **16**, **39**, **48**, **49**, **53** und **54** vergleichbare FD-Faktoren in den Brotproben, sodass von einer hohen Transferrate relevanter Aromastoffe aus dem Rohstoff in das

verarbeitete Produkt auszugehen war. Hingegen wurden die Aromastoffe, welche durch den Hefemetabolismus (z.B. 3-Methyl-1-butanol (**3**) und 2-Phenylethanol (**34**)) oder thermische Bildungswege (z.B. 2-Acetyl-1-pyrrolin (**7**)) entstanden, nicht im Reismehl detektiert. Um genauere Aussagen zum Transfer relevanter Aromastoffe vom Reismehl in das Reisbrot treffen zu können, wurden Quantifizierungsexperimente durchgeführt, deren Ergebnisse im nachfolgenden Abschnitt zusammengestellt wurden.

3.3.1.2 Quantitative Untersuchungen und Berechnung der Aromawerte

Unter den 12 im Reismehl quantifizierten Substanzen erreichte Essigsäure, ebenso wie in den Brotproben, die höchste Konzentration (>1 g/kg; Tabelle 9), gefolgt von Hexanal, Phenyllessigsäure, (*E*)-2-Nonenal und Vanillin (>10 µg/kg) mit um mehrere Zehnerpotenzen niedrigeren Konzentrationen.

Tabelle 9 Konzentrationen und Aromawerte ausgewählter Aromastoffe in Reismehl der frischen Mehcharge R1

Aromastoff	Konzentration [µg/kg] ^a	Aromawert ^b
Essigsäure ^c	1264808	42
Hexanal	87	2
Phenyllessigsäure	20	<1
(<i>E</i>)-2-Nonenal	15	1
Vanillin	14	<1
3-Methylbuttersäure	7,5	<1
γ-Nonalacton	2,7	<1
2-Methylbuttersäure	2,7	<1
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	1,7	<1
2-Aminoacetophenon	1,4	<1
4-Vinylphenol	1,0	<1
(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	0,58	<1
1-Octen-3-on	0,42	2

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, relative Standardabweichungen <20 %, ^b

^b Bestimmt nach Kapitel 4.5.3 mit den in Tabelle 32 angegebenen Geruchsschwelle in Stärke, ^c Enzymatische Bestimmung nach 4.6.5

Im Vergleich zu den Reisbrotproben wurden im Reismehl höhere Konzentrationen an Essigsäure und den Lipidabbauprodukten Hexanal, (*E*)-2-Nonenal und (*Z*)-2-Butyl-2-octenal verzeichnet. Dies hing zum einen mit einer Verdünnung des Mehls mit den übrigen Zutaten während der Brotherstellung zusammen, aber auch mit der Flüchtigkeit der Verbindungen sowie möglichen Folgereaktionen. Globisch et al. untersuchten durch Hitze begünstigte Reaktionen aliphatischer Aldehyde mit den Seitenketten von Aminosäuren.⁹⁰ Auch Aldolreaktionen, wie die oben beschriebene Aldolkondensation oder Aldoladdition könnten teilweise zum Verlust der aromaaktiven Aldehyde beitragen. In einer Studie von Czerny und Schieberle wurden Verluste aromaaktiver Aldehyde in Weizenmehl durch die Herstellung von Sauerteigen beobachtet.³⁸ Folglich wäre auch ein Abbau der Aldehyde bereits während der Teigherstellung denkbar.

Die übrigen untersuchten Aromastoffe waren im Reismehl in geringeren Mengen enthalten, als in den Reisbrotproben. Die Konzentrationen der Lipidabbauprodukte 1-Octen-3-on und (*E,E*)-2,4-Decadienal im Reismehl machten zumindest einen nennenswerten Anteil von >10 % der in den Brotproben enthaltenen Mengen aus. Als weitere Bildungswege dieser Verbindungen sind enzymatische Oxidationsreaktionen der Linolsäure während der Teigfermentation denkbar.⁴⁷ Die Gehalte an Vanillin, γ -Nonalacton, 2-Aminoacetophenon und 4-Vinylphenol machten im Reismehl weniger als 10 % der Konzentrationen in den Brotproben aus, die für das Hefearoma charakteristischen Aromastoffe 2- und 3-Methylbuttersäure sogar weniger als 1 %.

Nur 4 der in Reismehl quantifizierten Substanzen erreichten einen Aromawert >1 und waren somit relevant für das Gesamtaroma des Reismehls. Essigsäure erreichte den höchsten AW von 42, gefolgt von Hexanal (AW 2) sowie (*E*)-2-Nonenal und 1-Octen-3-on (AW 1). Die übrigen Aromastoffe trugen nicht zum Gesamtaroma bei. Diese Ergebnisse standen im Einklang mit dem sehr schwachen Geruch des Reismehls und dem intensiveren Aroma des daraus hergestellten Brotes.

3.3.2 Quantitative Bestimmung freier Aminosäuren und Zusammenhang mit den Konzentrationen ihrer Hefemetaboliten der Weizen- und Reisbrotkrume

Trotz der Verwendung der gleichen Hefesorte (frische Presshefe, *Saccharomyces cerevisiae*) und -menge zur Herstellung von Weizen- und Reisbrot, variierten die Konzentrationen der aromaaktiven Hefemetaboliten der Aminosäuren Leucin (3-Methyl-1-butanol und 3-Methylbuttersäure), Isoleucin (2-Methyl-1-butanol und 2-Methylbuttersäure) und Phenylalanin (2-Phenylethanol und 2-Phenylethylsäure) vor allem in den Brotkrumen sehr stark. Als Bildungsweg dieser Substanzen gilt der Ehrlich-Abbau der genannten Aminosäuren zu deren korrespondierenden Aldehyden mit anschließender Reduktion, bzw. Oxidation zu den jeweiligen Alkoholen und Säuren, wie in Abbildung 15 dargestellt.

3.3.2.1 *Freie Aminosäuren in den Rohstoffen*

Um die beschriebenen Konzentrationsschwankungen der Hefemetaboliten in den Brotproben zu ergründen, wurden die Vorläufer-Aminosäuren mittels SIVA-HPLC-MS/MS (siehe Kapitel 4.7) zunächst in den Rohstoffen Weizen- und Reismehl sowie der Hefe bestimmt. Zur Steigerung der Empfindlichkeit und der Selektivität wurden die Analyten vor der Messung mit Benzoylchlorid derivatisiert, wie es häufig zur Quantifizierung von Aminosäuren in Lebensmitteln erfolgte.^{43,91,92}

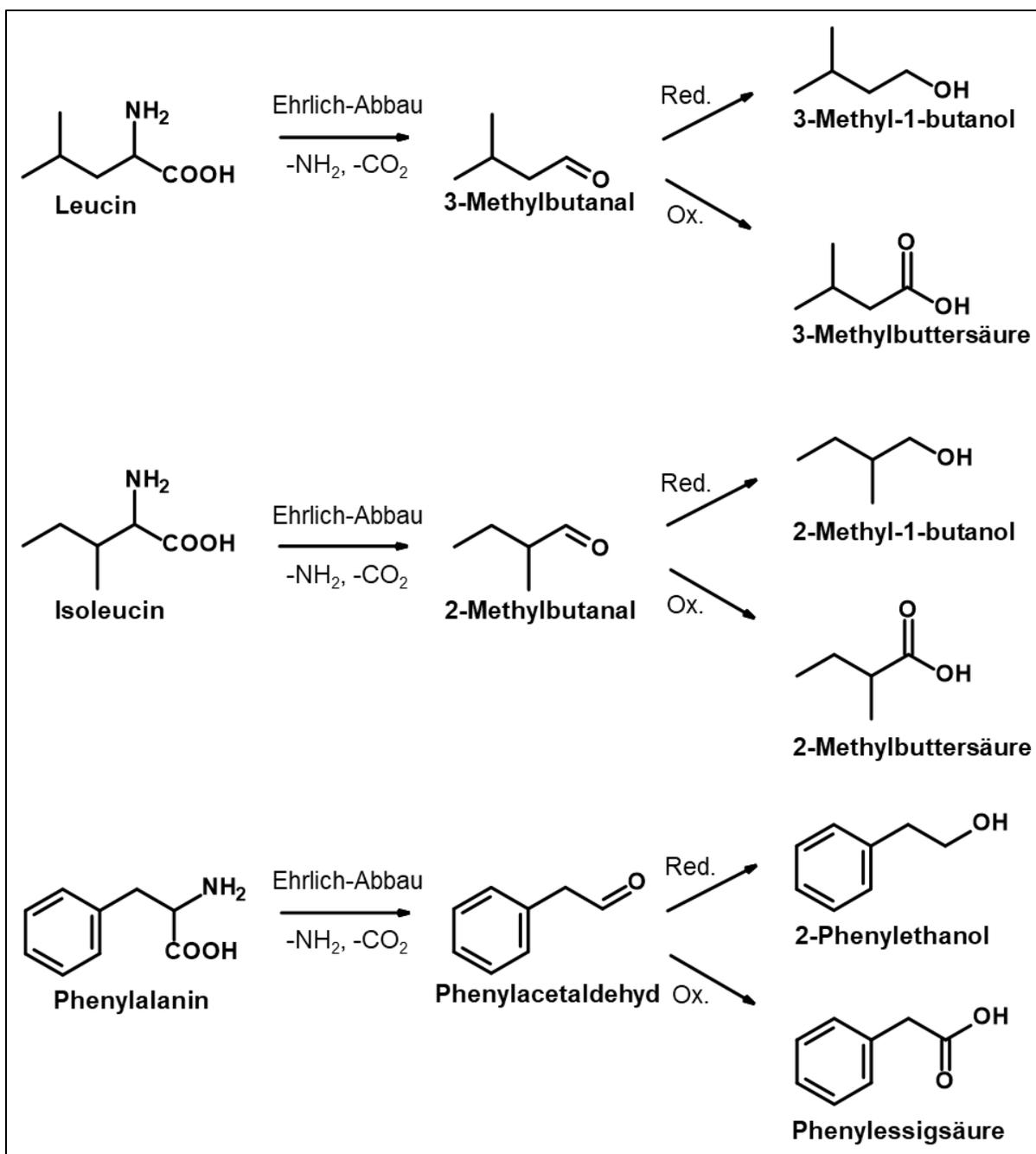


Abbildung 15 Bildungsmechanismus aromaaktiver Hefemetaboliten der Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Phenylalanin

Diese Untersuchungen ergaben deutliche Konzentrationsunterschiede der Aminosäuren zwischen den verschiedenen Rohstoffen (Abbildung 16). Die höchsten Gehalte wurden in der Hefe bestimmt, sodass diese, trotz ihres eher geringen prozentualen Anteils im Teig (etwa 5,4 mg Hefetrockenmasse/kg Teig), als eine wichtige Quelle freier Aminosäuren angesehen werden konnte. Die bestimmten Konzentrationen lagen etwas über den von Münch et al. mittels Aminosäure-Analysator und Ninhydrin Derivatisierung gemessenen Werten in frischer Bäckerhefe, jedoch in der gleichen Größenordnung.⁴⁰ Eine solche Abweichung konnte mit verschiedenen Einflussfaktoren auf dieses Produkt lebender Mikroorganismen, wie dem Alter, der Hefeaktivität und dem Hefestamm, aber auch mit den verschiedenen angewendeten Analysemethoden, erklärt werden.

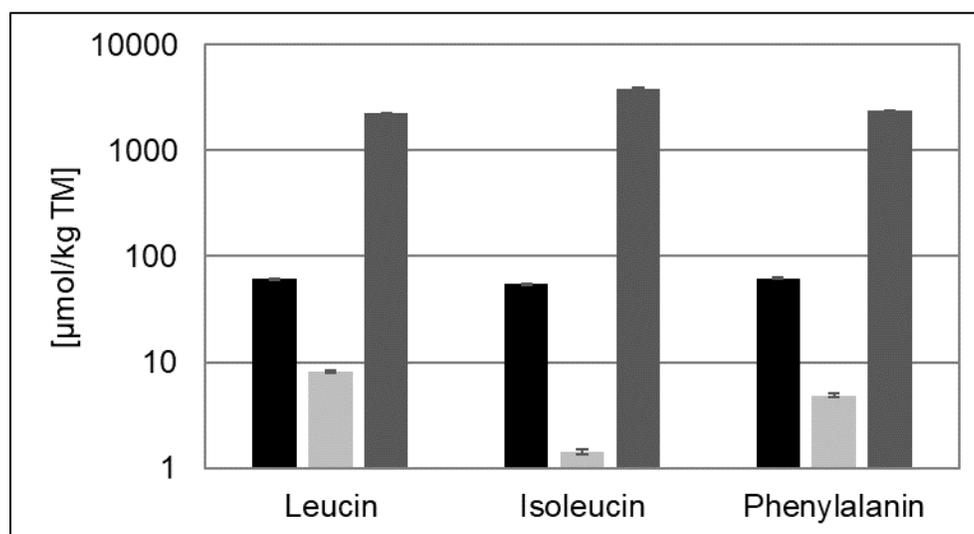


Abbildung 16 Konzentrationen freier Aminosäuren in den Rohstoffen Weizenmehl (schwarz), Reismehl (hellgrau) und Frischhefe (grau) in $\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse (TM), Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

Die Konzentrationen der Aminosäuren in Weizenmehl lagen mehr als eine Zehnerpotenz unter denen in der Hefe und stimmten gut mit den Ergebnissen von Opperer überein,⁴³ welche eine vergleichbare Methode zur Quantifizierung freier Aminosäuren von Weizen- und Maismehl anwendete. Verglichen mit dem Weizenmehl betragen die Konzentrationen im Reismehl nur 3-13 %. Insbesondere der Isoleucin-Gehalt war im Reismehl sehr niedrig, sodass sich die Verhältnisse der Aminosäuren zwischen den Mehlen stark unterschieden.

3.3.2.2 *Veränderung der Aminosäurekonzentrationen während der Mehluellung*

Die Mengen freier Aminosäuren, welche der Hefe während der Teigbereitung zur Verstoffwechslung zur Verfügung standen, waren nicht allein auf die in den Rohstoffen vorliegenden Konzentrationen zurückzuführen. Enzymatische Abbaureaktionen mehleigener Peptide und Proteine können eine erhebliche Zunahme der Aminosäurekonzentrationen während der Brotherstellung bewirken. Solche Reaktionen werden durch das bei der Teigherstellung zugegebene Wasser ausgelöst, welches Proteasen aktiviert, die während der Quell- bzw. Fermentationszeit wirken. Saikusa et al. beschrieben diesen Effekt am Beispiel von Reismehlen, welche aus verschiedenen Schichten der Reiskörner gewonnen wurden.⁹³ Ein besonders hoher Anstieg der Konzentrationen freier Aminosäuren während des Quellvorgangs wurde bei Mehlen aus den äußeren Reiskornschichten beobachtet. In diesem Bereich der Reiskörner waren demnach die meisten Enzyme lokalisiert. Auch in Weizenkörnern sind die Enzyme vorrangig in einer der äußeren Schichten, der sogenannten Aleuronschicht, enthalten.⁷ Während der Vermahlung kommt es bei beiden Getreidearten zum Verlust der äußeren Schichten der Körner. Somit sind der Enzymgehalt und die Enzymaktivität von Mehlen stark vom Ausmahlungsgrad abhängig.

In einer Versuchsreihe wurden die Gehalte freier Aminosäuren von Weizen- und Reismehl direkt nach dem Vermischen mit Wasser und nach definierten Inkubationszeiten (10, 20, 30 und 40 min) bei 30 °C (siehe Kapitel 4.7) bestimmt. In Abhängigkeit von der Quellzeit stiegen in Weizenmehl vor allem die Konzentrationen von Leucin (auf 266 % des Ausgangswertes im Mehl), aber auch die Konzentrationen von Phenylalanin (184 %) und Isoleucin (175 %) kontinuierlich an (Abbildung 17). In dem ohnehin aminosäurearmen Reismehl wurden dagegen nur schwache Anstiege der Aminosäuren Phenylalanin (132 %) und Leucin (118 %) verzeichnet. Die Konzentration von Isoleucin blieb während der gesamten Quellung unverändert.

Das stark unterschiedliche Verhalten der Aminosäuregehalte von Weizen- und Reismehl während des Quellens könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen besaß Reis bzw. Reismehl generell einen geringeren Anteil an Proteinen als Weizen,⁹ aus denen freie Aminosäuren gebildet werden können. Zudem waren Verluste von Aminosäuren

und Enzymen während der Nassvermahlung denkbar. Aus einer Studie zum Vergleich der nassen und trockenen Vermahlung von Reismehl ist eine signifikante Abnahme der Protein-, Lipid- und Mineralstoffgehalte im Zusammenhang mit der Nassvermahlung bekannt.⁹⁴ Der Verlust der Proteine bezog sich vor allem auf die wasserlösliche Albuminfraktion, welche zahlreiche Enzyme beinhaltet.^{7,94} Auch war eine gründlichere Abtrennung der Außenschichten der Reiskörner vor der Mehlherstellung im Vergleich zur Vermahlung der Weizenkörner als Einflussfaktor denkbar.

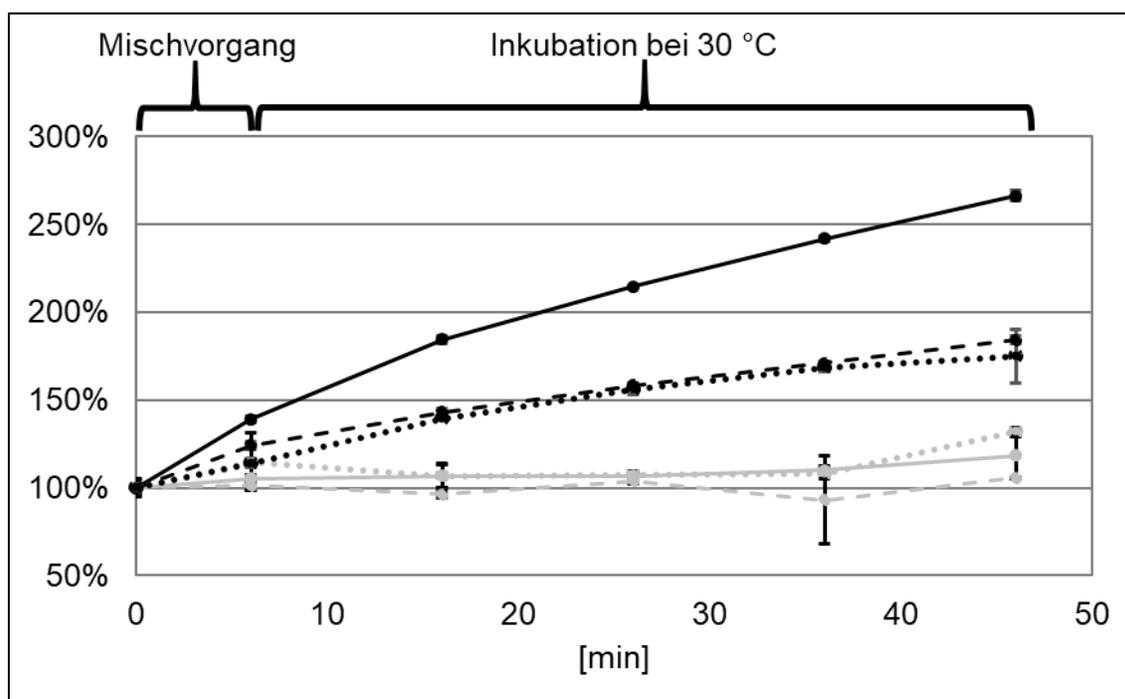


Abbildung 17 Prozentuale Veränderung der Gehalte an freiem Leucin (—), Isoleucin (- - -) und Phenylalanin (....) in Weizenmehl (schwarz) und Reismehl (hellgrau) nach verschiedenen Quellzeiten in Wasser, bezogen auf die Ausgangswerte der Mehle (= 100 %); Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

3.3.2.3 *Veränderung der Aminosäurekonzentrationen während der Teigfermentation*

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss der Hefe auf das Teigsystem untersucht. Die Mengen der freien Aminosäuren der aus Weizen- und Reismehl hergestellten Hefeteige wurden direkt nach dem Mischen und nach definierter Fermentationszeit (10, 20, 30 und 40 min) bei 30 °C bestimmt (siehe Kapitel 4.7). Ein entsprechender Nullpunkt vor dem Mischen wurde aus den Aminosäurekonzentrationen der Rohstoffe in deren jeweiligen Anteilen im Teig berechnet. Die resultierenden Verlaufskurven wurden in Abbildung 18 dargestellt.

In den untersuchten Teigsystemen waren zeitgleich der Abbau der Aminosäuren aufgrund des Hefemetabolismus sowie die Freisetzung infolge der Proteinabbauprozesse bei der Mehlquellung zu beobachten. Im Weizenbrotteig überwog während der Knetzeit bei Raumtemperatur die Neubildung der Aminosäuren, sodass der Leucin- und Phenylalanin Gehalt im Weizenteig leicht anstieg und der Isoleucin-Gehalt konstant blieb. Die höhere Temperatur während der anschließenden Fermentation (30 °C) erhöhte die Hefeaktivität und resultierte in einem kontinuierlichen Rückgang aller Aminosäuren.

Im Gegensatz zum Weizenbrotteig war die Konzentrationen freier Aminosäuren im Reisbrotteig deutlich geringer und eine Anreicherung durch die Quellung des Reismehls fand nicht statt (siehe Abbildung 17). Dieses geringe Nährstoffangebot für die Hefe führte zu einer sehr schnellen Metabolisierung von 50 % der Aminosäuren nach der Mischzeit und von 75 % nach dem ersten Viertel der Fermentationszeit, jedoch nicht zu einem vollständigen Abbau (Abbildung 18).

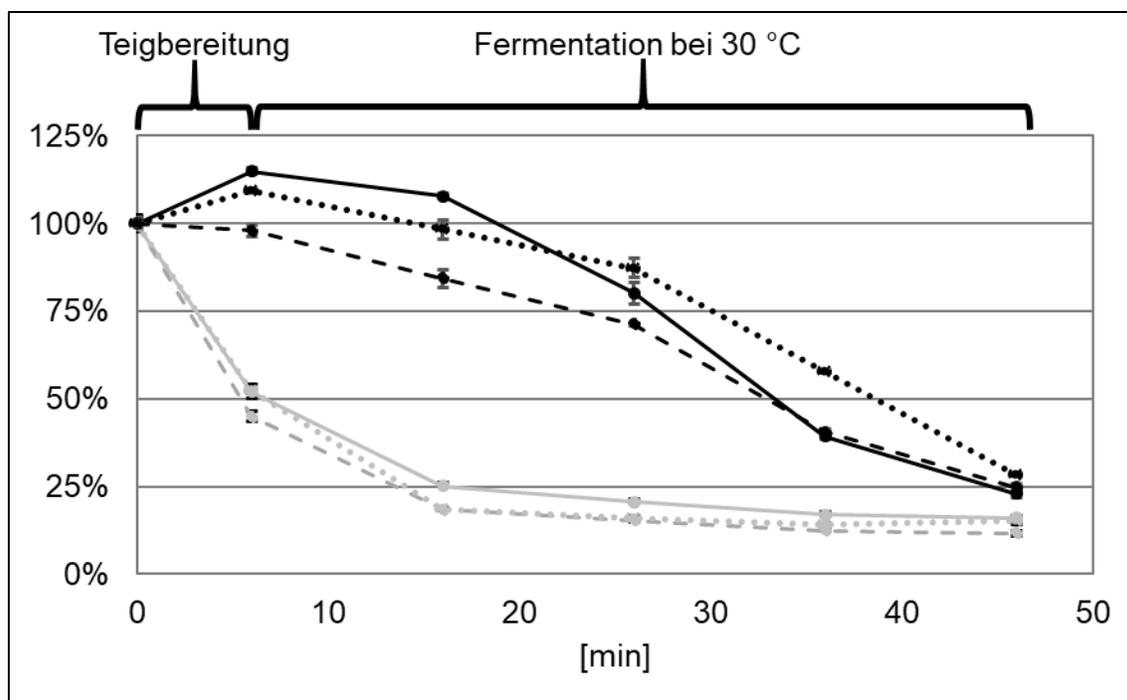


Abbildung 18 Prozentuale Veränderung der Gehalte an freiem Leucin (—), Isoleucin (- - -) und Phenylalanin (....) in Hefeteigen aus Weizenmehl (schwarz) und Reismehl (hellgrau) nach verschiedenen Fermentationszeiten, bezogen auf berechnete Ausgangswerte entsprechend der Rohstoffanteile (= 100 %); Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

Am Ende der Fermentationszeit verblieben in beiden Teigen nur geringe Mengen freier Aminosäuren (Tabelle 10). Dennoch überstiegen die in Weizenbrotteig bestimmten Werte (jeweils >2 mg/kg) die Mengen des Reisbrotteiges (jeweils <1 mg/kg TM) um einen Faktor 3,7 bis 5,3. Somit war das Nährstoffangebot der Hefe im Weizenbrotteig nach der vierzigminütigen Fermentation noch nicht aufgebraucht. Durch eine Verlängerung der Fermentation könnten höhere Konzentrationen aromaaktiver Metaboliten erreicht werden.

Tabelle 10 Konzentrationen freier Aminosäuren in den Brotteigen nach 40 min Fermentation

Aminosäure	Konzentration ^a [mg/kg TM]	
	Weizenbrotteig	Reisbrotteig
Leucin	2,36	0,63
Isoleucin	2,88	0,61
Phenylalanin	3,81	0,72

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, relative Standardabweichungen <10 %

3.3.2.4 Gegenüberstellung der Konzentrationen freier Aminosäuren in Teigen und aromaaktiver Hefemetaboliten in Brotkrumen

Die erhobenen Daten ermöglichten eine Berechnung der insgesamt verfügbaren freien Aminosäuremengen in den Teigen, welche sich als Summe der freien Aminosäuren der für 40 min gequollenen Mehle und der Hefe in den entsprechenden Anteilen zusammensetzten. Diese wurden in Abbildung 19 den in den Brotkrumen bestimmten Hefemetaboliten gegenübergestellt. Entsprechend der Daten der AEVA wurden im Rahmen dieser Studie vorwiegend die Alkohole und Säuren betrachtet und mit deren korrespondierenden Aminosäuren verglichen. Von einer Quantifizierung der Aldehyde wurde aufgrund der vergleichsweise geringen Aromaintensitäten in den Brotproben abgesehen. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden alle Daten auf die jeweiligen Trockenmassen bezogen, welche nach 4.4.1 bestimmt wurden.

In den weizenbasierten Proben (Abbildung 19 A) wurde eine höhere Verfügbarkeit von Leucin im Teig verglichen mit Isoleucin und Phenylalanin, welche in vergleichbaren Mengen vorlagen, bestimmt. In Übereinstimmung damit wurden höhere Gehalte der Metaboliten von Leucin im Vergleich zu den anderen Aminosäuren in der Weizenbrotkrume detektiert. Die Umsatzraten aller Aminosäuren waren jedoch niedriger als 50 %. Entsprechend der Literatur wurde eine bevorzugte Bildung des Alkohols für alle Aminosäuren beobachtet.^{42,43} Die Verhältnisse zwischen Alkohol und Säure variierten jedoch, sodass die Isoleucinmetaboliten 2-Methyl-1-butanol und 2-Methylbuttersäure in etwa gleichen Mengen vorlagen. Bei den Phenylalaninmetaboliten überwog der Alkohol 2-Phenylethanol deutlich.

Gegenteilige Ergebnisse wurden bei den auf Reismehl basierenden Proben gefunden (Abbildung 19 B). Obwohl die Gehalte an Leucin, Isoleucin und Phenylalanin im Reisbrotteig einander ähnlich waren (33 – 45 $\mu\text{mol/kg TM}$), wurden starke Konzentrationsunterschiede der Metaboliten festgestellt. In der Reisbrotkrume wurden besonders hohe Mengen an 3-Methyl-1-butanol und 2-Phenylethanol, den Metaboliten von Leucin und Phenylalanin, bestimmt. Die Gehalte der Alkohole übertrafen diejenigen der Aminosäuren deutlich. Vor allem 3-Methyl-1-butanol überstieg die Stoffmenge seines Vorläufers Leucin um den Faktor 3,5. Nur die Gehalte der Isoleucinmetaboliten in

der Reisbrotkrume lagen unter dem Gehalt des freien Isoleucins im Reisbrotteig. Dementsprechend musste es andere Quellen für die Freisetzung der Aminosäuren oder alternative Bildungswege für die Aromastoffe geben. Wahrscheinlich führte das geringe Nährstoffangebot im Reisteigsystem zu einer Aktivierung von Hefeproteasen, welche verfügbare Peptide oder Proteine hydrolysierten, die über hohe Anteile der Aminosäuren Leucin und Phenylalanin verfügten.

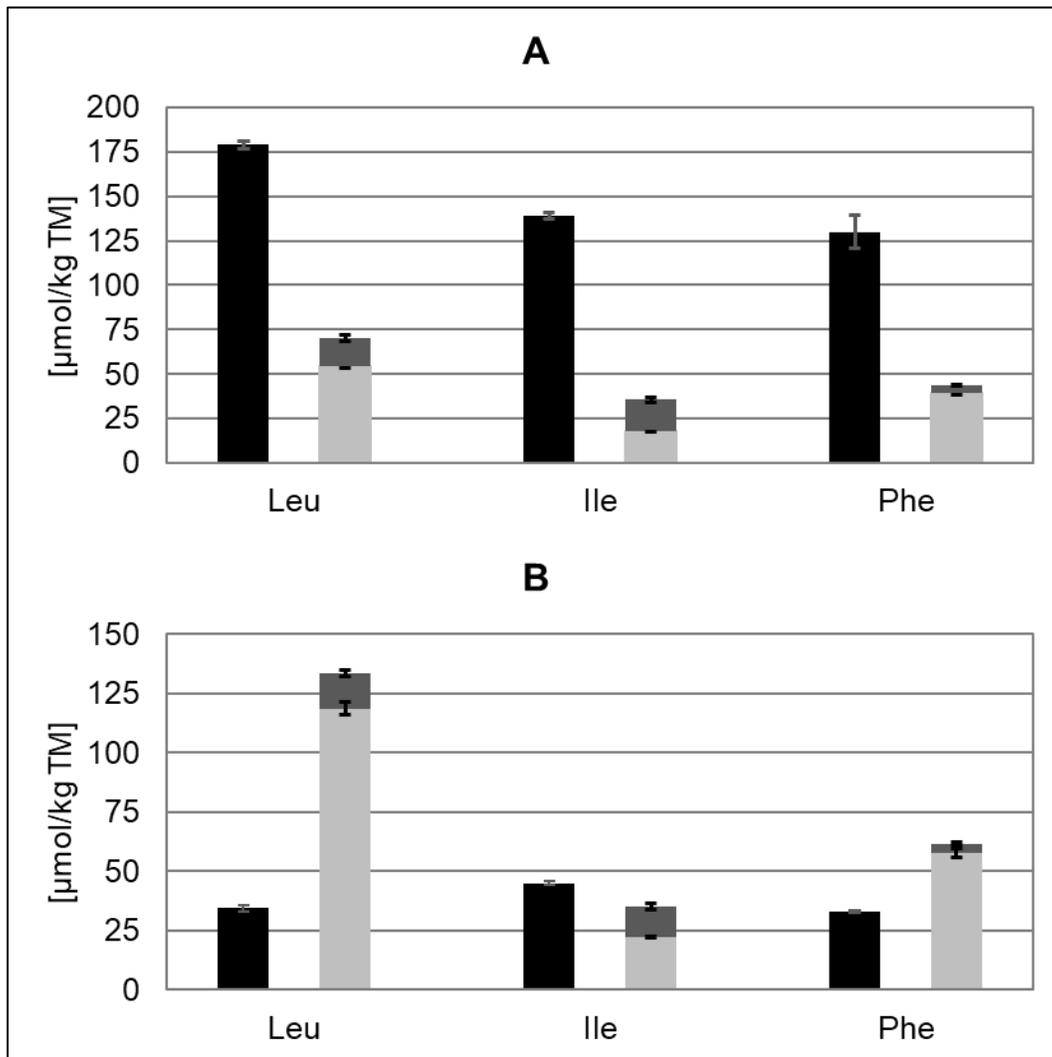


Abbildung 19 Gegenüberstellung der verfügbaren Mengen freier Aminosäuren in den Teigen (schwarz) und der korrespondierenden Alkohole (hellgrau) und Säuren (grau) in den Krumen von Weizenbrot (A) und Reisbrot (B) bezogen auf die Trockenmasse (TM)

Es ist bekannt, dass Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) fähig ist, auf zwei verschiedenen Wegen Proteine abzubauen, dem spezifischen Abbau im Proteasom und dem unspezifischen Abbau im Lysosom (Vakuole).⁹⁵ In der Vakuole werden u.a. Aminosäuren und Metaboliten gespeichert, aber es können auch Proteine aufgenommen werden. Bei Nährstoffmangel kann die unspezifische Proteolyse auf bis zu 85 % des gesamten Proteinabbaus der Hefe ansteigen um das Überleben der Hefezelle zu sichern.^{95,96} Dieser proteolytische Abbau nimmt auf den Kurvenverlauf des Abbaus der freien Aminosäuren während der Fermentation Einfluss (Abbildung 18), welcher zu Beginn sehr schnell verlief und anschließend stagnierte, da freie Aminosäuren durch proteolytische Abbaureaktionen nachgebildet wurden. So verblieben auch nach der Fermentation noch eine geringe Konzentration freier Aminosäuren im Teig (Tabelle 10).

Äquivalent zur Weizenbrotkrume und zu den Ergebnissen von Opperer wurden auch in der Reisbrotkrume vorwiegend die Alkohole gebildet.⁴³ Ausschließlich bei den aus Isoleucin gebildeten Metaboliten wurde ein näherungsweise ausgeglichenes Verhältnis zwischen der Säure (2-Methylbuttersäure) und dem Alkohol (2-Methyl-1-butanol) festgestellt. In diesem Punkt bestand ebenfalls eine Übereinstimmung zwischen der Weizen- und der Reisbrotkrume.

3.3.3 Bildung des für Reisbrot charakteristischen Aromastoffs 2-Aminoacetophenon

Die Untersuchung der Ursachen des abweichenden Aromas von Reisbrot im Vergleich zu Weizenbrot ergab hauptsächlich Unterschiede in den Intensitäten der Schlüsselaromastoffe. Eine Sonderrolle nahm der Aromastoff 2-Aminoacetophenon (2-AAP) ein, da dieser ausschließlich in der Reisbrotkrume und -kruste relevante Aromawerte (jeweils AW 6) erreichte, im Weizenbrot hingegen als unbedeutend für das Aroma (AW <1) eingestuft wurde. Um die Ursachen der Bildung dieses Aromastoffs im Reisbrot aufzuklären, wurden im Folgenden tiefergehende Untersuchungen durchgeführt.

Die quantitative Bestimmung von 2-AAP in Reismehl (Kapitel 3.3.1.2) ergab eine um den Faktor 10 geringere Konzentration als in der Reisbrotkrume und -kruste (Kapitel 3.2.2.2). Dies ließ einen starken Einfluss der Brotherstellung auf die Bildung von 2-AAP vermuten. Darüber hinaus überstiegen die in den Reisbrotproben gemessenen Konzentrationen von 2-AAP die von Jezussek bestimmten Mengen in gekochtem Reis (bis zu 5 µg/kg Trockenmasse) etwa um das Dreifache,⁶¹ sodass es sich womöglich nicht oder nicht ausschließlich um eine thermisch induzierte Bildungsreaktion des 2-AAPs handelte.

3.3.3.1 Mögliche Vorstufen und deren Konzentrationen in den Rohstoffen

Wie in Kapitel 1.7.4 beschrieben, wurden bereits mehrere Studien zur Aufklärung des Bildungsmechanismus von 2-Aminoacetophenon (2-AAP) in Wein durchgeführt. Als Vorläufer gilt Indol-3-essigsäure (IAA), ein Derivat der Aminosäure Tryptophan (Trp). Durch die Reaktion mit Superoxidradikalen kommt es zum oxidativen Abbau der IAA über mehrere Reaktionsschritte. Zudem kann die Oxidation auch enzymatisch katalysiert werden.^{74,77} Aus dem Zwischenprodukt 2-Formamidoacetophenon (FAP) wird im letzten Schritt durch Hydrolyse der Formamidgruppe Ameisensäure abgespalten und 2-Aminoacetophenon (2-AAP) gebildet (siehe Abbildung 6).^{72,73}

Zur Untersuchung des Bildungsmechanismus von 2-AAP während der Herstellung von Reisbrot wurden zunächst dessen Konzentration sowie die Konzentrationen der möglichen Vorstufen Trp, IAA und FAP in den für die Brotherstellung verwendeten

Mehlen sowie in der Hefe bestimmt (Tabelle 11). Die nichtflüchtigen Analyten wurden mittels SIVA-HPLC-MS/MS (Kapitel 4.7 und 4.8) quantifiziert. Die Konzentrationsbestimmung der flüchtigen Analyten 2-AAP und FAP erfolgte mittels SIVA-GC×GC-TOF-MS (Kapitel 4.6.4) und dem internen Standard [d₃]-2-Aminoacetophenon für beide Verbindungen. Anstatt des für die übrigen Untersuchungen verwendeten kommerziellen Weizenmehls wurde im gesamten Kapitel 3.3.3 auf ein selbst vermahlendes Weizenmehl der Sorte Dekan zurückgegriffen. Dies lag daran, dass bei kommerziellen Weizenmehlen ein Zusatz von Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel nicht auszuschließen ist, welcher die Analysen durch die Unterdrückung der Oxidation von IAA beeinträchtigen könnte.

Tabelle 11 Konzentrationen von 2-Aminoacetophenon und seinen potenziellen Vorläufern in den zur Brotherstellung verwendeten Zutaten

	Trp^a		IAA^b		FAP^c		2-AAP^d	
	[μmol/kg TM]		[nmol/kg TM]		[nmol/kg TM]		[nmol/kg TM]	
Hefe	755	± 24	2583	± 178	n.d.		49	± 4
Weizenmehl ^e	691	± 4	274	± 16	n.d.		2,9	± 1,5
Reismehl	4,0	± 0,4	951	± 34	7,6	± 1,1	12	± 1

^a freies Tryptophan, ^b freie Indol-3-essigsäure, ^c 2-Formamidoacetophenon, ^d 2-Aminoacetophenon, ^e Weizenmehl Dekan

Die Untersuchungen ergaben die höchsten Konzentrationen an Trp, IAA und 2-AAP in der Hefe, welche jedoch in der Brotrezeptur nur einen geringen Anteil (4 % der Mehltrockenmasse) ausmachte. Zudem lagen deutliche Unterschiede zwischen dem Weizenmehl und dem Reismehl vor. Die freie Aminosäure Tryptophan besaß in Reismehl eine sehr niedrige Konzentration von weniger als 1 % des Vorkommens in Weizenmehl. Somit lag kein direkter Zusammenhang zwischen dem Trp-Gehalt und demjenigen der Derivate IAA, FAP und 2-AAP vor. Dies stimmte mit den Ergebnissen von Christoph et al. überein, welche die Umsatzrate von Trp zu 2-AAP während der Weinherstellung beobachteten und diese als sehr gering einschätzten.⁷¹ Entgegen dem Trp-Gehalt überwogen die Konzentrationen der Vorläufer IAA und FAP, und auch die Konzentration des 2-AAPs selbst, im Reismehl verglichen mit dem Weizenmehl. Der

direkte 2-AAP-Vorläufer FAP wurde zudem ausschließlich im Reismehl, nicht jedoch in der Hefe und im Weizenmehl detektiert.

Folglich war ein direkter Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der Substanzen IAA, FAP und 2-AAP im Reismehl zu erwarten. Ein solcher Zusammenhang ließ sich ebenfalls von der biologischen Funktion dieser Substanzen in Pflanzen herleiten. Die IAA ist ein Pflanzenhormon, welches als Wachstumsregulator die Keimung unterdrückt und somit verstärkt in den Samen vorliegt. Durch Wasserkontakt finden enzymatische Oxidationsprozesse zu weniger aktiven Wachstumsregulatoren (u.a. FAP) statt, sodass bei Pflanzensamen durch Quellung die Keimung eingeleitet wird.^{74,77} Solche Enzyme sind vorrangig in den Spelzen lokalisiert, die beim Reis, im Gegensatz zum Weizen, fest mit den Körnern verwachsen sind.⁷ Dies könnte Einfluss auf die Gehalte dieser Enzyme im Mehl haben. Zudem beschrieben Kato et al. bei Untersuchungen der Wachstumsregulation in Pflanzen, am Beispiel von Linsenkeimlingen, regulatorische Effekte zwischen den Metabolitkonzentrationen und enzymatischen Reaktionen.⁹⁷ So schrieben sie dem FAP die Fähigkeit zu, die IAA-Oxidase zu aktivieren, sodass der oxidative Abbau von IAA beschleunigt würde. Dies könnte eine Ursache für die verstärkte Bildung von 2-AAP in Reisbrot sein, da Reismehl die höchste FAP-Konzentration unter den untersuchten Rohstoffen besaß.

Auch war der Gehalt natürlicher Antioxidantien im Weizenmehl, welche den oxidativen Abbau von IAA und somit die Bildung von FAP unterdrücken würden, eine mögliche Erklärung für dessen geringen FAP- und 2-AAP-Gehalte. In Getreiden korreliert die antioxidative Kapazität mit dem Gehalt phenolischer Verbindungen, welcher in Weizenmehl deutlich höher ist, als in Reismehl.^{98,99} Ein vergleichbarer Effekt konnte bei der Untersuchung von Weiß- und Rotwein festgestellt werden. Die geringere antioxidative Kapazität des Weißweins wurde mit einer erhöhten Bildung von 2-AAP in Verbindung gebracht. Ein Zusatz des Antioxidationsmittels Ascorbinsäure zu Weißwein glich dies aus und unterband die Bildung von 2-AAP.⁶⁹

Es war darüber hinaus zu bedenken, dass die freie IAA oft nur einem kleinen Teil der gesamten, in Getreide enthaltenen, IAA entspricht. Zahlreiche estergebundene Zuckerkonjugate sowie als Amid an Aminosäuren, Peptide oder Proteine gebundene

Konjugate sind bekannt.¹⁰⁰ Die Hefe ist in der Lage, solche Bindungen enzymatisch zu spalten, sodass in fermentierten Lebensmitteln nicht von einer konstanten IAA-Konzentration auszugehen ist. Dementsprechend beschrieben Hoenicke et al. einen immensen Anstieg der freien IAA während der Weinfermentation,¹⁰¹ wohingegen die IAA im unfermentierten Most beinahe vollständig gebunden vorlag. Aufgrund der bei der Brotherstellung relativ kurzen Fermentationszeit könnte der Einfluss dieses Freisetzungsweges weniger bedeutsam sein als bei der Weinherstellung. Um einen Eindruck vom Ausmaß der Freisetzung der IAA während der Fermentation zu bekommen, wurde die freie IAA in Teigen nach der Fermentation quantifiziert und mit den theoretisch im Teig enthaltenen IAA-Mengen verglichen (siehe Tabelle 12). Die theoretische IAA-Konzentration wurde aus den IAA-Konzentrationen in den Rohstoffen in den entsprechenden Anteilen der Teigrezeptur berechnet.

Tabelle 12 Indol-3-essigsäure-Konzentrationen in den für 40 min fermentierten Brotteigen

	IAA^a	IAA theoretisch^b
	[nmol/kg TM]	[nmol/kg TM]
Weizenbrotteig	2661 ± 704	288 ± 17
Reisbrotteig	1183 ± 32	929 ± 34

^a IAA-Konzentration, bestimmt mittels SIVA-HPLC/MS/MS, ^b theoretische IAA-Konzentration, berechnet aus den Konzentrationen der Rohstoffe in den jeweiligen Anteilen

Besonders hohe Konzentrationen an freier IAA (>2 µmol/kg TM) waren im fermentierten Weizenbrotteig enthalten. Der darin bestimmte Wert überstieg die theoretisch berechnete IAA-Konzentration beinahe um Faktor 10. Demnach lag in Weizenmehl, das relativ geringe Gehalte an freier IAA aufwies (274 nmol/kg TM), diese vorwiegend in gebundener Form vor. In Reisbrotteig stimmte die analytisch bestimmte Konzentration der freien IAA sehr gut mit dem aus den Gehalten des Mehls und der Hefe berechneten Wert überein. Man könnte also auf ein geringeres Vorkommen gebundener IAA im Reismehl als im Weizenmehl schließen. Wahrscheinlicher war jedoch, dass die Freisetzung der IAA im Reisbrotteig im Gleichgewicht mit oxidativen, bzw. enzymatischen Abbaureaktionen stand. Dieser Umsatz wurde im Weizenbrotteig durch Antioxidantien oder einen Mangel oxidierender Enzyme des Weizenmehls unterdrückt,

sodass es dort zur Anreicherung der IAA kam. Diese Überlegungen wurden durch die quantitativen Daten der IAA-Abbauprodukte in den Brotkrumen bestätigt. So lagen in der Reisbrotkrume Konzentrationen von FAP (175 nmol/kg TM) und 2-AAP (245 nmol/kg TM) vor, welche diejenigen in der Weizenbrotkrume etwa um Faktor 10 (2-AAP) bzw. Faktor 100 (FAP) überstiegen.

3.3.3.2 Bildung von 2-Aminoacetophenon aus dem direkten Vorläufer 2-Formamidoacetophenon

Um den Bildungsmechanismus des 2-Aminoacetophenons (2-AAP) in Reisbrot aufzuklären, wurde zunächst die letzte Reaktion, die Hydrolyse des 2-Formamidoacetophenons (FAP), detailliert betrachtet. Durch Backversuche von Reis- und Weizenbrot mit dem Zusatz definierter Mengen an FAP wurden die Umsatzraten sowie die Abhängigkeit von der Getreideart auf die Bildung von 2-AAP überprüft. Der Zusatz von FAP erfolgte gemeinsam mit dem für die Teigherstellung benötigten Wasser, sodass die üblichen Bedingungen des Herstellungsprozesses für die Reaktion beibehalten werden konnten.

Als Resultat wurde in beiden Brotkrumen gleichermaßen ein linearer Anstieg der 2-AAP-Konzentration in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge des Precursors FAP beobachtet (Abbildung 20). Die Umsatzrate lag dabei unabhängig von Reis- oder Weizenmehl bei 12-13 %, die Wiederfindung von FAP hingegen sank mit zunehmender Zusatzmenge, sodass von weiteren Reaktionen sowie von Verlusten aufgrund der Flüchtigkeit ausgegangen werden konnte. Folglich waren die Bedingungen zur Hydrolyse des FAPs zu 2-AAP während der Reis- und Weizenbrotherstellung gleichermaßen gegeben. Die vorliegenden Unterschiede der 2-AAP-Konzentrationen zwischen Reis- und Weizenbrot waren demnach auf abweichende Bedingungen bei der Bildung des FAPs zurückzuführen.

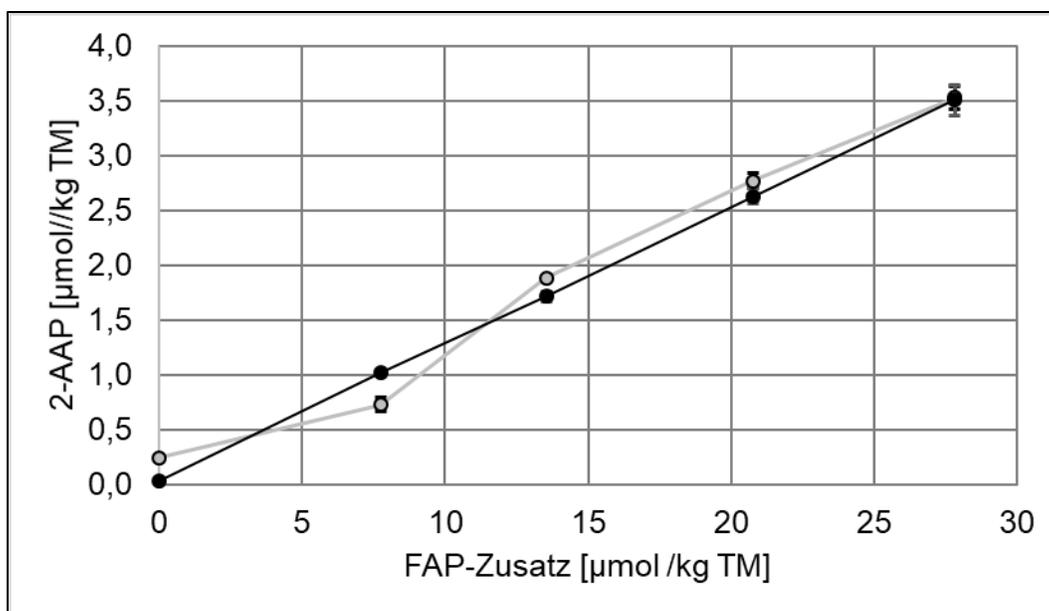


Abbildung 20 Konzentration von 2-Aminoacetophenon (2-AAP) in der Reisbrotkrume (hellgrau) und Weizenbrotkrume (schwarz) in Abhängigkeit vom Zusatz von 2-Formamidoacetophenon (FAP) zum Teig, Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

Die gleichermaßen guten Bedingungen für die Hydrolyse von FAP während der Herstellung von Reis- und Weizenbrot standen jedoch dem Konzentrationsunterschied zwischen Reisbrot und gekochtem Reis gegenüber (siehe Seite 63). Der wichtigste Unterschied in der Herstellung von Reisbrot verglichen mit der herkömmlichen Zubereitung von gekochtem Reis liegt in der Hefefermentation. Die Hefe enthält zum einen selbst 2-AAP sowie dessen Vorstufen Tryptophan (Trp) und Indol-3-essigsäure (IAA) und ist zudem fähig, 2-AAP zu bilden.⁷⁶ Um den Einfluss der Hefe auf den Bildungsmechanismus von 2-AAP während der Herstellung von Reisbrot zu untersuchen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Reisbrote ohne Hefezusatz hergestellt, denen bei der Teigherstellung definierte Mengen des Vorläufers FAP zugesetzt wurden.

Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen den erheblichen Einfluss der Hefe auf die Hydrolyse von FAP zu 2-AAP. Im Gegensatz zur Umsatzrate in der herkömmlichen Reisbrotkrume von etwa 12 %, konnten in der Versuchsreihe mit der Reisbrotkrume, die nicht mit Hefe gelockert wurde, nur geringe Anstiege der 2-AAP-Konzentration nach FAP-Zusatz beobachtet werden. Die Umsatzrate lag hier nur bei

etwa 2 %. Demzufolge war die Hydrolyse der Amidbindung des FAPs vorwiegend auf eine Reaktion zurückzuführen, welche von hefeeigenen Enzymen katalysiert wurde.

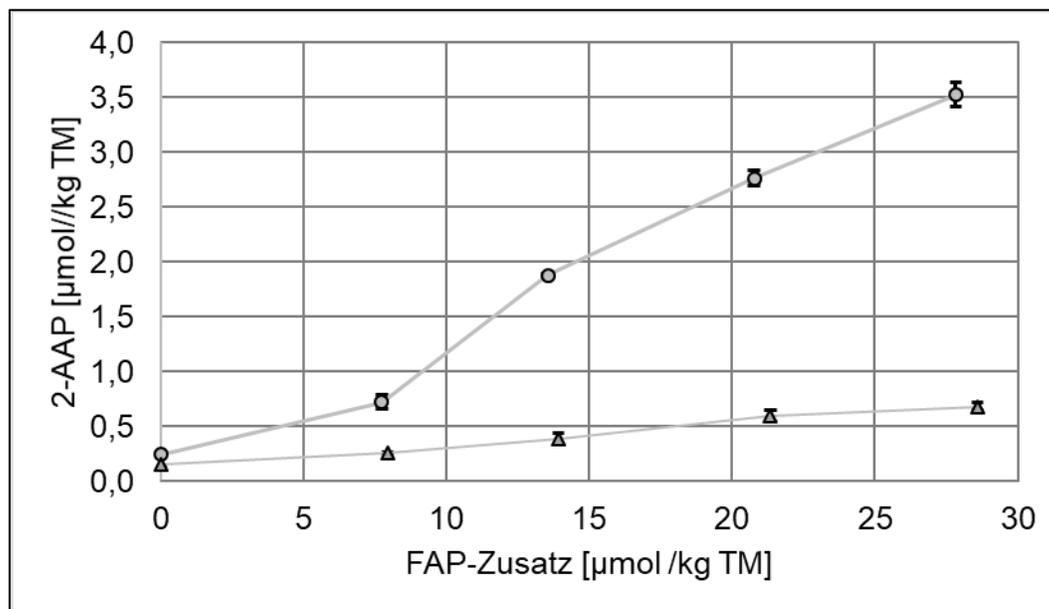


Abbildung 21 Konzentration von 2-Aminoacetophenon (2-AAP) in den Brotkrumen von Reisbrot mit Hefe (o) und ohne Hefe (Δ) in Abhängigkeit vom Zusatz von 2-Formamidoacetophenon (FAP) zum Teig, Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

Einen darüber hinaus wichtigen Einflussfaktor auf die Reaktion könnte der pH-Wert darstellen, da die Hydrolyse der Carbonsäureamidbindung ebenfalls säurekatalysiert ablaufen könnte. Der pH-Wert in Brotteigen wird durch die Hefe beeinflusst, welche Säuren sowohl direkt einträgt als auch während der Fermentation durch Stoffwechselprozesse bildet. Laut einer Studie von Holmes und Hosoney beträgt der pH-Wert eines frisch gekneteten Weizenbrotteiges etwa 6,0 und sinkt während der Fermentation auf 5.3 ab, bevor er während des Backens wieder leicht ansteigt.¹⁰² Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde der pH-Wert in fermentierten Hefeteigen des Reis- und Weizenmehls überprüft (Tabelle 13), da zu diesem Zeitpunkt der niedrigste Wert zu erwarten war. Der pH-Wert des Weizenbrotteiges stimmte gut mit Literaturdaten überein und war etwas höher, als der des Reisbrotteiges.^{102,103}

Tabelle 13 pH-Werte in Reis- und Weizenbrotteig nach der Teigfermentation

	pH-Wert
Reisbrotteig	5,28 ± 0,01
Weizenbrotteig	5,47 ± 0,03

Ein Test der Stabilität des FAPs in wässrigen Lösungen bei verschiedenen pH-Werten (7; 4,8; 2) bei Raumtemperatur bestätigte eine säurekatalysierte Hydrolyse des FAPs nur bedingt (Tabelle 14). Bei neutralem pH-Wert (pH 7) und einem dem Hefeteig ähnlichen pH-Wert (pH 4,8) wurde bei Raumtemperatur keine Hydrolyse des FAPs zu 2-AAP festgestellt. Lediglich bei einem sehr sauren pH-Wert (pH 2) wurde, bei vierzigminütiger Inkubationszeit (entsprechend der Teigfermentationszeit), ein Signal des 2-AAP detektiert, dessen Intensität etwa 10 % des Signals seiner Ausgangsverbindung entsprach.

Tabelle 14 Untersuchung der Bildung von 2-AAP aus FAP in Abhängigkeit vom pH-Wert und der thermischen Bedingungen

	pH 7	pH 4,8	pH 4,8; T ^a	pH 2
Signal FAP ^b	4,9E+05	5,9E+05	5,6E+05	1,3E+06
Signal 2-AAP ^b	0,0E+00	0,0E+00	7,6E+03	1,3E+05
Anteil 2-AAP	0,0 %	0,0 %	1,3 %	9,6 %

^a Thermische Behandlung entsprechend der Brotherstellung (siehe Kapitel 4.9.2), ^b Signalintensitäten der charakteristischen Massenspur m/z 135, bestimmt nach Kapitel 4.10.4

Es wurde jedoch eine geringe Bildung von 2-AAP (1,3 %) beobachtet, wenn eine, den Bedingungen der Brotherstellung entsprechende, thermische Behandlung (siehe Kapitel 4.9.2) bei einem dem Teig ähnlichen pH-Wert stattfand. Somit konnte von einem Einfluss des leicht sauren Teig-pH-Wertes, kombiniert mit den thermischen Bedingungen des Backprozesses, auf die Hydrolyse von FAP zu 2-AAP ausgegangen werden. Da die Umsatzrate deutlich unter der in den Hefeteigen bestehenden Umsatzrate lag, war der pH-Wert jedoch nur als untergeordneter Einflussfaktor einzustufen.

3.3.3.3 Einfluss der Teigfermentationszeit

Die Ergebnisse des vorherigen Kapitels deuteten darauf hin, dass die Bildung des 2-Aminoacetophenons (2-AAP) vorwiegend während der Teigfermentation stattfindet. Um dies zu überprüfen, war eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Reaktion während der Fermentation nötig. Dafür wurden in einem Modellansatz Teige des Reismehls über definierte Zeiträume (40, 120 und 240 min) bei den üblichen Bedingungen (30 °C, Wasserdampfsättigung) fermentiert und darin die Konzentrationen von 2-AAP und seinem Vorläufer 2-Formamidoacetophenon (FAP) bestimmt. Der Ausgangswert vor der Teigfermentation wurde aus den Konzentrationen der Analyten in den Teigzutaten berechnet.

Die Untersuchungen ergaben einen starken Anstieg von FAP und 2-AAP nach der Fermentationszeit von 40 min, der üblichen Fermentationszeit zur Brotherstellung, im Vergleich zum berechneten Ausgangswert (Abbildung 22). Die schnelle Bildung des FAPs könnte von verschiedenen Parametern beeinflusst worden sein. Die Wasserzugabe zur Teigbereitung führte möglicherweise zur Aktivierung der mehleigenen Enzyme, welche die Indol-3-essigsäure (IAA) freisetzen und Oxidationsreaktionen begünstigen. Der Sauerstoffeintrag während des Mischvorgangs könnte zudem die Oxidation der IAA beschleunigt haben, sodass die FAP-Konzentration trotz der Hydrolyse zu 2-AAP stark anstieg. In diesem Zeitraum lag die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung von FAP über der Geschwindigkeit der Hydrolyse zu 2-AAP.

Im weiteren Verlauf der Fermentation (120 und 240 min) stieg die Konzentration des 2-AAPs weiter an, jedoch ließ sich eine Sättigungskurve erahnen. Die FAP-Konzentration nahm hingegen bei einer 120- bzw. 240-minütigen Fermentation im Vergleich zu dem Messpunkt bei 40 min langsam wieder ab. Die Abnahme der FAP-Konzentration verlief jedoch langsamer als die Bildung des 2-AAP, sodass von einer kontinuierlichen Neubildung des FAPs ausgegangen werden konnte. Die Geschwindigkeit der Neubildung des FAPs lag allerdings unter der der Hydrolyse zu 2-AAP. Eine mögliche Erklärung dafür lag in der nachlassenden Verfügbarkeit des, für die Oxidation von Indol-3-essigsäure (IAA) nötigen Sauerstoffs während der

Fermentationszeit. Auch eine Regulation der enzymatischen Oxidation von IAA durch die Abbauprodukte wäre denkbar. Um die Bildung von FAP aus IAA genauer zu untersuchen, wurden in den nachfolgenden beiden Kapiteln Modellexperimente und Backzusatzversuche mit IAA durchgeführt.

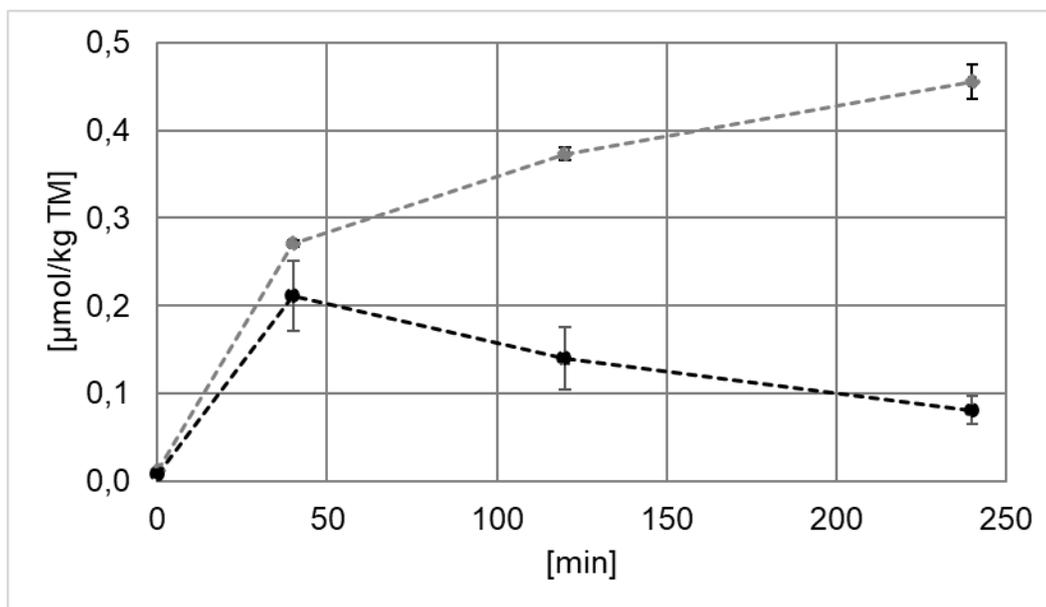


Abbildung 22 Konzentrationen von 2-Aminoacetophenon (grau) und 2-Formamidoacetophenon (schwarz) während der Teigfermentationszeit, Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken, 0-Punkt berechnet aus den Daten des Reismehls und der Hefe

3.3.3.4 Modellstudien zur Bildung von 2-Formamidoacetophenon aus Indol-3-essigsäure

Anhand der Ergebnisse der vorherigen Kapitel galt die Hefefermentation als wichtiger Einflussfaktor zur Hydrolyse von 2-Formamidoacetophenon (FAP) zu 2-Aminoacetophenon (2-AAP). Eine darüber hinaus bestehende Fähigkeit der Hefe, FAP aus Indol-3-essigsäure (IAA) zu bilden, sollte im nächsten Schritt mit Hilfe von Modellexperimenten untersucht werden. Hierfür wurde eine wässrige Hefesuspension (4 %, 20 mL) mit IAA versetzt, thermisch, entsprechend der Bedingungen während der Brotherstellung, behandelt (siehe Kapitel 4.9.3) und auf die Vorkommen von FAP und 2-AAP untersucht. Als Vergleich diente ein Ansatz einer Hefesuspension (4 %, 20 mL) ohne Zusatz von IAA. Um eine mögliche Umwandlung ohne die Beteiligung der Hefe

ausschließen zu können, wurde ein Kontrollwert mit IAA in einer dem Teig-pH entsprechenden wässrigen Essigsäurelösung (20 mL) äquivalent thermisch behandelt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind Tabelle 15 zu entnehmen. Im Kontrollansatz ohne Hefe (Ansatz 1) wurden sehr geringe Mengen an FAP und 2-AAP detektiert. Demnach bestand ein hefeunabhängiger Bildungsweg bei schwach saurem pH-Wert, jedoch nur mit sehr geringer Reaktionsgeschwindigkeit. Von der eingesetzten Menge der IAA wurden nur Stoffmengenanteile von 93 ppm FAP, bzw. 124 ppm 2-AAP wiedergefunden. Der Ansatz der Hefe ohne IAA-Zusatz (Ansatz 2) beinhaltet natürlich vorkommende, geringe Mengen an IAA und 2-AAP, jedoch kein FAP. Nach der thermischen Behandlung konnten jedoch geringe Mengen an FAP nachgewiesen werden, welche etwa 0,15 % der verfügbaren Stoffmenge der IAA entsprachen.

Tabelle 15 Modellversuche zur Bildung von 2-Aminoacetophenon aus Indol-3-essigsäure

Ansatz ^a	IAA	FAP		2-AAP	
	Gesamt ^b	Aus Hefe ^c	Gesamt ^d	Aus Hefe ^c	Gesamt ^d
	[nmol]	[pmol]	[pmol]	[pmol]	[pmol]
1	73,9	-	6,9 ± 0,4	-	9,2 ± 0,2
2	1,5	-	2,3 ± 0,3	28	42 ± 7
3	75,3	-	17 ± 6	28	48 ± 6

^a Ansätze der Modellstudie (1 IAA in Essigsäure ohne Hefe; 2 Hefesuspension ohne IAA-Zusatz, 3 Hefesuspension mit IAA Zusatz; jeweils 20 mL), ^b Summe der in der Hefe natürlich vorkommenden und der zugesetzten IAA, ^c Natürlich in der Hefe enthalte Menge ^d Mittels GCxGC-TOF-MS (siehe Kapitel 4.10.4) bestimmte Menge

Die in Kapitel 3.3.3.2 beschriebene, beschleunigte Hydrolyse des FAPs zu 2-AAP in Anwesenheit der Hefe erwies sich auch in diesem Modellsystem, sodass die 2-AAP-Konzentration in diesem Ansatz die des FAPs deutlich überstieg. Ein Zusatz der IAA zur Hefesuspension (Tabelle 15, Ansatz 3) ergab signifikant höhere Mengen an FAP, als in den beiden anderen Ansätzen gemessen wurde. Somit fand eine Umsetzung der zugesetzten IAA zu FAP in dieser Matrix statt. Jedoch konnten nur eine geringfügig höhere 2-AAP-Konzentration beim IAA-Zusatz (Ansatz 3) verglichen mit der Hefesuspension ohne IAA-Zusatz (Ansatz 2) verzeichnet werden. Die Hydrolyse des

FAPs war demnach in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit begrenzt. Eine mögliche Ursache dafür lag in dem Mangel an Nährstoffen im Modellsystem verglichen mit einem Brotteig, welcher die Aktivität der Hefe beeinträchtigt haben könnte.

Dennoch konnte die Hefe als wichtiger Einflussfaktor der Bildungsreaktion von 2-AAP aus IAA über das Zwischenprodukt FAP angesehen werden. Um diesen Sachverhalt abzusichern, wurde ein weiterer Ansatz entsprechend dem Ansatz 3, mit einem Zusatz von stabilisotopenmarkierter [d₅]-IAA, anstatt der nicht isotopenmarkierten IAA, durchgeführt. In diesem Ansatz waren nur qualitative Einschätzungen möglich, da der Zusatz des zum quantifizieren notwendigen [d₃]-2-AAP die Massenspektren überlagern würde.

Dieser Ansatz untermauerte die vermutete Bildungsreaktion. Aus dem [d₅]-IAA entstanden beide äquivalent deuterierten Reaktionsprodukte ([d₅]-FAP und [d₄]-2-AAP), welche anhand der jeweiligen Retentionszeiten und der EI-Massenspektren identifiziert wurden. In Abbildung 23 wurden die Massenspektren des FAPs (A) und des fünffach deuterierten FAPs (B) gegenübergestellt. Das [d₅]-FAP besaß dabei einen relativen Anteil von 69 % der Summe der Signale der isotopenmarkierten und unmarkierten Substanz, sodass in diesem Ansatz vorwiegend das zugesetzte [d₅]-IAA umgewandelt wurde.

Hingegen konnte das isotopenmarkierte [d₄]-2-AAP nur in geringen Anteilen detektiert werden. Abbildung 24 vergleicht das Massenspektrum von unmarkiertem 2-AAP (A) mit dem des durch die Modellfermentation von [d₅]-IAA erhaltenen Spektrums (B). In Letzterem lag nur ein geringer Anteil des [d₄]-2-AAP vor, erkennbar anhand der jeweils um $m/z = 4$ höheren Massensignale verglichen zu den charakteristischen Massensignalen der unmarkierten Substanz. Der relative Anteil des [d₄]-2-AAP betrug nur 16 %. Dies war vor allem mit dem natürlichen Vorkommen an nicht-isotopenmarkiertem 2-AAP sowie nicht-isotopenmarkierter IAA in der Hefe zu erklären.

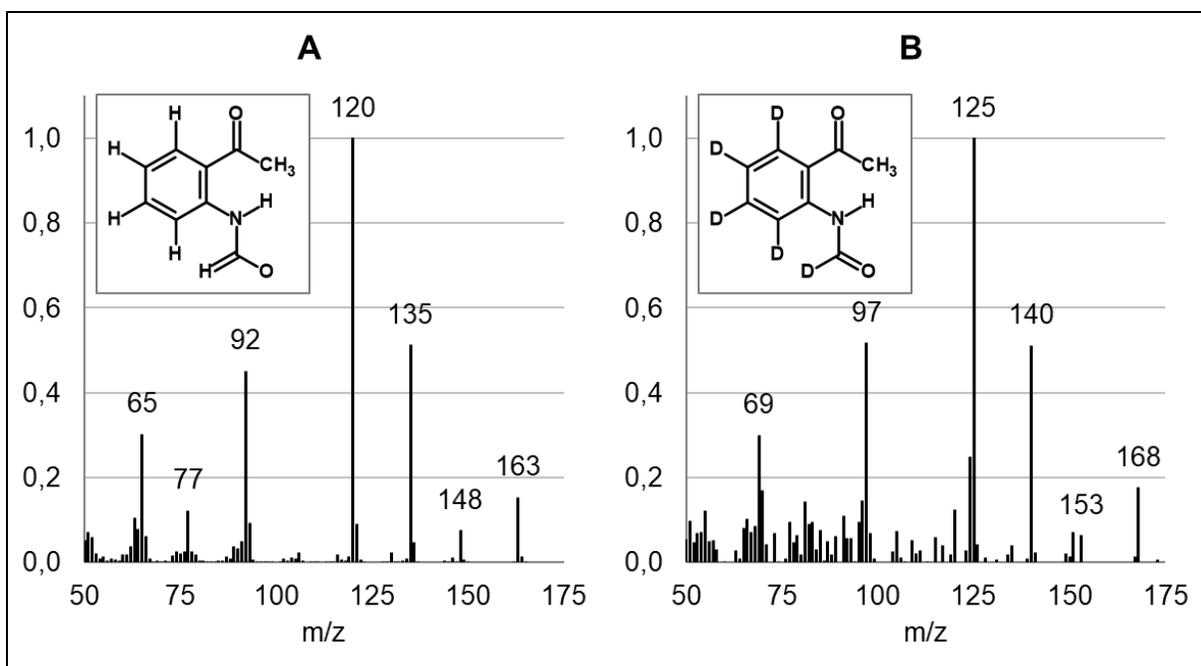


Abbildung 23 EI-Massenspektren von 2-Formamidoacetophenon (A) und von [d₅]-2-Formamidoacetophenon (B)

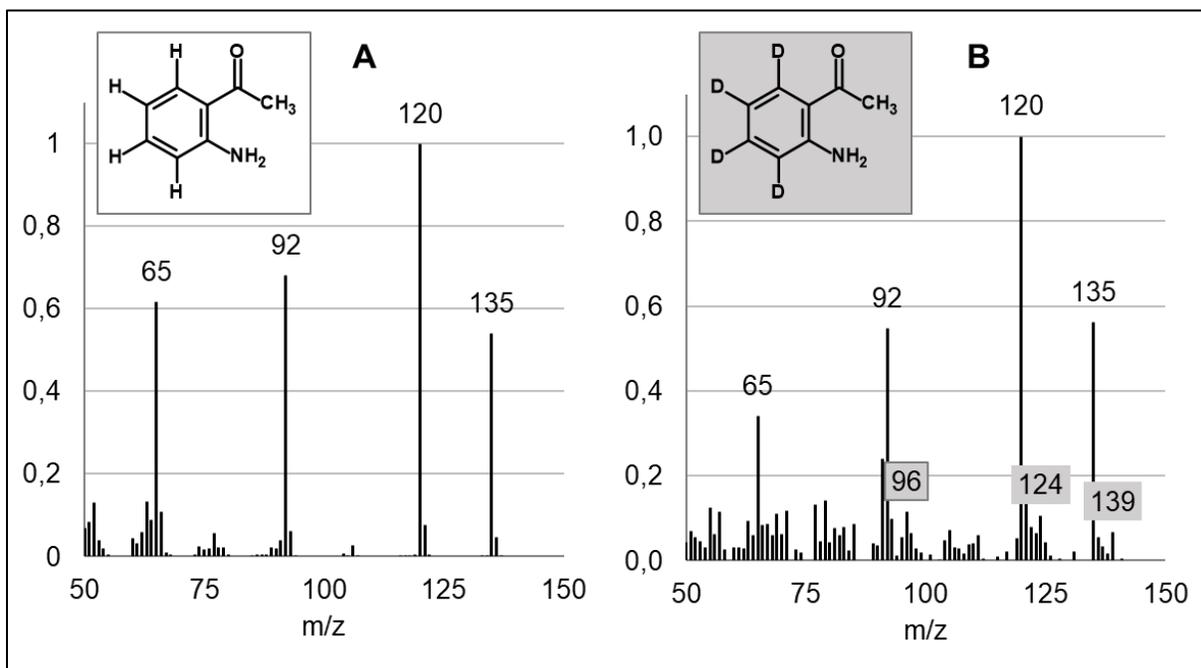


Abbildung 24 EI-Massenspektren von 2-Aminoacetophenon (A) und von dessen Mischung mit [d₄]-2-Aminoacetophenon (B)

Anhand der Modellexperimente wurde die hefeabhängige Bildung von FAP und 2-AAP aus IAA belegt. Die Reaktionsgeschwindigkeit des Abbaus von IAA war jedoch sehr niedrig, wie bereits von Hoenicke et al. angemerkt wurde.⁷³ Sie ist darüber hinaus abhängig von der Matrix, bzw. der darin enthaltenen Enzyme und dem Nährstoffangebot für die Hefe. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Matrix in die Experimente einbezogen.

3.3.3.5 Backversuche mit Zusatz von Indol-3-essigsäure

Der zuvor beschriebene Anstieg der Konzentrationen an 2-Formamidoacetophenon (FAP) und 2-Aminoacetophenon (2-AAP) bei Zusatz von Indol-3-essigsäure (IAA) in wässrigen Modellsystemen sollte im Folgenden in Form von Backexperimenten überprüft werden. Dafür wurden die Brotteige aus Reis- und Weizenmehl mit definierten Mengen an IAA versetzt (siehe Kapitel 4.9.5). Diese Mengen wurden dann in Abbildung 25 den analytisch ermittelten Konzentrationen von 2-AAP und FAP in den Brotkrumen des Reisbrotes (A), des Weizenbrotes (B) und des Reisbrotes ohne Hefe (C), gegenübergestellt.

Bei keiner der untersuchten Brotsorten wurde ein linearer Bezug zwischen dem IAA-Zusatz und den bestimmten Mengen der Reaktionsprodukte verzeichnet. In der Reisbrotkrume bestand ein Anstieg beider Analyten während der ersten beiden Messpunkte im Vergleich zum Ausgangswert, wobei die Konzentration des FAPs deutlich schneller anstieg. Bei höherem IAA-Zusatz sanken die Konzentrationen jedoch wieder. So schien es, als wäre die Reaktion zur Bildung von FAP bei zu hohen IAA-Konzentrationen unterdrückt worden, sodass die Konzentration des FAPs bei hohen IAA-Zusätzen wieder deutlich unter die des 2-AAPs sank. Es wurde demnach mehr FAP zu 2-AAP hydrolysiert als aus IAA nachgebildet wurde.

In der Weizenbrotkrume lag die Konzentration des 2-AAPs stets über der des FAPs. Äquivalent zur Reisbrotkrume stiegen die Analytkonzentrationen während der ersten beiden Messpunkte im Vergleich zum Ausgangswert an, schwankten jedoch sehr stark. Höhere IAA-Zusätze führten zu keinen Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert. Generell lagen die bestimmten Analytkonzentrationen deutlich unter denen der

Reisbrotkrume. Wie in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben, lagen in fermentierten Weizenbrotteig generell höhere Mengen an freier IAA vor als in Reisbrotteig. Dennoch wurden geringere Mengen FAP und 2-AAP in der Weizenbrotkrume detektiert und ein Zusatz von IAA hatte kaum Auswirkungen darauf. Folglich musste eine Unterdrückung des oxidativen Abbaus der IAA aufgrund von natürlichen Antioxidantien oder anderen regulatorischen Effekte im Weizenbrotteig stattgefunden haben.

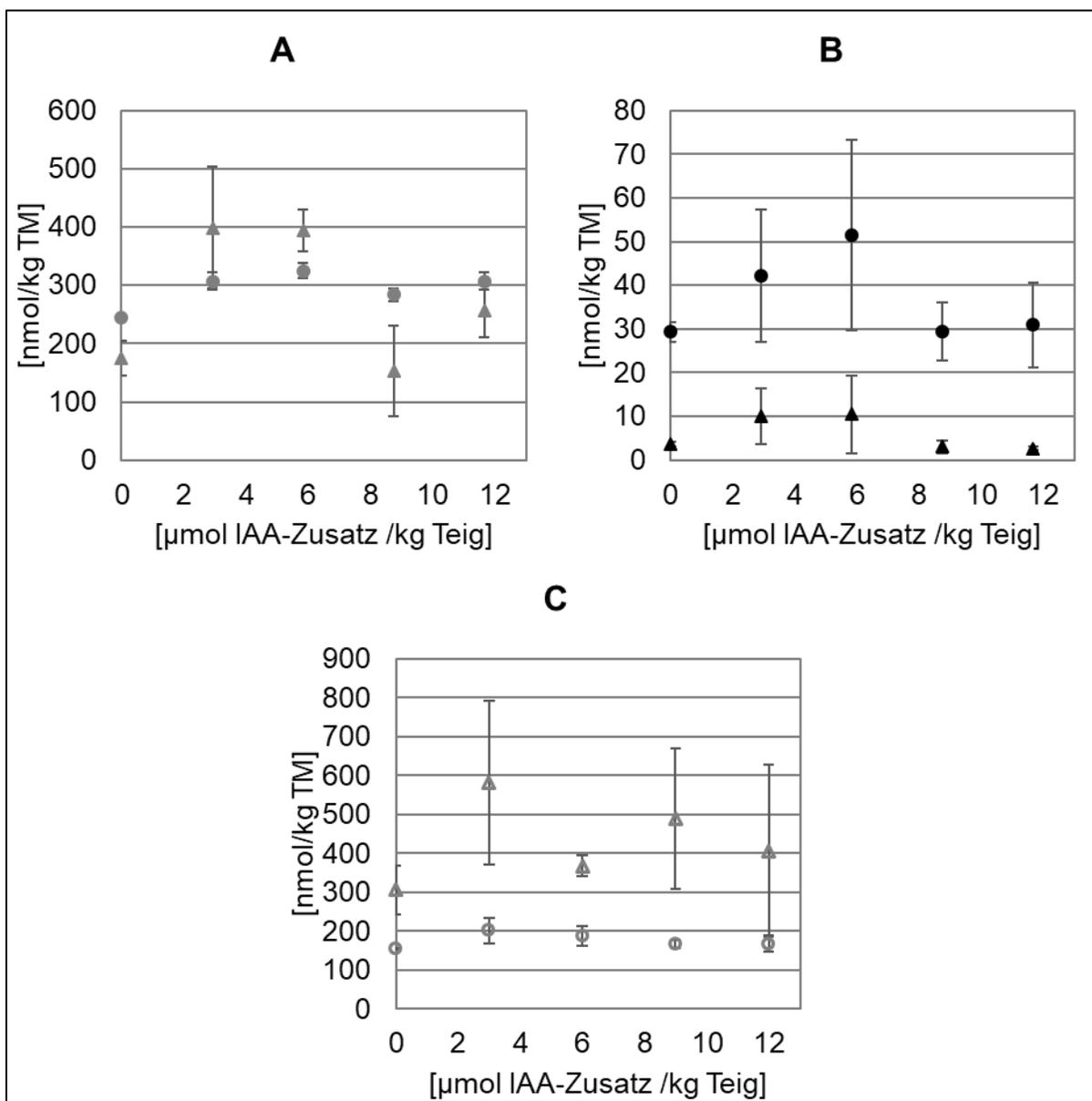


Abbildung 25 Konzentrationen von FAP (Δ) und 2-AAP (o) in den Brotkrumen von Reisbrot (A), Weizenbrot (B) und Reisbrot ohne Hefe (C) in Abhängigkeit von der Zusatzmenge an Indol-3-essigsäure, Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

In der Krume des Reisbrotes ohne Hefe (Abbildung 25 C) lagen die 2-AAP-Konzentrationen bei allen Messpunkten unter denen des FAPs, da die Hefe, welche die Hydrolyse des FAPs begünstigte, fehlte. Unabhängig vom IAA-Zusatz blieb die 2-AAP-Konzentration in allen Proben unverändert, jedoch waren Veränderungen der FAP-Konzentration zu verzeichnen. Aufgrund der starken Schwankungen der Messergebnisse bei IAA-Zusatz ließ sich jedoch kein Trend erkennen.

3.3.3.6 Übersicht der Einflussfaktoren auf die Bildung von 2-Aminoacetophenon in Reisbrot

Die in Kapitel 3.3.3 angestellten Untersuchungen bestätigten den in der Literatur für Wein beschriebenen Bildungsmechanismus des 2-Aminoacetophenons (2AAP) aus Indol-3-essigsäure.^{69,71–73} Jedoch unterscheiden sich die Herstellungsbedingungen von Brot und Wein, sodass von abweichenden Einflussfaktoren auf die Reaktion ausgegangen werden muss. Der letzte Teilschritt der Reaktion, die Hydrolyse von 2-Formamidoacetophenon (FAP) zu 2-AAP wurde bei der Brotherstellung durch eine enzymatische Katalyse der Hefe begünstigt. Die Anwesenheit der Hefe als Teiglockerungsmittel führte in Backversuchen des Reisbrotes zu einer deutlich höheren Umsatzrate bei der Brotherstellung als bei einem gleichwertigen Teigsystem ohne Hefe. Dies erklärte die um etwa Faktor 3 höheren 2-AAP-Konzentrationen in Reisbrot verglichen mit gekochtem Reis.⁶¹ Studien zur Bildung von 2-AAP in Wein maßen der Hefe hingegen nur einen geringen Einfluss bei und sprachen dagegen von einer spontanen Hydrolyse von FAP zu 2-AAP.^{71,73} Dies könnte mit dem pH-Wert in Wein (pH 2,8-3,8) zusammenhängen,⁷ welcher stark von dem in Reis- und Weizenbrotteig (pH 5,3-5,5) abwich. Auch die Unterschiede der Fermentationstemperatur und Zeit könnten die geringere Bedeutung der Hefe für die Reaktion bei der Weinherstellung verglichen mit der Brotherstellung erklären.

Backzusatzversuche verdeutlichten zudem die Unabhängigkeit der Hydrolyse von FAP zu 2-AAP von der Getreideart, sodass die Reaktion in Weizen- und Reisbrot gleichermaßen verlief. Der Unterschied der 2-AAP-Konzentration zwischen Weizen- und Reisbrot lag daher vielmehr in der Verfügbarkeit des FAPs im Mehl bzw. im Brotteig,

welche in Weizenmehl bzw. dessen Teig nur sehr gering war. Um dies zu ergründen, wurde die Bildung von FAP aus IAA in weiteren Versuchen beleuchtet.

Untersuchungen verschieden lang fermentierter Reisbrotteige zeigten eine stetige Nachbildung von FAP während der Fermentation. Jedoch war die Bildungsgeschwindigkeit nicht konstant und nahm mit der Zeit ab. Dies könnte mit dem Sauerstoffeintrag während des Knetens zusammenhängen, welcher den Abbau der Indol-3-essigsäure (IAA) über mehrere Schritte zu FAP durch eine radikalische Oxidation begünstigte (siehe Kapitel 1.7.4.). Modellversuche bestätigten die Bildung von FAP aus Indol-3-essigsäure (IAA) in Hefesuspensionen, ergänzend zu dem bekannten, durch Enzyme des Reismehls gesteuerten Bildungsmechanismus.^{74,77} Die höhere Menge an freier IAA im Reismehl im Vergleich zu Weizenmehl könnte sich somit begünstigend auf die Bildung von FAP und 2-AAP bei der Reisbrotherstellung ausgewirkt haben. Dem widersprach jedoch die hohe IAA-Konzentration in Weizenbrotteig, welche auf eine starke Freisetzung der IAA durch die Hefe zurückzuführen war und die vorliegende freie IAA im fermentierten Reisbrotteig übertraf. Es fand demzufolge eine starke Anreicherung der IAA im Weizenbrotteig statt, was auf eine Hemmung des oxidativen Abbaus zurückgeführt werden könnte. Backzusatzexperimente bestätigten, dass es sich bei der Abbaureaktion von IAA zu FAP um einen komplexen Mechanismus handelte. Der Zusatz von geringen Mengen an IAA zum Reisbrotteig bewirkte einen Anstieg der Metaboliten FAP und 2-AAP. Zu hohe Mengen führten jedoch zu einer Abnahme der FAP- und 2-AAP-Bildung, vermutlich verursacht durch regulatorische Mechanismen, welche die enzymatisch ablaufenden Reaktionen kontrollieren. Beim Weizenbrot wurde zudem kaum ein Einfluss durch den Zusatz von IAA verzeichnet.

Zuletzt musste auch die Komplexität der Brotteigmatrix in die Diskussion einbezogen werden. Ein bedeutender Unterschied zwischen Teigen aus Weizen- und Reismehl lag im Nährstoffangebot (z.B. freie Aminosäuren), welche den Stoffwechsel der Hefe beeinträchtigten. Bereits Ciolfi et al. beobachteten in einem synthetischen Nährmedium ein niedriges Nahrungsangebot für die Hefe als begünstigend für die Bildung von 2-AAP.

Anhand der Ergebnisse könnten verschiedene Maßnahmen zur Verringerung des 2-AAP-Gehalts in Reisbrot abgeleitet werden, um eine Angleichung an das Aroma von Weizenbrot zu erreichen. Ein Zusatz von Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure, Tocopherol oder β -Carotin) oder von glutenfreien Mehlen mit höherem Anteil phenolischer Verbindungen (z.B. Mais oder Buchweizen)^{98,99} könnte die Oxidation von IAA hemmen. Eine Steigerung der Konzentration der für die Hefe verfügbaren Nährstoffe im Reisbrotteig könnte zudem Einfluss auf den Hefestoffwechsel nehmen und hungerbedingte Stoffwechselwege der Hefe vermeiden. Ein Zusatz freier Aminosäuren wäre zum Beispiel durch die Verwendung von Proteinhydrolysaten realisierbar.

3.4 Einfluss des Mehllalters auf das Reisbrotaroma

3.4.1 Generelle Charakterisierung von Reisbrot in Abhängigkeit vom Mehllalter

Um den Einfluss des Mehllalters auf die Qualität von Reisbrot zu überprüfen wurde ein Reisbrot aus einem über einen Zeitraum von zwei Jahren gelagerten Reismehl (Mehlcharge R2) entsprechend der vorherigen Kapitel untersucht und die Daten mit dem Reisbrot aus dem frischen Reismehl (Mehlcharge R1) verglichen.

3.4.1.1 Optimaler Wasserzusatz bei der Reisbrotherstellung in Abhängigkeit vom Mehllalter

Veränderungen der Reismehlzusammensetzung und der funktionellen Eigenschaften der Inhaltsstoffe des Reismehls betrafen auch die Wasserbindungseigenschaften. So ist eine Zunahme der Wasserbindungskapazität des Reismehls während der Lagerung bekannt.^{63,104}

Zur Bestimmung der optimalen Wassermenge zur Herstellung eines Reisbrotes aus der gelagerten Mehlcharge R2 wurden Backversuche mit verschiedenen Wasserzusätzen (Einfachbestimmungen) zur Teigherstellung (jeweils relativ zur Mehl trockenmasse) durchgeführt und mit den Daten von Broten aus der frischen Mehlcharge R1 verglichen. Die Einschätzung der in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse erfolgte anhand des Brotvolumens und einer optischen Bewertung der Beschaffenheit der Brotkrume.

	90%	95%	100%	105%	110%	115%
R1						
Volumen	2,69 ml/g	2,60 ml/g	2,92 ml/g	2,11 ml/g	1,89 ml/g	1,61 ml/g
R2	Nicht untersucht	Nicht untersucht				
Volumen			2,12 ml/g	1,85 ml/g	1,54 ml/g	1,54 ml/g

Abbildung 26 Brotvolumen und Krumenstruktur der Reisbrote, hergestellt aus der frischen (R1) und der gelagerten (R2) Mehcharge, in Abhängigkeit vom Wasserzusatz bezogen auf die Mehl trockenmasse

Im Rahmen der Untersuchungen wurde eine höhere Wasserbindungskapazität des gelagerten Reismehls mit einem Optimum von 105 % im Vergleich zur frischen Charge (100 %) gefunden. Bei Wasserzusätzen unter dem Optimum kam es bei beiden Mehchargen zur Ausbildung größerer Poren und einer unregelmäßigen Krumenstruktur. Zudem war bei Wasserzusätzen unter dem Optimum bei der Reismehlcharge R1 eine Abnahme des Brotvolumens zu beobachten. Wasserzusätze über dem Optimum führten bei beiden Mehchargen zu einer Abnahme des Brotvolumens. Das gelagerte Reismehl zeichnete sich jedoch durch eine höhere Toleranz gegenüber dem Zusatz von Wasser aus. So war auch bei einem Wasserzusatz von 115 % noch eine gleichmäßige Porung vorhanden, wohingegen bei der Brotkrume des frischen Reismehls R1 starke Unregelmäßigkeiten auftraten, welche auf eine Entmischung hindeuteten. Die in diesem Kapitel ermittelten optimalen Wasserzusätze wurden bei allen weiteren Untersuchungen verwendet.

3.4.1.2 Brotvolumen und Krumenstruktur der Reisbrote in Abhängigkeit vom Mehllalter

Die Untersuchungen genereller Qualitätsparameter (Brotvolumen und Krumenstärke) der Reisbrote der beiden Mehllagen deuteten eine Verschlechterung der Backeigenschaften von gelagertem Reismehl an. Das Volumen des Brotes aus der gelagerten Mehllage R2 lag mit 1,9 mL/g etwa 30 % unter dem Volumen des Reisbrotes aus der frischen Mehllage R1 (2,7 mL/g), wie Abbildung 27 A verdeutlicht. Einhergehend mit dem niedrigeren Volumen wurde für das Brot aus dem Mehl R2 eine höhere Krumenstärke gemessen (Abbildung 27 B).

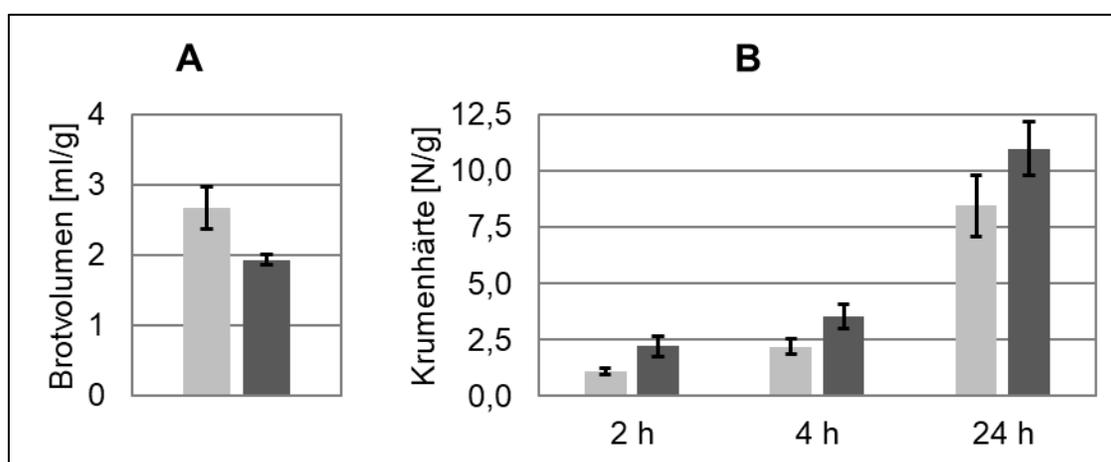


Abbildung 27 Brotvolumen (A) und Krumenstärke (B) von Reisbroten, hergestellt aus der frischen Reismehllage R1 (hellgrau) und der gelagerten Reismehllage R2 (grau)

Diese Parameter zeigten von einer Abnahme des Gashaltevermögens des Reisbrotteiges bei zunehmendem Mehllalter, sodass eine kompaktere Krumenstruktur mit weniger Gasblasen entstand (siehe Abbildung 28). Die Gasblasen der Reisbrotkrume des aus dem gelagerten Reismehl R2 hergestellten Brotes waren deutlich größer und weniger gleichmäßig verteilt. Auch zeigte die Brotkruste zwar weniger Risse, jedoch eine weniger gleichmäßige Struktur, als die des Brotes aus der frischen Reismehllage R1 und ließ ein Kollabieren des Teiges vor der Ausbildung der Krumenstruktur während des Backens vermuten.

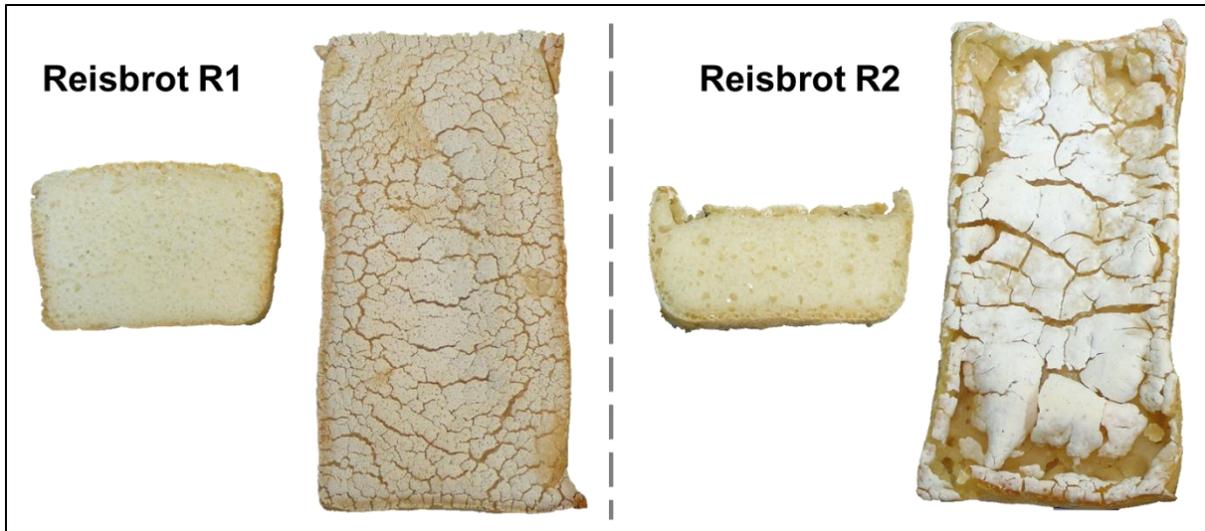


Abbildung 28 Reisbrote hergestellt aus der frischen (R1) und gelagerten (R2) Mehlscharge: Brotkrumen und Brotkrusten im optischen Vergleich

Ursachen für das schlechtere Gashaltevermögen des gelagerten Mehles lagen in der Veränderung der funktionellen Eigenschaften der Inhaltsstoffe des Reismehls, insbesondere der Kohlenhydratfraktion. Dazu zählen z.B. Veränderungen der Verkleisterungseigenschaften, der Wasserbindungsfähigkeit sowie der Teigviskosität. Besonders bei höheren Lagertemperaturen ($>30\text{ }^{\circ}\text{C}$) beobachteten verschiedene Autoren einen Anstieg der Verkleisterungstemperatur und der Verkleisterungsenthalpie, aber auch bei einer Lagerung bei 4°C kam es über längere Zeiträume zu Veränderungen.^{105,106} Ebendies könnte die Einbußen im Brotvolumen verursachen, da die Gasblasen im Teig während des Backprozesses rissen, bevor eine Verfestigung der Struktur eintrat, wie es von Masure et al. beschrieben wurde.²²

Die Krumenhärte des frisch gebackenen Reisbrotes der gelagerten Charge R2 war 2 h nach dem Backen etwa doppelt so hoch wie diejenige des Brotes aus R1 (Abbildung 27 B). Der Anstieg der Krumenhärte während der Lagerung (4 und 24 h nach dem Backen) verlief jedoch bei beiden Reisbrotkrumen etwa in gleicher Geschwindigkeit. Die Alterung aufgrund der Wassermobilität und der Retrogradation waren somit als unabhängig vom Mehllalter einzustufen. Dies stand in Übereinstimmung mit bisherigen Literaturdaten, welche den Veränderungen der Reisstärke eine geringe Bedeutung

zuwiesen und die altersbedingten Veränderungen des Reismehls eher in den Veränderungen der Proteine sahen.⁶³

3.4.1.3 Sensorische Untersuchungen der Reisbrote in Abhängigkeit vom Mehllalter

Im ersten Schritt der sensorischen Untersuchungen wurden die Brotkrumen und Brotkrusten, welche aus der frischen (R1) und der gelagerten (R2) Reismehlcharge hergestellt wurden, einem Triangeltest nach 4.5.1 unterzogen. Ziel der Untersuchung war die Überprüfung auf signifikante, sensorisch wahrnehmbare Unterschiede zwischen den Proben. Dies konnte sowohl zwischen den Brotkrumen als auch den Brotkrusten mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,001$ bestätigt werden (siehe Tabelle 16). Die von den Teilnehmern anzugebende Intensität des wahrnehmbaren Unterschieds auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) lag im Mittelwert bei den Brotkrumen (3,0) etwas höher als bei den Brotkrusten (2,3). Die Frage nach der Geruchsqualität, in welcher sich die Brotkrumen unterschieden, ergab keine übereinstimmenden Angaben der Teilnehmer. Im Gegensatz dazu gaben etwa 40 % der Teilnehmer an, die Brotkruste aus dem frischen Reismehl R1 aufgrund des intensiveren röstigen Geruchs von derjenigen aus dem gelagerten Reismehl R2 unterscheiden zu können.

Tabelle 16 Ergebnis des Triangeltests auf einen signifikanten Unterschied zwischen den Reisbrotkrumen bzw. Krusten, hergestellt aus den beiden Reismehlchargen R1 und R2

Proben	Zahl richtiger Antworten	n	Signifikanzniveau des Unterschiedes ^a
Brotkrumen	29	30	hoch signifikant
Brotkrusten	22	30	hoch signifikant

^a Zahl nötiger richtiger Antworten bei $n = 30$: 15 (signifikant, $p = 0,05$), 17 (sehr signifikant, $p = 0,01$), 19 (hoch signifikant, $p = 0,001$)

Detailliertere Vergleiche der sensorischen Unterschiede zwischen den Brotproben ergaben die in Abbildung 29 dargestellten Aromaprofile, in welchen die Brotkrumen (A) und die Brotkrusten (B) der beiden Mehlchargen verglichen wurden. Die Brotkrume aus der gelagerten Mehlcharge R2 wick durch geringere Intensitäten der Geruchsnoten

„hefig“ und „gekochte Kartoffel“ und durch eine etwas stärkere fettige Note von der Brotkrume des frischen Mehles R1 ab. Zudem erinnerte sie intensiver an Reis, die in beiden Proben am höchsten bewertete Geruchsqualität. Die übrigen Geruchsattribute (malzig, sauer, schweißig, Karamell und röstig) trafen auf beide Brotkrumen gleichermaßen zu.

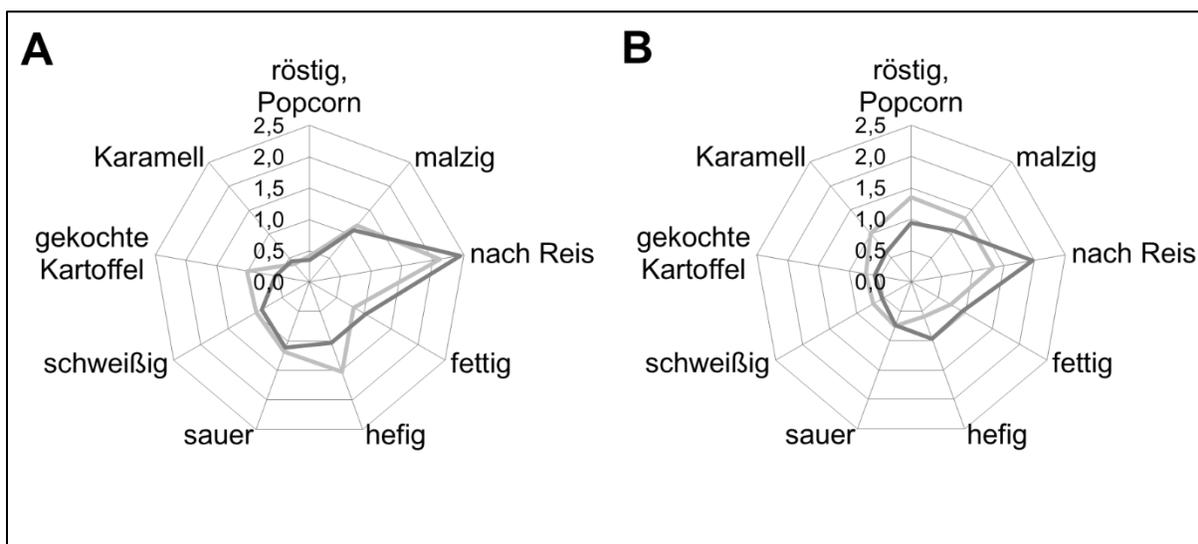


Abbildung 29 Sensorische Aromaprofile der Brotkrumen (A) und Brotkrusten (B) von Reisbrot, hergestellt aus der frischen Reismehlcharge R1 (hellgrau) und der gelagerten Reismehlcharge R2 (grau)

Stärkere Abweichungen lagen zwischen den Brotkrusten vor. In Übereinstimmung mit dem Triangeltest mangelte es der Brotkruste aus der gelagerten Mehlcharge R2 an dem röstigen, popcornartigen Aroma. Aber auch die Geruchsqualitäten „malzig“ und „Karamell“ sowie in geringem Maße „schweißig“ und gekochte Kartoffel“ wurden in der Brotkruste von R2 niedriger bewertet als in der Brotkruste von R1. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Brotkrumen wies die Kruste des Brotes aus dem gelagerten Mehl R2 stärker hervortretende fettige und an Reis erinnernde Eindrücke sowie eine stärker hefige Note im Vergleich zur Kruste aus dem Mehl R1 auf. Die Ergebnisse der sensorischen Untersuchungen verdeutlichen einen beträchtlichen Einfluss des Alters des verwendeten Reismehls auf das Gesamtaroma daraus hergestellter Brote, sowohl in den Brotkrumen als auch in den Brotkrusten. Dieser Sachverhalt wurde im Folgenden auf molekularer Ebene unter Anwendung des Sensomics Ansatzes im Detail untersucht.

3.4.2 Identifizierung relevanter Aromastoffe im Reisbrot der gelagerten Reismehlcharge R2

Die Untersuchung des Aromas der Reisbrotkrume und –kruste aus der gelagerten Mehlcharge R2 mittels AEVA (siehe Kapitel 4.6.2) ermöglichte die Identifizierung von 44 Aromastoffen in der Brotkrume, bzw. 45 in der Kruste (Tabelle 17). Die höchsten FD-Faktoren erreichten in beiden Proben die Aromastoffe **34** (blumig, Honig), **48** (würzig), **49** (foxy) und **53** (Honig, Bienenwachs, FD ≥ 521), **12** (gekochte Kartoffel), **26** (Zitrus, seifig, grün), **27** (schweißig), **32** (grün, fettig), **40** (Kokos) und **54** (Vanille, FD ≥ 256) sowie **3** (malzig, FD 128). In der Reisbrotkrume wurde zudem **47** (rauchig, Nelke) mit einem höheren FD Faktor (FD 256) als in der Kruste (FD 64) wahrgenommen. Hingegen erreichten die Aromastoffe **41** (Karamell, FD 2049), **7** (röstig, Popcorn) und **39** (metallisch, FD 254) sowie **2**, **6**, **11**, **45** und **50** (FD 128) nur in der Reisbrotkruste relevante FD Faktoren ≥ 128 . Bei diesen Verbindungen handelte es sich vorrangig um Aromastoffe, deren Bildungswege thermisch bedingt, durch *Maillard* Reaktion (**7**, **41**) sowie andere thermische Reaktionen (**11**, **50**) ablaufen und um Lipidabbauprodukte (**2**, **6**, **39**). Ein signifikanter Unterschied (≥ 3 Verdünnungsstufen Unterschied) lag jedoch nur bei den Verbindungen **6**, **7** und **41** vor.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 17 Ergebnisse der AEVA der Reisbrotkrume und -kruste, hergestellt aus der gelagerten Reismehlcharge R2: olfaktorische und gaschromatographische Daten

Nr. Aromastoff ^a	Geruchsqualität ^b	RI ^c		FD-Faktor ^d	
		FFAP	DB5	Krume	Kruste
1 Diacetyl	Butter	991	605	64	64
2 Hexanal	grün, grasig	1084	810	32	128
3 2- und 3-Methyl-1-butanol	malzig	1204	732	128	128
5 Acetoin	Butter, Karotte	1284	711	2	4
6 1-Octen-3-on	pilzig	1298	973	4	128
7 2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig, Popcorn	1326	916	32	256
8 (Z)-1,5-Octadien-3-on ^e	metallisch, Geranie	1372	976	8	16
9 2,3,5-Trimethylpyrazin	erdig	1398	1000	2	8
10 (E)-2-Octenal	grün, fettig	1425	1055	4	8
11 Essigsäure	sauer	1445	611	32	128
12 Methional	gekochte Kartoffel	1455	898	256	512
13 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	erdig, röstig	1484	1153	8	8
15 (Z)-2-Nonenal	grün, fettig	1500	1143	64	4
16 (E)-2-Nonenal	grün, fettig	1529	1157	64	16
18 2-Butyl-2-heptenal	Zitrus, seifig, grün	1563	1278	2	2
19 Methylpropansäure	sauer, käsig	1562	800	16	16
20 2-Propyl-2-octenal	Zitrus, seifig, grün	1572	1286	4	2
21 (E,Z)-2,6-Nonadienal ^e	Gurke	1581	1153	4	4
23 Buttersäure	schweißig	1627	825	64	64
24 Phenylacetaldehyd	Honig	1644	1039	8	16
26 (Z)-2-Butyl-2-octenal	Zitrus, seifig, grün	1663	1374	256	256
27 2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig	1666	873	256	1024
28 (E,E)-2,4-Nonadienal	Gurke	1695	1214	32	64
29 Pentansäure	sauer	1734	925	8	32
30 (E,Z)-2,4-Decadienal	grün, fettig	1755	1298	8	1
31 2-Acetyl-2-thiazolin	röstig, Popcorn	1758	1100	<1	8
32 (E,E)-2,4-Decadienal	grün, fettig	1811	1319	256	512
33 Hexansäure	sauer, stechend	1843	1004	64	64
34 2-Phenylethanol	blumig, Honig	1920	1109	512	1024
36 Heptansäure	sauer, stechend	1951	1102	8	8

Ergebnisse und Diskussion

37	4-Hydroxy-2-octensäurelacton ^f	Kokos	1969	1243	8	16
39	tr-4,5-Epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	metallisch	2003	1378	64	256
40	γ -Nonalacton	Kokos	2032	1360	256	256
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(<i>2H</i>)-furanon	Karamell	2041	1065	64	2048
42	Octansäure	sauer, muffig	2056	1279	32	64
43	4-Hydroxy-2-nonensäurelactone	Kokos	2076	1345	32	64
45	4-Methylchinazolin	Minze	2091	1353	32	128
46	γ -Decalacton	Kokos	2148	1470	4	16
47	2-Methoxy-4-vinylphenol	rauchig, Nelke	2209	1311	256	64
48	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(<i>5H</i>)-furanon ^e	würzig	2213	1106	512	1024
49	2-Aminoacetophenon	foxy	2223	1302	512	512
50	4-Vinylphenol	phenolisch	2395	1215	32	128
51	Indol	fäkalisch	2452	1291	8	8
53	Phenylelessigsäure	Honig, Bienenwachs	2568	1267	512	512
54	Vanillin	Vanille	2586	1398	256	1024

^{a-f} siehe Tabelle 2

Der Vergleich der mittels AEVA gewonnenen Daten der Reisbrotkrumen und -krusten, hergestellt aus der frischen Reismehlcharge R1 (Tabelle 3, Kapitel 3.2.1) und der gelagerten Charge (Tabelle 17) ermöglichte Rückschlüsse auf den Einfluss der Lagerzeit des Reismehls auf die Brotaromastoffe. So konnte festgestellt werden, dass die meisten Aromastoffe in allen Brotproben identifiziert wurden und sich nur in ihren Intensitäten unterschieden. Die ausschließlich in den Brotproben des frischen Reismehls R1 nachweisbaren Verbindungen (*Z*)-4-Heptenal (**4**), 4-Methylphenol (**44**) und 3-Methylindol (**52**) besaßen nur geringe FD-Faktoren (FD \leq 8). Ebenso verhielt es sich mit den, ausschließlich in den Brotproben der gelagerten Mehlcharge R2 nachweisbaren Aromastoffen 2,3,5-Trimethylpyrazin (**9**), 2-Butyl-2-heptenal (**18**), 2-Propyl-2-octenal (**20**) und Pentansäure (**29**, FD \leq 32).

Sowohl in der Brotkrume als auch der Kruste, welche aus der gelagerten Mehcharge R2 hergestellt wurden, erreichten zahlreiche Lipidabbauprodukte signifikant höhere FD-Faktoren als in den aus frischem Mehl hergestellten Proben. Darunter waren die aliphatischen Aldehyde Hexanal (**2**), (*E*)-2-Octenal (**10**) und (*Z*)-2-Butyl-2-octenal (**26**) sowie die aliphatischen Säuren Buttersäure (**23**), Pentansäure (**29**), Hexansäure (**33**), Heptansäure (**36**) und Octansäure (**42**). Auch wurden die ungesättigten Lactone 4-Hydroxy-2-octensäurelacton (**37**) und 4-Hydroxy-2-nonensäurelacton (**43**) verstärkt in den Reisbrotproben von R2 wahrgenommen. Der Aromastoff (*E,Z*)-2,4-Decadienal (**30**) zeigte zudem nur in der Brotkrume des Mehls R2 einen signifikant höheren FD-Faktor als in der Brotkrume von R1.

Eine Gegenüberstellung der wichtigsten aromaaktiven Verbindungen ($FD \geq 128$) der Brotkrumen und Krusten aus den beiden Reismehlen ist Tabelle 18 zu entnehmen. Unter den 21 aufgeführten Aromastoffen konnten viele Parallelen zwischen den zu vergleichenden Proben gezogen werden. So erreichten die Aromastoffe, welche durch den Hefemetabolismus und durch thermische Reaktionen im Backprozess gebildet wurden, auch vergleichbare FD-Faktoren in beiden Brotkrumen bzw. Brotkrusten.

Die wichtigsten Unterschiede waren die höheren FD-Faktoren der Aromastoffe Hexanal (**2**) und (*Z*)-2-Butyl-2-octenal (**26**) in den Brotproben der gelagerten Reismehlcharge. Bereits in mehreren Studien wurde **2** als wichtiger Alterungsindikator in Reis⁶³⁻⁶⁵ und anderen Getreidearten, wie z.B. Hafer,⁸⁵ detektiert. Dies beeinträchtigte auch das Aroma der aus dem gelagerten Mehl R2 hergestellten Brotkrume (FD 32) und Kruste (FD 128) im Vergleich zu der Krume (FD 1) und Kruste (FD8) des frischen Mehles R1.

(*Z*)-2-Butyl-2-octenal (**26**) entstand vermutlich durch Aldolkondensation aus **2** während der Lagerung des Reismehls (Abbildung 11, Kapitel 3.3.1.1),¹⁰⁷ und erreichte einen im Vergleich zu **2** noch höheren FD-Faktor (FD 256) in der Brotkrume und -kruste des gelagerten Mehles R2. **26** wurde bereits als Bestandteil der flüchtigen Fraktion von Reis identifiziert,^{108,109} aber es existierten bisher keine Angaben zu seiner Bedeutung für das Aroma von Reis bzw. Reisbrot. Weitere Studien beschrieben einen Zusammenhang von **26** und dem ranzigen Geruch von gelagertem Hafer und die lagerungsbedingte Bildung

in Longjing-Tee war bereits bekannt.^{107,110} Somit war eine Funktion dieser Aromakomponente als Indikator für das Mehllalter naheliegend.

Tabelle 18 Gegenüberstellung der mittels AEVA detektierten Aromastoffe (FD \geq 128) in den Brotkrumen und -krusten, hergestellt aus der frischen Reismehlcharge R1 und der gelagerten Charge R2

Nr.	Aromastoff ^a	Geruchsqualität ^b	FD-Faktor ^d			
			Brotkrume		Brotkruste	
			R1	R2	R1	R2
2	Hexanal	grün, grasig	1	32	8	128
3	3-Methyl-1-butanol	malzig	64	128	64	128
6	1-Octen-3-on	pilzig	32	4	128	128
7	2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig, Popcorn	64	32	128	256
11	Essigsäure	sauer	16	32	64	128
12	Methional	gekochte Kartoffel	256	256	1024	512
16	(<i>E</i>)-2-Nonenal	grün, fettig	32	64	128	16
26	(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	Zitrus, seifig, grün	8	256	2	256
27	2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig	256	256	256	1024
32	(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	grün, fettig	512	256	1024	512
34	2-Phenylethanol	blumig, Honig	1024	512	1024	1024
39	tr-4,5-Epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	metallisch	128	64	1024	256
40	γ -Nonalacton	Kokos	64	256	128	256
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	Karamell	256	64	2048	2048
45	4-Methylquinazolin	Minze	8	32	64	128
47	2-Methoxy-4-vinylphenol	rauchig, Nelke	64	256	64	64
48	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon ^e	würzig	1024	512	1024	1024
49	2-Aminoacetophenon	foxy	512	512	1024	512
50	4-Vinylphenol	phenolisch	512	32	256	128
53	Phenyllessigsäure	Honig, Bienenwachs	256	512	256	512
54	Vanillin	Vanille	1024	256	1024	1024

^{a, b, d, e} siehe Tabelle 2

Neben der Bildung von Aromastoffen während der Lagerung von Mehl verloren einige Substanzen im Reisbrot aus R2 im Vergleich zu dem Brot aus R1 an Intensität. Vor allem 4-Vinylphenol (**50**) besaß in der Brotkrume aus dem Reismehl R1 (FD 512) einen höheren FD-Faktor als in der von R2 (FD 32). Da diese Verbindung aus p-Cumarsäure

durch eine wärmeinduzierte Reaktion während des Backens gebildet wird,⁸⁹ würde eine Verringerung dieses Vorläufers während der Lagerung des älteren Reismehls R2, wie von Zhou et al. dargelegt,¹¹¹ die niedrigere Intensität dieser Verbindung in den Brotproben von R2 erklären. Zudem wurde (*E*)-2-Nonenal (**16**) in geringerem Maße in der Brotkruste aus dem gelagerten Mehl R2 wahrgenommen als in der des frischen Mehls R1. Ursachen hierfür könnten Folgereaktionen des ungesättigten Aromastoffes während der Lagerung des Mehls sein.

Die erhobenen Daten der AEVA standen in guter Übereinstimmung mit den in Abbildung 29 dargestellten sensorischen Aromaprofilen. Die Verwendung des gelagerten Mehls R2 führte zu einem stärker fettigen, und an Reis erinnernden Aroma der Brotkrume und -kruste als die mit Mehl R1 gebackenen Proben. Dies lag vermutlich an den höheren Intensitäten der Lipidoxidationsprodukte, vor allem Hexanal (**2**) und (*Z*)-2-Butyl-2-octenal (**26**). Im Gegensatz dazu waren die Geruchseindrücke „hefig“ und „gekochte Kartoffel“ in der Brotkrume sowie die Geruchsnoten „röstig/popcornartig“ und „Karamell“ in der Brotkruste aus dem gelagerten Reismehl R2 im Vergleich zum Brot aus R1 schwächer. Infolgedessen schienen die Lipidabbauprodukte diese Wirkung zu induzieren, indem sie diese Geruchseigenschaften überlagerten. Um genauere Aussagen diesbezüglich zu treffen, waren quantitative Daten und die Bestimmung der Aromawerte notwendig.

3.4.3 Quantitative Untersuchungen und Bestimmung von Aromawerten im Reisbrot der gelagerten Reismehlcharge R2

Unter den quantifizierten Aromastoffen in der Brotkrume und -kruste des Reisbrotes aus der gelagerten Mehlcharge R2 (Tabelle 19) besaß Essigsäure die höchste Konzentration (>100 mg/kg), gefolgt von den Hefemetaboliten 3- und 2-Methyl-1-butanol, 3-Methylbuttersäure, 2-Phenylethanol und 2-Methylbuttersäure (>5 mg/kg). Zudem wurden hohe Mengen (>1 mg/kg) an γ -Nonalacton, Hexanal, Phenyllessigsäure und Vanillin detektiert.

Die Konzentrationen in der Brotkrume und Brotkruste waren stets in der gleichen Größenordnung, jedoch wich die Reihenfolge in der Brotkruste etwas von der Brotkrume ab. So war die Konzentration der Essigsäure in der Brotkruste höher, hingegen die der

Hefemetaboliten, insbesondere der Alkohole 2- und 3-Methyl-1-butanol, stets niedriger als in der Brotkrume. Diese Trends entsprachen den zuvor in Kapitel 3.2.2 aufgeführten Ergebnissen von Weizenbrot und dem Reisbrot aus der frischen Mehlladung R1. Demgemäß lagen auch höhere Konzentrationen von Vanillin und (*E,E*)-2,4-Decadienal in der Brotkrume sowie höhere Gehalte von Hexanal, Maltol und 1-Octen-3-on in der Kruste des Reisbrotes aus der gelagerten Mehlladung R2 vor.

Tabelle 19 Konzentrationen ausgewählter Aromastoffe in der Reisbrotkrume und -kruste, hergestellt aus der gelagerten Mehlladung R2

Aromastoff	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] ^a	
	Brotkrume	Brotkruste
Essigsäure ^b	443501	518557
3-Methyl-1-butanol	8754	4178
2-Methyl-1-butanol	1431	676
3-Methylbuttersäure	1294	1097
2-Phenylethanol	1132	804
2-Methylbuttersäure	1124	900
γ -Nonalacton	571	472
Hexanal	480	514
Phenyllessigsäure	252	346
Vanillin	216	139
2-Methoxy-4-vinylphenol	76	82
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	58	9,3
4-Vinylphenol	34	43
2-Aminoacetophenon	15	14
(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	14	3,1
Maltol	11	36
(<i>E</i>)-2-Nonenal	8,9	5,1
1-Octen-3-on	0,48	1,01

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, relative Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen <20 %; ^b Enzymatische Bestimmung nach 4.6.5

Der Vergleich der quantitativen Daten der Reisbrotproben, hergestellt aus den beiden Mehlchargen R1 (Tabelle 6) und R2 (Tabelle 19) bestätigte die im vorherigen Kapitel mittels AEVA beobachteten Unterschiede. Die sensorisch wahrnehmbaren höheren Intensitäten von Hexanal und (*Z*)-2-Butyl-2-octenal in den Brotproben aus dem gelagerten Mehl R2 spiegelten sich in den Konzentrationsunterschieden wider. γ -Nonalacton, (*E,E*)-2,4-Decadienal und (*E*)-2-Nonenal besaßen ebenfalls höhere Konzentrationen in den Brotproben des gelagerten Mehles als in denen des frischen Mehles. Alle diese Aromastoffe haben den Bildungsweg aus Fettsäuren gemein, sodass deren Abbau eine große Rolle für das Aroma von Broten aus gelagertem Reismehl spielte. Dem entgegen stand eine geringere Konzentration der Essigsäure in den Brotproben des gelagerten Mehles.

Nicht mittels AEVA wahrnehmbar waren die Unterschiede der Konzentrationen der Hefemetaboliten in den Reisbrotproben aus den beiden Mehlchargen verschiedenen Alters. Die Gehalte der Leucin- und Isoleucinmetaboliten 3- und 2-Methyl-1-butanol sowie deren korrespondierende Säuren in der Brotkrume des gelagerten Reismehls R2 übertrafen die Werte des Brotes aus R1 um 40-66 %. Die Konzentrationen der Alkohole in der Brotkruste von R2 lagen sogar mehr als 100 % über dem in der Kruste von R1 bestimmten Wert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre der Proteinabbau im Reismehl zu kleinen Peptiden und freien Aminosäuren während der Lagerung. Eine Studie von Dhaliwal et al. deutete auf einen Anstieg der proteolytischen Aktivität in gemahlenem Reis und einen daraus resultierenden Anstieg des Gehaltes freier Aminosäuren während der Lagerung hin.⁶² Die Untersuchung der freien Aminosäuren im gelagerten Reismehl R2 ergab zwar geringfügig höhere Mengen freier Aminosäuren, jedoch nicht in dem Ausmaß des Unterschieds der Hefemetaboliten (siehe Kapitel 3.4.5). Zudem wurde ein gegenteiliger Effekt der Metaboliten des Phenylalanins beobachtet. Besonders der Alkohol 2-Phenylethanol war in der Reisbrotkrume und Kruste von R2 gleichermaßen geringer konzentriert als in den entsprechenden Proben von R1.

Der Einfluss der quantifizierten Aromastoffe auf das Gesamtaroma des Reisbrotes der gelagerten Mehlcharge R2 wurde durch die Berechnung der Aromawerte (AW, Tabelle 20) untersucht. Unter den 18 untersuchten Aromastoffen erreichten 13 relevante AW in der Brotkrume und 10 in der Brotkruste. Die Leucinderivate 3-Methyl-1-butanol und 3-

Methylbuttersäure besaßen die höchsten Aromawerte in der Reisbrotkrume (AW >100) und der Brotkruste (AW >50). Aromawerte >10 erreichten in beiden Proben 2-Methoxy-4-vinylphenol, Essigsäure, 2-Methylbuttersäure, Hexanal und Phenylelessigsäure.

Tabelle 20 Aromawerte der in der aus der gelagerten Mehcharge R2 hergestellten Reisbrotkrume und -kruste quantifizierten Verbindungen

Aromastoff	Aromawert ^a	
	Brotkrume	Brotkruste
3-Methyl-1-butanol	112	54
3-Methylbuttersäure	100	84
2-Methoxy-4-vinylphenol	17	18
Essigsäure	15	17
2-Methylbuttersäure	15	12
Hexanal	11	12
Phenylelessigsäure	11	15
2-Aminoacetophenon	5	5
2-Phenylethanol	2	2
1-Octen-3-on	2	4
2-Methyl-1-butanol	2	<1
(E,E)-2,4-Decadienal	1	<1
(E)-2-Nonenal	1	<1
Vanillin	<1	<1
γ-Nonalacton	<1	<1
4-Vinylphenol	<1	<1
Maltol	<1	<1
(Z)-2-Butyl-2-octenal	<1	<1

^a Bestimmt nach Kapitel 4.5.3 mit den in Tabelle 32 angegebenen Geruchsschwelle in Stärke

Entsprechend den Konzentrationen unterschieden sich die Aromawerte zwischen der Brotkrume und -kruste nur geringfügig. Die größten Abweichungen lagen in den höheren AW von 3-Methyl-1-butanol und 3-Methylbuttersäure in der Brotkrume verglichen mit der Brotkruste. Zudem war der Aromawert von 1-Octen-3-on in der Reisbrotkrume (AW 4)

zwar gering, betrug jedoch das doppelte des AWs dieses Aromastoffs in der Reisbrotrume.

Der Vergleich der Aromawerte zwischen den Reisbrotkrumen der beiden Mehlchargen ist in Abbildung 30 graphisch dargestellt. Dies verdeutlicht eine gewisse Übereinstimmung beider Proben in Bezug auf die Rangordnung der Aromastoffe sowie die Größenordnung der Aromawerte. In beiden Proben erreichten 3-Methyl-1-butanol und 3-Methylbuttersäure die höchsten AW, wobei die Werte in der Brotrume der gelagerten Reismehlcharge (R2) diejenigen der frischen Mehlcharge (R1) überstiegen. Auch bei 2-Methylbuttersäure und 2-Methyl-1-butanol war dies der Fall. Hexanal, welches in der Reisbrotrume des frischen Mehls R1 keinen Einfluss auf das Gesamtaroma besaß (AW <1), erreichte in der Reisbrotrume des Mehls R2 einen AW >10. Der in der Literatur mehrfach als wichtiger Alterungsindikator für Reis und Reismehl postulierte Aromastoff zeigte somit auch den größten Unterschied zwischen den Brotkrumen aus unterschiedlich lange gelagertem Reismehl.^{63–65} Zusätzlich führte die Lipidoxidation während der Mehllagerung zu relevanten AW >1 von (*E,E*)-2,4-Decadienal und (*E*)-2-Nonenal in der Krume des gelagerten Reismehles R2.

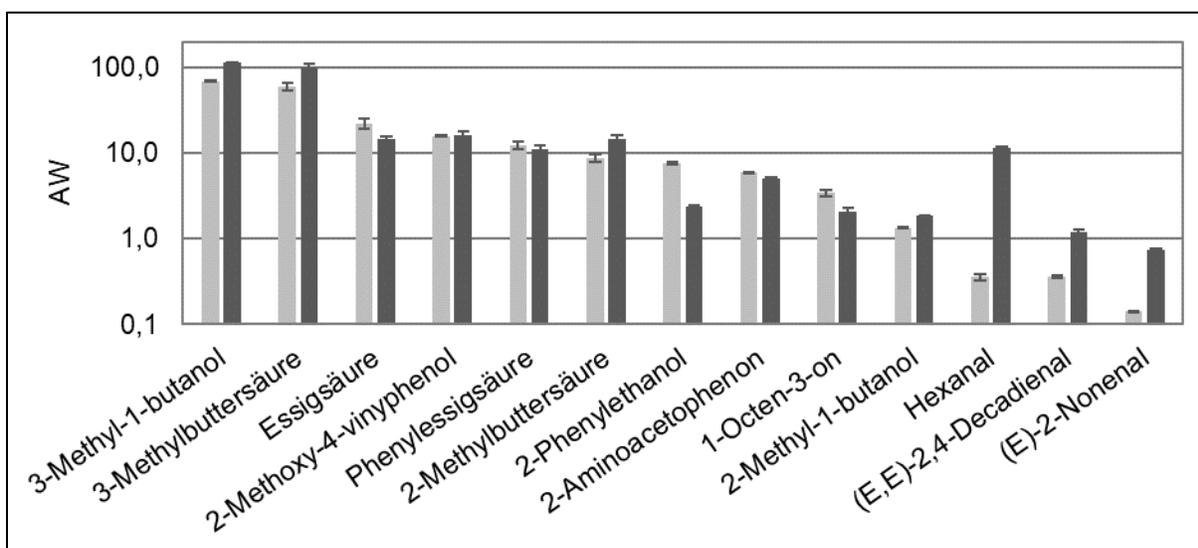


Abbildung 30 Gegenüberstellung der Aromawerte relevanter Aromastoffe der Reisbrotkrumen, hergestellt aus der frischen Mehlcharge R1 (hellgrau), und der gelagerten Mehlcharge R2 (grau), logarithmische Skala Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

Außerdem bestanden höhere AW von Essigsäure, 2-Phenylethanol und 1-Octen-3-on in der Brotkrume des frischen Mehles, deren Mangel in der Krume von R2 ebenfalls zu dem vorliegenden sensorischen Unterschied beitrugen. Die übrigen aromaaktiven Verbindungen unterschieden sich dagegen nicht in ihren AW zwischen den beiden Brotkrumen, sodass deren Einfluss auf das Gesamtaroma als unbeeinflusst von dem Alter der Mehcharge anzusehen war.

Ähnliche Tendenzen bestanden beim Vergleich der AW der beiden Reisbrotkrusten, hergestellt aus dem frischen (R1) bzw. dem gelagerten (R2) Reismehl (Abbildung 31). Auch hier war ein Einfluss des Mehalters durch einen Anstieg der AW von 3-Methylbuttersäure, 3-Methyl-1-butanol und Hexanal sowie die Abnahme der AW von Essigsäure, 1-Octen-3-on und 2-Phenylethanol, aufgrund des höheren Alters des Reismehls, erkennbar.

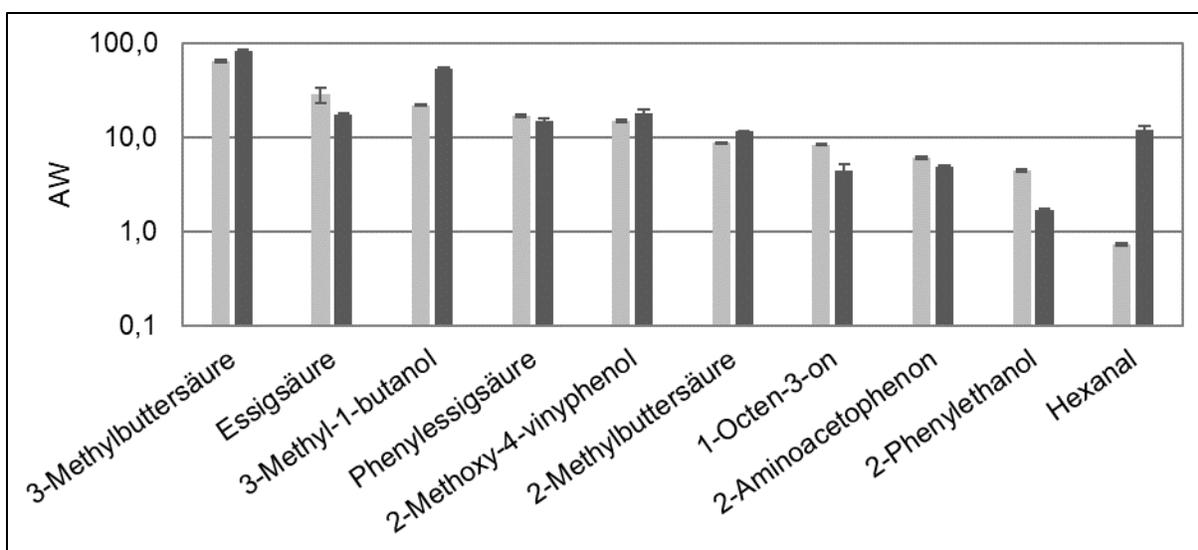


Abbildung 31 Gegenüberstellung der Aromawerte relevanter Aromastoffe der Reisbrotkrusten, hergestellt aus der frischen Mehcharge R1 (hellgrau), und der gelagerten Mehcharge R2 (grau), logarithmische Skala, Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

3.4.4 Identifizierung relevanter Aromastoffe in der gelagerten Reismehlcharge R2

Zur Rückverfolgung der Herkunft der Aromastoffe des Reisbrottes aus der gelagerten Reismehlcharge, wurde diese selbst mittels AEVA auf ihre Aromastoffzusammensetzung überprüft (siehe Kapitel 4.6). In der gelagerten Reismehlcharge R2 wurden 32 aromaaktive Verbindungen identifiziert (Tabelle 21). Diese Zahl überstieg die in der frischen Reismehlcharge R1 detektierten 30 aromaaktiven Verbindungen, welche ebenfalls zum Vergleich in Tabelle 21 angegeben wurden. Die höchsten FD-Faktoren in dem Reismehl R2 erreichten **26** (Zitrus, seifig grün) und **54** (Vanille, FD ≥ 1024), **20** (Zitrus, seifig grün), **39** (metallisch) und **48** (würzig, FD 512), **11** (sauer) und **53** (Honig, Bienenwachs, FD 256) sowie **2** (grün, grasig), **28** (Gurke) und **49** (foxy, FD 128). Die meisten Aromastoffe wurden in beiden Mehlchargen nachgewiesen. Aromastoffe, welche nur in einer der beiden Chargen detektiert wurden, erreichten auch in dieser nur geringe FD-Faktoren ≤ 16 .

Tabelle 21 Aromastoffe im gelagerten Reismehl: olfaktorische und gaschromatographische Daten, Ergebnisse der AEVA, direkter Vergleich zum frischen Reismehl R1

Nr. Aromastoff ^a	Geruchsqualität ^b	RI ^c		FD-Faktor ^d	
		FFAP	DB5	R2	R1
2 Hexanal	grün, grasig	1084	810	128	8
6 1-Octen-3-on	pilzig	1298	973	32	32
10 (E)-2-Octenal	grün, fettig	1425	1055	2	<1
11 Essigsäure	sauer	1445	611	256	128
14 Decanal	fettig, seifig	1493	1189	4	<1
15 (Z)-2-Nonenal	grün, fettig	1500	1143	64	32
16 (E)-2-Nonenal	grün, fettig	1529	1157	64	128
18 2-Butyl-2-heptenal	Zitrus, seifig, grün	1563	1278	64	4
20 2-Propyl-2-octenal	Zitrus, seifig, grün	1572	1286	512	1
21 (E,Z)-2,6-Nonadienal ^e	Gurke	1581	1153	1	8
23 Buttersäure	schweißig	1627	825	64	16
25 (E,Z)-2,4-Nonadienal	grün	1656	1191	16	4
26 (Z)-2-Butyl-2-octenal	Zitrus, seifig, grün	1663	1374	2048	32
27 2- & 3-Methylbuttersäure	schweißig	1666	873	16	32
28 (E,E)-2,4-Nonadienal	Gurke	1695	1214	128	32

Ergebnisse und Diskussion

29	Pentansäure	sauer	1734	925	8	4
30	(<i>E,Z</i>)-2,4-Decadienal	grün, fettig	1755	1298	1	<1
32	(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	grün, fettig	1811	1319	64	64
33	Hexansäure	sauer, stechend	1843	1004	64	2
35	γ -Octalacton	Kokos	1917	1251	2	<1
36	Heptansäure	sauer, stechend	1951	1102	2	<1
37	4-Hydroxy-2-octensäurelacton ^f	Kokos	1969	1243	8	1
39	tr-4,5-Epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	metallisch	2003	1378	512	1024
40	γ -Nonalacton	Kokos	2032	1360	64	16
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	Karamell	2041	1065	<1	2
42	Octansäure	sauer, muffig	2056	1279	16	<1
43	4-Hydroxy-2-nonensäurelacton	Kokos	2076	1345	32	4
44	4-Methylphenol	phenolisch	2079	1076	2	8
45	4-Methylchinazolin	Minze	2094	1344	16	8
47	2-Methoxy-4-vinylphenol	rauchig, Nelke	2209	1311	<1	16
48	3-Hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5 <i>H</i>)-on ^e	würzig	2213	1106	512	1024
49	2-Aminoacetophenon	foxy	2223	1302	128	1024
50	4-Vinylphenol	phenolisch	2395	1215	<1	4
51	Indol	fäkalisch	2452	1291	<1	1
53	Phenylelessigsäure	Honig, Bienenwachs	2568	1267	256	256
54	Vanillin	Vanille	2586	1398	1024	1024

^{a-f} siehe Tabelle 2

Die größten Unterschiede zwischen den Reismehlen lagen in den höheren FD-Faktoren der Aromastoffe Hexanal (**2**), 2-Butyl-2-heptenal (**18**), 2-Propyl-2-octenal (**20**), (*Z*)-2-Butyl-2-octenal (**26**) und Hexansäure (**33**) im Reismehl R2. Strukturell handelte es sich bei diesen Verbindungen um aliphatische bzw. verzweigte Aldehyde und Säuren aus dem Abbau von Lipiden während der Lagerung. Eine Bildung der Aldolkondensationsprodukte **18**, **20** und **26** aus **2**, bzw. **2** gemeinsam mit Pentanal wurde bereits in 3.3.1.1 diskutiert. Die Tatsache der deutlich höheren FD-Faktoren im Reismehl R2 bestätigten jedoch, dass es sich hierbei um Altersindikatoren handelte.

Die Beurteilung des Ausmaßes des Eintrags von Aromastoffen des Reismehles in das Brot in Abhängigkeit vom Mehllalter erforderten Quantifizierungsexperimente, welche im nachfolgenden Kapitel vorgestellt wurden.

3.4.5 Quantitative Untersuchungen und Bestimmung von Aromawerten im gelagerten Reismehl R2

In Tabelle 22 sind die Konzentrationen der 13 untersuchten Aromastoffe im gelagerten Reismehl R2 im direkten Vergleich zu den Ergebnissen des frischen Reismehls dargestellt. Den höchsten Gehalt der untersuchten Verbindungen besaß Essigsäure (>1g/kg), gefolgt von Hexanal (>1 mg/kg), (Z)-2-Butyl-2-octenal und Vanillin (>100 µg/kg).

Tabelle 22 Konzentrationen ausgewählter Aromastoffe in Reismehl der gelagerten Mehlladung R2 im Vergleich zur frischen Mehlladung R1

Aromastoff	Konzentration [µg/kg] ^a	
	R2	R1
Essigsäure	1259495	1264808
Hexanal	1780	87
(Z)-2-Butyl-2-octenal	540	0,58
Vanillin	125	14
γ-Nonalacton	77	2,7
Phenylelessigsäure	45	20
3-Methylbuttersäure	13	7,5
(E)-2-Nonenal	13	15
2-Methylbuttersäure	5,3	2,7
(E,E)-2,4-Decadienal	4,3	1,7
2-Aminoacetophenon	4,0	1,4
4-Vinylphenol	1,6	1,0
1-Octen-3-on	0,37	0,42

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, relative Standardabweichungen <20 %

Die größten Unterschiede zum frischen Reismehl R1 lagen bei den Gehalten der Lipidabbauprodukte, Hexanal, γ -Nonalacton und (*Z*)-2-Butyl-2-octenal. Insbesondere letzteres wies einen mehr als 90-fach höheren Gehalt im gelagerten Reismehl R2 im Vergleich zu R1 auf. Folglich kann diese Substanz als wichtiger Alterungsindikator des Reismehls angesehen werden. Auch bei Vanillin wurde ein starker Anstieg in Abhängigkeit von der Lagerung festgestellt. Dieses Phänomen war bereits bei der Lagerung anderer Getreideprodukte, wie Hafermehlextrudat, registriert worden.⁸⁵ Zudem konnten geringe Anstiege von Phenyllessigsäure, (*E,E*)-2,4-Decadienal und 2-Aminoacetophenon im gelagerten Mehl beobachtet werden.

Ein Vergleich der bestimmten Konzentrationen von Aromastoffen im gelagerten Reismehl R2 mit denen des daraus gebackenen Reisbrot (Tabelle 19) bestätigte den direkten Transfer der Aromastoffe Essigsäure, Hexanal, (*Z*)-2-Butyl-2-octenal und (*E*)-2-Nonenal. Die Konzentrationen dieser Substanzen im Reismehl überstiegen die Konzentrationen im daraus hergestellten Reisbrot, sodass es zu Verlusten während des Brotherstellungsprozesses kam. Dies stand im Einklang mit dem Vergleich der Konzentrationen des frischen Reismehls R1 und denen des daraus hergestellten Brotes in Kapitel 3.3.1.2. Als besonders gering war die Transferrate von (*Z*)-2-Butyl-2-octenal einzustufen, dessen Konzentration im Reisbrot weniger als 5 % der Konzentration des Mehles betrug. Demzufolge war ein Abbau dieser Verbindung aufgrund seiner reaktiven Doppelbindung während der Brotherstellung sehr wahrscheinlich. Die Tatsache, dass die Konzentration von (*Z*)-2-Butyl-2-octenal in der Reisbrotkrume deutlich höher war als in der Kruste, ließ eine thermische Reaktion vermuten.

Die übrigen Aromastoffe waren in den Brotproben in höheren Mengen vorhanden als im Reismehl R2. Die Gehalte der Aromastoffe Vanillin, γ -Nonalacton, Phenyllessigsäure, 2-Aminoacetophenon und 1-Octen-3-on betrugen im Reismehl R2 >10 % der Konzentrationen in den daraus hergestellten Brotproben, die der übrigen Verbindungen lagen unter 10 %. Somit konnten die Ergebnisse des Vergleichs des frischen Reismehls und dessen Reisbrot (Kapitel 3.3.1.2) bestätigt werden, wobei teilweise höhere Transferraten von Aromastoffen vom Mehl zum Brot vorlagen, wie z.B. bei Vanillin.

Die berechneten Aromawerte der in den Reismehlen quantifizierten Aromastoffe sind Tabelle 23 zu entnehmen. Im gelagerten Reismehl erreichten 6 Aromastoffe relevante AW ≥ 1 . Die höchsten AW wiesen Hexanal und Essigsäure (jeweils AW 42) auf, die übrigen Aromastoffe 1-Octen-3-on, 2-Aminoacetophenon, (*E*)-2-Nonenal und 3-Methylbuttersäure nur AW ≤ 2 . Somit unterschied sich das gelagerte Reismehl R2 in Bezug auf die Aromaaktivität nur in dem Aromastoff Hexanal vom frischen Reismehl R1. Hexanal war folglich der einzige Alterungsindikator, welcher das Aroma im Reismehl sowie im Reisbrot in hohem Maße beeinflusste.

Tabelle 23 Aromawerte der quantifizierten Aromastoffe im Reismehl der gelagerten Mehlladung R2 im Vergleich zur frischen Mehlladung R1

Aromastoff	Aromawert ^a	
	R2	R1
Hexanal	42	2
Essigsäure	42	42
1-Octen-3-on	2	2
2-Aminoacetophenon	1	<1
(<i>E</i>)-2-Nonenal	1	1
3-Methylbuttersäure	1	<1
(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	<1	<1
Vanillin	<1	<1
γ -Nonalacton	<1	<1
Phenyllessigsäure	<1	<1
2-Methylbuttersäure	<1	<1
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	<1	<1
4-Vinylphenol	<1	<1

^a Bestimmt nach Kapitel 4.5.3 mit den in Tabelle 32 angegebenen Geruchsschwelle in Stärke

3.4.6 Quantitative Bestimmung von freien Aminosäuren als Vorstufen wichtiger Aromastoffe im gelagerten Reismehl

Die Konzentrationen und Aromawerte der im Ehrlich-Abbau aus den freien Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Phenylalanin gebildeten Aromastoffe unterschieden sich stark zwischen den Brotproben der beiden Mehlchargen. Eine mögliche Ursache war die Veränderung der Gehalte an freien Aminosäuren im Reismehl während der Lagerung. Um dem nachzugehen, wurden die Konzentrationen der freien Aminosäuren in der gelagerten Mehlcharge sowie deren Veränderungen während der Mehlquellung (ohne Hefe) und der Hefefermentation entsprechend der Kapitel 3.3.2 und 4.7 bestimmt.

Die Gehalte an freiem Leucin, Isoleucin und Phenylalanin in der gelagerten Reismehlcharge R2 im Vergleich zur frischen Charge R1 sind in Tabelle 24 aufgeführt. Die Untersuchungen ergaben höhere Gehalte aller freien Aminosäuren in der älteren Mehlcharge. Dies stimmte mit dem in der Literatur beschriebenen proteolytischen Abbau von Proteinen während der Lagerung von Reis überein.⁶² Während die Konzentrationen von Leucin und Phenylalanin im Reismehl R2 etwa das doppelte der in R1 ermittelten Werte betrug, war der Gehalt des Isoleucins in R2 nur geringfügig höher als in R1.

Tabelle 24 Konzentrationen freier Aminosäuren in der gelagerten Reismehlcharge R2 im Vergleich zur frischen Mehlcharge R1

Aminosäure	R2 [$\mu\text{mol/kg TM}$]	R1 [$\mu\text{mol/kg TM}$]
Leucin	15,31 \pm 0,32	8,08 \pm 0,21
Isoleucin	1,88 \pm 0,01	1,43 \pm 0,07
Phenylalanin	9,59 \pm 0,13	4,83 \pm 0,20

Die Untersuchung des Quellverhaltens von einer Reismehl-Wasser-Suspension der gelagerten Mehlcharge R2 ergab vom Anteigen bis nach der vierzigminütigen Inkubation bei 30 °C kaum einen Anstieg der Aminosäurekonzentrationen (siehe Abbildung 32). Dies entsprach den Ergebnissen der frischen Reismehlcharge R1. Somit ist das Verhalten der freien Aminosäuren während der Mehlquellung unabhängig vom Alter des Reismehls.

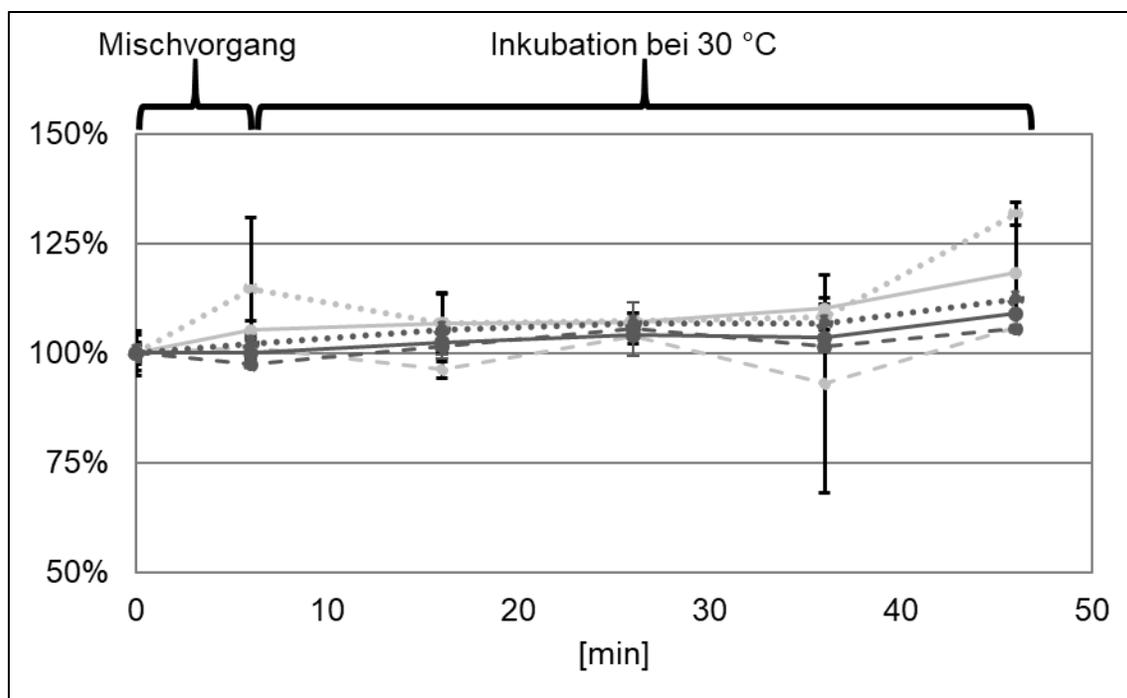


Abbildung 32 Prozentuale Veränderungen der Gehalte an freiem Leucin (—), Isoleucin (- -) und Phenylalanin (....) im Reismehl der gelagerten Mehcharge R2 (grau) im Vergleich zum Reismehl der frischen Charge R1 (hellgrau) nach verschiedenen Quellzeiten in Wasser, bezogen auf die Ausgangswerte der Mehle (= 100 %); Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

Die Bestimmung der freien Aminosäuren zu verschiedenen Zeitpunkten der Hefeteigfermentation (Abbildung 33) ergab ebenso, wie die Untersuchungen während der Mehluellung, ein sehr ähnliches Verhalten beider Reismehlchargen. Bereits während der Teigbereitung wurden 50 % der verfügbaren freien Aminosäuren durch die Hefe umgesetzt. Nur der Abbau des Phenylalanins in der gelagerten Reismehlcharge verlief zunächst etwas langsamer als im frischen Reisbrotteig von R1. Dies könnte zu der niedrigeren Konzentration des Metabolits 2-Phenylethanol in der Brotkrume von R2 verglichen mit R1 geführt haben. Am Ende der Teigfermentation waren die absoluten Aminosäuregehalte des gelagerten Mehls R2 etwas niedriger als im frischen Reismehl.

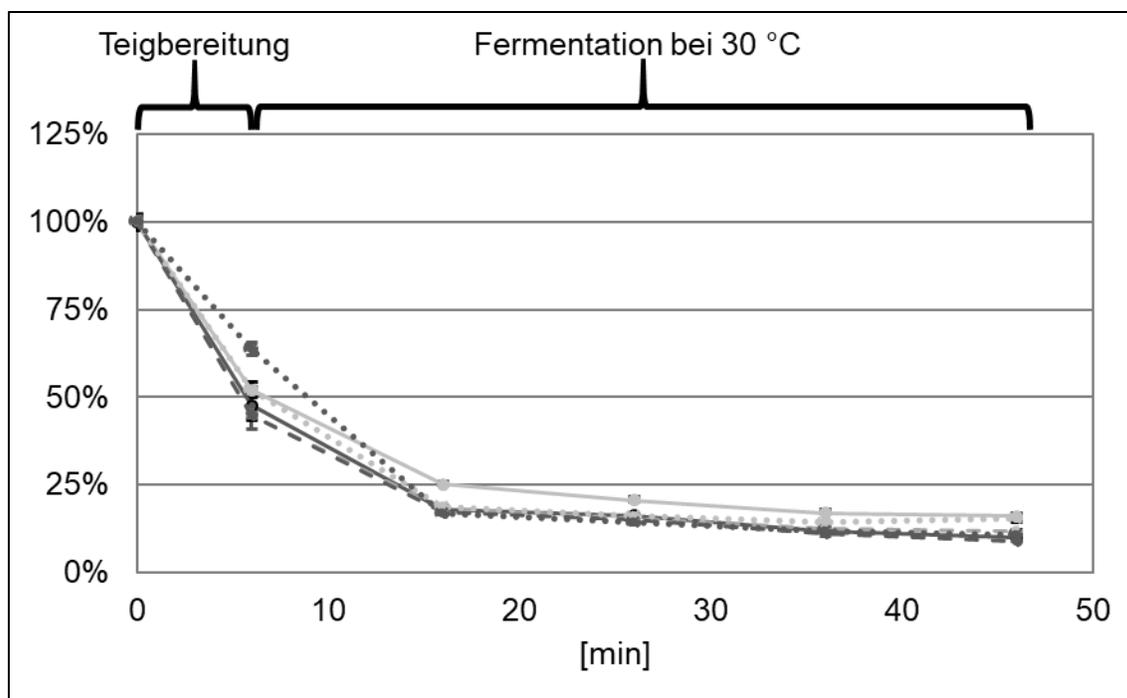


Abbildung 33 Prozentuale Veränderungen der Gehalte an freiem Leucin (—), Isoleucin (- -) und Phenylalanin (....) in Hefeteigen aus Reismehl der gelagerten Mehcharge R2 (grau) im Vergleich zum Reismehl der frischen Charge R1 (hellgrau) nach verschiedenen Fermentationszeiten, bezogen auf berechnete Ausgangsgehalte entsprechend der Rohstoffanteile (= 100 %); Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Angabe der Standardabweichungen als Fehlerbalken

Mit den Unterschieden der Gehalte der freien Aminosäuren zwischen den beiden Reismehlchargen ließen sich die höheren Konzentrationen der Hefemetaboliten dieser Aminosäuren in den daraus hergestellten Brotkrumen nicht erklären. Um dies zu verdeutlichen, sind in Abbildung 34 die Gehalte der verfügbaren Aminosäuren im Teig und der Hefemetaboliten in den Brotkrumen gegenübergestellt. Dabei bestanden Parallelen zu den Ergebnissen der frischen Reismehlcharge R1 (siehe Kapitel 3.3.2.4, Abbildung 19 B). Die freien Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Phenylalanin waren in vergleichbaren Mengen vorhanden und lagen teilweise unter den bestimmten Konzentrationen der Hefemetaboliten in den Brotkrumen. Vor allem die aus dem Leucin gebildeten Hefemetaboliten 3-Methyl-1-butanol und 3-Methylbuttersäure überstiegen in ihrer Summe die Menge des Vorläufers etwa um das Fünffache. Dieser Unterschied war in den Proben von R2 noch stärker ausgeprägt als in den Proben von R1. Es handelte sich demnach nur bedingt um einen Alterungseffekt aber vorwiegend um einen Effekt des Reismehls. Wie bereits in Kapitel 3.3.2.4 diskutiert, müssen weitere

Reaktionsmechanismen oder aber das geringe Nährstoffangebot im Reisbrotteig, welches Veränderungen im Hefestoffwechsel auslöste, die Ursache für die hohen Konzentrationen des 3-Methyl-1-butanols in der Reisbrotkrume sein.

Die Mengen an freiem Isoleucin und die der Isoleucinmetaboliten lagen in der gleichen Größenordnung und stimmten mit den Ergebnissen des frischen Reismehls überein. Die Phenylalaninkonzentration lag hingegen im Reisbrotteig von R2 über den Mengen der Phenylalaninmetaboliten der Brotkrume. Somit wurde Phenylalanin im Teig des gelagerten Reismehls in geringerem Maße umgesetzt als im frischen Reisbrotteig.

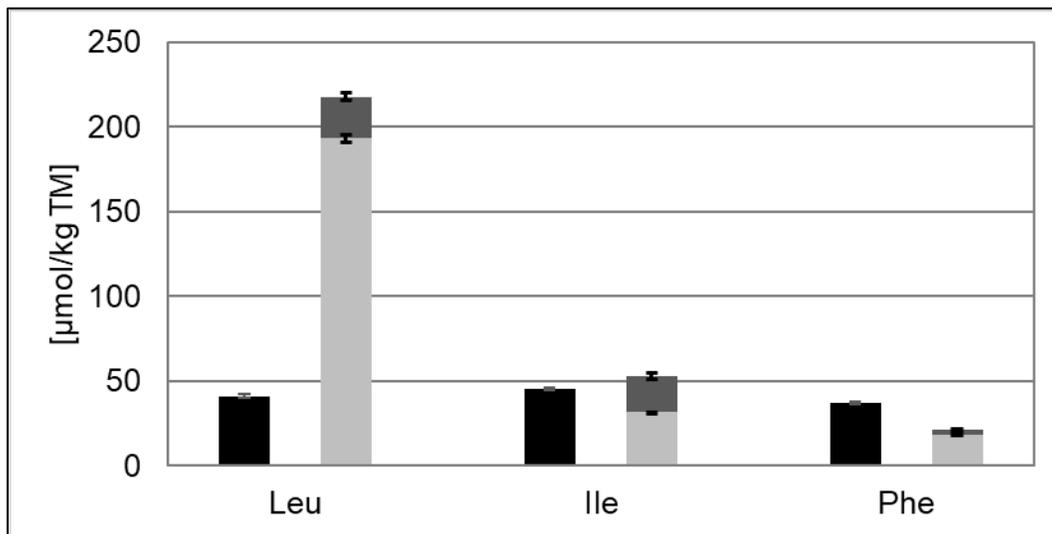


Abbildung 34 Gegenüberstellung der verfügbaren Mengen freier Aminosäuren (schwarz) und der Korrespondierenden Alkohole (hellgrau) und Säuren (grau) in der Reisbrotkrume des Reismehls R2

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 Chemikalien und Materialien

Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in analytischer oder höherer Reinheit von VWR (Darmstadt, DE), Merck (Darmstadt, DE), Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE) oder Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, DE) erworben. Das Lösungsmittel Dichlormethan (technische Reinheit, Merck) wurde vor der Verwendung frisch destilliert.

Die verwendeten Rohstoffe, welche zur Herstellung des Probenmaterials, bzw. selbst als Untersuchungsmaterial dienen, sind in Tabelle 25 aufgelistet. Sofern nicht anders benannt, wurden stets die frische Reismehlcharge R1 und das kommerziell erhältliche Weizenmehl („Rosenmehl“) verwendet. Die gelagerte Reismehlcharge R2 wurde ausschließlich in Kapitel 3.4 verwendet, das selbst vermahlene Weizenmehl Dekan ausschließlich in Kapitel 3.3.3.

Darauffolgend sind die verwendeten aromaaktiven (Tabelle 26) und nicht-aromaaktiven (Tabelle 27) Referenzsubstanzen aufgelistet. Die, vorrangig für Quantifizierungsexperimente verwendeten, stabilisotopenmarkierten Standardsubstanzen sind

Tabelle 28 zu entnehmen.

Tabelle 25 Rohstoffe zur Herstellung des Probenmaterials

Zutat	Hersteller	Anmerkungen
Frischhefe	F.X. Wieninger GmbH (Passau, DE)	
Natriumchlorid	Merck	
Reismehl	BENEO-Remy (Wijgmaal-Leuven, BE)	Remiflo R7 90T LP, nass vermahlen Kohlenhydrate: 84 %, Protein: 5 % Chargen: R1 (frisch, TM ^a 88,6 %); R2: (2 Jahre gelagert, TM ^a 89,51 %)
Saccharose	Alfa Aesar (Karlsruhe, DE)	
Weizenmehl	Rosenmühle (Ergolding, DE)	Typ 550 Rosenmehl Kohlenhydrate: 72 %, Protein: 11 %, TM ^a 86,40 %
Weizenmehl Dekan	Anbaugebiet Gatersleben (DE)	Ernte 2017 Auszugsmehl, selbst vermahlen ^b

^a Trockenmasse, bestimmt nach Kapitel 4.4.1, ^b Vermahlung mit einer Brabender Quadrumat Junior Mühle (Duisburg, DE), bei 200 µm Lochgröße gesiebt (entspricht etwa der Mehltypen 550), vor Verwendung 2 Wochen bei RT gelagert

Tabelle 26 Referenzaromastoffe

Aromastoff	Quelle ^a	Aromastoff	Quelle ^a
Acetoin	A	3-Methyl-1-butanol	A
2-Acetyl-1-pyrrolin	B, ³²	2-Methylbuttersäure	A
2-Acetyl-1-pyridin	A	3-Methylbuttersäure	A
6-Acetyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin	B, ¹¹²	4-Methylphenol	A
2-Aminoacetophenon	C	2-Methylpropansäure	A
Buttersäure	C	4-Methylchinazolin	E
2-Butyl-2-heptenal	B, 4.2.1	(<i>E,E</i>)-2,4-Nonadienal	A
(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	B, 4.2.1	(<i>E,Z</i>)-2,4-Nonadienal	A
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	A	(<i>E,Z</i>)-2,6-Nonadienal	A
γ-Decalacton	A	γ-Nonalacton	A
Decanal	A	(<i>E</i>)-2-Nonenal	A
Diacetyl	A	(<i>Z</i>)-2-Nonenal	B, ¹¹³
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	A	(<i>Z</i>)-1,5-Octadien-3-on	B, ¹¹⁴
trans-4,5-Epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	B, ⁴⁴	γ-Octalacton	A
Essigsäure	A	Octansäure	A
Heptansäure	A	1-Octen-3-on	A
(<i>Z</i>)-4-Heptenal	D	(<i>E</i>)-2-Octenal	A
Hexanal	A	Pentansäure	A
Hexansäure	A	Phenylacetaldehyd	A
4-Hydroxynonensäurelacton	B, ⁸⁵	Phenylethanol	A
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	A	2-Propyl-2-octenal	B,4.2.1
Indol	A	Skatol	A
Maltol	A	Sotolon	A
Methional	A	2,3,5-Trimethylpyrazin	A
2-Methoxy-4-vinylphenol	A	Vanillin	A
2-Methyl-1-butanol	A	4-Vinylphenol	A

^a A Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE), B Synthese entsprechend der angegebenen Literatur, bzw. des angegebenen Kapitels, C Alfa Aesar (Karlsruhe, DE), D Symrise (Holzminden, DE), E AromaLAB GmbH (Planegg, DE)

Tabelle 27 Weitere Referenzsubstanzen

Substanz	Quelle ^a
2-Formamidoacetophenon	A, 4.2.2
Indol-3-essigsäure	B
L-Isoleucin	B
L-Leucin	C
L-Phenylalanin	B
L-Tryptophan	D

^a A Synthese entsprechend der angegebenen Literatur bzw. des angegebenen Kapitels, B Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE), C Merck (Darmstadt, DE), D Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, DE)

Tabelle 28 Liste der Verwendeten stabilisotopenmarkierten Substanzen

Substanz	Quelle ^a	Substanz	Quelle ^a
[d ₃] 2-Aminoacetophenon	A, ⁶¹	[d ₁₀] 3-Methylbuttersäure	C
[d ₂₀] (Z)-2-Butyl-2-octenal	A, 4.2.1	[¹³ C ₂] γ-Nonalacton	A, ¹¹⁵
[d ₄] (E,E)-2,4-Decadienal	A, ¹¹⁶	[d ₂] (E)-2-Nonenal	A, ¹¹⁷
[d ₅] Indol-3-essigsäure	B	[d _{2,3}] 1-Octen-3-on	A, ¹¹⁸
[d ₁₂] Hexanal	C	[d ₅] Phenylalanin	D
[¹³ C ₆] Isoleucin	B	[¹³ C ₂] Phenylelessigsäure	E
[¹³ C ₆] Leucin	B	[d ₅] 2-Phenylethanol	C
[¹³ C ₂] Maltol	A, ¹¹⁹	[d ₅] Tryptophan	E
[¹³ C ₆] 2-Methoxy-4-vinylphenol	A, ¹²⁰	[¹³ C ₆] Vanillin	E
[d ₂] 3-Methyl-1-butanol	A, ⁴⁵	[d ₄] 4-Vinylphenol	A, ⁶¹

^a A Synthese entsprechend der angegebenen Literatur, bzw. des angegebenen Kapitels, B Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, Massachusetts, USA), C EQ Laboratories GmbH (Augsburg, DE), D Euriso-top (Saarbrücken, DE), E Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)

4.2 Synthesen

4.2.1 Aldolkondensationsprodukte

In Zentrifugenröhrchen mit hitzebeständigen Schraubdeckeln wurden jeweils die in Tabelle 29 angegebenen Mengen der Edukte eingewogen und in der angegebenen Menge Lösungsmittel (Ethanol/Natriumhydroxidlösung (aq., 1 mol/L); v/v) gelöst. Die Syntheselösungen wurden im Heizblock über Nacht bei 70 °C gerührt, nach dem Abkühlen dreifach mit je 10 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Reinheit und Vollständigkeit der Reaktion wurden mittels GC-O/FID (4.10.1) und GCxGC-TOF-MS (4.10.4) überprüft.

Tabelle 29 Ansatzmengen zur Synthese der Aldolkondensationsprodukte

Ansatz	Edukte	n_{Edukt}^a [nmol]	V_{LM}^b [mL]	Produkte
I	Hexanal	10	14,0	2-Butyl-2-octenal
II	Hexanal	5	14,0	2-Butyl-2-octenal
	Pentanal	5		2-Butyl-2-heptenal
				2-Propyl-2-octenal
				2-Propyl-2-heptenal
III	[d ₁₂]-Hexanal	1	1,4	[d ₂₀]- 2-Butyl-2-octenal
IV	[d ₁₂]-Hexanal	0,5	1,4	[d ₂₀]- 2-Butyl-2-octenal
	Pentanal	0,5		[d ₁₀]- 2-Butyl-2-heptenal
				[d ₁₀]- 2-Propyl-2-octenal
				2-Propyl-2-heptenal

^a Eingesetzte Stoffmenge der Edukte, ^b Volumen des Lösungsmittels

4.2.2 2-Formamidoacetophenon

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Dhake et al., durch eine N-Formylierung von 2-Aminoacetophenon mit Ameisensäure (Abbildung 35).¹²¹ In einem Zentrifugenröhrchen mit hitzebeständigem Schraubdeckel wurden 5 mmol 2-Aminoacetophenon und 6 mmol Ameisensäure im Heizblock bei 60 °C für 2,5 h gerührt und nach dem Abkühlen in 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Zur Aufreinigung wurde die Lösung zweifach mit je 10 mL Wasser und zweifach mit je 10 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt und die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer (Büchi Labortechnik GmbH, Essen, DE) abgezogen und der Rückstand über Flash-Chromatographie (Kieselgel 60 0,04-0,063 mm, Merck) mit einem stufenweisen Pentan-Diethylether-Gradient (9/1 bis 3/7 (v/v)) aufgereinigt. Das Reaktionsprodukt wurde bei einem Anteil von 50 % Diethylether eluiert und konnte somit von seinem Edukt 2-Aminoacetophenon abgetrennt werden, welches bereits bei 30 % Diethylether eluierte. Das Lösungsmittel der Fraktionen des Produkts wurde am Rotationsverdampfer abgezogen, sodass ein weißes Pulver zurückblieb. Die Ausbeute betrug 20,6 %. Die Reinheit des Produkts wurde mittels GCxGC-TOF-MS (siehe Kapitel 4.10.4) überprüft.

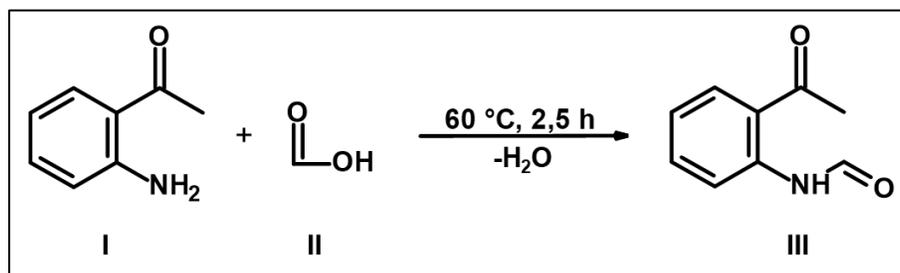


Abbildung 35 Mechanismus der Synthese von 2-Formamidoacetophenon (III) aus 2-Aminoacetophenon (I) und Ameisensäure (II)

4.3 Brotrezepturen

Die Rezepturen für Weizen- und Reisbrot enthielten 4 % Hefe, 3 % Saccharose und 1,5 % Kochsalz, bezogen auf die Mehltrockenmasse (siehe Kapitel 4.1). Um die technologische Verarbeitbarkeit zu gewährleisten, wurde der optimale Wasserzusatz für jede Brotsorte entsprechend der Wasseraufnahmefähigkeit des Mehles gewählt. Dieser Parameter wurde bei Weizenmehl mittels Farinograph (71,8 %, siehe Kapitel 4.4) bestimmt, bei Reismehl hingegen waren Backversuche sowie die visuelle Begutachtung und Volumenbestimmung der Brote notwendig. Der optimale Wasserzusatz variierte zwischen den beiden Reismehlchargen (R1: 100 %; R2: 105 %).

Die Teige wurden in einer Küchenmaschine (Universal; Bosch, München, DE) vorgemischt und nach Zugabe des Wassers 3 min auf niedrigster und 3 min auf höchster Stufe zu einem Teig verknetet. Die Teigeinwaage je Brot betrug 385 g. Die Brote wurden in Kastenformen eingewogen, 40 min bei 30 °C und Wasserdampfsättigung im Gärschrank (Heraeus, Hahnau, DE) ruhen gelassen und anschließend 50 min bei 200 °C Ober- und Unterhitze in einem Piccolo I Ofen (Wachtel, Hilden, DE) bei zweifacher Schwadengabe (je 25 mL) gebacken. Die Untersuchungen wurden nach einer Abkühldauer von 2 h durchgeführt.

4.4 Allgemeine Charakterisierung von Mehl und Brot

4.4.1 Feuchtebestimmungen von Mehlen und Brotkrumen

Die Feuchtebestimmung erfolgte jeweils in Dreifachbestimmung mit Hilfe eines Feuchtebestimmungsgeräts (MA35M, Sartorius, Göttingen, DE). Je 3,5 g der homogenen Probe wurden in einer Aluminiumschale auf der, im Gerät integrierten, Waage eingewogen und gleichmäßig verteilt. Die Messung basierte auf dem Prinzip eines Wäge-Trocknungsverfahrens, unter Verwendung von Infrarotstrahlung zur Probenerwärmung ($T = 100\text{ °C}$). Getrocknet wurde bis zur Gewichtskonstanz. Mehlproben wurden direkt untersucht. Hingegen wurden Brotkrumen vor der Messung in flüssigem Stickstoff gefroren und mit einer Messermühle (GRINDOMIX GM 200, Retsch, Haan, DE) homogenisiert.

4.4.2 Wasseraufnahmefähigkeit von Weizenmehl

10 g Weizenmehl bei 14 % Feuchte wurden mit 2 % Natriumchlorid und zunächst 60 % Wasser (Ausgangswert) bei Raumtemperatur 20 min im Farinographen E (Brabender GmbH & Co KG, Duisburg, DE) geknetet. War die Wasseraufnahme optimal, so lag im Farinogramm ein Maximum der Drehmomentkurve bei 550 BU (Brabender Units) vor. War dies nicht der Fall, wurde die nötige Wassermenge korrigiert.

Die optimale Wasseraufnahme des kommerziellen Weizenmehls (Rosenmehl, Typ 550) betrug 62 % (71,8 % der Mehl trockenmasse) und diejenige des selbst vermahlenden Weizenmehls der Sorte Dekan 59,7 % (67,7 % der Mehl trockenmasse).

4.4.3 Bestimmung des Brotvolumens

Das Brotvolumen wurde lasergestützt mit einem Volscan Profiler Gerät (Stable Micro Systems Ltd, Goldalming, UK) bestimmt.

4.4.4 Untersuchung der Brotkrumentextur

Die Krumentextur wurde nach Walter et al.,¹²² mittels TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems), zu definierten Zeitpunkten (2, 4 und 24 h nach dem Backen), untersucht. Dafür wurden Zylinder ($d = 2$ cm) mit einem Korksneider aus einer 15 mm dicken Brotscheibe gestanzt. Die Analyse erfolgte stets in Dreifachbestimmung, wobei ein Plexiglaszylinder die Krumentextur zweimal direkt nacheinander um 7 mm eindrückte. Die so generierten Kraft-Weg bzw. Kraft-Zeit Diagramme wurden mit der Software Exponent (Stable Micro Systems) ausgewertet. Aus der Krumentextur, dem Maximum der Kraft während des ersten Eindrückens, ergab sich, durch Division durch die Masse des Krumentexturzylinders, die korrigierte Krumentextur [N/g].

4.5 Sensorische Untersuchungen

Sensorische Bewertungen wurden von jeweils 15-25 geschulten Testpersonen (männlich und weiblich) durchgeführt. Die sensorischen Schulungen fanden wöchentlich statt und die Panelisten wurden so geschult, dass sie unterschiedliche Aromaqualitäten erkennen und beschreiben konnten. Für die Untersuchungen stand ein Sensorikraum, mit abgetrennten Kabinen für jeden Teilnehmer, einer definierten Temperatur (20-25 °C) und weißer Kabinenbeleuchtung, zur Verfügung. Im Folgenden werden die verschiedenen, während dieser Arbeit angewendeten, Testsysteme vorgestellt.

4.5.1 Triangeltest zur Untersuchung eines signifikanten Unterschieds

Triangeltests (auch Dreiecksprüfung) gemäß der §64 LFGB Methode L00.90 7 (DIN EN ISO 4120:2007) wurden zur Prüfung auf signifikante Unterschiede angewendet. Den Teilnehmern wurden eine oder mehrere Testreihen, bestehend aus je drei codierten Behältern, vorgelegt. Zwei Behälter enthielten identische Proben. Ein signifikanter Unterschied lag vor, wenn die abweichende Probe von einer Mindestzahl der Teilnehmer identifiziert wurde. Diese Mindestzahl war einer Signifikanztabelle zu entnehmen und richtete sich nach dem gewünschten Signifikanzniveau ($\alpha \geq 0,05$) und der Gesamtteilnehmerzahl.

4.5.2 Sensorische Aromaprofilanalysen

Für die Erstellung von Aromaprofilen bewertete das geschulte Panel anhand einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 3 (stark wahrnehmbar) die Intensität vorgegebener Geruchsqualitäten in den gereichten Brotproben. Als Vergleiche der Geruchseindrücke dienten die in Tabelle 30 aufgeführten wässrigen Aromastofflösungen, bzw. Lebensmittel, welche in verschließbaren Gefäßen zur Verfügung gestellt wurden. Die Prüfung von Weizen- und Reisbrotproben fand im direkten Vergleich zueinander statt.

Tabelle 30 Vergleichslösungen zur Erstellung von Aromaprofilen

Geruchsqualität	Referenz ^a	Geruchsqualität	Referenz ^a
röstig, Popcorn	2-Acetyl-1-pyrrolin	sauer	Essigsäure
malzig	3-Methyl-1-butanol	schweißig	3-Methylbuttersäure
Reis	Reismehl ^b ,	gekochte Kartoffel	Methional
fettig	(<i>E,E</i>)-2,4- Decadienal	Karamell	4-Hydroxy-2,5-dimethyl- 3(<i>2H</i>)-furanon
hefig	Frischhefe ^c		

^a Wässrige Aromastofflösungen, falls nicht anders vermerkt; ^b als Suspension in Wasser gereicht; ^c direkt gereicht

4.5.3 Bestimmung von Geruchsschwellen

Die Geruchsschwellen ausgewählter Aromastoffe in der Matrix Stärke wurden nach Czerny et al. bestimmt.³³ Die auf ihre Reinheit überprüften Aromastoffe wurden entweder direkt oder gelöst in 50 µL Wasser (maximal 10 ppm Ethanol), zusammen mit 50 g Stärke in ein verschließbares Gefäß gegeben und für 15 min in einem 3D-Schüttler (Willy A. Backofen AG, Muttenz, CH) geschüttelt. Eine Verdünnungsreihe wurde entweder durch die Verdünnung der Stärkesuspension mit weiterer Stärke oder durch Verdünnung der Aromastofflösung vor dem Zusatz zur Stärke erreicht. Die Bestimmung der Geruchsschwelle erfolgte als Triangeltest (siehe Kapitel 4.5.1). Zum Vergleich diente Stärke, welche mit der entsprechenden Menge Wasser versetzt (1 µl/g) und 15 min im 3D-Schüttler geschüttelt wurde.

4.6 Untersuchung von Aromastoffen

4.6.1 Probenvorbereitung und Hochvakuumdestillation

Zur Aromastoffanalytik wurden die Proben wie nachfolgend beschrieben homogenisiert, um anschließend alle lipophilen Verbindungen mit Dichlormethan zu extrahieren.

Die Brote wurden in Krume und Kruste getrennt, mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit der Messermühle (GRINDOMIX GM 200, Retsch) vermahlen. Aus Reismehl wurde zur AEVA mittels Ultra Turrax (IKA, Staufen, DE) eine wässrige Suspension (1/1 m/m) hergestellt, welche mit der nötigen Menge wasserfreien Natriumsulfats homogenisiert wurde. Zur Quantifizierung wurde Reismehl unbehandelt eingesetzt.

Die Probeneinwaagen und Lösungsmittelvolumina zur Extraktion variierten zwischen den Experimenten. Für die AEVA wurden je 15 g Probe und 200 mL Dichlormethan verwendet. Für die Quantifizierungsexperimente mittels SIVA wurden, je nach der erwarteten Analytkonzentration, 1-50 g Probeneinwaage gewählt und die Lösungsmittelmenge entsprechend angepasst. Hierbei wurden bekannte Mengen der stabilisotopenmarkierten Standards zu Beginn der Kaltextraktion zugesetzt.

Alle so vorbereiteten Proben wurden bei Raumtemperatur für 2 h unter ständigem Rühren extrahiert, anschließend die festen Bestandteile abfiltriert und die flüchtigen Verbindungen des Extrakts mittels SAFE-Destillation isoliert.³⁰ Das gewonnene Isolat wurde über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonnen bei 53 °C auf 200 µL (AEVA) bzw. 200-1000 µL (SIVA) eingeeengt.

4.6.2 Aromaextraktverdünnungsanalyse

Der Extrakt der flüchtigen Verbindungen und seine schrittweisen Verdünnungen (jeweils 1:2) wurden mittels GC-O/FID (siehe Kapitel 4.10.1) auf der FFAP-Säule analysiert, bis keine geruchsaktiven Verbindungen mehr wahrnehmbar waren. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der ein Aromastoff noch sensorisch detektiert wurde, entsprach dessen Flavor-Dilution- (FD-) Faktor.

4.6.3 Aromastoffidentifizierung und Berechnung des Retentionsindex

Zur Identifizierung geruchsaktiver Verbindungen in den Proben, wurden die olfaktorischen (Geruchsaktivität), gaschromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften mit denen von Referenzaromastoffen verglichen. Die ersten beiden Eigenschaften wurden mittels GC-O/FID (siehe Kapitel 4.10.1) ermittelt. Als Maß für die gaschromatographischen Eigenschaften, wurde der Retentionsindex (RI), die Retentionszeit des jeweiligen Analyten relativ zu denen einer homologen Alkanreihe, bestimmt. Diese Größe ist ausschließlich vom Säulenmaterial abhängig und wird nicht von methodischen Einstellungen (z.B. Temperaturgradient) beeinflusst. Sie berechnet sich nach folgender Formel:

$$RI = 100 \cdot z + 100 \cdot \frac{t_{R(x)} - t_{R(z)}}{t_{R(z+1)} - t_{R(z)}}$$

z Kettenlänge des nächst geringeren n-Alkans
 $t_{R(x)}$ Retentionszeit der Substanz
 $t_{R(z)}$ Retentionszeit des nächst geringeren n-Alkans
 $t_{R(z+1)}$ Retentionszeit des nächst höheren n-Alkans

Zur eindeutigen Identifizierung wurden die RI stets auf zwei verschiedenen Säulenmaterialien, einer polaren FFAP- und einer unpolaren DB-5-Phase, bestimmt. Elektronenstoßionisations-(EI-) Massenspektren wurden nach zweidimensionaler gaschromatischer Trennung, mit den in 4.10.4 oder bei schwer erfassbaren Substanzen mit dem in 4.10.5 dargestellten Systemen aufgenommen.

Referenzsubstanzen wurden in Dichlormethan gelöst in den Konzentrationen von 100 µg/mL (GC-O/FID, 4.10.1), bzw. 1 µg/mL (Massenspektrometrie, 4.10.4) untersucht und die erfassten Daten mit den zu identifizierenden Aromastoffen abgeglichen.

4.6.4 Quantifizierung von Aromastoffen mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse

Diese Methode der Quantifizierung basiert auf dem Zusatz bekannter Mengen stabilisotopenmarkierter Standards während der Probenaufarbeitung. Hierfür wurden zunächst die Konzentrationen dieser Standards mit dem nachfolgend vorgestellten Verfahren überprüft. Die Untersuchungen erfolgten jeweils als Dreifachbestimmungen. Lösungen der unmarkierten Referenzaromastoffe und der isotope markierten Standards wurden in separaten Ansätzen im Verhältnis 1:1 (v/v) mit einer Methyloctanoat-Lösung, welche als interner Standard diente, gemischt und mittels GC-FID vermessen (siehe Kapitel 4.10.2). Aus den Flächenverhältnissen und der bekannten Konzentration des unmarkierten Aromastoffs berechnete sich die Konzentration des Standards anhand der angegebenen Formel:

$$c_S = c_A \cdot A_{rel,S} \cdot A_{rel,A}$$

c_S Konzentration des isotope markierten Standards

c_A Konzentration der unmarkierten Referenz

$A_{rel,S}$ Fläche des isotope markierten Standards relativ zur Fläche des Methyloctanoats

$A_{rel,A}$ Fläche der unmarkierten Referenz relativ zur Fläche des Methyloctanoats

Die nach 4.6.1 vorbereiteten Aromaextrakte, welche definierte Mengen an isotope markierten Standards enthielten, wurden mittels verschiedener GC-MS Systeme gemessen und die Intensitäten der charakteristischen Massenspuren bestimmt. Die Auswahl des Systems erfolgte für jeden Analyten individuell, aufgrund der zu erwartenden Konzentration, der chromatographischen Eigenschaften und des Fragmentierungsverhaltens bei verschiedenen Ionisationsarten (siehe Tabelle 31).

Zudem wurden die Ergebnisse durch Response-Geraden korrigiert. Hierfür wurden Mischungen der jeweiligen markierten und unmarkierten Verbindung in den

Konzentrationsverhältnissen 5:1 bis 1:5 mit dem entsprechenden GC-MS-System analysiert und die Flächen der charakteristischen Massenspuren integriert. Die Response-Gerade entstand durch Auftragung der Verhältnisse der Konzentrationen (x-Achse) und der Flächen der charakteristischen Massenspuren (y-Achse) durch Division der Daten des isotonenmarkierten Standards durch die der unmarkierten Verbindung. Die resultierende Geradengleichung wurde folgendermaßen in die Konzentrationsberechnung einbezogen:

$$c_A = \frac{c_S}{\frac{A_S}{A_A \cdot a} - \frac{b}{a}}$$

c_A	Konzentration des Analyten
c_S	Konzentration des markierten Standards
A_S	Fläche des isotonenmarkierten Standards
A_A	Fläche des Analyten
a	Steigung der Responsegerade
b	Achsenabschnitt der Responsegerade

In Tabelle 31 sind die verwendeten Massenspuren und Daten der Responsegeraden der analysierten Verbindungen aufgeführt.

Tabelle 31 Verwendete Messsysteme, Massenspuren und Responsegeraden zur Quantifizierung von Aromastoffen mittels SIVA

Aromastoff	System ^a	Massenspur (<i>m/z</i>)		Responsegerade $ax+b$		
		Analyt	Standard	a	b	R ²
2-Aminoacetophenon	2	135	138	0,9162	0,0130	0,9969
(<i>Z</i>)-2-Butyl-2-octenal	2	139	152	0,8979	-0,0847	0,9922
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	1	153	157, 158	0,8932	-0,0508	0,9998
Hexanal	1	101	113	0,9646	-0,1186	0,9981
Maltol	2	126	128	1,4885	-0,0856	0,9952
3-Methylbutanol	1	71	73	1,1365	-0,0232	1,0000
3-Methylbuttersäure	1	117	126	0,9166	0,0111	0,9945
(<i>E</i>)-2-Nonenal	3	123	125	0,8480	-0,0080	0,9999
γ -Nonalacton	2	85	87	0,8660	0,0862	0,9945
1-Octen-3-on	3	127	129, 130	0,7229	-0,0188	0,9999
Phenylessigsäure	2	136	138	1,0503	-0,0501	0,9997
2-Phenylethanol	1	105	109,110	0,9732	0,0285	0,9988
Vanillin	2	151	157	1,2299	0,0288	0,9966
2-Methoxy-4-vinylphenol	2	150	156	0,8752	0,1159	0,9905
4-Vinylphenol	2	120	124	1,2678	-0,0783	0,9992

^a Verwendetes GC-MS-System: 1: GC-MS, siehe Kapitel 4.10.3; 2: Comprehensive 2D-GC \times GC-TOF-MS, siehe Kapitel 4.10.4 3; 2D-Heart-cut-GC \times GC-MS siehe Kapitel 4.10.5

4.6.5 Enzymatische Quantifizierung von Essigsäure

Aufgrund der hohen erwarteten Konzentration der Essigsäure erfolgte deren Bestimmung enzymatisch mit einem Testkit (R-Biopharm, Darmstadt, DE) entsprechend der beiliegenden Anleitung. Brotproben wurden zunächst in Krume und Kruste geteilt, mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit der Messermühle (GRINDOMIX GM 200, Retsch) vermahlen, die Mehle wurden direkt verwendet. Zur Probenextraktion wurden jeweils 4 g in einem 100 mL Messkolben mit ca. 60 mL Wasser für 20 min bei 56-60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Messkolben bis zur Markierung aufgefüllt und die Lösung filtriert. Alle Untersuchungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

4.6.6 Unterscheidung von Isomeren

Die Strukturisomere 2- und 3-Methyl-1-butanol sowie 2- und 3-Methylbuttersäure ließen sich chromatographisch schwer trennen, unterschieden sich jedoch in ihren EI-Massenspektren. Daher wurden die Verbindungen zunächst als Summe der 3-Isomere mittels CI-MS quantifiziert und in einer separaten Aufarbeitung, ohne Standard, die EI-Massenspektren aufgenommen.

Zur Kalibrierung wurden Mischungen zwischen den jeweiligen Strukturisomeren in fünf verschiedenen Verhältnissen mittels GC-EI-MS untersucht. Durch die Auftragung der Verhältnisse charakteristischer Massenspuren (x-Achse) gegen den relativen Anteil des 3-Isomers (y-Achse) wurden lineare Kalibriergeraden zur Bestimmung der Isomerenverhältnisse in den Proben erstellt (Abbildung 36). Als geeignetes Massenspurverhältnis wurde für die Alkohole m/z 57 dividiert durch m/z 70 gewählt, für die Säuren wurde das bereits in der Literatur verwendete Verhältnis m/z 60 dividiert durch die Summe aus m/z 60 und m/z 74 übernommen.¹²³

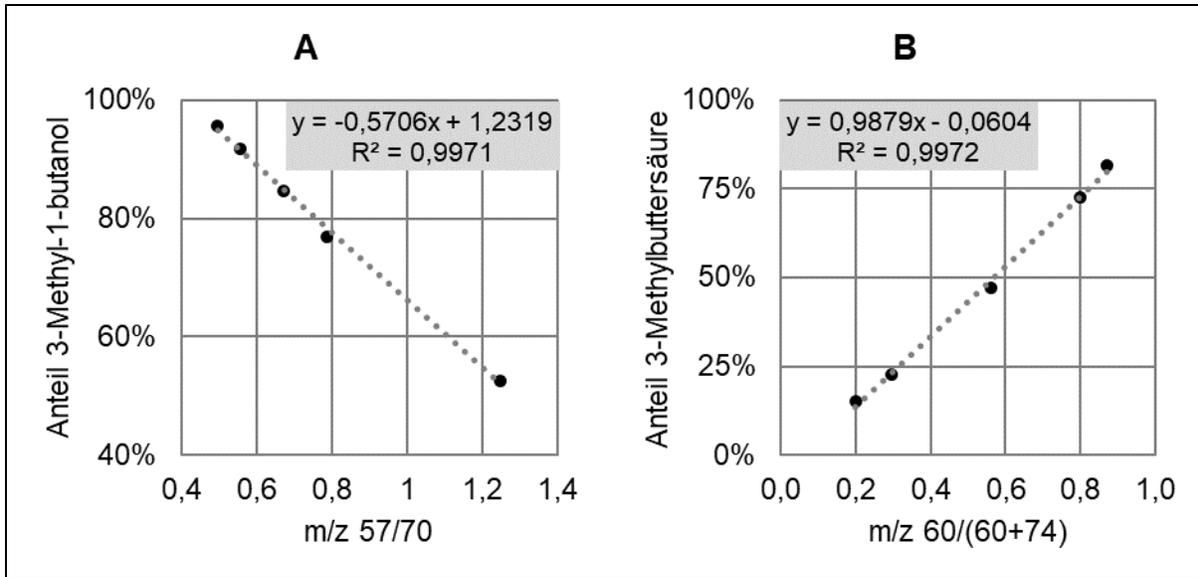


Abbildung 36 Mischkalibriergeraden der Strukturisomere 2- und 3-Methyl-1-butanol (A) sowie 2- und 3-Methylbuttersäure (B)

4.6.7 Bestimmung des Aromawertes

Der Aromawert gilt als Kenngröße für die Relevanz eines Aromastoffs für das Gesamtaroma eines Lebensmittels und ist als Quotient der Konzentration durch die Geruchsschwelle des Aromastoffs in einer der Probe ähnlichen Matrix definiert. Da Stärke der Hauptinhaltsstoff von Reis- und Weizenmehl sowie von draus hergestellten Broten ist, wurden zur Berechnung die Geruchsschwellen in Stärke verwendet (siehe Tabelle 32), deren Bestimmung in Kapitel 4.5.3 beschrieben wurde.

Tabelle 32 Geruchsschwellen der quantifizierten Aromastoffe in Stärke

Aromastoff	Geruchsschwelle in Stärke [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Aromastoff	Geruchsschwelle in Stärke [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
2-Aminoacetophenon	2,9	2-Methylbuttersäure	77
(Z)-2-Butyl-2-octenal	5400	3-Methylbuttersäure	13
(E,E)-2,4-Decadienal	48	(E)-2-Nonenal	12
Essigsäure	300000	γ -Nonalacton	3300
Hexanal	30	1-Octen-3-on	0,23
Maltol	1400	2-Phenylethanol	23
2-Methoxy-4-vinylphenol	18	2-Phenylethanol	470
2-Methyl-1-butanol	763	Vanillin	440
3-Methyl-1-butanol	78	4-Vinylphenol	2100

4.7 Quantifizierung freier Aminosäuren

4.7.1 Probenvorbereitung

Die Quantifizierung freier Aminosäuren erfolgte in Frischhefe, Reis- und Weizenmehl sowie in Suspensionen und Hefeteigen der Mehle. Suspensionen von Mehlen mit Wasser und Brotteige aus Weizen- bzw. Reismehl (R1) wurden unter Verwendung der Proportionen hergestellt, wie zuvor für die Brotzubereitung (siehe Kapitel 4.3). Portionen von je 200 g der Suspensionen oder Teige wurden direkt nach dem Mischen entnommen sowie nach 10, 20, 30 und 40 min Fermentationszeit (30 °C, wasserdampfgesättigt), mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, gefriergetrocknet und mit einer Messermühle (GRINDOMIX GM 200, Retsch) gemahlen. Frische gepresste Hefe (100 g) wurde vor dem Gefrierrocknen mit einer Kryomühle (SPEX SamplePrep, Stanmore, UK) gemahlen. Die Mehle (jeweils 100 g) wurden direkt gefriergetrocknet.

Zwischen 0,1 und 1 g der gefriergetrockneten Proben (entsprechend der erwarteten Aminosäuregehalte) wurden in Zentrifugenröhrchen mit 3,5 mL Trichloressigsäure (aq., 8,5 %) und bekannten Mengen der stabilisotopenmarkierten Standards versetzt. Die Proben wurden 2 min mit einem Hochleistungs-Dispergiergerät (Ultra Turrax, IKA) homogenisiert, 3 min in einem Ultraschallbad (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE) extrahiert und anschließend in einer Laborzentrifuge (Heraeus Multifuge X3 FR, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE) 20 min bei 4500 × g und 15 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Amicon®-Zentrifugalfilter (15 kDa, Merck) gegossen und bis zu 12 h bei 3000 × g zentrifugiert.

4.7.2 Derivatisierung mit Benzoylchlorid

Zur Derivatisierung wurden je 2 mL der Filtrate mit 2 mL Natriumcarbonatlösung (aq., 1 mol/L, pH 9,8) und 0,5 mL Benzoylchlorid (1 mol/L in Acetonitril), gemischt und 30 min bei RT gerührt. Zum Stoppen der Reaktion wurde der pH-Wert mit Salzsäure (32 %) auf 2,0 eingestellt. Proben wurden direkt oder verdünnt mit wässrigem Acetonitril (10 %) für HPLC-MS/MS-Messungen verwendet (siehe Kapitel 4.10.6).

4.7.3 Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA)

Die Quantifizierung mittels SIVA entsprach der Vorgehensweise aus Kapitel 4.6.4. Die Gehalte der Aminosäuren in den Proben ergaben sich aus dem Verhältnis zwischen den entsprechenden Signalintensitäten der jeweiligen, mittels HPLC-MS/MS bestimmten, charakteristischen MRM-Massenübergänge von Analyt und Standard (Tabelle 33), unter Einberechnung der Responsegeraden.

Zur Erstellung der Responsegeraden wurden die Lösungen der unmarkierten und isotopenmarkierten Aminosäuren (je 1 µg/mL) zunächst separat, nach der in 4.7.2 beschriebenen Vorgehensweise, derivatisiert und anschließend in fünf verschiedenen Verhältnissen (5:1 bis 1:5) gemischt.

Tabelle 33 Verwendete MRM-Massenübergänge und Responsegeraden zur Quantifizierung von Aminosäuren mittels SIVA-HPLC-MS/MS

Aminosäure	MRM Übergang (Fragmentierungsspannung) ^a		Responsegerade ax+b		
	Analyt	Standard	a	b	R ²
Leucin	236,1 → 105,1 (18 V)	242,1 → 105,1 (18 V)	0,7829	0,0379	0,9998
	236,1 → 190,1 (8 V)	242,1 → 195,1 (8 V)			
Isoleucin	236,1 → 105,1 (18 V)	242,1 → 105,1 (18 V)	0,8204	0,0453	0,9996
	236,1 → 190,1 (8 V)	242,1 → 195,1 (8 V)			
Phenylalanin	270,1 → 105,1 (18 V)	275,1 → 105,1 (18 V)	1,0612	0,0527	0,9999
	270,1 → 224,1 (8 V)	275,1 → 229,1 (8 V)			
Tryptophan	309,1 → 105,1 (22 V)	314,1 → 105,1 (22 V)	0,0537	0,0186	0,9997
	309,1 → 263,1 (12 V)	314,1 → 267,1 (12 V)			

^a Charakteristische MRM Übergänge des jeweiligen Analyten und Standards, zur Quantifizierung betrachteter Übergang fettgedruckt

4.8 Quantifizierung von Indol-3-essigsäure

4.8.1 Probenvorbereitung

In Dreifachbestimmung wurden jeweils 1 g Probe (Reismehl R1, Weizenmehl Dekan, Frischhefe), bzw. 3,5 mL wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung (1 mol/L) und 100 μ L einer [d₅]-Indol-3-essigsäurelösung in verschließbare Zentrifugenröhrchen eingewogen, 2 min mit einem Hochleistungs-Dispergiergerät homogenisiert, 3 min in einem Ultraschallbad (Bandelin electronic GmbH & Co. KG) extrahiert und anschließend in einer Laborzentrifuge (Heraeus Multifuge X3 FR, Thermo Fisher Scientific) 20 min bei 4500 \times g und 15 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Amicon®-Zentrifugalfilter (15 kDa, Merck) gegossen und bis zu 4 h bei 3000 \times g zentrifugiert. Auf 800 μ l des mit Ameisensäure auf pH 2 angesäuerten, im Ultraschallbad entgasten Filtrats wurden 200 μ L Acetonitril gegeben und die Proben nach 4.10.8 mittels HPLC-MS/MS analysiert.

Eine etwas abgewandelte Probenvorbereitung wurde für die jeweiligen Teige des Reis- bzw. Weizenmehls, bestehend aus jeweils 50 g Mehl sowie 100 % Wasser, 4 % Hefe, 3 % Saccharose und 1,5 % Kochsalz, entsprechend der jeweiligen Mehltrockenmasse, gewählt. Nach dem Vermischen mit einem Handrührgerät (myMix 300W, Siemens, München, DE) für 3 min auf niedrigster und 3 min auf höchster Stufe, wurden in Dreifachbestimmung jeweils 2 g Teig in Zentrifugenröhrchen eingewogen, 40 min im wasserdampfgesättigten Gärschrank bei 30°C ruhen gelassen und anschließend mit 2,5 mL wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung (1 mol/L) und 100 μ L einer [d₅]-Indol-3-essigsäurelösung, entsprechend der erwarteten Analytkonzentration, versetzt. Die nachfolgenden Schritte entsprachen der zuvor angegebenen Probenvorbereitung der Mehle.

4.8.2 Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA)

Wie in Kapitel 4.7.3 dienten die mittels HPLC-MS/MS gemessenen Signale der charakteristischen MRM-Massenübergänge von Indol-3-essigsäure sowie deren [d₅]-markierten Standards (Tabelle 34) der Quantifizierung mittels SIVA. Die Analytkonzentrationen in den Proben wurden nach 4.6.4, unter Einberechnung der in Tabelle 34 angegebenen Responsegeradengleichung, bestimmt. Die Response-Reihe bestand aus der Messung von sieben verschiedenen Mischungsverhältnissen (10:1 – 1:10) zwischen Analyt und Standard.

Tabelle 34 Verwendete MRM-Massenübergänge und Responsegerade zur Quantifizierung von Indol-3-essigsäure mittels SIVA-HPLC-MS/MS

MRM Übergang (Fragmentierungsspannung) ^a		Responsegerade $ax+b$		
Analyt	Standard	a	b	R ²
176,1 → 103,2 (34 V)	181,1 → 106,2 (34 V)	0,5468	0,0063	1,0000
176,1 → 130,1 (12 V)	181,1 → 195,1 (12 V)			

^a Charakteristische MRM Übergänge des jeweiligen Analyten und Standards, zur Quantifizierung betrachteter Übergang fettgedruckt

4.8.3 Wiederfindungsrate

Zur Überprüfung der Methode wurde die Wiederfindungsrate in Cassava-Stärke durch Zusatz einer definierten Menge Indol-3-essigsäure (100 µg/kg Stärke) im Vergleich zu Cassava-Stärke ohne Zusatz bestimmt. Sie betrug $104,35 \pm 0,03 \%$.

4.9 Modellexperimente zur Untersuchung des Bildungswegs von 2-Aminoacetophenon

Für alle Versuche dieses Abschnittes, welcher die Untersuchung von Mehl, Teig oder Brot beinhaltet, wurde das Reismehl der Charge R1 bzw. das selbst hergestellte Weizenmehl der Sorte Dekan verwendet. Zur Aufklärung des Bildungsweges von 2-Aminoacetophenon in den in 4.9.3 bis 4.9.5 beschriebenen Modellansätzen wurden die Gehalte an 2-Formamidoacetophenon und 2-Aminoacetophenon mittels SIVA, nach Kapitel 4.6.4 über den Standard [d_3]-2-Aminoacetophenon bestimmt. Tabelle 35 sind die verwendeten Massenspuren und Response-Geraden zu entnehmen. Die Analytik erfolgte mittels GCxGC-TOF-MS (siehe Kapitel 4.10.4).

Tabelle 35 Verwendete Massenspuren und Responsegeraden zur Quantifizierung von 2-Aminoacetophenon und 2-Formamidoacetophenon mittels SIVA

Aromastoff	Massenspur (m/z)		Responsegerade $ax+b$		
	Analyt	Standard ^a	a	b	R ²
2-Aminoacetophenon	135	138	0,9162	0,0130	0,9969
2-Formamidoacetophenon	135	138	1,0601	-0,2336	0,9914

^aIn beiden Fällen [d_3]-2-Aminoacetophenon

4.9.1 Bestimmung des Teig-pH-Wertes

Aus den, nach 4.3 hergestellten, Reis- bzw. Weizenbrotteigen wurden je drei Portionen von 10 g in offene Glasgefäße eingewogen und 40 min bei 30 °C und Wasserdampfsättigung im Gärschrank ruhen gelassen. Nach Zusatz von je 100 mL Wasser wurden die Suspensionen 1 min mit einem Hochleistungsdispergiergerät (Ultra Turrax, IKA) homogenisiert und der pH-Wert an einer pH-Elektrode (inoLab pH 720, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, DE) gemessen.

4.9.2 Vorversuche:

Die Stabilität des 2-Formamidoacetophenons wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur überprüft. Jeweils 110 µg 2-Formamidoacetophenon in Ethanol wurden in verschließbaren Zentrifugenröhrchen mit 5 mL (I) Wasser, (II) Essigsäure (0,1 mol/L, pH 4,8) und (III) Salzsäure (0,01 mol/L, pH 2) vermischt und 40 min bei RT stehen gelassen. In einem weiteren Versuch wurde Ansatz II in einem Heizblock mit folgendem Temperaturgradienten erhitzt: 40 min konstant bei 30 °C, Anstieg von 1,5 °C/min bis 95 °C, 7 min halten, abkühlen bei Raumtemperatur. Alle Lösungen wurden zweifach mit 10 mL Dichlormethan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend mittels GCxGC-TOF-MS nach 4.10.4 auf die Bildung des Zerfallsproduktes 2-Aminoacetophenon sowie weitere Zerfallsprodukte überprüft.

4.9.3 Modellversuche in wässrigen Lösungen

In verschließbaren Zentrifugenröhrchen wurden als Dreifachbestimmung je 20 mL Wasser (I) sowie 20 mL wässrige Hefesuspension (4 %) (II) mit 74 nmol Indol-3-essigsäure versetzt. In zwei weiteren Ansätzen wurden je 20 mL Hefesuspension (4 %) ohne weiteren Zusatz (Blindwert, III) sowie mit Zusatz von 66 nmol [d₅]-Indol-3-essigsäure (IV) vorbereitet. Alle Proben wurden im Heizblock mit dem in 4.9.2 angegebenen Temperaturgradienten thermisch behandelt, nach dem Abkühlen dreifach mit 10 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und die organischen Phasen vereinigt. Zur Quantifizierung mittels SIVA wurde eine bekannte Menge des isotopenmarkierten Standards [d₃]-2-Aminoacetophenon zu den Proben gegeben (Ansätze I-III). Zudem wurden mittels SAFE-Destillation nicht-flüchtige Bestandteile in den Proben der Hefesuspensionen (Ansätze II-IV) abgetrennt. Zuletzt wurden alle Proben über Natriumsulfat getrocknet und auf ein Volumen von 200 µL eingengt (siehe Kapitel 4.6.1).

4.9.4 Modellversuche mit Reisbrotteig

Der Reisbrotteig wurde nach Kapitel 4.3 frisch hergestellt und je 20 g in Glasschalen eingewogen. Jeweils in Dreifachbestimmung wurden die Teigproben 40, 120 bzw. 240 min im Gärschrank bei 30 °C und Wasserdampfsättigung fermentiert. Anschließend wurde jede Probe mit 20 g wasserfreiem Natriumsulfat verrührt, mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit der Messermühle (GRINDOMIX GM 200, Retsch) vermahlen. Die gemahlene Probe wurde in verschließbare Glasgefäße überführt, die Einwaage zur Korrektur von Verlusten notiert, und 130 mL Dichlormethan sowie der isotopenmarkierte Standard ($[d_3]$ -2-Aminoacetophenon) entsprechend der erwarteten Analytkonzentration zugegeben. Die Probenextraktion, die SAFE-Destillation und das Einengen der getrockneten Proben auf ein Volumen von 200 μ l erfolgten nach 4.6.1.

4.9.5 Backzusatzversuche

Während des in 4.3 beschriebenen Herstellungsprozesses von Weizen- und Reisbrot sowie einem Reisbrot ohne Hefezusatz wurden in separaten Ansätzen Indol-3-essigsäure und 2-Formamidoacetophenon, gelöst in jeweils 20 μ L Ethanol, während der Teigherstellung zugesetzt. Der Zusatz erfolgte gelöst in dem, für die Teigherstellung benötigten, Wasser. Die Konzentrationen der ethanolischen Lösungen der Zusätze wurden so gewählt, dass jeweils Gehalte von 0,25; 0,5; 0,75 und 1 mg/kg Teig erreicht wurden. Die weitere Probenvorbereitung der Brotkrumen entsprach Kapitel 4.6.1, bei einer Probeneinwaage von je 10 g (Dreifachbestimmung). Zur Quantifizierung mittels SIVA wurde $[d_3]$ -2-Aminoacetophenon als isotopenmarkierter Standard entsprechend der erwarteten Analytkonzentration zugesetzt.

4.10 Apparativer Teil

4.10.1 GC-O/FID

Die AEVA sowie die Analysen zur Aromastoffidentifizierung wurden an einem Trace GC Ultra Gaschromatographen (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Als Trägergas diente Helium. Die Probenaufgabe von je 1 μL erfolgte cold-on-column (40 °C). Zur chromatographischen Trennung wurden eine FFAP-Kapillarsäule oder eine DB-5 Kapillarsäule (beide: Agilent, Waldbronn, DE, 30 m x 0,32 mm; 0,25 μm Filmdicke) verwendet, jeweils kombiniert mit einer deaktivierten Vorsäule (CHM, Fridolfing, DE, 5 m x 0,32 mm i.d.), und das folgende Temperaturprogramm eingestellt: 40 °C isotherm für 2 min, 6°C/min bis 230 °C (FFAP) bzw. 240 °C (DB-5), isotherm für 5 min. Ein Y-Splitter (CHM) teilte den Gasstrom am Ende der Kapillarsäule im Volumenverhältnis 1:1. Beide Teile wurden anschließend, über deaktivierte Glaskapillaren gleicher Länge (CHM, 50 cm x 0,32 mm i.d.), zu den beiden Detektoren geleitet. Die Signale des Flammenionisationsdetektors (FID) wurden mit einem Schreiber (Servogor 124, Kipp & Zonen, Delft, NL) als Chromatogramm aufgezeichnet, die über den Sniffing Port wahrgenommenen Geruchsqualitäten im Chromatogramm händisch ergänzt.

4.10.2 GC-FID

Die Konzentrationsbestimmungen isotope-markierter Standards erfolgten an einem Thermoquest Trace 2000 Gaschromatograph (Thermo Fisher Scientific), ausgerüstet mit einem PAL-Autosampler (CTC-Analytics, Zwingen, CH) und einem FID. Als Trägergas diente Helium. Die Probenaufgabe von je 2 μL erfolgte cold-on-column (40 °C). Zur chromatographischen Trennung diente eine FFAP-Kapillarsäule (Agilent, 30 m x 0,32 mm i.d.; 0,25 μm Filmdicke), ausgestattet mit einer deaktivierten Vorsäule (CHM, 5 m x 0,32 mm i.d.). Das verwendete Temperaturprogramm entsprach dem aus 4.10.1. Die Auswertung wurde mit der Software ChromQuest 5.0 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

4.10.3 GC-MS

Die Quantifizierung der in höheren Konzentrationen enthaltenen Verbindungen erfolgte an einem Agilent 7890B Gaschromatographen (Modell 431 Varian, Agilent) mit Helium als Trägergas, auf einer FFAP-Kapillarsäule (Agilent, 30 m × 0,25 mm; 0,25 µm Filmdicke) mit einer deaktivierten Vorsäule (CHM, 5 m × 0.53 mm i.d.). Ein PAL-Autosampler (CTC-Analytcs) injizierte zur Messung je 2 µL Probenlösung cold-on-column. Das Temperaturprogramm der Messung ist in Kapitel 4.10.1 angegeben. Zur massenspektrometrischen Detektion diente eine Ionenfalle (Saturn 2000, Agilent). Die Ionisierung erfolgte mittels chemischer Ionisation (MS-CI, 115 eV; Reaktandgas: Methanol).

4.10.4 Comprehensive 2D-GC×GC-TOF-MS

Die massenspektrometrische Identifizierung der Aromastoffe sowie die Quantifizierung der meisten Aromastoffe mittels SIVA erfolgte mit einem Leco Pegasus 4D GC×GC-TOF-MS-System (St. Joseph, MI, USA). Das System bestand aus einem Gerstel PTV 4 Injektor (Mühlheim an der Ruhr, DE), einem Agilent 6890N Gaschromatographen, mit einem intern montierten zweiten Ofen, und einem Pegasus III reflectron time of flight Massenspektrometer. Als Trägergas diente Helium. Die Probenaufnahme von je 1 µL erfolgte cold-on-column, splitless durch einen Liner. Zur chromatographischen Auftrennung in der ersten Dimension diente eine FFAP-Kapillarsäule (30 m × 0,32 mm i.d.; 0,25 µm Filmdicke) mit einer deaktivierten Vorsäule (2,5 m × 0.32 mm) und folgendes Temperaturprogramm: 40 °C isotherm für 2 min, 6°C/min bis 230 °C, isotherm für 3 min. Ein zweistufiger thermischer Modulator transferierte das Eluat mittels Kryofokussierung und einer Modulationszeit von 4 s kontinuierlich auf eine DB17MS- oder DB5-Kapillarsäule (beide: Agilent, 2,2 m × 0,18 mm i.d.; 0,18 µm Filmdicke) auf welcher die Auftrennung in der zweiten Dimension stattfand. Das Temperaturprogramm der zweiten Dimension war dabei stets um 20 °C höher als das der ersten Dimension.

Im Massenspektrometer erfolgte die Ionisation mittels EI (Elektronenstoßionisation, 70 eV). Die Detektorspannung wurde auf 1650 V eingestellt. Aufgenommen wurde der Massenbereich m/z 35 – 300 mit einer Scanrate von 100 Scans/s. Die Datenauswertung

erfolgte mit den Programmen GC Image und GC Project (GC-Image, Lincoln, NE, USA) unter Nutzung der NIST Datenbank.

4.10.5 2D-„Heart-Cut“-GCxGC-MS

Das System diente der Quantifizierung gering konzentrierter Aromastoffe mittels SIVA und bestand aus einem Trace 2000 Series Gaschromatographen (Thermo Fisher Scientific), ausgerüstet mit einem PAL-Autosampler (CTC-Analytcs), einem FID und einem Sniffing Port. Über das Moving Column Stream Switching System (MCSS, Fisons, Thermo Fisher Scientific) bestand die Verbindung zu einem zweiten Gaschromatographen (Varian CP 3800, Agilent), welcher mit einem Saturn 2000 Massenspektrometer (Agilent) gekoppelt war. Die cold-on-column injizierten Proben wurden mit Helium als Trägergas in der ersten Dimension auf einer FFAP-Kapillarsäule (Agilent, 30 m × 0,32 mm i.d., 0,25 µm Filmdicke) mit dem folgenden Temperaturprogramm aufgetrennt: 40 °C isotherm für 2 min, 6 °C/min bis 230 °C, isotherm für 5 min. Mittels Sniffing Port und FID wurden in einem Testlauf die Retentionszeiten der gewünschten Analyten bestimmt. Der dadurch festgelegte Elutionsbereich von maximal 1 min wurde durch das MCSS in einer Kühlfalle (- 100 ° C) fokussiert und über die beheizte Transferline auf die im zweiten Gaschromatographen lokalisierte DB5-Kapillare (Agilent, 30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm Filmdicke) übertragen. Auf dieser fand die Trennung in der zweiten Dimension mit folgendem Temperaturprogramm statt: 40 °C, 6 °C/min bis 240 °C, isotherm für 3 min. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mit Chemischer Ionisierung (MS-CI, 115 eV; Reaktandgas: Methanol).

Ein baugleiches System mit einem zusätzlichen Sniffing Port am zweiten Gaschromatographen sowie die massenspektrometrische Detektion nach Elektronenstoßionisation (MS-EI, 70 eV) ermöglichte zudem eine Empfindlichkeitssteigerung zur Identifizierung besonders gering konzentrierter Aromastoffe.

4.10.6 HRGC-qTOF-MS

Um unbekannte Verbindungen zu identifizieren, wurde ein mit einem MMI-Injektor ausgestatteter Agilent 7890B Gaschromatograph zur Aufnahme hochaufgelöster Massenspektren mit einem Agilent 7200 Accurate-Mass-QTOF Massenspektrometer, gekoppelt. Die Proben wurden cold-on-column injiziert. Zur chromatographischen Trennung diente Helium als Trägergas und eine Agilent FFAP-Kapillare (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm Filmdicke) als stationäre Phase. Das Temperaturprogramm entsprach dem in Kapitel 4.10.1 angegebenen. Massenspektren wurden mit MS-EI (70 eV) aufgenommen und die erhaltenen Daten mit der Agilent-Software Mass Hunter Workstation ausgewertet.

4.10.7 HPLC-MS/MS (I)

Zur Quantifizierung freier Aminosäuren mittels SIVA diente ein Surveyor-HPLC-System (Thermo Finnigan, Egelsbach) gekoppelt mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (TSQ Quantum, Thermo Finnigan). Die chromatographische Trennung wurde auf einer Synergi Hydro-RP-Säule (150 × 2 mm, 4 µm, 80 Å, Phenomenex, Aschaffenburg, DE) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Fließmittel A: 0,1 % (v/v) Ameisensäure (aq.), Fließmittel B: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril; Gradient: 0-1 min: 0 % B, 1-1,10 min: 0-15 % B, 1,10-20 min: 15-35 % B, 20-25 min: 35-40 % B, 25-29 min: 40-90 % B, 39-36 min: 90 % B; Fließgeschwindigkeit 0,2 mL/min; Injektionsvolumen: 10 µL; Säulentemperatur: RT. Die Ionenquelle wurde im ESI-Positivmodus unter Verwendung der folgenden Parameter betrieben: Spray Voltage 4000 V; Sheath Gas Pressure: 35 Arbitrary Units (au); Aux Gas Pressure: 15 au; Kapillartemperatur 320 °C. Mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM) wurden charakteristische Übergänge jeder benzylierten Aminosäure mit experimentell optimierten Kollisionsenergien gemessen (Tabelle 33).

4.10.8 HPLC-MS/MS (II)

Das System zur Quantifizierung freier Indol-3-essigsäure mittels SIVA bestand aus einem UltiMate 3000 HPLC-System (Dionex, Idstein) gekoppelt mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (TSQ Vantage, Thermo Fisher Scientific). Die Chromatographie erfolgte auf einer Synergi Hydro-RP-Säule (150 × 2 mm, 4 µm, 80 Å, Phenomenex) mit dem in 4.10.7 beschriebenen Fließmittelsystem und folgendem Gradienten: 0-2 min: 20 B, 2-15 min: 20-90 % B, 15-19 min: 90 % B. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl, der Fluss 0,2 µl/min und die Säulentemperatur 24°C. Die Elektronenspray-Ionenquelle wurde im positiven Modus mit folgenden Einstellungen betrieben: Spray Voltage: 4000 V, Vaporizer Temperatur: 50 °C, Sheath Gas Druck: 40 au, Aux Gas Druck: 5 au. Mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM) wurden die in Tabelle 34 aufgeführten charakteristischen Übergänge mit experimentell optimierten Kollisionsenergien gemessen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Nachfrage nach glutenfreien Backwaren, insbesondere nach glutenfreiem Brot, ist in den letzten Jahren stark gestiegen. Reismehl gilt aufgrund seiner weltweiten Verfügbarkeit und des geringen Preises als einer der wichtigsten Rohstoffe zur Herstellung glutenfreier Brote. Verglichen mit Weizenbrot weist Reisbrot jedoch qualitative Mängel auf und vor allem das Aroma wird von den Verbrauchern weniger akzeptiert. Ziel dieser Studie war es daher, qualitative und quantitative Unterschiede zwischen dem Aroma von glutenfreiem Reisbrot und Weizenbrot zu definieren und deren Ursachen aufzuklären.

Die Charakterisierung der Backqualität ergab vergleichbare Werte des Volumens und der Krumenhärte beider Brotsorten, jedoch ist zu beachten, dass es sich um Modellbrote mit einer relativ kurz gewählten Teigfermentationszeit handelte. Während der Lagerung stieg die Krumenhärte des Reisbrotes deutlich schneller an als die des Weizenbrotes. Darüber hinaus entsprach die helle, rissige Kruste des Reisbrotes nicht der üblichen Verbrauchererwartung einer gebräunten, gleichmäßigen Brotkruste. Sensorische Aromaprofile ergaben eine starke, an Reis erinnernde Note in der Reisbrotkrume- und Kruste. Die Geruchsqualitäten „malzig“, „röstig, Popcorn“ und „Karamell“ wurden im Reisbrot zudem schwächer bewertet als in Weizenbrot.

Untersuchungen des Aromas auf molekularer Ebene erfolgten nach einem Sensomics Ansatz.^{26,29} Mittels Kaltextraktion und „Solvent Assisted Flavor Evaporation“ wurde die flüchtige Fraktion gewonnen und die darin enthaltenen aromaaktiven Verbindungen durch Gaschromatographie-Olfaktometrie detektiert. Die Analyse einer Verdünnungsreihe jeder Probe (Aromaextraktverdünnungsanalyse, AEVA) ermöglichte eine Einschätzung der Relevanz jedes Aromastoffs entsprechend der höchsten Verdünnung, in welcher dieser detektiert wurde (FD-Faktor). In den Brotkrumen und -krusten der beiden Brotsorten wurden 35-43 geruchsaktive Verbindungen detektiert, wobei die meisten relevanten Substanzen in beiden Broten enthalten waren und nur in ihren Intensitäten variierten. Drei Aromastoffe des Reisbrotes (4-Hydroxy-2-octensäurelacton und 4-Hydroxynonenensäurelacton (Kokos) sowie 4-Methylchinazolin (Minze) wurden erstmals in Reis bzw. darauf basierenden Produkten identifiziert.

Mittels Stabilisotopenverdünnungsanalysen (SIVA) wurden 18 Aromastoffe quantifiziert, um deren Aromawerte (AW), die Quotienten aus der Konzentration und der Geruchsschwelle, zu berechnen. In allen Brotproben zählten 3-Methylbuttersäure (schweißig), 3-Methyl-1-butanol (malzig), 2-Methoxy-4-vinylphenol (rauchig, Nelke) und Phenyllessigsäure (Honig, Bienenwachs) zu den Aromastoffen mit den höchsten AW (>10). 2-Aminoacetophenon (foxy) besaß hingegen ausschließlich in den Reisbrotproben relevante AW, das *Maillard*-Produkt Maltol (Karamell) ausschließlich in der Weizenbrotkruste. Weitere Unterschiede zwischen den Brotproben wurden durch höhere AW der Essigsäure und niedrigere AW der Lipidabbauprodukte (z.B. Hexanal) in Reisbrot verursacht. Auch gab es Abweichungen in den AW der durch die Hefen mittels Ehrlich-Abbau gebildeten Aromastoffe, insbesondere 3-Methyl-1-butanol, welches in der Reisbrotkrume einen höheren AW besaß als in der Weizenbrotkrume.

Um die Ursachen der Aromaunterschiede zwischen Reis- und Weizenbrot besser zu verstehen, wurden verschiedene Studien zum Ursprung der Aromastoffe des Reisbrotes angestellt. Die Analyse des Reismehls mittels AEVA ergab eine große Ähnlichkeit zum Reisbrot, wobei mit 31 Aromastoffen eine geringere Komplexität als in den Brotproben vorlag. Quantifizierungsexperimente mittels SIVA verdeutlichten, dass nur wenige Aromastoffe (Essigsäure, Hexanal und (*E*)-2-Nonenal) in höheren Mengen im Mehl enthalten waren als im Brot, also vorwiegend vom Mehl in das Brot eingetragen wurden. Von den übrigen Aromastoffen des Reisbrotes stammten lediglich kleine Anteile aus dem Reismehl.

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen den durch die Hefe via Ehrlich-Abbau gebildeten Aromastoffen und den in den Rohstoffen verfügbaren freien Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Phenylalanin untersucht. In Weizenmehl lagen diese Aminosäuren in deutlich höheren Konzentrationen vor als in Reismehl. Auch wurde ausschließlich bei Weizenmehl ein Anstieg der Aminosäurekonzentrationen während der Quellung in Wasser beobachtet. Dies stand in Widerspruch mit den Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten, welche in der Reisbrotkrume teilweise höher waren als in der Weizenbrotkrume. Die Konzentration der Metaboliten in der Reisbrotkrume überstiegen sogar die verfügbaren Mengen der freien Aminosäuren im Reismehl bzw. im Reisbrotteig. Eine mögliche Ursache dafür wäre eine Veränderung der

Stoffwechselprozesse der Hefe aufgrund des geringen Nährstoffangebots in Reisbrotteig, welcher zu einem verstärkten Proteinabbau und somit zu einer verstärkten Bildung der Leucin- und Phenylalaninmetaboliten führte.

Untersuchungen zur Bildung des für Reisbrot charakteristischen Aromastoffs 2-Aminoacetophenon (2-AAP) bestätigten 2-Formamidoacetophenon (FAP) als direkte Vorstufe. FAP lag ausschließlich im Reismehl, nicht aber im Weizenmehl und der Hefe vor und wurde während der Teigfermentation stetig nachgebildet. Die Bildung von FAP erfolgte aus Indol-3-essigsäure (IAA),⁷³ welche in Mehlen sowohl frei als auch gebunden vorliegt, durch einen radikalischen oder enzymatischen, oxidativen Abbau. Die beobachtete Anreicherung der IAA im Weizenbrotteig während der Fermentation ließ eine Unterdrückung dieses Abbaus, möglicherweise durch höhere Mengen an Antioxidantien (z.B. phenolische Verbindungen und Carotinoide) vermuten. Ein Zusatz von IAA zum Teig ergab jedoch auch bei Reisbrot keinen linearen Zusammenhang mit den Konzentrationen der Derivate FAP und 2-AAP, sodass weitere regulatorische Mechanismen der Bildung von 2-AAP in der komplexen Matrix der Brotteige in Betracht gezogen werden müssen.

Zuletzt wurde der Einfluss des Mehllalters auf das Aroma des Reisbrotes untersucht, wozu eine zwei Jahre lang gelagerte Charge des Reismehls diente. Das daraus hergestellte Brot besaß sowohl eine schlechtere Backqualität (Volumen und Krumenhärte), als auch starke sensorische Abweichungen zu dem Brot aus der frischen Reismehlcharge. Mittels AEVA und SIVA wurden vor allem Lipidabbauprodukte dafür verantwortlich gemacht und Hexanal als wichtigster aromaaktiver Alterungsindikator erkannt. Darüber hinaus wurde eine starke Anreicherung von (*Z*)-2-Butyl-2-octenal, dem Aldolkondensationsprodukt des Hexanals, in der gelagerten Reismehlcharge, verglichen mit der frischen, verzeichnet. Dieses wurde jedoch nur teilweise in das Reisbrot übertragen. Zwei weitere lagerungsbedingt gebildete Aldolkondensationsprodukte (2-Butyl-2-heptenal und 2-Propyl-2-octenal) wurden zudem erstmals im Reismehl detektiert.

6 LITERATUR

- 1) Scherf, K. A.; Köhler, P. Wheat and gluten: Technological and health aspects. *Ernaehrungs Umschau* **2016**, 63 (8), 166–175.
- (2) Scherf, K. A.; Koehler, P.; Wieser, H. Gluten and wheat sensitivities - An overview. *J. Cereal Sci.* **2016**, 67, 2–11.
- (3) Masure, H. G.; Fierens, E.; Delcour, J. A. Current and forward looking experimental approaches in gluten-free bread making research. *J. Cereal Sci.* **2015**, 67, 92–111.
- (4) Kim, M.; Yun, Y.; Jeong, Y. Effects of corn, potato, and tapioca starches on the quality of gluten-free rice bread. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, 24 (3), 913–919.
- (5) Park, J. H.; Kim, D. C.; Lee, S. E.; Kim, O. W.; Kim, H.; Lim, S. T.; Kim, S. S. Effects of rice flour size fractions on gluten free rice bread. *Food Sci. Biotechnol.* **2014**, 23 (6), 1875–1883.
- (6) Han, H. M.; Cho, J. H.; Kang, H. W.; Koh, B. K. Rice varieties in relation to rice bread quality. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, 92 (7), 1462–1467.
- (7) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch Der Lebensmittelchemie*, 6th ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **2008**.
- (8) Produktionsstatistik der FAO 2017, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (accessed: Mar 02, 2019)
- (9) Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H. *Lebensmitteltabelle für die Praxis — Der Kleine Souci-Fachmann-Kraut*; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, **2011**.
- (10) GMF. *Getreide, Mehl und Schrot: Vom Rohstoff zur Backqualität*. GMF, (Vereinigung Getreide-, Markt- und Ernährungsforschung): Bonn, **2004**.

- (11) Kieffer, R.; Wieser, H.; Henderson, M. H.; Graveland, A. Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. *J. Cereal Sci.* **1998**, 27 (1), 53–60.
- (12) Müller, E. Backqualität von Weizenmehl – Funktionelle Untersuchungen und stoffliche Ursachen, Dissertation, Technische Universität München, **2018**.
- (13) Jeleń, H. Flavor of bread and bakery products. In *Food Flavors: Chemical, Sensory and Technological Properties*; CRC Press: Boca Raton, FL, US, **2011**; pp 301–333.
- (14) Gray, J. A.; Bemiller, J. N. Bread staling: Molecular basis and control. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2006**, 2 (1), 1–21.
- (15) Gómez, M.; Oliete, B.; Pando, V.; Ronda, F.; Caballero, P. A. Effect of rice, pea, egg white and whey proteins on crust quality of rice flour-corn starch based gluten-free breads. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 226 (6), 1379–1387.
- (16) Lorenz, K.; Maga, J. Staling of white bread: Changes in carbonyl composition and glc headspace profiles. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, 20 (2), 211–213.
- (17) Sciarini, L. S.; Ribotta, P. D.; León, A. E.; Pérez, G. T. Influence of gluten-free flours and their mixtures on batter properties and bread quality. *Food Bioprocess Technol.* **2010**, 3 (4), 577–585.
- (18) Hager, A.-S.; Wolter, A.; Czerny, M.; Bez, J.; Zannini, E.; Arendt, E. K.; Czerny, M. Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, 235 (2), 333–344.
- (19) Feizollahi, E.; Mirmoghtadaie, L.; Mohammadifar, M. A.; Jazaeri, S.; Hadaegh, H.; Nazari, B.; Lalegani, S. Sensory, digestion, and texture quality of commercial gluten-free bread: Impact of broken rice flour type. *J. Texture Stud.* **2018**, 49 (4), 395–403.

- (20) de la Hera, E.; Martinez, M.; Oliete, B.; Gómez, M. Influence of flour particle size on quality of gluten-free rice bread. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, 6 (9), 2280–2288.
- (21) Matos, M. E.; Rosell, C. M. Quality indicators of rice-based gluten-free bread-like products: relationships between dough rheology and quality characteristics. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, 6, 2331–2341.
- (22) Masure, H. G.; Wouters, A. G. B.; Fierens, E.; Delcour, J. A. Electrical resistance oven baking as a tool to study crumb structure formation in gluten-free bread. *Food Res. Int.* **2019**, 116, 925–931.
- (23) Pico, J.; Bernal, J. L.; Gómez, M. Influence of different flours and starches on gluten-free bread aroma. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, 54 (6), 1433–1441.
- (24) Dunkel, A.; Steinhaus, M.; Kotthoff, M.; Nowak, B.; Krautwurst, D.; Schieberle, P.; Hofmann, T. Nature's chemical signatures in human olfaction: A foodborne perspective for future biotechnology. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, 53 (28), 7124–7143.
- (25) Jeleń, H. Specificity of food odorants. In *Food Flavors: Chemical, Sensory and Technological Properties*; CRC Press: Boca Raton, FL, US, **2011**; pp 1–18.
- (26) Schieberle, P.; Hofmann, T. Auf den Geschmack gekommen: Die molekulare Welt des Lebensmittelgenusses. *Chemie Unserer Zeit* **2003**, 37 (6), 388–401.
- (27) Buettner, A.; Beer, A.; Hannig, C.; Settles, M.; Schieberle, P. Physiological and analytical studies on flavor perception dynamics as induced by the eating and swallowing process. *Food Qual. Prefer.* **2002**, 13 (7–8), 497–504.
- (28) Busch-Stockfish, M. Sensorische Grundlagen. In *Praxishandbuch Sensorik*; BEHR's Verlag, Hamburg, **2007**; pp 1–12.
- (29) Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In *Characterization of Food: Emerging Methods*; Gaonkar, A. H., Elsevier, Amsterdam, Niederlande, **1995**; pp 403–431.

- (30) Engel, W.; Bahr, W.; Schieberle, P. Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, 209 (3–4), 237–241.
- (31) Ullrich, F.; Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, 184 (4), 277–282.
- (32) Schieberle, P.; Grosch, W. Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, 35, 252–257.
- (33) Czerny, M.; Christlbauer, M.; Christlbauer, M.; Fischer, A.; Granvogl, M.; Hammer, M.; Hartl, C.; Hernandez, N. M.; Schieberle, P. Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 228 (2), 265–273.
- (34) Grosch, W. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem. Senses* **2001**, 26 (5), 533–545.
- (35) Moving Capillary Stream Switching
<https://www.brechbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/ancillary-products/advanced-gc/MCSS.pdf> (accessed Jan 24, 2019).
- (36) Schieberle, P. Intense aroma compounds: Useful tools to monitor the influence of processing and storage on bread aroma. *Adv. food Sci.* **1996**, 18 (5–6), 237–244.
- (37) Birch, A. N.; Petersen, M. A.; Hansen, Å. S. REVIEW: Aroma of wheat bread crumb. *Cereal Chem. J.* **2013**, 91 (2), 105–114.
- (38) Czerny, M.; Schieberle, P. Important aroma compounds in freshly ground wholemeal and white wheat flour-identification and quantitative changes during sourdough fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (23), 6835–6840.

- (39) Schieberle, P. Studies on bakers yeast as source of *Maillard*-type bread flavour compounds. In *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*; Birkhäuser Verlag: Basel, **1990**; pp 187–196.
- (40) Münch, P.; Hofmann, T.; Schieberle, P. Comparison of key odorants generated by thermal treatment of commercial and self-prepared yeast extracts: Influence of the amino acid composition on odorant formation. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45 (4), 1338–1344.
- (41) Ehrlich, F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, 40 (147), 1027–1042.
- (42) Czerny, M.; Schieberle, P. Labelling studies on pathways of amino acid related odorant generation by *saccharomyces cerevisiae* in wheat bread dough. In *Flavor Science: Recent Advances and Trends*; **2006**; pp 89–92.
- (43) Opperer, C. Generierung Potenter Aromastoffe aus Getreidemehlen durch mikrobielle Metabolisierung, Dissertation, Technische Universität München, **2014**.
- (44) Schieberle, P.; Grosch, W. Potent odorants of the wheat bread crumb Differences to the crust and effect of a longer dough fermentation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, 192 (2), 130–135.
- (45) Gassenmeier, K.; Schieberle, P. Potent aromatic compounds in the crumb of wheat bread (French-type) - influence of pre-ferments and studies on the formation of key odorants during dough processing. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, 201 (3), 241–248.
- (46) Birch, A. N.; Petersen, M. A.; Hansen, Å. S. The aroma profile of wheat bread crumb influenced by yeast concentration and fermentation temperature. *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, 50 (2), 480–488.

- (47) Zehentbauer, G.; Grosch, W. Crust aroma of baguettes ii. dependence of the concentrations of key odorants on yeast level and dough processing. *J. Cereal Sci.* **1998**, 28 (1), 93–96.
- (48) Brümmer, J.-M. Bäckereitechnologische Zusammenhänge von Brotaroma, Brotvolumen, Krumenstruktur und Geschmacksbeeinflussung. *Getreidetechnologie* **2005**, 59 (1), 20–25.
- (49) Pico, J.; Bernal, J.; Gómez, M. Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: A review. *Food Res. Int.* **2015**, 75, 200–215.
- (50) Sahin, B.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in yeast dumplings by means of the Sensomics concept. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67 (10), 2973–2979.
- (51) Schieberle, P.; Grosch, W. Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, 185, 111–113.
- (52) Zehentbauer, G.; Grosch, W. Crust aroma of baguettes I. Key odorants of baguettes prepared in two different ways. *J. Cereal Sci.* **1998**, 28, 81–92.
- (53) Rychlik, M.; Grosch, W. Identification and quantification of potent odorants formed by toasting of wheat bread. *LWT - Food Sci. Technol.* **1996**, 29 (5–6), 515–525.
- (54) Schieberle, P. The role of free amino acids present in yeast as precursors of the odorants 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine in wheat bread crust. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1990**, 191, 206–209.
- (55) Schieberle, P.; Grosch, W. Changes in the concentrations of potent crust odourants during storage of white bread. *Flavour Fragr. J.* **1992**, 7 (3), 213–218.
- (56) Schieberle, P.; Grosch, W. Potent odorants of rye bread crust- differences from the crumb and from wheat bread crust. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1994**, 198 (4), 292–296.

- (57) Pico, J.; Hansen, Å. S.; Petersen, M. A. Comparison of the volatile profiles of the crumb of gluten-free breads by DHE-GC/MS. *J. Cereal Sci.* **2017**, 76, 280–288.
- (58) Buttery, R. G.; Turnbaugh, J. G.; Ling, L. C. Contribution of volatiles to rice aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 36 (5), 1006–1009.
- (59) Buttery, R. G.; Ling, L. C.; Turnbaugh, J. G.; Juliano, B. O. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31 (4), 823–826.
- (60) Jezussek, M.; Juliano, B. O.; Schieberle, P. Comparison of key aroma compounds in cooked brown rice varieties based on aroma extract dilution analyses. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (5), 1101–1105.
- (61) Jezussek, M. Zur Aromabildung beim Kochen von Naturreis (*Oryza Sativa* L.) Sowie Blättern von Pandanus Amaryllifolius Roxb., Dissertation, Technische Universität München, **2002**.
- (62) Dhaliwal, Y.; Sekhon, K.; Nagi, H. Enzymatic activities and rheological properties of stored rice. *Cereal Chem.* **1991**, pp 18–21.
- (63) Zhou, Z.; Robards, K.; Helliwell, S.; Blanchard, C. Ageing of stored rice: changes in chemical and physical attributes. *J. Cereal Sci.* **2001**, 33, 18–26.
- (64) Widjaja, R.; Craske, J. D.; Wootton, M. Changes in volatile components of paddy, brown and white fragrant rice during storage. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, 71 (2), 218–224.
- (65) Bryant, R. J.; McClung, A. M. Volatile profiles of aromatic and non-aromatic rice cultivars using SPME/GC-MS. *Food Chem.* **2011**, 124 (2), 501–513.
- (66) Mall, V.; Schieberle, P. Evaluation of key aroma compounds in processed prawns (whiteleg shrimp) by quantitation and aroma recombination experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65 (13), 2776–2783.
- (67) Grosch, W.; Schieberle, P. Flavor of cereal products—a review. *Cereal Chem.* **1997**, 74 (2), 91–97.

-
- (68) Langos, D.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in two bavarian wheat beers by means of the sensomics approach. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61 (47), 11303–11311.
- (69) Christoph, N.; Geßner, M.; Simat, T. J.; Hoenicke, K. Off-flavor compounds in wine and other food products formed by enzymatical, physical, and chemical degradation of tryptophan and its metabolites BT - tryptophan, serotonin, and melatonin: Basic aspects and applications. In *Tryptophan, Serotonin, and Melatonin - Basic Aspects and Applications*; Huether, G., Kochen, W., Simat, T. J., Steinhart, H.; Springer US: Boston, MA, **1999**; pp 659–669.
- (70) Fritsch, H. T.; Schieberle, P. Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a bavarian pilsner-type beer. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7544–7551.
- (71) Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Geßner, M.; Köhler, H. J.; Simat, T. J.; Hoenicke, K. Formation of 2-aminoacetophenone and formylaminoacetophenone in wine by reaction of sulfurous acid with indole-3-acetic acid. *Vitic. Enol. Sci.* **1998**, 53 (2), 79–86.
- (72) Hoenicke, K.; Simat, T. J.; Steinhart, H.; Christoph, N.; Geßner, M.; Köhler, H. J. “Untypical aging off-flavor” in wine: formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 458 (1), 29–37.
- (73) Hoenicke, K.; Borchert, O.; Grüning, K.; Simat, T. J. “Untypical aging off-flavor” in wine: synthesis of potential degradation compounds of indole-3-acetic acid and kynurenine and their evaluation as precursors of 2-aminoacetophenone. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (15), 4303–4309.
- (74) Kato, T.; Tomita, N.; Yagi, J.; Taniguchi, K.; Takahashi, N. A chemical evaluation of a role of rice husk toward growth regulation of rice seedlings. *Recent Res. Dev. Agric. Biol. Chem.* **1999**, 3, 43–50.
- (75) Shin, M.; Shinguu, T.; Sano, K.; Umezawa, C. Metabolic fates of l-tryptophan in *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*). *Chem. Pharm. Bull* **1991**, 39 (7), 1792–1795.
-

- (76) Ciolfi, G.; Garofolo, A.; Di Stefano, R. Identification of o-aminophenons as secondary metabolites of *Saccharomyces* yeast during fermentation by synthetic medium. *Wein-Wissenschaft* **1996**, 51 (3/4), 156–158.
- (77) Kato, T.; Tomita, N.; Hoshikawa, M.; Ehara, K.; Shima, J.; Takahashi, N.; Sugiyama, H. In vitro oxidation of indoleacetic acid by crude enzyme from rice husk - an aspect of preharvest sprouting. *Heterocycles* **1998**, 47 (1), 497–500.
- (78) Koehler, P.; Wieser, H.; Konitzer, K. Celiac disease and gluten : multidisciplinary challenges and opportunities. Elsevier, Heidelberg **2014**.
- (79) Hager, A. S.; Bosmans, G. M.; Delcour, J. A. Physical and molecular changes during the storage of gluten-free rice and oat bread. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (24), 5682–5689.
- (80) Erazo-Castrejón, S. V.; Doehlert, D. C.; D'Appolonia, B., L. application of oat oil in breadmaking. *Cereal Chem.* **2001**, 78 (3), 243–248.
- (81) Forssell, P.; Shamekh, S.; Härkönen, H.; Poutanen, K. Effects of native and enzymatically hydrolysed soya and oat lecithins in starch phase transitions and bread baking. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, 76 (1), 31–38.
- (82) Lamberts, L.; Delcour, J. A. Carotenoids in raw and parboiled brown and milled rice. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (24), 11914–11919.
- (83) Tan, J.; Baisakh, N.; Oliva, N.; Parkhi, V.; Rai, M.; Torrizo, L.; Datta, K.; Datta, S. K. The screening of rice germplasm, including those transgenic rice lines which accumulate β -carotene in their polished seeds, for their carotenoid profile. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2005**, 40 (5), 563–569.
- (84) Browne, D. M.; Niyomura, O.; Wirth, T. Catalytic use of selenium electrophiles *Cyclizations*. *Org. Lett.* **2007**, 9 (16), 3169–3172.
- (85) Guth, H.; Grosch, W. Geruchsstoffe von extrudiertem Hafermehl, Veränderungen bei der Lagerung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, 196, 22–28.

- (86) Grosshauser, S.; Schieberle, P. Characterization of the key odorants in pan-fried white mushrooms (*Agaricus Bisporus L.*) by means of molecular sensory science: comparison with the raw mushroom tissue. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61 (16), 3804–3813.
- (87) Mann, S. Chinazolinderivate bei Pseudomonaden. *Arch. Mikrobiol.* **1967**, 56 (4), 324–329.
- (88) Cox, C. D.; Parker, J. Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **1979**, 9 (4), 479–484.
- (89) Fujimaki, M.; Tsugita, T.; Kurata, T. Fractionation and identification of volatile acids and phenols in the steam distillate of rice bran. *Agric. Biol. Chem.* **1977**, 41 (9), 1721–1725.
- (90) Globisch, M.; Schindler, M.; Kreßler, J.; Henle, T. Studies on the reaction of trans-2-heptenal with peanut proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (33), 8500–8507.
- (91) Mayr, C. M.; Schieberle, P. Development of stable isotope dilution assays for the simultaneous quantitation of biogenic amines and polyamines in foods by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (12), 3026–3032.
- (92) Hartmann, S.; Schieberle, P. On the role of amadori rearrangement products as precursors of aroma-active strecker aldehydes in cocoa. *ACS Symp. Ser.* **2016**, 1237, 1–13.
- (93) Saikusa, T.; Horino, T.; Mori, Y. distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42 (5), 1122–1125.
- (94) Leewatchararongjaroen, J.; Anuntagool, J. effects of dry-milling and wet-milling on chemical, physical and gelatinization properties of rice flour. *Rice Sci.* **2016**, 23 (5), 274–281.

- (95) Bernreuther, D. Untersuchungen zur Autophagocytose in der Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*. Proteinwechselwirkungen, Klonierung und Charakterisierung des SAI1-Gens, Dissertation, Universität Stuttgart, **2002**.
- (96) Teichert, U.; Mechlere, B.; Müller, H.; Wolfll, D. H. Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264 (27), 16037–16045.
- (97) Rousset, M.; Dubouchet, J. Study of some physicochemical and biological properties of o-formamidoacetophenone. *Comptes Rendus du Congr. Natl. des Soc. Savantes, Sect. des Sci.* **1975**, 99 (2), 131–142.
- (98) Soong, Y. Y.; Tan, S. P.; Leong, L. P.; Henry, J. K. Total antioxidant capacity and starch digestibility of muffins baked with rice, wheat, oat, corn and barley flour. *Food Chem.* **2014**, 164, 462–469.
- (99) Sakač, M.; Torbica, A.; Sedej, I.; Hadnadev, M. Influence of breadmaking on antioxidant capacity of gluten free breads based on rice and buckwheat flour. *Food Res. Int.* **2011**, 44 (9), 2806–2813.
- (100) Cohen, J. D.; Bandurski, R. S. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1982**, 33 (1), 403–430.
- (101) Hoenicke, K.; Simat, T. J.; Steinhart, H.; Koehler, H. J.; Schwab, A. Determination of free and conjugated indole-3-acetic acid, tryptophan, and tryptophan metabolites in grape must and wine. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (11), 5494–5501.
- (102) Holmes, J. T.; Hosney, R. C. Chemical Leavening: Effect of pH and certain ions on breadmaking properties. *Cereal Chem. J.* **1987**, 64 (6), 343–348.
- (103) Collar Esteve, C.; Benedito de Barber, C.; Martínez-Anaya, M. Microbial sour doughs influence acidification properties and breadmaking potential of wheat dough. *J. Food Sci.* **1994**, 59 (3), 629–633.
- (104) Chrastil, J. Chemical and physicochemical changes of rice during storage at different temperatures. *J. Cereal Sci.* **1990**, 11 (1), 71–85.

- (105) Fan, J.; Marks, B. P. Effects of rough rice storage conditions on gelatinization and retrogradation properties of rice flours. *Cereal Chem.* **1999**, 76 (6), 894–897.
- (106) Zhou, Z.; Robards, K.; Helliwell, S.; Blanchard, C. Effect of storage temperature on rice thermal properties. *Food Res. Int.* **2010**, 43 (3), 709–715.
- (107) Cheng, Y.; Huynh-Ba, T.; Blank, I.; Fabien, R. Temporal changes in aroma release of Longjing tea infusion: Interaction of volatile and nonvolatile tea components and formation of 2-butyl-2-octenal upon aging. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 2160–2169.
- (108) Lin, J.-Y.; Fan, W.; Gao, Y.-N.; Wu, S.-F.; Wang, S.-X. Study on Volatile compounds in rice by HS-SPME and GC-MS. *10th Int. Work. Conf. Stored Prod. Prot.* **2010**, 125–134.
- (109) Grimm, C. C.; Champagne, E. T.; Lloyd, I. S. W.; Easson, I. M. Analysis of 2-acetyl-1-pyrroline in rice by HSSE/GC/MS. *Cereal Chem. J.* **2011**, 88 (3), 271–277.
- (110) Heiniö, R. L.; Lehtinen, P.; Oksman-Caldentey, K. M.; Poutanen, K. Differences between sensory profiles and development of rancidity during long-term storage of native and processed oat. *Cereal Chem.* **2002**, 79 (3), 367–375.
- (111) Zhou, Z.; Robards, K.; Helliwell, S.; Blanchard, C. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chem.* **2004**, 87 (3), 401–406.
- (112) Büchi, G.; Wüest, H. Synthesis of 2-Aeetyl-1,4,5,6-Tetrahydropyridine, a constituent of bread aroma. *J. Org. Chem.* 1971, 36 (4), 609–610.
- (113) Wavrin, L.; Viala, J. Clean and Efficient Oxidation of homoallylic and homopropargylic alcohols into β,γ -unsaturated aldehydes by the Dess-Martin Periodinane. *Synthesis.* **2002**, 6 (3), 326–330.
- (114) Schieberle, P.; Buettner, A. Influence of the chain length on the aroma properties of homologous epoxy-aldehydes, ketones, and alcohols. In *Aroma*

Active Compounds in Foods; ACS Symposium Series; American Chemical Society, **2001**; Vol. 794 (9), pp 109–118.

- (115) Schütt, J.; Schieberle, P. Quantitation of nine lactones in dairy cream by stable isotope dilution assays based on novel syntheses of carbon-13-labeled γ -lactones and deuterium-labeled δ -Lactones in combination with comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65 (48), 10534–10541.
- (116) Guth, H.; Grosch, W. Deterioration of soya-bean oil. Quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1990**, 23 (6), 513–522.
- (117) Lin, J.; Welti, D. H.; Arce Vera, F.; Fay, L. B.; Blank, I. Synthesis of deuterated volatile lipid degradation products to be used as internal standards in isotope dilution assays. 1. Aldehydes *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (7), 2822–2829.
- (118) Kubíčková, J.; Grosch, W. Quantification of potent odorants in camembert cheese and calculation of their odour activity values. *Int. Dairy J.* **1998**, 8 (1), 17–23.
- (119) Harada, R.; Iwasaki, M. Syntheses of maltol and ethylmaltol. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, 47 (12), 2921–2922.
- (120) Kiefl, J. Differentiation of hazelnut cultivars (*Corylus Avellana* L.) by metabolomics and sensomics approaches using comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GCxGC/TOF-MS), Dissertation, Technische Universität München, **2013**.
- (121) Dhake, K. P.; Tambade, P. J.; Singhal, R. S.; Bhanage, B. M. An efficient, catalyst- and solvent-free N-formylation of aromatic and aliphatic amines. *Green Chem. Lett. Rev.* **2011**, 4 (2), 151–157.
- (122) Walter, T.; Wieser, H.; Koehler, P. Degradation of gluten in rye sourdough products by means of a proline-specific peptidase. *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, 240 (3), 517–524.

- (123) Christlbauer, M.; Schieberle, P. Evaluation of the key aroma compounds in beef and pork vegetable gravies a la chef by stable isotope dilution assays and aroma recombination experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 13122–13130.