

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Lebensmittelchemie

## **Einfluss der Milchpasteurisierung und der Reifungszeit auf die Bildung von Schlüsselaromastoffen in Käse nach Gouda-Art**

**Philipp Werner Duensing**

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

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Rychlik

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle  
2. Univ.-Prof. Dr. Jörg Hinrichs (Universität Hohenheim)

Die Dissertation wurde am 02.11.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 27.02.2012 angenommen.

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. Peter Schieberle in der Zeit von Januar 2005 bis Januar 2008 am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Peter Schieberle gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des äußerst interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die vielen wertvollen Anregungen, Ratschläge und Diskussionen sowie die mir jederzeit gewährte Unterstützung und das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse und Vertrauen.

Herrn Professor Dr. Jörg Hinrichs und Herrn Giovanni Migliore vom Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität Hohenheim danke ich für die Möglichkeit und hervorragende Zusammenarbeit bei der Herstellung des Probenmaterials in der dortigen Forschungs- und Lehrmolkerei.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie und der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie für ein sehr angenehmes und persönliches Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für ihre Teilnahme an sensorischen Untersuchungen danke ich Frau Petra Bail, Frau Dr. Johanna Bogen, Herrn Dr. Tobias Breitbach, Frau Dr. Katja Buhr, Frau Dr. Irene Chetschik, Herrn Dr. Michael Czerny, Frau Laetitia David, Frau Kathrin Eisgruber, Frau Patricia Esposito, Frau Stephanie Frank, Frau Dr. Anja Fischer, Herrn Dr. Michael Granvogl, Frau Dr. Gesa Gröhnke, Frau Sonja Großhauser, Frau Michaela Hammer, Frau Dr. Cornelia Hartl, Frau Dr. Kathie Horst, Herrn Bernd Köhlnhofer, Frau Johanna Kreißl, Herrn Christof Madinger, Frau Veronika Mall, Frau Dr. Christine Mayr, Frau Dr. Noelia Moran, Frau Astrid Oelmann, Frau Dr. Sabine Riha, Frau Christina Pammer, Herrn Johannes Polster, Frau Dr. Claudia Scheidig, Frau Julia Scherb, Frau Dr. Kerstin Söllner, Herrn Jörg Stein, Herrn Dr. Martin Steinhaus, Frau Simone Strasser, Frau Kerstin Teichert-Möller, Frau Dr. Karin Thomas, Herrn Dr. Michael Vocke, Herrn Dr. Martin Weigl, Frau Elke Wiegand und Herrn Wolfgang Wilhelm.

Herrn Dr. Michael Czerny, Frau Dr. Anja Fischer und Herrn Dr. Martin Steinhaus danke ich für die lehrreiche Einführung in die instrumentelle Aromastoff-Analytik und die Wartung der Ionenfallen.

Frau Sabine Heinel, Herrn Sami Kaviani-Nejad und Frau Ines Otte danke ich für die zuverlässige Durchführung zahlreicher Messungen am Sektorfeld-MS, sowie Herrn Patrick Selmair für die NMR-Messungen. Für die Durchführung der ASA-Messungen danke ich herzlich Frau Katharina Schiesser. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Michael Larcher für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Instandsetzung defekter Geräte und bei Herrn Georg Gamböck für seine Hilfe bei Reparaturen. Für ihren Einsatz rund um das Spülen von Glasgeräten und die Chemikalienverwaltung bedanke ich mich bei Frau Helga Häusler, Frau Lydia Paganal und Frau Verica Tuvaljevic.

Für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Betreuung des lebensmittelchemischen Praktikums danke ich Herrn Dr. Stefan Asam, Herrn Dr. Michael Granvogl, Frau Dr. Kathie Horst, Frau Dr. Sabine Mönch, Frau Christina Pammer, Frau Dr. Claudia Scheidig, Frau Dorothea Schweiger-Recknagel und Herrn Dr. Michael Vocke.

Bei meinen Laborkolleginnen und Laborkollegen Frau Dr. Susanne Bugar, Frau Stephanie Frank, Frau Anja Mialki, Herrn Dr. Martin Steinhaus, Frau Magdalena Uzunova und Frau Elke Wiegand möchte ich mich ganz herzlich für das angenehme Arbeitsklima und die schöne gemeinsame Zeit im Labor 62110 bedanken.

Ein Dank gilt auch meinem Kollegen Herrn Dr. Stefan Asam für die vielen konstruktiven Gespräche, hilfreichen Ratschläge sowie die gute Zusammenarbeit und Kameradschaft während unserer Studien- und Promotionszeit.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir meine langjährige Ausbildung ermöglicht haben und mich jederzeit bedingungslos unterstützt und gefördert haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Daniela danken, für ihre Liebe, immerwährende Geduld und Unterstützung bei der Vollendung meiner Arbeit.

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Geschichte des Käsekonsums.....</b>	<b>1</b>
	Käse in der Urzeit.....	1
	Käse in Antike und Mittelalter.....	1
	Käse in Neuzeit und Gegenwart.....	2
<b>1.2</b>	<b>Käse nach Gouda-Art.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b>Flüchtige Verbindungen in Käse nach Gouda-Art.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>Quantitative Veränderungen flüchtiger Verbindungen in Schnitt- und Hartkäse.....</b>	<b>16</b>
1.4.1	Einfluss der Reifungszeit auf die Bildung flüchtiger Verbindungen in Käse nach Gouda-Art .....	16
1.4.2	Einfluss der Pasteurisierung der Milch auf die Bildung flüchtiger Verbindungen in Schnitt- und Hartkäse.....	18
<b>1.5</b>	<b>Freisetzung von Fettsäuren in Käse durch Lipolyse sowie der Einfluss der Pasteurisierung der Milch.....</b>	<b>21</b>
<b>1.6</b>	<b>Modelluntersuchungen zur Umsetzung von L-Leucin zu flüchtigen Verbindungen durch Mikroorganismen.....</b>	<b>23</b>
<b>1.7</b>	<b>Aromarelevanz flüchtiger Verbindungen.....</b>	<b>27</b>
1.7.1	Aromastoffe – Definition und Bedeutung für die Lebensmittelqualität.....	27
1.7.2	Physiologie der Aromawahrnehmung.....	27
1.7.3	Stufenmodell zur Charakterisierung und Bewertung von Aromastoffen.....	28
	Isolierung flüchtiger Verbindungen.....	29
	Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA).....	30
	Identifizierungsexperimente.....	31
	Quantifizierung von Schlüsselaromastoffen.....	31
	Berechnung von Aromawerten.....	32
	Aromasimulation.....	33
<b>1.8</b>	<b>Charakterisierung von Aromastoffen in Schnitt- und Hartkäse.....</b>	<b>34</b>
<b>1.9</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>41</b>

<b>2</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
<b>2.1</b>	<b>Wichtige Aromastoffe in Käse nach Gouda-Art.....</b>	<b>42</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Aromaextraktverdünnungsanalyse eines Handels-Goudas.....</b>	<b>42</b>
	Neutral-basische Fraktion (NBF).....	42
	Saure Fraktion (AF).....	43
	Identifizierungsexperimente.....	44
<b>2.1.2</b>	<b>Schlüsselaromastoffe in 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch.....</b>	<b>48</b>
2.1.2.1	Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA).....	48
	Neutral-basische Fraktion (NBF).....	48
	Identifizierungsexperimente in der NBF.....	50
	Saure Fraktion (AF).....	51
	Identifizierungsexperimente in der AF.....	53
2.1.2.2	Quantifizierung ausgewählter Verbindungen mittels SIVA.....	60
2.1.2.3	Ergebnisse der Quantifizierungen.....	63
2.1.2.4	Ermittlung von Geruchsschwellenwerten.....	64
2.1.2.5	Berechnung von Aromawerten.....	65
2.1.2.6	Aromasimulation.....	66
2.1.2.7	Quantifizierungen der Schlüsselaromastoffe aus Charge 2.....	68
2.1.2.8	Vergleich wichtiger Aromastoffe in Käse nach Gouda-Art.....	70
<b>2.2</b>	<b>Einfluss der Milchpasteurisierung auf die Bildung wichtiger Aromastoffe in Käse nach Gouda-Art.....</b>	<b>75</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Aromaprofilanalyse.....</b>	<b>75</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Schlüsselaromastoffe in 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus Rohmilch.....</b>	<b>76</b>
2.2.2.1	Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA).....	76
	Neutral-basische Fraktion (NBF).....	76
	Saure Fraktion (AF).....	76
2.2.2.2	Quantifizierung und Aromawertberechnung ausgewählter Verbindungen mittels SIVA.....	81
2.2.2.3	Quantifizierungen der Schlüsselaromastoffe aus Charge 2.....	82
2.2.2.4	Aromasimulation.....	83

2.2.2.5	Diskussion zum Einfluss der Milchpasteurisierung auf die Konzentrationen von Schlüsselaromastoffen in Gouda-Käse.....	84
	Freie Fettsäuren.....	86
	Ethylester.....	89
	Lactone.....	91
	Methylverzweigte Aromastoffe.....	92
	Andere Aromastoffe.....	95
2.2.2.6	Schlussfolgerungen zum Aromabeitrag von Schlüsselaromastoffen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch.....	100
<b>2.3</b>	<b>Untersuchungen zum Bildungsverlauf von Aromastoffen in Käse nach Gouda-Art.....</b>	<b>103</b>
2.3.1	<b>Bildungsverlauf wichtiger Aromastoffe in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch.....</b>	<b>103</b>
2.3.2	<b>Bildungsverlauf wichtiger Aromastoffe in Gouda-Käse aus Rohmilch.....</b>	<b>105</b>
2.3.3	<b>Diskussion zum Bildungsverlauf wichtiger Aromastoffe in Gouda-Käse.....</b>	<b>108</b>
	L- und D-Lactat: Biomarker für die Reifung.....	108
	Bildungsverlauf kurzkettiger Fettsäuren.....	109
	Bildung von Ethylestern aus unverzweigten Fettsäuren.....	112
	Bildung von Lactonen.....	114
	Bildung anderer Aromastoffe.....	116
	Bildung von Aromastoffen aus „parent“-Aminosäuren.....	118
<b>2.4</b>	<b>Modellversuche zur Bildung von Aromastoffen aus dem Aminosäurestoffwechsel.....</b>	<b>125</b>
2.4.1	Entwicklung eines Labormodells.....	125
2.4.2	Dotierung mit Precursoren und Quantifizierung der Metabolite.....	128
2.4.3	Bilanzierung der Metabolite.....	136
2.4.4	CAMOLA-Auswertung.....	140
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>143</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>143</b>
3.1.1	Kommerziell erhältlicher Dutch-type Käse (Gouda).....	143
3.1.2	Definiert hergestellter Käse nach Gouda-Art (Hohenheim).....	143

<b>3.2</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b> .....	<b>146</b>
3.2.1	Referenzaromastoffe.....	146
3.2.2	Stabilisotopenmarkierte Aromastoffe.....	148
3.2.3	Sonstige Chemikalien und Reagenzien.....	149
<b>3.3</b>	<b>Synthese des isotopenmarkierten [9,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-<math>\delta</math>-Decalactons</b> .....	<b>151</b>
<b>3.4</b>	<b>Identifizierung der Aromastoffe</b> .....	<b>155</b>
3.4.1	Isolierung der flüchtigen Verbindungen.....	155
3.4.1.1	Kaltextraktion mit Diethylether.....	155
3.4.1.2	Hochvakuumtransfer (HVT).....	155
3.4.2	Fraktionierung der flüchtigen Fraktion.....	156
3.4.3	Identifizierung der Aromastoffe mittels Kapillargaschromatographie- Olfaktometrie (HRGC-O).....	157
3.4.4	Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA).....	157
<b>3.5</b>	<b>Quantitative Bestimmung der Aromastoffe</b> .....	<b>157</b>
3.5.1	Konzentrationsbestimmung der isotopenmarkierten Standards.....	158
3.5.2	Standarddotierung und Herstellung der Lösungsmittelextrakte.....	159
3.5.3	Bestimmung der Responsefaktoren.....	159
3.5.4	Massenspektrometrie und Konzentrationsberechnung.....	159
3.5.5	Bestimmung der Konzentrationen von 2- und 3-Methylbuttersäure.....	161
<b>3.6</b>	<b>Chromatographische Methoden</b> .....	<b>163</b>
3.6.1	Hochauflösende Kapillargaschromatographie: HRGC-O und HRGC-FID.....	163
3.6.2	Bestimmung von Retentionsindices.....	164
3.6.3	Zweidimensionale Kapillargaschromatographie (TDGC).....	165
3.6.4	Festphasenmikroextraktion (SPME).....	167
<b>3.7</b>	<b>Massenspektrometrische Systeme</b> .....	<b>168</b>
3.7.1	HRGC-MS MAT 95 S (System I).....	168
3.7.2	HRGC/MD 800 (System II).....	168
3.7.3	HRGC-ITD-Saturn 2000 (System III).....	168
3.7.4	TDGC-ITD 800 (System IV).....	168
3.7.5	TDGC-ITD-Saturn 2200 (System V).....	189
<b>3.8</b>	<b>Sensorische Methoden</b> .....	<b>169</b>
3.8.1	Dreiecksprüfung (Triangeltest).....	169

3.8.2	Aromaprofilanalyse.....	170
3.8.3	Bestimmung von Geruchsschwellen in Sonnenblumenöl.....	170
3.8.4	Rekombinationsversuche (Aromasimulation).....	171
<b>3.9</b>	<b>Sonstige Methoden.....</b>	<b>175</b>
3.9.1	Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes (Wassergehalt).....	175
3.9.2	Enzymatische Bestimmung von D- und L-Lactat.....	176
3.9.3	Bestimmung der freien Aminosäuren.....	176
3.9.3.1	Probenvorbereitung.....	176
3.9.3.2	Bestimmungsmethode.....	176
3.9.4	Bestimmung der Lipaseaktivität.....	178
3.9.4.1	Messprinzip.....	178
3.9.4.2	Probenvorbereitung.....	179
3.9.4.3	Messung der Fluoreszenz.....	179
3.9.5	Kernresonanzspektroskopie ( <sup>1</sup> H-NMR).....	181
3.9.6	pH-Messung.....	181
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>183</b>
<b>5.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>188</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>201</b>



### Abkürzungen

AEVA	Aromaextraktverdünnungsanalyse
AF	acide Fraktion, saure Fraktion
AW	Aromawert
CAMOLA	Carbon Modul Labeling
CI	Chemische Ionisation
EI	Elektronenstoßionisation
FD-Faktor	Flavour Dilution-Faktor
FFA	Free Fatty Acid, Freie Fettsäure(n)
FFAP	Free Fatty Acid Phase
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie, Gaschromatograph
GC-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRGC	High Resolution Gas Chromatography, Kapillargaschromatographie
HRGC-MS	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie
HRGC-O	Kapillargaschromatographie-Olfaktometrie
HVT	Hochvakuumtransfer
ID	Innendurchmesser
IR-Spektroskopie	Infrarotspektroskopie
Ile	Isoleucin
ITD	Ion Trap Detector
LC-MS-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
Leu	Leucin
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
LPL	Lipoprotein-Lipase
MCSS	Moving Column Stream Switching
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
NBF	neutral-basische Fraktion
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NSLAB	Non Starter Lactic Acid Bacteria
OAV	Odour Activity Value
PCA	Principal Component Analysis
Phe	Phenylalanin
PTR-MS	Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry

Rf	Responsefaktor
RI	Retentionsindex
SAFE	Solvent Assisted Flavour Evaporation
SDE	Simultane Destillation Extraktion
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SPME	Solid Phase Micro Extraction
TDGC-MS	Two Dimensional Gas Chromatography-Mass Spectrometry
TOT	Totalionenstrom
vAEVA	vergleichende Aromaextraktverdünnungsanalyse
Val	Valin

### Trivialnamen

Abhexon	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon
Acetoin	2-Hydroxy-3-butanon
Buttersäure	Butansäure
Diacetyl	2,3-Butandion
Essigsäure	Ethansäure
Methional	3-(Methylthio)-propanal
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinuclueotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-adenin-dinuclueotid, reduzierte Form
p-Kresol	4-Methylphenol
Skatol	3-Methylindol
Sotolon	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon
Vanillin	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd
Wilkinson-Katalysator	Tris-(triphenylphosphin)-rhodium(I)chlorid

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Geschichte der Käseherstellung

### Käse in der Urzeit

Nach der landläufigen historischen Auffassung ist Käse ca. 8000 Jahre alt und stammt aus einer Region, die als der „fruchtbare Halbmond“ bekannt ist, einem Gebiet, das sich von den Flüssen Tigris und Euphrat über die heutige Süd-Türkei bis zur Mittelmeerküste erstreckte. Die Domestizierung von Pflanzen und Tieren in dieser Zeit wird als die „landwirtschaftliche Revolution“ beschrieben. Die ersten Darstellungen über die Käseherstellung im Tempel der Lebensgöttin *Ninchursag* stammen aus Mesopotamien, dem heutigen Irak, und sind 3000 Jahre alt (*Fox et al., 2000a*).

Die natürliche Säuerung durch Milchsäurebakterien bei der damaligen Lagerung der von Ziegen, Rindern und Schafen gewonnenen Milch ließ die Caseine an ihrem isoelektrischen Punkt (pH-Wert = 4,6) ausfallen. Man schätzte die Nahrhaftigkeit der hieraus gewonnenen sauren Molke und des entstandenen Käsebruchs, der frisch oder gelagert konsumiert wurde. Es wurde früh erkannt, dass die Haltbarkeit des Käsebruchs durch Trocknung oder Salzung verlängert werden konnte. Die Entdeckung von Lab-Enzymen aus Wiederkäuermägen zur Dicklegung der Milch stammt auch aus dieser Zeit. Sie beruhte u.a. auf der Beobachtung, dass Milch, die in Mägen geschlachteter Tiere gelagert wurde, koagulierte. Die besseren Syneräse-Eigenschaften dieses Käsebruchs durch die Labfällung resultierten u.a. in einer wasserärmeren Bruchmasse, die gleichzeitig nicht aushärtete. Es ließ sich somit ein stabileres Produkt erzeugen, weshalb sich die **Labfällung** zum vorherrschenden Verfahren in der Käseherstellung entwickelte. Sie wird heute noch immer für ca. 75 % der Käse-Weltproduktion angewendet (*Fox und Mc Sweeney, 2004*).

### Käse in Antike und Mittelalter

Käse entwickelte sich im antiken Griechenland zur begehrten Handelsware und Delikatesse sowie zur Opfergabe und sogar zum Aphrodisiakum und fand somit im Alltag der Griechen seinen festen Platz. *Homer* beschrieb im 8. Jh. v. Chr. in seiner *Odysee* die magische Kraft des Käsegenusses und *Aristoteles* verfasste bereits das erste Fachbuch über die Milchverarbeitung. Durch den vermehrten Verkauf griechischer Sklaven nach Rom und in die von Rom besetzten Gebiete, in Verbindung mit dem dichten Verkehrsnetz des römischen Reiches, verbreitete sich die Käsereikunst schnell in alle Teile Europas. Im alten Rom waren

## 1 Einleitung

---

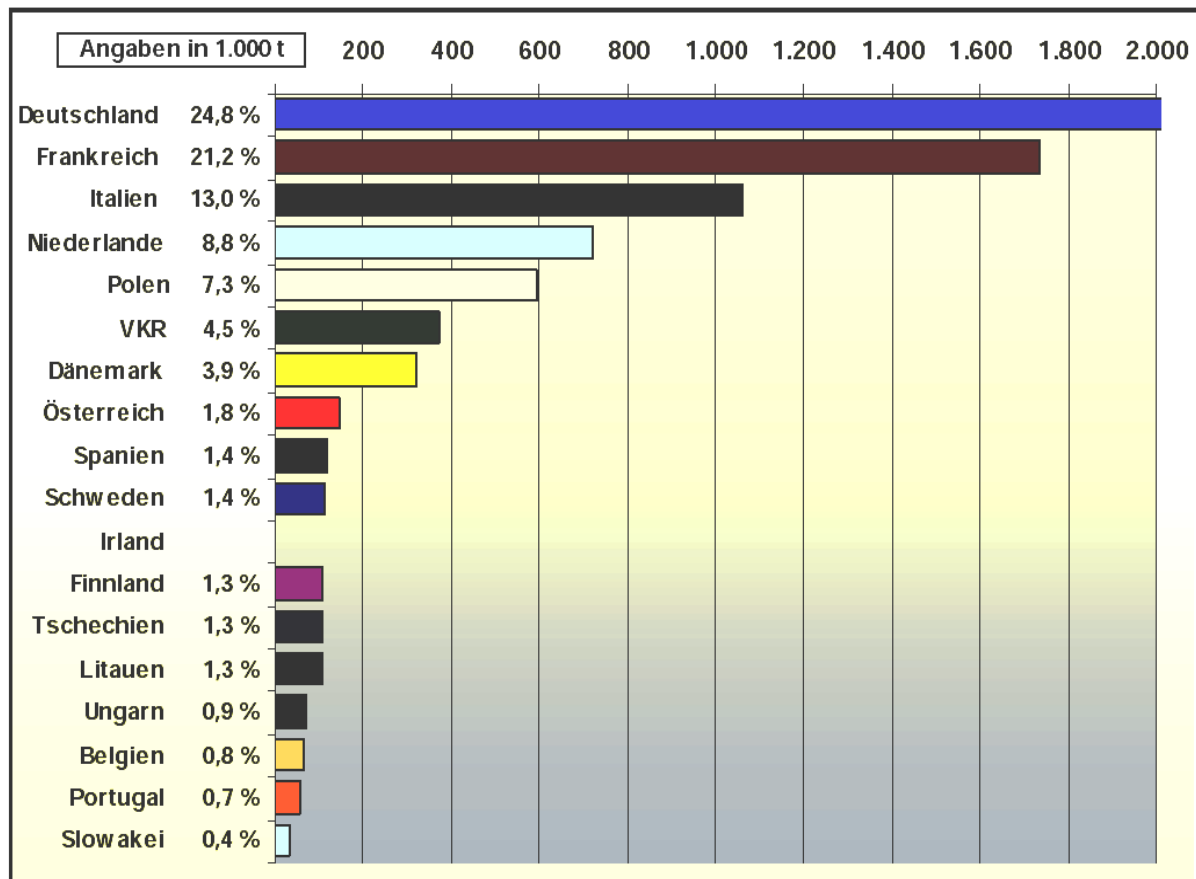
Ziegen- und Schafskäse Grundnahrungsmittel (CMA, 2008). Die umfassendste und detaillierteste Abhandlung in der Antike über die Käseherstellung stammt vom römischen Soldaten und Autor *Columella* (Fox und Mc Sweeney, 2004).

Nachdem später die Kelten die Käsereikunst übernahmen und ausbauten, führten die Germanen die errichteten Käsereien fort. Die wichtigste Quelle für das heutige Wissen über Käse stammt jedoch aus den europäischen Klöstern des Mittelalters (CMA, 2008). Viele unserer heutigen Käsevarietäten haben dort ihren Ursprung. Gleichzeitig produzierten in dieser Zeit viele feudale Landsitze – die später zu Städten und größeren Gemeinden heranwuchsen – verschiedene Käsesorten als Handelsgüter. Die Eigenständigkeit und Abgeschlossenheit der Gemeinden und Klöster im Mittelalter erklärt die Entwicklung hunderter Käsesorten in Europa aus ein und demselben Rohstoff. Dieses lokale Auftreten und Produzieren einzelner Käsesorten ist heutzutage immer noch sichtbar (Fox und Mc Sweeney, 2004). Ihre Herkunftsbezeichnung ist oftmals rechtlich geschützt und stellt ein Qualitätskriterium für den Verbraucher dar.

### **Käse in Neuzeit und Gegenwart**

Das letzte Kapitel der Käsegeschichte ist die Verbreitung des Käses in die ganze Welt. Sie resultiert aus der Kolonisation von Nord- und Südamerika, Ozeanien und Afrika durch europäische Siedler, die ihre Fähigkeiten der Käseherstellung mitbrachten (Fox und Mc Sweeney, 2004). Mit neuen Erfindungen im Zeitalter der Industrialisierung und der rasch wachsenden Weltbevölkerung entwickelte sich der Käse zu einem Industriegut, das heutzutage im Maßstab von mehreren Millionen Tonnen pro Jahr auf der Welt produziert wird.

Europa besitzt am Käsemarkt mit ca. 35 % den größten Marktanteil. Wirtschaftlich gesehen stellt Käse folglich einen wichtigen Faktor in der Europäischen Union dar. Deutschland hält mit 24,8 % den größten Anteil an der Käseproduktion (**Abbildung 1**), wobei mit 2,21 Mio. Tonnen im Jahre 2008 soviel Käse wie nie zuvor hergestellt wurde.



**Abbildung 1:** Prozentuale Anteile von EU-Ländern an der Käseproduktion (in 1000 t) in der Europäischen Union 2008 (*Milchindustrie-Verband e.V., 2009*)

Im Gegensatz zu Frisch- und Schmelzkäse hat sich die Erzeugung von Hart-, Schnitt- und Weichkäse in Deutschland bemerkenswerterweise im Zeitraum von 1990 bis 2009 nahezu verdoppelt (**Tabelle 1**). Der Pro-Kopf-Verbrauch an Hart- Schnitt- und Weichkäse lag 2008 insgesamt bei 10,8 kg (*Milchindustrie-Verband e.V., 2009*), der Pro-Kopf-Verbrauch an Käse insgesamt (ohne Schmelzkäse) belief sich 2009 auf 21,3 kg (*Milchindustrie-Verband e.V., 2010*).

## 1 Einleitung

**Tabelle 1:** Erzeugung von Käse in Deutschland von 1990 bis 2009 in 1.000 t  
(*Milchindustrie-Verband e.V., 2010*)

Jahr	1990	1995	2000	2005	2006	2007	2008	2009
<b>Erzeugung davon</b>	1.353	1.551	1.778	2.026	2.093	2.116	2.124	2.205
Hart-, Schnitt- u. Weichkäse	535	716	822	956	990	998	1.004	1.045
Frischkäse	626	737	832	773	782	773	754	763
Schmelzkäse	160	160	171	177	185	183	181	181

### 1.2 Käse nach Gouda-Art

**Käse** (vom Lateinischen *caseus*) ist definitionsgemäß ein Produkt, das aus dickgelegter Milch durch Abscheidung von Molke und durch mehr oder weniger weitgehende Reifung mit Hilfe spezieller Mikroorganismen gewonnen wird (*Belitz et al., 2001*). Nach der Begriffsbestimmung § 1 Absatz 1 der **Deutschen Käseverordnung** sind Käse frische oder in verschiedenen Graden der Reife befindliche Erzeugnisse, die aus dickgelegter Käsereimilch hergestellt sind. Nach Absatz 2 dieser Verordnung ist Käsereimilch die zur Herstellung von Käse bestimmte Milch, auch unter Mitverwendung von beispielsweise Sahneerzeugnissen, Süßmolke und Sauermolke. Die Milch kann ganz oder teilweise durch Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch ersetzt sein (*Käseverordnung, 2007*).

Mannigfaltige Herstellungsmethoden und differenzierte Geschmacksneigungen der Konsumenten, in Verbindung mit großen Unterschieden der mikrobiologischen und klimatischen Voraussetzungen für die Reifung, sowie der Futtermittelverhältnisse, haben weltweit schätzungsweise 4000 Käsesorten entstehen lassen (*Ternes et al., 2005*).

Diese lassen sich nach verschiedenen Gesichtspunkten einteilen: So kann eine Einordnung der Käsesorten nach der verwendeten Milch (Kuh, Ziege, Schaf), der Art der Dicklegung (Säuerung, Labung, Kombination beider Verfahren) oder dem Fettgehalt in der Trockenmasse in % erfolgen. Ebenso lässt sich Käse nach der Konsistenz bzw. dem Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse in % einteilen (*Belitz et al., 2001*).

Wichtige Gruppen sind dabei:

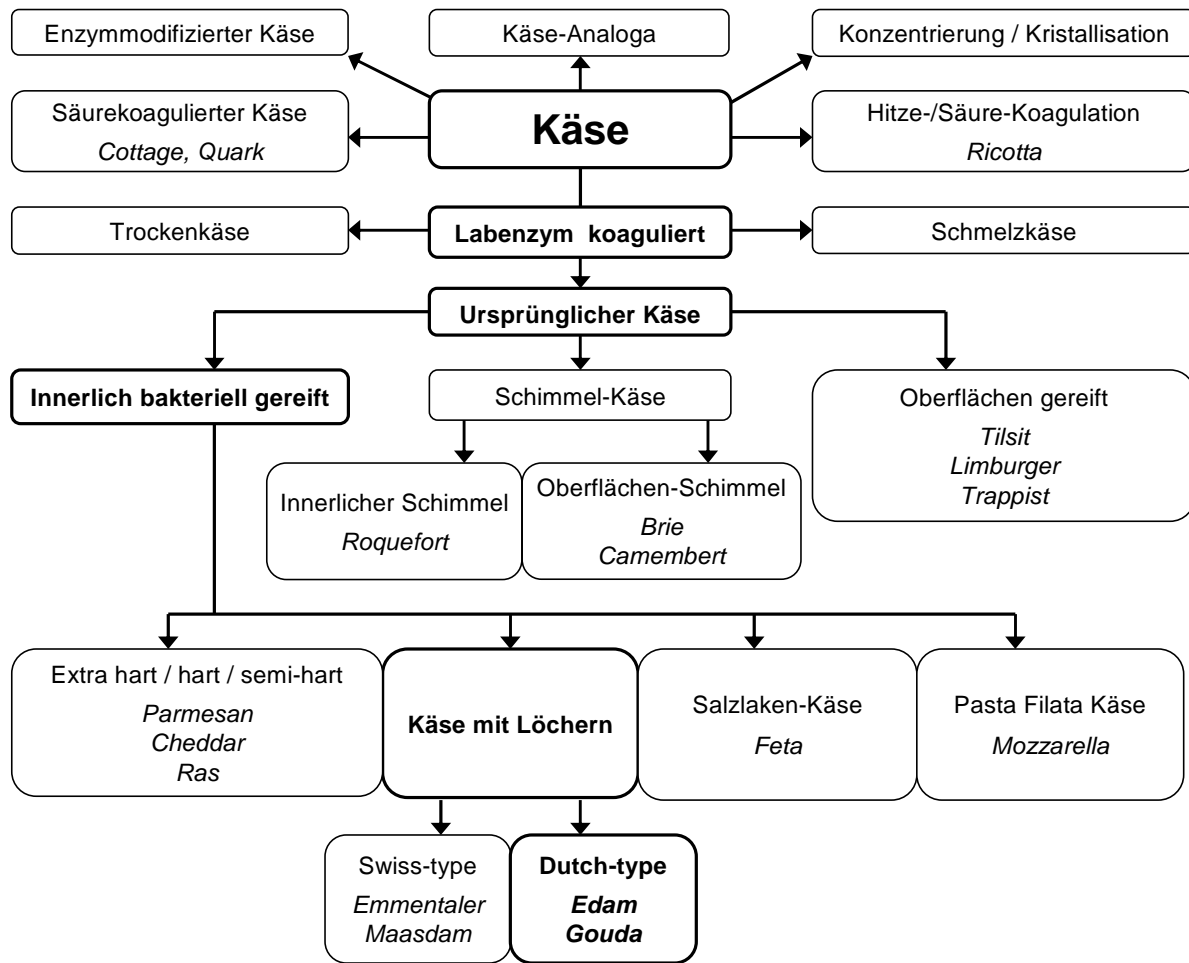
§ Extra hart:	< 51 %	
§ Hart:	49 – 56 %	(Hartkäse)
§ Semihart:	54 – 63 %	(Schnittkäse)
§ Halbfest:	61 – 69 %	(Halbfester Schnittkäse)
§ Weich:	> 67 %	(Weichkäse)

**Käse nach Gouda-Art** ist der Hauptvertreter in der Gruppe der Schnittkäse. Aufgrund der unterschiedlichen Reifungszeiten von Gouda-Käse variiert sein Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse zwischen 53 % und 63 % (*van den Berg et al., 2004*). Er wird nach 4-8-wöchiger Reifung als „junger Gouda“, nach 2-6-monatiger Reifung als „mittelalter Gouda“ und schließlich nach 6-8-monatiger oder längerer Reifung als „alter Gouda“ angeboten.

Bei der systematischen Einteilung der Käsearten lässt sich Käse nach Gouda-Art als natürlicher, lab-koagulierter und innerlich bakteriell gereifter Käse gegenüber oberflächengereiften Käsen und Schimmelkäsen einordnen (**Abbildung 2**). Gouda ist ein Käse, der u.a. durch seine holländische Herkunft (engl.: *dutch-type cheese*) innerhalb der Gruppe der Käse mit Löchern von Käsen nach Schweizer-Art (engl.: *swiss-type cheese*) zu unterscheiden ist.

In den Niederlanden unterscheidet man den auf den Bauernhöfen hergestellten Gouda-Bauernkäse (niederl.: *Goudse boerenkaas*) und den kommerziell hergestellten Gouda-Käse (niederl.: *Goudse kaas*). Seit dem 16.Jahrhundert, vermutlich aber noch viel früher, wird hauptsächlich in der Provinz Süd-Holland und im westlichen Teil der Provinz Utrecht, in der weiteren Umgebung der Stadt Gouda, auf den Bauernhöfen Käse hergestellt, der seinen Namen von der Stadt ableitet. Üblicherweise wird für Gouda-Bauernkäse nur auf dem eigenen Bauernhof ermolkene, rohe Vollmilch zur Käseherstellung verwendet (*Schiere und Van der Bas, 1974*).

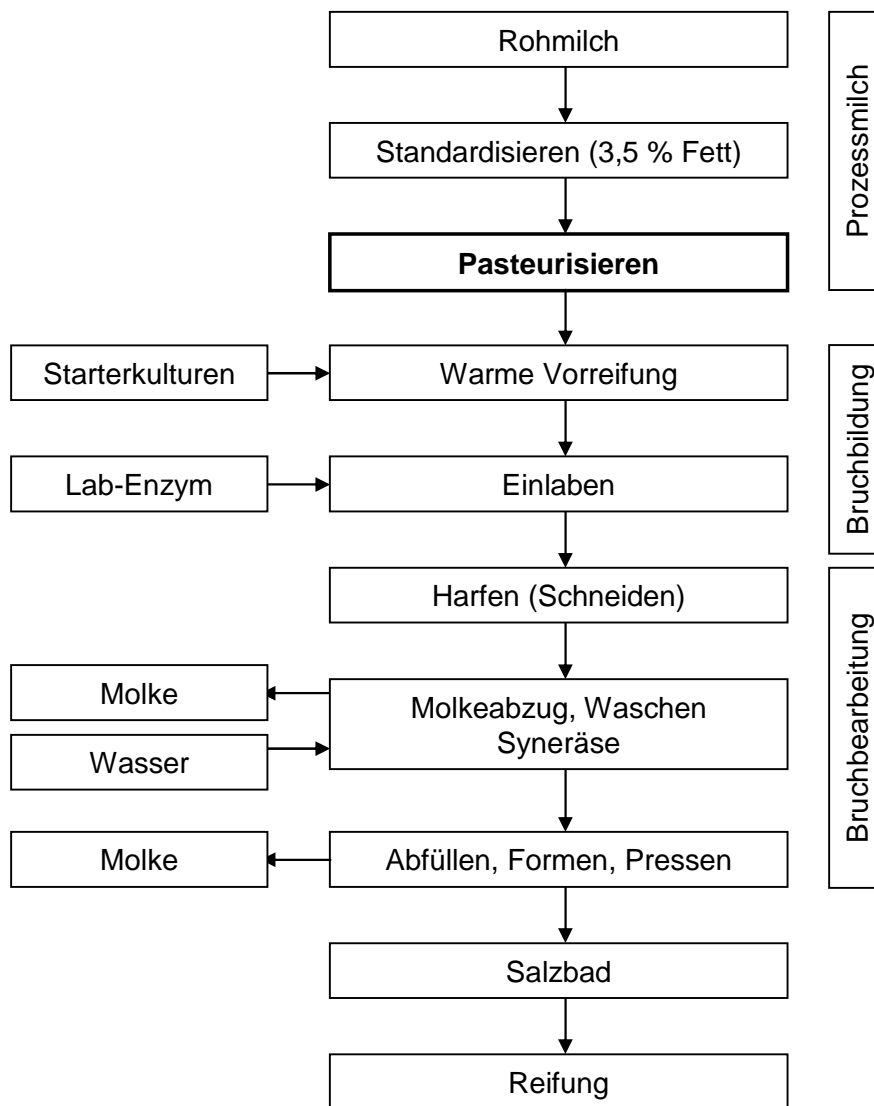
# 1 Einleitung



**Abbildung 2:** Käsesystematik modifiziert nach *Mc Sweeney et al. (2004)*

Die kommerzielle **Gouda-Herstellung (Abbildung 3)** erfolgt heute ausschließlich aus standardisierter und pasteurisierter Milch, die nach Zugabe der Starterkulturen einer warmen Vorreifung unterzogen werden kann. Nach dem Einlaben wird der gebildete Bruch geschnitten. Ein Teil der Molke wird abgezogen und das verbleibende Molke-Bruch-Gemisch mit Wasser verdünnt. Nach erfolgter *Syneräse* (Molkeaustritt aus dem Bruch) hat der Bruch die richtige Konsistenz, um abgefüllt, geformt und gepresst zu werden. Hierbei kommt ein Druck von bis zu 4,0 bar zur Anwendung. Die geformten „rohen“ Käselaike werden nun für 1 - 2 Tage in einem Salzbad (ca. 20 % Salzgehalt) belassen, bevor sie in klimatisierten Kammern bei 15 °C und 80-85 % Luftfeuchte bis zum gewünschten Reifegrad gelagert werden (*Van den Berg et al., 2004*).





**Abbildung 3:** Gouda-Herstellung in Anlehnung an *Van den Berg et al. (2004)*

Nach Anlage 1 der Deutschen Käseverordnung (*Käseverordnung, 2007*) stellt Gouda eine sogenannte **Standardsorte** dar, die zur Gruppe der Schnittkäse gehört. Als Gewürze sind bei der Herstellung Pfeffer und Kümmel erlaubt. Gouda darf in vier verschiedenen Fettstufen (3/4-Fettstufe, Fettstufe, Vollfettstufe, Rahmstufe) mit entsprechenden Mindestgehalten an Trockenmasse (49 %, 53 %, 55 %, 57 %) angeboten werden, wobei das Herstellungsgewicht 0,3 bis 30 kg beträgt. Das Mindestalter von Gouda beträgt fünf Wochen. In Bezug auf das äußere Aussehen ist nach der Käseverordnung eine trockene und glatte Rinde, auch mit einem leichten weißlichen Schimmelbelag erlaubt, die Rinde kann auch fehlen. Die Konsistenz und das innere Aussehen ist vorgegeben als elfenbeinfarbig bis gelb, mattglänzend, runde oder auch ovale Lochung von etwa Erbsgröße, die gleichmäßig im Teig

## 1 Einleitung

---

verteilt ist, jedoch nicht sehr zahlreich vorhanden sein darf. Der Teig ist fest, aber noch geschmeidig. Geruch und Geschmack sind mild bis leicht pikant, jedoch nicht säuerlich. Der Begriff Gouda stellt keine geographische Herkunftsbezeichnung dar, weshalb er nicht in einem bestimmten Herkunftsgebiet hergestellt sein muss (*Käseverordnung, 2007*).

**Tabelle 2** zeigt die durchschnittliche Zusammensetzung von Gouda-Käse (45 % Fett i.Tr.).

**Tabelle 2:** Zusammensetzung von Gouda-Käse (45 % Fett i.Tr.) nach *Souci et al. (2000)*

<b>Parameter</b>	<b>Gehalt/100g</b>	<b>Einheit</b>
Brennwert	1373 (331)	kJoule (kcal)
Wasser	46	g
Eiweiß (N x 6.38)	25,5	g
Eiweiß (N x 6.25)	25,0	g
Fett	25,4	g
Mineralstoffe	2,10	g
Calcium	820	mg
Natrium	512	mg
Chlorid	788	mg
Phosphat	443	mg

### 1.3 Flüchtige Verbindungen in Käse nach Gouda-Art

Für Käse nach Gouda-Art sind bislang ca. 140 verschiedene flüchtige Verbindungen publiziert worden, die zu den verschiedensten chemischen Verbindungsklassen zählen. Eine Literaturübersicht zu diesen Verbindungen zeigt **Tabelle 4** am Ende dieses Kapitels. Dabei wird in den veröffentlichten Arbeiten oft der Terminus „Aroma“ (engl.: *flavour*) verwendet, obwohl die Aromaaktivität der flüchtigen Verbindungen häufig nicht mit sensorischen Methoden überprüft wurde.

Die erste Arbeit über freie Fettsäuren in Gouda stammt von *Svensen (1961)*. Er entwickelte eine gaschromatographische Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von acht Monocarbonsäuren (C1-C6) in Käse nach deren Isolierung mittels Wasserdampfdestillation. In Gouda-Käse konnten Essigsäure und Buttersäure identifiziert und bestimmt werden. Propionsäure, Methylpropansäure, 3-Methylbuttersäure sowie Pentan- und Hexansäure wurden in Gouda-Käse nicht detektiert.

*Iyer (1967)* bestimmte gaschromatographisch die freien Hauptfettsäuren C1-C18 in vier verschiedenen Gouda-Käsen von lokalen Märkten in Madison (Wisconsin, USA). Nach säulenchromatographischer Abtrennung wurden die Fettsäuren in ihre Butylester überführt und mittels Gas-Flüssigkeits-Chromatographie identifiziert und quantifiziert. Nach *Iyer* sollen freie Fettsäuren zum Aroma und zum Geruch von Gouda-Käse beitragen. **Tabelle 3** zeigt auszugsweise die Ergebnisse der freien Fettsäuren Essigsäure, Buttersäure und Hexansäure in den vier untersuchten Gouda-Käsen.

**Tabelle 3:** Fettsäure-Konzentrationen (mg/kg) in vier verschiedenen Gouda-Käsen (A - D) nach *Iyer (1967)*

Fettsäure	Gouda-Käse			
	A	B	C	D
Essigsäure	408	986	1.073	186
Buttersäure	69	91	101	57
Hexansäure	22	62	51	42

## 1 Einleitung

---

Ein phenolisches Fehleroma in Gouda-Käse wurde von *Badings et al. (1968)* untersucht. Die flüchtigen Verbindungen wurden mittels einer Vakuumdestillations-Apparatur in eine mit Flüssigstickstoff gekühlte Falle überführt. Nach gaschromatographischer Auftrennung in mehrere Fraktionen wurden diese mittels IR-Spektroskopie untersucht. Sensorische Untersuchungen durch ein Panel in Verbindung mit den instrumentellen Ergebnissen ließen die Autoren vermuten, dass p-Kresol die Ursache für das Fehleroma war. Modellversuche mit Labenzym-Präparaten, die mit stark salzresistenten Lactobacillen infiziert wurden, ließen darauf schließen, dass letztendlich diese Bakterien die p-Kresol-Bildung verursachten.

*Groux und Moinas (1974)* untersuchten die neutrale flüchtige Fraktion diverser Käsesorten mittels Kapillargaschromatographie gekoppelt an ein Massenspektrometer. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte ohne Verwendung von Referenzverbindungen. In Gouda-Käse konnten 1-Butanon, 2-Pentanon, 2-Heptanon und Ethanol, 2-Butanol, 2-Pentanol und 2-Heptanol identifiziert, jedoch nur semiquantitativ bestimmt werden.

*Sloot und Harkes (1975)* identifizierten Spurenkomponenten in destillierten neutralen Flüssigextrakten aus Gouda-Käse. Nach einer Vortrennung in 45 Fraktionen, wurden diese mittels GC-Massenspektrometrie untersucht. Neben Fettsäureestern und Methylketonen wurden Tetramethylpyrazin, 2,5-(oder 2,6-)Diethyl-3-methylpyrazin, Dimethylpyrazin, Ethylmethylpyrazin und 3-Ethyl-2,6-(oder 2,5-)Dimethylpyrazin gefunden. Neben Anethol (p-(1-Propenyl-)anisol) wurde außerdem Bis(methylthio-)methan durch Synthese der Referenzverbindung identifiziert.

*Aishima und Nakai (1987)* klassifizierten fünf Käsesorten durch Vergleich der Profile von Gas-Chromatogrammen, darunter auch Gouda-Käse. Der nach Simultaner Destillation Extraktion (SDE, vgl. **1.7.3**) mittels einer Likens-Nickerson-Apparatur erhaltene Extrakt flüchtiger Verbindungen wurde mittels Kapillargaschromatographie aufgetrennt. Anschließend wurden 108 ausgewählte Signale im Gaschromatogramm einer computergestützten Auswertung zugeführt. Die sogenannte schrittweise Diskriminierungs-Analyse (engl.: *stepwise discriminant analysis*) ließ eine Differenzierung der Käsesorten durch die Mustererkennung aus den GC-Profilen zu.

*Neeter und de Jong (1992)* untersuchten die Verwendung von Purge-and-Trap-Techniken gekoppelt mit Gaschromatographie und FID bei der Analyse von Aromen und Fehlparomen in Milchprodukten. Neben Fehlparomen in Milchpulvern untersuchten sie mittels In-Line- und Off-Line-Purge-and-Trap-Technik auch Gouda-Käse. Sie identifizierten hierbei im Gouda-Käse u.a. Acetaldehyd, Aceton, Dimethylsulfid, 2-Methylpropanal, 2,3-Butandion, 3-Methylbutanal, Ethylbutanoat, 2-Heptanon und 2-Nonanon.

Die flüchtigen Komponenten in wasserlöslichen Fraktionen verschiedener Käsesorten untersuchte *Engels (1997)*. Die Wasserextrakte wurden mittels Purge-and-Trap-Technik und anschließender thermischer Desorption der GC-Massenspektrometrie zugeführt. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte durch den Vergleich ihrer Retentionszeiten und Fragmentmuster nach Elektronenstoßionisation (EI) im Massenspektrometer mit Referenzsubstanzen. Quantifizierungen wurden mittels Flächenauswertung an einem Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt. In Gouda-Käse konnten auf diese Weise 45 Verbindungen aus mehr als acht Verbindungsklassen bestimmt werden, darunter hauptsächlich Aldehyde, Alkohole und Ketone (vgl. **Tabelle 4**).

*Dirinck und De Winne (1999)* verwendeten die SDE unter Verwendung einer Likens-Nickerson-Apparatur zur Isolierung flüchtiger Verbindungen in jeweils drei Käsen nach Gouda- und Emmentaler-Art. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand von Kovats-Retentionsindizes und Vergleichsspektren verschiedener Datenbanken. Semiquantitative Daten der Verbindungen wurden mit Hilfe des internen Standards Dodecan erhoben. Im Gouda-Käse konnten 27 Verbindungen identifiziert und davon 23 Verbindungen quantifiziert werden, darunter hauptsächlich Säuren und Ketone (vgl. **Tabelle 4**). Eine Auswertung über einen PCA-Plot (engl: *principal component analysis*) erlaubte eine Differenzierung von Gouda- und Emmentaler-Käse. Die SDE ist aufgrund von Artefaktbildungen, die das Profil flüchtiger Verbindungen verfälschen können, allerdings für die Herstellung repräsentativer Fraktionen flüchtiger Verbindungen ungeeignet (vgl. **1.7.3**).

*De Jong et al. (2000)* entwickelten zur Analyse der flüchtigen Fraktion eine direkte statische Headspace-Methode in Kombination mit Gaschromatographie und FID. In Gouda-Käse wurden Schwefelwasserstoff, Methanthiol, Dimethylsulfid und Dimethyldisulfid gefunden.

## 1 Einleitung

---

**Tabelle 4:** Flüchtige Verbindungen in Käse nach Gouda-Art: Literaturübersicht <sup>a)</sup>

<b>Aldehyde</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
Acetaldehyd	3,4,5
Benzaldehyd	5,7,9
Butanal	5
2,4-Decadienal	9
2-Decenal	9
Dimethylbenzaldehyd	8
Dodecanal	9
2,4-Heptadienal	9
Heptanal	4,5,9
Hexadecanal	6,9
Hexanal	4,5,9
2-Methylbutanal	4,9
3-Methylbutanal	3,4,5,9
2-Methylpropanal	3,5
2-Methylpropenal	5
Nonanal	4,5,9
2-Nonenal	9
Pentanal	5,9
Phenylacetaldehyd	6,9
Tetradecanal	9

---

<b>Ketone</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
Aceton	3,4,5
Acetophenon	5
2,3-Butandion	3,4,5
1-Butanon	1,4,5
2-Butanon	6
2-Decanon	4,9
2-Dodecanon	9
2-Heptanon	1,3,4,5,6,8,9
2-Hexanon	9
3-Hydroxy-2-butanon	4,5,6,8,9
2-Hydroxy-3-pentanon	8
1-Hydroxy-2-propanon	8
2-Nonanon	3,4,5,6,8,9
2-Pentadecanon	6,8,9
2,3-Pentandion	5
2-Pentanon	1,4,5,6,9
2-Tridacanon	6,8,9
2-Undecanon	6,8,9

---

Fortsetzung Tabelle 4

<b>Alkohole</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
1,3-Butandiol	5
2,3-Butandiol	8,9
1-Butanol	4,5,9
2-Butanol	1,5
Ethanol	1,4,5
2-Heptanol	1,5
Hexanol	5
Isopropylalkohol	4
Methanol	5
2-Methylbutanol	5
3-Methylbutanol	4,5,8,9
3-Methyl-3-butenol	5,8
2-Methylphenol	8
2-Methylpropanol	4,5
Phenol	5,8
2-Phenylethanol	8,9
2-Phenylmethanol	9
1-Pentanol	4,5,8
2-Pentanol	1,5
1-Propanol	4
2-Propanol	5
<b>Säuren</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
2-Acetylamino-propionsäure	8
Benzoessäure	8
Buttersäure	6,8,9
Decansäure	6,8,9
Decensäure	8
Dodecansäure	6,8,9
Dodecensäure	8
Essigsäure	4,5,8
Heptansäure	8
Hexadecansäure	6,8,9
(Z)-9-Hexadecensäure	8
(Z)-11-Hexadecensäure	8
Hexansäure	4,5,6,8,9
2-Methylbuttersäure	6,9
3-Methylbuttersäure	6,8,9
2-Methylpropansäure	8,9
Nonansäure	8,9

## 1 Einleitung

---

Fortsetzung Tabelle 4

<b>Säuren</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
Octadecansäure	8
(Z,Z)-9,12-Octadecadiensäure	8
Octansäure	6,8,9
(Z)-9-Octadecensäure	8
Pentadecansäure	8
Pentansäure	8
3-Phenylpropansäure	8
Propionsäure	6,8
Tetradecansäure	6,8,9
Tetradecensäure	8
Undecansäure	8,9

---

<b>Ester</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
Ethylacetat	5
Ethylbutanoat	3,4,5
Ethyldecanoat	8,9
Ethyl-dodecanoat	9
Ethylhexadecanoat	8,9
Ethylhexanoat	4,5,8,9
Ethyltetradecanoat	8,9
Ethyl-octanoat	9
Methylacetat	5
3-Methylbutanoat	5
Methylhexadecanoat	8
Methyl-2-hydroxy-4-methylpentanoat	8
Methyloctadecanoat	8
Methyl-oleat	8

---

<b>Lactone</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
$\delta$ -Decalacton	6,8,9
$\delta$ -Dodecalacton	6,8,9
$\delta$ -Hexadecalacton	8,9
$\delta$ -Hexalacton	8
$\delta$ -Octadecalacton	8
$\delta$ -Octalacton	8,9
$\delta$ -Pentadecalcton	8
$\delta$ -Tetradecalacton	6,8,9
$\delta$ -Undecalacton	8,9
$\gamma$ -Decalacton	8
$\gamma$ -6-Dodecalacton	8,9

---



Fortsetzung Tabelle 4

<b>Lactone</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
$\gamma$ -Dodecalacton	6,8,9
$\gamma$ -Hexadecalacton	8
Mevalonsäurelacton	8
$\gamma$ -Nonalacton	9
$\gamma$ -Undecalacton	8,9
<b>Schwefelverbindungen</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
Bis(methylthio-)methan	2
Dimethyldisulfid	4,5,7,9
Dimethylsulfid	3,4,7
Dimethylsulfon	8
Dimethyltrisulfid	5,9
Methanthiol	7
3-(Methylthio)-propanal	9
Schwefelwasserstoff	7
<b>Pyrazine</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
2,5-(2,6-)Diethyl-3-methylpyrazin	2
Dimethylpyrazin	2
3-Ethyl-2,6-(2,5-)dimethylpyrazin	2
Ethylmethylpyrazin	2
Tetramethylpyrazin	2
<b>Andere</b>	<b>Referenz <sup>a)</sup></b>
2,4-Bis-(1,1-dimethylethyl)-phenol	8
Butanamid	8
Dimethylbenzol	5
Ethylbenzol	5
Hexan	4
Indol	5,9
Limonen	4,5
Methylthiocyanat	8
p-(1-Propenyl)-anisol	2
Toluol	5

<sup>a)</sup> Referenz:

- 1 = Groux und Moinas, 1974
- 2 = Sloot und Harkes, 1975
- 3 = Neeter und de Jong, 1992
- 4 = Neeter et al., 1996
- 5 = Engels et al., 1997
- 6 = Dirinck und de Winne, 1999
- 7 = de Jong et al., 2000
- 8 = Alewijn et al., 2003
- 9 = Van Leuven et al., 2008

*Alewijn et al. (2003)* untersuchten flüchtige Verbindungen von Gouda-Käse, Cheddar und Danish Blue. Die nach Extraktion mit Acetonitril und anschließendem Ausfrieren des Fetts erhaltenen Lösungen wurden mittels GC-Massenspektrometrie analysiert. Neben 27 Säuren und 14 Lactonen wurden im Gouda-Käse noch zahlreiche Alkohole, Ester und Ketone neben anderen Verbindungen identifiziert und quantifiziert (vgl. **Tabelle 4**). Die Quantifizierung erfolgte über den internen Standard Myristylbromid, der kurz vor der GC-MS-Messung dem Extrakt zugegeben wurde.

### 1.4. Quantitative Veränderungen flüchtiger Verbindungen in Schnitt- und Hartkäse

#### 1.4.1 Einfluss der Reifungszeit auf die Bildung flüchtiger Verbindungen in Käse nach Gouda-Art

Eine dynamische Purge-and-Trap-Technik benutzten *Neeter et al. (1996)*, um die flüchtigen Verbindungen aus Gouda- und Prosdij-Käse, einer Gouda-Varietät, zu isolieren und diese anschließend mittels Gaschromatographie und GC-Massenspektrometrie zu untersuchen. Dabei verglichen sie die Profile flüchtiger Verbindungen von frischem Käsebruch mit Gouda-Käse, der 6 Wochen und 6 Monate gereift war. Es konnten dabei 29 Verbindungen aus verschiedenen Verbindungsklassen identifiziert werden (vgl. **Tabelle 4**). Die Autoren detektierten im Käsebruch nur wenige flüchtige Verbindungen, hauptsächlich Ethanol, Aceton und 2-Butanon, Verbindungen, die auch in der Milch zu finden waren. Nach 6 Wochen fanden sie dieselben Verbindungen und zusätzlich lineare und verzweigte Alkohole und Aldehyde sowie Ketone, 2,3-Butandion und Ethylester. Nach 6 Monaten waren die gleichen Verbindungen wie nach 6 Wochen mit größeren Peakflächen detektierbar. Genaue quantitative Daten wurden aber von den Autoren nicht erhoben.

Neun verschiedene organische Säuren untersuchten *Califano et al. (2000)* in Käse nach Gouda-Art mittels HPLC. Im Reifungsverlauf von 80 Tagen stieg dabei u.a. der Gehalt von Essigsäure und Propionsäure im Käse linear an.

*Alewijn et al. (2005)* untersuchten die Bildung der aus dem Fett von Gouda-Käse stammenden flüchtigen Verbindungen und den Einfluss der Pasteurisierung. Die Isolierung der flüchtigen Verbindungen erfolgte mittels Acetonitril-Extraktion (vgl. *Alewijn et al., 2003*).

Neben steigender Fettsäuregehalte stieg während der Reifungsperiode von 96 Wochen der  $\delta$ -Lacton-Gehalt zunächst progressiv an, bis er nach ca. 30 Wochen ein Plateau-Niveau erreicht hatte. Der Gehalt an  $\gamma$ -Lactonen entwickelte sich ähnlich. Die Bildung von Methylketonen verlief hingegen sehr langsam, wobei sich die Gesamtkonzentration innerhalb der 96-wöchigen Reifungszeit nur verdoppelte. Auch bei den Ethylestern konnte ein stetiger Anstieg in den Konzentrationen im Reifungsverlauf beobachtet werden.

Speziell die Bildung von  $\delta$ -Lactonen während der Reifung von Gouda-Käse untersuchten *Alewijn et al. (2007)*. Im Reifungsverlauf von 0 bis 40 Wochen stiegen die Konzentrationen zunächst progressiv an, bis diese nach ca. 25 Wochen ein Plateau-Niveau erreicht hatten. Dieser charakteristische zeitliche Bildungsverlauf war umso ausgeprägter, je höher das Konzentrationsniveau des gebildeten  $\delta$ -Lactons war. Dabei war die absolute Konzentration der  $\delta$ -Lactone umso höher, je länger die Fettsäure war, aus der das  $\delta$ -Lacton vermutlich gebildet wurde (vgl. **2.3.3, Abbildung 35**).

*Van Leuven et al. (2008)* untersuchten u.a die flüchtigen Verbindungen von Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch nach 6 Wochen sowie nach 4 und 10 Monaten Reifungszeit. Die flüchtigen Verbindungen wurden mittels SDE unter Verwendung einer Likens-Nickerson-Apparatur isoliert und anschließend per GC-Massenspektrometrie untersucht (vgl. *Dirinck und De Winne, 1999*). Dabei konnten *Van Leuven et al.* 62 Verbindungen aus verschiedenen Verbindungsklassen identifizieren (vgl. **Tabelle 4**) und die meisten quantifizieren. Im Reifungsverlauf des Gouda-Käses stiegen dabei die Konzentrationen von Ethylestern, des 2- und 3-Methylbutanals, des 2-Phenylethanol sowie der Schwefelverbindungen und der Methylketone an. Die Konzentration der freien Fettsäuren, Lactone und linearen Aldehyde nahm hingegen während der Reifung ab. Der Gehalt an 3-Methylbutanol stieg zunächst nach 4 Monaten an und fiel nach 10 Monaten Reifungszeit wieder ab. Für die Herstellung eines repräsentativen Extraktes flüchtiger Verbindungen ist - wie bereits erwähnt - die von den Autoren verwendete SDE aufgrund der Bildung flüchtiger Artefakte, die die Zusammensetzung der Fraktion verändern, nicht geeignet (vgl. **1.3, 1.7.3**).

### 1.4.2 Einfluss der Pasteurisierung der Milch auf die Bildung flüchtiger Verbindungen in Schnitt- und Hartkäse

Den Einfluss der Pasteurisierung auf die Entwicklung verschiedener Parameter in Käse nach Schweizer-Art untersuchten *Beuvier et al. (1997)*. Am Ende der Reifung waren die Gehalte an Essigsäure, Propionsäure und 3-Methylbuttersäure im Rohmilchkäse nach Schweizer-Art höher, dagegen zeigten Buttersäure und Hexansäure keine quantitativen Unterschiede zwischen den Käsen aus pasteurisierter Milch und Rohmilch.

*Buchin et al. (1998)* untersuchten den Einfluss der Pasteurisierung u.a. auf die Bildung flüchtiger Verbindungen in einem semiharten Morbier-Käse, der einem Raclette- oder Saint-Paulin-Käse ähnlich ist. Die flüchtigen Verbindungen wurden in Verbindungsklassen eingeteilt und die quantitativen Daten als Tendenz („R“ für Rohmilchkäse größer als [ $>$ ] oder kleiner als [ $<$ ] „P“ für Käse aus pasteurisierter Milch) dargestellt. Dabei zeigten sich innerhalb keiner Verbindungsklasse eindeutige Trends. Beispielsweise war Pentansäure im Rohmilchkäse in höherer Konzentration als im Käse aus pasteurisierter Milch vorhanden, Hexansäure zeigte hingegen keine Tendenz. Dasselbe galt für geradkettige und verzweigte Alkohole oder Ester. 2-Methylbutanal war im Käse „P“ größer als in „R“, 3-Methylbutanal zeigte keinen Unterschied zwischen „P“ und „R“. Auf diese Weise bewerteten *Buchin et al. (1998)* 92 Verbindungen.

Das Profil der flüchtigen Verbindungen von Cheddar-Käse, der aus roher und pasteurisierter Milch hergestellt und bei verschiedenen Temperaturen gereift wurde, untersuchten *Rehmann et al. (2000a)*. In den Rohmilchvarianten waren geradkettige Säuren und Ethylester in höherer Konzentration als im Käse aus pasteurisierter Milch zu finden. Umgekehrt verhielten sich methylverzweigte Säuren (z.B. 2- und 3-Methylbuttersäure), 3-Methylbutanol und 3-Hydroxy-2-butanon. Keine Unterschiede zwischen Cheddar aus pasteurisierter Milch und Rohmilch zeigten sich bei geradkettigen Aldehyden und Methylketonen sowie bei  $\gamma$ - und  $\delta$ -Lactonen.

*Rehmann et al. (2000b)* zeigten den Einfluss der Pasteurisierung auf die Bildung flüchtiger Verbindungen in Cheddar-Käse durch die Verwendung von pasteurisierter und roher Milch sowie von pasteurisierter Milch, der 1%, 5% und 10% Rohmilch zur Herstellung des Käses zugemischt wurde. Im Vergleich der Käsevarianten aus 100 % pasteurisierter Milch und

Rohmilch zeigten sich für dieselben flüchtigen Substanzen analoge Tendenzen wie in der Arbeit von *Rehmann et al. (2000a)*.

Den Effekt der Pasteurisierung von Schafsmilch auf die Bildung flüchtiger Komponenten in Roncal-Käse versuchten *Ortigosa et al. (2001)* aufzuklären. Insgesamt wurden 76 flüchtige Verbindungen identifiziert und quantitative Daten in den Käsen nach einem Tag sowie nach 120 und 240 Tagen der Reifung erhoben. Die Tendenzen waren eindeutig: Im Rohmilchkäse zeigten sich alle geradkettigen und verzweigten Säuren sowie alle Ester (insbesondere Ethylester) in höherer Konzentration als im Käse aus pasteurisierter Milch. Dasselbe galt für geradkettige und verzweigte Alkohole und Aldehyde sowie für Schwefelverbindungen. Eine Ausnahme bildeten 2,3-Butandion, 2,3-Pentandion und 3-Hydroxy-2-butanon, deren Konzentrationen im Käse aus pasteurisierter Milch tendenziell höher waren.

*Fernandez-Garcia et al. (2002)* untersuchten flüchtige Verbindungen in Manchego-Käse, der aus roher und pasteurisierter Milch hergestellt wurde. Dabei wurden quantitative Daten nach drei, sechs und neun Monaten der Reifung erhoben. Dabei zeigten sich für Methyl-, Ethyl- und höhere Ester sowie für primäre, sekundäre und methylverzweigte Alkohole höhere Gehalte im Rohmilchkäse im Vergleich zum Käse aus pasteurisierter Milch. Genauso verhielten sich die meisten Methylketone. Im Käse aus pasteurisierter Milch waren Diketone und ihre Reduktionsprodukte (z.B. 2,3-Butandion und 2-Hydroxy-3-butanon) mit deutlich höheren Peak-Intensitäten vertreten als in der Rohmilchvariante. Auch 3-Methylbutanal war nach 6-monatiger Reifung im Käse aus pasteurisierter Milch in größerer Menge vorhanden als in der Rohmilchvariante.

Auch *Gomez-Ruiz et al. (2001)* untersuchten die Unterschiede in der mittels Simultaner Destillation Extraktion (SDE, vgl. **1.7.3**) erhaltenen flüchtigen Fraktion aus Manchego-Käse, der aus pasteurisierter Milch bzw. Rohmilch hergestellt wurde. Im Käse aus Rohmilch nahm die Summen-Konzentration der freien Fettsäuren im Reifungsverlauf stark zu, während sie im Käse aus pasteurisierter Milch zunächst anstieg und nach vier Monaten Reifung stetig abnahm. Der lineare Anstieg der Esterkonzentration fiel im Käse aus Rohmilch stärker aus, als im Käse aus pasteurisierter Milch.

## 1 Einleitung

---

*Buffa et al. (2004)* untersuchten in einem Schnittkäse aus unterschiedlich behandelte Ziegenmilch die Entwicklung organischer Säuren während einer Reifungszeit von einem, 30 und 60 Tagen. Dabei stiegen die Gehalte an Essigsäure und Propionsäure im Rohmilchkäse während der Reifung stärker an als im Käse aus pasteurisierter Milch. Die Konzentration der Buttersäure nahm kontinuierlich bei der Reifung im Rohmilchkäse zu, während sie im Käse aus pasteurisierter Milch mit fortschreitender Reifung stetig abnahm.

Die Unterschiede in der Zusammensetzung der flüchtigen Fraktion sowie in anderen chemischen und mikrobiologischen Parametern zeigten *Horne et al. (2005)* beim Vergleich von ursprünglich aus Rohmilch hergestelltem und industriellem Piacentinu Ennese-Käse, der aus pasteurisierter Milch produziert wird. Dabei wurde, nach Verbindungsklassen geordnet, nur gezeigt, ob eine flüchtige Verbindung in allen Käsen, nur in einigen Käsen oder in keinem Käse der entsprechenden Kategorie gefunden wurde. Die Bestimmungen erfolgten nach zwei, vier und sechs Monaten Reifung. Auffällig dabei war, dass 2,3-Butandion im Käse aus pasteurisierter Milch stärker vertreten war als im Rohmilchkäse, Ethylbutanoat und Ethylhexanoat neben Hexansäure dagegen öfter in der Rohmilchvarietät gefunden wurden. Andere Verbindungen zeigten hingegen keine deutlichen Unterschiede.

*Alewijn et al. (2005)* bestimmten per GC-MS die bei der Reifung von Gouda-Käse aus dem Fett gebildeten flüchtigen Verbindungen. Neben Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch wurde auch ein Gouda-Käse aus Rohmilch zur Untersuchung herangezogen. Die Bestimmungen der flüchtigen Verbindungen erfolgten aus acht Reifungsstufen im Zeitraum von 0 bis 96 Wochen. Neben den Fettsäuren nahmen die entsprechenden Ethylester dabei im Reifungsverlauf im Rohmilchkäse deutlich ausgeprägter zu. Keine Unterschiede im Vergleich der Gouda-Varietäten zeigten sich bei den Methylketonen sowie den  $\gamma$ - und  $\delta$ -Lactonen.

Neben konventionellem Gouda-Käse, der sechs Wochen, vier Monate und zehn Monate gereift und anschließend analysiert wurde, bestimmten *van Leuven et al. (2008)* die flüchtigen Verbindungen in einem Rohmilch-Gouda, der sechs Wochen gereift war. Im Vergleich der sechswöchig gereiften Gouda-Varietäten waren aufgrund lückenhafter quantitativer Daten nur wenige tendenzielle Aussagen zu treffen. So waren beispielsweise alle Methylketone im Rohmilch-Gouda in höheren Konzentrationen als im Gouda aus pasteurisierter Milch zu finden. Im Gouda aus pasteurisierter Milch fanden sich hingegen

$\delta$ -Decalacton und  $\delta$ -Dodecalacton in höherer Konzentration. Butter- und Hexansäure wurden im Rohmilchkäse nicht quantifiziert, Ethylester wurden in beiden Käsevarietäten nach 6-wöchiger Reifung nicht detektiert.

### 1.5 Freisetzung von Fettsäuren in Käse durch Lipolyse sowie der Einfluss der Pasteurisierung der Milch

*Morris et al. (1963)* untersuchten u.a. die Bildung freier Fettsäuren bei der Reifung von kommerziellem Blauschimmelkäse (engl.: *Blue Cheese*), der unter Verwendung von pasteurisierter, homogenisierter Milch und homogenisierter Rohmilch hergestellt wurde. Es zeigte sich, dass Buttersäure, Hexansäure und höhere Fettsäuren stets in höheren Konzentrationen im Rohmilchkäse vorhanden waren.

*Kanawija et al. (1995)* untersuchten die Änderungen von Aroma und Textur sowie chemische Veränderungen bei der Beschleunigung der Reifung von Gouda-Käse durch ein Enzympräparat. Dabei wurde u.a. der Verlauf der Gehalte an freien Fettsäuren nach 0, 2, 4, 6 und 8 Monaten Reifungszeit verfolgt. Unabhängig von der Reifungsbeschleunigung stieg der Gesamtgehalt an freien Fettsäuren im Verlauf der Reifung stetig an.

Die Effekte der Pasteurisierung, des Einsatzes von pflanzlichem Chymosin und der Zugabe von Starterbakterien auf die die Lipolyse in Schafsmilchkäse zeigten *Sousa und Malcata (1997)*. Die HPLC-Analyse der freien Fettsäuren ergab im Schafskäse aus pasteurisierter Milch keinen Einfluss der Pasteurisierung auf die Bildung von Capronsäure über Laurinsäure bis zu Linolensäure, jedoch höhere Werte für Buttersäure, Caprylsäure und Caprinsäure.

*Pinna et al. (1999)* fanden in Fiorde Sardo-Käse im Reifungsverlauf von null bis acht Monaten heraus, dass Buttersäure bis zu Caprinsäure sowie Laurinsäure bis zu Palmitinsäure im Käse aus roher Schafsmilch in signifikant höherer Menge vorhanden waren als in pasteurisierter Schafsmilch. Dagegen zeigten sich bei der GC-Analyse von Stearinsäure bis zu Linolensäure keine signifikanten Unterschiede in den Käsevarianten. Die Autoren nahmen an, dass die Aktivität der Milchlipase in der Rohmilch für diese Tendenzen verantwortlich ist.

## 1 Einleitung

---

Neben mikrobiologischen und biochemischen Charakteristika untersuchten *Albenzio et al. (2001)* den Gehalt an freien Fettsäuren in Canestrato Pugliese-Käse, der aus pasteurisierter und roher Schafsmilch hergestellt wurde. Die Gehalte von Capronsäure bis zu Caprinsäure, Stearinsäure, sowie Linolsäure und Linolensäure waren im Rohmilchkäse in höherer Konzentration vorhanden als im Käse aus pasteurisierter Milch. Keine Unterschiede zeigten sich dagegen bei Buttersäure, Laurinsäure bis zu Palmitinsäure und Ölsäure.

*Morgan et al. (2001)* untersuchten den Einfluss der Pasteurisierung auf die Lipolyse von Ziegenmilchkäse. Die Lipolyse, ausgedrückt als freier Ölsäure-Gehalt pro 100 g Käse, fiel im Käse aus Rohmilch signifikant stärker aus als im Käse aus pasteurisierter Milch.

Um den Effekt der Milchbehandlung auf die Lipolyse in Ziegenmilchkäse zu untersuchen, bestimmten *Buffa et al. (2001)* gaschromatographisch die Gehalte an freien Fettsäuren in Käsen, die u.a. aus pasteurisierter sowie roher Ziegenmilch hergestellt wurden. Die Untersuchungszeitpunkte lagen nach einem sowie nach 30 und 60 Tagen der Reifung. Zum einen wurde der Gesamtgehalt an freien Fettsäuren in mg/g Fett im Käse aus Rohmilch deutlich höher gemessen als im Käse, der aus pasteurisierter Ziegenmilch hergestellt wurde. Bei der Einzelbetrachtung der freien Fettsäuren im Reifungsverlauf lagen zum anderen die Gehalte im Käse aus Rohmilch erst ab einer Kettenlänge von C-10 deutlich höher als im Käse aus pasteurisierter Milch.

*Alewijn et al. (2005)* untersuchten die durch Lipolyse gebildeten flüchtigen Verbindungen aus acht Reifungsstufen in Gouda-Käse aus pasteurisierter sowie roher Kuhmilch im Zeitraum von 0 bis 96 Wochen. Dabei war die Summe der Konzentrationen der gesamten freien Fettsäuren (C-6 bis C-18) sowie die Summe der mittellangen freien Fettsäuren (C-6 bis C-9) im Rohmilch-Gouda höher als im Gouda aus pasteurisierter Milch. In beiden Betrachtungen wurde die Buttersäure nicht miteinbezogen.

Die Lipolyse in Cheddar-Käse, der aus roher, thermisierter und pasteurisierter Milch hergestellt wurde, untersuchten *Hickey et al. (2007)*. Neben der Bestimmung von Enzymaktivitäten und Bakterienzahlen wurden die freien Fettsäuren (FFS) mittels GC und FI-Detektor in Käse aus sechs Reifungsstufen in einem Reifungszeitraum von 168 Tagen bestimmt. Die Konzentrationen an FFS stiegen mit der Reifungszeit im Rohmilchkäse vor



allem in den höheren Reifungsstufen deutlich stärker an als im Cheddar aus pasteurisierter Milch.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Unterschied im Spektrum flüchtiger Verbindungen und freier Fettsäuren zwischen Käsen, die aus pasteurisierter Milch und Rohmilch hergestellt wurden, zuvorderst darin besteht, dass die (flüchtigen) freien Fettsäuren im Käse aus Rohmilch in höheren Konzentrationen vorhanden sind. Gemäß den Literaturdaten gilt dies auch für Ester, besonders für Ethylester.

2,3-Butandion und 3-Methylbutanal waren gegenüber der jeweiligen Rohmilchvariante hingegen vermehrt in Käsen aus pasteurisierter Milch in höheren Konzentrationen enthalten. In den Arbeiten, in welchen Lactone in Käsen bestimmt wurden, konnten für diese Verbindungsgruppe meistens keine Konzentrationsunterschiede zwischen Rohmilchkäse und Käse aus pasteurisierter Milch festgestellt werden.

### 1.6 Modelluntersuchungen zur Umsetzung von L-Leucin zu flüchtigen Verbindungen durch Mikroorganismen

Erste Untersuchungen zur Umsetzung von L-Leucin zu flüchtigen Verbindungen in Modellansätzen durch Mikroorganismen stammen aus den 50er-Jahren.

1954 untersuchten *Jackson und Morgan* die Umsetzung von Leucin und Isoleucin zu flüchtigen Aldehyden durch *Streptococcus lactis var. maltigenes*. Die Aldehyde wurden nach Derivatisierung zu 2,4-Dinitrophenylhydrazonen zunächst über Dünnschichtchromatographie (DC) und Schmelzpunktbestimmungen identifiziert. Mit Hilfe der DC-Technik machten die Autoren nur semiquantitative Abschätzungen über das Bildungsverhältnis der Aldehyde.

*MacLeod und Morgan (1955)* untersuchten in-vitro den Leucin-Abbau durch *Streptococcus lactis* und *Streptococcus lactis var. maltigenes*. Dabei wurde unter Anwendung der Analysetechniken nach *Jackson und Morgan (1954)* auch die Umsetzung von 2-Keto-4-methylpentansäure zu flüchtigen Verbindungen versucht.

*Williams et al. (2001)* untersuchten die Umsetzung von Aminosäure-Mischungen, die L-Leucin enthielten, durch 29 zellfreie Bakterienisolate von Lactobacillen, die aus neun verschiedenen Cheddar-Käsen gewonnen wurden. Nach Isolierung einer flüchtigen Fraktion aus den inkubierten Suspensionen mittels Wasserdampfdestillation wurden daraus flüchtige

## 1 Einleitung

---

Verbindungen identifiziert und anhand eines internen Standards quantifiziert. Als Leucin-Metabolite wurden 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure bestimmt. Von 29 Isolaten, die mit der Aminosäuremischung inkubiert wurden, bildeten 26 Isolate deutlich höhere Konzentrationen an 3-Methylbuttersäure.

*Ayad et al. (2001)* untersuchten das Potential verschiedener Mischungen von Lactokokkus-Stämmen, Aminosäuren und flüchtige Verbindungen in UHT-Milch freizusetzen. Dabei analysierten die Autoren Milch mit und ohne Dotierung von Leucin, Isoleucin und Valin sowie korrespondierender  $\alpha$ -Ketosäuren. Flüchtige Verbindungen wurden mittels Headspace-Gaschromatographie und FI-Detektor qualifiziert und quantifiziert. Sowohl in den mit L-Leucin als auch in den mit der korrespondierenden 2-Keto-4-methylpentansäure ( $\alpha$ -Keto-Isocaproinsäure) dotierten Ansätzen bildete ein bestimmter Lactokokkus-Stamm hohe Mengen an 3-Methylbutanal.

*Kieronczyk et al. (2003)* verglichen die Fähigkeit von *L. lactis subsp. cremoris* NCDO763 und Glutamatdehydrogenase (GDH)-positiven oder -negativen Stämmen von Nichtstarter Lactobacillen u.a. aus radioaktiv markiertem L-[4,5]-<sup>3</sup>H-Leucin in vitro Metabolite zu bilden. Die Analyse erfolgte durch Umkehrphasen-HPLC (engl. *Reversed Phase HPLC, RP-HPLC*) und Ionenausschluss-Chromatographie (engl.: *Ion Exclusion Chromatographie, IEC*) mit UV- und radioaktiver Detektion. Aus dem markierten L-Leucin bildete der Lactokokkus-Stamm neben 2-Hydroxy-4-methylpentansäure und 3-Methylbuttersäure vorzugsweise 2-Keto-4-methylpentansäure. Die Menge an 3-Methylbuttersäure konnte durch Mischungen des *L. lactis subsp. cremoris* mit Lactobacillen im Verhältnis zu den anderen Metaboliten erhöht werden.

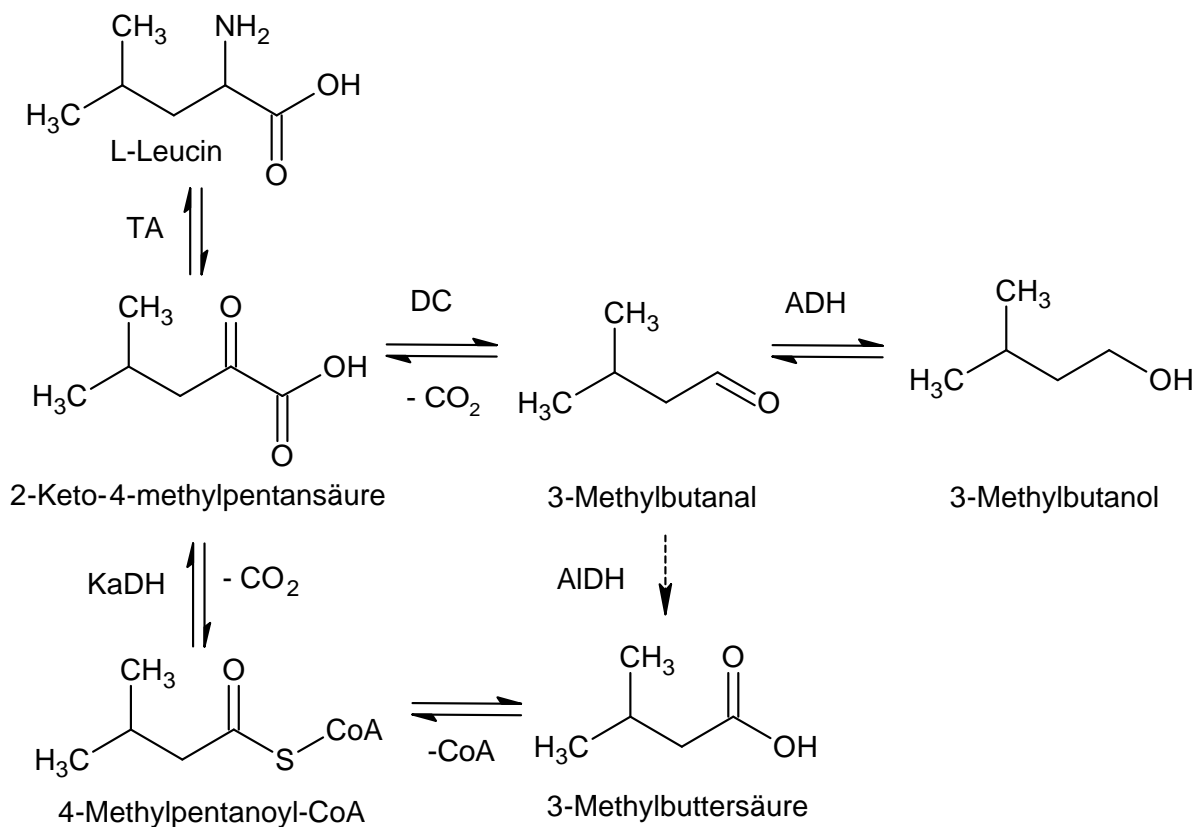
Die Bildung von Monocarbonsäuren aus Amino- und  $\alpha$ -Ketosäuren durch Lactokokken und Lactobacillen untersuchten *Ganesan et al. (2004)*. In-vitro-Ansätze der Bakterien mit einzelnen Substraten und Mischungen, darunter L-Leucin und 2-Keto-4-methylpentansäure, wurden nach Inkubation gaschromatographisch auf die Bildung von gerad- und verzweigt-kettigen Monocarbonsäuren untersucht. Aus den Ansätzen von 2-Keto-4-methylpentansäure bildete sich u.a. immer 3-Methylbuttersäure. Unklar ist hingegen, warum sich 3-Methylbuttersäure nur in einem von zwei L-Leucin-Ansätzen bildete.

*Smit et al. (2004)* untersuchten den L-Leucin-Katabolismus an 23 verschiedenen Mikroorganismen, die insbesondere bei der Produktion von Käse involviert sind. Neben der Bestimmung der Transaminase- und Decarboxylase-Aktivität in zellfreien Extrakten erfolgten Bestimmungen potentieller nichtflüchtiger und flüchtiger Umsetzungsprodukte mittels HPLC und Headspace-Gaschromatographie. Dabei waren nur aus den Ansätzen zweier Bakterienstämme mit L-Leucin die Metabolite 3-Methylbutanal und 3-Methylbutanol detektierbar.

*Kieronczyk et al. (2006)* untersuchten den Einfluss des Redoxpotentials auf die Umsetzung von Aminosäuren zu flüchtigen Verbindungen durch Stämme von *Lactococcus lactis*. In Ansätzen dieser Bakterien in rekonstituierter Kuhmilch unter Zusatz von u.a. radioaktiv markiertem L-[4,5]-<sup>3</sup>H-Leucin wurden die gebildeten flüchtigen und nichtflüchtigen Metabolite mittels Gaschromatographie und HPLC mit jeweiliger radioaktiver Detektion quantifiziert. Dabei bildeten sich aus markiertem L-Leucin aus einem von zwei untersuchten Stämmen von *Lactococcus lactis* 3-Methylbuttersäure neben 2-Keto-4-methylpropansäure und 2-Hydroxy-4-methylpropansäure. Hingegen waren 3-Methylbutanal und 3-Methylbutanol nicht detektierbar. Aus dem anderen Lactokokkus-Stamm bildeten sich neben der 3-Methylbuttersäure auch vergleichbare Mengen an 3-Methylbutanal und 3-Methylbutanol.

In den Arbeiten von *Smit et al. (2004)*, *Ganesan et al. (2004)*, *Ardö (2006)* und *Kieronczyk et al. (2006)* leiten die Autoren aus ihren Daten u.a. Umsetzungsschemata für die Bildung flüchtiger Metabolite aus Aminosäuren bzw. L-Leucin ab, die sich zusammenfassend in der folgenden **Abbildung 4** darstellen lassen. Demnach bildet sich aus L-Leucin zunächst das Schlüsselintermediat 2-Keto-4-methylpentansäure. Über 3-Methylbutanal kann sich zum einen 3-Methylbutanol bilden, zum anderen bildet sich aus der  $\alpha$ -Ketosäure 3-Methylbuttersäure über 4-Methylpentanoyl-CoA. *Ganesan et al. (2004)* schlagen dabei eine Bildung von 3-Methylbuttersäure aus 4-Methylpentanoyl-CoA über 4-Methylpentanoyl-Phosphat unter ATP-Gewinn vor. Eine Bildung der Säure aus dem Aldehyd wird ebenso in Betracht gezogen.

## 1 Einleitung



**Abbildung 4:** Schema zum Leucin-Abbau (TA = Transaminase, DC = Decarboxylase, ADH = Alkoholdehydrogenase, KaDH = Ketosäuredehydrogenase, AIDH = Aldehyddehydrogenase)

Wie die Literaturdaten zeigen, sind Modelluntersuchungen zur mikrobiellen Umsetzung von L-Leucin zu flüchtigen Verbindungen mit Hilfe von L-Leucin und 2-Keto-4-methylpentansäure als stabilisotopenmarkierte Precursoren nicht bekannt. Auch genaue quantitative Daten über markierte flüchtige Umsetzungsprodukte der genannten Vorstufen, die mittels Stabilisotopenverdünnungsanalysen (vgl. 1.7.3) erzeugt wurden, sind bislang nicht veröffentlicht worden.

## 1.7 Aromarelevanz flüchtiger Verbindungen

### 1.7.1 Aromastoffe – Definition und Bedeutung für die Lebensmittelqualität

**Aromastoffe** sind bei Raumtemperatur flüchtige Verbindungen, die in der Lage sind, die Rezeptoren in der sogenannten *Regio Olfactoria* im nasalen Riechepithel zu stimulieren. Dies kann direkt beim Einatmen durch die Nase (*orthonasal*) oder nach dem Zerkauen über den Rachenraum (*retronasal*) erfolgen. Demgegenüber wirken die i.d.R. nichtflüchtigen Geschmacksstoffe auf Geschmacksrezeptoren, die auf der Zunge lokalisiert sind. Es sind jedoch auch Verbindungen bekannt, die auf beide Rezeptoren wirken können. Unter unseren fünf Sinnen stellen Geruchs- und Geschmackssinn die chemischen Sinne dar (*Schieberle, 1995; Belitz et al., 2001; Schieberle und Hofmann 2003*).

Das Zusammenspiel von Geruchs-, Geschmacks- und Tastempfindungen resultiert in einem Gesamtsinneseindruck beim Verzehr eines Lebensmittels, der im Deutschen als „Geschmack“ (engl.: *flavour*) bezeichnet wird (*Belitz et al., 2001*). Er definiert den Genusswert und damit, neben anderen Faktoren, maßgeblich die **Qualität** eines Lebensmittels und letztendlich die Akzeptanz des Produktes beim Konsumenten. Detaillierte Kenntnisse über die am Geschmack beteiligten, bioaktiven Verbindungen (Geruchs- bzw. Aromastoffe und Geschmacksstoffe) ermöglichen folglich die Verbesserung der Produktqualität.

Ziel der modernen **Aromaforschung** ist es deshalb, durch aktivitätsorientierte Screeningverfahren die Komponenten zu identifizieren, die vorwiegend und prägend zum Aroma beitragen (Schlüsselaromastoffe), deren Vorstufen in Rohstoffen zu charakterisieren und Reaktionswege aufzuklären, die ihre Bildung während der Lebensmittelverarbeitung und Lagerung bestimmen, um somit die Produktqualität positiv beeinflussen zu können (*Schieberle, 1995; Schieberle und Hofmann 2003*).

### 1.7.2 Physiologie der Aromawahrnehmung

Die erste Voraussetzung für die Klassifizierung einer Verbindung als Aromastoff ist seine Flüchtigkeit. Durch das Einziehen der Atemluft durch die Nase (*orthonasal*) oder über den Rachenraum beim Kauen und Schlucken der Nahrung (*retronasal*) gelangen die flüchtigen Verbindungen zur sogenannten Riechzone (*Regio olfactoria*), die in der oberen Nasenhöhle lokalisiert ist. Die sich in der dortigen Riechschleimhaut (Riechepithel) befindenden ca. 30 Millionen Sinnesneuronen (Riechzellen) besitzen feine *Cilien* (Riechhärchen), die wiederum

## 1 Einleitung

---

Rezeptorproteine enthalten, die mit Geruchsstoffen reagieren. Stellt diese Bindungsreaktion einen ausreichenden Reiz dar, wird das durch eine Signaltransduktionskaskade entstehende elektrische Signal über sogenannte *Axone* durch das Siebbein zum Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) geleitet. Die *Axone* enden in den *Glomeroli* (Riechknötchen), deren weiterleitende Neuronen das Signal zur Interpretation zum *olfaktorischen Cortex* (Riechrinde) weiterleiten (Axel, 1995; Belitz et al., 2001; Hatt, 2003).

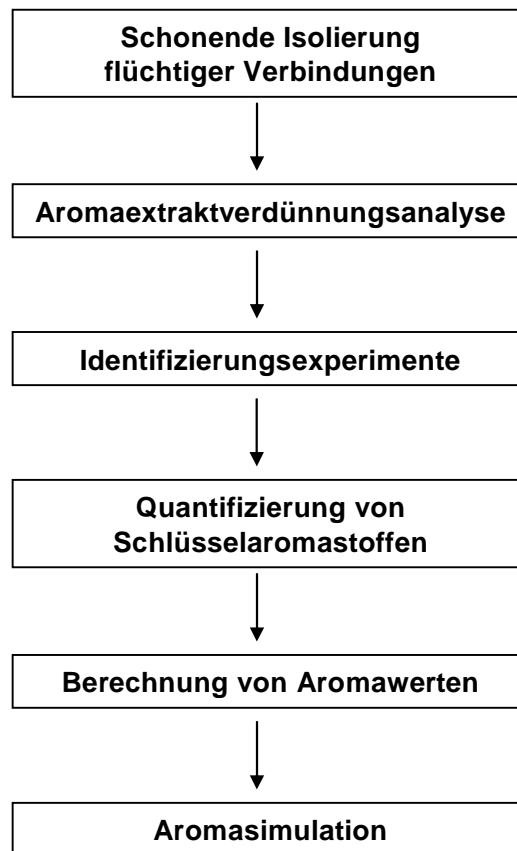
Die ca. 30 Millionen Sinnesneuronen in der Riechschleimhaut sind dort in einem spezifischen Verteilungsmuster angeordnet, das genetisch festgelegt ist. Sie besitzen jeweils nur einen von ca. 390 Rezeptortypen. Damit besitzen viele Riechzellen dieselbe Duftstoffselektivität für eine bestimmte Gruppe von Aromastoffen. Neue Daten zeigen, dass jede Sinneszelle sein Signal nur an ein Ziel-Glomerulus weiterleitet. Stimulierte Riechzellen vom gleichen Rezeptortyp leiten ihr Signal zum selben Glomerulus weiter. Inhaliert man nun eine Duftstoffmischung, wird ein bestimmtes Muster an Glomeruli aktiviert, das vom nachgeschalteten olfaktorischen Cortex und weiteren übergeordneten sensorischen Bereichen im Großhirn gespeichert und als Geruch wiedererkannt werden kann. So ist es für den Menschen möglich, ca. 10.000 verschiedene Gerüche mit einer geringen Anzahl von Rezeptortypen wahrzunehmen (Axel, 1995; Hatt, 2003).

Die zweite Voraussetzung, damit eine Verbindung als Aromastoff wahrgenommen wird, ist neben der Flüchtigkeit ihre Konzentration in der Luft, die hoch genug sein muss, um ihre spezifische Geruchsschwelle zu überschreiten. Da die Aromastoff-Konzentration in der Luft sehr stark von der Matrix abhängig ist, in der er sich befindet, können sich stoffspezifische Geruchsschwellen derselben Verbindung in unterschiedlichen Lebensmitteln um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden (Rychlik et al., 1998).

### 1.7.3 Stufenmodell zur Charakterisierung und Bewertung von Aromastoffen

Um diesen physiologischen und physiko-chemischen Voraussetzungen Rechnung zu tragen, müssen aromarelevante flüchtige Verbindungen (Aromastoffe) von nichtrelevanten flüchtigen Verbindungen durch aktivitätsorientierte Screeningverfahren unterschieden und die Aromastoffe aus ihrer komplexen Lebensmittelmatrix charakterisiert werden. Diese Techniken werden unter dem Begriff **Molekulare Sensorik** zusammengefasst (Schieberle und Hofmann, 2003). Grosch und Schieberle entwickelten hierzu ein mehrstufiges Konzept

(Abbildung 4), das analytische und sensorische Methoden kombiniert (Grosch, 1993; Schieberle, 1995).



**Abbildung 4:** Stufenmodell zur Bewertung der Aromarelevanz flüchtiger Verbindungen (Grosch, 1993; Schieberle, 1995)

### Isolierung flüchtiger Verbindungen

Die Anforderungen an die Methode zur Isolierung flüchtiger Verbindungen aus ihrer Matrix zielen - im Hinblick auf die Aromasimulation - auf die Herstellung eines repräsentativen Aromaextraktes, der die Aromastoffzusammensetzung des Ausgangsmaterials widerspiegelt. Hierzu sind die Wahl des Extraktionsmittels und -verfahrens sowie des Destillationsverfahrens entscheidend. Die Verfahren müssen schonend sein, um Aromastoffverluste und die Artefaktbildung zu minimieren.

Eine heute noch häufig angewendete Methode zur Isolierung flüchtiger Verbindungen ist die Simultane Destillation Extraktion (SDE) nach *Likens* und *Nickerson* (1964). Aufgrund der thermischen und oxidativen Belastung, die auch nach Weiterentwicklungen dieser Methode noch gegeben ist, zeigt sich die SDE zur Herstellung eines repräsentativen Aromaextrakts

## 1 Einleitung

---

allerdings als nicht geeignet. So kann es beispielsweise leicht zur Generierung von aromaaktiven Lipidperoxidationsprodukten kommen sowie zu einer Verfälschung der Aromazusammensetzung u.a. durch Esterhydrolysen und Maillard-Reaktionen (*Chaintreau, 2001*).

Optimalerweise wird bei der Isolierung der flüchtigen Verbindungen eine Kaltextraktion mit einem niedrig siedenden Lösungsmittel (beispielsweise Diethylether) angewendet, gefolgt von einem Hochvakuumtransfer bei niedrigen Temperaturen, um die Artefaktbildung zu minimieren (*Schieberle, 1995*). Die von *Weurman et al. (1970)* entwickelte Methode des Hochvakuumtransfers, die sie bereits zur Aufreinigung von Aromaextrakten anwendeten, wurde über die Jahre modifiziert und verbessert. *Engel et al. (1999)* entwickelten schließlich die sogenannte **SAFE**-Apparatur (**Solvent Assisted Flavour Evaporation**, vgl. **3.4.1.2**), die repräsentative Aromaextrakte liefert. Mit der SAFE-Apparatur sind zudem zeitsparende direkte Destillationen aus wässrigen und alkoholischen Lebensmitteln möglich.

### **Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)**

Der nächste Schritt nach der Herstellung und schonenden Aufkonzentrierung des Aromadestillats ist die Unterscheidung von flüchtigen Verbindungen und aromaaktiven Substanzen und deren Bewertung. Hierzu erfolgt eine Untersuchung des Konzentrats flüchtiger Verbindungen mittels **Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O)**. Dabei wird der Gasstrom am Ende der GC-Säule zu gleichen Teilen getrennt, zur Hälfte an einem Flammenionisationsdetektor (FID) aufgezeichnet und zur anderen Hälfte zeitgleich an einem beheizten Sniffing-Port direkt abgerochen. Zur schonenden Aufgabe des Extraktes auf die GC-Säule dient die On-Column-Injektion bei 40 °C (vgl. **3.6.1**).

Die olfaktorische Wahrnehmung ermöglicht die Festlegung von aromaaktiven Bereichen in einem FID-Chromatogramm, die Festlegung einer Geruchsqualität und die Bestimmung von Retentionsindices. Wichtig ist zudem, dass bei dieser Sniffing-Technik aromaaktive Substanzen mit der Nase detektiert werden können, auch wenn diese aufgrund ihrer niedrigen Konzentration und gleichzeitig niedrigen Geruchsschwelle in der Luft kein FID-Signal ergeben.

Da die Anzahl und Intensität der wahrgenommenen Aromastoffe abhängig ist von der Menge des Ausgangsmaterials, der Konzentrierung des Destillats und des Einspritzvolumens bei der GC-O, kann die Bedeutung einer aromaaktiven Substanz im Chromatogramm für das Gesamtaroma erst durch Verdünnungstechniken abgeschätzt werden. Dafür eignet sich eine



sukzessive Verdünnung des Destillats und Untersuchung mittels GC-O (*Schmid und Grosch 1986; Ullrich und Grosch, 1987*). Bei dieser als **Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)** bezeichneten Methode wird der konzentrierte Aromaextrakt sukzessive 1:2 verdünnt und die einzelnen Verdünnungen mittels GC-O untersucht (*Schieberle und Grosch, 1987a*). Dabei wird die letzte Verdünnungsstufe, bei der ein Aromastoff am Sniffing-Port noch detektiert werden kann, nach *Schieberle und Grosch (1988)* als **FD-Faktor (Flavour Dilution-Faktor)** bezeichnet. Je höher dieser ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Aromarelevanz des Aromastoffs. Da jedoch bei dieser Methode die Verbindungen unabhängig von ihrer Flüchtigkeit und der Lebensmittelmatrix untersucht werden, kann die AEVA nur eine Screeningmethode darstellen.

### Identifizierungsexperimente

Die Identifizierungsexperimente der aromaaktiven Bereiche im FID-Chromatogramm der GC-Olfaktometrie erfolgen durch den Vergleich von Geruchsqualitäten und Retentionsindices mit Referenzsubstanzen auf mindestens zwei verschiedenen GC-Säulen unterschiedlicher Polarität sowie durch den Vergleich mit Massenspektren der Referenzsubstanzen im EI- und CI-Modus. Da Aromastoffe häufig in nur sehr geringen Konzentrationen im Aromaextrakt vorliegen, sind in solchen Fällen für interpretationsfähige Massenspektren Anreicherungs-, Aufreinigungs- und Fraktionierungsschritte notwendig.

### Quantifizierung von Schlüsselaromastoffen

Die bisher erläuterten Techniken erlauben die Selektion potentiell wichtiger Aromastoffe in einem repräsentativen Aromaextrakt. Eine endgültige Bewertung des Beitrags eines Aromastoffs zum Gesamtaroma ist daher nur mit genauen quantitativen Daten möglich. Bei Quantifizierungsmethoden für Aromastoffe muss in Betracht gezogen werden, dass die Analyten als z.T. labile und/oder leichtflüchtige Spurenkomponenten vorliegen und die daraus resultierenden Aufarbeitungsverluste kompensiert werden müssen. Die Methode der Wahl ist deshalb die **Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA)**. Sie wurde in der Aromaforschung erstmalig von *Schieberle und Grosch (1987a)* zur Quantifizierung von Aromastoffen in Weißbrotkruste eingesetzt.

Die SIVA zeichnet sich dadurch aus, dass der verwendete  $^2\text{H}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -markierte interne Standard dem Analyten in seinen chemischen, physikalischen und chromatographischen Eigenschaften nahezu gleicht. So ist eine bestmögliche Kompensation von

## 1 Einleitung

---

Aufarbeitungsverlusten möglich. Die Konzentration des Analyten kann über das Verhältnis der Intensitäten (Flächensignale) der charakteristischen Ionen, in der Regel das durch chemische Ionisation (MS-CI) erzeugte Molekülion, bei der Messung mittels Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) äußerst genau bestimmt werden.

Eine Variante der Isolierung flüchtiger Verbindungen und Aromastoffe ist die Anwendung der sogenannten **Festphasen-Mikroextraktion (Solid Phase Micro Extraction, SPME)** anstelle einer Lösungsmittelextraktion und Aromastoffdestillation vor der HRGC-MS. Bei der SPME werden Analyt und interner Standard direkt über der equilibrierten Probe im Gasraum an eine Festphase adsorbiert und nach thermischer Desorption auf die GC-Säule gespült und gemessen. Die Methode ist besonders für sehr leichtflüchtige Substanzen geeignet und ermöglicht zudem eine erhebliche Zeitersparnis im Vergleich zur „klassischen“ Lösungsmittelextraktion (vgl. 3.6.4).

### Berechnung von Aromawerten

*Rothe und Thomas (1963)* führten erstmalig den Begriff des Aromawerts (AW) ein, der als Quotient der Konzentration und dessen Geruchsschwelle in einer bestimmten lebensmittelnahen Matrix definiert ist:

$$\text{AW} = \frac{\text{Konzentration}}{\text{Geruchsschwelle}}$$

Der **Aromawert AW** (engl.: *odour activity value, OAV*) ermöglicht durch den Einbezug der Effekte der Lebensmittelmatrix auf den Aromastoff eine tatsächliche Aussage über die Aromawirksamkeit einer Verbindung und den Beitrag zum Gesamtaroma des Lebensmittels. Liegt der Aromawert über eins, so trägt nach *Rothe und Thomas (1963)* der Aromastoff zum Gesamtaroma bei. Da die Geruchsschwellenwerte einzelner Verbindungen in geruchsneutralen Matrices ermittelt werden, sind bei dieser Betrachtungsweise Wechselwirkungen mit anderen Aromastoffen nicht berücksichtigt. Diese Wechselwirkungen können synergistische oder suppressive Effekte verursachen (*Laing und Willcox, 1983; Widder und Grosch, 1994*). Zudem ist zu beachten, dass nach *Stevens (1957)* zwischen der

Konzentration eines Aromastoffs und seiner subjektiven Wahrnehmung (Geruchsintensität) kein linearer, sondern ein exponentieller Zusammenhang besteht (engl.: *Psychophysiological Law*), der vom Aromastoff selbst abhängig ist.

Um all diesen Effekten Rechnung zu tragen, ist es notwendig, den tatsächlichen Aromabeitrag eines Aromastoffs zum Gesamtaroma durch Aromasimulationen zu testen.

### **Aromasimulation**

Die Aromasimulation dient, wie gesagt, der Überprüfung der bis dato ermittelten qualitativen und quantitativen Daten zur Ermittlung der Aromazusammensetzung eines Ausgangsproduktes. Hierzu werden die Aromastoffe in den analytisch bestimmten Konzentrationen in einer lebensmittelnahen Matrix eingesetzt und von einem geschulten Personenkreis (Panel) sensorisch bewertet. Der Vergleich mit dem originalen Ausgangsprodukt zeigt bei einer guten Übereinstimmung, dass die wichtigen aromarelevanten Verbindungen aus dem Produkt erfasst wurden. Die Wichtigkeit einzelner Verbindungen im Simulationsgemisch kann durch sogenannte Weglassversuche geklärt werden, wobei die Auswirkung der Abwesenheit eines Aromastoffs im Gesamtrekombinat auf das Gesamtaroma getestet wird.

Die in den letzten Jahren erzielten Ergebnisse durch die konsequente Anwendung des beschriebenen Aromawertkonzepts zeigen eindrucksvoll, dass die beschriebenen instrumentellen und sensorischen Techniken (Molekulare Sensorik) die Erstellung sehr guter Aromamodelle ermöglichen. Dies gelang beispielsweise für Olivenöl (*Guth und Grosch 1991; Guth und Grosch 1993b*) und Butter (*Schieberle et al., 1993*), für die Soße eines Rinderschmorbratens (*Guth und Grosch 1993c; Guth und Grosch 1994*), für Weißwein-Sorten (*Guth 1997a, Guth 1997b*), für Erdbeeren (*Schieberle und Hofmann, 1997*), für Aprikosen und Pfirsiche (*Greger und Schieberle, 2007*), für Mandarinen- und Orangenöl (*Fischer et al. 2008, Fischer und Schieberle 2009*), für Bourbon Whisky (*Poisson und Schieberle 2008a, Poisson und Schieberle 2008b*), für die Soße eines Rindfleisch-Gemüse-Schmorbratens (*Christlbauer und Schieberle, 2009*) und für Edelsalami (*Söllner und Schieberle, 2009*).

### 1.8. Charakterisierung von Aromastoffen in Schnitt- und Hartkäse

Neben den Beispielen verschiedener Lebensmittel für die erfolgreiche Verfolgung des Stufenmodells nach *Schieberle (1995)* fanden systematische Techniken der **Molekularen Sensorik** auch bei Schnitt- und Hartkäse ihre Anwendung. Mittels GC-Olfaktometrie und weiterführender Verfahren (z.B. AEVA, SIVA, OAV) konnten in verschiedenen semiharten und harten Käsesorten Aromastoffe charakterisiert und in einigen Arbeiten ihr Beitrag zum Gesamtaroma ermittelt werden.

Umfassende systematische Untersuchungen zu Emmentaler-Käse führten *Preininger et al. (1994)*, *Preininger und Grosch (1994)*, sowie *Preininger et al. (1996)* durch. Die Kombination der erläuterten Techniken der Molekularen Sensorik (AEVA, SIVA, OAV) ermöglichte nach der Aufklärung wichtiger aromaaktiver Verbindungen in der neutralen flüchtigen Fraktion von Schweizer Emmentaler-Käse und der Ermittlung genauer quantitativer Daten schließlich die Aromazusammensetzung durch Rekombinationsversuche zu überprüfen (*Preininger et al., 1996*). Neben den Aromastoffen aus der neutral-basischen Fraktion quantifizierten die Autoren hierfür auch Geschmacksstoffe (u.a. Fettsäuren, Aminosäuren und Mineralstoffe) in ungerieftem, jungem und altem Emmentaler-Käse (**Tabelle 5**).

In gereiftem Cheddar-Käse bewerteten *Christensen und Reineccius (1995)* mittels GC-O und AEVA (Verdünnungen 1:3) 25 aromaaktive Bereiche eines Gas-Chromatogramms und identifizierten davon 18 Aromastoffe durch GC-Massenspektrometrie. Die höchsten FD-Faktoren (FD = 729) zeigten Ethylbutanoat, Essigsäure und Buttersäure. Die Identifizierung erfolgte durch den Vergleich von RI-Werten mit Literatur- und Datenbankwerten.

Nach dynamischer Purge-and-Trap-Extraktion untersuchten *Arora et al. (1995)* Cheddar-Käse mit Hilfe einer GC-MS-Sniffing-Methode, wobei 49 von 60 flüchtigen Verbindungen anhand von RI-Werten und MS-Spektren identifiziert wurden. Davon wiederum konnten am Sniffing-Port 28 Verbindungen Geruchsqualitäten zugeordnet werden, die anhand ihrer Intensität auf einer Skala von 1-5 bewertet wurden. Diese an der Geruchsintensität orientierte Bewertungsweise wird als *Osme-Technik* bezeichnet (*Osme*, griechisch für „Geruch“).

**Tabelle 5:** Konzentrationen von Schlüsselaromastoffen und Geschmacksstoffen (Fettsäuren) in ungereiftem (UC), jungem (A) und altem (B) Emmentaler-Käse nach *Preininger et al. (1996)*

Verbindung	Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in Emmentaler-Käse		
	UC	A	B
<i>Aromastoffe</i>			
2,3-Butandion	184	26	98
3-Methylbutanal	10	43	64
Ethylbutanoat	< 1	98	26
Ethyl-3-methylbutanoat	n.b.	0,3	0,9
Ethylhexanoat	< 1	35	62
3-(methylthio)-propanal	4,8	6,6	33
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	< 5	241	2035
5-Ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2H)-furanon	n.b.	112	141
$\delta$ -Decalacton	1400	1822	927
<i>Geschmacksstoffe</i>			
Essigsäure	12,7	2019000	2250000
Propionsäure	n.d.	2933000	4171000
Buttersäure	1	444	83
3-Methylbuttersäure	n.b.	10	15
Hexansäure	n.b.	26	44
Octansäure	n.b.	23	30
Decansäure	0,2	73	73
Dodecansäure	5,6	106	96

n.b. = nicht bestimmt

*Milo und Reineccius (1997)* untersuchten Cheddar-Käse zweier verschiedener Fettgehaltsstufen und charakterisierten neun Schlüsselaromastoffe nach Anwendung der AEVA, Quantifizierung mittels stabilisotopenmarkierter interner Standards per GC-MS und Berechnung von Aromawerten. Einen besonderen Aromabeitrag leisteten demnach die Aromastoffe 3-(Methylthio)-propanal (Methional), 2(5)-ethyl-5(2)-methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (Homofuraneol) und 2,3-Butandion sowie Essig- und Buttersäure.

## 1 Einleitung

---

*Moio und Addeo (1998)* identifizierten 83 flüchtige Verbindungen in Gran Padano-Käse, der nach Vakuum-Destillation und Flüssig-flüssig-Fraktionierung mittels HRGC-O und HRGC-MS analysiert wurde. In der sauren Fraktion waren v.a. Butter- und Hexansäure aromaaktiv, in der neutralen Fraktion konnten 23 Aromastoffe identifiziert werden.

Nach direkter Lösungsmittlextraktion, Hochvakuumtransfer und Fraktionierung des Extraktes in saure und neutral-basische flüchtige Verbindungen wendeten *Suriyaphan et al. (2001)* die AEVA auf einen British Farmhouse Cheddar-Käse an. Die Autoren machten p-Kresol für eine kuhstallartige Note und 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin für eine erdige Note in diesem Cheddar verantwortlich. *Suriyaphan et al. (2001)* sahen sich in der Hypothese bestätigt, nachdem sich durch die Dotierung eines milden Cheddar-Käse mit diesen beiden Aromastoffen die charakteristische Geruchsnoten „kuhstallartig“ und „erdig“ im Cheddar-Käse verstärkten.

Das Aroma und Fehleroma-Komponenten in Schweizer Gruyère-Käse untersuchten *Rychlik und Bosset*. Nach dem Screening auf potente Aromastoffe mittels vergleichender AEVA (*Rychlik und Bosset, 2001a*) wurden mit Hilfe von quantitativen Daten (SIVA und OAV) Aromamodelle für Gruyère-Käse mit und ohne kartoffelartigem Fehleroma entwickelt (*Rychlik und Bosset, 2001b*). Für die Fehlnote konnte hauptsächlich die nach Kartoffel riechende Verbindung 3-(methylthio)propanal (Methional) verantwortlich gemacht werden.

*Zehentbauer und Reineccius (2002)* untersuchten kommerziellen Cheddar-Käse zum einen mit Hilfe einer AEVA nach Flüssigextraktion, Hochvakuum-Destillation sowie Fraktionierung und zum anderen mit Hilfe einer Verdünnungsanalyse von dynamischen Headspace-Proben (DHVA, Dynamische Headspace-Verdünnungsanalyse). Die Autoren bewerteten aus den Versuchsanordnungen mittels HRGC-Olfaktometrie 22 (AEVA) und 25 (DHVA) Aromastoffe mit FD-Faktoren von 1 bis 256. Den höchsten FD-Faktor bei der AEVA zeigte Buttersäure.

Den aktuellen Wissensstand über Untersuchungen zu aromaaktiven Verbindungen mittels GC-O verschiedener Käsesorten gaben *Curioni und Bosset (2002)*, die die Ergebnisse tabellarisch nach Verbindungsklassen geordnet zusammenfassten. Sie zeigten detailliert, welche Extraktionsmethode und welche analytische Methode (z.B. AEVA, OAV) die jeweiligen Autoren angewendet haben. Ebenso wurden ermittelte FD-Faktoren,

Konzentrationen und Geruchsschwellen der einzelnen Verbindungen dargestellt. Da bis dato keine Untersuchungen mit Techniken der Molekularen Sensorik an Gouda-Käse durchgeführt wurden, sind im umfassenden Rückblick von *Curioni und Bosset (2002)* keine Daten für diese Käsesorte aufgeführt.

*Quian und Reineccius (2002)* führten molekulare und sensorische Untersuchungen an Parmigiano Reggiano-Käse durch, indem sie flüchtige Verbindungen mittels Flüssigextraktion und Hochvakuumdestillation aus dem Käse isolierten. Nach Fraktionierung in saure und neutral-basische flüchtige Verbindungen führten sie diese einer kombinierten GC-Olfaktometrie/Massenspektrometrie zu. Die olfaktometrische Bewertung aromaaktiver Verbindungen wurde intensitätsbasiert (Osme-Technik) anhand der qualitativen Kriterien „sehr schwach“ über „schwach“ und „stark“ bis „sehr stark“ durchgeführt. Auf diese Weise wurden von den Autoren 11 Säuren, 9 Pyrazine und weitere 7 Aromastoffe in Cheddar-Käse charakterisiert.

Später untersuchten *Qian und Reineccius (2003a)* Parmigiano Reggiano-Käse, indem sie flüchtige Verbindungen mittels statischer Headspace-Methode sowie durch Flüssigextraktion isolierten und jeweils eine AEVA mittels GC-Olfaktometrie durchführten. Die Identifizierung der Aromastoffe erfolgte jeweils anhand von Geruchsqualitäten und RI-Werten im Vergleich zu Referenzsubstanzen sowie Massenspektren (MS-EI), die über eine Datenbank ausgewertet wurden. Mit der Headspace-Methode konnten 17 Aromastoffe, mit der Flüssigextraktion 43 Aromastoffe identifiziert und bewertet werden. Bei der AEVA ermittelten die Autoren FD-Faktoren von 4 bis 1024, wobei Essig- und Oktansäure sowie Ethylbutanoat den höchsten FD-Faktor erzielten.

Weitere Untersuchungen zu Parmigiano Reggiano-Käse wurden von *Qian und Reineccius (2003b)* mittels dynamischer Headspace-Analyse gekoppelt mit GC-O durchgeführt, wobei die Bewertung aromaaktiver flüchtiger Verbindungen zum einen anhand der Intensität (Osme-Technik) und zum anderen durch eine indirekte Verdünnungsanalyse durchgeführt wurde. Bei Letzterer erfolgte die Verdünnung durch eine sukzessive Halbierung der Käseeinwaage. Die Identifizierung der Aromastoffe erfolgte analog zu *Qian und Reineccius (2003a)*. Den höchsten FD-Faktor bei der Headspace-Verdünnungsanalyse, entsprechend der niedrigsten Einwaage, erzielten Acetaldehyd, Ethylbutanoat und Methional.

## 1 Einleitung

---

*Boscaini et al. (2003)* untersuchten die Profile aromaaktiver Verbindungen in Gran Padano-, Parmigiano Reggiano- und Grana Trentino-Käse. Mittels dynamischer Headspace-Extraktion und GC-O sowie mittels PTR-MS erfolgte die Analyse und olfaktometrische Bewertung des Gasraums über den Käsesorten. Durch eine statistische Auswertung über einen PCA-Plot (engl.: *principal component analysis*) konnten die Käsesorten anhand spezifischer Aromastoffe voneinander unterschieden werden.

Um ein nussiges Aroma in Cheddar-Käse aufzuklären, untersuchten *Avsar et al. (2004)* diesen Käse mit Hilfe von GC-O nach Flüssigextraktion und Hochvakuumdestillation, nach dynamischer Headspace-Extraktion sowie mittels GC-MS-Analyse. Die Identifizierung der Aromastoffe erfolgte anhand von Geruchsqualitäten, RI-Werten und Massenspektren von Referenzsubstanzen. Quantitative Daten wurden aus Peakflächen erhoben. Die sensorische Bewertung mittels GC-O erfolgte bei Headspace-Proben durch eine 10-Punkte-Skala, bei den Flüssigextrakten durch FD-Faktoren nach 1:3-Verdünnungen. Nach Dotierungsversuchen von Cheddar-Käse mit 2- und 3-Methylbutanal sowie 2-Methylpropanal leiteten die Autoren eine große Bedeutung dieser Aromastoffe für das nussige Aroma von Cheddar-Käse ab.

In der Arbeit von *Frank et al. (2004)* wurden verschiedene Cheddar-Käse und die Hartkäsesorten Parmesan, Pecorino und Grana Padano mit Hilfe von SPME-GC-MS und einer kombinierten GC-Olfaktometrie/Massenspektrometrie (GC-O/MS) molekular-sensorisch untersucht. Durch Vergleich mit einer MS-Datenbank identifizierten die Autoren insgesamt 61 verschiedene aromaaktive Verbindungen in den Käsesorten und bewerteten die Aromastoffe nach ihrer Intensität auf einer Skala von 1 – 5. Für Alkylpyrazine und Schwefelverbindungen wurden aus der Berechnung von relativen Peakflächen quantitative Daten erhoben.

*Carunchia et al. (2005)* versuchten unter Anwendung einer Flüssigextraktion, SAFE-Destillation, vergleichender Aromaextraktverdünnungsanalysen und Quantifizierung von fünf Aromastoffen sowie den Bezug dieser zu ihren Geruchsschwellen ein blumiges, rosenartiges Fehleroma in Cheddar-Käse aufzuklären. Aus Dotierungsversuchen mit den Aromastoffen leiteten die Autoren ab, dass Phenylacetaldehyd für die Fehlnote verantwortlich sein musste, die durch Kombination mit Phenyllessigsäure verstärkt werde.



Einen Vergleich von Cheddar-Käse mit Cheddar, der einem Verfahren der Fettreduzierung unterworfen wurde, führten *Carunchia et al. (2006)* durch. Nach Flüssigextraktion und SAFE-Destillation wurden die flüchtigen Fraktionen der Käse jeweils per GC-Olfaktometrie mittels AEVA untersucht. Die Identifizierung und Bewertung von 33 Aromastoffen erfolgte durch den Vergleich von RI-Werten, Massenspektren und Geruchsqualitäten mit Referenzsubstanzen. Mit Hilfe interner Standards, die vor der Extraktion zu den Proben dotiert wurden, quantifizierten die Autoren in den Käsen sechs Aromastoffe mittels GC/MS. Unter Anwendung einer computergestützten, statistischen Auswertung kommen die Autoren zu dem Schluss, dass das angewandte Verfahren geeignet ist, fettreduzierten Cheddar-Käse unter Erhalt der ursprünglichen sensorischen Eigenschaften und der Quantität der untersuchten Aromastoffe, herzustellen.

Im Review von *d'Acampora Zellner et al. (2008)* zur Anwendung der GC-Olfaktometrie bei Lebensmitteln werden u.a. die bisherigen Untersuchungen mit dieser Methode an Käse zusammengefasst. Generell sei bei den meisten Käsesorten wenig über das charakteristische Aroma bekannt. Bezüglich der Untersuchungen mittels GC-Olfaktometrie sei Cheddar-Käse der am besten untersuchte Käse. Nach den Autoren seien von aromaaktiven Verbindungen (Aromastoffen) aus der Lebensmittelmatrix nur wenige für das charakteristische Aroma verantwortlich, weshalb nur diese als Schlüsselaromastoffe bezeichnet werden können.

Die bislang einzige systematische Untersuchung zu aromaaktiven Schlüsselkomponenten in Gouda-Käse stammt von *Schmitt et al. (unveröffentlicht)*. Die Autoren untersuchten die aromaaktiven Verbindungen in kommerziellem Gouda-Käse, der 4 und 44 Wochen gereift war. Nach Etherextraktion, Hochvakuum-Destillation (SAFE-Technik) und nasschemische Trennung in eine saure und neutral-basische Fraktion wurden diese Fraktionen mittels HRGC-FID in Verbindung mit der Sniffing-Technik (HRGC-O) und GC-MS durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen identifiziert. Zudem erfolgten Untersuchungen mit der statischen Headspace-Mehode direkt aus dem Gasraum über dem Gouda-Käse. Die Autoren klärten im Rahmen ihrer Versuche insgesamt 39 aromaaktive Verbindungen auf. Mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) wurde der Extrakt durch die Bestimmung von FD-Faktoren (FD 1 bis 1024) auf potentiell wichtige Aromastoffe sensorisch untersucht.

## 1 Einleitung

---

Die höchsten FD-Faktoren ( $FD > 512$ ) erzielten Essigsäure, Buttersäure und 2-/3-Methylbuttersäure.

Quantitative Daten über aromaaktive Verbindungen in Gouda-Käse auf der Basis molekular-sensorischer Untersuchungen wurden bislang nicht veröffentlicht. So sind in diesem Zusammenhang auch keine Untersuchungen zum Einfluss der Reifungszeit und der Pasteurisierung der Milch auf die Entwicklung von Schlüsselaromastoffen in Käse nach Gouda-Art bekannt.

## 1.9 Zielsetzung

Da das Aroma von Gouda-Käse entscheidend zur Produktqualität und damit zur Akzeptanz beim Konsumenten beiträgt, ist es wichtig, dieses auf stofflicher Basis zu definieren. Die Kenntnis darüber, welche Aromastoffe entscheidend zum Gouda-Aroma beitragen (Schlüsselaromastoffe) und wie sich die Konzentrationen bei der Reifung verändern, ist aber in der Literatur sehr begrenzt. Auch der Einfluss einer Pasteurisierung der Milch auf die Aromabildung in Käse nach Gouda-Art, insbesondere auf die Entwicklung der Schlüsselaromastoffe, wurde bislang noch nicht systematisch untersucht.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, Schlüsselaromastoffe in einem definierten Käse nach Gouda-Art mit Techniken der molekularen Sensorik zu identifizieren und deren Bildung im Reifungsverlauf quantitativ zu messen. Durch vergleichende Untersuchungen an einem parallel hergestellten Gouda-Käse aus Rohmilch sollte der Einfluss der Pasteurisierung auf die Aromabildung gezielt aufgeklärt werden.

Als wichtige Vorstufe für Schlüsselaromastoffe in Käse wird L-Leucin diskutiert. Modellversuche mit stabilisotopenmarkierten Aromavorstufen unter realistischen Produktionsbedingungen sind allerdings noch nicht beschrieben.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines Reifungsmodells im Labormaßstab und die Verfolgung der Aromabildung aus den stabilisotopenmarkierten Aromavorstufen [ $^2\text{H}_3$ ]-2-Keto-4-methylpentansäure und [ $^{13}\text{C}_6$ ]-L-Leucin. Anhand quantitativer Daten für die daraus entstehenden, markierten Metabolite sollten Rückschlüsse auf deren Bildung gezogen werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Wichtige Aromastoffe in Käse nach Gouda-Art

Ausgangspunkt für die Untersuchungen war zunächst ein handelsüblicher mittelalter Gouda, der mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse analysiert wurde. Es folgten umfassende Untersuchungen an einem Gouda-Käse (G), der nach einem klassischen Schema aus pasteurisierter Milch (PM) unter definierten Bedingungen (Rohstoffe, Zutaten, Käserei-Parameter) hergestellt und 30 Wochen gereift wurde (PM-G-30W, vgl. **3.1.2**).

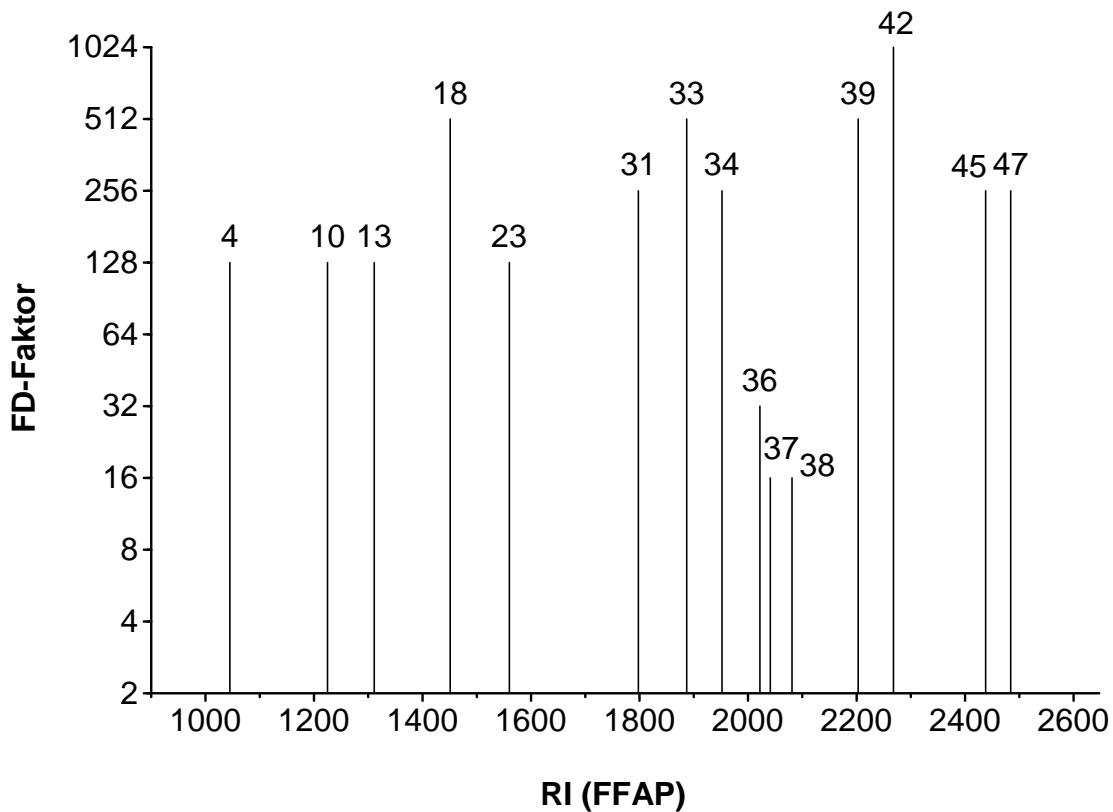
#### 2.1.1 Aromaextraktverdünnungsanalyse eines Handels-Goudas

Nach der Isolierung der Fraktion flüchtiger Verbindungen des Gouda-Käses wurden aromaaktive Substanzen definiert und nach ihrem Aromapotentiale olfaktorisch bewertet. Dieses Screening erfolgte anhand einer Aromaextraktverdünnungsanalyse.

Nach Kaltextraktion mit Diethylether und anschließendem Hochvakuumtransfer (SAFE-Methode, vgl. **3.4.1.2**) wurde das erhaltene Destillat flüchtiger Verbindungen zunächst in eine neutral-basische (NBF) und eine saure Fraktion (AF) aufgetrennt (vgl. **3.4.2**), um bei der folgenden Analyse mittels HRGC-O eine Überlagerung geruchsaktiver Bereiche zu vermeiden.

#### Neutral-basische Fraktion (NBF)

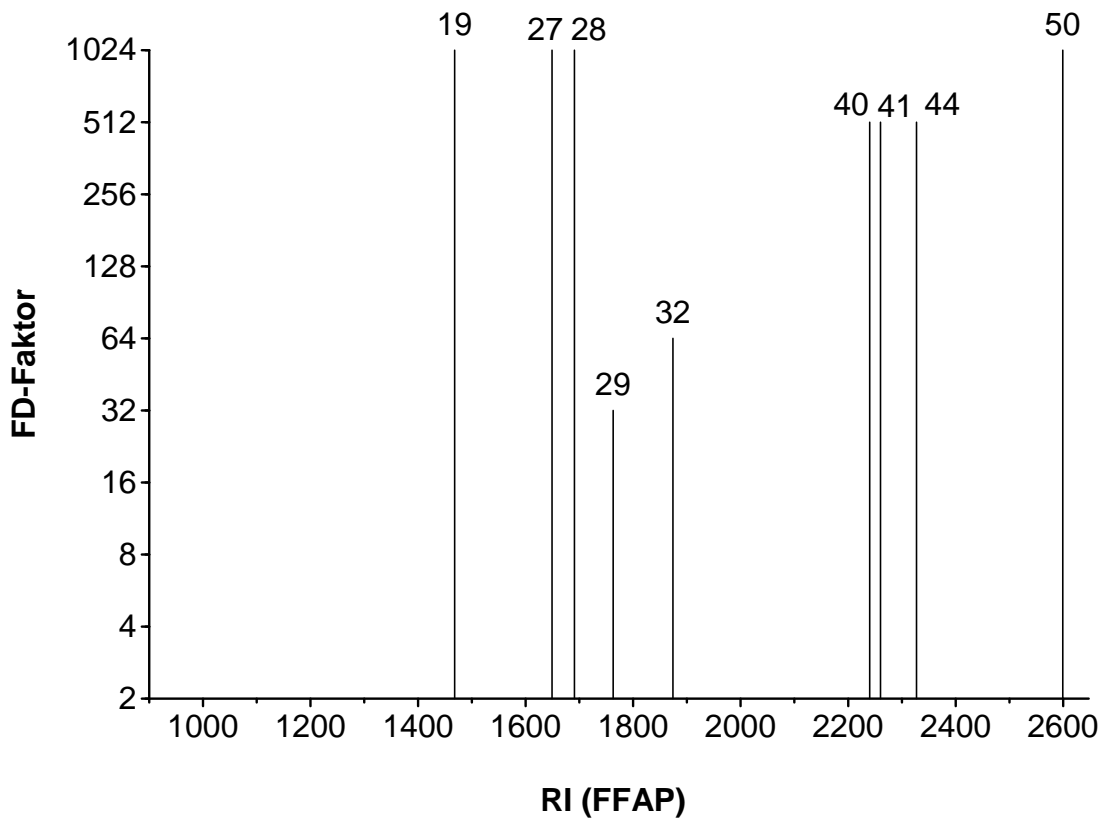
In der neutral-basischen Fraktion zeigten sich FD-Faktoren bis  $FD = 1024$ , welchen allein die Verbindung **42** (kokosnussartig) erzielte. Einen Faktor von  $FD = 512$  wiesen die Verbindungen **18** (grüne Paprika), **33** (rauchig, nelkenartig) und **39** (kokosnussartig) auf. Weitere Aromastoffe ( $FD = 256$ ) waren die Verbindung **31** (röstig, popcornartig), **34** (blumig), **45** und **47** (pfirsichartig), gefolgt von **4** (fruchtig), **10** (malzig), **13** (pilzartig) und **23** (grün, fettig) mit einem FD-Faktor von 128. Etwas geringere FD-Faktoren erzielten die Verbindungen **36** (kokosnussartig,  $FD = 32$ ), **37** (metallisch,  $FD = 16$ ) und **38** (pfirsichartig,  $FD = 16$ ). Ein FD-Chromatogramm hierzu zeigt **Abbildung 5**.



**Abbildung 5:** FD-Chromatogramm der neutral-basischen Fraktion ( $FD \geq 16$ ) eines Gouda-Käses aus dem Handel

### Saure Fraktion (AF)

In der sauren Fraktion erzielten die Verbindungen **19** (essigsauer), **27** (schweißig, ranzig), **28** (schweißig, käsig) und **50** (vanilleartig) den höchsten FD-Faktor mit  $FD = 1024$ , gefolgt von **40** (ziegenartig), **41** und **44** (würzig, maggiartig), die einen Faktor von  $FD = 512$  aufwiesen. Mit geringeren FD-Faktoren wurden die Verbindungen **32** (schweißig, ziegenartig,  $FD = 64$ ) und **29** (schweißig,  $FD = 32$ ) detektiert. Die folgende **Abbildung 6** zeigt das FD-Chromatogramm der sauren Fraktion.



**Abbildung 6:** FD-Chromatogramm der sauren Fraktion (FD  $\geq$  16) eines Gouda-Käses aus dem Handel

### Identifizierungsexperimente

Für die Identifizierung der geruchsaktiven Verbindungen dienten Destillate der flüchtigen Verbindungen (vgl. **3.4.1**) aus 300 g Käse. Dabei erfolgte zunächst ein Vergleich der Retentionsindices und Geruchsqualitäten der geruchsaktiven Bereiche mit den Daten einer hauseigenen Datenbank. Durch die Auswahl geeigneter Referenzverbindungen wurden die Vermutungen anhand von Geruchsqualität und Geruchsintensität bei der HRGC-O (vgl. **3.4.3**), Retentionsindices nach Kovats (vgl. **3.6.2**) auf drei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität (FFAP, OV-1701 und DB-5; vgl. **Tabelle 5**) und MS-Spektren durch MS-EI und MS-CI abgesichert. Siehe hierzu auch Abschnitt **2.1.2.2**.

Die Ergebnisse der Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) in Kombination mit den Identifizierungsexperimenten des Handels-Goudas sind in **Tabelle 6** zusammengefasst. Im Handels-Gouda konnten 32 Aromastoffe identifiziert und bewertet werden.

**Tabelle 6:** Wichtige Aromastoffe (FD  $\geq$  1) in gereiftem Gouda-Käse aus dem Handel

Nr. <sup>a)</sup>	Geruchsstoff <sup>b)</sup>	Geruchsqualität <sup>c)</sup>	Fraktion <sup>d)</sup>	RI <sup>e)</sup>		FD <sup>f)</sup>	
				FFAP	OV-1701		DB-5
1	3-Methylbutanal <sup>h)</sup>	malzig	NBF	931	733	661	1
3	2,3-Butandion <sup>h)</sup>	butterartig	NBF	995	700	588	1
4	Ethylbutanoat	fruchtig	NBF	1045	851	810	128
10	3-Methylbutanol	malzig	NBF	1225	848	730	128
11	Ethylhexanoat	fruchtig	NBF	1245	1058	994	1
13	1-Octen-3-on <sup>g)</sup>	pilzartig	NBF	1311	1069	983	128
18	2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazin <sup>g)</sup>	grüne Paprika	NBF	1451	1147	1101	512
19	Essigsäure	essigsauer	AF	1225	848	730	1024
21	(Z)-2-Nonenal	grün, fettig	NBF	1529	1253	1140	4
23	(E)-2-Nonenal	grün, fettig	NBF	1560	1276	1154	128
24	2-Methylpropansäure	schweißig, fruchtig	AF	1589	958	n.b. <sup>i)</sup>	8
25	(E,Z)-2,6-Nonadienal	gurkenartig	NBF	1600	1280	1150	8
27	Buttersäure	schweißig, ranzig	AF	1649	982	n.b. <sup>i)</sup>	1024
28	2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig, käsigt	AF	1691	1033	n.b. <sup>i)</sup>	1024
29	Pentansäure	schweißig	AF	1763	1079	n.b. <sup>i)</sup>	32
31	2-Acetyl-2-thiazolin <sup>g)</sup>	röstig, popcornartig	NBF	1798	1251	1112	256
32	Hexansäure	schweißig, ziegenartig	AF	1874	1173	n.b. <sup>i)</sup>	64
33	2-Methoxyphenol	rauchig, nelkenartig	NBF	1887	1231	1085	512
34	2-Phenylethanol	blumig	NBF	1952	1282	1051	256
35	$\gamma$ -Octalacton	kokosnussartig	NBF	1962	1472	1249	4

Fortsetzung **Tabelle 6:**

Nr. <sup>a)</sup>	Geruchsstoff <sup>b)</sup>	Geruchsqualität <sup>c)</sup>	Fraktion <sup>d)</sup>			FD <sup>f)</sup>
			FFAP	OV-1701	DB-5	
36	$\delta$ -Octalacton	kokosnussartig	NBF	1514	1283	32
37	trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal <sup>g)</sup>	metallisch	NBF	1547	1375	16
38	$\gamma$ -Nonalacton	pfirsichartig	NBF	1586	1366	16
39	$\gamma$ -Decalacton	pfirsichartig	NBF	1695	1467	512
40	4-Ethyl-octansäure	ziegenartig	AF	1439	n.b. <sup>h)</sup>	512
41	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon <sup>g)</sup>	würzig, maggiartig	AF	1357	1108	512
42	$\delta$ -Decalacton	kokosnussartig	NBF	1739	1491	1024
44	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon <sup>g)</sup>	würzig, maggiartig	AF	1435	1196	512
45	$\gamma$ -Dodecalacton	pfirsichartig	NBF	1914	1676	256
47	$\delta$ -Dodecalacton	pfirsichartig	NBF	1948	1710	256
49	Phenyllessigsäure	honigartig	AF	1496	1283	4
50	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	vanilleartig	AF	1648	1391	1024



### Legende zu **Tabelle 6**:

- a) Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Aromastoffe wurden entsprechend der Elutionsreihenfolge auf der FFAP-Kapillarsäule durchnummeriert
- b) Die Identifizierung der Aromastoffe erfolgt durch Vergleich mit Referenzsubstanzen auf der Basis folgender Kriterien: Geruchsqualität, Geruchsintensität und RI-Werte auf drei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität (FFAP, OV-1701, DB-5), MS-Spektren (EI/CI-Modus).
- c) Geruchsqualität des Aromastoffs am Sniffing-Port während der HRGC-O
- d) Fraktion, die den Hauptteil des Aromastoffs enthielt: AF = saure Fraktion, NBF = neutral-basische Fraktion
- e) Linearer Retentionsindex (RI) nach Kovats (vgl. **3.6.2**) auf den angegebenen Kapillarsäulen
- f) FD = FD-Faktor: Flavour Dilution-Faktor (vgl. **1.2.2.1**)
- g) Die MS-Signale waren für eine eindeutige Identifizierung zu schwach. Die Identifizierung erfolgte anhand der übrigen unter b) genannten Kriterien.
- h) Die MS-Spektren wurden im Laufe der Quantifizierung erhalten.
- i) n.b. = nicht bestimmt

### 2.1.2 Schlüsselaromastoffe in 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch

#### 2.1.2.1 Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

In Analogie zum untersuchten Handels-Gouda (vgl. 2.1.1) wurde anhand des aus pasteurisierter Milch definiert hergestellten, 30 Wochen gereiften Gouda (PM-G-30W) nach Isolierung der flüchtigen Fraktion mittels SAFE-Methode und Auftrennung in eine neutral-basische (NBF) und eine saure Fraktion (AF) eine Aromaextraktverdünnungsanalyse mittels HRGC-O durchgeführt.

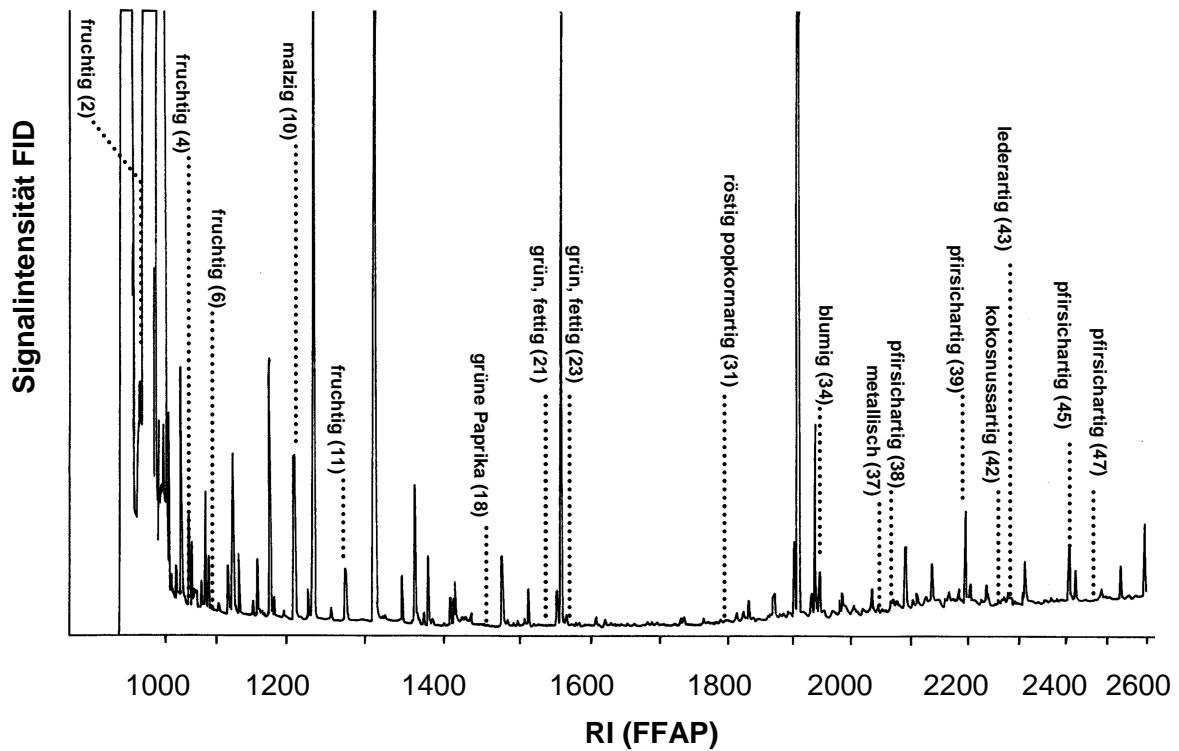
#### Neutral-basische Fraktion (NBF)

Die unverdünnte neutral-basische Fraktion zeigte im Gaschromatogramm verschieden starke Signalintensitäten am FID-Detektor. Gleichzeitig waren dabei im Bereich RI = 800 - 2600 verschiedenste Geruchsqualitäten wahrnehmbar, insbesondere malzige (**1, 10**), fuchtige (**2, 4, 6, 11**) und butterartige (**3**) Noten, über fettige und gurkenartige Noten (**21, 23**), bis hin zu kokosnuss- und pfirsichartigen Noten (**38, 39, 42, 45, 47**).

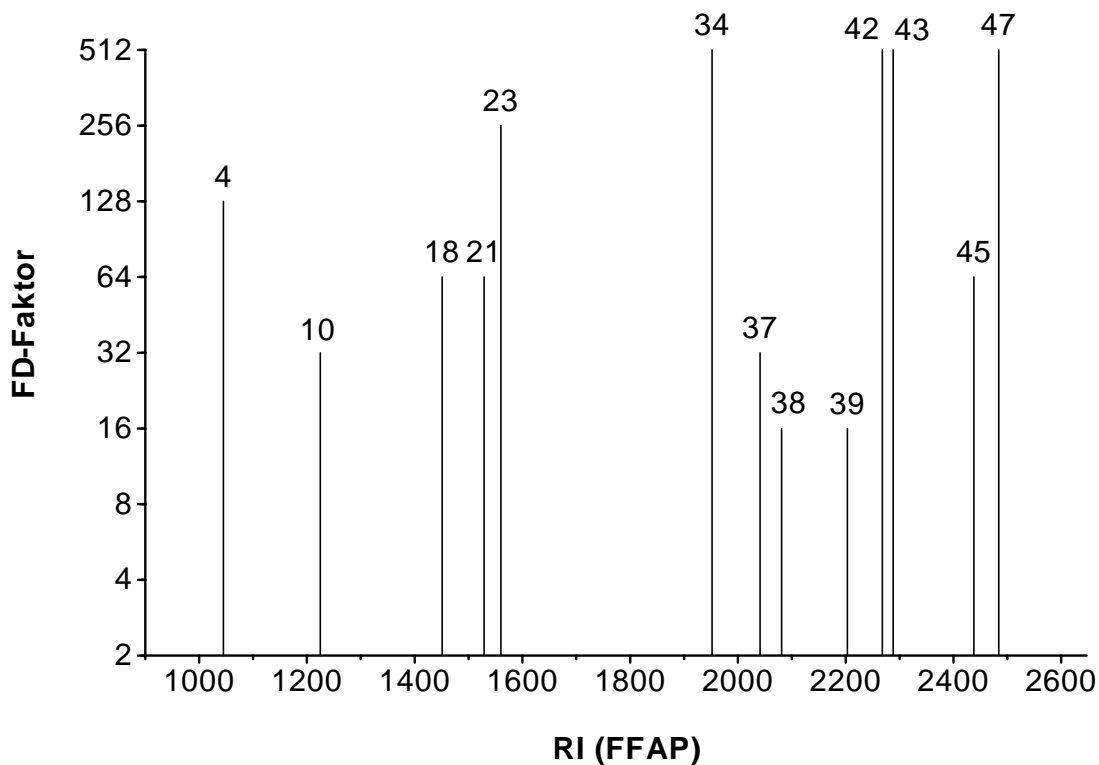
In der NBF wird deutlich, dass ein hohes FID-Signal nicht gleichbedeutend war mit einer hohen Geruchsintensität, ausgedrückt als FD-Faktor. So waren in den Bereichen der Verbindungen **42, 43** und **47** keine deutlichen Peaks erkennbar. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Geruchsschwellen der zugehörigen Verbindungen in der Luft niedriger liegen als die Detektionsschwelle des FID in der vorgenommenen Einstellung. Bei Verbindung **10** (malzig), die hingegen eine höhere Geruchsschwelle besitzt, zeigt sich zur olfaktorischen Detektion auch ein deutliches FID-Signal (**Abbildung 7**).

Die NBF zeigte bei der Aromaextraktverdünnungsanalyse insgesamt FD-Faktoren von bis zu  $FD = 512$ , der von den Verbindungen **34** (blumig), **42** (kokosnussartig), **43** (lederartig) und **47** (pfirsichartig) erreicht wurde. Mit  $FD = 256$  wurde die Verbindung **23** (grün, fettig) und mit  $FD = 128$  die Verbindung **4** (fruchtig) wahrgenommen. Die Verbindungen **18** (grüne Paprika), **21** (grün, fettig) und **45** (pfirsichartig) zeigten noch einen FD-Faktor von  $FD = 64$ . Geringere FD-Faktoren wiesen die Verbindungen **10** (malzig) und **37** (metallisch) auf ( $FD$ -Faktor 32), gefolgt von den Verbindungen **38** und **39** (pfirsichartig) mit  $FD = 16$ .

Das  $FD$ -Chromatogramm ( $FD \geq 16$ ) für die geruchsaktiven Bereiche der neutral-basischen Fraktion ist in **Abbildung 8** dargestellt.



**Abbildung 7:** Gaschromatogramm der unverdünnten neutral-basischen Fraktion des Gouda-Käses aus pasteurisierter Milch, 30 Wochen gereift



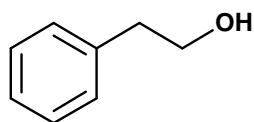
**Abbildung 8:** FD-Chromatogramm der neutral-basischen Fraktion (FD  $\geq$  16) des Gouda-Käses aus pasteurisierter Milch, 30 Wochen gereift

## 2 Ergebnisse und Diskussion

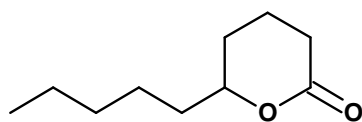
### Identifizierungsexperimente in der NBF

Analog zu den Untersuchungen des Handels-Goudas (vgl. 2.1.1) erfolgte die Identifizierung der geruchsaktiven Verbindungen durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen anhand der Kriterien Geruchsqualität und Geruchsintensität bei der HRGC-O (vgl. 3.4.3), Retentionsindices nach Kovats (vgl. 3.6.2) auf drei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität (FFAP, OV-1701 und DB-5; vgl. Tabelle 5) und MS-Spektren durch MS-EI und MS-CI.

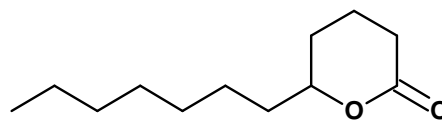
Mit einem FD-Faktor von 512 wurden in der NBF die drei Verbindungen mit den höchsten FD-Faktoren als 2-Phenylethanol (34),  $\delta$ -Decalacton (42) und  $\delta$ -Dodecalacton (47) eindeutig identifiziert.



2-Phenylethanol (34)

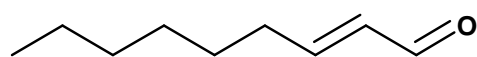


$\delta$ -Decalacton (42)

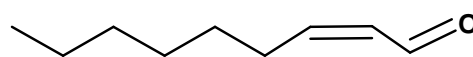


$\delta$ -Dodecalacton (47)

Die grün und fettig riechenden Verbindungen Nr. 23 (FD 256) und 21 (FD 64) zeigten erst nach Anreicherung mittels TDGC-MS (vgl. 3.6.3, 3.7.4) eindeutige Massenspektren und wurden als (E)-2-Nonenal und (Z)-2-Nonenal identifiziert.

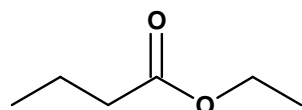


(E)-2-Nonenal (23)

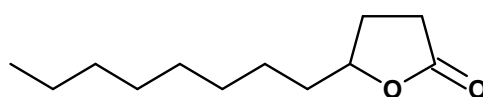


(Z)-2-Nonenal (21)

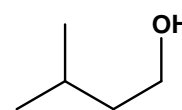
Weiterhin zeigten die Identifizierungsversuche in der NBF die Verbindungen Ethylbutanoat (4, FD 128),  $\gamma$ -Dodecalacton (45, FD 64), 3-Methylbutanol (10, FD 32),  $\gamma$ -Nonalacton (38, FD 32) und  $\gamma$ -Decalacton (39, FD 32).



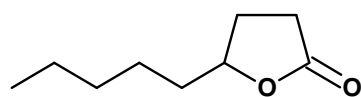
Ethylbutanoat (4)



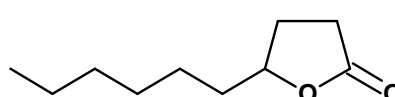
$\gamma$ -Dodecalacton (45)



3-Methylbutanol (10)

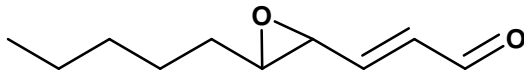


$\gamma$ -Nonalacton (38)

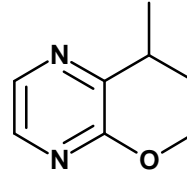


$\gamma$ -Decalacton (39)

Für die Verbindung Nr. **18** (FD 64) und Nr. **37** (FD 32) konnten weder bei der HRGC-MS noch bei der TDGC-MS nach Anreicherung aussagekräftige Massenspektren erhalten werden. Aufgrund der charakteristischen Geruchsqualitäten und Geruchsintensitäten sowie der RI-Werte auf drei verschiedenen Kapillarsäulen musste es sich bei den Verbindungen Nr. **18** und **37** jedoch um die Verbindungen trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal und 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin handeln.



trans-4,5-Epoxy-2-(E)-Decenal ( **37** )



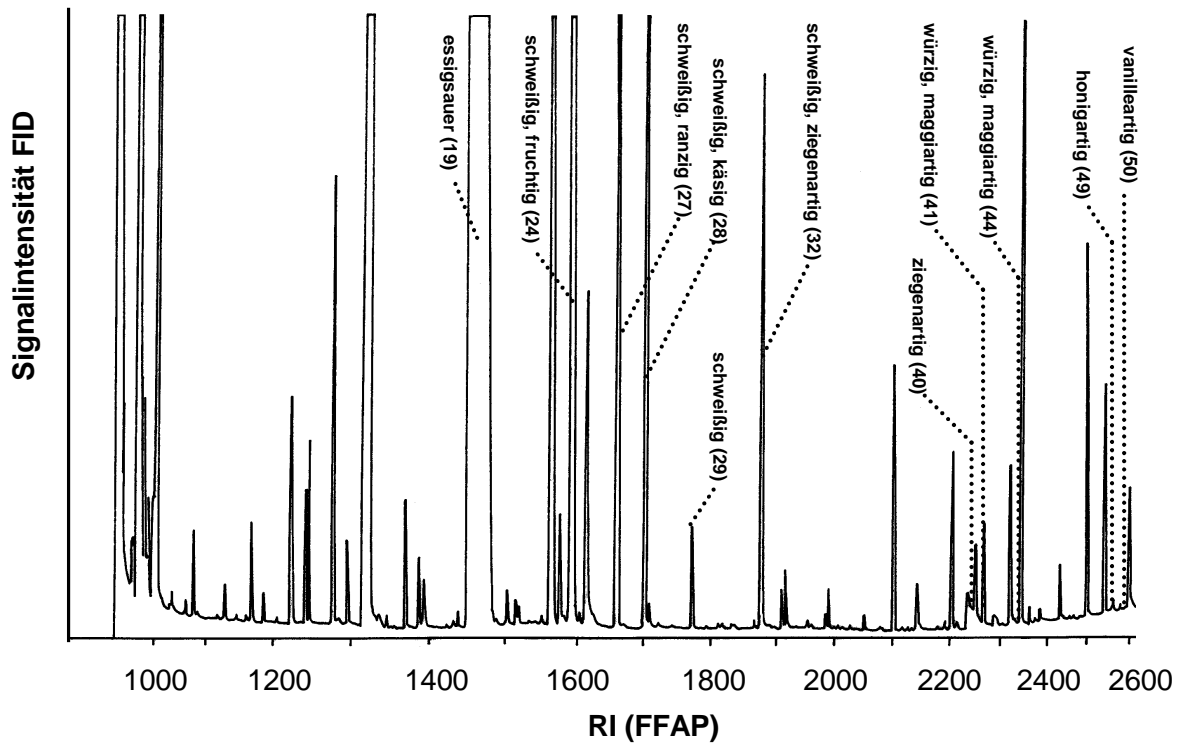
2-Isopropyl-3-methoxypyrazin ( **18** )

### Saure Fraktion (AF)

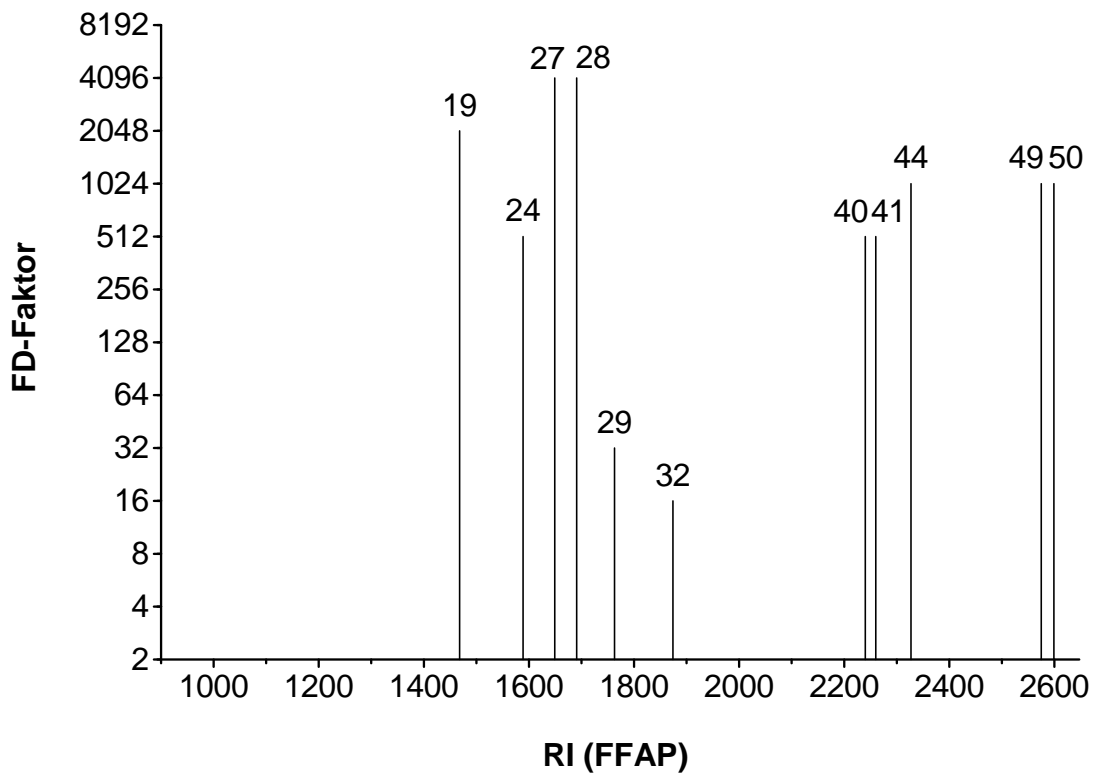
Im Gaschromatogramm der unverdünnten sauren Fraktion (**Abbildung 9**) zeigten sich erst ab einem RI von ca. 1450 geruchsaktive Bereiche. Vorherrschend in der sauren Fraktion waren im Bereich RI = 1450 - 1900 dabei saure und schweißige Geruchsqualitäten, wie essigsauer (**19**), schweißig-fruchtig (**24**), schweißig-ranzig (**27**), schweißig-käsigt (**28**), schweißig (**29**) und schweißig-ziegenartig (**32**). Hohe Geruchsintensitäten waren dabei immer gepaart mit deutlichen FID-Signalen im Gaschromatogramm, wie **Abbildung 9** verdeutlicht. Im Bereich RI = 2200 - 2600 wurden die intensiven Geruchsnoten ziegenartig (**40**) und würzig-maggiartig (**41**, **44**) sowie honigartig (**49**) und vanilleartig (**50**) wahrgenommen. Diesen geruchsintensiven Bereichen konnten nur sehr geringe FID-Signale zugeordnet werden.

In der sauren Fraktion zeigten sich bei der Aromaextraktverdünnungsanalyse FD-Faktoren von bis zu FD = 4096, den die Verbindungen **27** (schweißig, ranzig) und **28** (schweißig, käsigt) erreichten, gefolgt von Verbindung **19** (essigsauer) mit einem FD-Faktor von 2048. Die Verbindungen **44** (würzig, maggiartig), **49** (honigartig) und **50** (vanilleartig) konnten bis zur Verdünnung mit dem FD-Faktor 1024 wahrgenommen werden. Einen FD-Faktor von FD = 512 zeigten die Verbindungen **24** (schweißig, fruchtig), **40** (ziegenartig) und **41** (würzig, maggiartig). Geringe FD-Faktoren in der sauren Fraktion erzielten die Verbindungen **29** (schweißig; FD = 32) und **32** (schweißig, ziegenartig; FD = 16). **Abbildung 10** zeigt das FD-Chromatogramm (FD  $\geq$  16) für die geruchsaktiven Bereiche der sauren Fraktion.

## 2 Ergebnisse und Diskussion



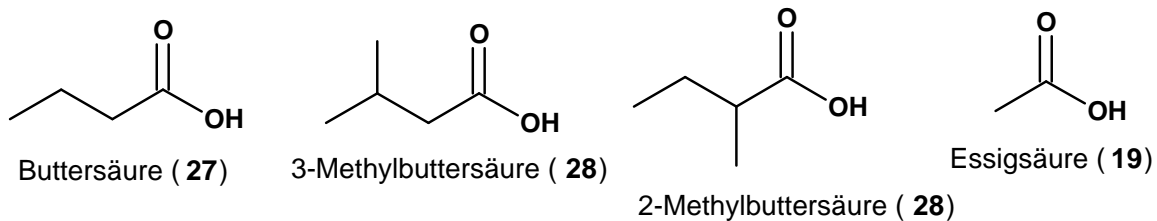
**Abbildung 9:** Gaschromatogramm der unverdünnten sauren Fraktion des Gouda-Käses aus pasteurisierter Milch, 30 Wochen gereift



**Abbildung 10:** FD-Chromatogramm der sauren Fraktion ( $FD \geq 16$ ) des Gouda-Käses aus pasteurisierter Milch, 30 Wochen gereift

### Identifizierungsexperimente in der AF

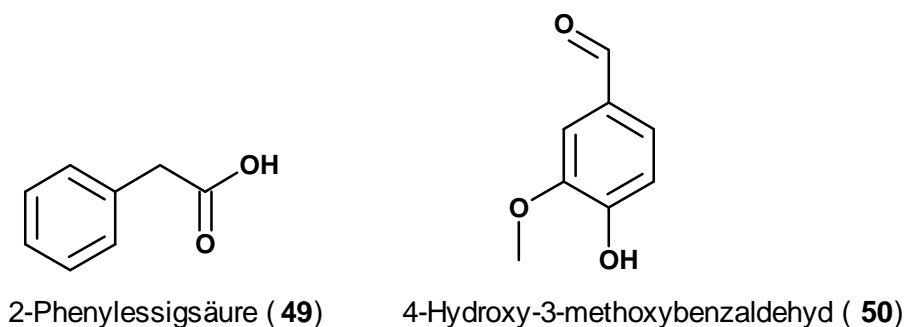
In der sauren Fraktion (AF) gelang es, die Verbindungen Nr. **27** und **28** sowie Verbindung Nr. **19** aufgrund ihrer hohen Signalintensität leicht zu identifizieren (vgl. **Abbildung 9**). Diese Peaks wurden Buttersäure (FD 4096), 2/3-Methylbuttersäure (FD 4096) und Essigsäure (FD 2048) zugeordnet.



Der Peak Nr. **28** zeigte bei der HRGC-MS (MS-EI) ein typisches Mischspektrum der Stellungsisomere 2- und 3-Methylbuttersäure. Eine Differenzierung der beiden Verbindungen erfolgte anhand der typischen Massenfragmente  $m/z = 60$  (3-Methylbuttersäure) und  $m/z = 74$  (2-Methylbuttersäure), die jeweils aus einer **McLafferty-Umlagerung** abgeleitet werden können (**Abbildung 11**). Sie stellt eine  $\beta$ -Spaltung mit  $\gamma$ -H-Verschiebung dar.

Der Anteil der Verbindungen 2- und 3-Methylbuttersäure wurde nach **2.1.1.3** bestimmt.

Weiterhin gelang es, in der sauren Fraktion mit  $FD = 1024$  die Verbindungen Phenylessigsäure (**49**) und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (**50**) zu identifizieren.



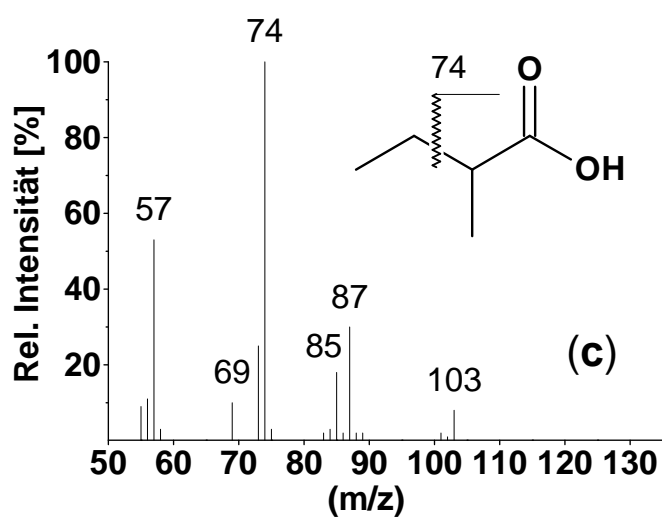
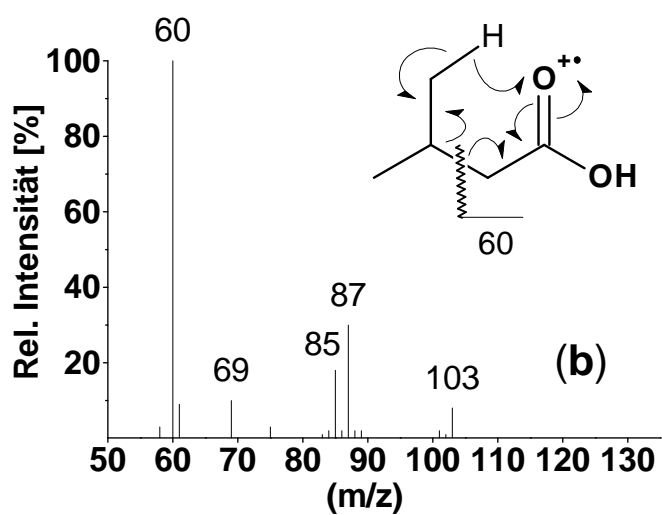
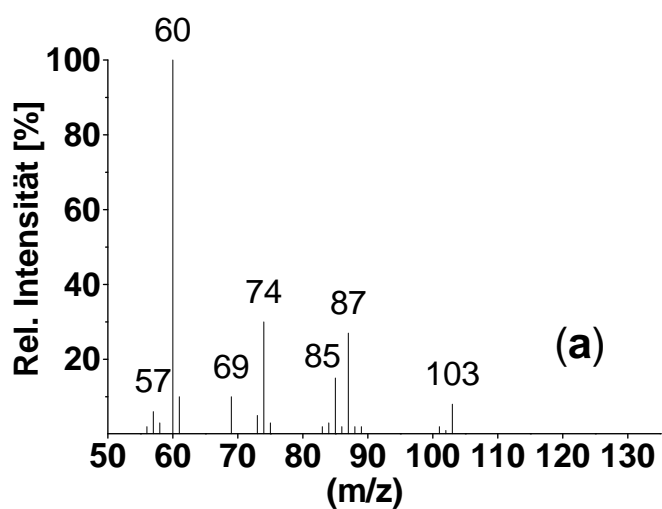
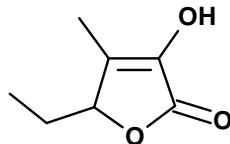


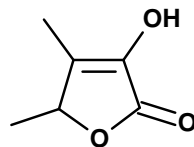
Abbildung 11: Massenspektren (MS-EI) von Verbindung **28** (a) sowie von 3-Methylbuttersäure (b) und 2-Methylbuttersäure (c)



Die Verbindungen **44** (FD 1024) und **41** (FD 512) lieferten weder bei der HRGC-MS noch bei der TDGC-MS nach Anreicherung aussagekräftige Massenspektren. Aufgrund der charakteristischen Geruchsqualitäten und Geruchsintensitäten sowie der RI-Werte auf drei verschiedenen Kapillarsäulen muss es sich um die würzig, maggiartig riechenden Verbindungen 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (**41**; Sotolon) und 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon (**44**; Abhexon) handeln.



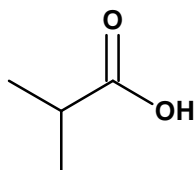
5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon (**44**)



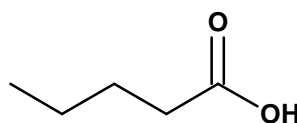
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (**41**)

Die Verbindung Nr. **40** zeigte eine intensive, ziegenartige Geruchsqualität mit einem FD-Faktor von 512. Bei der HRGC-MS konnte zunächst kein aussagekräftiges Massenspektrum erhalten werden. Nach Anreicherung mittels TDGC-MS wurde die Verbindung letztlich anhand von Massenspektren durch MS-EI und MS-CI als 4-Ethyl-octansäure identifiziert (**Abbildung 12**).

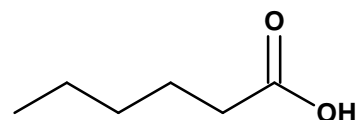
Aufgrund der für die Säuren in der AF typischen hohen Signalintensitäten gelang es auch die Verbindungen Nr. **24**, **29** und **32** leicht zu identifizieren (vgl. **Abbildung 9**). Diese Peaks wurden 2-Methylpropansäure (FD 512), Pentansäure (FD 32) und Hexansäure (FD 16) zugeordnet.



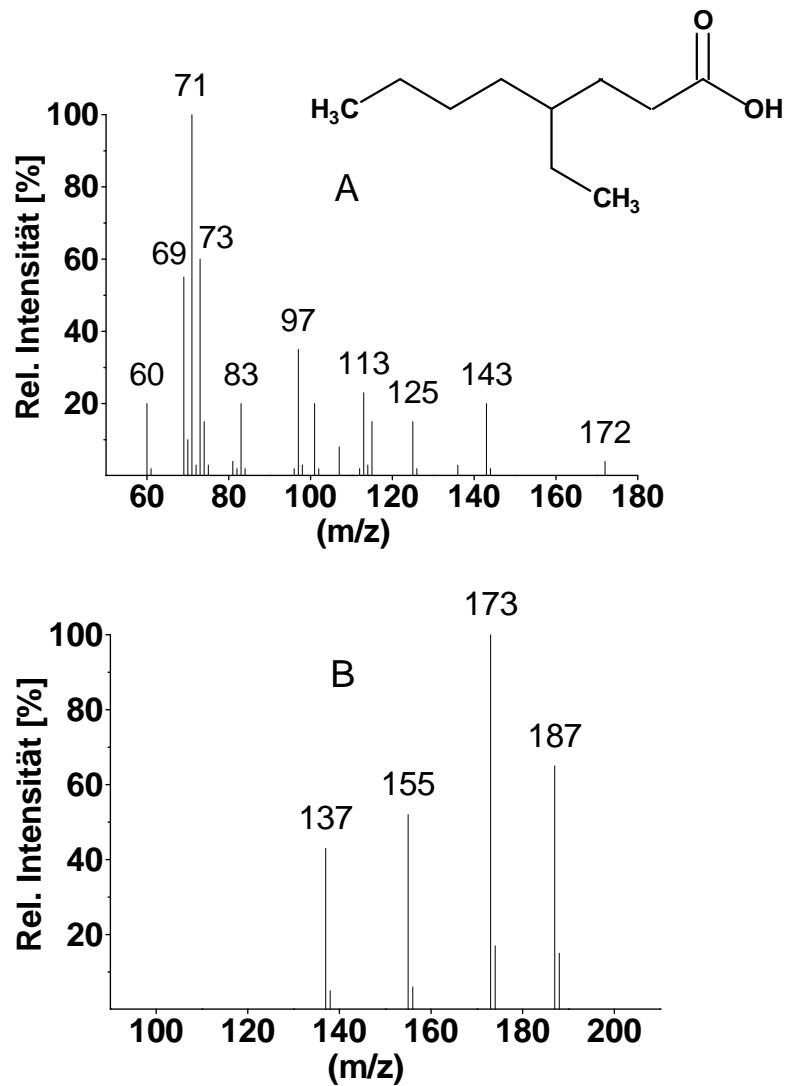
2-Methylpropansäure (**24**)



Pentansäure (**29**)



Hexansäure (**32**)



**Abbildung 12:** Massenspektren von 4-Ethyl-octansäure (A: MS-EI; B: MS-CI)

Die Ergebnisse der Identifizierungsexperimente in Käse nach Gouda-Art aus pasteurisierter Milch nach 30 Wochen Reifung (PM-G-30W) sind in **Tabelle 7** zusammengefasst. Von 39 geruchsaktiven Verbindungen wurden 38 nach den in der Legende zu **Tabelle 7** genannten Kriterien identifiziert.

**Tabelle 7:** Wichtige Aromastoffe (FD≥ 1) in 30 Wochen gereiftem Käse nach GoudaArt aus pasteurisierter Milch (PMG-30W)

Nr. <sup>a)</sup>	Geruchsstoff <sup>b)</sup>	Geruchsqualität <sup>c)</sup>	Fraktion <sup>d)</sup>	RI <sup>e)</sup>		FD <sup>f)</sup>	Lit. <sup>k)</sup>	
				FFAP	OV-1701			DB-5
1	3-Methylbutanal <sup>h)</sup>	malzig	NBF	931	733	661	2	2
2	Ethyl-2-methylpropanoat	fruchtig	NBF	976	815	762	4	-
3	2,3-Butandion <sup>h)</sup>	butterartig	NBF	995	700	588	1	2
4	Ethylbutanoat	fruchtig	NBF	1045	851	810	128	2
5	Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig	NBF	1062	907	849	4	-
6	Ethyl-3-methylbutanoat	fruchtig	NBF	1079	912	858	1	-
10	3-Methylbutanol	malzig	NBF	1225	848	730	32	2
11	Ethylhexanoat	fruchtig	NBF	1245	1058	994	1	2
13	1-Octen-3-on <sup>e)</sup>	pilzartig	NBF	1311	1069	983	2	-
17	Ethyl-octanoat	fruchtig	NBF	1438	1265	1204	2	-
18	2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazin <sup>e)</sup>	grüne Paprika	NBF	1451	1147	1101	64	-
19	Essigsäure	essigsauer	AF	1468	784	n.b. <sup>l)</sup>	2048	1
21	(Z)-2-Nonenal	grün, fettig	NBF	1529	1253	1140	64	-
22	Propionsäure	stechend, sauer	AF	1561	893	n.b. <sup>l)</sup>	4	4
23	(E)-2-Nonenal	grün, fettig	NBF	1560	1276	1154	256	-
24	2-Methylpropansäure	schweißig, fruchtig	AF	1589	958	n.b. <sup>l)</sup>	512	5
25	(E,Z)-2,6-Nonadienal	gurkenartig	NBF	1600	1280	1150	2	-
27	Buttersäure	schweißig, ranzig	AF	1649	982	n.b. <sup>l)</sup>	4096	1
28	2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig, käsig	AF	1691	1033	n.b. <sup>l)</sup>	4096	4
29	Pentansäure	schweißig	AF	1763	1079	n.b. <sup>l)</sup>	32	5

Fortsetzung von Tabelle 7:

Nr. <sup>a)</sup>	Geruchsstoff <sup>b)</sup>	Geruchsqualität <sup>c)</sup>	Fraktion <sup>d)</sup>	RI <sup>e)</sup>		FD <sup>f)</sup>	Lit. <sup>g)</sup>
				FFAP	OV-1701		
31	2-Acetyl-2-thiazolin <sup>g)</sup>	röstig, popcornartig	NBF	1798	1251	1112	4
32	Hexansäure	schweißig, ziegenartig	AF	1874	1173	n.b. <sup>h)</sup>	16
33	2-Methoxyphenol	rauchig, nelkenartig	NBF	1887	1231	1085	4
34	2-Phenylethanol	blumig	NBF	1952	1282	1051	5
35	$\gamma$ -Octalacton	kokosnussartig	NBF	1962	1472	1249	4
36	$\delta$ -Octalacton	kokosnussartig	NBF	2022	1514	1283	4
37	trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal <sup>g)</sup>	metallisch	NBF	2041	1547	1375	32
38	$\gamma$ -Nonalacton	pfirsichartig	NBF	2081	1586	1366	16
39	$\gamma$ -Decalacton	pfirsichartig	NBF	2203	1695	1467	16
40	4-Ethyl-octansäure	ziegenartig	AF	2240	1439	n.b. <sup>h)</sup>	512
41	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon <sup>g)</sup>	würzig, maggiartig	AF	2260	1357	1108	512
42	$\delta$ -Decalacton	kokosnussartig	NBF	2268	1739	1491	512
43	Unbekannt	lederartig	NBF	2288	1567	n.b. <sup>h)</sup>	512
44	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon <sup>g)</sup>	würzig, maggiartig	AF	2327	1435	1196	1024
45	$\gamma$ -Dodecalacton	pfirsichartig	NBF	2438	1914	1676	64
46	(Z)-6-Dodecen- $\gamma$ -lacton	pfirsichartig	NBF	2453	1895	1657	8
47	$\delta$ -Dodecalacton	pfirsichartig	NBF	2484	1948	1710	512
49	Phenyllessigsäure	honigartig	AF	2575	1496	1283	1024
50	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	vanilleartig	AF	2599	1648	1391	1024

### Legende zu **Tabelle 5**:

- j) Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Aromastoffe wurden entsprechend der Elutionsreihenfolge auf der FFAP-Kapillarsäule durchnummeriert.
- k) Die Identifizierung der Aromastoffe erfolgt durch Vergleich mit Referenzsubstanzen auf der Basis folgender Kriterien: Geruchsqualität, Geruchsintensität und RI-Werte auf drei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität (FFAP, OV-1701, DB-5), MS-Spektren (EI/CI-Modus).
- l) Geruchsqualität des Aromastoffs am Sniffing-Port während der HRGC-O
- m) Fraktion, die den Hauptteil des Aromastoffs enthielt: AF = saure Fraktion, NBF = neutral-basische Fraktion
- n) Linearer Retentionsindex (RI) nach Kovats (vgl. **3.6.2**) auf den angegebenen Kapillarsäulen
- o) FD = FD-Faktor: Flavour Dilution-Faktor (vgl. **1.2.2.1**)
- p) Die MS-Signale waren für eine eindeutige Identifizierung zu schwach. Die Identifizierung erfolgte anhand der übrigen unter b) genannten Kriterien.
- q) Die MS-Spektren wurden im Laufe der Quantifizierung erhalten.
- r) n.b. = nicht bestimmt
- k) Literaturstelle der Erstnennung der Verbindung in Gouda-Käse: 1 = *Iyer et al., 1967*; 2 = *Neeter et al., 1996*, 3 = *Engels et al., 1997*; 4 = *Dirinck und de Winne, 1999*; 5 = *Alewijn et al., 2003*; 6 = *Van Leuven et al., 2008*

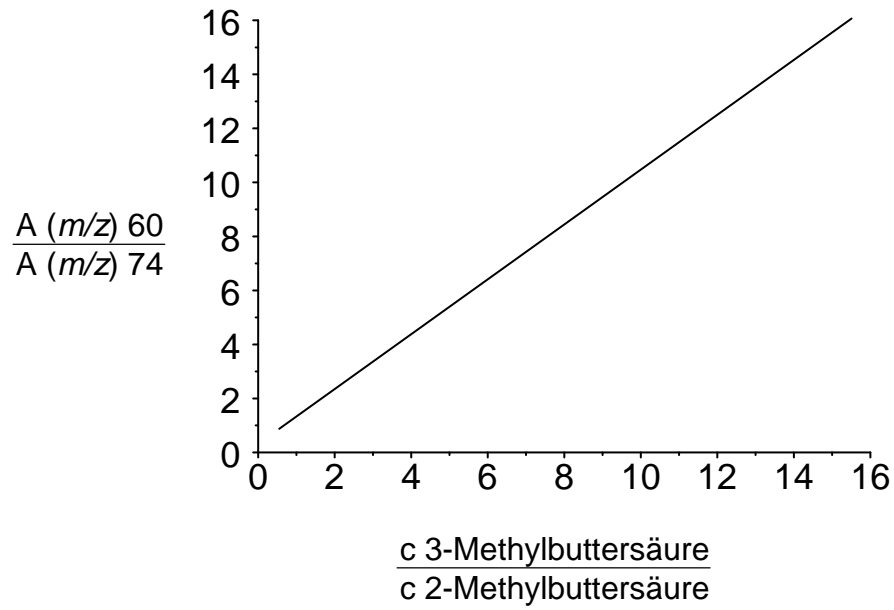
### 2.1.2.2 Quantifizierung ausgewählter Verbindungen mittels SIVA

Um den Beitrag einzelner Aromastoffe zum Gesamtaroma beurteilen zu können, war es notwendig, ihre Konzentration im Käse zu ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 13 Verbindungen, die bei der AEVA mit hohen FD-Faktoren bewertet wurden und als typische Käsearomastoffe beschrieben sind, für die Quantifizierung ausgewählt.

Zusätzlich wurden die leichtflüchtigen Aromastoffe 3-Methylbutanal (**1**) und 2,3-Butandion (**3**) als relevant eingestuft, die beim Screening mittels AEVA aufgrund ihrer Flüchtigkeit nicht vollständig erfasst werden konnten. Für spätere Bewertungen bzgl. des Einflusses der Milchpasteurisierung auf Aromastoffkonzentrationen (vgl. **2.1.3.4**) wurde außerdem Ethylhexanoat (**11**) in die quantitativen Bestimmungen einbezogen.

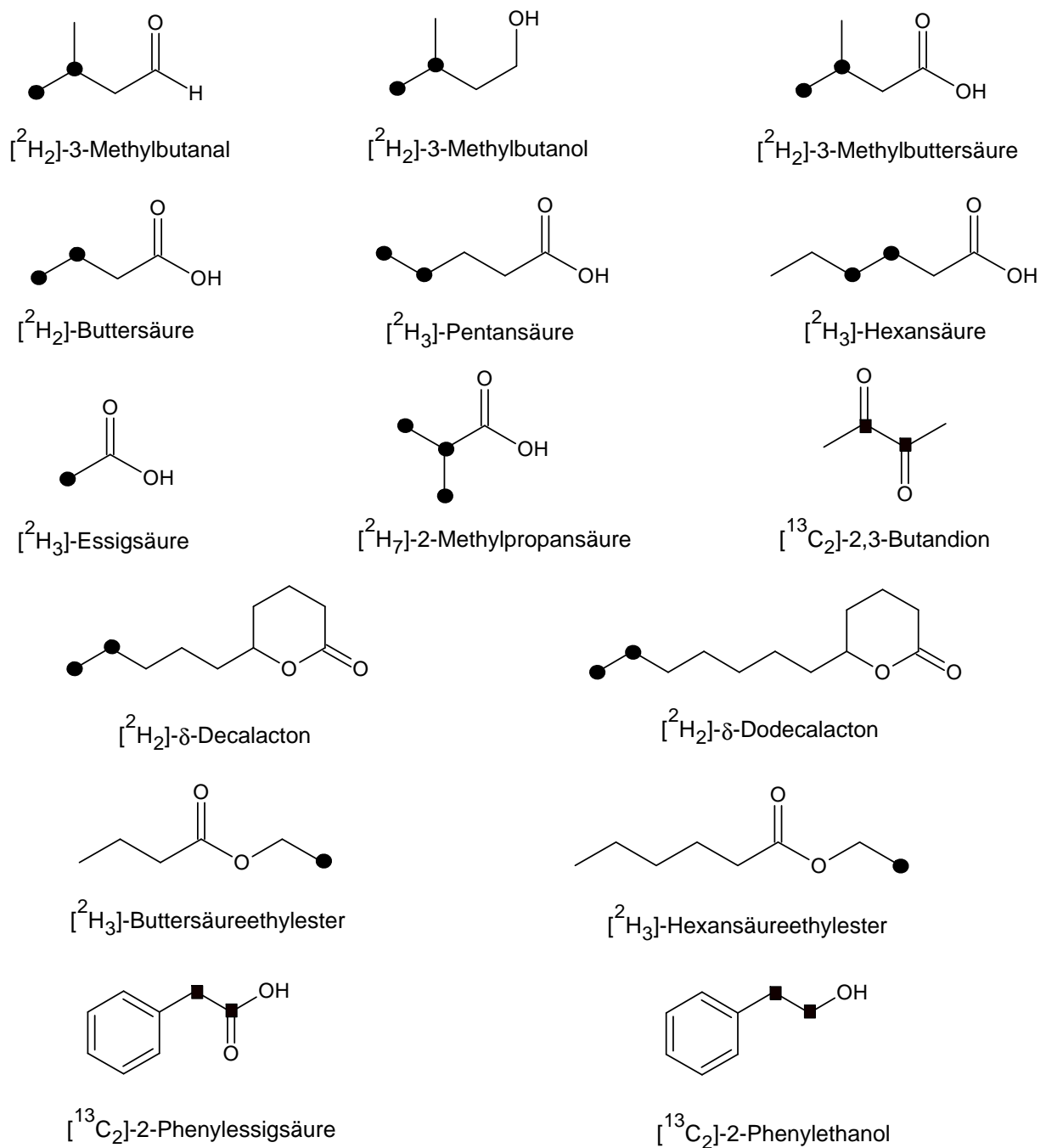
Zur Quantifizierung der ausgewählten Aromastoffe wurden Stabilisotopenverdünnungssassays (SIVA, vgl. **3.5**) mit den in **Abbildung 14** dargestellten stabilisotopenmarkierten Verbindungen als interne Standards durchgeführt.

Die auf einer FFAP-Säule nicht trennbaren Isomere 2- und 3-Methylbuttersäure wurden zunächst als Summe mit [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Methylbuttersäure als internem Standard quantifiziert. Die Bestimmung der Isomerenanteile in der Probe erfolgte dann durch Messung der Extrakte bei der HRGC-MS durch MS-EI, die ein Verhältnis der Fragmente  $m/z = 60$  (3-Methylbuttersäure) und  $m/z = 74$  (2-Methylbuttersäure) lieferte. Zur korrekten Differenzierung der Säuren wurden fünf Mischungen von 2- und 3-Methylbuttersäure unter denselben Bedingungen vermessen. Die resultierende Kalibriergerade ist in **Abbildung 13** dargestellt. Dabei ist das Flächenverhältnis (A) von  $m/z = 60$  (3-Methylbuttersäure) /  $m/z = 74$  (2-Methylbuttersäure) gegen das Konzentrationsverhältnis (c) von 2-Methylbuttersäure / 3-Methylbuttersäure aufgetragen. Die Berechnung erfolgte nach **3.5.5**.



**Abbildung 13:** Kalibriergerade zur Differenzierung von 2- und 3-Methylbuttersäure mittels charakteristischer Massenfragmente bei der Massenspektrometrie (Flächenverhältnisse A gegen Konzentrationsverhältnisse c)

## 2 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 14:** Strukturen der 15 in dieser Arbeit verwendeten stabilisotopenmarkierten Verbindungen (vgl. 3.2.2, ● Position der  $[^2\text{H}]$ -Markierung, ■ Position der  $[^{13}\text{C}]$ -Markierung)



### 2.1.2.3 Ergebnisse der Quantifizierungen

Für die quantitativen Bestimmungen wurden 5 - 50 g Gouda-Käse eingesetzt, eine definierte Menge an internem Standard zugesetzt und, wie unter 3.4.1 - 3.4.2 beschrieben, aufgearbeitet. Die Einwaage richtete sich nach der zu erwartenden Analyt-Konzentration und wurde in Vorversuchen ermittelt. Das GC-Eluat wurde je nach Substanzmenge und Substanzeigenschaften der Massenspektrometrie in verschiedenen Systemen zugeführt.

Essigsäure, 2-Methylpropansäure, Buttersäure, 2- und 3-Methylbuttersäure, Pentansäure und Hexansäure konnten direkt aus der sauren Fraktion mittels eindimensionaler HRGC-MS bestimmt werden. Die anderen Aromastoffe wurden aus der neutral-basischen Fraktion per TDGC-MS (vgl. 3.6.3, 3.7.5) bestimmt. 2,3-Butandion (Diacetyl) wurde aus dem Gasraum über der Probe mittels statischer Headspace-TDGC-MS mit Hilfe der SPME isoliert und quantifiziert (vgl. 3.6.4, 3.7.5).

**Tabelle 8** zeigt die Ergebnisse aus Doppelbestimmungen der Konzentrationen der 16 ausgewählten Aromastoffe in 30 Wochen gereiftem Käse nach Gouda-Art, der aus pasteurisierter Milch hergestellt wurde (PM-G-30W).

Die höchsten Konzentrationen erreichten dabei die Säuren, die mit ca. 3,9 bis 898 mg/kg bestimmt wurden (ausgenommen Pentansäure). Neben den Lactonen  $\delta$ -Decalacton und  $\delta$ -Dodecalacton (ca. 1,6 - 2,4 mg/kg) lagen noch Phenylelessigsäure und 2,3-Butandion im mg/kg-Bereich (je ca. 1,3 mg/kg). In etwas geringerer Konzentration lagen Pentansäure (390  $\mu$ g/kg), 2-Phenylethanol (217  $\mu$ g/kg) und 3-Methylbutanol (171  $\mu$ g/kg) sowie 3-Methylbutanal (ca. 91  $\mu$ g/kg) vor. In den geringsten Konzentrationen wurden im Gouda-Käse Ethylbutanoat (35  $\mu$ g/kg) und Ethylhexanoat (16  $\mu$ g/kg) gemessen.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 8:** Konzentrationen von 16 ausgewählten Aromastoffen in 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W)

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a)</sup>	Konzentrationsbereich ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Ethylhexanoat	16	15 - 17
Ethylbutanoat	35	34 - 36
3-Methylbutanal	93	91 - 95
3-Methylbutanol	171	170 - 172
2-Phenylethanol	217	213 - 221
Pentansäure	390	387 - 393
2,3-Butandion	1266	1262 - 1270
Phenyllessigsäure	1295	1285 - 1305
$\delta$ -Decalacton	1618	1610 - 1626
$\delta$ -Dodecalacton	2394	2372 - 2417
2-Methylbuttersäure	3980	3901 - 4059
Hexansäure	10183	10158 - 10207
2-Methylpropansäure	11049	11014 - 11083
3-Methylbuttersäure	25608	25099 - 26117
Buttersäure	59205	58334 - 60076
Essigsäure	843501	788790 - 898212

<sup>a)</sup> Konzentrationen als Mittelwerte von Doppelbestimmungen

### 2.1.2.4 Ermittlung von Geruchsschwellenwerten

Um aus den ermittelten Konzentrationen letztlich Aussagen über den Aromabeitrag einzelner Substanzen zum Gesamtaroma treffen zu können, wurden die Gehalte im Käse in Bezug zur Geruchsschwelle der Verbindung in einer geeigneten, probennahen Matrix gesetzt. Zur Berechnung der Aromawerte (vgl. 1.7.3) sind Geruchsschwellen der Aromastoffe in Öl geeignet, wie Arbeiten von *Preininger und Grosch (1994)*, *Kubickova und Grosch (1998)* sowie von *Rychlik und Bosset (2001)* zeigen.

Die Geruchsschwellen wurden einer hauseigenen Datenbank entnommen, die auf die in **Tabelle 9** genannten Literaturstellen verweist. Im Fall der 2-Methylpropansäure wurde die Geruchsschwelle, wie unter 3.8.3 beschrieben, in geruchsarmem Sonnenblumenöl bestimmt.

**Tabelle 9** zeigt die Geruchsschwellen in Öl der im Rahmen dieser Arbeit im Gouda-Käse quantifizierten Aromastoffe. Diese variieren annähernd um den Faktor 1000. So zeigt Hexansäure mit Abstand die höchste Geruchsschwelle (5400 µg/L). Neun von fünfzehn Geruchsschwellen der hier untersuchten Aromastoffe liegen im Bereich von ca. 100-300 µg/L, gefolgt von Ethylhexanoat, Ethylbutanoat und 3-Methylbuttersäure, deren Geruchsschwellen zwischen 20 und 40 µg/L Öl liegen. Die niedrigsten Geruchsschwellen in Öl zeigen 3-Methylbutanal (5,4 µg/L) und 2,3-Butandion (4,5 µg/L).

### 2.1.2.5 Berechnung von Aromawerten

Aus den ermittelten Konzentrationen der Aromastoffe und deren Geruchsschwellenwerten in Öl konnten nun die Aromawerte (vgl. 1.7.3) berechnet werden. Die Aromawerte von 15 ausgewählten Aromastoffen in 30 Wochen gereiftem Käse nach Gouda-Art aus pasteurisierter Milch sind in **Tabelle 9** dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass Essigsäure (AW 6802) mit Abstand den größten Aromawert aufwies. Hohe Aromawerte zeigten auch 3-Methylbuttersäure (AW 1164) und Buttersäure (AW 439) sowie 2,3-Butandion (AW 281). Geringere Aromawerte wurden für 2-Methylpropansäure (AW 34),  $\delta$ -Dodecalacton (AW 20), 2-Methylbuttersäure (AW 20), 3-Methylbutanal (AW 17) und  $\delta$ -Decalacton (AW 14) berechnet. Für Phenylelessigsäure (AW 7) und Hexansäure (AW 2) ergaben sich noch Aromawerte größer eins. Ethylbutanoat, 2-Phenylethanol und 3-Methylbutanol zeigten dagegen Konzentrationen, die annähernd bei ihrer Geruchsschwelle lagen. Für Ethylhexanoat errechnete sich mit AW = 0,4 ein Aromawert, der unter eins lag.

Für eine abschließende Beurteilung der Aromarelevanz der untersuchten Aromastoffe war letztlich eine Aromasimulation notwendig.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 9:** Aromawerte (AW) von 15 ausgewählten Aromastoffen in 30 Wochen gereiftem Käse nach Gouda-Art aus pasteurisierter Milch und ihre orthonasalen Geruchsschwellen

Geruchsstoff	AW <sup>a)</sup>	Geruchsschwelle in Öl [ $\mu\text{g/l}$ ]	Literatur für Geruchsschwellen
Essigsäure	6802	124	<i>Reiners und Grosch, 1998</i>
3-Methylbuttersäure	1164	22	<i>Reiners und Grosch, 1998</i>
Buttersäure	439	135	<i>Schieberle und Gassenmeier, 1995</i>
2,3-Butandion	281	4,5	<i>Schieberle et al., 1993</i>
2-Methylpropansäure	34	325	e.U. <sup>b)</sup>
$\delta$ -Dodecalacton	20	120	<i>Schieberle et al., 1993</i>
2-Methylbuttersäure	20	203	<i>Schmitt, 2008 (unveröffentlicht)</i>
3-Methylbutanal	17	5,4	<i>Preiningner und Grosch, 1994</i>
$\delta$ -Decalacton	14	120	<i>Gassenmeier und Schieberle, 1994</i>
Phenyllessigsäure	7	186	<i>Kerscher, 2000</i>
Hexansäure	2	5400	<i>Schieberle et al., 1993</i>
Ethylbutanoat	1	28	<i>Preiningner und Grosch, 1994</i>
2-Phenylethanol	1	211	<i>Reiners, 1997</i>
3-Methylbutanol	< 1	225	<i>Guth und Grosch 1993b</i>
Ethylhexanoat	< 1	40	<i>Preiningner und Grosch, 1994</i>

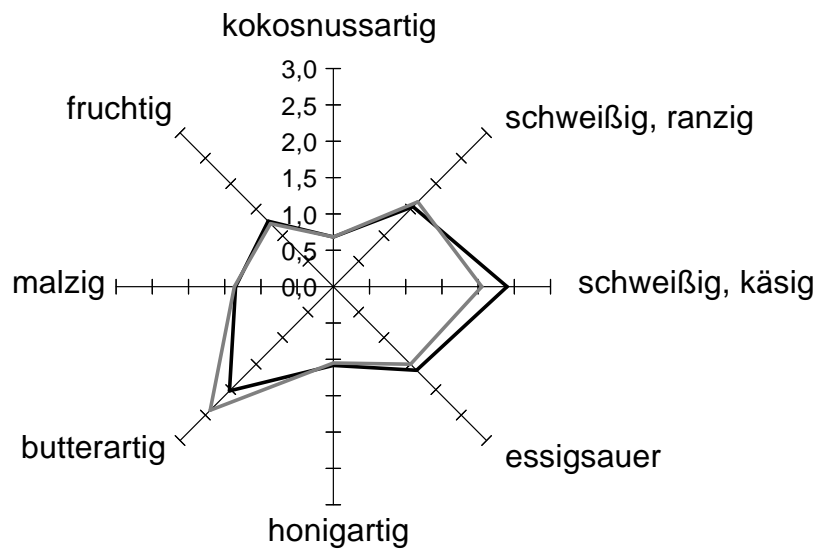
<sup>a)</sup> Aromawerte wurden aus der Konzentration der Aromastoffe im Käse dividiert durch die Geruchsschwelle in Öl berechnet (vgl. 1.7.3)

<sup>b)</sup> e.U. = eigene Untersuchungen

### 2.1.2.6 Aromasimulation

Zur Verifizierung des Aromabeitrags der definierten Schlüsselaromastoffe im Gouda-Käse wurde eine vergleichende Aromaprofilanalyse mit dem 30 Wochen gereiften Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W) und seinem Rekombinat durchgeführt. Für die Rekombinationsversuche wurden Präparate in Mozzarella-Pulver anhand der quantitativen Daten von 16 ausgewählten Aromastoffen hergestellt (vgl. 3.8.4). Das geruchsarme Mozzarella-Pulver simulierte eine weitgehend geruchsneutrale Käsematrix. Das geschulte Sensorikpanel bestand aus 20 Personen und bewertete die Präparate anhand von acht Deskriptoren auf einer Intensitätsskala von 0 - 3 (vgl. 3.8.2).

Die Rekombinationsversuche sollten zeigen, ob die als Schlüsselaromastoffe definierten und quantifizierten Verbindungen wichtige Aromastoffe im untersuchten Gouda-Käse repräsentieren und die Rekombinate eine valide Simulation für den Gouda-Käse darstellen.



**Abbildung 15:** Vergleich der Aromaprofile von Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch, 30 Wochen gereift ( — ) und seinem Rekombinat ( — )

Das Ergebnis der Rekombinationsversuche (**Abbildung 15**) zeigte, dass die verwendeten Aromastoffe im Rekombinat das Aromaprofil des Originals sehr gut widerspiegeln. Bis auf die butterartige Note, die im Rekombinat etwas stärker bewertet wurde als im Original, und die schweißig, käsige Note, die im Original deutlicher hervortrat als im Rekombinat, wurden die Attribute nahezu identisch bewertet (vgl. 6.).

## 2 Ergebnisse und Diskussion

### 2.1.2.7 Quantifizierungen der Schlüsselaromastoffe aus Charge 2

Um die Wiederholbarkeit der Käseproduktion sowie der qualitativen und quantitativen Ergebnisse zu Schlüsselaromastoffen des definiert hergestellten Goudas zu überprüfen, wurde im Abstand von einem Jahr eine zweite Charge Gouda-Käse analog hergestellt und untersucht. Auch in diesem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch, 30 Wochen gereift (PM-G-30W-II), wurden die Konzentrationen ausgewählter Aromastoffe bestimmt und anhand ihrer Geruchsschwellen die Aromawerte berechnet (**Tabelle 10**).

**Tabelle 10:** Konzentrationen und Aromawerte (AW) von 15 ausgewählten Aromastoffen in der 2. Charge Gouda-Käse (PM-G-30-W-II) aus pasteurisierter Milch, 30 Wochen gereift

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a)</sup>	(AW) <sup>b)</sup>
Essigsäure	1394525	11246
3-Methylbuttersäure	18448	839
Buttersäure	103638	768
2,3-Butandion	2435	541
2-Methylpropansäure	22860	70
3-Methylbutanal	211	39
$\delta$ -Dodecalacton	3596	30
$\delta$ -Decalacton	1687	14
2-Methylbuttersäure	1928	10
Phenyllessigsäure	1059	6
Hexansäure	9175	2
2-Phenylethanol	275	1
3-Methylbutanol	228	1
Ethylbutanoat	28	1
Ethylhexanoat	9,6	< 1

<sup>a)</sup> Konzentrationen als Mittelwerte von Doppelbestimmungen

<sup>b)</sup> Aromawerte wurden aus der Konzentration der Aromastoffe im Käse dividiert durch die Geruchsschwelle in Öl (**Tabelle 9**) berechnet

Die höchste Konzentration und gleichzeitig den höchsten Aromawert erreichte die Essigsäure (1395 mg/kg, AW 11246). Ebenso zeigten Buttersäure (104 mg/kg, AW 768), 3-Methylbuttersäure (18 mg/kg, AW 839) und 2,3- Butandion (2,4 mg/kg, AW 541) hohe Konzentrationen in Verbindung mit hohen Aromawerten. Zweistellige Aromawerte wurden für 2-Methylpropansäure (23 mg/kg, AW 70),  $\delta$ -Dodecalacton (3,6 mg/kg, AW 30), 3-Methylbutanal (0,2 mg/kg, AW 39),  $\delta$ -Decalacton (1,7 mg/kg, AW 14) und 2-Methylbuttersäure (1,9 mg/kg, AW 10) berechnet. Hohe Konzentration und einstellige Aromawerte wiesen Hexansäure (9,2 mg/kg, AW 2) und Phenyllessigsäure (1,1 mg/kg, AW 6) auf. Einen Aromawert von eins erzielten 2-Phenylethanol (275  $\mu$ g/kg, AW 1), 3-Methylbutanol (228  $\mu$ g/kg, AW 1) und Ethylbutanoat (28  $\mu$ g/kg, AW 1). Ethylhexanoat hingegen erzielte einen Aromawert kleiner eins (9,6  $\mu$ g/kg, AW 0,2).

Durch die konsequente Anwendung von Techniken der molekularen Sensorik gemäß dem **Stufenmodell** (vgl. 1.7.3) nach *Schieberle (1995)* ist es gelungen, 15 Aromastoffe in den untersuchten Gouda-Käsen systematisch zu bewerten und ihren Beitrag am Gesamtaroma zu zeigen. Sie dienten fortan als **Markersubstanzen** für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der Pasteurisierung der Milch auf die Aromabildung und zur Aromaentwicklung in Gouda-Käse (vgl. 2.2, 2.3).

### 2.1.2.8 Vergleich wichtiger Aromastoffe in Käse nach Gouda-Art

Die folgende **Tabelle 11** zeigt einen Vergleich der FD-Faktoren ( $FD \geq 16$ ) zwischen 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch nach definierter Herstellung (PM-G-30W, vgl. **3.1.2**) und einem gereiftem Gouda-Käse aus dem Handel (vgl. **3.1.1**), wie er im Rahmen dieser Arbeit in Vorversuchen untersucht wurde. Die in **Tabelle 11** fett-gedruckten Aromastoffe sind im Rahmen dieser Arbeit als wichtige Markersubstanzen quantifiziert worden.

Es wird ersichtlich, dass die potentiell wichtigen Aromastoffe in beiden Gouda-Käsen weitestgehend übereinstimmen. So lagen die FD-Faktoren bei der AEVA für die Markersubstanzen Ethylbutanoat, Essigsäure, Buttersäure, Pentansäure und 2- und 3-Methylbuttersäure sowie für 2-Phenylethanol und die  $\delta$ -Lactone im gleichen Bereich. Lediglich 2-Methylpropansäure und Phenyllessigsäure wurden im Handelskäse schwächer bewertet. Auch weitere potente Aromastoffe wie die Verbindungen 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin, (E)-2-Nonenal, trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal, 4-Ethyl-octansäure, die beiden Furanone und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd wurden im Handelskäse mit vergleichbar hohen FD-Faktoren bewertet (**Tabelle 11**).

Die vergleichende Bewertung der FD-Faktoren zeigte, dass die festgelegten Markersubstanzen über den definiert hergestellten Gouda hinaus Gültigkeit besitzen und in diesem Fall auf einen handelsüblichen Gouda anwendbar waren.



**Tabelle 11:** Vergleich der FD-Faktoren von definiert hergestelltem, 30 gereiftem Gouda-Käse (PM-G-30W) mit gereiftem Gouda-Käse aus dem Handel

Aromastoff <sup>a)</sup>	FD-Faktor <sup>b)</sup>	
	Gouda definiert <sup>c)</sup>	Gouda Handel <sup>d)</sup>
<b>Buttersäure</b>	<b>4096</b>	<b>1024</b>
<b>2- und 3-Methylbuttersäure</b>	<b>4096</b>	<b>1024</b>
<b>Essigsäure</b>	<b>2048</b>	<b>1024</b>
<b>Phenylelessigsäure</b>	<b>1024</b>	<b>4</b>
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	1024	1024
5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon	1024	512
<b>2-Methylpropansäure</b>	<b>512</b>	<b>8</b>
<b>2-Phenylethanol</b>	<b>512</b>	<b>256</b>
<b>δ-Decalacton</b>	<b>512</b>	<b>1024</b>
<b>δ-Dodecalacton</b>	<b>512</b>	<b>256</b>
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	512	512
4-Ethyl-octansäure	512	512
(E)-2-Nonenal	256	128
<b>Ethylbutanoat</b>	<b>128</b>	<b>128</b>
2-Isopropyl-3-methoxypyrazin	64	512
(Z)-2-Nonenal	64	4
γ-Dodecalacton	64	256
<b>3-Methylbutanol</b>	<b>32</b>	<b>128</b>
<b>Pentansäure</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal	32	16
<b>Hexansäure</b>	<b>16</b>	<b>64</b>
γ-Nonalacton	16	16
γ-Decalacton	16	512
Ethyl-2-methylbutanoat	4	128
2-Acethyl-2-thiazolin	4	256
2-Methoxyphenol	4	512
δ-Octalacton	4	32
1-Octen-3-on	2	128

<sup>a)</sup> Im Rahmen dieser Arbeit identifizierter Aromastoff

<sup>b)</sup> FD-Faktor = Flavour Dilution-Faktor (vgl. 1.7.3)

<sup>c)</sup> Im Rahmen dieser Arbeit definiert hergestellter Gouda aus pasteurisierter Milch, 30 Wochen gereift (vgl. 3.1.2)

<sup>d)</sup> Im Rahmen dieser Arbeit untersuchter Dutch-type Käse (Gouda) in Quaderform aus dem Handel (vgl. 3.1.1)

## 2 Ergebnisse und Diskussion

Einen weiteren Beleg für die Gültigkeit der durchgeführten Untersuchungen stellt der Wiederholungsversuch der Käseherstellung dar (Charge 2), der im Abstand von einem Jahr zur ersten Käseproduktion durchgeführt wurde. **Tabelle 12** zeigt einen Vergleich der berechneten Aromawerte aus beiden Chargen des definiert hergestellten Goudas (PM-G-30W). Hieraus ist ersichtlich, dass die Tendenzen der Einzelbeiträge der wichtigen Aromastoffe der 1.Charge in der 2.Charge bestätigt werden konnten.

**Tabelle 12:** Aromawerte (AW) 15 ausgewählter Aromastoffe in 2 Chargen Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch, 30 Wochen gereift (PM-G-30W)

Geruchsstoff	PM-G-30W (Charge 1)	PM-G-30W (Charge 2)
	AW <sup>a)</sup>	
Essigsäure	6802	11246
3-Methylbuttersäure	1164	839
Buttersäure	439	768
2,3-Butandion	281	541
2-Methylpropansäure	34	70
$\delta$ -Dodecalacton	20	30
2-Methylbuttersäure	20	10
3-Methylbutanal	17	39
$\delta$ -Decalacton	14	14
Phenyllessigsäure	7	6
Hexansäure	2	2
Ethylbutanoat	1	1
2-Phenylethanol	1	1
3-Methylbutanol	< 1	1
Ethylhexanoat	< 1	< 1

<sup>a)</sup> Aromawerte (AW) wurden berechnet aus der Konzentration der Aromastoffe dividiert durch die Geruchsschwelle in Öl (vgl. 1.7.3)

In **Tabelle 13** werden quantitativen Daten der eigenen Untersuchungen mit Literaturwerten für Gehalte an flüchtigen Verbindungen in gereiftem Gouda-Käse gegenübergestellt, die mittels GC-MS ermittelt wurden.

**Tabelle 13:** Vergleich quantitativer Literaturdaten in gereiftem Gouda-Käse mit eigenen Untersuchungen an PM-G-30W

Aromastoff	Konzentration in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]			
	PM-G-30W	<i>Dirinck, de Winne, 1999</i>	<i>Alewijn et al., 2003</i>	<i>Van Leuven et al., 2008</i>
2,3-Butandion	1.266	n.b. <sup>1)</sup>	n.b. <sup>1)</sup>	n.b. <sup>1)</sup>
Essigsäure	843.501	n.b. <sup>1)</sup>	133.000	n.b. <sup>1)</sup>
2-Methylpropansäure	11.049	n.b. <sup>1)</sup>	2.600	163 <sup>2)</sup>
2-Methylbuttersäure	3.980	n.b. <sup>1)</sup>	n.b. <sup>1)</sup>	61 <sup>2)</sup>
3-Methylbuttersäure	25.608	516-696	11.000	1.141 <sup>2)</sup>
Buttersäure	59.205	n.b. <sup>1)</sup>	12.000	n.b. <sup>1)</sup>
Pentansäure	390	n.b. <sup>1)</sup>	30	n.b. <sup>1)</sup>
Hexansäure	10.183	1.061-1.554	3.400	n.b. <sup>1)</sup>
Ethylbutanoat	35	n.b. <sup>1)</sup>	n.b. <sup>1)</sup>	n.b. <sup>1)</sup>
Ethylhexanoat	16	n.b. <sup>1)</sup>	n.b. <sup>1)</sup>	17
3-Methylbutanal	93	n.b. <sup>1)</sup>	n.b. <sup>1)</sup>	46
3-Methylbutanol	171	n.b. <sup>1)</sup>	130	27
2-Phenylethanol	217	n.b. <sup>1)</sup>	30	59
Phenyllessigsäure	1.295	n.b. <sup>1)</sup>	n.b. <sup>1)</sup>	n.b. <sup>1)</sup>
$\delta$ -Decalacton	1.618	671-691	1.500	331
$\delta$ -Dodecalacton	2.394	845-896	3.200	590

<sup>1)</sup> n.b. = nicht bestimmt

<sup>2)</sup> Gehalte aus einem jungen, sechswöchig gereiften Gouda

Aus den Literaturdaten lassen sich im Vergleich zu den Daten, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, Tendenzen in den Konzentrationsverhältnissen der Aromastoffe zueinander wiederfinden.

So fanden auch *Alewijn et al. (2003)* die höchsten Konzentrationen für Essigsäure, gefolgt von Buttersäure und 3-Methylbuttersäure. Im Vergleich hierzu waren 2-Methylpropansäure und Hexansäure sowohl in den eigenen Untersuchungen als nach *Alewijn et al.* im Gouda-Käse in geringerer Konzentration vorhanden. Die geringste Säurekonzentration zeigte übereinstimmend Pentansäure. Die  $\delta$ -Lactone waren in allen dargestellten Arbeiten in vergleichbaren absoluten Konzentrationen vorhanden. Zudem lag die Konzentration von  $\delta$ -Dodecalacton immer deutlich über der von  $\delta$ -Decalacton (**Tabelle 13**).

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

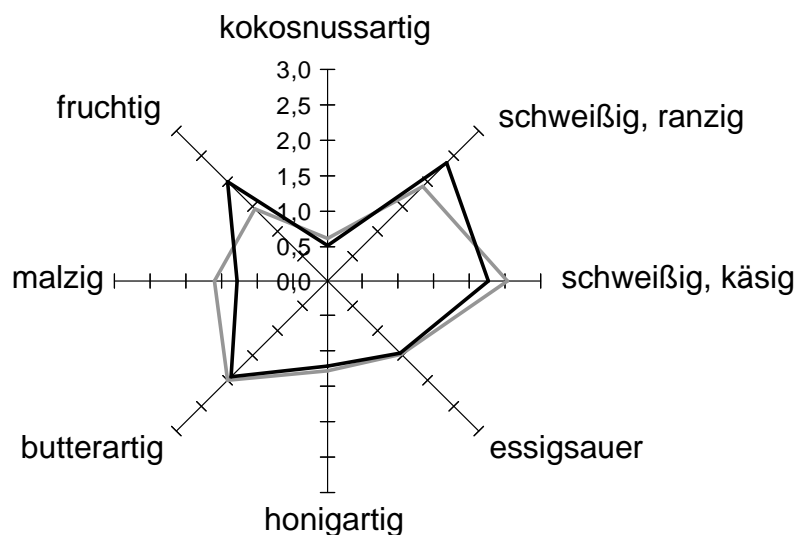
Iyer (1967), der die freien Fettsäuren in Gouda Käse gas-flüssig-chromatographisch untersuchte, konstatierte, dass ein Beitrag der Säuren zum Aroma von Gouda-Käse äußerst wahrscheinlich sei. Er ermittelte für Essigsäure 186 - 1073 mg/kg Käse, für Buttersäure 57 - 101 mg/kg Käse sowie für Hexansäure 22 - 62 mg/kg Käse.

Die Größenordnungen der Konzentration der Aromastoffe Ethylhexanoat, 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 2-Phenylethanol (16 - 271 µg/kg) aus den eigenen Untersuchungen sind mit den quantitativen Daten von *Van Leuven et al. (2008)*, der diese Aromastoffe mit Gehalten von 17 - 59 mg/kg Käse quantifizierte, vergleichbar (**Tabelle 13**).

## 2.2 Einfluss der Milchpasteurisierung auf die Bildung wichtiger Aromastoffe in Käse nach Gouda-Art

### 2.2.1 Aromaprofilanalyse

Ausgangspunkt für die Untersuchungen zum Einfluss der Milchpasteurisierung auf die Bildung wichtiger Aromastoffe in Käse nach Gouda-Art war ein Vergleich der definiert hergestellten Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch nach 30 Wochen Reifung (PM-G-30W und RM-G-30W) durch ein geschultes Sensorikpanel, bestehend aus 20 Personen, das die Präparate anhand von acht Deskriptoren auf einer Intensitätsskala von 0 - 3 (vgl. 3.8.2) bewertete. Es sollte geprüft werden, ob und welcher sensorische Unterschied zwischen den Käsevarietäten besteht (**Abbildung 16**).



**Abbildung 16:** Vergleich der Aromaprofile von Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch ( — ) und Rohmilch ( ——— ), 30 Wochen gereift

**Abbildung 16** zeigt, dass die gereiften Gouda-Varietäten sensorisch unterschieden werden konnten. Die Geruchsqualitäten schweißig, ranzig und fruchtig wurden im Rohmilch-Gouda stärker bewertet, die Geruchsqualitäten malzig und schweißig, käsig traten im Gouda aus pasteurisierter Milch etwas stärker hervor. Die anderen Deskriptoren (butterartig, honigartig, essigsauer und kokosnussartig) zeigten im Gouda-Vergleich annähernd dieselben Intensitäten (vgl. 6.)

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

Die gezeigte Unterscheidbarkeit wurde durch das Ergebnis eines Triangeltests (vgl. **3.8.1**) an denselben Präparaten bestätigt. Die Gesamtaromen der Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch waren mit einem Signifikanzniveau von 0,1 % eindeutig unterscheidbar.

### 2.2.2 Schlüsselaromastoffe in 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus Rohmilch

#### 2.2.2.1 Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

Wie im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (vgl. **2.1.2.1**) wurde mit dem definiert hergestellten und 30 Wochen gereiften Gouda-Käse aus Rohmilch (RM-G-30W) zum Screening auf wichtige Aromastoffe zunächst eine Aromaextraktverdünnungsanalyse durchgeführt. Nach Kaltextraktion mit Diethylether und anschließendem Hochvakuumtransfer (SAFE-Methode, vgl. **3.4.1.2**) wurde das erhaltene Destillat flüchtiger Verbindungen für die folgende Analyse mittels HRGC-O in die neutral-basische (NBF) und saure Fraktion (AF) aufgetrennt (vgl. **3.4.2**). Die Identifizierungsexperimente wurden wie am Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch bereits gezeigt, durchgeführt (vgl. **2.1.1.2**).

#### Neutral-basische Fraktion (NBF)

Die neutral-basische Fraktion (**Tabelle 14**) zeigte bei der Aromaextraktverdünnungsanalyse insgesamt FD-Faktoren von bis zu  $FD = 512$ . Mit dem höchsten FD-Faktor wurden die Verbindungen Ethylbutanoat (**4**; fruchtig), 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin (**18**; nach grüner Paprika), (E)-2-Nonenal (**23**; grün, fettig), 2-Phenylethanol (**34**, blumig) und  $\delta$ -Dodecalacton (**47**, pfirsichartig) detektiert sowie die unbekannte Verbindung Nr. **43** (lederartig). Es folgte mit einem FD-Faktor von 256 das  $\delta$ -Decalacton (**47**, kokosnussartig) sowie (Z)-2-Nonenal (**21**; grün, fettig) mit einem FD-Faktor von 128. Mit  $FD = 64$  wurden Ethylhexanoat (**11**, fruchtig) und  $\gamma$ -Dodecalacton (**45**,  $FD = 64$ ) bestimmt.

#### Saure Fraktion (AF)

Die saure Fraktion (**Tabelle 14**) zeigte bei der Aromaextraktverdünnungsanalyse insgesamt FD-Faktoren von bis zu  $FD = 8192$ . Vorherrschend waren die schweißigen, ranzigen und käsigen Noten der Säuren, gefolgt von würzig, maggiartigen Noten und den Geruchsqualitäten honigartig und vanilleartig. Den höchsten FD-Faktor von 8092 erzielte Buttersäure (**27**; schweißig, ranzig). In der sauren Fraktion folgten mit  $FD = 4096$  Essigsäure (**19**; essigsauer) und 2-/3-Methylbuttersäure (**28**; schweißig, käsig). Mit einem FD-Faktor

von 512 wurden 2-Methylpropansäure (**24**; schweißig, fruchtig), 4-Ethyl-octansäure (**40**; ziegenartig), 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-furan-2(5H)-on (**44**; würzig, maggiartig), und Phenyllessigsäure (**49**, honigartig) detektiert. Es folgten mit FD = 256 3-Methoxy-4-hydroxy-benzaldehyd (50; vanilleartig), mit FD = 128 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (**41**, würzig, maggiartig) und Pentansäure (**29**, schweißig) mit FD = 64.

Die Ergebnisse der Identifizierungsexperimente sowie der AEVA in Käse nach Gouda-Art aus Rohmilch nach 30 Wochen Reifung (RM-G-30W) sind in der folgenden **Tabelle 14** zusammengefasst. Von 41 geruchsaktiven Verbindungen konnten demnach 40 nach den in der Legende zu **Tabelle 14** genannten Kriterien identifiziert und mittels AEVA bewertet werden.

Tabelle 14: Wichtige Aromastoffe (FD $\geq$  1) in 30 Wochen gereiftem RohmilchGouda (RM-G-30W)

Nr. a)	Geruchsstoff b)	Geruchsqualität c)	Fraktion <sup>d)</sup>	RI <sup>e)</sup>			FD <sup>f)</sup>
				FFAP	OV-1701	DB-5	
1	3-Methylbutanal <sup>h)</sup>	malzig	NBF	931	733	661	2
2	Ethyl-2-methylpropanoat	fruchtig	NBF	976	815	762	16
3	2,3-Butandion <sup>h)</sup>	butterartig	NBF	995	700	588	1
4	Ethylbutanoat	fruchtig	NBF	1045	851	810	512
5	Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig	NBF	1062	907	849	8
6	Ethyl-3-methylbutanoat	fruchtig	NBF	1079	912	858	16
8	1-Hexen-3-on	metallisch	NBF	1108	865	771	1
10	3-Methylbutanol	malzig	NBF	1225	848	730	16
11	Ethylhexanoat	fruchtig	NBF	1245	1058	994	64
13	1-Octen-3-on <sup>g)</sup>	pilzartig	NBF	1311	1069	983	8
16	1-Nonen-3-on <sup>g)</sup>	pilzartig	NBF	1421	1170	1083	2
17	Ethyl-octanoat	fruchtig	NBF	1438	1265	1204	8
18	2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazin <sup>g)</sup>	grüne Paprika	NBF	1451	1147	1101	512
19	Essigsäure	essigsauer	AF	1468	784	n.b. <sup>i)</sup>	4096
20	3-(Methylthio)propanal	gekochte Kartoffel	NBF	1472	1057	911	2
21	(Z)-2-Nonenal	grün, fettig	NBF	1529	1253	1140	128
22	Propionsäure	stechend, sauer	AF	1561	893	n.b. <sup>i)</sup>	8
23	(E)-2-Nonenal	grün, fettig	NBF	1560	1276	1154	512
24	2-Methylpropansäure	schweißig, fruchtig	AF	1589	958	n.b. <sup>i)</sup>	512
25	(E,Z)-2,6-Nonadienal	gurkenartig	NBF	1600	1280	1150	8
27	Buttersäure	schweißig, ranzig	AF	1649	982	n.b. <sup>i)</sup>	8192



Fortsetzung von Tabelle 14:

Nr. <sup>a)</sup>	Geruchsstoff <sup>b)</sup>	Geruchsqualität <sup>c)</sup>	Fraktion <sup>d)</sup>	FD <sup>f)</sup>		
				FFAP	RI <sup>e)</sup>	DB-5
28	2- und 3-Methylbuttersäure	schweflig, käsig	AF	1691	1033	n.b. <sup>l)</sup> 4096
29	Pentansäure	schweflig	AF	1763	1079	n.b. <sup>l)</sup> 64
32	Hexansäure	schweflig, ziegenartig	AF	1874	1173	n.b. <sup>l)</sup> 32
34	2-Phenylethanol	blumig	NBF	1952	1282	1051 512
35	$\gamma$ -Octalacton	kokosnussartig	NBF	1962	1472	1249 8
36	$\delta$ -Octalacton	kokosnussartig	NBF	2022	1514	1283 4
37	trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal <sup>g)</sup>	metallisch	NBF	2041	1547	1375 16
38	$\gamma$ -Nonalacton	pfirsichartig	NBF	2081	1586	1366 16
39	$\gamma$ -Decalacton	pfirsichartig	NBF	2203	1695	1467 32
40	4-Ethyl-octansäure	ziegenartig	AF	2240	1439	n.b. <sup>l)</sup> 512
41	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon <sup>g)</sup>	würzig, maggiartig	AF	2260	1357	1108 128
42	$\delta$ -Decalacton	kokosnussartig	NBF	2268	1739	1491 256
43	Unbekannt	lederartig	NBF	2288	1567	n.b. <sup>l)</sup> 512
44	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-furan-2(5H)-on <sup>g)</sup>	würzig, maggiartig	AF	2327	1435	1196 512
45	$\gamma$ -Dodecalacton	pfirsichartig	NBF	2438	1914	1676 64
46	(Z)-6-Dodecyl-lacton	pfirsichartig	NBF	2453	1895	1657 8
47	$\delta$ -Dodecalacton	pfirsichartig	NBF	2484	1948	1710 512
48	3-Methylindol	fäkalisch	NBF	2550	1625	1385 1
49	Phenyllessigsäure	honigartig	AF	2575	1496	1283 512
50	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	vanilleartig	AF	2599	1648	1391 256

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

### Legende zu **Tabelle 14**:

- a) Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Aromastoffe wurden entsprechend der Elutionsreihenfolge auf der FFAP-Kapillarsäule durchnummeriert.
- b) Die Identifizierung der Aromastoffe erfolgt durch Vergleich mit Referenzsubstanzen auf der Basis folgender Kriterien: Geruchsqualität, Geruchsintensität und RI-Werte auf drei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität (FFAP, OV-1701, DB-5), MS-Spektren (EI/CI-Modus).
- c) Geruchsqualität des Aromastoffs am Sniffing-Port während der HRGC-O
- d) Fraktion, die den Hauptteil des Aromastoffs enthielt: AF = saure Fraktion, NBF = neutral-basische Fraktion
- e) Linearer Retentionsindex (RI) nach Kovats (vgl. **3.6.2**) auf den angegebenen Kapillarsäulen
- f) FD = FD-Faktor: Flavour Dilution-Faktor (vgl. **1.7.3**)
- g) Die MS-Signale waren für eine eindeutige Identifizierung zu schwach. Die Identifizierung erfolgte anhand der übrigen unter b) genannten Kriterien.
- h) Die MS-Spektren wurden im Laufe der Quantifizierung erhalten.
- i) n.b. = nicht bestimmt

### 2.2.2.2 Quantifizierung und Aromawertberechnung ausgewählter Verbindungen mittels SIVA

Für die Quantifizierungsversuche wurden analog zum gereiften Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W, 2.1.1.) 15 potente Aromastoffe ausgewählt und mittels SIVA anhand von stabilisotopenmarkierten Verbindungen als interne Standards quantifiziert (vgl. 2.1.1.3). Unter Berücksichtigung der Geruchsschwellenwerte in Öl wurden anschließend die Aromawerte dieser Verbindungen ermittelt (vgl. 2.1.1.6).

**Tabelle 15** zeigt zunächst die Konzentrationen und Aromawerte der 15 ausgewählten Aromastoffe der 1.Charge in 30 Wochen gereiftem Käse nach Gouda-Art, der aus Rohmilch hergestellt wurde (RM-G-30W).

Die höchste Konzentration und gleichzeitig den höchsten Aromawert erreichte die Essigsäure (910 mg/kg, AW 7336). Ebenso zeigten Buttersäure (92 mg/kg, AW 684) und 3-Methylbuttersäure (18 mg/kg, AW 804) hohe Konzentrationen in Verbindung mit hohen, dreistelligen Aromawerten. Zweistellige Aromawerte errechneten sich für 2,3-Butandion (0,4 mg/kg, AW 97), 2-Methylpropansäure (12 mg/kg, AW 36),  $\delta$ -Dodecalacton (2,5 mg/kg, AW 21),  $\delta$ -Decalacton (1,6 mg/kg, AW 13), 2-Methylbuttersäure (2,3 mg/kg, AW 11) und 3-Methylbutanal (53  $\mu$ g/kg, AW 10).

Aromawerte deutlich größer als 1 wiesen Phenylelessigsäure (1,6 mg/kg, AW 9), Hexansäure (32 mg/kg, AW 6), Ethylbutanoat (135  $\mu$ g/kg, AW 5) und Ethylhexanoat (154  $\mu$ g/kg, AW 4) auf. Einen Aromawerte um eins erzielte 2-Phenylethanol (159  $\mu$ g/kg, AW 1), die Konzentration von 3-Methylbutanol (106  $\mu$ g/kg, AW < 1) lag unterhalb der Geruchsschwelle.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 15:** Konzentrationen und Aromawerte (AW) von 15 ausgewählten Aromastoffen in 2 Chargen Gouda-Käse aus Rohmilch, 30 Wochen gereift

Geruchsstoff	Charge 1		Charge 2	
	Konz. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a)</sup>	AW <sup>b)</sup>	Konz. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a)</sup>	AW <sup>b)</sup>
3-Methylbutanal	53	10	124	23
3-Methylbutanol	106	< 1	150	1
Ethylbutanoat	131	5	88	3
Ethylhexanoat	154	4	90	2
2-Phenylethanol	159	1	227	1
2,3-Butandion	437	97	696	155
$\delta$ -Decalacton	1593	13	1673	14
Phenyllessigsäure	1648	9	1372	7
2-Methylbuttersäure	2286	11	1224	6
$\delta$ -Dodecalacton	2507	21	3508	29
2-Methylpropansäure	11626	36	22876	70
3-Methylbuttersäure	17692	804	11208	510
Hexansäure	32377	6	29620	5
Buttersäure	92305	684	169068	1252
Essigsäure	909719	7336	1680038	13549

<sup>a)</sup> Konzentrationen als Mittelwerte von Doppelbestimmungen

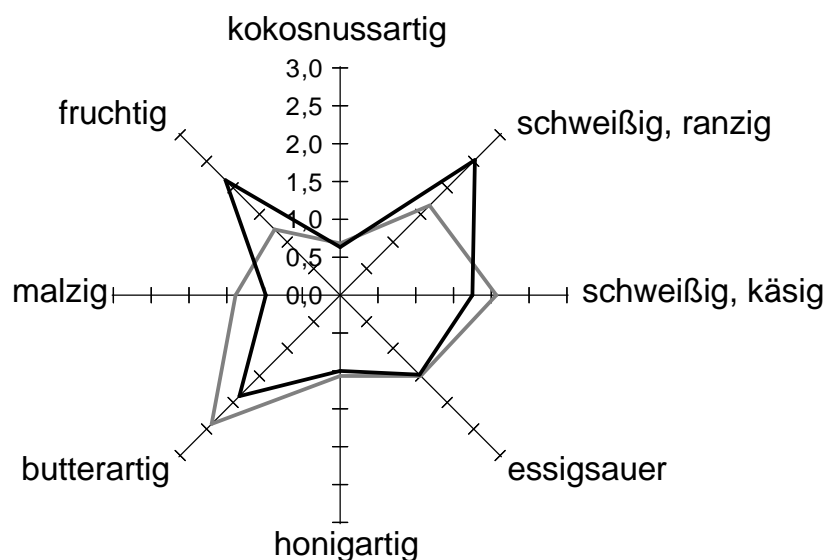
<sup>b)</sup> Aromawerte wurden aus der Konzentration der Aromastoffe im Käse dividiert durch die Geruchsschwelle in Öl (vgl. 2.1.1.6) berechnet

### 2.2.2.3 Quantifizierungen der Schlüsselaromastoffe aus Charge 2

Um die Wiederholbarkeit der definierten Käseproduktion sowie der qualitativen und quantitativen Ergebnisse zu Schlüsselaromastoffen des Goudas zu überprüfen, wurde die im Abstand von einem Jahr hergestellte 2.Charge Gouda-Käse aus Rohmilch (30 Wochen gereift) untersucht, wobei sich die Konzentrations- und Aromawert-Tendenzen aus der 1.Charge bestätigten (vgl. **Tabelle 15**).

### 2.2.2.4 Aromasimulation

In einer abschließenden vergleichenden Aromasimulation (**Abbildung 17**) sollten die olfaktorischen Unterschiede im 30 Wochen gereiften Gouda-Käse aus pasteurisierter und Rohmilch auf der Ebene der Rekombinate untersucht werden. Entsprechend der Rekombinationsversuche zum Gouda PM-G-30W (vgl. **2.1.1.7**) wurden Präparate in geruchsarmem Mozzarella-Pulver anhand der quantitativen Daten von 16 ausgewählten Aromastoffen hergestellt (vgl. **3.8.4**). Das geschulte Sensorikpanel (bestehend aus 20 Personen) bewertete die Präparate anhand von acht Deskriptoren auf einer Intensitätsskala von 0 - 3 (vgl. **3.8.2**).



**Abbildung 17:** Vergleich der Aromaprofile der Rekombinate von 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch ( — ) und Rohmilch ( — )

Das Diagramm zeigt eine deutliche Unterscheidung in der olfaktorischen Bewertung der beiden Käsemodelle (**Abbildung 17**). So traten im Rekombinat des Goudas aus pasteurisierter Milch die Geruchsqualitäten malzig, schweißig-käsig und butterartig hervor. Dagegen wurden im Rekombinat des Rohmilch-Gouda die Noten fruchtig und schweißig-ranzig deutlich stärker bewertet. Nahezu kein Unterschied war bei den Beschreibungen kokosnussartig, essigsauer und honigartig feststellbar (vgl. **6.**).

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

Bis auf den Unterschied in der butterartigen Note spiegeln beide Rekombinate die sensorischen Unterschiede in den Käsevarietäten sehr gut wider, wie sie in den eingangs gezeigten Aromaprofilanalysen auftraten (vgl. 2.2.1). Dies gilt folglich auch für die zugrundeliegenden Aromastoffkonzentrationen und Aromawerte, die somit zur Differenzierung des Aromas der Käsevarietäten herangezogen werden können.

### 2.2.2.5 Diskussion zum Einfluss der Milchpasteurisierung auf die Konzentrationen von Schlüsselaromastoffen in Gouda-Käse

Aus den Untersuchungen zu Schlüsselaromastoffen in 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W) und Rohmilch (RM-G-30W) ergeben sich Unterschiede in den Konzentrationen dieser Verbindungen, die im Folgenden anhand weiterer, eigener Parameter und Literaturdaten diskutiert werden sollen.

Aufgrund der annähernd identischen Wassergehalte der beiden Käsevarietäten (Daten nicht dargestellt) werden die ermittelten quantitativen Aromastoff-Daten im Folgenden deshalb nicht um ihren Wassergehalt bereinigt, dargestellt.

Die Verbindungen Pentansäure, Hexansäure und Buttersäure zeigten im Rohmilch-Gouda deutlich höhere Gehalte. Ebenso verhielten sich Ethylbutanoat und Ethylhexanoat. Die Konzentration von Phenyllessigsäure war im Rohmilch-Gouda nur leicht erhöht.

Annähernd gleich hohe Konzentrationen in beiden Gouda-Käsen wurden jeweils für die Verbindungen  $\delta$ -Decalacton und  $\delta$ -Dodecalacton sowie für 2-Methylpropansäure und Essigsäure gemessen. Hingegen lagen die Konzentrationen für die methylverzweigten Verbindungen 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure sowie für 2-Methylbuttersäure im Gouda aus pasteurisierter Milch höher als im Rohmilch-Gouda. Auch 2-Phenylethanol und 2,3-Butandion wiesen diesen Trend auf (**Tabelle 16**).

**Tabelle 16:** Vergleich der Konzentrationen von 16 Aromastoffen aus 2 Chargen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W) und aus Rohmilch (RM-G-30W)

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a)</sup>			
	Charge 1		Charge 2	
	PM-G-30W	RM-G-30W	PM-G-30W	RM-G-30W
Pentansäure	390	657	369	732
Hexansäure	10183	32377	9175	29620
Buttersäure	59205	92305	103638	169068
Ethylbutanoat	35	131	28	88
Ethylhexanoat	16	154	9,6	90
Phenyllessigsäure	1295	1648	1059	1372
$\delta$ -Decalacton	1618	1593	1687	1673
$\delta$ -Dodecalacton	2394	2507	3596	3508
2-Methylpropansäure	11049	11626	22860	22876
Essigsäure	843501	909719	1394525	1680038
3-Methylbutanal	93	53	211	124
3-Methylbutanol	171	106	228	150
3-Methylbuttersäure	25608	17692	18448	11208
2-Methylbuttersäure	3980	2286	1928	1224
2-Phenylethanol	217	159	275	227
2,3-Butandion	1266	437	2435	696

<sup>a)</sup> Konzentrationen aus Doppelbestimmungen

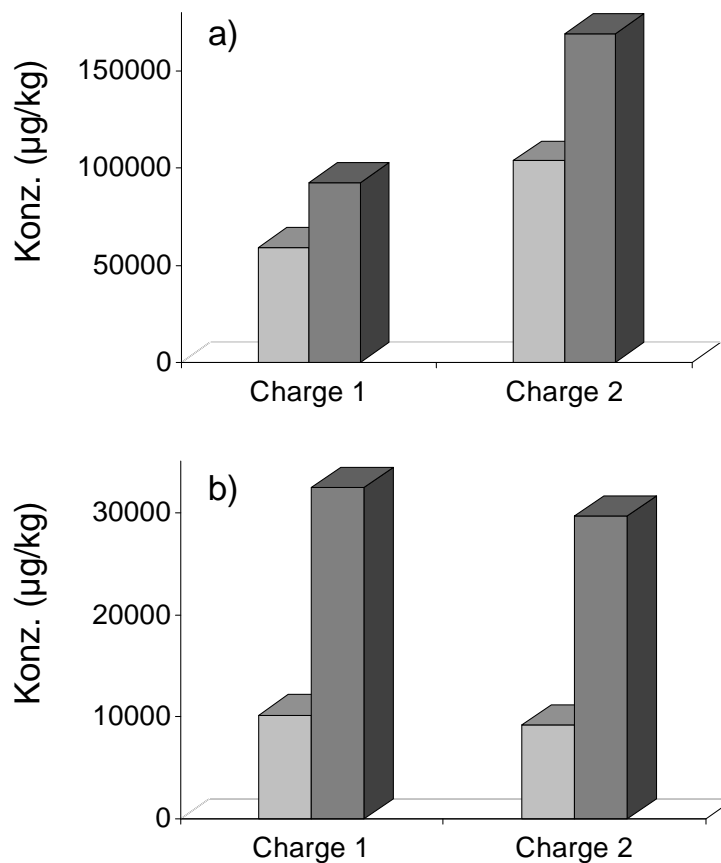
Um die ermittelten Konzentrationsunterschiede in den beiden Gouda-Varianten, die sich in der Pasteurisierung der Milch unterscheiden, zu überprüfen, wurden die Konzentrationen der Aromastoffe analog in einer 2.Charge ermittelt. In **Tabelle 16** sind auch die Ergebnisse dieser Quantifizierungen dargestellt. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Tendenzen in den Konzentrationsunterschieden beim Vergleich des Goudas aus pasteurisierter Milch und des Rohmilch-Goudas ausnahmslos in der 2.Charge bestätigt wurden.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

Da sich die ermittelten Tendenzen der Konzentrationsunterschiede zwischen dem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch in bestimmten Verbindungsgruppen verschiedener Herkunft zeigen, werden diese detailliert anhand von Literaturdaten diskutiert.

### Freie Fettsäuren

Die kurzen, geradkettigen Fettsäuren **Buttersäure** und **Hexansäure** waren im Rohmilch-Gouda nach 30 Wochen Reifung in deutlich höherer Konzentration vorhanden als im Gouda aus pasteurisierter Milch (**Abbildung 18**).



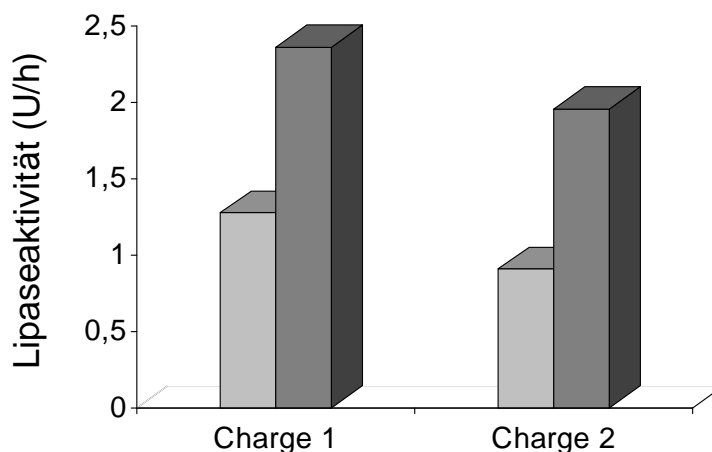
**Abbildung 18:** Konzentrationen von Buttersäure (a) und Hexansäure (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) aus 2 Chargen Käse, 30 Wochen gereift



*Pinna et al. (1999)* zeigten an einem Fiorde Sardo-Käse u.a. nach sechs Monaten Reifung ebenfalls in der Rohmilchvariante höhere Konzentrationen an Buttersäure (1549 mg/kg) und Hexansäure (1520 mg/kg) im Gegensatz zum Käse aus pasteurisierter Milch, der 475 mg/kg Buttersäure und 406 mg/kg Hexansäure enthielt (**Tabelle 17**).

*Albenzio et al. (2001)* ermittelten in einem Canestrato Pugliese-Käse, der aus pasteurisierter (PM) und roher Schafsmilch (RM) hergestellt wurde, sowohl für Hexansäure (RM 274 mg/kg; PM 189 mg/kg) als auch für Buttersäure (RM 451 mg/kg; PM 431 mg/kg) nach 63 Tagen höhere Konzentrationen im Käse aus Rohmilch (**Tabelle 17**). Gleichzeitig lag auch die **Lipaseaktivität** nach 63 Tagen in der Rohmilchvariante (16,2 U/g) deutlich über der Aktivität im Käse aus pasteurisierter Milch (10,1 U/g).

Ebenso stellten *Hickey et al. (2007)* neben höheren Gehalten an freien Fettsäuren (**Tabelle 17**) in Rohmilch-Käse gleichzeitig höhere Lipaseaktivitäten fest. Es lag somit die Vermutung nahe, dass auch im untersuchten Gouda-Käse aus Rohmilch eine höhere Lipaseaktivität vorlag, die für eine erhöhte Fettsäurefreisetzung verantwortlich war. Dieser Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. In beiden Käsechargen lag die Lipaseaktivität nach 30 Wochen Reifung im Gouda-Käse aus Rohmilch deutlich höher (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19:** Lipaseaktivitäten in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) aus 2 Chargen Käse, 30 Wochen gereift

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

In Ziegenmilchkäse, den *Morgan et al. (2001)* untersuchten, zeigte sich die Lipolyse, ausgedrückt als freie Oktansäure (AO), mit 13,5 g AO/100 g MG ebenfalls im Rohmilchkäse stärker als in der Variante aus pasteurisierter Milch (11,0 g AO/100 g MG).

*Buffa et al. (2001)*, die auch Ziegenkäse analysierten, konnten u.a. Butter- und Hexansäure nach 60 Tagen der Reifung in der Rohmilchvariante in höherer Konzentration bestimmen. Der Gesamtgehalt der freien Fettsäuren (FFA) lag zu diesem Zeitpunkt im Käse aus pasteurisierter Milch bei 6 mg/g Fett, im Rohmilchkäse hingegen bei 8,5 mg/g Fett. *Buffa et al. (2004)* zeigten für Buttersäure in Ziegenkäse, der aus pasteurisierter Milch (PM) und Rohmilch (RM) hergestellt wurde, Gehalte von 25,2 mg/kg (PM) und 61,1 mg/kg (RM) (**Tabelle 17**).

In Gouda-Käse, der aus pasteurisierter Milch und Rohmilch hergestellt worden war, stellten *Alewijn et al. (2005)* u.a. für die kurzkettigen Fettsäuren C6-C9 in allen acht Reifungsstufen (0 bis 96 Wochen) höhere Gehalte in der Rohmilch-Varietät fest.

Bei Untersuchungen der Lipolyse in Cheddar-Käse fanden *Hickey et al. (2007)* in Cheddar aus Rohmilch nach 168 Reifungstagen 39 mg/kg Buttersäure und 14 mg/kg Hexansäure, im Cheddar aus pasteurisierter Milch hingegen nur 30 mg/kg Buttersäure und 8 mg/kg Hexansäure (**Tabelle 17**). Die Esterase- und Lipaseaktivitäten in der Rohmilchvariante des Cheddar lagen dabei auch höher, wie bereits erwähnt.

Bei Untersuchungen an Cheddar-Käse aus pasteurisierter Milch (PM) und Rohmilch (RM), der vier Monate gereift wurde, ermittelten *Rehmann et al. (2000a)* für Buttersäure (RM 2,3 mg/kg und PM 1,4 mg/kg) sowie für Hexansäure (RM 3,3 mg/kg und PM 2,8 mg/kg) höhere Konzentrationen im Rohmilch-Cheddar. Dieselbe Tendenz ergaben die Bestimmungen in 6-monatig gereiftem Cheddar-Käse von *Rehmann et al. (2000b)*, die für Buttersäure 4,7 mg/kg (RM) und 2,0 mg/kg (PM) bestimmten, für Hexansäure 6,9 mg/kg (RM) und 3,5 mg/kg (PM) (**Tabelle 17**).

**Tabelle 17** zeigt zusammenfassend die erläuterten Literaturdaten zum Einfluss der Milchpasteurisierung auf die Butter- und Hexansäurekonzentrationen in verschiedenen Käsesorten im Vergleich zum untersuchten Gouda-Käse.

**Tabelle 17:** Konzentrationen (mg/kg) von Butter- und Hexansäure in Rohmilchkäse (RM) und Käse aus pasteurisierter Milch (PM) in verschiedenen Käsearten

Literatur	Käseart	Konzentration			
		Buttersäure		Hexansäure	
		RM	PM	RM	PM
<i>Pinna et al., 1999</i>	Fiorde-Sardo	1549	475	1520	406
<i>Albenzio et al., 2001</i>	Canestrato-Pugliese	451	431	274	189
<i>Buffa et al., 2004</i>	Ziegenkäse	61	25	-	-
<i>Hickey et al., 2007</i>	Cheddar	39	30	14	8
<i>Rehmann et al., 2000a</i>	Cheddar	2,3	1,4	3,3	2,8
<i>Rehmann et al., 2000b</i>	Cheddar	4,7	2,0	6,9	3,5
G-30W (Charge 1)	Gouda	92	59	32	10
G-30W (Charge 2)	Gouda	169	103	30	9,2

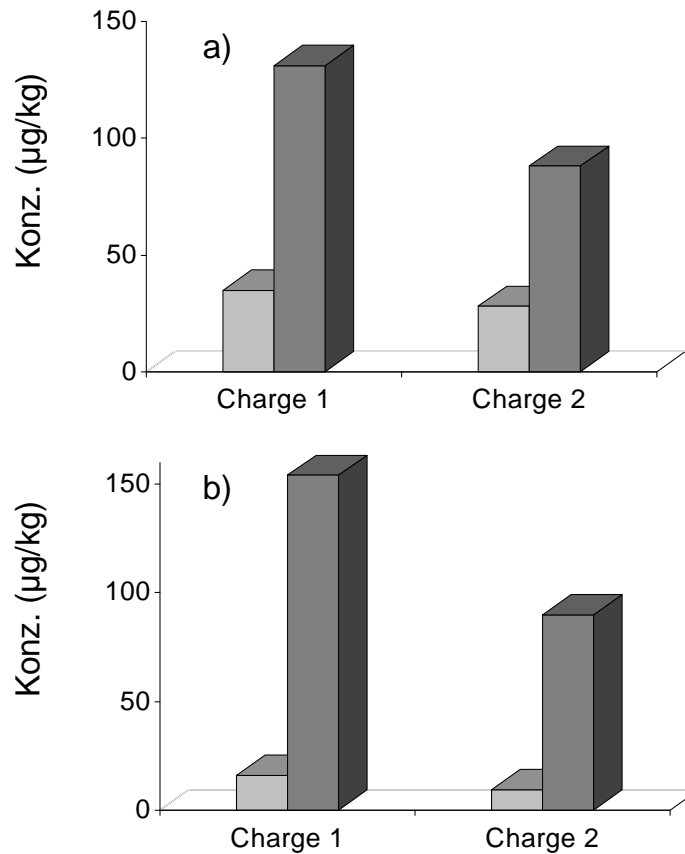
### Ethylester

In direktem Zusammenhang mit den freien Fettsäuren ist die Bildung ihrer **Ethylester** zu sehen. Da Butter- und Hexansäure als Substrat im Rohmilchkäse vermehrt zur Veresterung zur Verfügung standen, lagen auch ihre Ethylester dort in höheren Konzentrationen vor. Diese Tendenz trat bei den Estern im Vergleich zu ihren Säuren sogar noch stärker hervor (**Abbildung 20**).

*Rehmann et al. (2000b)* ermittelten für Ethylhexanoat in Cheddar-Käse aus pasteurisierter Milch (PM) und Rohmilch (RM) ebenso deutlich höhere Konzentrationen in der Rohmilch-Variante (RM 81 µg/kg; PM 13 µg/kg). Genauso verhielten sich die Konzentrationen für Ethylbutanoat in Cheddar-Käse nach *Rehmann et al. (2000a)*, wobei im Rohmilch-Cheddar 39 µg/kg und im Cheddar aus pasteurisierter Milch nur 16 µg/kg Ethylbutanoat bestimmt wurden.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---



**Abbildung 20:** Konzentrationen von Ethylbutanoat (a) und Ethylhexanoat (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) sowie Rohmilch (■) aus 2 Chargen Käse, 30 Wochen gereift

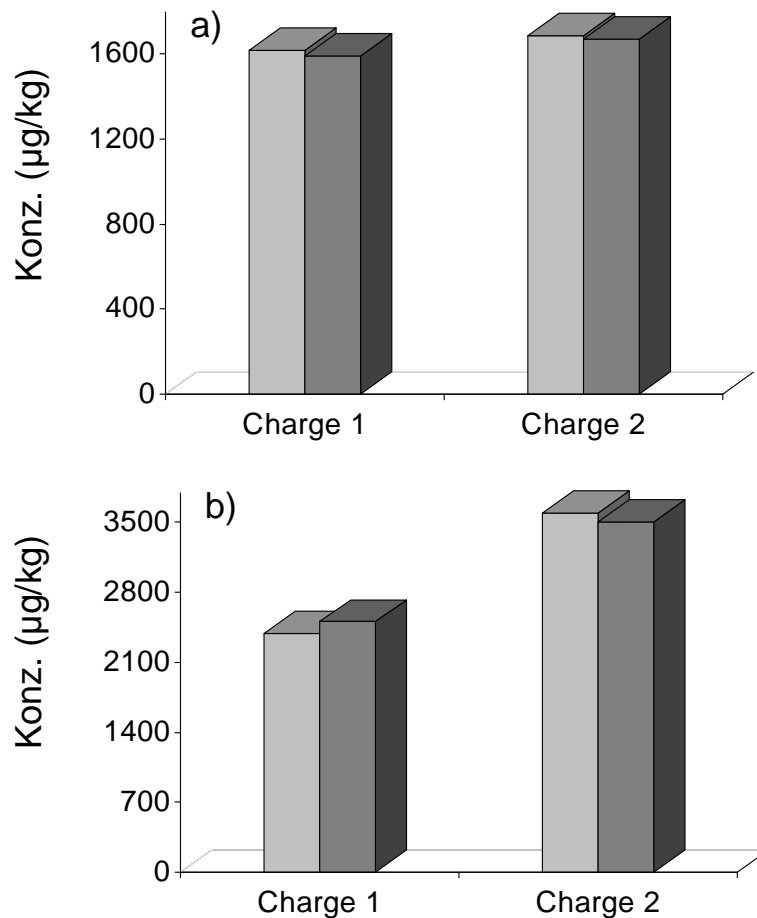
Diese Tendenzen stellten auch *Fernandez-Garcia et al. (2002)* fest. Sie fanden u.a. für Ethylbutanoat und Ethylhexanoat sowie für drei weitere Ethylester größere Mengen an diesen Verbindungen nach sechs Monaten Reifung in der Rohmilch-Variante eines Manchego-Käses im Vergleich zur Variante aus pasteurisierter Milch. Diesen Trend zeigten auch *Gomez-Ruiz et al. (2002)* für die Gesamtkonzentration an Ethylestern in Manchego-Käse, die in einer Rohmilch-Variante nach 12 Monaten Reifung deutlich höher lag.

Im Rohmilch-Gouda, den *Alewijn et al. (2005)* untersuchten, fanden diese deutlich höhere Gesamtkonzentrationen an Ethylestern (C6-C16) im Vergleich zu ihren Bestimmungen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch.

### Lactone

Als Vorstufe für die Lactonbildung werden, wie bei den Ethylestern, auch freie Fettsäuren diskutiert. Im hier untersuchten Gouda-Käse waren sowohl bei  $\delta$ -Decalacton als auch bei  $\delta$ -Dodecalacton jedoch keine Unterschiede zwischen der Rohmilchvariante und der Variante aus pasteurisierter Milch zu erkennen (**Abbildung 21**). Folglich kommen für die Lactonbildung in diesem Fall auch andere Mechanismen in Betracht.

*Rehmann et al. (2000b)* fanden beim Variantenvergleich in sechs Monate gereiftem Cheddar-Käse für den Rohmilchkäse und den Käse aus pasteurisierter Milch jeweils für  $\delta$ -Decalacton (311 mg/kg) als auch für  $\delta$ -Dodecalacton (488 mg/kg) dieselbe Konzentration.

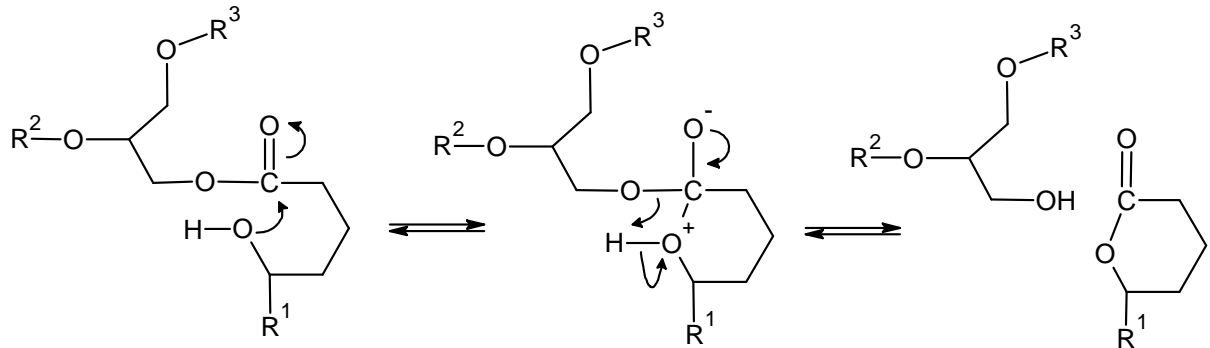


**Abbildung 21:** Lacton-Konzentrationen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) aus 2 Chargen Käse, 30 Wochen gereift

## 2 Ergebnisse und Diskussion

Auch die Bestimmungen von  $\delta$ -Lactonen von *Alewijn et al. (2005)* in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch lieferten keine Unterschiede in deren Konzentrationen. Die Gesamtkonzentration der  $\delta$ -Lactone (C-6 bis C-18) lag nach 40 Wochen Reifung in beiden Käsevarianten bei 50 mg/kg in der Trockenmasse.

*Alewijn et al. (2007)* untersuchten die Lactonbildung in MilCHFett und Gouda-Käse und sprechen sich aufgrund von Mengenbilanzierungen von freien und gebundenen Fettsäuren sowie kinetischen Daten der Lactonbildung gegen einen enzymatischen Mechanismus aus und schlagen stattdessen den in **Abbildung 22** dargestellten Mechanismus vor. Danach beginnt die Reaktion, wenn sich das Triglycerid in der richtigen Konformation befindet, mit einem nucleophilen Angriff der Hydroxygruppe des Fettsäurerestes R1 am zugehörigen Carbonyl-C-Atom und führt dort zu einem tetraedrischen Übergangszustand mit einer negativen Ladung am benachbarten Sauerstoff. Die Reaktion endet mit der Abspaltung des Lactons unter Bildung des Diglycerids. Der Mechanismus ist unabhängig von freien Fettsäuren, da die Lactonisation der Hydroxyfettsäure am Triglycerid stattfindet.

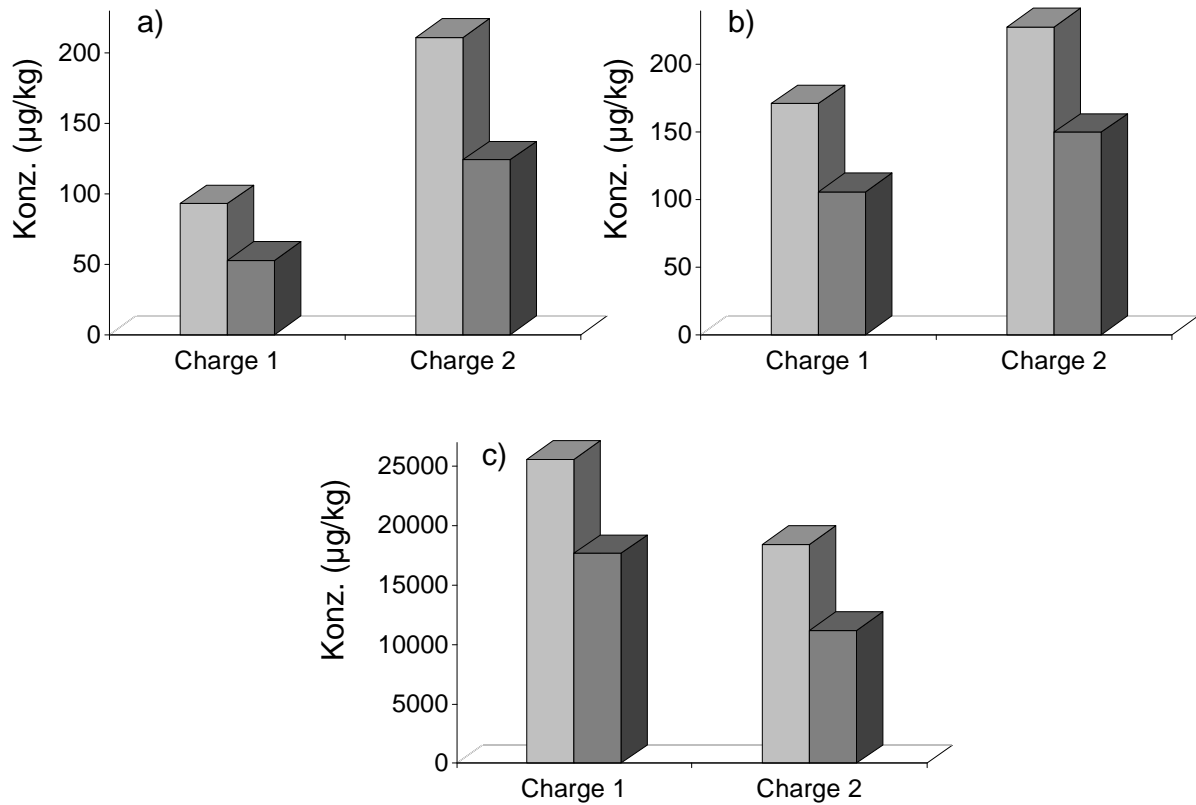


**Abbildung 22:** Direkte Lactonisation von veresterten Hydroxyfettsäuren zu  $\delta$ -Lactonen (*Alewijn et al., 2007*)

### Methylverzweigte Aromastoffe

Betrachtet man die Tendenzen für **3-methylverzweigte Aromastoffe**, die im Rahmen dieser Arbeit im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch im Reifungsverlauf quantifiziert wurden, so erkennt man, dass sich diese bezüglich der Käsevariante invers zu den bisher diskutierten Aromastoffen verhalten. **Abbildung 23** verdeutlicht, dass

3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure in gereiftem Gouda aus pasteurisierter Milch jeweils in höheren Konzentrationen vorhanden waren.



**Abbildung 23:** Konzentrationen von 3-Methylbutanal (a), 3-Methylbutanol (b) und 3-Methylbuttersäure (c) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) aus 2 Chargen Käse, 30 Wochen gereift

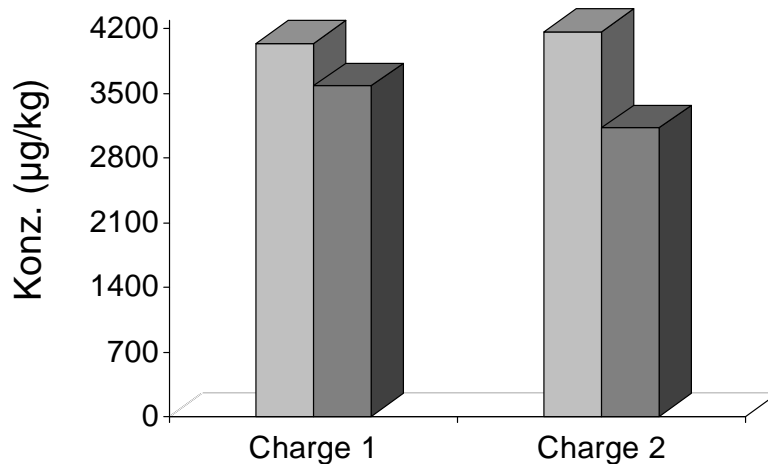
Übereinstimmend dazu stellten *Rehmann et al. (2000a)* beim Vergleich von Cheddar-Käsen aus Rohmilch (RM) und pasteurisierter Milch (PM) fest, dass sowohl 3-Methylbutanol (RM 150 µg/kg; PM 342 µg/kg) als auch 3-Methylbuttersäure (RM 92 µg/kg; PM 187 µg/kg) im Käse aus der thermisierten Milch in höherer Konzentration enthalten waren. 3-Methylbutanal wurde nicht bestimmt.

Im Manchego-Käse, den *Fernandez-Garcia et al. (2002)* auch in einer Rohmilchvariante und einer Variante aus pasteurisierter Milch untersuchten, war 3-Methylbutanal ebenfalls mit höheren Gehalten im Käse aus pasteurisierter Milch feststellbar, 3-Methylbutanol hingegen mit höheren Gehalten in der Rohmilchvariante.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

Die Gehalte an freiem L-Leucin in den untersuchten Gouda-Käsen verhielten sich entsprechend ihren strukturell verwandten Aromastoffe (s.o.) und zeigten höhere Konzentrationen im Gouda, der aus pasteurisierter Milch hergestellt wurde (**Abbildung 24**).

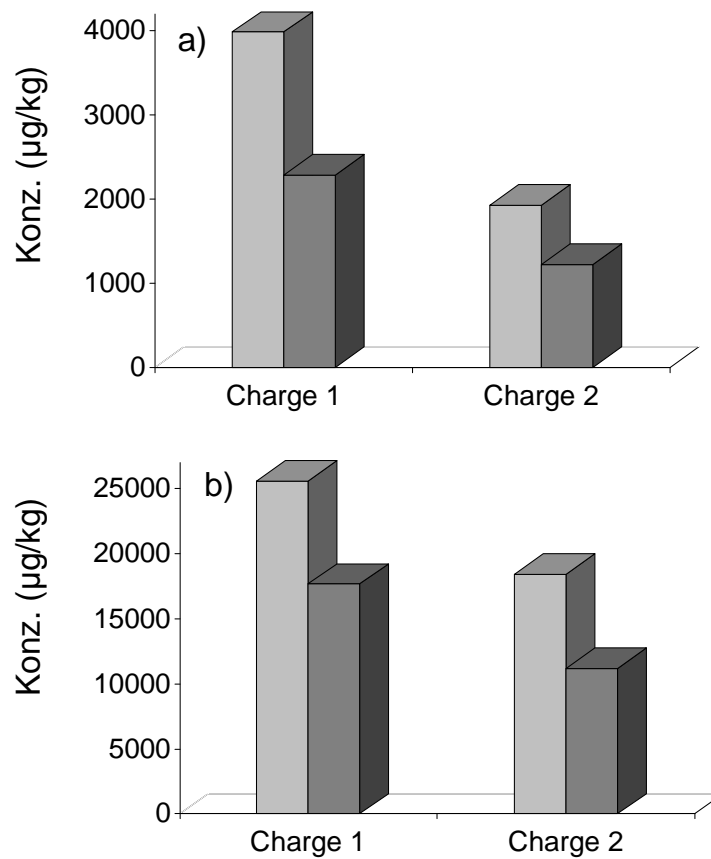


**Abbildung 24:** Konzentrationen an freiem Leucin in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) in zwei Chargen, 30 Wochen gereift

Die methylverzweigte Säure **2-Methylbuttersäure** entwickelte sich in gleicher Weise wie das Stellungsisomer 3-Methylbuttersäure im untersuchten Gouda-Käse (**Abbildung 25**). Die strukturelle Verwandtschaft der 2-Methylbuttersäure zu L-Isoleucin lässt vermuten, dass sie im Käse auf demselben Weg gebildet wird wie 3-Methylbuttersäure (*Urbach, 1995; Smit et al., 2005*). Die höheren Gehalte dieser Aminosäure im Gouda aus pasteurisierter Milch im Gegensatz zur Rohmilchvariante (Daten nicht dargestellt) können folglich auch für die Verhältnisse der 2-Methylbuttersäure im hier untersuchten Käse verantwortlich gewesen sein.

Höhere Gehalte an 2-Methylbuttersäure und 3-Methylbuttersäure wurden auch in einer Cheddar-Varietät aus pasteurisierter Milch im Vergleich zu einem Cheddar aus Rohmilch gefunden (*Rehmann et al, 2000a*).





**Abbildung 25:** Konzentrationen von 2-Methylbuttersäure (a) und 3-Methylbuttersäure (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■), 30 Wochen gereift

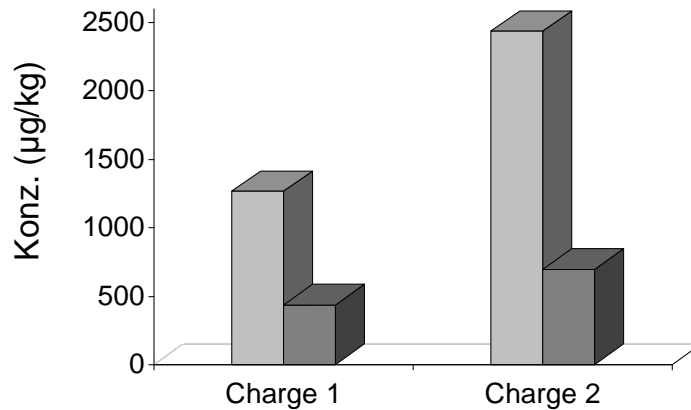
### Andere Aromastoffe

Die leichtflüchtige Verbindung **2,3-Butandion (Diacetyl)** zeigte sich in der Gouda-Varietät aus pasteurisierter Milch in deutlich höherer Konzentration als im Rohmilch-Gouda (**Abbildung 26**).

Die Daten stimmten mit Beobachtungen von *Fernandez-Garcia et al. (2002)* an Manchego-Käse aus pasteurisierter Milch überein, der ebenfalls höhere Gehalte an 2,3-Butandion im Vergleich zum Manchego-Käse aus Rohmilch aufwies. Dieselbe Tendenz ermittelten auch *Horne et al. (2005)* für Piacentinu Ennese-Käse.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

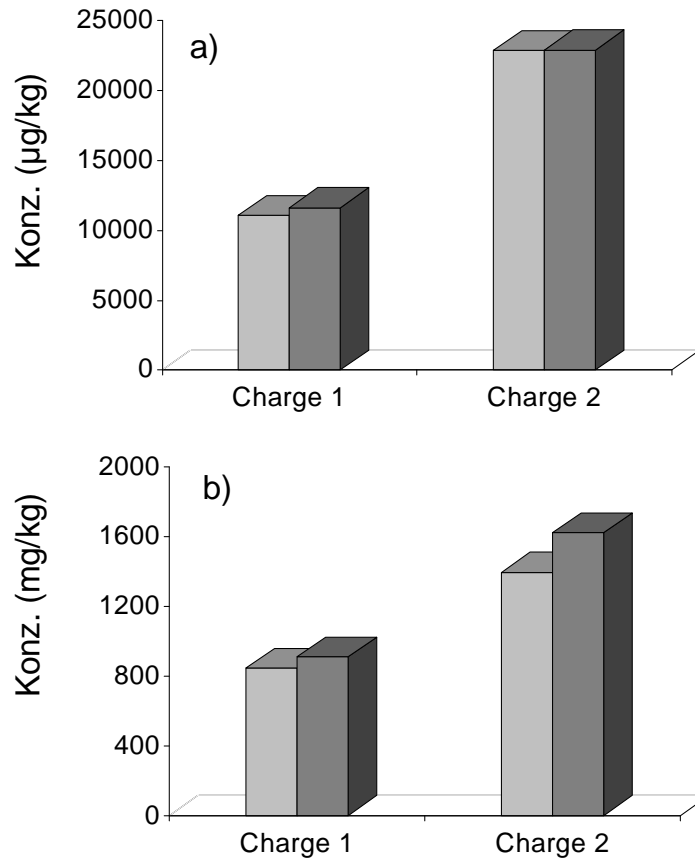


**Abbildung 26:** Konzentrationen von 2,3-Butandion in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■), 30 Wochen gereift

Die kurzkettigen Säuren **2-Methylpropansäure** und **Essigsäure** zeigten beide keine erkennbaren Unterschiede im Vergleich der Gouda-Varietäten (**Abbildung 27**).

Dieses Bild für 2-Methylpropansäure zeigte sich auch in der Studie von *Rehmann et al. (2000b)*, die bezüglich der Säurekonzentration ebenfalls keine Unterschiede in Cheddar-Käse aus Rohmilch und pasteurisierter Milch feststellten.

Die Gehalte der zur 2-Methylpropansäure korrespondierenden Aminosäure L-Valin folgten dem Trend von L-Leucin und L-Isoleucin und lagen im Rahmen dieser Arbeit im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch in höherer Konzentration vor (Daten nicht dargestellt), was auf andere oder weitere Bildungswege der Säure hindeuten könnte.



**Abbildung 27:** Konzentrationen von 2-Methylpropansäure (a) und Essigsäure (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■), 30 Wochen gereift

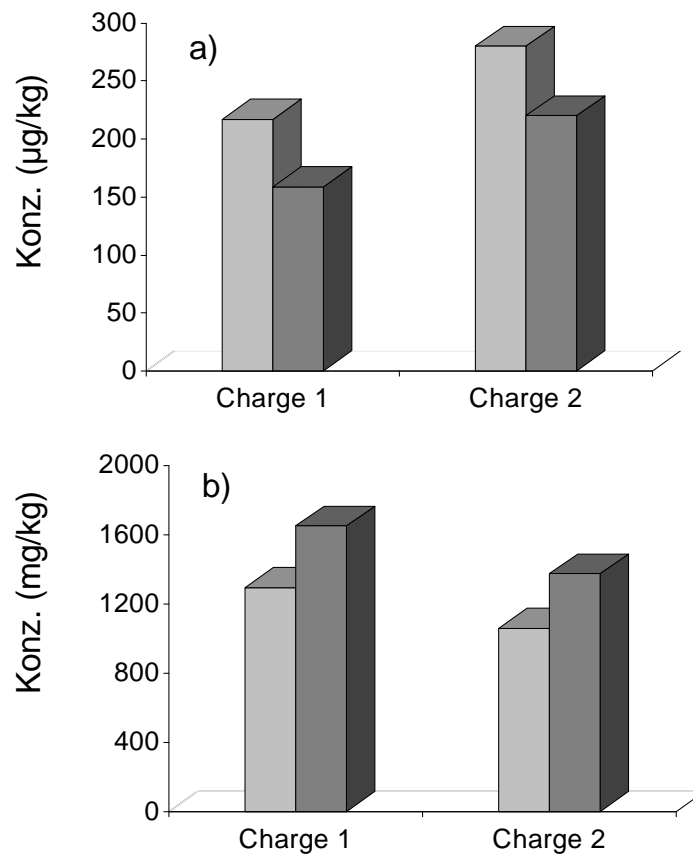
Bei den Aromastoffen, die auf den Phenylalanin-Abbau zurückgeführt werden können, **2-Phenylethanol** und **Phenylethylsäure**, zeigten sich unterschiedliche Entwicklungen in den Konzentrationen in den Gouda-Varietäten (**Abbildung 28**). Das Vorherrschen des Alkohols im Gouda aus pasteurisierter Milch gegenüber der Rohmilchvariante war bei der Phenylethylsäure nach 30 Wochen nicht zu beobachten. Die Säure herrschte zu diesem Zeitpunkt in der Rohmilchvariante vor.

Den Trend für 2-Phenylethanol konnten auch *Rehmann et al. (2000b)* an Cheddar-Käse beobachten. In der Rohmilchvariante quantifizierten sie den Alkohol mit 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , in Cheddar aus pasteurisierter Milch hingegen lag die Konzentration bei 39  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Für die genannten aromatischen Aromastoffe wird die Bildung aus der freien Aminosäure Phenylalanin diskutiert. Deren Gehalt lag im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen im

## 2 Ergebnisse und Diskussion

Gouda aus pasteurisierter Milch höher als im Gouda aus Rohmilch (Daten nicht dargestellt), was zumindest mit der Bildung von 2-Phenylethanol korrelierte.



**Abbildung 28:** Konzentrationen von 2-Phenylethanol (a) und Phenylacetic Säure (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■), 30 Wochen gereift

Bei der Diskussion der Unterschiede der Aromastoff-Konzentrationen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch wird deutlich, dass sich für bestimmte Verbindungsgruppen, die aus der Lipolyse des Fettes oder dem Aminosäure-Stoffwechsel stammen können, höhere Gehalte in der einen oder anderen Käsevarietät zeigten.

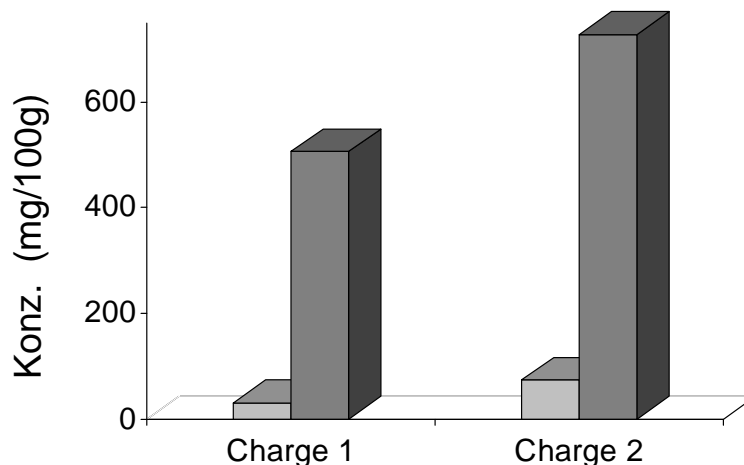
Nach *Lortal (2004)* können in Käse Starterkulturen mit Nichtstartern (**Nichtstarter-Milchsäurebakterien**, engl. *Non Starter Lactic Acid Bacteria*, **NSLAB**) in Wechselwirkung treten, wobei es zu einer Unterdrückung oder Stimulation bestimmter Bakterienstämme

kommt. Da durch die Pasteurisierung der Milch die Rohmilchflora nahezu (> 99,9 %) abgetötet wird (Fox et al., 2000b), ist im untersuchten Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch eine geringere Population an Nichtstarter-Milchsäurebakterien zu erwarten gewesen. Dies zeigten Rehmann et al. (2000a) und Hickey et al. (2007) für Cheddar-Käse sowie Buffa et al. (2004) für Ziegenkäse.

So ließe sich erklären, dass aufgrund der Konkurrenzsituation der Mikroorganismen bestimmte biochemische Vorgänge (Lipolyse, Veresterung) im untersuchten Rohmilch-Gouda stärker hervortraten, andere, wie die Freisetzung von freien Aminosäuren (L-Leucin, Phenylalanin), die in anderen Aromastoffen resultierte, in diesem Käse weniger ausgeprägt stattfanden.

Ein Indikator für NSLAB in Käse ist der Gehalt an **D-Lactat**. D-Lactat kann durch NSLAB direkt aus Lactose oder durch Racemisierung von L-Lactat gebildet werden (Mc Sweeney, 2004; Mc Sweeney und Fox, 2004). Die Konzentration an D-Lactat war aufgrund der vorhandenen Rohmilchflora deshalb im untersuchten Rohmilch-Gouda höher zu erwarten.

**Abbildung 29** zeigt die gemessenen D-Lactat-Konzentrationen in den 30 Wochen gereiften Käsevarietäten mit deutlich höheren Gehalten im Gouda aus Rohmilch, was die Annahme bestätigte.



**Abbildung 29:** D-Lactat-Gehalte in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) aus 2 Chargen Käse, 30 Wochen gereift

## 2 Ergebnisse und Diskussion

### 2.2.2.6 Schlussfolgerungen zum Aromabeitrag von Schlüsselaromastoffen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aromaprofilanalysen zum Aromabeitrag der definierten Schlüsselaromastoffe zeigten eine eindeutige sensorische Unterscheidbarkeit der 30 Wochen gereiften Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch (vgl. **Abbildung 16**), die sich in ihren Rekombinaten widerspiegelte (**Abbildung 17**).

Unter anderem traten dabei im Rohmilch-Gouda (RM-G-30W) die Geruchsqualitäten fruchtig und schweißig-ranzig hervor, die sich sensorisch den Schlüsselaromastoffen Ethylbutanoat und Ethylhexanoat sowie Buttersäure und Hexansäure zuordnen lassen. Die ermittelten **Aromawerte** dieser Geruchsstoffe korrelieren mit der sensorischen Wahrnehmung des trainierten Panels, da sie alle im Rohmilch-Gouda höher lagen. Insbesondere die fruchtigen Ester, deren Konzentrationen im Gouda aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W) im Bereich bzw. unter ihrer Geruchsschwelle lagen ( $AW < 1$ ), zeigten im RM-G-30W Aromawerte von 4 und 5 und konnten damit auch deutlicher wahrgenommen werden (**Tabelle 18**).

**Tabelle 18:** Vergleich der Aromawerte (AW) 10 ausgewählter Schlüsselaromastoffe in 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W) und Rohmilch (RM-G-30W)

Geruchsstoff	Geruchsqualität <sup>a)</sup>	AW	
		PM-G-30W	RM-G-30W
Buttersäure	schweißig, ranzig	439	684
Hexansäure	schweißig	2	6
Ethylbutanoat	fruchtig	1	5
Ethylhexanoat	fruchtig	< 1	4
2,3-Butandion	butterartig	281	97
3-Methylbuttersäure	schweißig, käsig	1164	804
2-Methylbuttersäure	schweißig, käsig	20	11
3-Methylbutanal	malzig	17	10
Essigsäure	essigsauer	6802	7336
Phenyllessigsäure	honigartig	7	9
δ-Decalacton	kokosnussartig	14	13

<sup>a)</sup> Geruchsqualität bestimmt bei der HRGC-O

Auch *Rehmann et al. (2000b)* bewerteten beim Vergleich von Rohmilch-Cheddar mit Cheddar aus pasteurisierter Milch die Aromaqualitäten „fruchtig“ und „ranzig“ im Rohmilchkäse stärker, was mit den ermittelten Daten für freie Fettsäuren und Ethylester in dieser Arbeit korrelierte. Im Rohmilch-Cheddar aus der Arbeit von *Rehmann et al. (2000a)* zeigte sich in Bezug auf die fruchtige Note derselbe Zusammenhang.

Obwohl *Van Leuven et al. (2008)* bei ihren Untersuchungen an 6-wöchig gereiftem Gouda-Käse keine quantitativen Daten zu Estern ermittelten, zeigte sich bei der sensorischen Analyse eine stärkere Bewertung des Attributs „fruchtig“ in der Rohmilch-Variante im Vergleich zum Gouda aus pasteurisierter Milch.

Umgekehrt liegen die Aromawerte für 2,3-Butandion (butterartig), 3-Methylbuttersäure (schweißig, käsig) und 3-Methylbutanal (malzig) im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch höher. Dies stimmt mit dem originären Aromaprofil (**Abbildung 16**) insoweit überein, als dass die Attribute schweißig, käsig und malzig dort etwas stärker im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch bewertet wurden. Noch deutlicher wird diese Tendenz im Rekombinat dieses Käses, in dem auch die butterartige Note stärker hervortrat, als im Rekombinat für den Rohmilch-Gouda (**Abbildung 17**).

Eine eindeutige Übereinstimmung der Aromawert-Daten der Schlüsselaromastoffe mit der sensorischen Bewertung ergab sich für jene Aromastoffe, die in beiden Käsevarietäten nahezu dieselben Aromawerte zeigten. So wurden die Geruchsqualitäten essigsauer (Essigsäure), honigartig (Phenyllessigsäure) und kokosnussartig ( $\delta$ -Decalacton) im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch gleich stark bewertet, was sich in annähernd gleich hohen Aromawerten zeigte (**Tabelle 18**).

Auch die in beiden Gouda-Varianten mit Aromawerten deutlich  $> 1$  auftretenden Aromastoffe  $\delta$ -Dodecalacton (AW 20 - 21) und 2-Methylpropansäure (AW 34 -36) sind als Schlüsselaromastoffe zu sehen, zumal sie auch Bestandteil der Rekombinationsversuche waren (**Tabelle 19**). Der tatsächliche Aromabeitrag von 2-Phenyethanol mit Aromawerten um eins ist fraglich. Die Aromastoffe 3-Methylbutanol (AW  $< 1$ ) und Pentansäure (AW  $< 1$ ) könnten mit ihren Geruchsqualitäten für die Schlüsselaromastoffen 3-Methylbutanal (malzig) und Butter- bzw. Hexansäure (schweißig, ranzig) synergistisch gewirkt haben und durch ihre

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

Konzentrationsverhältnisse die Tendenzen ihrer im Geruch korrespondierenden Schlüsselaromastoffe in den Gouda-Varietäten verstärkt haben.

**Tabelle 19:** Vergleich der Geruchsqualitäten und Aromawerte 5 (potenter) Aromastoffe in 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W) und Rohmilch (RM-G-30W)

Geruchsstoff	Geruchsqualität <sup>a)</sup>	Konz. (µg/kg) / AW	
		PM-G-30W	RM-G-30W
δ-Dodecalacton	pfirsichartig	2394 / 20	2507 / 21
2-Methylpropansäure	schweißig, fruchtig	11049 / 34	11626 / 36
2-Phenylethanol	blumig	217 / 1	159 / 1
3-Methylbutanol	malzig	171 / < 1	106 / < 1
Pentansäure	schweißig, ranzig	390 / < 1	657 / < 1

<sup>a)</sup> Geruchsqualität bestimmt bei der HRGC-O



### 2.3 Untersuchungen zum Bildungsverlauf von Aromastoffen in Käse nach Gouda-Art

Für die Untersuchungen zum Bildungsverlauf wichtiger Aromastoffe in Gouda-Käse während der Reifung wurden die definiert hergestellten Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch zunächst ungerieft, d.h. nach dem Dicklegen, Pressen und der Entnahme aus dem Salzbad (vgl. 3.1.2) und in fünf weiteren Reifungsstufen, nach 4, 7, 11, 19 und 30 Wochen untersucht.

#### 2.3.1 Bildungsverlauf wichtiger Aromastoffe in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch

Um die genaue Entwicklung der Aromastoffbildung in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch verfolgen zu können, wurden 16 ausgewählte Aromastoffe in den sechs definierten Reifungsstufen (0, 4, 7, 11, 19, 30 Wochen) mittels SIVA (vgl. 3.5) quantifiziert.

Die im Folgenden dargestellten Aromastoff-Konzentrationen beziehen sich auf das **Trockengewicht (i.Tr.)**, sie sind folglich um den Trocknungsverlust des Gouda-Käses während der Reifung bereinigt, um Verfälschungen in den Bildungsverläufen auszuschließen. Die Bestimmung der Trockenmasse (Wasserverlust) erfolgte nach 3.9.1.

Die quantitativen Daten der 16 Aromastoffe in sechs Reifungsstufen (0, 4, 7, 11, 19 und 30 Wochen) zeigten von ungerieftem zu 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse meist ansteigende Konzentrationen. Für die Lactone zeigte sich dabei bereits nach 7 - 11 Wochen eine Plateau-Konzentration. Die insgesamt abnehmenden und sehr leicht flüchtigen Aromastoffe 3-Methylbutanal und 2,3-Butandion durchliefen nach 4 - 7 Wochen zunächst ein Maximum, bevor ihre Konzentrationen dann stetig abfielen (**Tabelle 20**).

## 2 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 20:** Konzentrationen von 16 Aromastoffen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch nach 0, 4, 7, 11, 19 und 30 Wochen Reifung

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.Tr.) <sup>a)</sup> in Käse nach					
	0	4	7	11	19	30
Wochen Reifung						
3-Methylbutanal	215	223	272	260	157	136
2,3-Butandion	2416	3668	3218	2407	2231	1856
Ethylbutanoat	16	17	18	21	32	51
3-Methylbutanol	99	151	158	165	254	251
Ethylhexanoat	2	4	5	6	13	23
Essigsäure	712539	934606	1116706	1135269	1066276	1236805
2-Methylpropansäure	466	6007	7899	11271	13757	16201
Buttersäure	5345	13915	33365	41633	57362	86811
2-Methylbuttersäure	90	1254	3606	4038	4888	5836
3-Methylbuttersäure	622	8012	27703	33055	32644	37548
Pentansäure	121	147	252	306	401	572
Hexansäure	5279	9782	9523	9390	11943	14931
2-Phenylethanol	144	203	244	278	276	318
$\delta$ -Decalacton	1920	2484	2656	2717	2407	2372
$\delta$ -Dodecalacton	2419	3096	3525	3853	3641	3762
Phenyllessigsäure	624	677	859	1221	1302	1899

<sup>a)</sup> Konzentrationen in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in der Trockenmasse (i.Tr.) aus Doppelbestimmungen

Die Ergebnisse der 1.Charge Gouda-Käse konnten in einer 2.Charge, die im Abstand von einem Jahr unter denselben Bedingungen produziert und nach 4, 11 und 30 Wochen analysiert wurde, bestätigt werden. Mit Ausnahme von 3-Methylbutanal und 2,3-Butandion, die zunächst ein Maximum durchliefen, bevor ihre Konzentrationen abnahmen, stiegen die Konzentrationen aller Aromastoffe an.  $\delta$ -Decalacton und  $\delta$ -Dodecalacton zeigten dabei wiederum ein charakteristisches Konzentrations-Plateau (**Tabelle 21**).

**Tabelle 21:** Konzentrationen von 16 Aromastoffen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch nach 4, 11, und 30 Wochen Reifung, Charge 2

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.Tr.) <sup>a)</sup> in Käse nach		
	4	11	30
	Wochen Reifung		
3-Methylbutanal	244	460	316
2,3-Butandion	5396	5058	3651
Ethylbutanoat	14	21	42
3-Methylbutanol	150	182	342
Ethylhexanoat	4	6	14
Essigsäure	1917224	1946390	2090742
2-Methylpropansäure	2715	10858	34273
Buttersäure	11589	43033	155379
2-Methylbuttersäure	150	1246	2891
3-Methylbuttersäure	840	15326	27658
Pentansäure	170	256	553
Hexansäure	4302	7304	13756
2-Phenylethanol	110	197	412
$\delta$ -Decalacton	2240	2509	2529
$\delta$ -Dodecalacton	3035	5390	5391
Phenylelessigsäure	419	1036	1588

<sup>a)</sup> Konzentrationen in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in der Trockenmasse (i.Tr.) aus Doppelbestimmungen

### 2.3.2 Bildungsverlauf wichtiger Aromastoffe in Gouda-Käse aus Rohmilch

Auch im Gouda-Käse aus Rohmilch wurde der Bildungsverlauf von 16 ausgewählten Marker-Aromastoffen durch quantitative Daten mittels SIVA (vgl. 3.5) verifiziert. Unter Berücksichtigung des Trocknungsverlustes (Wassergehaltsbestimmung vgl. 3.9.1) sind die Daten als Konzentration **in der Trockenmasse (i.Tr.)** dargestellt.

Auffällig waren dabei die leichtflüchtigen Aromastoffe 3-Methylbutanal und 2,3-Butandion, deren Konzentrationen nach 4 bzw. 7 Wochen ein Maximum erreichten, bevor sie stetig abnahmen. Alle anderen Aromastoff-Konzentrationen nahmen im Reifungsverlauf zu, wobei

## 2 Ergebnisse und Diskussion

$\delta$ -Decalacton und  $\delta$ -Dodecalacton nach ca. 11 Wochen ihre höchste Konzentration erreichten, die mit der Zeit auch nicht mehr zunahm (**Tabelle 22**).

**Tabelle 22:** Konzentrationen von 16 Aromastoffen in Gouda-Käse aus Rohmilch nach 0, 4, 7, 11, 19 und 30 Wochen Reifung

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.Tr.) <sup>a)</sup> in Käse nach					
	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
3-Methylbutanal	76	73	117	140	107	77
2,3-Butandion	1192	1957	2306	1592	1316	635
Ethylbutanoat	39	41	58	73	130	190
3-Methylbutanol	32	71	88	102	157	154
Ethylhexanoat	21	32	61	73	144	224
Essigsäure	416299	690247	973390	1138369	1130505	1322266
2-Methylpropansäure	478	6670	8056	10348	14825	16898
Buttersäure	10471	34024	49815	60489	103823	134164
2-Methylbuttersäure	67	658	962	1210	2391	3323
3-Methylbuttersäure	661	7917	9104	15140	24155	25715
Pentansäure	179	247	407	481	783	955
Hexansäure	9571	14687	15043	14744	29033	47060
2-Phenylethanol	120	150	157	156	211	231
$\delta$ -Decalacton	2167	2437	2412	2460	2329	2315
$\delta$ -Dodecalacton	2186	3146	3676	3760	3792	3644
Phenyllessigsäure	241	384	524	1148	1454	2395

<sup>a)</sup> Konzentrationen in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in der Trockenmasse (i.Tr.) aus Doppelbestimmungen

In der 2.Charge Gouda-Käse aus Rohmilch, die analog zum Käse aus pasteurisierter Milch im Abstand von einem Jahr unter gleichen Bedingungen produziert und analysiert wurde, bestätigten sich die Ergebnisse der 1. Charge. Wiederum zeigten 3-Methylbutanal und 2,3-Butanon (Konzentrationsmaximum nach 7 - 11 Wochen) sowie  $\delta$ -Decalacton und  $\delta$ -Dodecalacton (Plateaukonzentration nach 4 - 7 Wochen) charakteristische Konzentrationsverläufe. Die Gehalte der anderen 14 Aromastoffe stiegen im Reifungsverlauf stetig an (**Tabelle 23**).

**Tabelle 23:** Konzentrationen von 16 Aromastoffen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch nach 4, 11, und 30 Wochen Reifung, Charge 2

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.Tr.) <sup>a)</sup> in Käse nach		
	4	11	30
	Wochen Reifung		
3-Methylbutanal	90	264	182
2,3-Butandion	4595	2018	1019
Ethylbutanoat	23	49	129
3-Methylbutanol	79	118	220
Ethylhexanoat	28	61	132
Essigsäure	1699945	2057828	2459792
2-Methylpropansäure	2323	11576	33493
Buttersäure	24327	83911	247537
2-Methylbuttersäure	89	568	1792
3-Methylbuttersäure	715	9361	16410
Pentansäure	260	409	1072
Hexansäure	10918	18739	43367
2-Phenylethanol	84	131	332
$\delta$ -Decalacton	2178	2502	2449
$\delta$ -Dodecalacton	3017	4836	5136
Phenylelessigsäure	245	1192	2009

<sup>a)</sup> Konzentrationen in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in der Trockenmasse (i.Tr.) aus Doppelbestimmungen

**Zusammenfassend** ist zu sagen, dass sich die Bildungsverläufe der 16 ausgewählten Aromastoffe im Vergleich von Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch in Ihren Tendenzen nicht unterschieden. 13 Aromastoffe zeigten in beiden Käsevarietäten eine stetige Konzentrationszunahme. Besonders charakteristisch zeigten sich die Konzentrationsverläufe von 3-Methylbutanal und 2,3-Butandion, die in der 30-wöchigen Reifungszeit unabhängig von der Milchbehandlung der Käse ein Maximum durchliefen. Parallel verlief auch die Konzentrationsentwicklung der beiden  $\delta$ -Lactone in den Gouda-Käsen, die sich jeweils durch ein Plateauniveau auszeichnete (vgl. **Tabellen 20 - 23**).

### 2.3.3 Diskussion zum Bildungsverlauf wichtiger Aromastoffe in Gouda-Käse

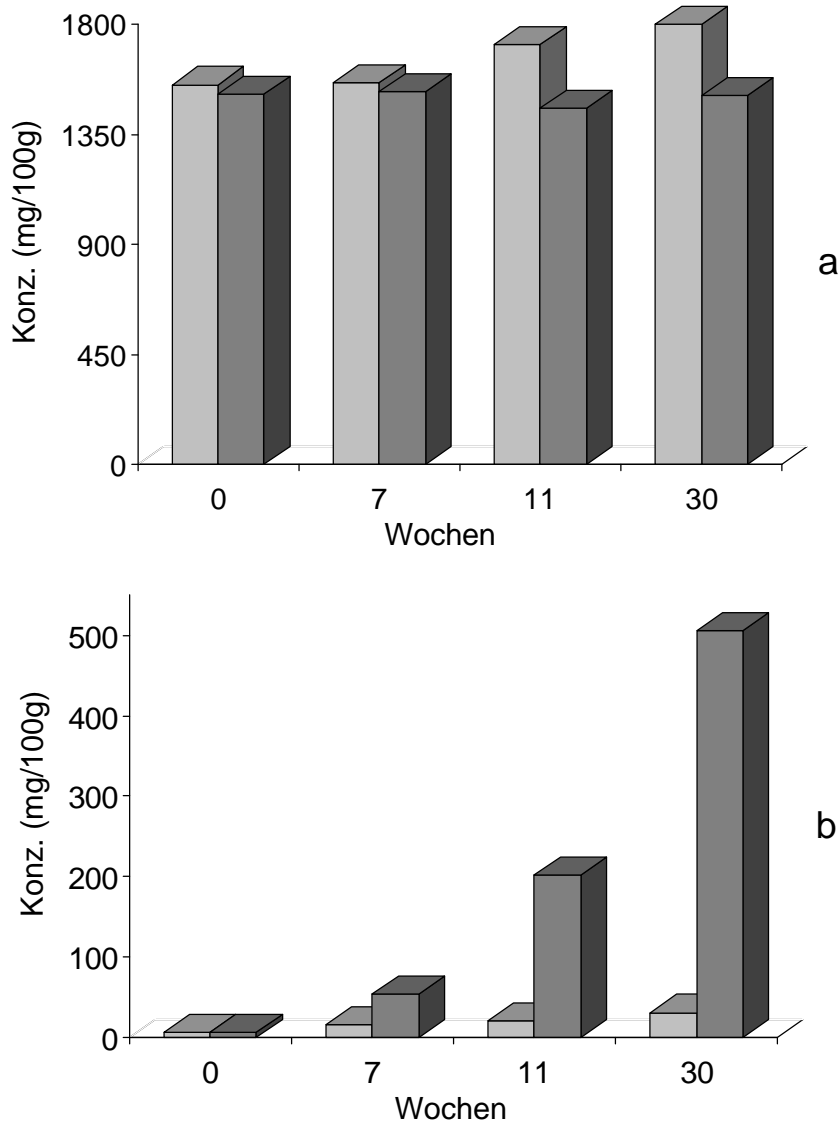
Die aus den quantitativen Daten der Aromastoffe in Gouda-Käse ersichtlichen unterschiedlichen **Konzentrationsentwicklungen** über die Reifungsdauer von 30 Wochen, die innerhalb einzelner Verbindungen und Verbindungsgruppen charakteristisch waren, werden im Folgenden anhand von biochemischen Parametern, Literaturwerten und Literaturerkenntnissen diskutiert. Zur detaillierten Diskussion der absoluten Konzentrations- und Aromaunterschiede zwischen Gouda aus pasteurisierter Milch und Rohmilch siehe Abschnitt **2.2.2.4**.

#### L- und D-Lactat: Biomarker für die Reifung

L- und D-Lactat, die Schlüssel-Stoffwechselprodukte von Milchsäurebakterien darstellen (*Marilley und Casei, 2004*), wurden im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch in allen Reifungsstufen enzymatisch bestimmt (vgl. **3.9.2**). Die Milchsäure ist ein Biomarker, der die mikrobielle Aktivität im Käse sehr gut widerspiegelt. Vor allem die differenzierte Betrachtung von L- und D-Lactat gibt Hinweise auf eine Aktivität von Starterbakterien und Nicht-Starterbakterien (NSLAB). Wie bereits unter **2.2.2.4** erläutert, sind NSLAB im Gegensatz zu den Starterkulturen vermehrt in der Lage, D-Lactat direkt aus Lactose oder über eine Racemisierung von L-Lactat zu bilden (*Mc Sweeney, 2004; Mc Sweeney und Fox, 2004*).

**L-Lactat** zeigt im untersuchten Gouda-Käse bereits 24 h nach der Dicklegung (= 0 Wochen Reifung) hohe Konzentrationen in beiden Käsen. Die Konzentration bleibt im Reifungsverlauf in beiden Käsen konstant hoch und nehmen im Käse aus pasteurisierter Milch leicht zu (**Abbildung 30**). Die hohe L-Lactat-Konzentration zu Beginn der Reifung spiegelt v.a. die frühe und hohe Aktivität der Starterkulturen wider, die im Reifungsverlauf nur unerheblich zuzunehmen scheint.

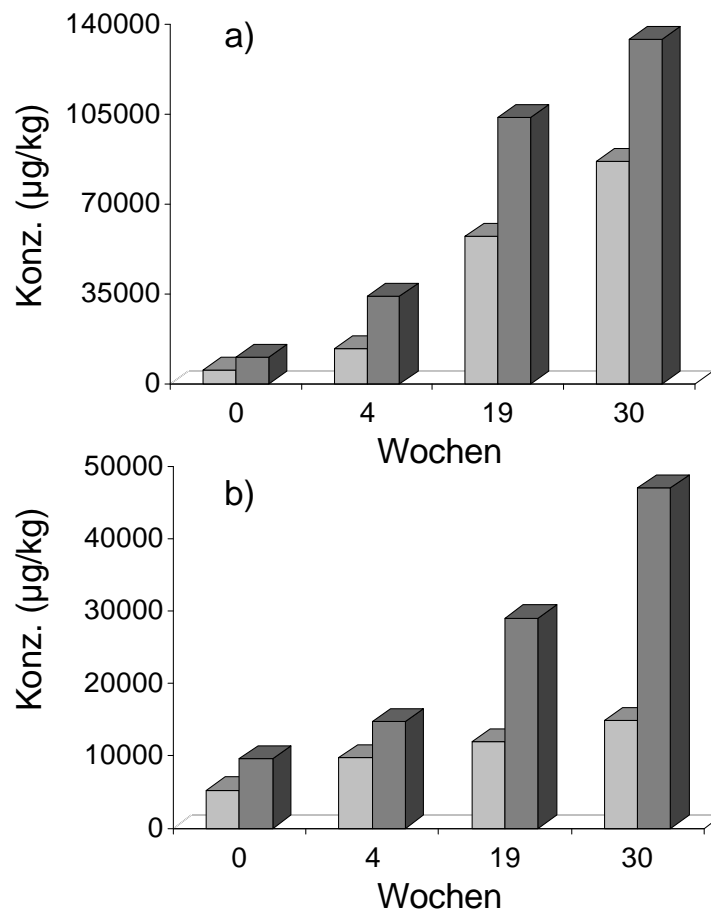
Betrachtet man dagegen die Konzentrationen an **D-Lactat** im Verlauf der Reifung über 30 Wochen, so zeigt sich sowohl für Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch als auch für den Rohmilch-Gouda ein kontinuierlicher Anstieg, der jedoch in Letzterem überproportional höher ausfiel (**Abbildung 30**). Dies bestätigte die Annahme, dass im Rohmilch-Gouda eine Population an NSLAB aktiv war, die erst mit zunehmender Reifungszeit größere Mengen an D-Lactat bildete.



**Abbildung 30:** Konzentrationsverlauf von L-Lactat (a) und D-Lactat (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) im Reifungsverlauf

### Bildungsverlauf von kurzkettigen Fettsäuren

Die kurzen geradkettigen Fettsäuren zeigten in beiden Gouda-Varietäten einen konstanten Konzentrationsanstieg während der Reifung. Der Gehalt an Butter- und Hexansäure nahm innerhalb von 30 Wochen jeweils auf das Vierfache zu (**Abbildung 31**).



**Abbildung 31:** Konzentrationsverläufe von Buttersäure (a) und Hexansäure (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) im Reifungsverlauf

*Kanawija et al. (1995)* stellten in Gouda ebenfalls einen kontinuierlichen Anstieg der gesamten freien Fettsäuren (FFA) im Reifungsverlauf fest. In einem konventionell hergestellten Gouda-Käse stieg der Gesamtgehalt an freien Fettsäuren innerhalb von acht Monaten um das Vierfache von 4,80 mMol/kg Käsefett auf 20,12 mMol/kg Käsefett.

Einen Anstieg der freien Fettsäuren (FFA) in Gouda-Käse, insbesondere der Fettsäuren der Kettenlänge C6-C9, beobachteten auch *Alewijn et al. (2005)*. In einer Reifungsperiode von 96 Wochen stieg der Gehalt aller FFAs (C6-C18) mit einer durchschnittlichen Rate von 6 mg/kg i.d.Tr. pro Woche. Im Rahmen dieser Arbeit lagen die Raten der FFAs (C4, C5, C6) in 30 Wochen bei ca. 3 - 5 mg/kg i.d.Tr. pro Woche, abhängig von der Milchpasteurisierung.



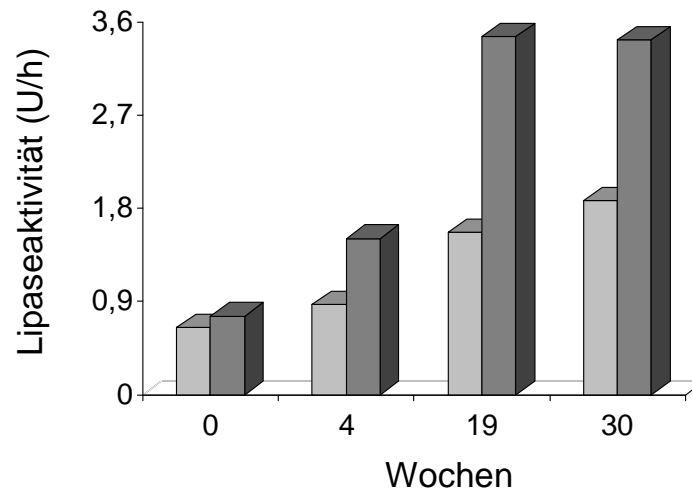
Die wissenschaftliche Auffassung über den Ursprung der freien Fettsäuren (FFA) bei der Käsereifung findet sich im Review von *Collins et al. (2003)* wieder. Demnach könnten Lipasen verschiedenen Ursprungs (endogen, exogen oder mikrobiellen Ursprungs) durch Spaltung der Triacylglyceride die freien Fettsäuren (FFA) bilden.

*Albenzio et al. (2001)* bestimmten in Canestrato Pugliese-Käsen die Lipaseaktivität über die Fettsäurefreisetzung aus Tributyrin (U = Milliequivalente/h) und beobachteten einen stetigen Anstieg dieser über drei Reifungsstufen (**Tabelle 24**).

**Tabelle 24:** Lipaseaktivitäten (U/g Käse) in Canestrato Pugliese Käsen in drei Reifungsstufen nach *Albenzio et al. (2001)*

Käsevariante	Lipaseaktivität (U/g)		
	Reifungstage		
	1	28	63
Rohmilchkäse	5,2	9,4	16,2
Käse aus pasteurisierter Milch	4,3	6,2	10,1

Diese Beobachtung wurde durch die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Lipaseaktivitäten in den Käsevarietäten nach Gouda-Art bestätigt (vgl. **3.9.4**). Dabei stieg die Lipaseaktivität während der Reifung sowohl in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch als auch im Rohmilch-Gouda an. Nach zwei Dritteln der Reifungszeit war kein Anstieg der Lipaseaktivität mehr zu beobachten. Sie blieb konstant hoch, was auf eine Stagnation der lipolytisch aktiven Bakterienpopulation hinweist (**Abbildung 32**).



**Abbildung 32:** Lipaseaktivitäten in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) im Reifungsverlauf

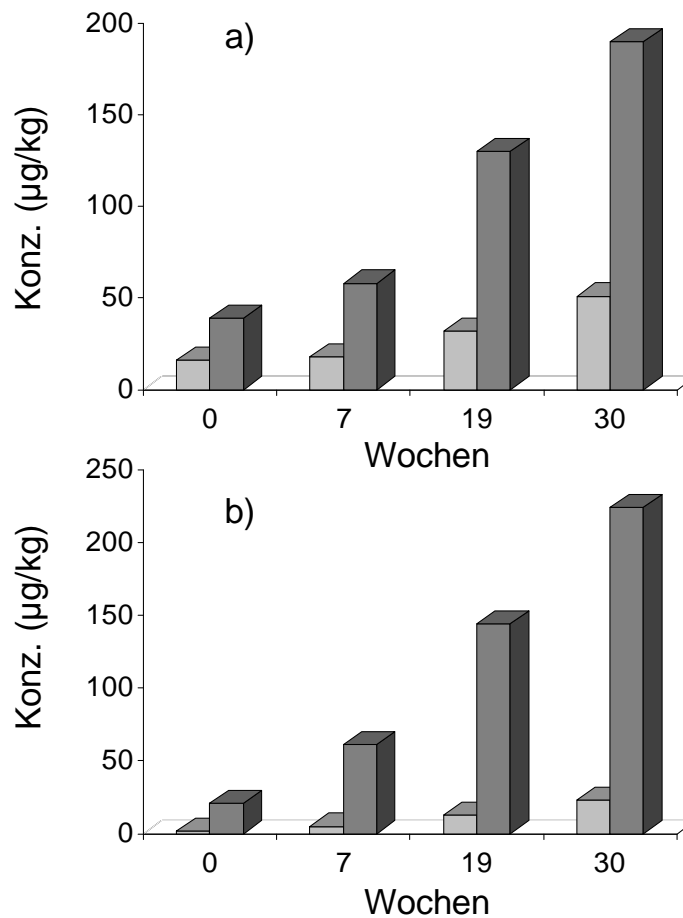
### Bildung von Ethylestern aus unverzweigten Fettsäuren

Analog der freien Fettsäuren entwickelten sich im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten auch Ethylester während der Reifung in den untersuchten Gouda-Käsen. Die Konzentrationen an Ethylbutanoat und Ethylhexanoat stiegen im Reifungsverlauf kontinuierlich an (**Abbildung 33**).

*Neeter et al. (1996)* detektierten in einem sechswöchig gereiften Gouda-Käse ebenfalls Ethylbutanoat und Ethylhexanoat und fanden diese Verbindungen nach sechsmonatiger Reifung in höheren Konzentrationen.

In einem Manchego-Käse, hergestellt aus pasteurisierter Milch sowie aus Rohmilch, beobachteten *Fernandez-Garcia et al. (2002)* einen kontinuierlichen Konzentrationsanstieg von Ethylbutanoat und Ethylhexanoat sowie von drei weiteren Ethylestern über die Reifungszeitpunkte von drei, sechs und neun Monaten.

*Alewijn et al. (2005)* stellten während der Reifung einen linearen Anstieg der Gesamtkonzentration an Ethylestern (C6-C16) innerhalb von 96 Wochen fest. Sie vermuteten, dass dafür eine Esterase verantwortlich sei, die Fettsäuren freisetzen und ihre Ethylester bilden könne.



**Abbildung 33:** Konzentrationsverläufe von Ethylbutanoat (a) und Ethylhexanoat (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) im Reifungsverlauf

Van Leuven et al. (2008) bestimmten Ethylhexanoat in einem vier und zehn Monate gereiften Gouda-Käse und ermittelten dabei einen Konzentrationsanstieg von 10,0 µg/kg auf 17,3 µg/kg.

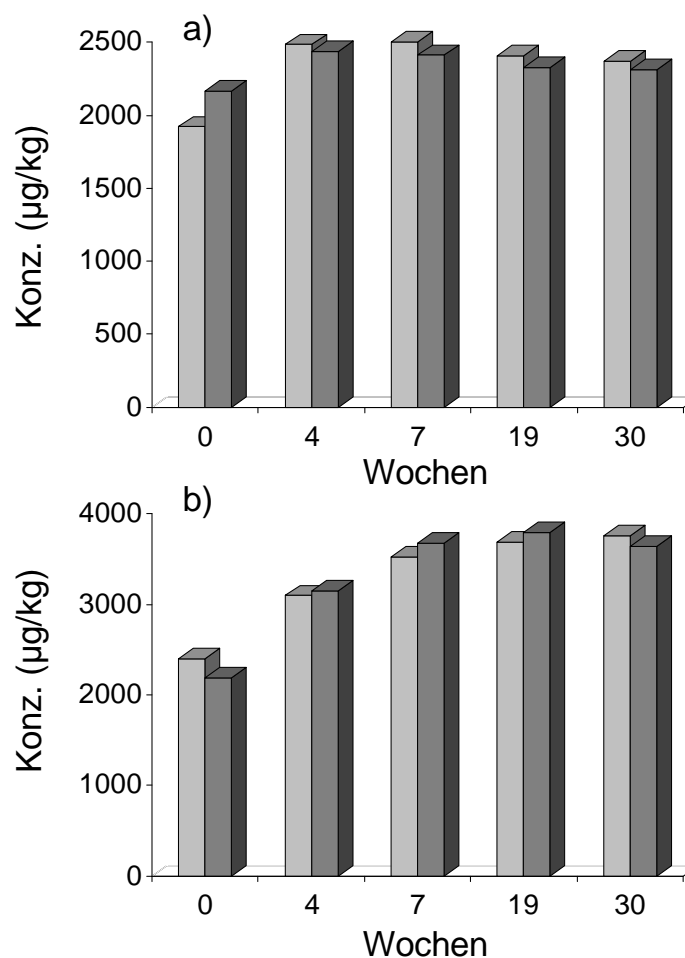
In der Zusammenfassung von Liu et al. (2004b) wird deutlich, dass die anerkannte Auffassung der Esterbiosynthese in Käse einen Zweischritt-Mechanismus darstellt, der die Freisetzung von Fettsäuren (FFAs) durch Hydrolyse (Lipolyse) und anschließende Veresterung derselben mit einem Alkohol umfasst, die durch Esterasen katalysiert wird. Liu et al. (1998) zeigten dies in vitro für die Bildung von Ethylbutanoat aus Buttersäure und Ethanol durch Stämme von *Lactococcus lactis subsp. Lactis* und *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*, die auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden (vgl. 3.1.2).

## 2 Ergebnisse und Diskussion

Demgegenüber zeigten *Liu et al. (2004a)* auch die Möglichkeit einer direkten Übertragung eines Säurerestes auf einen Alkohol (Alkoholyse) ohne Säurefreisetzung. Dies gelang bei Stämmen von *Streptococcus thermophilus* und *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*, die ebenfalls in der Starterkultur des hier untersuchten Goudas enthalten waren (vgl. 3.1.2). Diese Transferase-Reaktion erfolgte nach *Liu et al.* allerdings im wässrigen Medium.

### Bildung von Lactonen

Betrachtet man die Konzentrationsverläufe der  $\delta$ -Lactone (C10 und C12), so war festzustellen, dass nach einem Konzentrationsanstieg innerhalb der ersten 7 -11 Wochen der Reifung ein Plateau-Niveau erreicht wurde (**Abbildung 34**). Diese Konzentrationsverläufe unterschieden sich somit eindeutig von den untersuchten freien Fettsäuren und ihrer Ethylester.

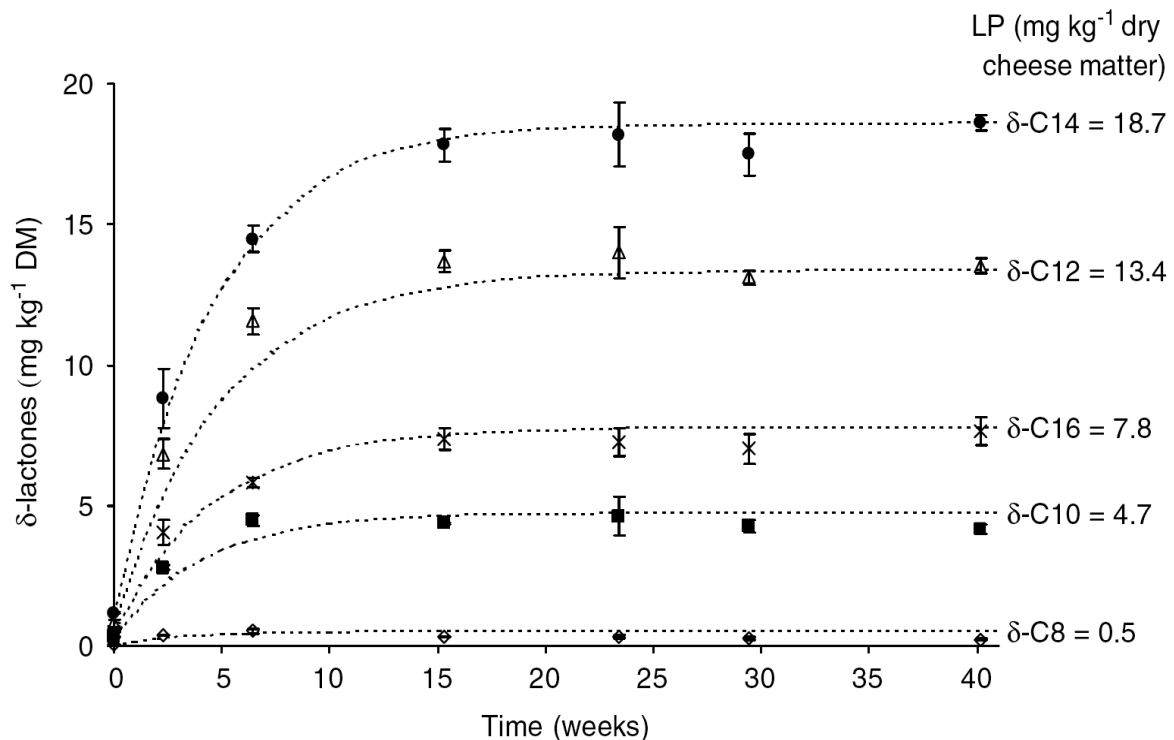


**Abbildung 34:** Konzentrationsverläufe von  $\delta$ -Decalacton (a) und  $\delta$ -Dodecalacton (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) im Reifungsverlauf

Die gezeigten Konzentrationsverläufe (**Abbildung 34**) bestätigten die Daten von *Alewijn et al. (2005)*, die eine analoge Entwicklung für die Gesamtkonzentration von  $\delta$ -Lactonen mit der Kettenlänge C6-C18 in Gouda-Käse zeigten. Dabei stieg der Gehalt im Käse innerhalb von 96 Wochen von 3 mg/kg i.d.Tr. auf ca. 50 mg/kg i.d.Tr., wobei diese Plateaukonzentration nach 20 Wochen Reifung erreicht wurde. Dies entspricht für 9 Lactone (C6-C18) einer Zunahme von ca. 0,5 mg/kg i.d.Tr. pro Woche und pro Lacton durchschnittlich einer Zunahme von ca. 0,05 mg/kg i.d.Tr. pro Woche. Im Rahmen dieser Arbeit stieg die Konzentration der  $\delta$ -Lactone pro Lacton durchschnittlich um 0,03 mg/kg i.d.Tr. pro Woche.

*Alewijn et al. (2007)* stellten detailliert die Konzentrationsentwicklung der  $\delta$ -Lactone C8 bis C14 in einem typischen Gouda-Käse dar (**Abbildung 35**). Sie schlugen als Bildungsmechanismus eine **direkte Lactonisation** von Hydroxyfettsäuren vor, der keine Hydrolyse der Fettsäure aus dem Triglycerid vorausgehen sollte (vgl. 2.1.3).

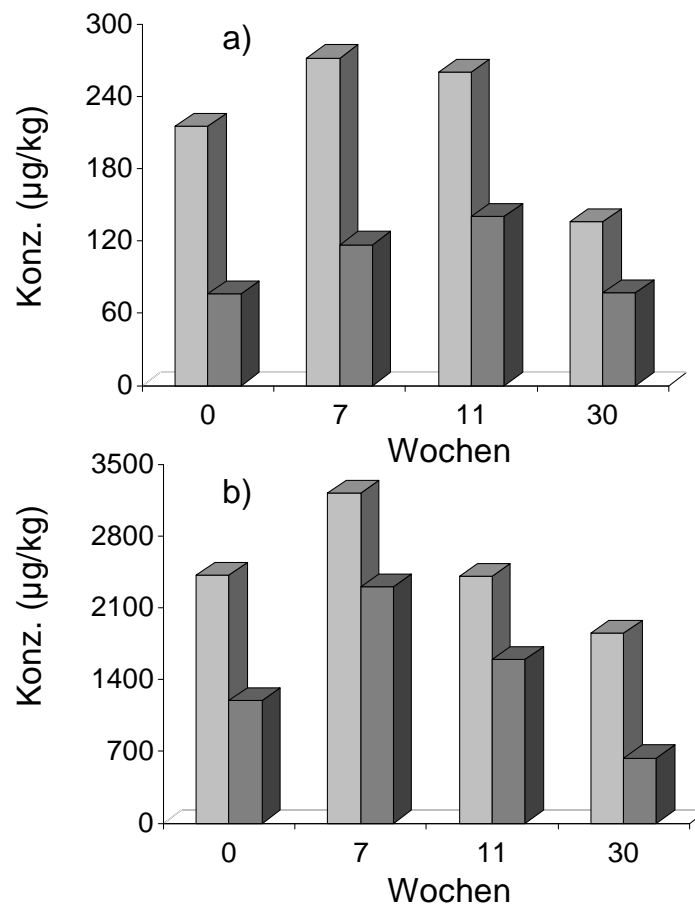
Gegen eine direkte Korrelation zwischen freien Fettsäuren bzw. Lipaseaktivität und Lactonbildung spricht auch der Befund, dass sich ein höherer Fettsäuregehalt bzw. höhere Lipaseaktivitäten im untersuchten Gouda-Käse aus Rohmilch nicht auf die Lactonbildung in dieser Käsevariante auswirkte (vgl. **Abbildung 31, 32**).



**Abbildung 35:** Bildungsverlauf von  $\delta$ -Lactonen während der Gouda-Reifung (*Alewijn et al., 2007*)

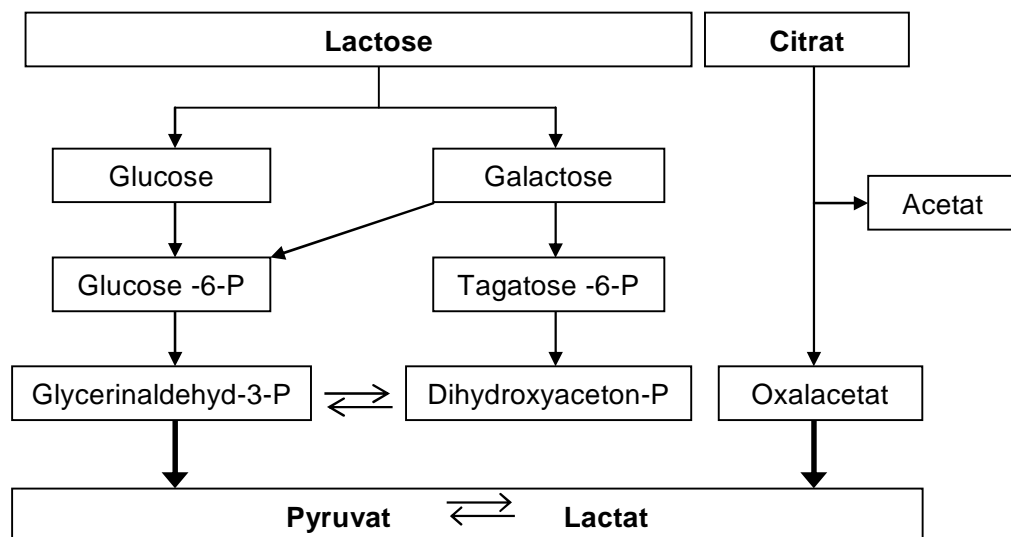
### Bildung anderer Aromastoffe

Für die leichtflüchtigen Verbindungen **3-Methylbutanal** und **2,3-Butandion** zeigte sich in den untersuchten Gouda-Käsen derselbe Konzentrationsverlauf. Wie bei den Lactonen durchliefen diese Aromastoffe nach sieben bzw. vier Wochen ein Konzentrationsmaximum. Es folgte eine stetige Abnahme der Gehalte im weiteren Reifungsverlauf (**Abbildung 36**), die auf der leichtflüchtigen Eigenschaft dieser Aromastoffe beruhen kann in Verbindung mit der Tatsache, dass 3-Methylbutanal und 2,3-Butandion mit zunehmender Reifungsdauer nicht mehr nachgebildet wurden.



**Abbildung 36:** Konzentrationsverläufe von 3-Methylbutanal (a) und 2,3-Butandion (b) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) im Reifungsverlauf

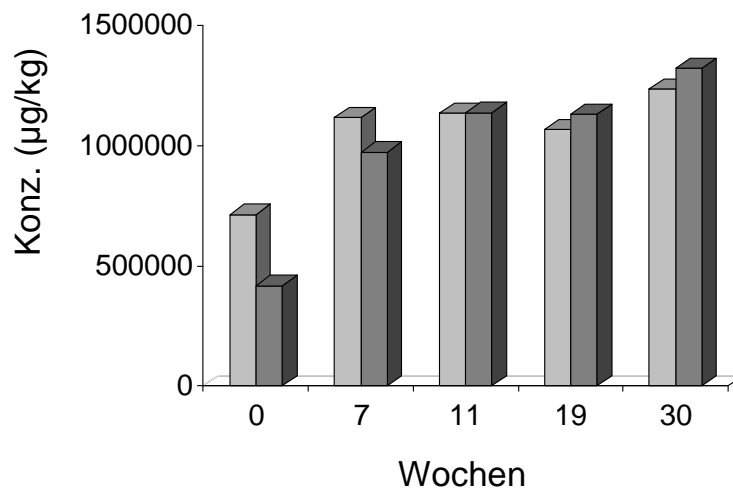
**2,3-Butandion** (Diacetyl) stammt aus dem Pyruvat-Stoffwechsel (*Amarita et al., 2001*). Pyruvat ist ein Schlüsselintermediat biochemischer Vorgänge, dessen Ursprung hauptsächlich im Kohlenhydratstoffwechsel (Abbau von Lactose und Citrat) zu finden ist (**Abbildung 36**). Besonders im hier untersuchten Gouda-Käse war von einer Citrat-Verwertung citrat-positiver Starter-Bakterien ( $\text{Cit}^+$ ), wie *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* auszugehen (vgl. **3.1.2**; *Mc Sweeney und Fox, 2004*). Unter Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -markiertem L-Aspartat zeigten *Le Bars und Yvon (2008)* für *Lactococcus lactis* (vgl. **3.1.2**) hingegen einen Metabolismus aus einer Aminosäure, der u.a. auch zu Diacetyl führte.



**Abbildung 36:** Kohlenhydratabbau durch Käse-Mikroorganismen zu Pyruvat modifiziert nach *Marilley und Casei (2004)*

**Essigsäure**, die schon zu Beginn der Reifung v.a. im Gouda aus pasteurisierter Milch in einer erheblichen Konzentration vorhanden war, zeigte im Reifungsverlauf, abgesehen von einem Zwischenplateau, einen kontinuierlichen Anstieg (**Abbildung 37**).

*Califano et al. (2000)* beschrieben im Reifungsverlauf von Gouda-Käse ebenfalls einen stetigen Anstieg der Essigsäure von ca. 850 mg/kg auf 2400 mg/kg Käse innerhalb von 80 Tagen.



**Abbildung 37:** Konzentrationsverläufe von Essigsäure in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) im Reifungsverlauf

Die bakterielle Essigsäurebildung (Acetat) steht in Käse, wie für 2,3-Butandion bereits erläutert, ebenso dem Pyruvat-Stoffwechsel in Zusammenhang, weshalb auch ihre Bildungswege als komplex zu sehen sind. Zusätzlich kann Acetat bereits beim Citrat-Abbau zum Pyruvat via Oxalacetat abgespalten werden (*Mc Sweeney und Fox, 2004; Abbildung 36*).

Die hohen Essigsäuregehalte zu Beginn der Reifung korrelieren mit den gleichzeitig hohen L-Lactat-Gehalten (vgl. **Abbildung 31**) zum Reifungszeitpunkt von 0 Wochen, was ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang des Pyruvat- bzw. Lactat-Stoffwechsels mit der Acetatbildung ist.

### **Bildung von Aromastoffen aus „parent“-Aminosäuren**

Der Reifungsverlauf derjenigen Aromastoffe, die auf einen Abbau von strukturverwandten Aminosäuren („parent“-Aminosäuren) zurückgeführt werden können, ist für drei Reifungsstufen in **Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch** in **Tabelle 24** zusammengefasst. Außer für das bereits gezeigte 3-Methylbutanal stiegen die Konzentrationen dieser Aromastoffe während der 30-wöchigen Reifung stetig an, wobei die Konzentrationen der Säuren deutlich höher waren.



**Tabelle 24:** Konzentrationen von 7 Aromastoffen in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch nach 0, 11 und 30 Wochen Reifung

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.Tr.) <sup>a)</sup> in Käse nach		
	0	11	30
	Wochen Reifung		
3-Methylbutanal	215	260	136
3-Methylbutanol	99	165	251
3-Methylbuttersäure	622	33055	37548
2-Methylbuttersäure	90	4038	5836
2-Methylpropansäure	466	11271	16201
2-Phenylethanol	144	278	318
Phenyllessigsäure	624	1221	1899

<sup>a)</sup> Konzentrationen in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in der Trockenmasse (i.Tr.) aus Doppelbestimmungen

Stellt man den gezeigten Aromastoffkonzentrationen die Konzentrationen der zugehörigen freien „parent“-Aminosäuren im Gouda-Käse gegenüber, so korrelieren die konstanten Konzentrationsanstiege (**Tabelle 25**).

**Tabelle 25:** Konzentrationen von „parent“-Aminosäuren in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch nach 0, 11 und 30 Wochen Reifung

Aminosäure	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.Tr.) <sup>a)</sup> in Käse nach		
	0	11	30
	Wochen Reifung		
Leucin	867	4446	5927
Isoleucin	161	1003	2650
Valin	575	3740	7045
Phenylalanin	347	1727	2704

<sup>a)</sup> Konzentrationen in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in der Trockenmasse (i.Tr.) aus Doppelbestimmungen

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

Neeter *et al.* (1996) fanden nach sechsmonatiger Reifung ebenfalls höhere Gehalte u.a. an 3-Methylbutanol in Gouda-Käse als nach sechswöchiger Reifung.

Ein differenziertes Bild zeigte sich in Untersuchungen von Ayad *et al.* (2003). Abhängig von der Zusammensetzung der Starterkultur konnten nach 4, 8 und 12 Wochen entweder kontinuierliche Anstiege oder kontinuierliche Abnahmen der Konzentration an 3-Methylbutanal (ausgedrückt als integrierte Peakflächen) festgestellt werden.

Van Leuven *et al.* (2008) quantifizierten in Gouda-Käse u.a. 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und Phenylethanol nach 6-wöchiger, 4-monatiger und 10-monatiger Reifung. Dabei stiegen die Konzentrationen für 3-Methylbutanal und 2-Phenylethanol im Gegensatz zu 3-Methylbutanol stetig an (**Tabelle 26**).

**Tabelle 26:** Konzentrationen flüchtiger Verbindungen verschieden gereifter Gouda-Käse (van Leuven *et al.*, 2008)

Flüchtige Verbindung	Gehalt im Gouda [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]		
	6 Wochen	4 Monate	10 Monate
3-Methylbutanal	9	37	46
3-Methylbutanol	27	51	27
2-Phenylethanol	11	29	59

Beim Vergleich der Aromastoff-Konzentrationen in **Gouda-Käse aus Rohmilch (Tabelle 27)** mit den zugehörigen Konzentrationen der freien „parent“-Aminosäuren in diesem Käse (**Tabelle 28**) zeigte sich analog zum Käse aus pasteurisierter Milch, dass mit konstant steigenden Aromastoff-Konzentrationen während der Reifung (Ausnahme 3-Methylbutanal) auch die Konzentrationen der freien Aminosäuren zunahmen. Wiederum zeigten die Säuren besonders hohe Gehalte im Gouda-Käse (vgl. **Tabelle 27**).

**Tabelle 27:** Konzentrationen von 7 Aromastoffen in Gouda-Käse aus Rohmilch nach 0, 11 und 30 Wochen Reifung

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.Tr.) <sup>a)</sup> in Käse nach		
	0	11	30
	Wochen Reifung		
3-Methylbutanal	76	140	77
3-Methylbutanol	32	102	154
3-Methylbuttersäure	661	15140	25715
2-Methylbuttersäure	67	1210	3323
2-Methylpropansäure	478	10348	16898
2-Phenylethanol	120	156	231
Phenyllessigsäure	241	1148	2395

<sup>a)</sup> Konzentrationen in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in der Trockenmasse (i.Tr.) aus Doppelbestimmungen

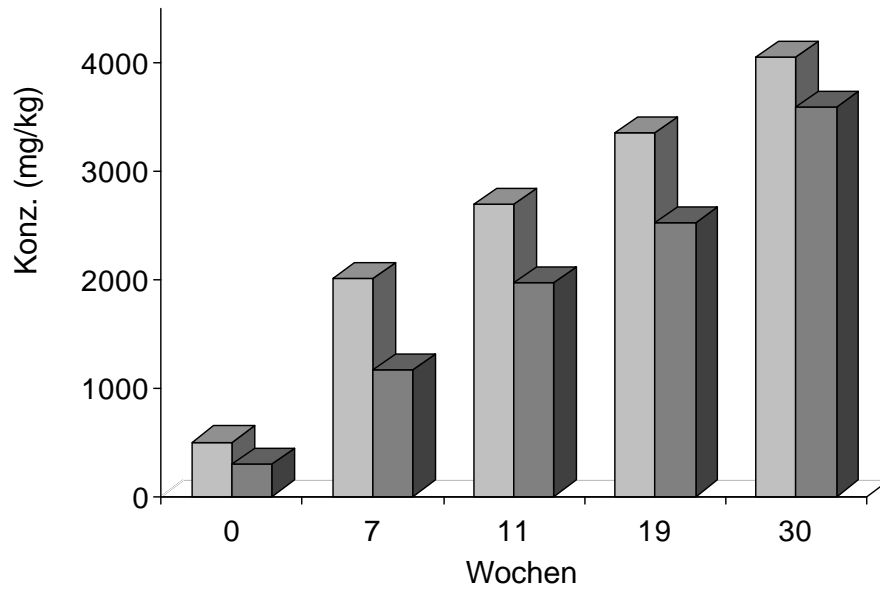
**Tabelle 28:** Konzentrationen von „parent“-Aminosäuren in Gouda-Käse aus Rohmilch nach 0, 11 und 30 Wochen Reifung

Aminosäure	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.Tr.) <sup>a)</sup> in Käse nach		
	0	11	30
	Wochen Reifung		
Leucin	524	3181	5212
Isoleucin	98	669	1923
Valin	402	2415	5023
Phenylalanin	272	1384	2317

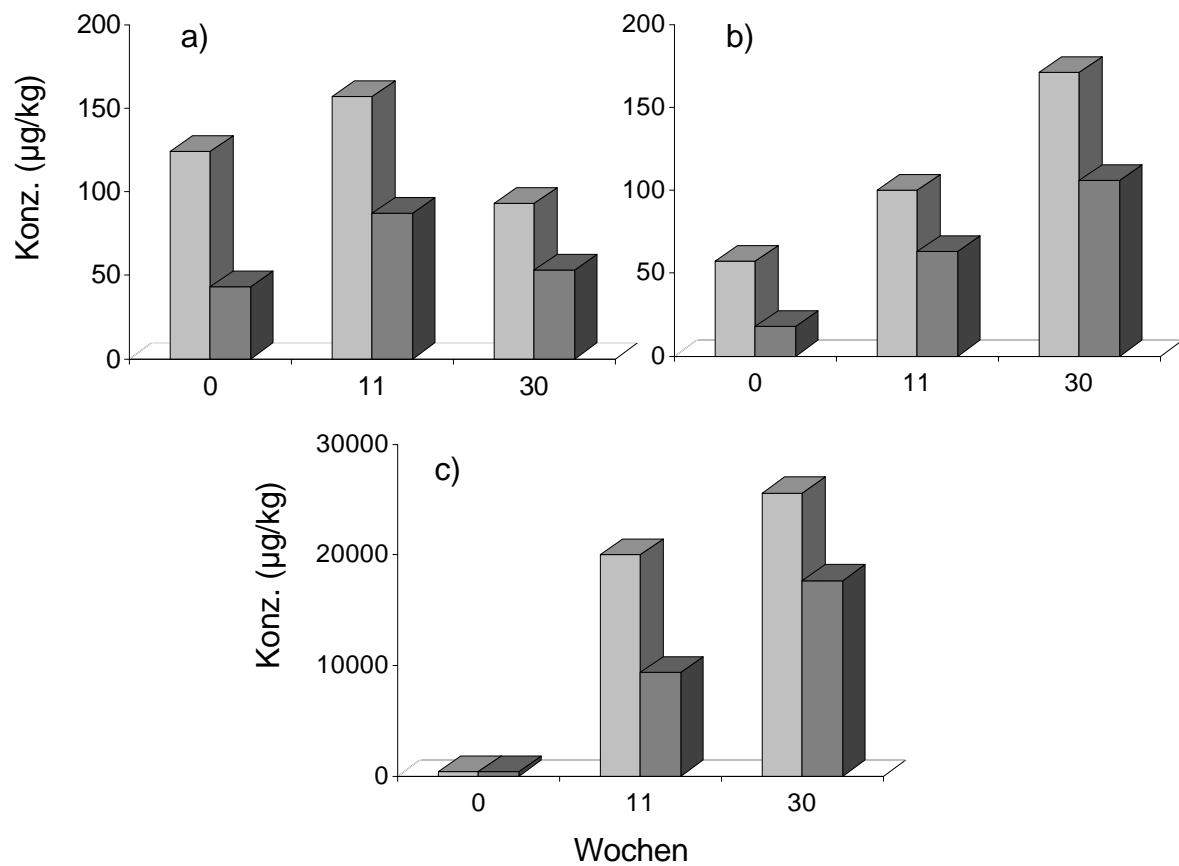
<sup>a)</sup> Konzentrationen in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] in der Trockenmasse (i.Tr.) aus Doppelbestimmungen

Ein weiterer Aspekt ist die Korrelation der Aromastoff- und Aminosäure-Konzentrationen beim Vergleich zwischen den Daten der Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch über den Reifungsverlauf. Für **L-Leucin** lagen sowohl die Konzentrationen dieser Aminosäure (**Abbildung 38**) als auch die zugehörigen Aromastoffe in ihren Gehalten im Käse aus pasteurisierter Milch in der gesamten Reifungszeit höher (**Abbildung 39**).

## 2 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 38:** Konzentrationsverläufe von L-Leucin in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) im Reifungsverlauf



**Abbildung 39:** Konzentrationsverläufe von 3-Methylbutanal (a), 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (■) und Rohmilch (■) im Reifungsverlauf

In Übereinstimmung mit der gezeigten Korrelation („parent“-Aminosäure / Aromastoffe) zeigten sich auch die Daten für Isoleucin und 2-Methylbuttersäure sowie für Phenylalanin und 2-Phenylethanol. Auch hier lagen jeweils die Aminosäure- und Aromastoff-Konzentrationen im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch im gesamten Reifungsverlauf höher (**Tabellen 24, 25**) als im Rohmilch-Gouda (**Tabellen 26, 27**).

Für 2-Phenylethylsäure und 2-Methylpropionsäure hingegen, deren Konzentrationen jeweils im Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch kaum Unterschiede im Reifungsverlauf zeigten, galt dieser Zusammenhang nicht. Dies könnte ein Hinweis auf andere Bildungswege dieser Aromastoffe im Gouda-Käse sein.

Die Umsetzung von freien Aminosäuren zu flüchtigen Verbindungen und Aromastoffen in Milchprodukten und Käse ist Gegenstand zahlreicher Reviews. *Yvon und Rijnen (2001)* vermuten, dass die Aminosäure-Umsetzung einen Hauptvorgang für die Aromabildung in Käse darstelle. Demnach sind aromatische Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan), methylverzweigte Aminosäuren (Leucin, Isoleucin und Valin) und Methionin die Vorstufen für ihre strukturverwandten Aromastoffe.

Sie werden dabei auf zwei Wegen umgesetzt, nämlich entweder durch **Transaminierung** (oxidative Aminierung) über eine  $\alpha$ -Ketosäure oder durch **Eliminierung** (insbesondere für Methionin). Für die in den **Tabellen 31 und 34** genannten Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin und Phenylalanin kommt nach *Yvon und Rijnen* demnach nur eine Transaminierung unter Beteiligung einer  $\alpha$ -Ketosäure als Aminogruppen-Akzeptor mit Hilfe einer Aminotransferase in Frage. Der Aminosäure-Abbau (Aminosäure-Gärung), der über eine  $\alpha$ -Ketosäure zunächst zum Aldehyd führt, ist als **Ehrlich-Mechanismus** bekannt. Für Hefen führt dieser Weg allerdings aufgrund einer hohen Aktivität der Alkoholdehydrogenase bevorzugt zum Alkohol (*Ehrlich, 1907; Hazelwood et al., 2008*). Nach Untersuchungen an Milchsäurebakterien ist die Alkoholbildung aus der Aminosäure allerdings durch Bildungswege zu anderen Aromastoffen zu ergänzen (*Yvon und Rijnen, 2001*).

Für L-Leucin ergibt sich nach *Smit et al. (2004)* ein Abbau-Schema, bei dem über 2-Keto-4-methylpentansäure neben Aromastoffen auch die Bildung einer Hydroxysäure (2-Hydroxy-4-methylpentansäure) in Betracht kommt.

Die Ergebnisse im untersuchten Gouda-Käse korrelieren mit der Vermutung, dass L-Leucin und andere Aminosäuren zu verschiedenen Aromastoffen in Käse umgesetzt werden. Eine

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

bevorzugte Alkoholbildung (3-Methylbutanol, 2-Phenylethanol) war nicht zu beobachten. Wie gezeigt, herrschte hingegen die Bildung von Säuren (u.a. 3-Methylbuttersäure) vor.

### 2.4 Modellversuche zur Bildung von Aromastoffen aus dem Aminosäurestoffwechsel

Um die Beteiligung des Aminosäurestoffwechsels an der Aromabildung zu beleuchten, wurde nach Entwicklung eines geeigneten Labormodells die Umsetzung der Aminosäure **L-Leucin** und des Intermediats **2-Keto-4-methylpentansäure** näher untersucht. Dabei sollten diese als stabilisotopenmarkierte Precursoren eingesetzt, unter käsenahen Bedingungen zu isotopenmarkierten Aromastoffen umgesetzt und anschließend mittels SIVA (vgl. 3.5) quantifiziert werden.

#### 2.4.1 Entwicklung eines Labormodells

Das Ziel war zunächst die Entwicklung eines Labormodells, in welchem, in Anlehnung an eine konventionelle Gouda-Herstellung (vgl. 1.2, 3.1.2), zugesetzte Aromastoff-Vorstufen unter realistischen Bedingungen umgesetzt wurden. Die letztliche Prozessführung des Labormodells ist als Ergebnis zahlreicher Vorversuche schematisch in der folgenden **Abbildung 40** dargestellt.

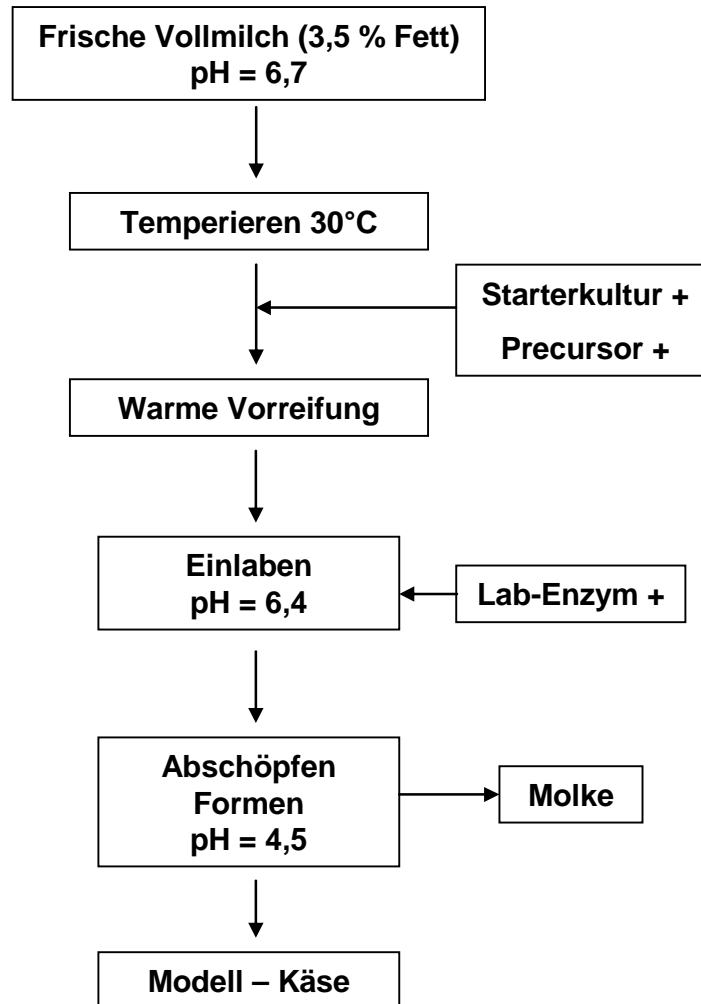
Das Fließschema zeigt den Ablauf des Reifungsmodells, wie es im Labormaßstab mit Milchmengen von 1 bis 2 Liter pro „Reaktionsansatz“ durchgeführt wurde. Die Prozessparameter wurden dabei so gewählt, dass sie möglichst genau den Parametern für die Herstellung eines Gouda-Käses aus pasteurisierter Milch entsprachen, wie er im Rahmen dieser Arbeit produziert wurde (vgl. 3.1.2).

So wurde eine pasteurisierte Vollmilch (3,5 %Fett) verwendet. Nach dem Temperieren der Milch, dem Zusatz der Starterkultur und des jeweiligen Precursors zum Reifungsansatz, wurde das Gemisch einer sogenannten „warmen Vorreifung“ unterzogen, bei der die Mikroorganismen vor der Labfällung begannen, v.a. Lactose und Citrat zu Milchsäure umzusetzen. Die Starterkultur war identisch zur Kultur, die für die reale Gouda-Produktion verwendet wurde (vgl. 3.1.2). Auch der Prozessschritt der warmen Vorreifung entsprach in Temperatur und Dauer den realen Bedingungen. Der leicht fallende pH-Wert auf 6,4 (**Abbildung 40**) war das Signal zur Caseinfällung (Einlaben), initiiert durch das jetzt zugefügte Lab-Enzym und unterstützt durch den weiter sinkenden pH-Wert. Auch das Lab-Enzym entsprach der Gouda-Herstellung gemäß 3.1.2. Zuletzt wurde die entstandene Gallerte (Käsebruch) in spezielle löchrige Käseformen gefüllt, wobei eine Separierung des

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

Käsebruchs und der Molke erfolgte (Molkeabzug). Der geformte Bruch diente als Käsemodell für die molekularen Untersuchungen zur Umsetzung von Aromastoffvorstufen.



**Abbildung 40:** Fließschema des Labormodells

### Bestimmung der L-Leucin-Gehalte im Modell

In Vorversuchen stellte sich heraus, dass es nicht möglich war, Precursoren in das bereits gefällte Casein so einzuarbeiten, dass diese zu nachweisbaren Gehalten an Aromastoffen umgesetzt wurden. Es war prozesstechnisch folglich unumgänglich die Precursoren bereits zum flüssigen Medium (Prozessmilch) zu dotieren (**Abbildung 46**). Im Falle von L-Leucin wurde zudem klar, dass die Aminosäure im Modell bereits nach der abgeschlossenen Labfällung in erheblicher Menge (ca. 130 mg/kg) aus der Milch gebildet wurde (**Tabelle 29**). Durch das folgende Trennen in den festen Bruch (Modell-Käse) und die



flüssige Molke wurde ein Teil des L-Leucins (Precursor und natürlicher Gehalt), das in der Molke gelöst war, wieder entfernt. Für weiterführende Untersuchungen und Berechnungen (vgl. 2.2.1.2) musste deshalb der L-Leucin-Gehalt im Verlauf der Prozessführung genau ermittelt werden.

Zu diesem Zweck dienten undotierte Ansätze, in welchen das natürlich gebildete L-Leucin vor und nach dem Molkeabzug sowie zur Kontrolle in der abgetrennten Molke bestimmt wurde. Ob eine Nachbildung des Precursors im Käsebruch (Modell-Käse) erfolgte, wurde in diesem nach sieben Tagen Reifung kontrolliert (**Tabelle 29**).

**Tabelle 29** Konzentration (mg/kg) von L-Leucin im Modellversuch vor und nach dem Molkeabzug in zwei getrennten Versuchen

FrISChe Vollmilch <sup>a)</sup>	Modell vor Molkeabzug	Molke	Modell ungerEIFt	Modell 7 Tage gereift	Leucin-Verlust <sup>b)</sup>
0,6	126	107	146	140	<b>42 %</b>
0,6	133	105	149	148	<b>40 %</b>

<sup>a)</sup> Die vermessenen Vollmilchproben stammen aus zwei verschiedenen Verpackungen derselben Charge Milch

<sup>b)</sup> Leucin-Verlust in [%] bezogen auf „Modell vor Molkeabzug“ und „Modell ungerEIFt“

Im Modell bildeten sich vor dem Molkeabzug ca. 130 mg/kg L-Leucin. Nach der Trennung in Bruch und Molke lagen ca. 106 mg/kg L-Leucin in der Molke und ca. 148 mg/kg L-Leucin im ungerEIFten Käsebruch vor. Folglich waren vom ursprünglichen L-Leucin Gehalt durchschnittlich 41 % mit der Molke entfernt worden. Bei der Kontrollbestimmung nach sieben Tagen der Reifung des Modellbruchs wurde deutlich, dass in diesem Zeitraum keine Nachbildung von L-Leucin erfolgte.

Unter der Voraussetzung, dass immer genauso viel L-Leucin gebildet wird und sich genauso viel in der Molke löst, wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen angenommen, dass unter genauer Einhaltung der Prozessparameter der natürliche L-Leucin-Gehalt im Käse-Modell, wie auch der „L-Leucin-Verlust“ in der Molke immer gleich ist. Das bedeutete auch, dass aus einer bekannten, zugegebenen Menge des markierten L-Leucins als Precursor vor der Dicklegung sein letzlicher Gehalt im Käsebruch (Modell-Käse) errechnet werden konnte. Diese Annahme musste auch deshalb getroffen

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

werden, weil in den anschließenden Dotierungsversuchen mit isotoopenmarkiertem L-Leucin, dieses in der Aminosäureanalyse vom natürlichen L-Leucin nicht unterscheidbar war.

Um diese Annahmen zu verifizieren, also die reproduzierbare Prozessführung zu kontrollieren, wurden die Wassergehalte aus mehreren undotierten und dotierten Ansätzen bestimmt (**Tabelle 30**). Die Werte zeigten, dass mit einem Durchschnittsgehalt von 78,6 % der Käsebruch reproduzierbare Wassermengen enthielt und die Durchführung der Modell-Käseherstellung wiederholbar durchzuführen war.

**Tabelle 30:** Wassergehalte des Käsebruchs (Modell-Käse) in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Modellversuche

Versuch <sup>a)</sup>	Wassergehalt in % <sup>b)</sup>
1	78,5
2	78,4
3	80,3
4	77,2
5	79,6
6	77,6
A	78,2
B	79,3

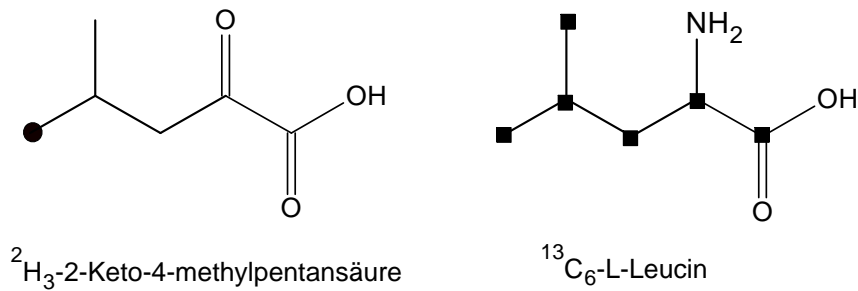
<sup>a)</sup> Versuche 1-3, 4-6: Dotierungsversuche mit den Precursoren <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-2-Keto-4-methylpentansäure und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-L-Leucin, die im Abstand von einer Woche durchgeführt wurden

Versuche A, B: Versuche zur Bestimmung des Leucin-Verlustes im Modell-Versuch

<sup>b)</sup> Wassergehalt in [%] aus Doppelbestimmungen nach **3.9.1** bestimmt

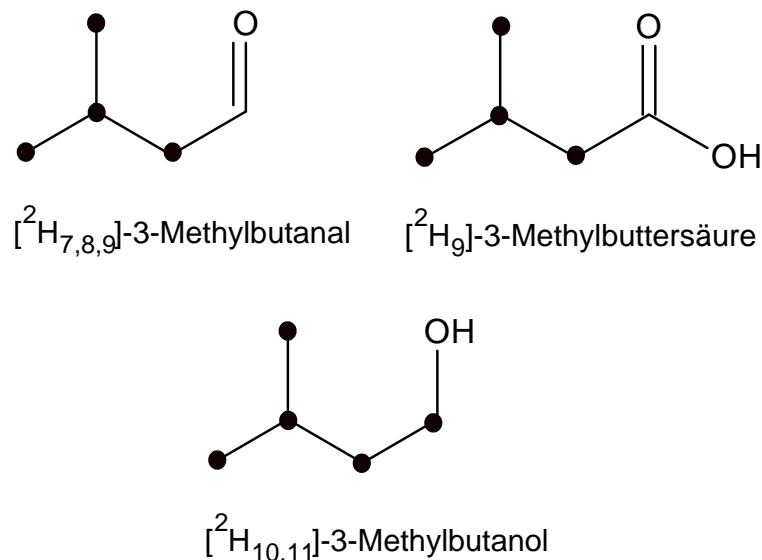
### 2.4.2 Dotierung mit Precursoren und Quantifizierung der Metabolite

Für die Modellversuche mit stabilisotopenmarkierten Aromastoff-Vorstufen (Precursoren) wurden im Rahmen dieser Arbeit die in **Abbildung 41** dargestellten Verbindungen verwendet (vgl. **3.2.3**). Es handelte sich dabei um die am Kohlenstoffatom 5 dreifach deuterierte  $\alpha$ -Ketosäure [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-2-Keto-4-methylpentansäure sowie um die durchgehend mit dem Kohlenstoff-Isotop <sup>13</sup>C-markierte Aminosäure [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-L-Leucin.



**Abbildung 41:** Isotopenmarkierte Precursoren in den Modellversuchen

Bei den getrennten Dotierungsversuchen mit  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin und  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure im Käsemodell wurde nach Zusatz des jeweiligen Precursors die Milch dickgelegt und in Molke und Käsebruch (Käsemodell) aufgetrennt. Der Bruch wurde nach kurzer Lagerung von 24 Stunden aufgearbeitet (vgl. 3.4.1) und mittels SIVA (TDGC-MS, vgl. 3.6.3, 3.7.5) untersucht. Als **interne Standards** bei der Aufarbeitung dienten die in **Abbildung 42** dargestellten deuterierten Verbindungen.



**Abbildung 42:** Stabilisotopenmarkierte Standards zur Quantifizierung der Aminosäure-Metabolite

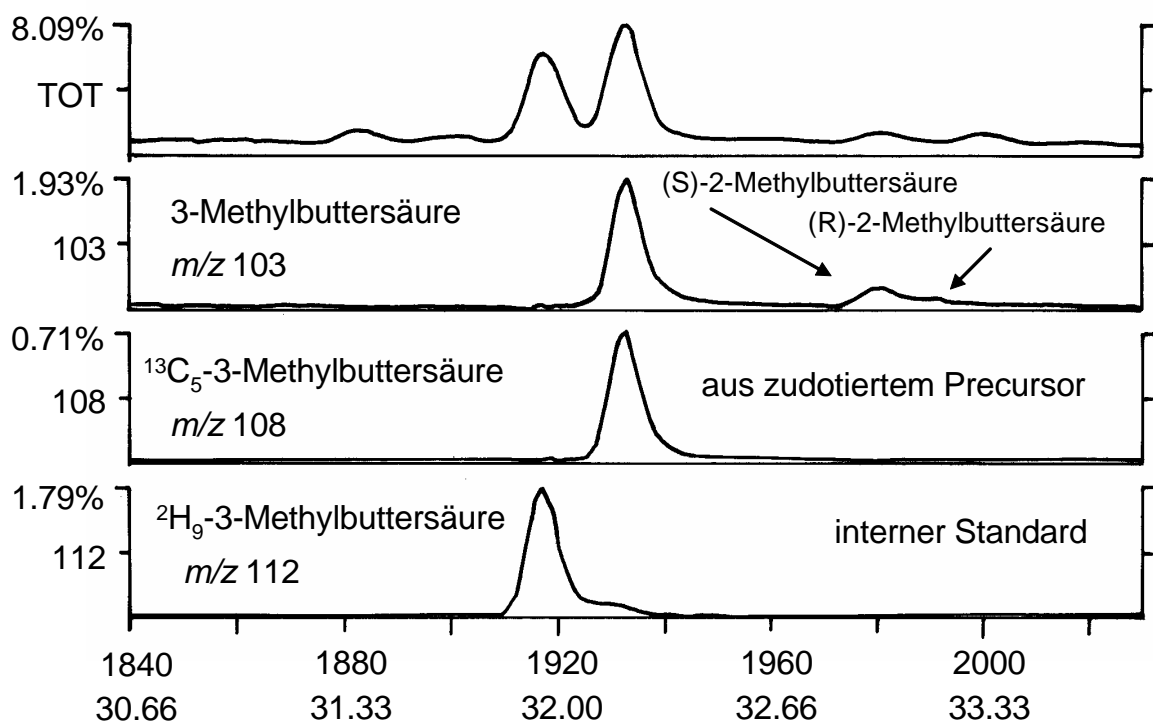
## 2 Ergebnisse und Diskussion

Die deuterierten Standards wurden so gewählt, dass ihr **Markierungsgrad** und damit ihr Massenunterschied im Vergleich zu unmarkierten Metaboliten und den 3-fach bzw. 5-fach markierten Metaboliten aus den dotierten Precursoren groß genug war, um eindeutige Quantifizierungen durchführen zu können.

Quantifiziert wurden jeweils die potentiell aus den natürlichen Precursoren (L-Leucin oder 2-Keto-4-methylpentansäure) und den dotierten, markierten Precursoren ( $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin oder  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure) stammenden Aromastoffe **3-Methylbutanal**, **3-Methylbutanol** und **3-Methylbuttersäure**. Zu jedem Dotierungsversuch wurde parallel ein Blindversuch ohne Dotierung durchgeführt.

### Massenspuren bei der SIVA mittels TDGC-MS

Die Massenspuren bei der TDGC-MS, welche in den **Dotierungsversuchen mit  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin** für 3-Methylbuttersäure erhalten wurden, zeigt beispielhaft **Abbildung 43**.



**Abbildung 43:** Massenspuren des Metaboliten 3-Methylbuttersäure und des internen Standards nach Dotierung der Käseemilch mit  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin

Neben dem Totalionenstrom (TOT) sind die Massenspuren  $m/z = 103$  für die natürliche 3-Methylbuttersäure (sowie (S)- und (R)-2-Methylbuttersäure),  $m/z = 108$  für  $^{13}\text{C}_5$ -3-Methylbuttersäure aus der zudotierten Vorstufe und  $m/z = 112$  für den internen Standard  $^2\text{H}_9$ -3-Methylbuttersäure zu sehen. Dabei wird auch deutlich, dass Moleküle mit  $^{13}\text{C}$ -Gehalten ohne Retentionszeit-Verschiebung detektiert wurden, wohingegen deuterierte Metabolite oder Standards aufgrund der geringeren Polarisierbarkeit der Verbindung (*Gant und Yang, 1964*), schwächerer H-Brückenbindungen und Siedepunktunterschieden mit steigendem Markierungsgrad im Vergleich zur unmarkierten Verbindung früher eluiert werden (**Abbildung 43**).

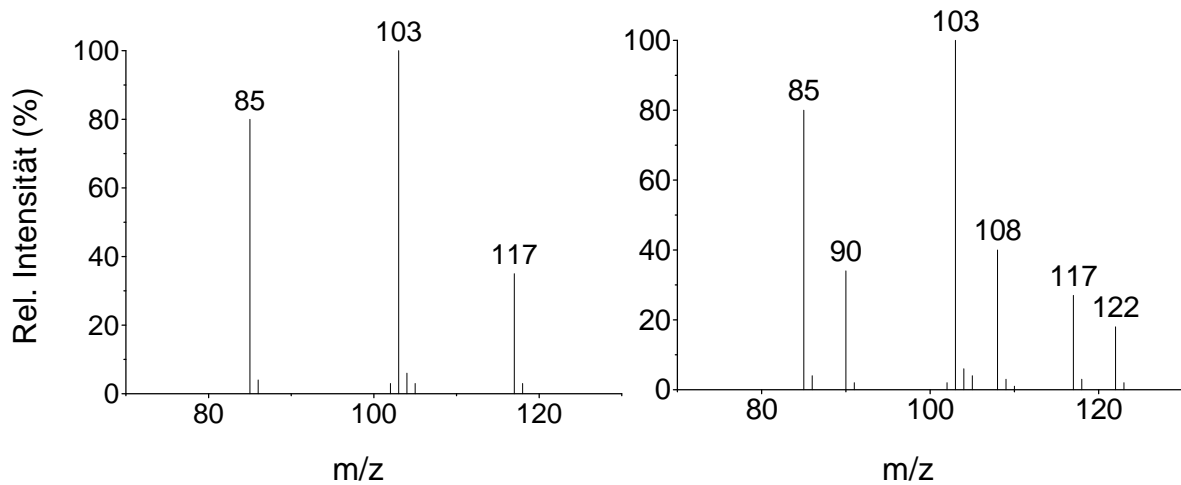
Im Rahmen der Dotierungsversuche konnte das analytische Problem gelöst werden, dass die isomeren 2- und 3-Methylbuttersäure auf den gängigen GC-Säulen (FFAP, OV-1701) nicht getrennt werden können, weshalb ihre Gehalte bisher indirekt bestimmt werden mussten (vgl. **3.5.5**).

Durch die Verwendung einer chiralen GC-Säule im zweiten Ofen bei der TDGC-MS (BGB 176, vgl. **3.6.3**) konnten die auf einer FFAP-Säule nicht trennbaren 2- und 3-Methylbuttersäure eindeutig aufgetrennt werden. Die Chiralität der GC-Säule ermöglichte zuvorderst die Trennung der Enantiomere R- und S-2-Methylbuttersäure, von denen natürlicherweise das S-Enantiomer vorherrschte (**Abbildung 43**), sodass die Trennung der 2- und 3-Methylbuttersäure einen Nebeneffekt darstellte.

Die quantitative Auswertung erfolgte, wie unter **3.5.4** beschrieben, unter Verwendung der absoluten Flächenverhältnisse des internen Standards und der Metabolite bei der TDGC-MS in Verbindung mit der zugesetzten Menge des markierten internen Standards.

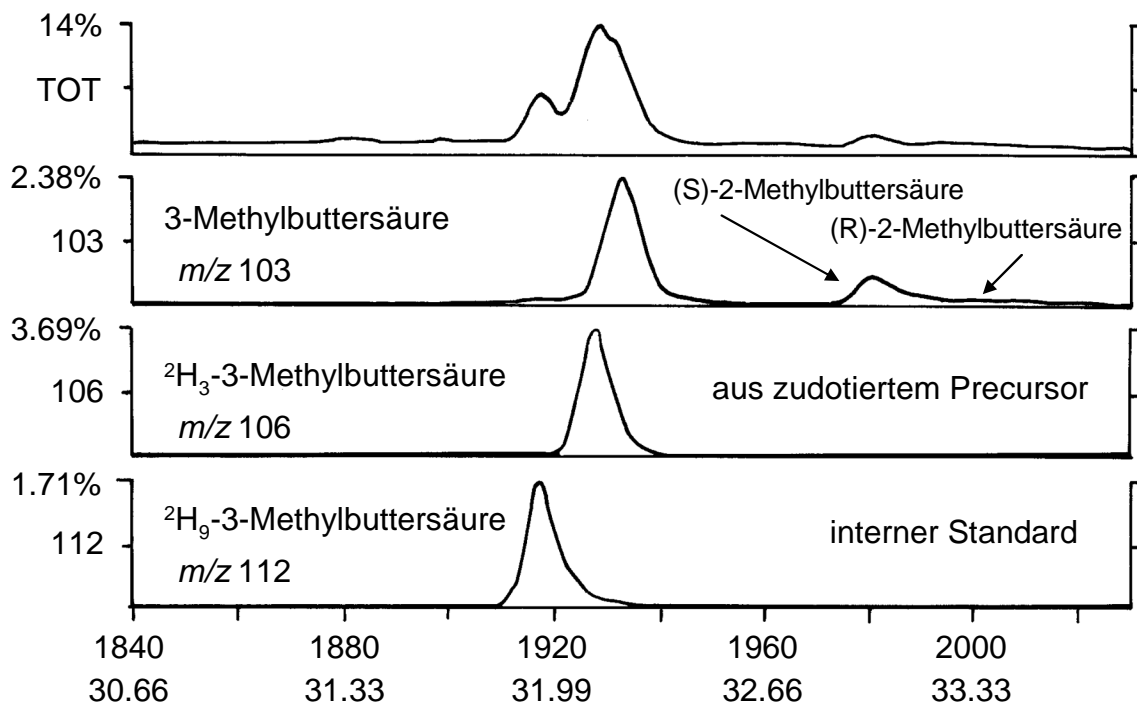
Die folgende **Abbildung 44** zeigt beispielhaft die Massenspektren im Kontroll- und Dotierungsversuch des 3-Methylbuttersäure-Peaks bei der TDGC-MS im CI-Modus. Das typische **Säurespektrum** zeigt drei charakteristische Massen. Das Molekülion  $M+1$  ( $m/z = 103$ ) wird ergänzt durch eine Wasserabspaltung (- 18 Masseneinheiten,  $m/z = 85$ ) und eine Methylierung aus dem Reaktandgas Methanol (+ 14 Masseneinheiten,  $m/z = 117$ ). Im Dotierungsversuch trat jede Masse zusätzlich auch mit einer  $^{13}\text{C}_5$ -Markierung auf, also mit + 5 Masseneinheiten ( $m/z = 108, 117, 122$ ), sodass ein Mischspektrum der unmarkierten und markierten 3-Methylbuttersäure entstand.

## 2 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 44:** Massenspektren von 3-Methylbuttersäure im Kontrollversuch (links) und im Dotierungsversuch (rechts) mit  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin (Mischspektrum)

Die folgenden **Abbildungen 45** und **46** zeigen beispielhaft die Massenspuren bei der TDGC-MS, die in den Dotierungsversuchen mit  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure für die Metabolite 3-Methylbuttersäure und 3-Methylbutanal erhalten wurden.



**Abbildung 45:** Massenspuren des Metaboliten 3-Methylbuttersäure und des internen Standards nach Dotierung der Käseemilch mit  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure

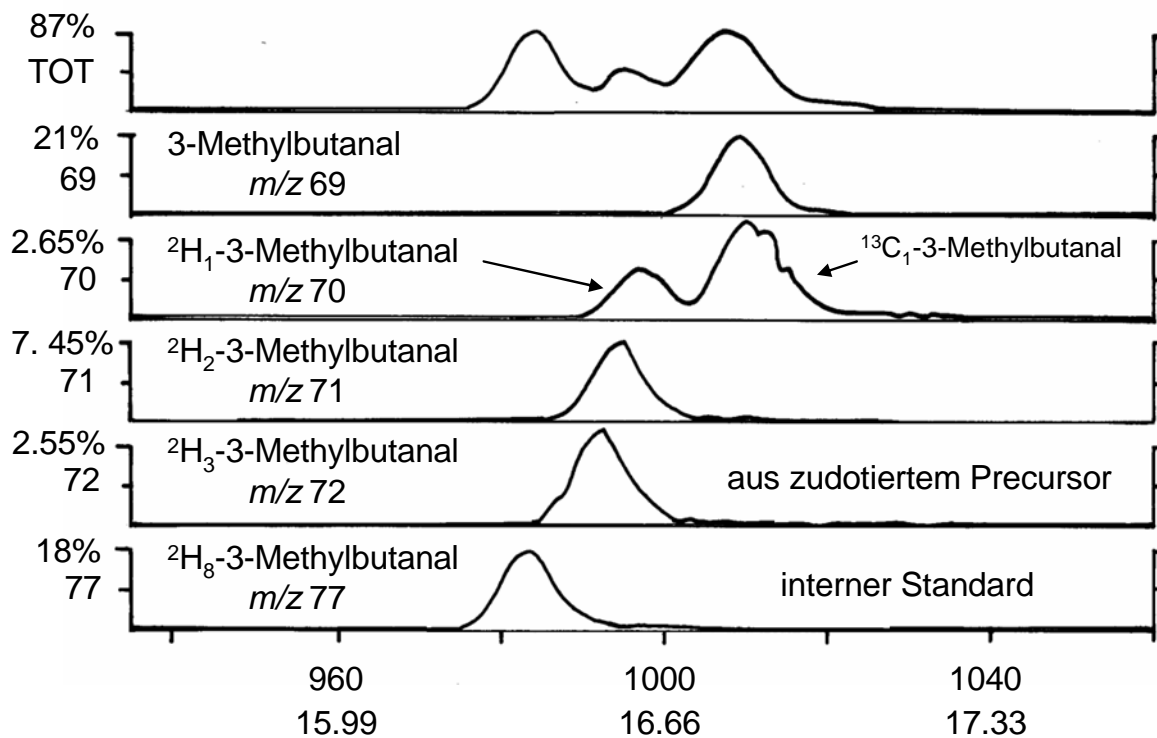
**Abbildung 45** zeigt für die Quantifizierung der Isotopomere neben dem Totalionenstrom (TOT) die Massenspuren  $m/z = 103$  für die natürliche 3-Methylbuttersäure,  $m/z = 106$  für  $^2\text{H}_3$ -3-Methylbuttersäure aus der dotierten und  $m/z = 112$  für den internen Standard  $^2\text{H}_9$ -3-Methylbuttersäure. Analog zum Versuch mit L-Leucin (vgl. **2.2.2.2**) war in der Massenspur der 3-Methylbuttersäure ( $m/z = 103$ ) die natürlich vorhandene (S)- und (R)-2-Methylbuttersäure chromatographisch gut trennbar.

**Abbildung 46** zeigt für die Quantifizierung der Isotopomere neben dem Totalionenstrom (TOT) die Massenspuren  $m/z = 69$  für das natürliche 3-Methylbutanal,  $m/z = 72$  für  $^2\text{H}_3$ -3-Methylbutanal aus der dotierten  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure und  $m/z = 77$  für den internen Standard  $^2\text{H}_8$ -3-Methylbutanal. Die zusätzliche Fläche in der Massenspur  $m/z = 70$  stammte vom natürlichen  $^{13}\text{C}$ -Gehalt des 3-Methylbutanals. Weiterhin zeigten sich zwei auffällige Massenspuren mit  $m/z = 70$  und  $71$ , die aufgrund von Retentionszeit (incl. Verschiebung, vgl. **Abbildung 43**), Flächendimension und Massenspektrum einem ein- und zweifach deuterierten Isotopomer ( $^2\text{H}_1$ -3-Methylbutanal und  $^2\text{H}_2$ -3-Methylbutanal) zugeordnet wurden.

Aus dem Precursor  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methyl-pentansäure wäre als einziger Metabolit  $^2\text{H}_3$ -3-Methylbutanal ( $m/z = 72$ ) zu erwarten gewesen. Das Ergebnis zeigte jedoch eindeutig zwei weitere Metabolite, welchen ein bzw. zwei Deuteriumatome zu fehlen scheinen ( $m/z = 71$  und  $70$ ). Um auszuschließen, dass bereits der deuterierte Precursor aus drei Isotopomeren bestand, wurde dieser mittels NMR-Spektroskopie (vgl. **3.9.5**) überprüft. Die Messung ergab, dass es sich um ein reines, am Kohlenstoffatom 5 dreifach deuteriertes Molekül handelte, weshalb von einer **Aufspaltung der ursprünglichen Dreifachmarkierung** bei der Metabolisierung ausgegangen werden kann (**Abbildung 46**).

Für die Bilanzierungsergebnisse (vgl. **2.4.3**) wurde für den Metaboliten die Summe aus den drei Isotopomeren gebildet ( $^2\text{H}_1$ -3-Methylbutanal,  $^2\text{H}_2$ -3-Methylbutanal,  $^2\text{H}_3$ -3-Methylbutanal).

## 2 Ergebnisse und Diskussion

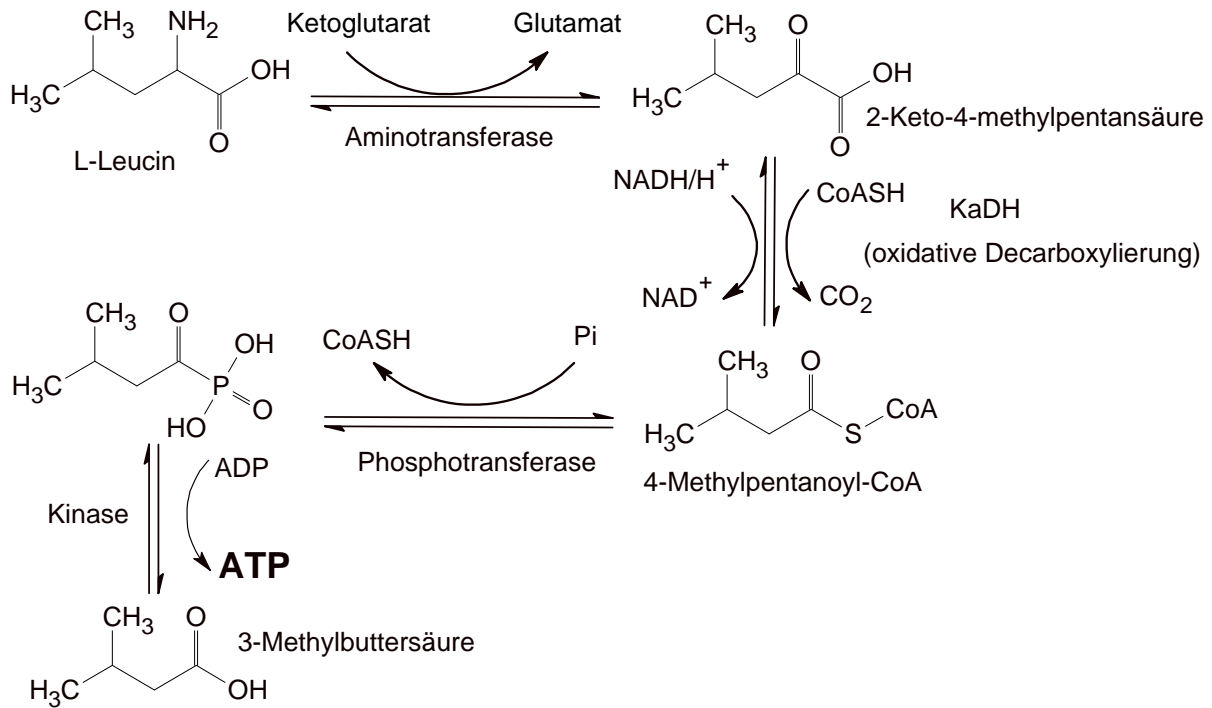


**Abbildung 46:** Massenspektren des Metaboliten 3-Methylbutanal und des internen Standards nach Dotierung der Käseemilch mit  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure

Die gezeigte „Aufspaltung“ der Dreifachmarkierung fand sich in den Metaboliten  $[\text{}^2\text{H}_3]$ -3-Methylbutanol und  $[\text{}^2\text{H}_3]$ -3-Methylbuttersäure nicht wieder. Aus diesem Ergebnis lassen sich verschiedene Erklärungsansätze ableiten, die Hinweise auf **Bildungswege** der Metabolite im L-Leucin-Metabolismus geben. Wie bereits in Kapitel 1.6 (**Abbildung 4**) gezeigt, sind für die Bildung der flüchtigen L-Leucin-Metabolite über 2-Keto-4-methylpentansäure mehrere Möglichkeiten in Betracht zu ziehen.

Zum einen ist es denkbar, dass 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure in den Dotierungsversuchen mit  $[\text{}^2\text{H}_3]$ -2-Keto-4-methylpentansäure zum überwiegenden Teil nicht aus 3-Methylbutanal gebildet wurden. Dies ist besonders im Fall der 3-Methylbuttersäure vorstellbar. *Ganesan et al. (2004)* schlagen hierfür den in **Abbildung 47** dargestellten Bildungsweg vor. Aber auch eine Bildung des Alkohols aus der Säure mittels reduzierender Enzyme ist in Erwägung zu ziehen.





**Abbildung 47:** Leucin-Metabolisierung zu 3-Methylbuttersäure unter ATP-Gewinn modifiziert nach *Ganesan et al. (2004)*

Für die Abbauwege des L-Leucin zu 3-Methylbuttersäure werden nach *Smit et al. (2004)* zwei Bildungswege vorgeschlagen, wobei der Alkohol nur aus dem Aldehyd hervorgeht. *Kieronczyk et al. (2006)* beschreiben für *L.lactis* ein Umsetzungsschema für verzweigtkettige Aminosäuren (L-Leucin), das dem von *Smit et al. (2004)* entspricht. Im Gegensatz dazu schlägt *Ardö (2006)* für die Aminosäureumsetzung ein Schema vor, bei dem die Säure ausschließlich aus dem Aldehyd gebildet wird.

Bei differenzierter Betrachtung ist es zum anderen vorstellbar, dass die metabolisierenden Mikroorganismen im Käsemodell unterschiedliche Fähigkeiten (Enzyme) besaßen, die [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-2-Keto-4-methylpentansäure umzusetzen, zumal schon die Starterkultur aus sechs verschiedenen Bakterienarten bestand (vgl. 3.1.2). Ein Teil wäre demnach nur in der Lage gewesen, unter der beobachteten „Markierungsveränderung“ [<sup>2</sup>H<sub>1,2,3</sub>]-3-Methylbutanal zu bilden.

*Ayad et al. (2001)* zeigten bei der Umsetzung von L-Leucin durch verschiedene Stämme von *L.lactis*, dass allein die Kombination der Bakterienvarietäten erheblichen Einfluss auf die Menge an 3-Methylbutanal hatte. In den Untersuchungen von *Kieronczyk et al. (2006)* bildete

## 2 Ergebnisse und Diskussion

der Bakterienstamm *L. lactis* NCDO 763 aus L-Leucin nur 3-Methylbuttersäure, wohingegen der Stamm *L. lactis* NCDO 1867 aus L-Leucin neben 3-Methylbuttersäure auch 3-Methylbutanal und 3-Methylbutanol bildete.

### 2.4.3 Bilanzierung der Metabolite

Im Folgenden werden die quantitativen Ergebnisse der Umsetzung des natürlich vorhandenen L-Leucins sowie der isotoopenmarkierten Precursoren  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin und  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure zu den Metaboliten 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure dargestellt, bilanziert und diskutiert. Die ermittelten Metabolitkonzentrationen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) wurden hierzu umgerechnet und sind in Mol-Konzentrationen dargestellt.

Betrachtet man zunächst in den beiden **Dotierungsversuchen mit  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin** die ermittelten Metabolit-Konzentrationen der Aromastoffe, die aus dem natürlichen L-Leucin stammen, so zeigt sich, dass aus der Ausgangskonzentration der Aminosäure (1124  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , vgl. 2.4.1) in der Summe 2,10 bzw. 1,76  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  Metaboliten gebildet wurden. Dies entspricht Konversionsraten von 0,19 % bzw. 0,16 %. Dabei bildeten sich 3-Methylbutanal (0,23 bzw. 0,20  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) und 3-Methylbutanol (0,11 bzw. 0,09  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) in derselben Größenordnung. 3-Methylbuttersäure hingegen wurde mit 1,75 bzw. 1,47  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  in der zehnfachen Konzentration gemessen (**Tabelle 31**). Die Konversionsrate der 3-Methylbuttersäure lag somit ca. um den Faktor 10 höher als die der übrigen Metabolite.

**Tabelle 31:** Metabolit-Konzentrationen in  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  Käsebruch und Konversionsraten (%) der unmarkierten Metabolite bezogen auf L-Leucin als Precursor in zwei Dotierungsversuchen

Metabolit	Metabolit-Konzentration in $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (Konversionsrate in %)		Durchschnitt
	Versuch 1	Versuch 2	
3-Methylbutanal	0,23 (0,02)	0,20 (0,02)	0,22 (0,02)
3-Methylbutanol	0,11 (0,01)	0,09 (0,01)	0,10 (0,01)
3-Methylbuttersäure	1,75 (0,16)	1,47 (0,13)	1,61 (0,15)
Summe	2,10 (0,19)	1,76 (0,16)	1,93 (0,18)

Die Quantifizierungsergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -Metabolite aus zugesetztem  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin zeigen dasselbe Umsetzungsmuster (**Tabelle 32**). Die Ausgangskonzentration des markierten Precursors für die Metabolisierung betrug 434  $\mu\text{mol/kg}$  (Versuch 1) bzw. 435  $\mu\text{mol/kg}$  (Versuch 2). Mit Konversionsraten für  $^{13}\text{C}_5$ -3-Methylbutanal von 0,02 % (0,08 bzw. 0,06  $\mu\text{mol/kg}$ ) bildete sich der Aldehyd mit derselben Konversionsrate wie sein unmarkiertes Pendant (**Tabelle 31**).  $^{13}\text{C}_5$ -3-Methylbutanol erzielte übereinstimmend mit 0,04 bzw. 0,03  $\mu\text{mol/kg}$  und Konversionsraten von 0,01 % die Bildungsrate des natürlichen 3-Methylbutanols. Der vorherrschende Metabolit war mit 0,62 bzw. 0,51  $\mu\text{mol/kg}$  (Konversionsraten von 0,14 bzw. 0,12 %)  $^{13}\text{C}_5$ -3-Methylbuttersäure, die somit auch im Konzentrationsbereich der unmarkierten Säure lag (vgl. **Tabelle 31**). Die Gesamtumsetzung liegt mit durchschnittlich 0,16 % im Bereich der geringen Gesamtumsetzung der unmarkierten Metabolite (0,18 %).

**Tabelle 32:** Metabolit-Konzentrationen in  $\mu\text{mol/kg}$  Käsebruch und Konversionsraten (%) der  $^{13}\text{C}$ -markierten Metabolite bezogen auf  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin als Precursor in zwei Dotierungsversuchen

Metabolit	Metabolit-Konzentration in $\mu\text{mol/kg}$ (Konversionsrate in %)		Durchschnitt
	Versuch 1	Versuch 2	
$^{13}\text{C}_5$ -3-Methylbutanal	0,08 (0,02)	0,06 (0,02)	0,07 (0,02)
$^{13}\text{C}_5$ -3-Methylbutanol	0,04 (0,01)	0,03 (0,01)	0,04 (0,01)
$^{13}\text{C}_5$ -3-Methylbuttersäure	0,62 (0,14)	0,51 (0,12)	0,57 (0,13)
<b>Summe</b>	0,74 (0,17)	0,60 (0,15)	0,67 (0,16)

## 2 Ergebnisse und Diskussion

Bei den **Dotierungsversuchen mit  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure** zeigte sich, dass von den dotierten 385  $\mu\text{mol/kg}$  (Versuch 1) bzw. 382  $\mu\text{mol/kg}$  (Versuch 2) des Precursors, 3-Methylbutanal mit Konversionsraten von 0,02 - 0,03 % gegenüber 3-Methylbutanol (Konversionsraten 0,01 - 0,02 %) in der zwei- bis dreifachen Menge gebildet wurde. 3-Methylbuttersäure war demgegenüber mit durchschnittlich 2,27  $\mu\text{mol/kg}$  in der ca. 20- bis 40-fachen Konzentration zu messen. Die durchschnittliche Gesamt-Konversionsrate betrug 0,64 % (**Tabelle 33**).

**Tabelle 33:** Metabolit-Konzentrationen in  $\mu\text{mol/kg}$  Käsebruch und Konversionsraten (%) der  $^2\text{H}_3$ -markierten Metabolite bezogen auf  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure als Precursor in zwei Dotierungsversuchen

Metabolit	Metabolit-Konzentration in $\mu\text{mol/kg}$ (Konversionsrate in %)		Durchschnitt
	Versuch 1	Versuch 2	
$^2\text{H}_3$ -3-Methylbutanal	0,12 (0,03)	0,09 (0,02)	0,11 (0,03)
$^2\text{H}_3$ -3-Methylbutanol	0,05 (0,01)	0,04 (0,01)	0,05 (0,01)
$^2\text{H}_3$ -3-Methylbuttersäure	2,57 (0,67)	1,97 (0,52)	2,27 (0,60)
<b>Summe</b>	2,74 (0,71)	2,10 (0,55)	2,43 (0,64)

Aus den Bilanzierungsergebnissen in den mit  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin und  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure dotierten Modell-Ansätzen zeigten sich relativ niedrige Konversionsraten. Sie liegen bei **0,16 %** im Fall des L-Leucins und bei **0,64 %** im Fall der  $\alpha$ -Ketosäure (vgl. **Tabellen 32, 33**). Vergleicht man diese Werte mit den Konversionsraten, die im Rahmen dieser Arbeit in einem ungereiften Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (0 Wochen Reifung, PM-G-0W, vgl. **3.1.2**) erreicht wurden, wird deutlich, dass diese in der gleichen Größenordnung lagen. Die Ausgangsmenge an L-Leucin (2272  $\mu\text{mol/kg}$  Gouda-Käse) wurde unter der Annahme der Bildung von 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure mit einer Gesamtkonversionsrate von **0,43 %** umgesetzt (**Tabelle 34**).

**Tabelle 34:** Metabolit-Konzentrationen in  $\mu\text{mol/kg}$  in ungerieftem Gouda-Käse (PM-G-0W) und Konversionsraten (%) bezogen auf L-Leucin als Precursor

Metabolit	Metabolit-Konzentration in $\mu\text{mol/kg}$ (Konversionsrate in %)
	PM-G-0W
3-Methylbutanal	2,5 (0,11)
3-Methylbutanol	1,1 (0,05)
3-Methylbuttersäure	6,09 (0,27)
<b>Summe</b>	<b>9,71 (0,43)</b>

Vorherrschend in allen Dotierungsversuchen war die Bildung der (un)markierten 3-Methylbuttersäure, die im Vergleich zu 3-Methylbutanal und 3-Methylbutanol um Faktoren von 10- bis 40-facher molarer Menge gebildet wurde. Im Gouda-Käse berechnet sich für 3-Methylbuttersäure ein Faktor von 2,5 bis 6 gegenüber dem Aldehyd und dem Alkohol.

Weiterhin stimmte das Verhältnis von 3-Methylbutanal und 3-Methylbutanol (2:1) im Gouda-Käse mit den Verhältnissen dieser Aromastoffe in den Modellversuchen überein. Der Aldehyd wurde sowohl in den Dotierungsversuchen mit  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin als auch mit  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure mit einem Verhältnis von 2:1 bestimmt.

*Williams et al. (2001)* untersuchten bei der Umsetzung von L-Leucin die Bildung der Metabolite 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure durch Stämme von Lactobacillen und Lactokokken in einzelnen Ansätzen und in Mischungen der Bakterien. Dabei bildete sich ebenfalls stets mehr 3-Methylbuttersäure als 3-Methylbutanol in den Ansätzen. Anders, als im hier untersuchten Käsemodell, lagen die Bildungsmengen dieser beiden Metabolite in derselben Größenordnung.

*Kieronczyk et al. (2006)* detektierten aus der Metabolisierung von radioaktiv markiertem L-Leucin durch Stämme von *Lactococcus lactis* in vitro auch die markierten Metabolite 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure sowie die korrespondierende  $\alpha$ -Keto-Säure. Dabei bildete ein Stamm neben der  $\alpha$ -Keto-Säure ausschließlich

## 2 Ergebnisse und Diskussion

---

3-Methylbuttersäure, wohingegen ein anderer alle drei Metabolite in derselben Größenordnung bildete.

Bei den Untersuchungen von *Ganesan et al. (2006)*, die u.a die Bildung von 3-Methylbuttersäure aus 2-Keto-4-methylpentansäure und L-Leucin durch Lactobacillen und Lactokokken thematisierten, wurde aus der  $\alpha$ -Keto-Säure im Vergleich zur Aminosäure deutlich mehr 3-Methylbuttersäure gebildet. Auch im Rahmen dieser Arbeit bildete sich mehr markierte 3-Methylbuttersäure in den Versuchen mit  $^2\text{H}_3$ -2-Keto-4-methylpentansäure als mit  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin. Als treibende Kraft für die Säurebildung schlagen die Autoren den **ATP-Gewinn** nach dem in **Abbildung 47** dargestellten Bildungsweg vor.

### 2.4.4 CAMOLA-Auswertung

Die von *Schieberle et al. (2003)* für die Maillard-Reaktion entwickelte, sogenannte CAMOLA-Technik (**Carbon Module Labeling**) ermöglicht die Aufklärung von Reaktionswegen und Reaktionsmechanismen organischer Moleküle. Grundsätzlich wird bei dieser Technik eine quantitativ definierte Mischung eines unmarkierten und vollmarkierten Kohlenwasserstoffs zur Reaktion gebracht, wobei das Kohlenstoffskelett abgebaut wird, Intermediate rekombiniert werden und eine Mischung an Isotopomeren des Zielmoleküls generiert wird. Auf der Basis von massenspektroskopischen Daten und statistischen Regeln kann hieraus die Wichtigkeit einer Einzelreaktion hergeleitet werden (*Schieberle, 2005*).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CAMOLA-Technik angewandt, um Rückschlüsse auf die Herkunft der Verbindungen 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure aus dem L-Leucin-Metabolismus ziehen zu können.

Aus den Dotierungsversuchen war durch die zugegebene Menge  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin (1124  $\mu\text{mol/kg}$ ; vgl. **2.4.3**) und der in Vorversuchen ermittelten durchschnittlichen Menge an natürlich gebildetem L-Leucin (435  $\mu\text{mol/kg}$ ; vgl. **2.4.1**) das Isotopomeren-Verhältnis der Aminosäure bekannt ( $^{12}\text{C}_6$ -L-Leucin :  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin = 1 : 2,6), welches zur Umsetzung im Modell zur Verfügung stand. Zum anderen sind alle Isotopomeren-Verhältnisse der Metabolite im Rahmen der SIVA massenspektroskopisch bestimmt worden (vgl. **2.4.2**). Führt man diese Daten zu einer CAMOLA-Auswertung zusammen, bei der die Markierungsverhältnisse verglichen werden, ergeben sich die in **Tabelle 35** dargestellten Ergebnisse.

**Tabelle 35:** Isotopomeren-Verhältnisse der Dotierungsversuche mit  $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin, berechnet aus den molaren Verhältnissen unmarkiert/markiert in  $\mu\text{mol/kg}$  in zwei Dotierungsversuchen

$^{12}\text{C}_6 / ^{13}\text{C}_6$ - L-Leucin	Isotopomeren-Verhältnis		
	$^{12}\text{C}_5 / ^{13}\text{C}_5$ - 3-Methylbutanal	$^{12}\text{C}_5 / ^{13}\text{C}_5$ - 3-Methylbutanol	$^{12}\text{C}_5 / ^{13}\text{C}_5$ - 3-Methylbuttersäure
2,6	2,9	2,8	2,8
2,6	3,3	3,0	2,9

Vergleicht man die drei Metabolite untereinander, so zeigt sich sowohl für das 3-Methylbutanal und das 3-Methylbutanol als auch für die in ihrer Bildungsmenge vorherrschende 3-Methylbuttersäure ein Markierungsverhältnis unmarkiert/markiert von ca. 2,9. Vergleicht man diesen Wert mit dem Precursor L-Leucin (Isotopomerenverhältnis  $^{12}\text{C}_6$ -/ $^{13}\text{C}_6$ -L-Leucin = 2,6), so ergibt sich eine Übereinstimmung von 90 %. Das Isotopomeren-Verhältnis des Precursors findet sich somit nahezu in den Metaboliten wieder (**Tabelle 35**).

Die CAMOLA-Auswertung zeigt, dass die **Herkunft** der drei potentiellen Metabolite des L-Leucins (3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure) zu 90 % durch die Aminosäure erklärt werden kann. Im Käsemodell liegen die Isotopomeren-Verhältnisse zur mikrobiellen Umsetzung der Aminosäure bei 2,6 (unmarkiert/markiert), in allen Umsetzungsprodukten ist dieser Quotient mit durchschnittlich 2,9 höher. Grund für den etwas höheren Anteil in allen unmarkierten Metaboliten des L-Leucins kann ein unberücksichtigter Grundgehalt der drei Aromastoffe, 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure in der verwendeten Milch sein. Der natürliche Gehalt an freiem L-Leucin in der verwendeten Milch ist vernachlässigbar (vgl. **2.4.1**). Ein weiterer Grund für die Differenz von 10% in der CAMOLA-Auswertung kann auch ein anderer Ursprung der Metabolite als das L-Leucin sein. Zu berücksichtigen sind weiterhin Ungenauigkeiten, die sich aus dem Versuchs-Design des Dotierungsmodells (vgl. **2.4.1**) und aus analytischen Schwankungsbreiten ergeben.

### Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Labormodell zur Untersuchung der Umsetzung von stabilisotopenmarkierten Aromastoffvorstufen entwickelt werden. Unter realistischen Prozessbedingungen konnte zunächst qualitativ gezeigt werden, dass bei den gewählten Prozessparametern die Precursoren L-Leucin und 2-Keto-4-methylpentansäure zu den strukturell korrespondierenden Aromastoffen 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure umgesetzt wurden. Die Aufspaltung der verifizierten Markierung der [ $^2\text{H}_3$ ]-2-Keto-4-methylpentansäure im Rahmen der SIVA lässt Interpretationsansätze bezüglich der Bildungswege von Aromastoffen im Rahmen des Leucin-Metabolismus zu.

Durch die Bilanzierungen der Metabolite wurde die bevorzugte Bildung von 3-Methylbuttersäure deutlich, die biochemisch über einen Energiegewinn erklärt werden kann (Ganesan *et al.*, 2004). Die geringen absoluten Konversionsraten sind zu diesem „Reifungszeitpunkt“ mit einem definiert hergestellten Gouda-Käse kurz nach der Dicklegung der Milch (PM-G-0W) vergleichbar.

Des Weiteren konnte im Rahmen des Modells durch eine CAMOLA-Auswertung gezeigt werden, dass die Aromastoffe 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure nahezu ausschließlich aus freiem L-Leucin gebildet wurden.

Durch die realistischen, käsenahen Bedingungen unter welchen die Precursoren umgesetzt wurden, sind die erzielten Ergebnisse und die daraus abgeleiteten Aussagen über deren Metabolisierung und Aromastoffbildung in einem Käse, der unter denselben Bedingungen hergestellt wird, übertragbar.



## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Untersuchungsmaterial

#### 3.1.1 Kommerziell erhältlicher Dutch-type Käse (Gouda)

Für Vorversuche diente ein kommerziell erhältlicher holländischer Schnittkäse (engl.: *dutch-type cheese*, vgl. 1.2), der bei der Fa. Schlemmermeyer am Viktualienmarkt in München erworben wurde. Es handelte sich dabei um einen ca. 20 Wochen gereiften Käse nach Gouda-Art in Quaderform (Blockkäse), der mit einer Wachsschicht umhüllt war.

#### 3.1.2 Definiert hergestellter Käse nach Gouda-Art (Hohenheim)

Am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim (Abteilung Forschungs- und Lehrmolkerei) wurde das Untersuchungsmaterial nach dem in **Abbildung 48** gezeigten Fließschema hergestellt. Auf diese Weise wurde aus derselben Charge Milch ein Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (PM) und eine Rohmilch-Variante (RM) hergestellt. Bei Letzterer wurde der Schritt der Pasteurisierung (vgl. **Abbildung 48**) weggelassen. In der verwendeten Starterkultur *CHOOZIT™ Alp D* (Fa. Danisco Cultures) waren folgende Mikroorganismen enthalten:

---

*Lactococcus lactis subsp. lactis*

*Lactococcus lactis subsp. cremoris*

*Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*

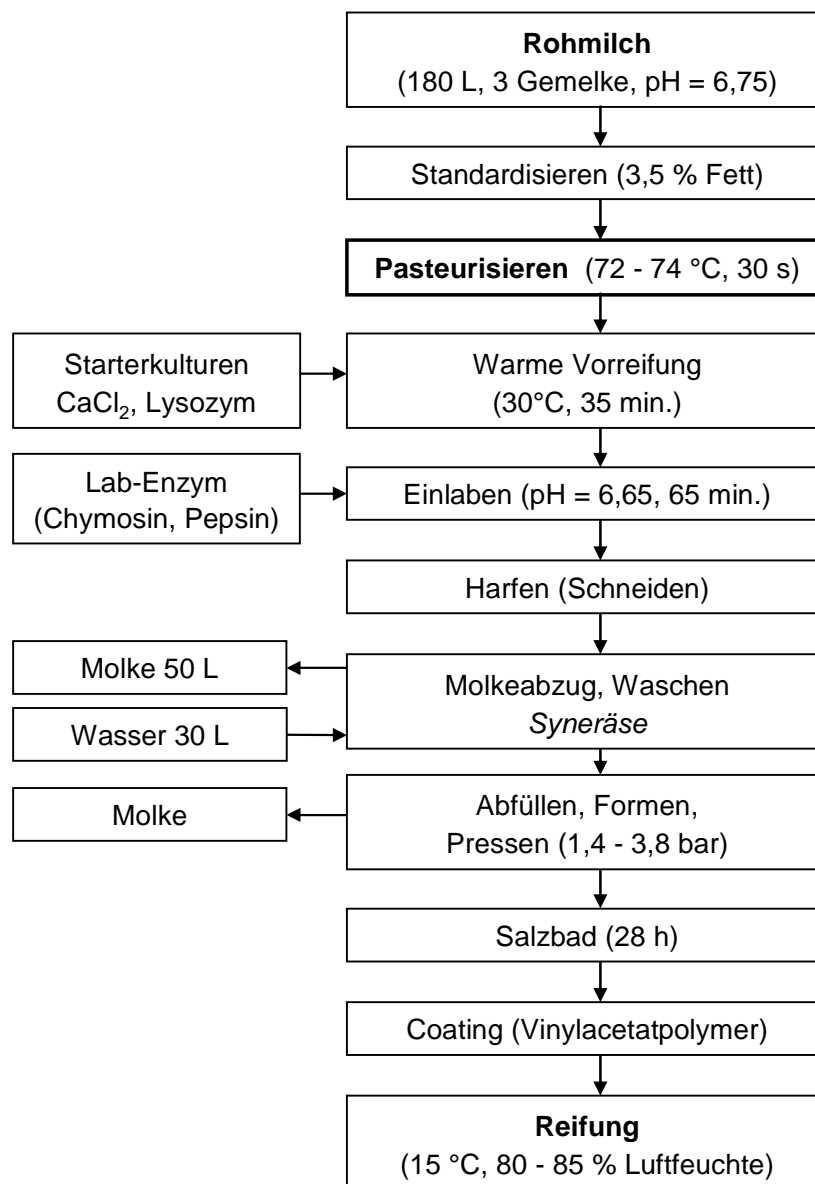
*Streptococcus thermophilus*

*Lactobacillus helveticus*

*Lactobacillus lactis*

---

Quelle: Product Description – PD 206838-9DE, Fa. Danisco Cultures, DK-1001, Copenhagen



**Abbildung 48:** Fließschema der definierten Gouda-Herstellung in Hohenheim

Bei der Gouda-Herstellung wurde die aus drei Gemelken (abends, mittags, abends) stammende Rohmilch zunächst auf einen Fettgehalt von 3,5 % standardisiert und in der kommerziellen Variante pasteurisiert. Nach Zugabe der Starterkulturen, Calciumchlorid und Lysozym erfolgte eine warme Vorreifung bei 30°C für 35 Minuten bis zur pH-Absenkung auf pH = 6,65. Dem Einlaben per Lab-Enzym (Dauer 65 min.) folgte das Schneiden des gebildeten Käsebruchs (*Harfen*). Durch einen Molke-Wasser-Austausch wurde der Käsebruch „gewaschen“ und dessen Molkeaustritt (*Syneräse*) beschleunigt. Anschließend

wurde der Käsebruch, der nun die richtige Konsistenz besaß, abgefüllt, geformt und stufenweise mit einem Druck von 1,4 bis 3,8 bar gepresst. Nach dem Tauchen für 28 Stunden in einem gesättigten Salzbad wurden die Käselaiibe mit einem Vinylacetatpolymer bestrichen (*Coating*), der die Schimmelbildung verhinderte und gleichzeitig den Gas- und Wasseraustausch mit der Umgebung ermöglichte, um einen natürlichen Reifungsprozess zu gewährleisten.

Aus der definierten Produktion wurden aus je 180 Liter Milch 9 runde Käselaiibe à 2 kg erhalten (Ausbeute 10 %). Die Reifung der Gouda-Käse umfasste einen Zeitraum von 0 - 30 Wochen, wobei von beiden Käsevarianten (PM, RM) die in **Tabelle 40** dargestellten Reifungsstufen untersucht wurden. Hierzu wurde die Reifung eines Käselaiibes nach der Portionierung durch Tiefgefrieren bei – 24 °C abgestoppt. Die Käseproduktion wurde in analoger Weise mit einem Abstand von 12 Monaten wiederholt.

**Tabelle 40:** Reifungsstufen der produzierten Käsevarianten und deren Bezeichnungen

<b>Käsevariante</b>	<b>Reifungsdauer [Wochen]</b>	<b>Bezeichnung</b>
Gouda aus pasteurisierter Milch	0	PM-G-0W
	4	PM-G-4W
	7	PM-G-7W
	11	PM-G-11W
	19	PM-G-19W
	30	PM-G-30W
Gouda aus Rohmilch	0	RM-G-0W
	4	RM-G-4W
	7	RM-G-7W
	11	RM-G-11W
	19	RM-G-19W
	30	RM-G-30W

### 3 Experimenteller Teil

---

#### 3.2 Chemikalien und Reagenzien

##### 3.2.1 Referenzaromastoffe

Tabelle 41: Referenzaromastoffe

Aromastoff	Hersteller
2- Acetyl-1-pyrrolin	nach <i>Buttery et al., 1982</i>
2- Acetyl-1-thiazolin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2,3- Butandion (Diacetyl)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
1- Butanol	Merck, Darmstadt
Buttersäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\delta$ - Decalacton	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\gamma$ - Decalacton	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
(Z)-2- Decenal	Lancaster, Mühlheim/Main
Dimethyltrisulfid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\delta$ - Dodecalacton	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\gamma$ - Dodecalacton	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
(Z)-6- Dodecen- $\gamma$ -lacton	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylbutanoat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethylhexanoat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
5- Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethyl-2-methylbutanoat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethyl-3-methylbutanoat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethyl-2-methylpropanoat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethyl-octanoat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4- Ethyl-octansäure	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe
(E)-4,5- Epoxy-(E)-2-decenal	<i>Schieberle und Grosch, 1991</i>
Hexanal	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Hexansäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
1- Hexen-3-on	Lancaster, Mühlheim/Main
3- Hydroxy-2-butanon	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3- Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Fortsetzung von **Tabelle 41**:

Aromastoff	Hersteller
4- Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd	VWR-International, Darmstadt
2- Isopropyl-3-methoxypyrazin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2- Methoxyphenol (Guajacol)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3- Methylbutanal	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3- Methyl-1-butanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2- Methylbuttersäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3- Methylbuttersäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3- Methylindol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3- (Methylthio)-propanal	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2- Methylpropansäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
(E,Z)-2,6- Nonadienal	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\gamma$ - Nonalacton	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
(E)-2- Nonenal	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
(Z)-2- Nonenal	nach <i>Ullrich und Grosch, 1988</i>
1- Nonen-3-on	Lancaster, Mühlheim/Main
$\delta$ - Octalacton	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
1- Octen-3-on	Lancaster, Mühlheim/Main
Pentansäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Phenyllessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2- Phenylethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Propionsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
(E)-2- Undecenal	Alfa-Aesar, Karlsruhe

### 3 Experimenteller Teil

---

#### 3.2.2. Stabilisotopenmarkierte Aromastoffe

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten stabilisotopenmarkierten Verbindungen wurden nach der in **Tabelle 42** aufgeführten Literatur synthetisiert.

**Tabelle 42:** Stabilisotopenmarkierte Aromastoffe

<b>Standard</b>	<b>Literatur</b>
[ <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]-2,3-Butandion	<i>Schieberle und Hofmann, 1997</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Buttersäure	<i>Schieberle et al., 1993</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]- $\delta$ -Decalacton	<i>Schieberle et al., 1993</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]- $\delta$ -Dodecalacton	<i>Schieberle et al., 1993</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Essigsäure	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Ethylbutanoat	<i>Schieberle und Hofmann, 1997</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Ethylhexanoat	<i>Guth, 1997</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Hexansäure	<i>Guth und Grosch, 1993a</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Methylbutanal	<i>Schieberle und Grosch, 1992</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>7,8,9</sub> ]-3-Methylbutanal	<i>Czerny, DFA, mündl. Mitteilung, 2007</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Methylbutanol	<i>Guth und Grosch, 1994</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>10,11</sub> ]-3-Methylbutanol	<i>Czerny und Schieberle, 2006</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Methylbuttersäure	<i>Guth und Grosch, 1994</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>9</sub> ]-3-Methylbuttersäure	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
[ <sup>2</sup> H <sub>9</sub> ]-3-Methylbuttersäureethylester	<i>Czerny, DFA, mündl. Mitteilung, 2007</i>
[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-Methylpropansäure	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Pentansäure	<i>Jagella und Grosch, 1999</i>
[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-Phenylelessigsäure	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-Phenylethanol	<i>Schuh und Schieberle, 2006</i>

## 3.2.3 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wiesen, soweit in **Tabelle 43** nicht anderes vermerkt, p.a. Qualität auf.

**Tabelle 43:** Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Aceton Lichrosolv	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Acetonitril	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Ameisensäure	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4-Brom-1-buten, purum, $\geq 98.0\%$	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
[ $^2\text{H}_9$ ]-n-Butylamin, Hydrochlorid	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
1,3-Cyclohexandion, 97%	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid (Dansylchlorid)	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Deuterium, 99,9 %	Linde, Wiesbaden
Deuteriumoxid, 100 %	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dichlormethan, p.a. <sup>1)</sup>	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Diethylether, p.a. <sup>1)</sup>	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
1,4-Dioxan, Reagent Plus®, $\geq 99\%$	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Enzymkit D-/L-Lactat	r-biopharm, Darmstadt
Ethanol, p.A.	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Kaliumhydroxid, p.a.	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
2-Keto-4-methyl-Pentansäure, 95 %	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2-Keto-4-methyl-[ $\text{d}_3$ ]-Pentansäure (Na-Salz), 98 atom % D	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kieselgel KG 60 (0,063 – 0,200 mm)	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
[ $^{13}\text{C}_6$ ]-L-Leucin	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA
Lithium-L-Lactat, puriss, $\geq 99\%$ (NT)	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3-Methylbutylamin	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methyloctanoat	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4-Methylumbelliferon $\geq 98\%$	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4-Methylumbelliferon-butyrat $\geq 95\%$	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

### 3 Experimenteller Teil

---

Fortsetzung von **Tabelle 43**:

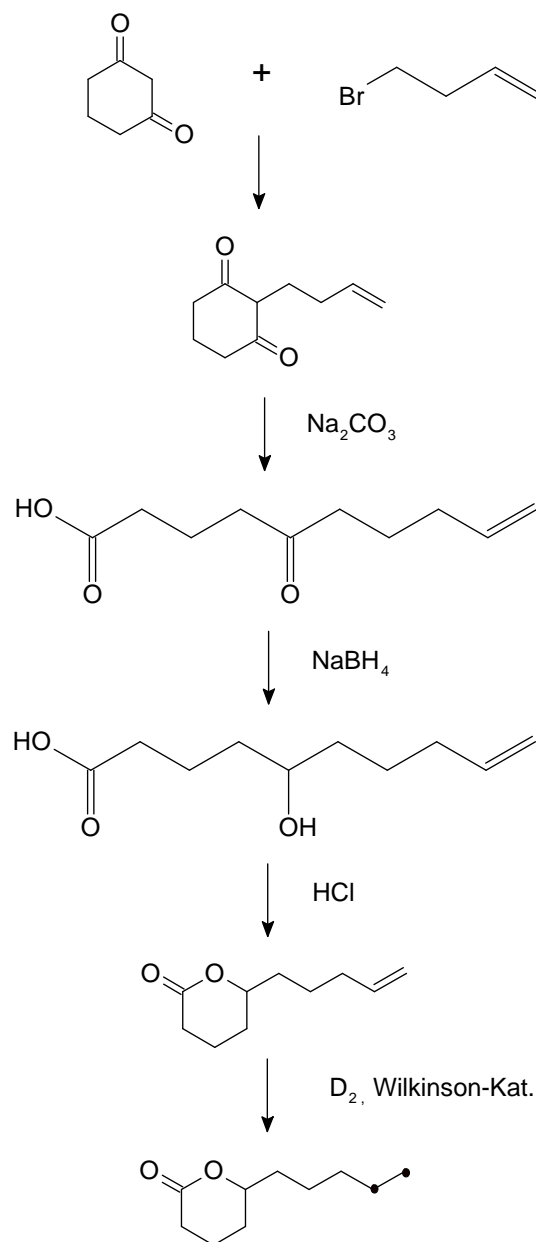
<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumborhydrid, purum p.a., $\geq 96\%$	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumcarbonat, p.a.	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, p.a.	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumsulfat, p.a.	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
L-Norleucin	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ortho-Phosphorsäure 85 %ig	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Pentan, p.a. <sup>1)</sup>	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Salzsäure 32%	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Seesand, reinst	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Sonnenblumenöl	Thomy, EDEKA, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde, München
Stickstoff, 99,999 %	Messer Griesheim, Krefeld
Toluol, p.a.	Merck, VWR International GmbH, Darmstadt
Tris-(triphenylphosphin)-rhodium(I)chlorid	Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Wasserstoff 99,9 %	Messer Griesheim, Krefeld

<sup>1)</sup> Diese Lösungsmittel wurden vor der Verwendung frisch destilliert



3.3 Synthese des isotopenmarkierten [9,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- $\delta$ -Decalactons

**Abbildung 49** zeigt das Reaktionsschema zur Herstellung von [9,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- $\delta$ -Decalacton. In einer fünfstufigen Synthese wurden zunächst 1,3-Cyclohexandion und 4-Brom-1-buten zu 1-(But-4-enyl)-2,6-cyclohexandion umgesetzt. Es folgten die Ringöffnung mittels Natriumcarbonat zu 5-Oxodec-9-ensäure und deren Reduzierung mittels Natriumborhydrid zu 5-Hydroxydec-9-ensäure. Das nach Zyklisierung der Hydroxysäure an Kieselgel aufgereinigte  $\delta$ -Dec-9-enolacton, wurde zuletzt in endständiger Position katalytisch deuteriert (*Ijima et al., 1971; Schieberle et al., 1993; Greger und Schieberle, 2007*).



**Abbildung 49:** Syntheseweg zur Herstellung von [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- $\delta$ -Decalacton

### 3 Experimenteller Teil

---

#### 1-(But-4-enyl)-2,6-cyclohexandion

1,3-Cyclohexandion (2,88 g, 25 mmol) und Kaliumhydroxid (1 g, 25 mmol) in Dioxan/Wasser (1/1, v/v, 25 ml) wurden vorgelegt und auf dem Ölbad zum Sieden gebracht. Über ein Septum wurde dann 4-Brom-1-Buten (3,37 g, 25 mmol) zugegeben und 7 h unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 25 ml einer wässrigen Kaliumhydroxid-Lösung (30 g/l) zugefügt und das Gemisch dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Diese Etherphasen wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde mit Salzsäure (1 mol/l) auf pH 4,0 eingestellt und dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden sodann mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer bei 35°C Wasserbadtemperatur entfernt.

#### 5-Oxodec-9-ensäure

Zum Ansatz von 1-(But-4-enyl)-2,6-cyclohexandion wurden 37,5 ml einer wässrigen Natriumcarbonatlösung (300 g/l) hinzugefügt, anschließend wurde das Reaktionsgemisch 30 h unter Rückfluss auf dem Ölbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Salzsäure (1 mol/l) auf pH 3,0 eingestellt und dreimal mit je 50 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer bei 35°C Wasserbadtemperatur entfernt.

#### 5-Hydroxydec-9-ensäure

Zur 5-Oxodec-9-ensäure wurden dann Natriumborhydrid (0,85 g, 25 mmol) und 50 ml einer Kaliumhydroxid-Lösung (30 g/l) hinzugefügt und für 8 h bei 40°C belassen.

#### $\delta$ -Dec-9-enolacton

Nach dem Abkühlen wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1,0 angesäuert und für 30 min unter Rückfluss auf dem Ölbad erhitzt. Nach erneutem Abkühlen wurde die Lösung dreimal mit je 50 ml Diethylether ausgeschüttelt und die vereinigten Etherphasen über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 35°C Wasserbadtemperatur entfernt.

Eine Chromatographiesäule (30 × 1 cm) wurde mit 30 g Kieselgel (0,063 - 0,2 mm, gereinigt nach *Esterbauer, 1968*) in Pentan gefüllt. Der Rückstand des  $\delta$ -Dec-9-enolacton wurde in 0,5 ml Ether gelöst, auf die Säule gegeben und mit den folgenden Lösemittelgemischen

eluiert (vgl. **Tabelle 44**). Durch HRGC-O konnte das kokosnussartig riechende  $\delta$ -Dec-9-enolacton in **Fraktion 4** festgestellt werden.

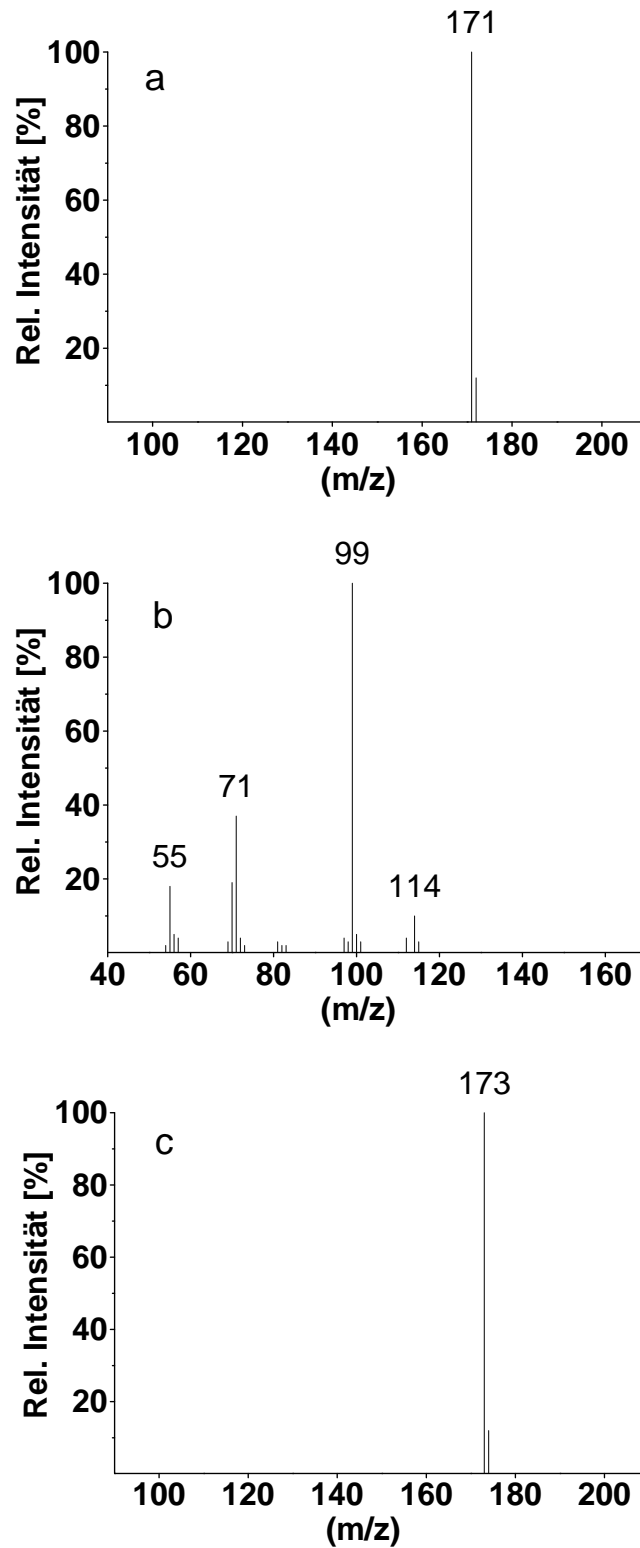
**Tabelle 44:** Elutionsschema für die Aufreinigung von  $\delta$ -Dec-9-enolacton

Fraktion	Pentan/Diethylether (v/v)	Volumen [ml]
1	90/10	50
2	80/20	50
3	60/40	50
4	40/60	50
5	0/100	50

### $^2\text{H}_2$ - $\delta$ -Decalacton

Obige Fraktion 4 wurde nun über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt und in 10 ml Toluol gelöst. Zur Deuterierung wurden separat 555 mg *Wilkinson-Katalysator* (Tris-(triphenylphosphin)-rhodium(I)-chlorid) in 20 ml Toluol gelöst und zur Synthese über ein Septum zugefügt, nachdem die Apparatur unter Deuterium-Atmosphäre gesetzt wurde. Nach 4 h wurde nochmals dieselbe Menge an Wilkinson-Katalysator über das Septum zugefügt und weitere 20 h deuteriert. Zur Entfernung des Katalysators wurde die stark gefärbte Lösung auf eine mit 30 g Kieselgel (s.o.) in Pentan befüllte Chromatographiesäule gegeben und das Toluol mit 200 ml Pentan von der Säule gewaschen. Anschließend wurde das markierte  $\delta$ -Decalacton mit 200 ml Diethylether eluiert. Zuletzt wurde die noch orange gefärbte Lösung zur Abtrennung nichtflüchtiger Bestandteile einer Hochvakuumdestillation (SAFE-Methode, vgl. **3.4.1.2**) unterzogen. Im farblosen Destillat wurde eine Konzentration von 170,2  $\mu\text{g/ml}$  bestimmt (vgl. **3.5.1**), was einer Ausbeute von 0,36 % entsprach.

Die folgende **Abbildung 50** zeigt die erhaltenen Massenspektren von  $^2\text{H}_2$ - $\delta$ -Decalacton (MS-EI und MS-CI) sowie zum Vergleich das Massenspektrum von  $\delta$ -Decalacton (MS-CI).



**Abbildung 50:** Massenspektren von  $\delta$ -Decalacton (a: MS-CI) und  $^2\text{H}_2$ - $\delta$ -Decalacton (b: MS-EI; c:MS-CI)

#### 3.4 Identifizierung der Aromastoffe

##### 3.4.1 Isolierung der flüchtigen Verbindungen

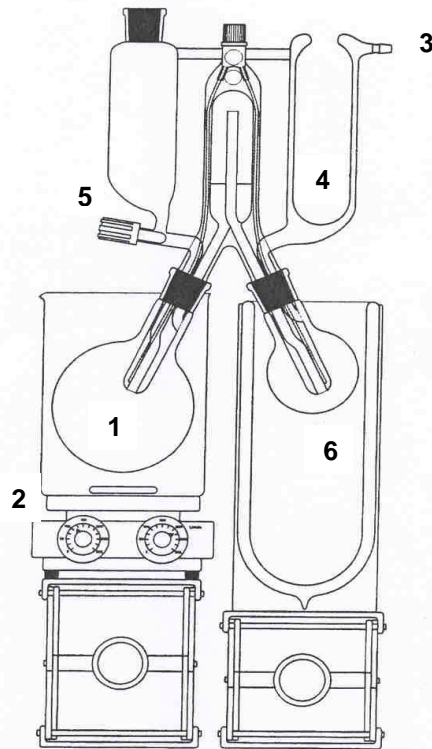
###### 3.4.1.1 Kaltextraktion mit Diethylether

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde vom angetauten Gouda-Käse die Rinde und eine ca. 3,5 cm dicke Außenzone entfernt (*Bosset et al., 2003*). Das so vorbereitete und portionierte Probenmaterial wurde in kleine Würfel vorzerkleinert, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und sofort mit einer handelsüblichen Moulinette® zu einem homogenen Pulver vermahlen. Nach Einwaage und Zugabe von Natriumsulfat wurde das Untersuchungsmaterial zweimal 120 min. unter Rühren mit frisch destilliertem Diethylether extrahiert und die Suspension über Baumwollwatte (gereinigt, entfettet) filtriert. Das Filtrat wurde direkt zur Hochvakuumdestillation eingesetzt.

###### 3.4.1.2 Hochvakuumtransfer (HVT)

Bei der Hochvakuumdestillation mittels **SAFE-Technik** (*Solvent Assisted Flavour Evaporation; Engel et al., 1999*) wurde der nach **3.4.1.1** erhaltene Etherextrakt über den Hahn des linken Tropftrichters (**5**) portionsweise in die Apparatur verbracht (**Abbildung 51**). Das über den Anschluss der Hochvakuumpumpe (**3**) erzeugte Vakuum von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  mbar trennte dabei schlagartig die flüchtigen von den nichtflüchtigen Bestandteilen. Letztere blieben im temperierten Kolben (**1**) zurück (Wasserbad, 40 °C), wohingegen die verdampfte flüchtige Fraktion die ebenfalls auf 40 °C temperierte Apparatur passierte und im gekühlten Auffangkolben (**6**) ausgefroren wurde. Zur Kühlung des Kolbens diente ein mit flüssigem Stickstoff befülltes Dewar-Gefäß. Die Sicherheitskühlfalle (**4**) war bei der Destillation ebenfalls mit flüssigem Stickstoff befüllt und verhinderte das Diffundieren flüchtiger Bestandteile in die Vakuumpumpe.

Folgende **Abbildung 51** zeigt die für die Hochvakuumdestillation (SAFE-Technik) zur Abtrennung der flüchtigen Verbindungen eingesetzte BAENG®-Apparatur (*Engel et al., 1999*).



**Abbildung 51:** Apparatur (BAENG<sup>®</sup>) zur SAFE-Destillation nach *Engel et al. (1999)*

(1) Temperierter Kolben; (2) Heizplatte; (3) Kakuumanschluss; (4) Sicherheitskühlfalle; (5) Tropftrichter; (6) gekühlter Auffangkolben

#### 3.4.2 Fraktionierung der flüchtigen Fraktion

Das Destillat aus 3.4.1.2 wurde zunächst durch Ausschütteln mit Natriumcarbonat in eine saure Fraktion (AF) und eine neutral-basische Fraktion (NBF) aufgetrennt. Hierzu wurde der farblose Etherextrakt dreimal mit Natriumcarbonatlösung (0,5 mol/L) ausgeschüttelt. Die Etherphase (NBF) wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung einmal gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und über Baumwollwatte filtriert. Die vereinigte wässrige Phase (AF) wurde mit Salzsäure (1 mol/L) auf einen pH von 2 eingestellt und anschließend dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen, die nun die saure Fraktion enthielten, wurden ebenfalls über Natriumsulfat getrocknet und über Baumwollwatte filtriert. Die AF und NBF wurden nach dem Filtrieren zunächst an einer Vigreux-Kolonne (60 cm x 1 cm) bei 41°C Wasserbadtemperatur auf ein Volumen von ca. 3 ml eingeeengt. Anschließend erfolgte die Reduzierung auf ein Volumen von 200 µl bei 38°C Wasserbadtemperatur an einer Mikrodestillationsapparatur nach *Bemelmans (1979)*.

#### 3.4.3 Identifizierung der Aromastoffe mittels Kapillargaschromatographie-Olfaktometrie (HRGC-O)

Der erste entscheidende Schritt zur Beurteilung flüchtiger Verbindungen im Hinblick auf ihre Aromarelevanz ist deren Wahrnehmung als aromaaktive Substanz mit Hilfe der Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O, Sniffing-Technik, *Schieberle, 1995*). Mittels hochauflösender Gaschromatographie (HRGC) wurden die flüchtigen Fraktionen (vgl. **3.4.2**) an einer Kapillarsäule aufgetrennt und durch Teilung des Trägergasstromes einem FI-Detektor sowie zeitgleich einem Sniffing-Port zugeführt, über welchen der Gasstrom abgerochen wurde. Auf diese Weise konnten geruchsaktiven Bereichen (Verbindungen) im FID-Chromatogramm Geruchsqualitäten und die analytische Messgröße des Retentionsindex (RI-Wert nach Kovats, vgl. **3.6.2**) zugeordnet werden. Die Zuordnung zu Aromastoffen erfolgte über den Vergleich von RI-Werten einer hausinternen Datenbank und ermittelten Werten von Reinsubstanzen, die auf drei verschiedenen Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität chromatographiert wurden (vgl. **3.6.1**).

#### 3.4.3 Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

Die Aromaextraktverdünnungsanalyse diente der ersten Bewertung der Aromarelevanz einer aromaktiven Verbindung in einem komplexen Gemisch. Die zu untersuchenden aufkonzentrierten Aromaextrakte der AF und NBF (vgl. **3.4.2**) wurden hierzu stufenweise 1:2 mit Lösungsmittel verdünnt und jede Verdünnungsstufe (2, 4, 8, ...,  $2^n$ ) mittels HRGC-O abgerochen, solange bis keine geruchsaktiven Verbindungen mehr am Sniffing-Port detektiert werden konnten (*Schieberle und Grosch, 1987a*). Der FD-Faktor einer Verbindung (*Flavour Dilution-Faktor*, vgl. **1.2.2.1**) stellt die höchste Verdünnung dar, bei der sie noch wahrgenommen wird, wobei für den unverdünnten Extrakt ein FD-Faktor von 1 festgelegt wird (*Ullrich und Grosch, 1987*). Um bei der AEVA Lücken (engl.: *gaps*, *Abbott et al. 1993*) zu vermeiden, wurde die Verdünnungsanalyse immer in zwei Etappen durchgeführt, wobei zunächst die Verdünnungsstufen 1, 4, 16, 64 usw. und zeitnah die Verdünnungsstufen 2, 8, 32, 128 usw. untersucht wurden.

#### 3.5 Quantitative Bestimmung der Aromastoffe

Die quantitative Bestimmung der Aromastoffe wurde mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA, vgl. **1.7.3**) durchgeführt.

### 3 Experimenteller Teil

---

#### 3.5.1 Konzentrationsbestimmung der isotopenmarkierten Standards

Zur Bestimmung der Konzentration der isotopenmarkierten Standards diente die HRGC-FID, bei der Methyloctanoat als interner Standard zur Korrektur der eingespritzten Volumina fungierte. Zunächst wurden eine Stammlösung der korrespondierenden unmarkierten Referenzverbindung (500 µg/ml) sowie eine Stammlösung von Methyloctanoat (500 µg/ml) hergestellt. Für die Ermittlung des Responsefaktors wurden Kalibrierlösungen der Referenzsubstanz-Lösung und der Methyloctanoat-Lösung in den Verhältnissen 1:4, 1:1 und 4:1 zubereitet, entsprechend einem Konzentrationsbereich von 12,5 - 200 µg/ml. Nach Analyse der Kalibrationslösungen wurde der Responsefaktor (Rf) nach folgender Formel berechnet:

$$Rf = \frac{c_A \cdot A_{MeOct}}{A_A \cdot c_{MeOct}}$$

Rf : Responsefaktor

$c_A$  : Konzentration der unmarkierten Verbindung

$c_{MeOct}$  : Konzentration der Methyloctanoat-Lösung im Responselauf

$A_A$  : Peakfläche der unmarkierten Verbindung

$A_{MeOct}$  : Peakfläche der Methyloctanoat-Lösung im Responselauf

Für die Ermittlung der Konzentration der markierten Verbindung, deren Konzentration zwischen 50 µg/ml und 200 µg/ml liegen sollte, wurden 0,5 ml dieser Lösung mit 0,5 ml einer Methyloctanoat-Lösung (100 µg/ml) hergestellt und ebenfalls mittels HRGC-FID vermessen. Die Berechnung der Konzentration der markierten Standardverbindung ( $c_{St}$ ) erfolgte nach der folgenden Formel.

$$c_{St} = Rf \cdot \frac{c_{MeOct} \cdot A_{St}}{A_{MeOct}}$$

$c_{St}$  : Konzentration der markierten Standardverbindung

$c_{MeOct}$  : Konzentration des Methyloctanoat-Standards

$A_{St}$  : Peakfläche der markierten Verbindung

$A_{MeOct}$  : Peakfläche des Methyloctanoat-Standards

Rf : Responsefaktor



### 3.5.2 Standarddotierung und Herstellung der Lösungsmittel-extrakte

Bei der Dotierung der Probenextrakte mit den stabilisotopenmarkierten internen Standards wurden diese direkt auf das nach 3.4.1.1 hergestellte Probenpulver pipettiert und sofort das Lösungsmittel zu Extraktion zugegeben. Die Extraktion in den Quantifizierungsversuchen erfolgte über Nacht, um sicherzustellen, dass eine vollständige Equilibrierung zwischen Analyt und Standard in der Probensuspension stattgefunden hat. Die dotierte Standardmenge wurde dabei so gewählt, dass sie zwischen der 0,33-fachen und 3-fachen Menge des betreffenden Analyten in der Probe lag, entsprechend den Mischungsverhältnissen für die Bestimmung der Responsefaktoren (vgl. 3.5.3). Nach der Hochvakuumdestillation erfolgte v.a. bei der Quantifizierung der aromaaktiven organischen Säuren eine Fraktionierung in NBF und AF (vgl. 3.4.2), um störende Signale bei der eindimensionalen HRGC-MS (vgl. 3.7.3) zu vermeiden.

### 3.5.3 Bestimmung der Responsefaktoren

Der **Responsefaktor (Rf)** diente bei der SIVA dazu, unvollständige Markierungen in markierten Standards zu korrigieren. Er wurde aus Mischungen bekannter Konzentrationen an unmarkierter und isotopenmarkierter Verbindung bestimmt, die in den Verhältnissen 3+1, 1+1 und 1+3 mittels HRGC-MS vermessen wurden und wie folgt berechnet.

$$Rf = \frac{m_u \cdot I_{iSt}}{I_u \cdot m_{iSt}}$$

Rf : Responsefaktor

$m_u$  : Menge des unmarkierten Analyten

$m_{iSt}$  : Menge der markierten Verbindung

$I_{iSt}$  : Intensität des Ions  $m/z$  des unmarkierten Analyten

$I_u$  : Intensität des Ions  $m/z$  des dotierten internen Standards

### 3.5.4 Massenspektrometrie und Konzentrationsberechnung

Die nach 3.5.2 hergestellten, dotierten Aromaextrakte der Quantifizierungsversuche wurden in den nach 3.7 beschriebenen Systemen mittels HRGC-MS oder TDGC-MS vermessen. Die Berechnung der Analytmenge im Extrakt erfolgte über das Verhältnis der relativen

### 3 Experimenteller Teil

---

Intensitäten der ausgewählten Ionen (vgl. **Tabelle 45**), also der integrierten Peakflächen der Massenspuren im Massenchromatogramm.

$$m_u = Rf \cdot \frac{m_{iSt} \cdot I_u}{I_{iSt}}$$

$m_u$  : Menge des unmarkierten Analyten

$m_{iSt}$  : Menge des dotierten internen Standards

$I_{iSt}$  : Intensität des Ions  $m/z$  des unmarkierten Analyten

$I_u$  : Intensität des Ions  $m/z$  des dotierten internen Standards

$Rf$  : Responsefaktor

In der folgenden **Tabelle 45** sind die verwendeten isopenmarkierten Standards mit den jeweils zur Quantifizierung verwendeten „Massen“ ( $m/z$  = Verhältnis Masse/Ladung) und den ermittelten Responsefaktoren ( $Rf$ ) aufgeführt sowie das massenspektrometrische System (vgl. **3.7**), in dem die Aromastoffe jeweils quantifiziert wurden.

Tabelle 45: Isotopenmarkierte Standards, Massenspuren und Responsefaktoren

Aromastoff	Standard	[m/z]		Rf <sup>a)</sup>	System <sup>b)</sup>
		Analyt	Standard		
2,3-Butandion <sup>c)</sup>	[ <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]-2,3-Butandion	87	91	1,00	V
Buttersäure	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Buttersäure	89	91	0,87	III
δ-Decalacton	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-δ-Decalacton	171	173	0,99	V
δ-Dodecalacton	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-δ-Dodecalacton	199	201	1,01	V
Essigsäure	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Essigsäure	61	64	0,98	III
Ethylbutanoat	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Ethylbutanoat	117	120	0,95	V
Ethylhexanoat	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Ethylhexanoat	145	148	0,97	V
Hexansäure	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Hexansäure	117	120	0,81	III
2-Methylpropansäure	[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-2-Methylpropansäure	89	96	0,87	III
3-Methylbutanal	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Methylbutanal	69	71	0,98	V
3-Methylbutanal	[ <sup>2</sup> H <sub>7,8,9</sub> ]-3-Methylbutanal	69	76-78	0,94	V
3-Methylbutanol	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Methylbutanol	71	73	1,07	V
3-Methylbutanol	[ <sup>2</sup> H <sub>10,11</sub> ]-3-Methylbutanol	71	81-82	0,93	V
3-Methylbuttersäure	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Methylbuttersäure	103	105	0,87	III
3-Methylbuttersäure	[ <sup>2</sup> H <sub>9</sub> ]-3-Methylbuttersäure	103	112	1,03	V
3-Methylbuttersäure-ethylester	[ <sup>2</sup> H <sub>9</sub> ]-3-Methylbuttersäure-ethylester	131	140	0,97	V
Pentansäure	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]- Pentansäure	103	106	0,90	III
Phenylelessigsäure	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-Phenylelessigsäure	137	139	0,86	V
2-Phenylethanol	[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-2-Phenylethanol	105	107	1,02	V

<sup>a)</sup> Rf = Responsefaktor (vgl. 3.5.3)

<sup>b)</sup> System (vgl. 3.7): System III = HRGC-ITD-Saturn 2000, System V = TDGC-ITD-Saturn 2200

<sup>c)</sup> 2,3-Butandion wurde mittels SPME-Technik gemessen (vgl. 3.6.4)

### 3.5.5 Bestimmung der Konzentrationen von 2- und 3-Methylbuttersäure

Die Konstitutionsisomere 2- und 3-Methylbuttersäure waren auf der verwendeten FFAP-Kapillarsäule chromatographisch nicht trennbar. Bei der Quantifizierung mittels MS-CI im HRGC-MS-System III (vgl. 3.7.3) ergab sich folglich eine gemeinsame Peakfläche der Massenspur  $m/z = 103$ . Zur Quantifizierung wurde deshalb die acide Fraktion (AF) zusätzlich ohne Standardzugabe mittels MS-EI analysiert. Mit den Verhältnissen der charakteristischen Fragmente der Isomere ( $m/z = 60$  für 3-Methylbuttersäure und  $m/z = 74$  für 2-Methylbuttersäure) ließ sich über eine Kalibriergerade aus bekannten Mischungen der

### 3 Experimenteller Teil

---

Isomere deren Verhältnis in der Probe berechnen. Unter Einbeziehung des über die SIVA mit isotopenmarkierter 3-Methylbuttersäure bestimmten Summengehalts bei der Methylbuttersäuren wurden die getrennten Isomeren-Gehalte letztlich berechnet.

**Tabelle 46** zeigt die Flächenteile der charakteristischen Massenspuren  $m/z = 60$  und  $m/z = 74$  der zur Kalibrierung verwendeten Isomeren-Mischungen bei der HRGC-MS im EI-Modus. Die resultierende Kalibriergerade ist in **Abbildung 13** (vgl. **2.1.1.3**) dargestellt, die charakteristischen Massenspektren bei der MS-EI der Isomere zeigt **Abbildung 11** (vgl. **2.1.2.2**).

**Tabelle 46:** Flächenanteile der Massenspuren  $m/z$  74 und  $m/z$  60 bei der HRGC-MS-EI von Mischungen aus 2- und 3-Methylbuttersäure

Zusammensetzung der Mischung [%]		Flächenanteile der Massenspur [%]	
2-Methylbuttersäure	3-Methylbuttersäure	$m/z$ 74	$m/z$ 60
0	100	1,4	98,6
5	95	6,0	94,0
10	90	11,2	88,8
20	80	20,6	79,4
40	60	28,4	61,6
60	40	58,1	41,9

Die Berechnung des Anteils an 3-Methylbuttersäure aus dem Isomeren-Gemisch erfolgte unter Einbeziehung eines **Responsefaktors (Rf)** nach den folgenden Formeln.

$$A(\%)_{3\text{MBs}} = \text{Rf} \cdot \frac{I_{60}}{I_{60} + I_{74}} \cdot 100$$

$A(\%)_{3\text{MBs}}$  : Anteil an 3-Methylbuttersäure in Prozent

$I_{60}$  : Intensität des Fragment-Ions  $m/z = 60$  von 3-Methylbuttersäure

$I_{74}$  : Intensität des Fragment-Ions  $m/z = 74$  von 2-Methylbuttersäure

Rf : Responsefaktor

$$Rf = \frac{m_{3MBs}}{m_{3MBs} + m_{2MBs}} \cdot \frac{I_{60} + I_{74}}{I_{60}}$$

Rf : Responsefaktor

$m_{3MBs}$  : Menge an 3-Methylbuttersäure in der Responsefaktorlösung

$m_{2MBs}$  : Menge an 2-Methylbuttersäure in der Responsefaktorlösung

$I_{60}$  : Intensität des Fragment-Ions  $m/z = 60$  von 3-Methylbuttersäure

$I_{74}$  : Intensität des Fragment-Ions  $m/z = 74$  von 2-Methylbuttersäure

### 3.6 Chromatographische Methoden

#### 3.6.1 Hochauflösende Kapillargaschromatographie: HRGC-O und HRGC-FID

Die hochauflösende Kapillargaschromatographie (HRGC) mit FID- und olfaktorischer Detektion wurde mittels eines Gaschromatographen 5160 Megaserie (Carlo Erba Instruments, Hofheim, Deutschland) durchgeführt, der an eine Steuereinheit MFC 500 gekoppelt war. Der Trägergasstrom wurde durch einen Y-Glassplitter (Chrompack, Frankfurt) im Verhältnis 1:1 geteilt und durch zwei unbelegte Kapillaren gleicher Länge (25 cm x 0,32 mm ID) einem FID und einem Sniffing-Port zugeführt.

#### Chromatographische Bedingungen HRGC

Gaschromatograph:	Megaserie 5160, Carlo Erba, Hofheim
Injektionstechnik:	On column bei 40 °C (mit sekundärer Kühlung)
Injektionsvolumen:	1 µl
Trägergas:	Helium (2,2 ml/min)
Trägergasvordruck:	FFAP: 75 kPa OV-1701: 110 kPa DB-5: 110 kPa
Brenngase (FID):	Wasserstoff (20 ml/min), synthetische Luft (200 ml/min)
Make-up Gas (FID):	Stickstoff (30 ml/min)
Split:	Splitverhältnis 1:1 (v/v) zu FID und Sniffing-Port
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID) Temperatur 230 °C, Attenuation 2 <sup>5</sup>
Sniffing-Port:	Temperatur 230 °C
Schreiber:	Servogor 124, BBC Goerz, Österreich Empfindlichkeit: 10 mV Papiervorschub: 1 cm/min

### 3 Experimenteller Teil

---

#### Trennsäulen HRGC (Fused Silica-Kapillarsäulen)

1. FFAP: 30 m x 0,32 mm (ID), 0,25 µm (FD), J&W Scientific, Folsom, USA
  2. OV-1701: 30 m x 0,25 mm (ID), 0,25 µm (FD), J&W Scientific, Folsom, USA
  3. DB-5: 30 m x 0,25 mm (ID), 0,25 µm (FD), Varian, Darmstadt
- Vorsäule: 5 m x 0,32 mm (ID), deaktiviert, J&W Scientific, Folsom, USA

#### Temperaturprogramme HRGC

FFAP:	40 °C, 2 min	$\xrightarrow{6\text{ °C/min}}$	190 °C, 0 min	$\xrightarrow{12\text{ °C/min}}$	230°C, 10 min
OV-1701:	40 °C, 2 min	$\xrightarrow{6\text{ °C/min}}$	190 °C, 0 min	$\xrightarrow{12\text{ °C/min}}$	230°C, 10 min
DB-5:	40 °C, 2 min	$\xrightarrow{8\text{ °C/min}}$	240 °C, 10 min		

#### 3.6.2 Bestimmung von Retentionsindices

Der **lineare Retentionsindex (RI)** berechnet sich nach *Kovats (1958)* nach der unten stehenden Formel. Hierfür wurde eine homologe Reihe von n-Alkanen (C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub> für FFAP, C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub> für OV-1701 und DB-5; Konz. 0,05 % in Pentan) unter denselben Bedingungen wie die Substanzen chromatographiert.

$$RI = 100 \cdot N + \frac{RT_v - RT_n}{RT_{n+1} - RT_n}$$

RI : Retentionsindex

RT<sub>v</sub> : Retentionszeit der Substanz

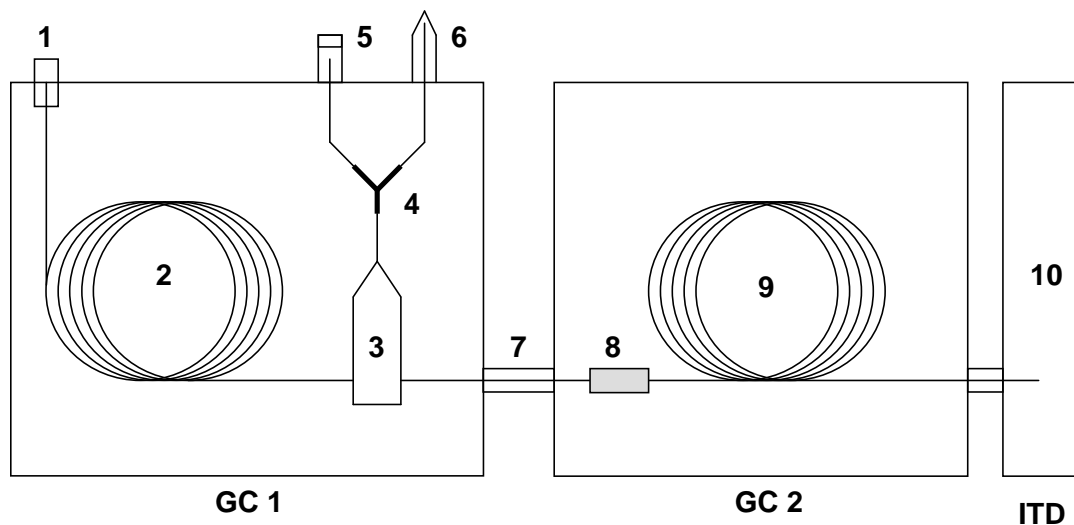
RT<sub>n</sub> : Retentionszeit des Alkans mit n C-Atomen

RT<sub>n+1</sub> : Retentionszeit des Alkans mit n+1 C-Atomen

N : Anzahl der C-Atome im Alkan

### 3.6.3 Zweidimensionale Kapillargaschromatographie (TDGC)

Die zweidimensionale Kapillargaschromatographie (TDGC) wurde in zwei MS-Systemen (**Systeme IV, V**; vgl. 3.7) verwendet und diente zum einen bei den Identifizierungsarbeiten (vgl. 2.1.3) zur Anreicherung von Spurenkomponenten und zum anderen zur Quantifizierung von Aromastoffen, die im eindimensionalen System überlagert oder gestört wurden. Beide Systeme waren mit einem Massenspektrometer als Detektor verbunden. Die folgende **Abbildung 52** zeigt schematisch den Aufbau eines TDGC-MS-Systems.



**Abbildung 52:** Schematischer Aufbau eines TDGC-MS-Systems

(1) On column-Injektor; (2) Kapillarsäule I (FFAP); (3) MCSS-Splitter mit Dom (Moving Column Stream Switching); (4) Y-Splitter; (5) FID; (6) Sniffing-Port; (7) Verbindung mit Transferline; (8) Kühlfalle; (9) Kapillarsäule II (OV-1701 oder DB-5); (10) Massenspektrometer (ITD)

Im TDGC-MS-System wurde ein Gaschromatograph (**GC 1**) mit einem **MCSS-System** (*Moving Column Stream Switching*) (3) und einem DOM über eine Transferline (7) mit einem zweiten Gaschromatographen (**GC 2**) verbunden. Dieser wiederum war an ein Massenspektrometer (10) gekoppelt. Das MCSS-System im GC 1 war im Offline-Modus über einen Splitter (4) gleichzeitig mit einem FID (5) und einem Sniffing-Port (6) verbunden. Auf diese Weise konnten nach Injektion der Probe über den On column-Injektor (1) die Substanzen auf der Kapillarsäule I (2) über ihre Retentionszeit zunächst lokalisiert werden. Im kurzzeitigen Online-Modus des MCSS-Systems wurde die gewünschte Substanz dann anhand ihrer Retentionszeit am GC 1 „ausgeschnitten“ und über die Transferline in die Kühlfalle (8) des GC 2 geleitet. Nach dem dortigen Ausfrieren der Verbindung

### 3 Experimenteller Teil

---

(*Kryofokussierung*,  $-100^{\circ}\text{C}$ ), wurde die Kühlfalle schlagartig erhitzt (*Thermodesorption*,  $+200^{\circ}\text{C}$ ), die zu untersuchende Substanz über die Kapillarsäule II (9) chromatographiert und dem Massenspektrometer (10) zur Detektion zugeführt.

#### Chromatographische Bedingungen TDGC

Gaschromatographen:	siehe 3.7.4 und 3.7.5
Injektionstechnik:	On column bei $40^{\circ}\text{C}$
Injektionsvolumen:	1 - 4 $\mu\text{l}$
Trärgas Säule I	Helium (2 ml/min)
Trärgasvordruck GC 1	FFAP: 100 kPa
Brenngase (FID):	Wasserstoff, synthetische Luft
Make-up Gas (FID):	Stickstoff
Split:	Splitverhältnis 1:1 (v/v) zu FID und Sniffing-Port (Y-Glassplitter)
Detektoren GC1:	FID und Sniffing-Port (parallel), Temperatur je $250^{\circ}\text{C}$
Spalteinheit:	MCSS-System (Moving Column Stream Switching-System)
Kühlfalle:	Fused-Silica-Kapillare desaktiviert (15 cm x 0,32 mm ID) Kryofokussierung bei $-100^{\circ}\text{C}$ mit flüssigem Stickstoff Thermodesorption bei $+200^{\circ}\text{C}$ Steuerung: MFA 815, Fisons Instruments
Trärgas Säule II	Helium (ca 1,5 ml/min)
Detektor GC 2:	Massenspektrometer ITD, siehe 3.7.4 und 3.7.5

#### Trennsäulen TDGC (Fused Silica-Kapillarsäulen)

##### **GC-Ofen 1:**

FFAP:	30 m x 0,32 mm (ID), 0,25 $\mu\text{m}$ (FD), Machery-Nagel, Düren, BRD
Vorsäule:	5 m x 0,53 mm i.D.; Chromatographiehändler Müller, Fridolfing, BRD

##### **GC-Ofen 2:**

OV-1701:	30 m x 0,25 mm (ID), 0,25 $\mu\text{m}$ (FD), Machery-Nagel, Düren, BRD
DB-5:	30 m x 0,25 mm (ID), 0,25 $\mu\text{m}$ (FD), Varian, Darmstadt
BGB 176:	30 m x 0,25 mm (ID), 0,25 $\mu\text{m}$ (FD), BGB Analytik AG, Anwil, Schweiz

#### Temperaturprogramme TDGC

FFAP:	40 $^{\circ}\text{C}$ , 2 min	$\xrightarrow{6^{\circ}\text{C}/\text{min}}$	230 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min		
OV-1701:	40 $^{\circ}\text{C}$ , 2 min	$\xrightarrow{6^{\circ}\text{C}/\text{min}}$	190 $^{\circ}\text{C}$ , 0 min	$\xrightarrow{12^{\circ}\text{C}/\text{min}}$	230 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min
DB-5:	40 $^{\circ}\text{C}$ , 2 min	$\xrightarrow{8^{\circ}\text{C}/\text{min}}$	240 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min		
BGB 176	35 $^{\circ}\text{C}$ , 3 min	$\xrightarrow{6^{\circ}\text{C}/\text{min}}$	240 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min		



### 3.6.4 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Die Festphasenmikroextraktion (*Solid Phase Micro Extraction*, SPME) diente zur Quantifizierung von 2,3-Butandion und fand in Verbindung mit dem TDGC-MS-System V Anwendung (vgl. 3.6.3, 3.7.5). Die Festphasen-Extraktionseinheit diente der **Extraktion und Probenaufgabe** zugleich.

#### Chromatographische Bedingungen SPME

Probenaufgabetechnik:	SPME, Thermische Desorption
Adsorptions-Phase:	85 µm Carboxen™ / PDMS StableFlex™ SUPELCO, Bellefonte, PA, USA
Bake-Out Temp.:	300°C
Bake Out Time:	5 min.
Extraction Time:	15 min.
Desorption Time:	1 min.
Desorption Temp.:	250°C
Trärgas / Fluss:	Helium (1,5 ml/min)
Trärgasvordruck:	120 kPa
Detektor:	Massenspektrometer ITD, siehe 3.7.5

#### Verwendete Kapillarsäulen SPME:

##### GC-Ofen 1:

FFAP:	30 m x 0,32 mm i.D.; 0,25 µm F.D.; Machery-Nagel, Düren, BRD
Vorsäule:	5 m x 0,53 mm i.D.; Chromatographiehandel Müller, Fridolfing, BRD

##### GC-Ofen 2:

OV1701:	30 m x 0,32 mm i.D.; 0,25 µm F.D.; Machery-Nagel, Düren, BRD
---------	--

#### Temperaturprogramme SPME

FFAP:	38 °C, 3 min	→ <sup>6 °C/min</sup>	80°C, 0 min	→ <sup>20 °C/min</sup>	230°C, 5 min
OV-1701:	35 °C, 4 min	→ <sup>6 °C/min</sup>	70 °C, 0 min	→ <sup>20 °C/min</sup>	230°C, 5 min

#### 3.7 Massenspektrometrische Systeme

##### 3.7.1 HRGC-MS MAT 95 S (System I)

Dieses System bestand aus einem Gaschromatographen vom Typ 5890 HP Serial 2 (Hewlett Packard, Heilbronn), der mit einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer des Typs MAT 95 S (Finnigan MAT, Bremen) als Detektor verbunden war. Die Ionisierungsenergie bei der Elektronenstoßionisation (EI-Modus) lag bei 70 eV, für die chemische Ionisation (CI-Modus) mit Isobutan als Reaktandgas wurde eine Ionisationsenergie von 115 eV eingesetzt. Das System diente zur Identifizierung von Aromastoffen, sowie zur Reinheitsüberprüfung von Synthesen. Die GC-Säule richtete sich nach den Anforderungen der Proben und Analyten.

##### 3.7.2 HRGC/MD 800 (System II)

Zur Charakterisierung von Zwischenprodukten und zur Reinheitsüberprüfung bei der Aromastoffsynthese wurde in diesem System eine je nach Anforderung benötigte Kapillarsäule in einem Gaschromatographen mit einem Quadrupol-Massenspektrometer (MD 800, Fisons Instruments, Mainz-Kastel) verbunden. Massenspektren wurden unter Anwendung einer Ionisationsenergie von 70 eV im EI-Modus erhalten.

##### 3.7.3 HRGC-ITD-Saturn 2000 (System III)

Zur Quantifizierung von Aromastoffen diente dieses eindimensionale HRGC-MS-System, bei dem ein Gaschromatograph Typ 3800 (Varian, Darmstadt), der mit einem Autosampler Combi Pal (Varian, Darmstadt) ausgestattet war, mit einem ITD-Massenspektrometer Saturn 2000 (Varian, Darmstadt) gekoppelt wurde. Die Massenspektren wurden im EI-Modus sowie im SECI-Modus (Selected Ejection Chemical Ionisation) mit Methanol als Reaktandgas bei einer Ionisationsenergie von 70 eV aufgenommen. Die GC-Säule richtete sich nach den Anforderungen der Proben und Analyten.

##### 3.7.4 TDGC-ITD 800 (System IV)

Dieses zweidimensionale System (vgl. 3.6.3) diente zur Identifizierung von Aromastoffen, die dabei angereichert und von Überlagerungen befreit werden mussten. Der erste Gaschromatograph (GC 1) Mega Series (Fisons Instruments, Egelsbach) war dabei über eine MCSS-Einheit mit dem zweiten Gaschromatographen (GC 2) Typ 5160 (Carlo Erba,

Hofheim) verbunden. GC 1 verfügte über einen FID und einen Sniffing-Port, GC 2 verfügte ebenso über einen Sniffing-Port und war gleichzeitig mit einem ITD-Massenspektrometer Typ 800 (Finnigan MAT, Bremen) verbunden. Massenspektren wurden durch Elektronenstoßionisation (EI-Modus) bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV und durch chemische Ionisation (CI-Modus) mit Methanol als Reaktandgas bei einer Ionisierungsenergie von 90 eV erhalten.

#### 3.7.5 TDGC-ITD-Saturn 2200 (System V)

Wenn es bei der Quantifizierung zu Überlagerung der Massenspuren der Analyten mit anderen Substanzen kam, wurde dieses zweidimensionale System (vgl. 3.6.3) eingesetzt. Hierbei war als GC 1 ein Trace 2000 (Thermo Quest, Egelsbach), der mit einem Autosampler Combi Pal (Varian, Darmstadt) ausgestattet war, über eine MCSS-Einheit (Fisons Instruments, Egelsbach) mit dem GC 2, ein CP 3800 (Varian, Darmstadt), verbunden. Dieser wiederum war gekoppelt an ein ITD-Massenspektrometer Saturn 2200 (Varian, Darmstadt), mit dem zur Quantifizierung Massenspektren nach chemischer Ionisation mit Methanol als Reaktandgas bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV aufgenommen wurden.

### 3.8 Sensorische Methoden

#### 3.8.1 Dreiecksprüfung (Triangeltest)

Zur Feststellung einer grundsätzlichen sensorischen Unterscheidbarkeit (orthonasal) von Käseproben unterschiedlichen Alters und unterschiedlicher Herstellung wurden Triangeltests durchgeführt. Einem geschulten Sensorikpanel wurden dazu in Prüfsätzen je drei Proben vorgesetzt, wobei eine Probe in jedem Fall als abweichend gekennzeichnet werden musste (*Forced-Choice-Technik*). Durchführung und Auswertung erfolgten nach der amtlichen Prüfmethode L 00.90-7 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (ehem. § 35 LMBG). Der Unterschied zwischen den Proben konnte so als signifikant eingestuft werden, wenn die Anzahl der richtigen Antworten unter Berücksichtigung der Gesamtzahl der Teilnehmer, bei einem festgelegten Signifikanzniveau  $\alpha$ , den dort angegebenen Wert erreichten. Das **Signifikanzniveau  $\alpha$**

### 3 Experimenteller Teil

---

steht für die Wahrscheinlichkeit ein falsches Ergebnis als richtig anzunehmen (Irrtumswahrscheinlichkeit).

#### 3.8.2 Aromaprofilanalyse

Bei den Aromaprofilanalysen bewertete ein geschultes Sensorikpanel Käseproben orthonasal anhand von Geruchsattributen, die in Vorversuchen bestimmt wurden. Die Bewertungsskala umfasste die Intensitäten 0 (nicht wahrnehmbar), 1 (schwach wahrnehmbar), 2 (wahrnehmbar) und 3 (stark wahrnehmbar). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aromaprofilanalysen wurden anhand der in **Tabelle 47** aufgeführten Deskriptoren und zugehörigen Aromastoffe durchgeführt.

**Tabelle 47:** Deskriptoren und zugehörige Aromastoffe zur Bewertung von Käse nach Gouda-Art in Aromaprofilanalysen

Deskriptor	Aromastoff
kokosnussartig	$\delta$ -Decalacton
schweißig, ranzig	Buttersäure
schweißig, käsig	3-Methylbuttersäure
essigsauer	Essigsäure
honigartig	Phenylelessigsäure
butterartig	2,3-Butandion (Diacetyl)
malzig	3-Methylbutanal
fruchtig	Ethylbutanoat

#### 3.8.3 Bestimmung von Geruchsschwellen in Sonnenblumenöl

Für die Bestimmung von Geruchsschwellen in Öl musste zunächst die Reinheit des jeweiligen Aromastoffs überprüft werden. In einer Verdünnungsanalyse (AEVA) einer ethanolischen Stammlösung der Verbindung ( $c = 1000 \mu\text{g/ml}$ ) galt diese als rein, wenn die wahrnehmbaren Verunreinigungen (bei Verdünnungsfaktoren von 10) einen mindestens um den Faktor 100 niedrigeren FD-Faktor als der Aromastoff besaßen.

Im Versuch zur Bestimmung der Geruchsschwelle wurde eine geeignete Stammlösung des Aromastoffs stufenweise 1:3 (v/v) mit Sonnenblumenöl verdünnt und jede Verdünnung in absteigender Konzentration als Triangelreihe einem geschulten Sensorikpanel zur Bewertung der abweichenden Probe vorgelegt. Auf diese Weise konnten die nasalen Erkennungs- und Wahrnehmungsschwellen der Aromastoffe in einer geruchsneutralen Öl-Matrix bestimmt werden. Aus den Schwellenwerten der einzelnen Prüfpersonen ließen sich gemäß den amtlichen Prüfmethode L 00.09-7 und L 00.90-9 nach § 64 LFGB (ehem. § 35 LMBG) die nasale Geruchsschwelle eines Aromastoffs wie folgt berechnen:

$$W = \sqrt{c_s \cdot c_{s+1}}$$

- W : Erkennungsschwelle der Prüfperson  
c<sub>s</sub> : Konzentration der letzten erkannten Probe  
c<sub>s+1</sub> : Konzentration der ersten nicht erkannten Probe

$$Sw = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n W_i}$$

- Sw : Erkennungsschwelle der Prüfgruppe  
n : Anzahl der Prüfer  
W<sub>i</sub> : Erkennungsschwelle der einzelnen Prüfer

#### 3.8.4 Rekombinationsversuche (Aromasimulation)

Die Aromasimulationen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten in Anlehnung an *Preininger et al. (1996)* und *Rychlik und Bosset (2001b)*. Dazu wurde ein geruchsarmer Mozzarella der Fa. Galbani® vorzerkleinert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einer Moulinette® zu einem feinen Pulver zermahlen. Anschließend erfolgte die Gefriertrocknung (vgl. **3.9.1**). Für das Rekombinat wurde das getrocknete Mozzarella-Pulver mit einer wässrig-ethanolischen Aromastofflösung so versetzt, dass neben der Endkonzentration der Aromastoffe auch der Wassergehalt dem realen Proben-Gouda entsprach.

### 3 Experimenteller Teil

---

Die entsprechenden Aromastofflösungen für den gereiften konventionellen Gouda und den gereiften Rohmilch-Gouda wurden aus den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten quantitativen Daten der Aromastoffe als Mischungen nach den folgenden **Tabellen 48** und **49** erstellt. Die Reinheiten der Aromastoffe wurden dabei berücksichtigt. Zudem wurde in der Aromastoffmischung, die letztlich zur Dotierung des Mozzarella-Pulvers benutzt wurde, der pH-Wert mittels Natriumcarbonatlösung (0,5 mol/L) auf pH = 5,2 - 5,4 eingestellt, um den pH-Wert des realen Käses zu simulieren.

Nach der Dotierung des Mozzarella-Pulvers mit der Aromastofflösung wurde das Gemisch durch intensives Schütteln homogenisiert und equilibriert, bevor es mit dem Original-Käse zum Vergleich Aromaprofilanalysen (vgl. **3.8.2**) unterzogen wurde. Zuletzt erfolgte eine Gesamtbewertung der Ähnlichkeit zwischen Original und Rekombinat auf einer Skala von 0 (keine Ähnlichkeit) bis 3 (sehr starke Ähnlichkeit).

**Tabelle 48:** Aromastoffzusammensetzung für das Rekombinat 30 Wochen gereifter Gouda -Käse aus pasteurisierter Milch

Aromastoff	Aromastoff Stammlösung [mg/100 ml]	Ethanol in Stammlösung [µl/100 ml]	Aromastoff Verdünnung 1:100 [µg/ml]	Zugabe zu Rekombinat- Lösung [µl/100 ml]	Konzentration Rekombinat- Lösung [µg/L]	Konzentration Mozzarella Rekombinat [µg/kg]
Essigsäure <sup>a)</sup>	-	-	-	268	2808861	843502
2-Methylpropansäure	218,0	- b)	2180	1688	36793	11049
3-Methylbuttersäure	1604,1	- b)	16041	1229	197151	59205
2-Methylbuttersäure	84,8	- b)	848	1564	13255	3980
Buttersäure	405,5	- b)	4055	2103	85274	25608
Pentansäure	160,5	- b)	1605	810	1300	390
Hexansäure	403,4	- b)	4034	841	33908	10183
Ethylbutanoat	204,3	2000	2043	572	117	35
Ethylhexanoat	201,4	2000	2014	263	53	16
2,3-Butandion	503,2	5000	5032	8376	4215	1266
3-Methylbutanal	196,7	2000	1967	1571	309	93
3-Methylbutanol	400,7	2000	4007	1424	570	171
δ-Decalacton	265,9	(5000) <sup>c)</sup>	-	(13) <sup>c)</sup>	5387	1618
δ-Dodecalacton	444,2	(5000) <sup>c)</sup>	-	(13) <sup>c)</sup>	8545	2566
Phenyllessigsäure	506,8	6000	5068	8506	4311	1295
2-Phenylethanol	396,5	3000	3965	1824	723	217

a) Essigsäure wurde direkt zum Rekombinat pipettiert

b) Diese Aromastoffe konnten direkt in Wasser eingewogen werden

c) δ-Decalacton und δ-Dodecalacton wurden zusammen direkt in 5 ml Ethanol eingewogen aus dieser Lösung wurden 13 µl in die Rekombinatlösung pipettiert

Tabelle 49: Aromastoffzusammensetzung für das Rekombinat 30 Wochen gereifter Gouda -Käse aus Rohmilch

Aromastoff	Aromastoff Stammlösung [mg/100 ml]	Ethanol in Stammlösung [µl/100 ml]	Aromastoff Verdünnung 1:100 [µg/ml]	Zugabe zu Rekombinat- Lösung [µl/100 ml]	Konzentration Rekombinat- Lösung [µg/L]	Konzentration Mozzarella Rekombinat [µg/kg]
Essigsäure <sup>a)</sup>	-	-	-	289	3029363	909719
2-Methylpropanensäure	218,0	- b)	2180	1776	38715	11626
3-Methylbuttersäure	1604,1	- b)	16041	1916	307375	92305
2-Methylbuttersäure	84,8	- b)	848	898	7611	2286
Buttersäure	405,5	- b)	4055	1453	58913	17692
Pentansäure	160,5	- b)	1605	1363	2187	657
Hexansäure	403,4	- b)	4034	2673	107815	32377
Ethylbutanoat	204,3	2000	2043	2141	437	131
Ethylhexanoat	201,4	2000	2014	2546	513	154
2,3-Butandion	503,2	5000	5032	2894	1456	437
3-Methylbutanal	196,7	2000	1967	892	176	53
3-Methylbutanol	400,7	2000	4007	883	354	106
δ-Decalacton	265,9	(5000) <sup>c)</sup>	-	(13)	5303	1593
δ-Dodecalacton	444,2	(5000) <sup>c)</sup>	-	(13)	8349	2507
Phenyllessigsäure	506,8	6000	5068	10827	5487	1648
2-Phenylethanol	396,5	3000	3965	1336	530	159

a) Essigsäure wurde direkt zum Rekombinat pipettiert

b) Diese Aromastoffe konnten direkt in Wasser eingewogen werden

c) δ-Decalacton und δ-Dodecalacton wurden zusammen direkt in 5 ml Ethanol eingewogen aus dieser Lösung wurden 13 µl in die Rekombinatlösung pipettiert



### 3.9 Sonstige Methoden

#### 3.9.1 Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes (Wassergehalt)

Zur Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes (Wassergehalt) wurde der Trocknungsverlust des Probenmaterials bestimmt. Dazu wurden 10 g Käse vorzerkleinert, mittels flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einer Moulinette® zu einem feinen Pulver zermahlen. Der Käsebruch des Vorstufenmodells wurde mit 10 g direkt zur Analyse eingesetzt. Anschließend erfolgte eine **Gefriertrocknung**. Durch Differenzwägung wurde der Trocknungsverlust berechnet. Die Gefriertrocknung wurde in einem Gefriertrockner Delta I (Fa. Christ, Osterode) durchgeführt.

#### Parameter der Gefriertrocknung

Temperatur:	-32 °C
Druck:	0,4 Pa
Platten-Temperatur:	18 °C
Zeit:	48 h

Für den im Rahmen dieser Arbeit produzierten Gouda-Käse wurden durch Gefriertrocknung folgende Wassergehalte (%) ermittelt (**Tabelle 50**).

**Tabelle 50:** Wassergehalte (%) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch in 2 Chargen

Käse	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
<b>Charge 1</b>						
Gouda aus pasteurisierter Milch	42,3	40,9	39,8	39,5	35,1	31,8
Gouda aus Rohmilch	43,1	41,2	39,5	38,0	35,5	31,2
<b>Charge 2</b>						
Gouda aus pasteurisierter Milch	44,2	40,1	40,2	39,5	37,9	33,3
Gouda aus Rohmilch	42,4	40,3	40,0	39,1	36,5	31,7

#### 3.9.2 Enzymatische Bestimmung von D- und L-Lactat

Die Bestimmung von D- und L-Lactat erfolgte mit einem kommerziellen Enzymkit der Fa. r-biopharm AG, Darmstadt. Hierzu wurden 10 g Käse in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Moulinette® zu einem feinen Pulver zermahlen. Nach dem Einwiegen von 0,3 g, 0,5 g und 1,0 g des Käsepulvers in einen Messkolben erfolgte eine Heißwasserextraktion bei 60°C für 30 Minuten. Das Fett wurde sodann im Gefrierschrank auskristallisiert, die Probensuspension filtriert und das Filtrat mit 0,1 - 1,0 ml direkt zur enzymatischen Bestimmung eingesetzt. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde ein L-Lactat-Standard bei der Aufarbeitung mitgeführt.

Bei der Bestimmung wird L-Lactat (D-Lactat) mittels NAD<sup>+</sup> (Nicotinamid-adenin-dinucleotid) in Gegenwart des Enzyms L-Lactat-Dehydrogenase (D-Lactat-Dehydrogenase) zu Pyruvat oxidiert, wobei NADH entsteht. Dessen Menge ist äquivalent zur Milchsäuremenge. NADH/H<sup>+</sup> ist Messgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 340 nm vermessen.

Zur photometrischen Messung wurde ein UV-VIS-Zweistrahlfotometer UV-2401 PC mit EPS-Controller der Marke SHIMADZU verwendet. Die Küvetten wurden dabei zur Messung auf 20°C thermostatiert.

#### 3.9.3 Bestimmung der freien Aminosäuren

##### 3.9.3.1 Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurden 5 g Gouda-Käse oder 20 g Käsemodell (vgl. 2.4) eingewogen, der interne Standard (L-Norleucin) und Wasser zugegeben und die Suspension mit einem Ultra-Turrax® zweimal 30 Sekunden homogenisiert. Nach Gefriertrocknung (vgl. 3.9.1) wurden die Proben dreimal mit Pentan entfettet, das Lösungsmittel abgeblasen und die Probe wieder in Wasser suspendiert. Sodann wurde zentrifugiert und die klare Lösung wiederum gefriergetrocknet. Bei Milchproben (Einwage 25 g) erfolgte vor dem Entfetten eine Fällung der Caseine bei pH = 4,6 mittels verdünnter Essigsäure.

##### 3.9.3.2 Bestimmungsmethode

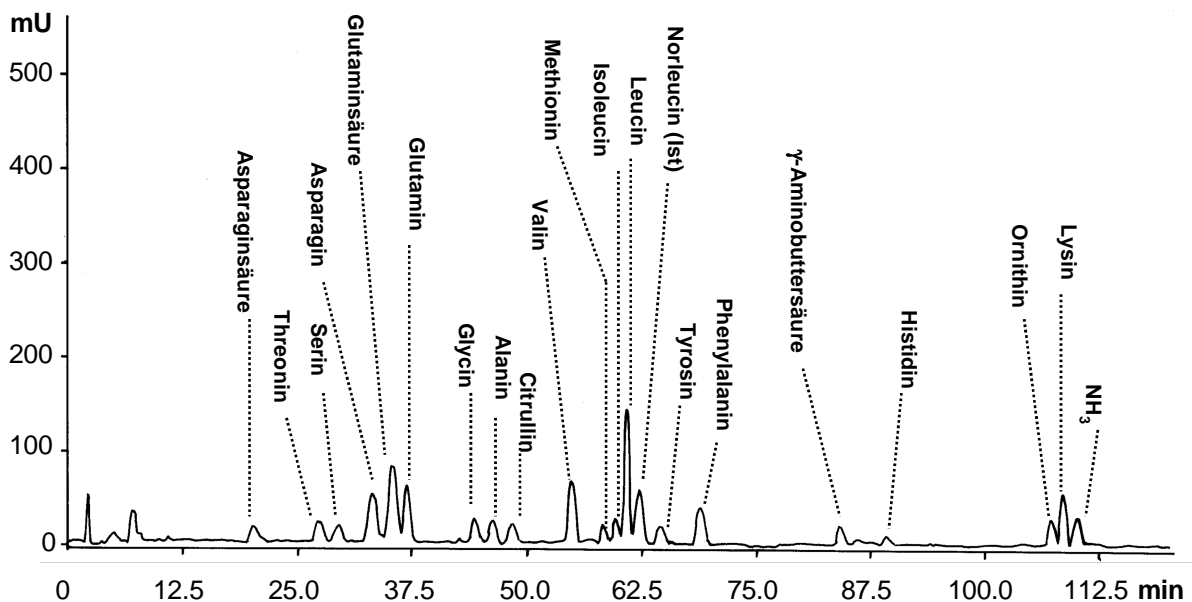
Die Analyse der freien Aminosäuren erfolgte an einem Kationentauscher (Aminosäureanalysator LC 3000, Fa. Eppendorf Biotronik, Maintal) mit der Methode der **Nachsäulen-Derivatisierung** mittels Ninhydrin und Detektion der Reaktionsprodukte bei 440 nm und 570 nm. Hierzu wurden 0,1 - 0,2 g der nach 3.9.3.1 vorbereiteten Probe in einem Puffer (pH = 2,2) aufgenommen und durch einen Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Mit

einer externen Standardlösung, die von jeder Aminosäure 2 nmol/20 µl enthielt, wurde das Gerät kalibriert. Die Elution der Probe erfolgte mit einem steigenden pH-Gradienten (s.u.).

#### Messparameter Aminosäureanalysator

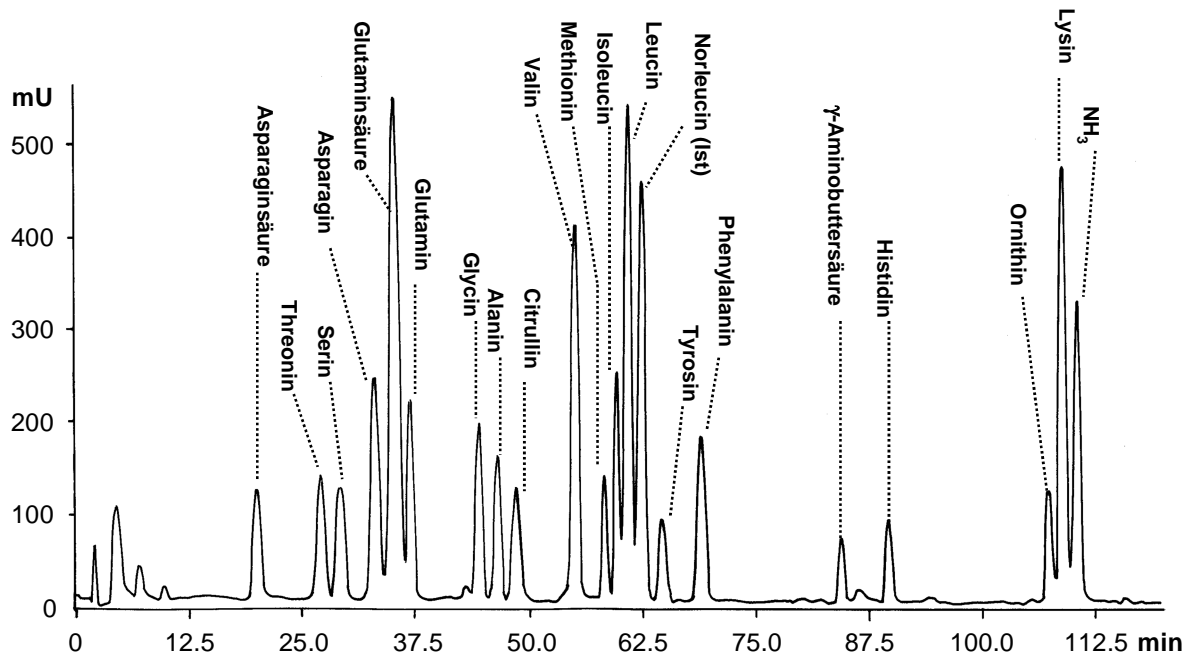
Vorsäule:	75 x 6 mm, BTC F, Fa. Eppendorf, Maintal
Trennsäule:	145 x 3,2 mm, BTC 2410, Fa. Eppendorf, Maintal
Injektionsvolumen:	20 µl
Reaktionsschleife:	130 °C
Fließgeschwindigkeit:	Puffer / Ninhydrin-Reagenz je 0,2 ml/min
Detektion:	Absorption bei 440 / 570 nm
pH-Gradient:	pH 2,85 à pH 3,30 à pH 4,25 à pH 8,00 à pH 10,60

Die folgenden **Abbildungen 53** und **54** zeigen die Chromatogramme freier Aminosäuren von 0 und 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch bei der Aminosäureanalyse (Detektion bei 570nm).



**Abbildung 53:** Chromatogramm freier Aminosäuren von 0 Wochen gereiftem Gouda aus pasteurisierter Milch bei der Aminosäureanalyse (Detektion bei 570 nm)

### 3 Experimenteller Teil

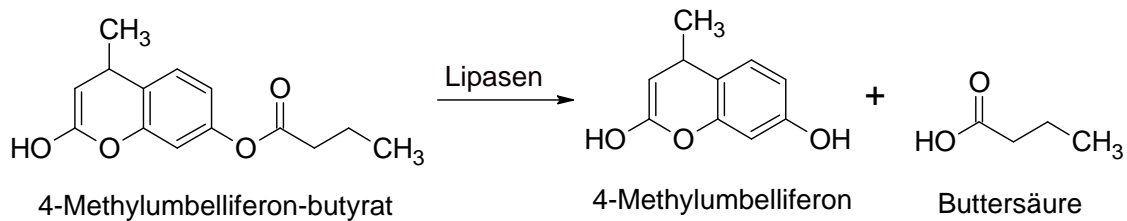


**Abbildung 54:** Chromatogramm freier Aminosäuren von 30 Wochen gereiftem Gouda aus pasteurisierter Milch bei der Aminosäureanalyse (Detektion bei 570nm)

#### 3.9.4 Bestimmung der Lipaseaktivität

##### 3.9.4.1 Messprinzip

Die Bestimmung der Lipaseaktivität erfolgte nach *Haslbeck et al., 1985* über die fluorimetrische Messung des aus 4-Methylumbelliferon-butyrat freigesetzten, fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon (**Abbildung 55**).



**Abbildung 55:** Messprinzip zur Bestimmung der Lipaseaktivität (*Haslbeck et al., 1985*)

#### 3.9.4.2 Probenvorbereitung

Aufgrund der Ergebnisse in Vorversuchen, in welchen der Einfluss der Entfettung, des Einfrierens mit flüssigem Stickstoff und des Verreibens der Proben mit Natriumsulfat auf die gemessene Lipaseaktivität getestet wurden, ergab sich für die Probenvorbereitung in den Hauptversuchen die folgende Durchführung.

Nach dem Tiefgefrieren und Vermahlen der Probe mit flüssigem Stickstoff wurden 1 - 2 g des erhaltenen Pulvers mit 100 ml Phosphatpuffer (pH = 7,2) versetzt und mittels Ultra-Turrax® zweimal für 30 Sekunden bei  $10^4$  Rpm homogenisiert. Anschließend wurde zunächst für 20 Minuten mit 5.000 U/min bei 15°C vorzentrifugiert und das Fett dekantiert. Dann wurden 1,5 ml des Zentrifugats für 20 Minuten bei 12.000 U/min bei 15°C klarzentrifugiert und zur Inkubation eingesetzt. Dabei wurden 200 µl der Probenflüssigkeit mit 200 µl einer Lösung von 4-Methylumbelliferon-butyrat ( $c = 26,2$  nmol/ml) im Trockenschrank bei 37°C für 60 min inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde nach exakt 60 Minuten mit 1,6 ml Acetonitril abgestoppt und die trübe Lösung für 20 Minuten bei 12.000 U/min und 15°C klarzentrifugiert. Diese Probenlösung wurde sodann zur fluorimetrischen Messung eingesetzt.

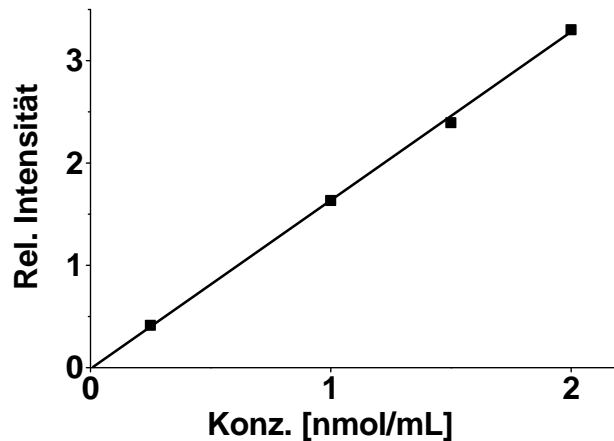
#### 3.9.4.3 Messung der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz der inkubierten Lösung wurde mit einem Spektralfluorometer der Fa. HITACHI, Modell F-2000 bei einer Anregungswellenlänge von 351 nm und einer Emissionswellenlänge von 449 nm unter den folgenden Bedingungen gemessen. Die zugehörige Kalibriergerade ist in **Abbildung 56** dargestellt.

#### Geräte- und Messparameter Fluoreszenzmessung

Gerätetyp:	HITACHI Spektralfluorometer, Modell F-2000
Lichtquelle:	Xenon-Hochdrucklampe (Innendruck: 9-30 bar, Spannung: 90 V)
Wellenlängen:	EX 351 nm; EM 449 nm
Response:	2 sec
Bandpass:	EX 10 nm; EM 10 nm
PM Voltage:	400 V
Replicates:	3
Init. Delay:	2 sec
Integr. Time:	2 sec
Küvette:	Quarzglas, $d = 1,0$ cm
Messvolumen:	1,0 ml

### 3 Experimenteller Teil



**Abbildung 56:** Kalibriergerade zur Bestimmung von 4-Methylumbelliferon

Die folgende **Tabelle 51** zeigt die ermittelten Lipaseaktivitäten im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch aus zwei Chargen und jeweils in sechs Reifungsstufen (0 bis 30 Wochen Reifung). Die Lipaseaktivität ist in [U/g] angegeben, wobei 1U einer Umsetzung von 1 nmol 4-Methylumbelliferon-butyrat pro Stunde entspricht.

**Tabelle 51: Lipaseaktivitäten (U/g) in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch in 2 Chargen**

Käse	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
<b>Charge 1</b>						
Gouda aus pasteurisierter Milch	0,652	0,873	1,027	1,413	1,565	1,871
Gouda aus Rohmilch	0,759	1,510	1,947	2,816	3,460	3,427
<b>Charge 2</b>						
Gouda aus pasteurisierter Milch	0,733	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>	1,202	n.b. <sup>a)</sup>	1,364
Gouda aus Rohmilch	0,800	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>	1,957	n.b. <sup>a)</sup>	2,862

<sup>a)</sup> n.b. = nicht bestimmt

#### 3.9.5 Kernresonanzspektroskopie ( $^1\text{H-NMR}$ )

Die Messungen mittels Kernresonanzspektroskopie wurden an einem Spektrometer AMX 400-III (Bruker, Rheinstetten) bei einer Transmitterfrequenz von 400 MHz für  $^1\text{H}$ -Messungen durchgeführt. Als interner Standard diente  $\text{D}_2\text{O}$ , die Auswertung erfolgte anhand des Programms X-WIN-NMR (Version 2.6, Bruker, Rheinstetten).

Zur Überprüfung des Deuterierungsgrades und der Deuterierungsposition der  $[\text{H}_3\text{C}]_2\text{-2-Keto-4-methylpentansäure}$  wurde die Verbindung mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie vermessen und mit einer unmarkierten, käuflichen Referenzsubstanz verglichen. Die folgende **Abbildung 57** zeigt die  $^1\text{H}$ -Kopplungen der beiden Verbindungen. Die Zuordnung der Kopplungen wurde mit einer zweidimensionalen Messung bestätigt.

Die unmarkierte Referenzsubstanz zeigte die erwarteten drei Kopplungen der  $^1\text{H}$ -Atome an C3, C4 und C5, C6. Die zwei  $^1\text{H}$ -Atome an C3 ergaben ein Duplett bei 2,7 ppm (Fläche = 2), das  $^1\text{H}$ -Atom an C4 ein asymmetrisches Multipllett bei 2,05 ppm (Fläche = 1) und die sechs  $^1\text{H}$ -Atome an C5/C6 ein Duplett bei 0,85 ppm (Fläche = 6).

Durch die Deuterierung an C5 koppelten diese drei  $^2\text{H}$ -Atome nicht mehr. Das Duplett (jetzt bei 2,55 ppm, Fläche = 2) blieb bestehen, das  $^1\text{H}$ -Atom an C4 koppelte nur noch mit insgesamt fünf  $^1\text{H}$ -Atomen (C3, C5) zu einem symmetrischen Multipllett (Fläche = 1) und die verbleibenden drei  $^1\text{H}$ -Atome an C5 koppelten zu einem Duplett mit einer Fläche von nur noch 3 bei 0,85 ppm.

#### 3.9.6 pH-Messung

Die pH-Messungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten mittels pH-Glas-Elektrode Typ GPRT 1400 AN, Fa. Greisinger Electronic, Deutschland.

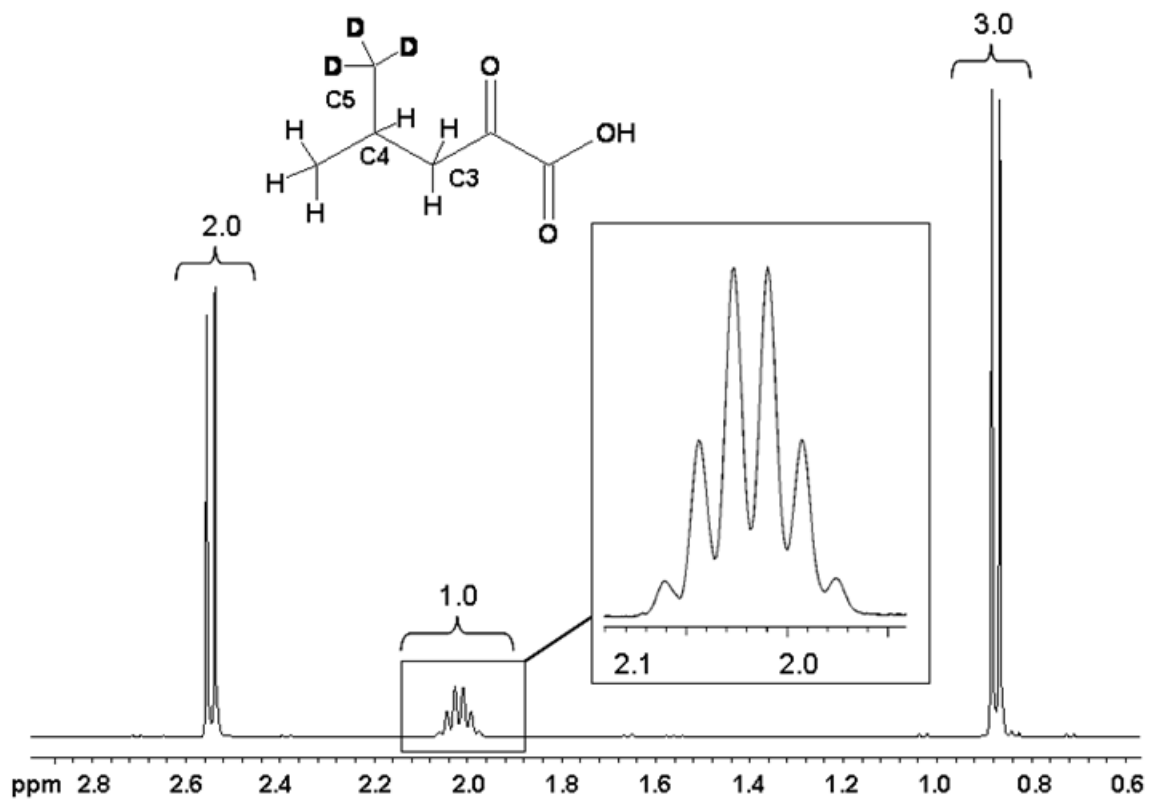
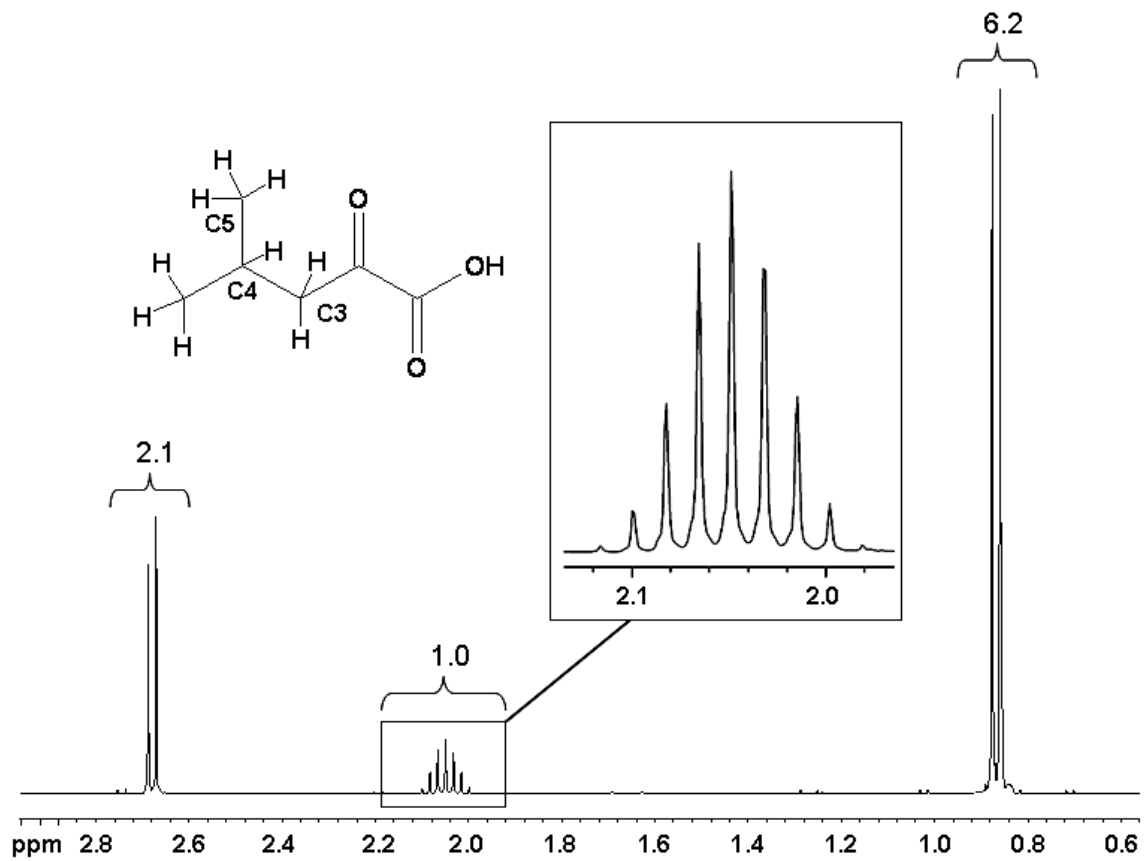


Abbildung 57:  $^1\text{H-NMR}$  der Referenzsubstanz 2-Keto-4-methylpentansäure (oben) und  $[\text{D}_3]$ -2-Keto-4-methylpentansäure (unten)



### 4. Zusammenfassung

Käse in all seinen Varianten ist vor allem in Europa ein äußerst beliebtes Lebensmittel, dessen Qualität und damit Akzeptanz beim Kunden durch seinen Geschmack und sein Aroma definiert werden. Die Entwicklung des Käsearomas ist von zahlreichen Einflussfaktoren abhängig. Diese beginnen bei der Auswahl der Milchsorte und seiner thermischen Behandlung und setzen sich über die an der Reifung maßgeblich beteiligten Mikroorganismen fort, bis hin zur Prozessführung und der Reifungsdauer sowie den dabei herrschenden Bedingungen. Insbesondere bei Schnitt- und Hartkäse, wie Gouda, ist die Dauer der Reifung ausschlaggebend für die Aromaentwicklung und seinen Preis.

Trotz zahlreicher Untersuchungen zu flüchtigen Verbindungen und Aromastoffen in verschiedenen Käsesorten erhielt die Aufklärung des Aromas von Gouda-Käse bisher wenig Aufmerksamkeit. Systematische Untersuchungen zur Aromazusammensetzung dieser holländischen Käsesorte waren bis dato nicht bekannt. Dasselbe gilt für systematische Studien zur Entwicklung des Aromas von Gouda-Käse über einen längeren Reifungszeitraum und den Einfluss der Milchthermisierung auf diese Aromabildung.

Ziel der Arbeit war es deshalb, die Aromazusammensetzung an einem definiert hergestellten, gereiften Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch aufzuklären und Schlüsselaromastoffe zu definieren, um diese mit einem Gouda aus Rohmilch zu vergleichen. Hieraus sollte der Einfluss der Milchpasteurisierung auf das Gouda-Aroma auf molekularer und sensorischer Ebene abgeleitet werden. Des Weiteren sollte dann die (unterschiedliche) Aromaentwicklung während der Reifung in den genannten Gouda-Varianten an mehreren Reifungsstufen gezeigt werden. Abschließend sollten durch Modellversuche Informationen über Vorstufen und die Herkunft wichtiger Aromastoffe aus dem Aminosäurestoffwechsel gesammelt werden.

Ausgangspunkt für die Untersuchungen war ein handelsüblicher mittelalter Gouda, der mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) analysiert wurde. Nach Etherextraktion und Hochvakuumdestillation wurde das Destillat mittels HRGC-O analysiert. Dieser Vorversuch lieferte erste Hinweise auf wichtige aromaaktive Verbindungen in Gouda-Käse. Mittels AEVA wurden 38 Aromastoffe identifiziert und anhand von FD-Faktoren bezüglich ihres Aromapotentials eingestuft.

## 4 Zusammenfassung

---

Ein 30 Wochen gereifter, definiert hergestellter Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch diente dazu, dessen Schlüsselaromastoffe mit Techniken der molekularen Sensorik zu definieren. Mit einer Aromaextraktverdünnungsanalyse wurden die 38 identifizierten aromaaktiven Verbindungen auf ihren potentiellen Beitrag zum Gesamtaroma hin untersucht. Mit einem FD-Faktor  $\geq 32$  wurden 21 wichtige Aromastoffe detektiert und bewertet. Hierzu zählten die organischen Säuren Essigsäure (essigsauer), 2-Methylpropansäure (schweißig, fruchtig), Buttersäure (schweißig, ranzig), 2- und 3-Methylbuttersäure (schweißig, käsige), sowie Hexansäure (schweißig, ziegenartig) und die Verbindungen Ethylbutanoat (fruchtig), 3-Methylbutanol (malzig), 2-Phenylethanol (blumig),  $\delta$ -Decalacton (kokosnussartig),  $\gamma$ -Dodecalacton (pfirsichartig),  $\delta$ -Dodecalacton (pfirsichartig) und Phenylelessigsäure (honigartig). Ebenso als potent zu bewerten waren die Aromastoffe 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin (grüne Paprika), (Z)-2-Nonenal (grün, fettig), (E)-2-Nonenal (grün, fettig), trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal (metallisch), 4-Ethyl-octansäure (ziegenartig), 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (würzig, maggiartig), 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon (würzig, maggiartig), und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (vanilleartig), die bisher in der Literatur - wie auch Phenylelessigsäure - in Gouda-Käse nicht erwähnt waren. Die leichtflüchtigen Aromastoffe 2,3-Butandion und 3-Methylbutanal wurden ebenso als wichtig eingestuft. Es folgten Quantifizierungen mittels SIVA von 16 definierten Schlüsselaromastoffen und die Berechnung von Aromawerten. In einer abschließenden Aromasimulation konnte eine sehr gute sensorische Übereinstimmung des Gouda-Käses mit seinem Rekombinat gezeigt werden.

Um den Gouda-Käse mit einem Pendant aus Rohmilch vergleichen zu können, wurde auch dieser anhand des Stufenmodells nach *Schieberle (2005)* bis zur Ermittlung der Aromawerte derselben 16 Schlüsselaromastoffe durchgeführt. Zwischen den Gouda-Varietäten aus pasteurisierter Milch und Rohmilch wurden dadurch eindeutige Aromaunterschiede erkennbar.

Auffällig waren zunächst die deutlich höheren Gehalte an Butter- und Hexansäure sowie ihrer Ethylester im Rohmilch-Gouda, was mit einer höheren Lipaseaktivität und einer vermehrten Veresterung der FFAs durch Nichtstarter-Milchsäurebakterien erklärbar war, worauf eine erhöhte D-Lactat-Bildung im Rohmilch-Gouda hinwies. Die  $\delta$ -Lactone (C10, C12) folgten diesem Trend nicht. Ihre Gehalte zeigten keinen Unterschied zwischen Gouda aus pasteurisierter Milch und Rohmilch. Als Grund hierfür kann eine *direkte Lactonisation* der

Fettsäure am Triglycerid diskutiert werden (Alewijn *et al.*, 2007), die unabhängig vom freien Fettsäuregehalt verläuft.

Hingegen ausgeprägt waren die höheren Konzentrationen an 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure sowie von 2-Methylbuttersäure im Gouda aus pasteurisierter Milch, was mit höheren Gehalten an L-Leucin bzw. L-Isoleucin in diesem Käse korrelierte. Diesem Trend folgte auch 2-Phenylethanol, das auf L-Phenylalanin zurückgeführt werden kann. Phenyllessigsäure hingegen zeigte in beiden Käsen dieselben Gehalte. Für 2-Methylpropansäure und Essigsäure waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gouda-Varianten festzustellen. 2,3-Butandion wiederum zeigte höhere Konzentrationen im Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch. Die gezeigten Tendenzen bestätigten sich in Gouda-Käse (2.Charge), der im Abstand von einem Jahr wiederholt hergestellt wurde.

In Experimenten zum Aromabeitrag konnten die quantitativen Unterschiede in den Marker-Aromastoffen zwischen den Gouda-Varietäten, ausgedrückt in Aromawerten, mit sensorischen Unterschieden ihren Aromaprofilen in Verbindung gebracht werden. Der Rohmilch-Gouda wurde als fruchtiger (Ethylester) und schweißig-ranziger (geradkettige kurze Fettsäuren) bewertet, hingegen weniger malzig (3-Methylbutanal) und weniger schweißig-käsiger (2- und 3-Methylbuttersäure).

Um die genaue Aromaentwicklung in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch zu beleuchten, wurden die 16 definierten Markersubstanzen in sechs Reifungsstufen in den beiden Käsen quantifiziert und die Gehalte auf die Trockenmasse bezogen.

Hohe Gehalte an L-Lactat in Gouda-Käse unabhängig von der Milchpasteurisierung und überproportionale höhere Gehalte an D-Lactat spiegeln dabei als Biomarker das Verhältnis von Starter- und Nichtstarter-Kulturen wider. Für Butter- und Hexansäure sowie für ihre beiden Ethylester zeigten sich in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch kontinuierliche Konzentrationsanstiege. Die Fettsäuren entspringen dem Milchlipid, aus dem sie bei der Käsureifung durch lipolytische Aktivitäten freigesetzt werden. Die gemessene Lipaseaktivität nahm ebenso mit der Reifung zu. Die freien Fettsäuren standen dann zur Veresterung mit Ethanol zur Verfügung, weshalb ihre Entwicklung mit den Fettsäuren korrelierte. Im gesamten Reifungsverlauf war diese Entwicklung im Rohmilch-Gouda deutlich stärker ausgeprägt. Die Gehalte der Lactone  $\delta$ -Decalacton und  $\delta$ -Dodecalacton hingegen stiegen

## 4 Zusammenfassung

---

kontinuierlich bis zum selben Plateauniveau in beiden Gouda-Varianten an, was wiederum mit der *direkten Lactonisation* (s.o.) der Fettsäuren am Triglycerid erklärt werden kann.

2,3-Butandion, welches wie 3-Methylbutanal im Reifungsverlauf bis zu einem Maximum anstieg, um danach stetig abzunehmen, stammt potentiell aus dem Abbau von Citrat und Lactose, die zunächst zum Schlüsselintermediat Pyruvat abgebaut werden. Der Gehalt an Essigsäure, deren Ursprung ebenso im Kohlenhydratabbau zu suchen ist (Pyruvat-Metabolismus), stieg in Gouda-Käse unabhängig von der Milchbehandlung in 30 Wochen stetig an.

Die ansteigenden Konzentrationsverläufe von 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol, 2- und 3-Methylbuttersäure sowie von 2-Methylpropansäure, 2-Phenylethanol und Phenyl-essigsäure korrelierten mit steigenden Gehalten ihrer freien „parent“-Aminosäuren sowohl in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch, als auch in Rohmilch-Gouda. Für die 3-methylverzweigten Aromastoffe, sowie für 2-Methylbuttersäure und 2-Phenylethanol stimmten zudem deren höherer Gehalte in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch mit höheren Gehalten ihrer „parent“-Aminosäuren in diesem Käse überein.

Um die Aromabildung aus Aminosäuren näher zu untersuchen, wurde ein Labormodell entwickelt, in dem es gelang, unter den mit der Gouda-Herstellung vergleichbaren Bedingungen, die stabilisotopenmarkierten Aromavorstufen [ $^{13}\text{C}_6$ ]-L-Leucin und [ $^2\text{H}_3$ ]-2-Keto-4-methyl-pentansäure zu den drei wichtigen Gouda-Aromastoffen 3-Methylbutanal, 3-Methylbutanol und 3-Methylbuttersäure umzusetzen. Die geringe Umsetzungsrate der Precursoren zu korrespondierenden Aromastoffen im Käsemodell stand im Einklang mit den Konzentrationsverhältnissen, die im definiert produzierten Gouda-Käse im frühen Reifungsstadium ermittelt wurden. In allen Versuchen war die Bildung der 3-Methylbuttersäure bevorzugt, was biochemisch über einen ATP-Gewinn erklärt werden kann (Ganesan *et al.*, 2004). Eine CAMOLA-Auswertung unter Einbezug der natürlichen L-Leucin-Bildung im Modell zeigte, dass die Aromastoffe fast ausschließlich aus der freien Aminosäure L-Leucin gebildet wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmalig anhand definiert hergestellter Käseproben die Aromazusammensetzung von Gouda-Käse molekular zu definieren. Ebenso erstmalig wurden systematische Untersuchungen zum Einfluss der Milchpasteurisierung auf die Aromaentwicklung in Gouda-Käse durchgeführt und diese Entwicklung während der Reifung

anhand von Schlüsselaromastoffen verfolgt. Vorstufenversuche in einem dafür entwickelten Labormodell zeigten die Herkunft wichtiger Aromastoffe aus freiem L-Leucin. Die ermittelten Daten ermöglichen es Verbindungen vorzuschlagen, mit Hilfe derer die Käsequalität objektiviert werden kann und die als Indikatoren für die Milchpasteurisierung dienen. Diese sind sowohl für die Lebensmittelbranche als auch für die Lebensmittelüberwachung von Interesse.

### 5 Literaturverzeichnis

Abbott, N.; Etievant, P.; Issanchou, S.; Langlois, D. Critical evaluation of two commonly used techniques for the treatment of data from extract dilution sniffing analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, *10*, 1698-1703.

d'Acampora Zellner, B.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Gas chromatography–olfactometry in food flavour analysis. *Journal of Chromatography A*, **2008**, *1186*, 123-143.

Aishima, T.; Nakai, S. Pattern recognition of GC profiles for classification of cheese variety. *Journal of Food Science* **1987**, *52(4)*, 939-942.

Albenzio, M.; Corbo, M.R.; Rehman, S.U.; Fox, P.F.; De Angelis, M.; Corsetti, A.; Sevi, A.; Gobbetti, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology* **2001**, *67*, 35-48.

Alewijn, M.; Sliwinski, E.L.; Wouters, J.T.M A fast and simple method for quantitative determination of fat-derived medium and low-volatile compounds in cheese. *International Dairy Journal* **2003**, *13*, 733-741.

Alewijn, M.; Sliwinski, E.L.; Wouters, J.T.M Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese. *International Dairy Journal* **2005**, *15*, 733-740.

Alewijn, M.; Smit, B.A.; Sliwinski, E.L.; Wouters, J.T.M The formation mechanism of lactones in Gouda cheese. *International Dairy Journal* **2007**, *17*, 59-66.

Amarita, F.; Fernandez-Espla, D.; Requena, T.; Pelaez, C. Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters* **2001**, *204*, 189-195.

Ardö, Y. Flavor formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* **2006**, *24 (2)*, 238-242.

Arora, G.; Cormier, F.; Lee, B. Analysis of odor-active volatiles in Cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS/Sniffing *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 748-752.

Avsar, Y.K.; Karagul-Yuceer, Y., Drake, M.A.; Singh, T.K.; Voon, Y.; Cadwallader, K.R. Characterization of nutty flavor in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **2004**, *87*, 1999-2000.

Axel, R. Die Entschlüsselung des Riechens. *Spektrum der Wissenschaft* **1995**, *12*, 72-78.

Ayad, E.H.E.; Verheul, A.; Engels, W.J.M.; Wouters, J.T.M.; Smit, G. Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology* **2001**, *90*, 59-67.

Ayad, E.H.E.; Verheul, A.; Engels, W.J.M.; Wouters, J.T.M.; Smit, G. Starter culture development for improving the flavour of Proosdij-type cheese. *International Dairy Journal* **2003**, *13*, 159-168.

Badings, H.T.; Stadhouders, J.; van Diun, H. Phenolic flavor in cheese. *Journal of Dairy Science* **1968**, *51* (1), 31-35.

Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. vollständig überarbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2001**.

Bemelmans, J. Review of isolation and concentration techniques. In: *Progress in Flavor Research* (Lang, G.; Nursten, H. Hrsg.), Applied Science Publication, London, **1979**, *8*, 79-98.

Beuvier, B.; Cegarra, S.; Dasen, A.; Pochet, S.; Buchin, S.; Duboz, G. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal* **1997**, *7*, 311-323.

Boscaini, E.; van Ruth, S.; Biasioli, F.; Gaperi, F.; Märk, T.D. Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) and Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry (PTR-MS) analysis of the flavor profile of Grana Padano, Parmigiano Reggiano, and Grana Trentino cheeses *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (7), 1782-1790.

Bosset, J.O; Collomb, M.; Sieber, R. The aroma composition of Swiss Gruyere cheese IV. The acidic volatile components and their changes in content during ripening. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **1993**, *26*, 581-592.

Buchin, S.; Delague, V.; Duboz, G.; Berdague, J.L.; Beuvier, E.; Pochet, S.; Grappin, R. Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of a semi-hard cheese. *Journal of Dairy Science* **1998**, *81*, 3097-3108.

Buffa, M.; Guamis, B.; Pavia, M.; Trujillo, A.J. Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure treated goats' milk. *International Dairy Journal* **2001**, *11*, 175-179.

Buffa, M.; Guamis, B.; Saldom, J.; Trujillo, A. J. Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **2004**, *37*, 247-253.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (ehem. § 35 LMBG)*, Band I (L), 00.90-7, Beuth Verlag, Berlin, **2005**.

## 5 Literaturverzeichnis

---

Califano, A.N.; Bevilacqua, A.E. Multivariate analysis of the organic acids content of Gouda type cheese during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis* **2000**, *13*, 949-960.

Carunchia Whetstone, M.E.; Cadwallader, K.R.; Drake, M.A. Characterization of aroma compounds responsible for the rosy/floral flavor in Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 3126-3132.

Carunchia Whetstone, M.E.; Drake, M.A.; Nelson, B.K.; Barbano, D.M. Flavor profiles of full-fat and reduced-fat cheese and cheese fat made from aged Cheddar with the fat removed using a novel process. *Journal of Dairy Science* **2006**, *89*, 505-517.

Chaintreau, A. Simultaneous distillation–extraction: from birth to maturity - review. *Flavour and Fragrance Journal* **2001**, *16*, 136-148.

Christensen, K. R.; Reineccius, G. A. Aroma extract dilution analysis of aged Cheddar cheese. *Journal of Food Science* **1995**, *60* (2), 218-20.

Christlbauer, M.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in beef and pork vegetable gravies à la chef by application of the aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*(19), 9114-9122.

CMA, Die Geschichte des Käses. **2008**,  
Aufgerufen am 09.02.2008 unter <http://www.cma.de/content/kaese/kaese-geschichte.php>

Collins, F.Y.; Mc Sweeney, P.L.H.; Wilkinson, M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* **2003**, *13*, 841-866

Curioni, P.M.G.; Bosset, J.O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal* **2002**, *12*, 959-984.

Czerny, M.; Schieberle, P. Labelling studies on pathways of amino acid related odorant generation by *Saccharomyces cerevisiae* in wheat bread dough. *Developments in Food Science* **2006**, *43*, 89-92.

De Jong, C.; Neeter, R.; Boelrijk, A.; Smit, G. Analytical control of flavour-active sulphur compounds: simple and sensitive method for analysis of sulphur compounds. In: *Frontiers of Flavour Science, Proceedings of the 9<sup>th</sup> Weurman Flavour Research Symposium, Freising, Germany, 1999* (Schieberle, P.; Engel, K.-H.; Hrsg.), Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, Germany, **2000**, 178-181.

Dirinck, P.; De Winne, A. Flavor characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic spectrometric profiling. *Journal of Chromatography* **1999**, *A 847*, 203-208.



Ehrlich, F. Über die Bedingungen der Fuselölbildungen und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1907**, *40*, 1027-1047.

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. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* **1999**, *209* (3-4), 237-241.

Engels, W. J. M.; Dekker, R.; De Jong, C.; Neeter, R.; Visser, S. A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal* **1997**, *7*, 255-263.

Esterbauer, H. Autoxidation of methylololeate in water. III.: Chromatographic separation of water-soluble reaction products. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **1968**, *70* (1), 1-4.

Fernandez-Garcia, E.; Carbonell, M.; Nunnez, M. Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 1. Comparison of raw and pasteurized milk cheese. *Journal of Dairy Research* **2002**, *69*, 579-593.

Fischer, A.; Grab, W.; Schieberle, P. Characterisation of the most odour-active compounds in a peel oil extract from Pontianak oranges (*Citrus nobilis* var. *Lour. microcarpa* Hassk.). *European Food Research and Technology* **2008**, *227*, 735-744.

Fischer, A.; Schieberle, P. Characterisation of the key aroma compounds in the peel oil extract from Pontianak oranges (*Citrus nobilis* var. *Lour. microcarpa* Hassk.) by aroma reconstitution experiments. *European Food Research and Technology* **2009**, *229*, 319-328.

Forss, A. Review of the Progress of Dairy Science: Mechanisms of formation of aroma compounds in milk and milk products. *Journal of Dairy Research* **1979**, *46*, 691-706.

Fox, P.F.; Guinee, T.O.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L.H. Cheese: Historical aspects. In: *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publication, London, UK, **2000a**, 1-9.

Fox, P.F.; Guinee, T.O.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L.H. Bacteriology of cheese milk. In: *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publication, London, UK, **2000b**, 45-53.

Fox, P.F.; Mc Sweeney, P.L.H. Cheese: An overview. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3rd edition* (Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P.; Hrsg.), Elsevier, London, UK, **2004**, *1*, 1-18.

Frank, D.C.; Owen, C.M.; Patterson, J. Solid Phase Microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensmittel-Wissenschaft u.-Technologie*, **2004**, *37*, 139-154.

## 5 Literaturverzeichnis

---

Ganesan, B.; Seefeldta Ramarathna, K.; Kokaa, C.; Diasa, B.; Weimera, B.C. Monocarboxylic acid production by lactococci and lactobacilli. *International Dairy Journal* **2004**, *14*, 237-246.

Gant, P.L.; Yang, K. Chromatographic separation of isotopic methanes. *Journal of American Chemical Society* **1964**, *86*, 5063-5064.

Gassenmeier, K.; Schieberle, P. Comparison of important odorants in puff-pastries prepared with butter or margarine. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **1994**, *27* (3), 282-288.

Gomez-Ruiz, J.A.; Ballesteros, C.; Gonzalez Vinas, M.A.; Cabezas, L.; Martinez-Catro, I. Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Lait*, **2002**, *82*, 613-628.

Greger V.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in apricots (*Prunus armeniaca*) by application of the molecular sensory science concept. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 5221-5228.

Grosch, W. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. *Trends in food science & Technology* **1993**, *4* (3), 68-73.

Groux, M.; Moinas, M. Cheese flavour. II. Comparison of the volatile fraction of various cheeses. *Lait* **1974**, *54* (531-532), 44-52.

Guth, H. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997a**, *45*, 3022-3026.

Guth, H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997b**, *45*, 3027-3032.

Guth, H.; Grosch, W. A comparative study of the potent odorants of different virgin olive oils. *Fat Science and Technology* **1991**, *93*, 335-339.

Guth, H.; Grosch, W. Geruchsstoffe von extrudiertem Hafermehl, Veränderungen bei der Lagerung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1993a**, *196* (1), 22-28.

Guth, H.; Grosch, W. Quantitation of potent odorants of virgin olive oil by stable-isotope dilution assays. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1993b**, *70* (5), 513-518.

Guth, H., Grosch, W. 12-Methyltridecanal, a species-specific odorant of stewed beef. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **1993c**, *26*, 171-177.

Guth, H.; Grosch, W. Identification of the character impact odorants of stewed beef juice by instrumental analyses and sensory studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, *42*, 2862-2866.

Haslbeck, F.; Senser, F.; Grosch, W. Detection of low lipase activities in food. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1985**, *181(4)*, 271-275.

Hatt, H. Von der Nase bis ins Gehirn: Düfte nehmen Gestalt an. In: *NEUROrubin - Sonderheft des Wissenschaftsmagazins RUBIN der neurowissenschaftlichen Forschungseinrichtungen an der Ruhr-Universität Bochum*, **2003**, 13-17.

Hazelwood, L. A.; Daran, J.-M.; van Maris, A. J. A.; Pronk, J. T.; Dickinson, J. R. The Ehrlich Pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, *74 (8)*, 2259-2266.

Hickey, D.K.; Kilcawley, K.N.; Beresford, T. P.; Wilkinson, M.G. Lipolysis in Cheddar Cheese made from raw, thermized, and pasteurized milks. *Journal of Dairy Science* **2007**, *90*, 47-56.

Horne, J.; Carpino, S.; Tuminello, L.; Rapisarda, T.; Corallo, L.; Licita, G. Differences in volatiles, and chemical, microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese cheeses. *International Dairy Journal* **2005**, *15*, 605-617.

Ijima, A.; Mizuno, H.; Takahashi, K. Synthese de  $\gamma$ -lactones, alcoyl-6-, alcenyl-6- ou aralcoyl-6- $\gamma$ -lactones a partir de la dihydroresorcin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1971**, *19*, 1053-1055.

Iyer, M.; Richardson, T.; Amundson, C. H.; Tripp, R.C. Major free fatty acids in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science* **1967**, *50 (3)*, 385.

Jackson, W.; Morgan, M.E. Identity and Origin of the malty aroma substance from milk cultures of *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*. *Journal of Dairy Science* **1954**, *37*, 1316-1324.

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

Kanawjia, S.K.; Rajesh, P.; Sabikhi, L.; Singh, S. Flavour, Chemical and textural profile changes in accelerated ripened Gouda cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **1995**, *28*, 577-583.

Käseverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. April 1986 (BGBl. I S. 412), zuletzt geändert durch Artikel 3 Abschnitt 2 § 13 des Gesetzes vom 13. Dezember **2007** (BGBl. I S. 2930), Aufgerufen am 09.02.2008 unter [http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/k\\_sev/gesamt.pdf](http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/k_sev/gesamt.pdf)

## 5 Literaturverzeichnis

---

Kerscher, R. Objektivierung tierartspezifischer Aromaunterschiede bei erhitztem Fleisch. *Dissertation*, Technische Universität München, **2000**.

Kieronczyk, A.; Skeie, S.; Langsrud, T.; Yvon, M. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, 69 (2), 734-739.

Kieronczyk, A.; Cachon, R.; Feron, G.; Yvon, M. Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* **2006**, 101, 1114-1122.

Kovats, E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta* **1958**, 41 (7), 1915-1932.

Kubickova, J.; Grosch, W. Quantification of potent odorants in camembert cheese and calculation of their odour activity values. *International Dairy Journal* **1998**, 8, 17-23.

Laing, D.G.; Willcox, M.E. Perception of components in binary odour mixtures. *Chemical Senses* **1983**, 7 (3/4), 249-264.

Le Bars, D.; Yvon, M. Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *Journal of Applied Microbiology* **2008**, 104, 171-177.

Likens S. T., Nickerson G.B. Detection of certain hop oil constituents in brewing Pproducts. *Proceedings of the Society of American Brewing Chemists* **1964**, 5-13.

Liu, S.-Q.; Holland, R., Crow, V.L. Ethylbutanoate formation by dairy lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **1998**, 8, 651-657.

Liu, S.-Q.; Baker, K.; Bennet, M.; Holland, R., Norris, G.; Crow, V.L. Characterisation of esterases of *Streptococcus thermophilus* ST1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B1079 as alcohol acyltransferases. *International Dairy Journal* **2004a**, 14, 865-870.

Liu, S.-Q.; Holland, R., Crow, V.L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal* **2004b**, 14, 932-945.

Lortal, S. Cheeses made with thermophilic lactic starters. In: *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, **2004**, 291-308.

MacLeod, P.; Morgan, M.E. Leucine metabolism of *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*. I. Conversion of alpha-ketoisocaproic acid to leucine and 3-methylbutanal. *Journal of Dairy Science* **1955**, *38* (11), 1208-1214.

Marilley L., Casei M. G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* **2004**, *90*, 139-159.

Mc Sweeney, P.L.H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* **2004**, *57* (2/3), 127-144.

Mc Sweeney P.L.H.; Ottogalli, G.; Fox, P.F. Diversity of Cheese Varieties. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3<sup>rd</sup> edition* (Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P.; Hrsg.), Elsevier, London, UK, **2004**, 1-22.

Mc Sweeney P.L.H.; Fox, P.F. Metabolism of Residual Lactose and Citrat. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3<sup>rd</sup> edition* (Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P.; Hrsg.), Elsevier, London, UK, **2004**, 361-371.

Milchindustrie-Verband e.V. Einblick, Analysen und Perspektiven – Geschäftsbericht des Milchindustrie-Verbandes 2008/2009. **2009**.

Aufgerufen am 13.01.2010 unter

[http://www.milchindustrie.de/de/presse/geschaeftsbericht/miv\\_geschaeftsbericht\\_2008\\_2009.pdf](http://www.milchindustrie.de/de/presse/geschaeftsbericht/miv_geschaeftsbericht_2008_2009.pdf)

Milchindustrie-Verband e.V. Einblick, Analysen und Perspektiven – Geschäftsbericht des Milchindustrie -Verbandes 2009/2010. **2010**.

Aufgerufen am 19.12.2010 unter

[http://www.milchindustrie.de/de/presse/geschaeftsbericht/miv\\_geschaeftsbericht\\_2009\\_2010.pdf](http://www.milchindustrie.de/de/presse/geschaeftsbericht/miv_geschaeftsbericht_2009_2010.pdf)

Milo, C.; Reineccius, G.A. Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 3590–3594.

Moio, L.; Addeo, F. Grana Padano cheese aroma. *Journal of Dairy Research* **1998**, *65*, 317-333.

Morgan, F.; Bodin, J.-P.; Gaborit, P. Lien entre le niveau de lipolyse du lait de chèvre et la qualité sensorielle des fromages au lait cru ou pasteurisé. *Lait* **2001**, *81*, 743-756.

Morris, H.A. ; Jezeski, J.J. ; Combs, W.B. ; Kuramoto. S. Free fatty acid, tyrosine, and pH changes during ripening of Blue cheese made from variously treated Milks. *Journals of Dairy Science* **1963**, *46*, 1-6.

Neeter, R.; de Jong, C. Flavour research on milk products: use of purge-and-trap techniques. *Voedingsmiddelentechnologie* **1992**, *25* (11), 11-13.

## 5 Literaturverzeichnis

---

Neeter, R.; De Jong, C.; H.G.J.; Ellen, G. Determination of volatile components in cheese using dynamic headspace techniques. *Special Publication – Royal Society of Chemistry* **1996**, 197 (Flavour Science), 293-296.

Ortigosa, M.; Torre, P.; Izco, J.M. Effect of pasteurization of ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of Roncal cheese. *Journal of Dairy Science* **2001**, 84, 1320-1330.

Parente, E.; Cogan, T.M. Starter cultures: General aspects. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3rd edition* (Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P.; Hrsg.), Elsevier, London, UK, **2004**, 1, 123-147.

Pinna, G.; Pirisi, A.; Piredda, G.; Addis, M.; Di Salvo, R. Effect of milk heat treatment on Fiore Sardo DOP cheese: 2. Lipolysis progress during ripening. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* **1999**, 50 (5), 366-377.

Poisson, L.; Schieberle, P. Characterization of the most odor-active compounds in an American Bourbon Whisky by application of the aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008a**, 56 (14), 5813-5819.

Poisson, L.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in an American Bourbon Whisky by quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008b**, 56 (14), 5820-5826.

Preininger, M.; Grosch, W. Evaluation of key odorants of the neutral volatiles of Emmentaler cheese by the calculation of odor activity values. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **1994**, 27 (3), 237-244.

Preininger, M.; Rychlik, M.; Grosch, W. Potent odorants of the neutral volatile fraction of Swiss cheese (Emmentaler). In: *Trends in Flavour Research* (Maarse, H.; van der Heij, D.G. Hrsg.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, **1994**, 267-270.

Preininger, M.; Warmke, R.; Grosch, W. Identification of the character impact flavour compounds of Swiss cheese by sensory studies of models. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1996**, 202, 30-34.

Quian, M.; Reineccius, G. Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. *Journal of Dairy Science* **2002**, 85, 1362-1369.

Quian, M.; Reineccius, G. Static headspace and aroma extract dilution analysis of Parmigiano Reggiano cheese. *Journal of Food Science* **2003a**, 68 (3), 794-798.

Quian, M.; Reineccius, G. Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method. *Flavour and Fragrance Journal* **2003b**, *18*, 252-259.

Rehman, U.-R.; Banks, J.M.; Brechany, E.Y.; Muir, D.D., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *International Dairy Journal* **2000a**, *10*, 55-65.

Rehman, U.-R.; McSweeney, P.L.H., Banks, J.M.; Brechany, E.Y.; Muir, D.D., Fox, P.F. Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal* **2000b**, *10*, 33-44.

Reiners, J. Objektivierung des Aromas von nativen Olivenölen unterschiedlicher Provenienz durch chemisch-instrumentelle und sensorische Untersuchungen, *Dissertation*, Technische Universität München, **1997**.

Reiners, J; Grosch, W. Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 2754-2763.

Rothe, M.; Thomas, B. Aromastoffe des Brotes. Versuch einer Auswertung chemischer Geruchsanalysen mit Hilfe des Schwellenwertes. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1963**, *19*, 302-310.

Rychlik, M.; Schieberle, P., Grosch, W. *Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie und Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Garching, **1998**.

Rychlik, M.; Bosset, J.O. Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Evaluation of potent odorants. *International Dairy Journal* **2001a**, *11*, 895-901.

Rychlik, M.; Bosset, J.O. Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies. *International Dairy Journal* **2001b**, *11*, 903-910.

Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In: *Characterization of Food – Emerging Methods* (Gaonkar, A.H.; Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, **1995**, 403-431.

Schieberle, P. The Carbon Modul Labeling (CAMOLA) technique. A useful tool for identifying transient intermediates in the formation of Maillard-type target molecules. In: *The Maillard Reaction - Chemistry at the interface of nutrition, aging, and disease* (Baynes, J.W.; Monnier V.M.; Ames J.M.; Thorpe S.R.; Hrsg.), New York Academy of Sciences, New York, *1043*, 236-248, **2005**.

## 5 Literaturverzeichnis

---

Schieberle, P.; Gassenmeier, K.; Guth, H.; Sen, A.; Grosch, W. Character impact compounds of different kinds of butter. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **1993**, 26, 347-356.

Schieberle, P.; Gassenmeier, K. Studies on the key odorants in pastries of high fat content. In: *Aroma, Perception, Formation, Evaluation, Proceedings of the 4<sup>th</sup> Wartburg Aroma Symposium, Eisenach, 01.-04.03.1994* (Rothe, M.; Kruse, H.-P.; Hrsg.), **1995**, 441-457 .

Schieberle, P.; Grosch W. Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1987a**, 185, 111-113.

Schieberle, P.; Grosch W. Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1987b**, 35, 252-257.

Schieberle, P.; Grosch W. Identification of potent flavor compounds formed in an aqueous lemon oil/citric acid emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1988**, 36, 797-800.

Schieberle, P.; Grosch W. Changes in the concentrations of potent crust odorants during storage of white bread. *Flavour and Fragrance Journal* **1992**, 7, 213-218.

Schieberle, P.; Hofmann, T. Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45, 227-232.

Schieberle, P.; Hofmann, T. Auf den Geschmack gekommen - Die molekulare Welt des Lebensmittelgenusses. *Chemie in unserer Zeit* **2003**, 37, 388-401.

Schieberle, P.; Fischer, R.; Hofmann, T. The Carbon Modul Labeling (CAMOLA) technique - a useful tool to clarify in the formation pathways of aroma compounds formed in Maillard-type reactions. In: *Flavour research at the Dawn of the Twenty-First Century. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Weurmann Flavour Research Symposium, Beaune, London, 2002* (Le Quere, J. L.; Etievant, J. X.; Eds.), **2003**, 447-452

Schiere, C.; Van der Bas, J.M. Goudse kaas. In: *Handbuch der Käse - Käse der Welt von A - Z*, Volkswirtschaftlicher Verlag GmbH, Kempten (Allgäu), Deutschland, **1974**, 484-487.

Schmid, W.; Grosch, W. Identifizierung flüchtiger Aromastoffe mit hohen Aromawerten in Sauerkirschen (*Prunus cerasus* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1986**, 182, 407-412.

Schmitt, R. Unveröffentlichte Ergebnisse, München, **2008**.

Schuh, C.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in the beverage prepared from Darjeeling black tea: Quantitative Differences between tea leaves and infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54 (3), 916-924.



- Seitz, E.W. Microbial and enzyme-induced flavors in dairy foods. *Journal of Dairy Science* **1990**, *73*, 3664-3691.
- Sloot, D.; Harkes, P.D. Volatile trace components in Gouda cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1975**, *23*, 356-357.
- Smit, B.A.; Engels, W.J.M.; Wouters, J.T.M., Smit, G. Diversity of L-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations, and identification of the rate-controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methylbutanal. *Applied Microbiological Biotechnology* **2004**, *64*, 396-402.
- Smit, G.; Smit, B.A.; Engels, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* **2005**, *29*, 591-610.
- Söllner, V.; Schieberle, P. Decoding the key aroma compounds of a Hungarian-type salami by molecular sensory science approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*(10), 4319-4327.
- Souci, S.W.; Fachmann, W.; Kraut, H. *Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen*. (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie; Hrsg.), Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, **2000**.
- Sousa, M.J.; Malcata, X. Ripening of ovine milk cheeses: effects of plant rennet, pasteurization, and addition of starter on lipolysis. *Food Chemistry* **1997**, *59* (3), 421-432.
- Stevens, S.S. On the psychological law. *Psychological Review* **1957**, *64*, 153-181.
- Suriyaphan, O.; Drake, M.A.; Chen, X.Q.; Cadwallader, K.R. Characteristic aroma components of British Farmhouse Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 1382-1387.
- Svensen, A. Estimation of volatile fatty acids in cheese by gas chromatography, *Meieriposten* **1961**, *50*, 263-9, 285-9, 306-13.
- Sweeley, C.C., Elliot, W.H., Fries, I., Ryhage R. Mass spectromeric determination of unresolved components in gas chromatographic effluents. *Analytical Chemistry* **1966**, *38* (11), 1549-1553.
- Ternes, W.; Täufel, A.; Tunger, L.; Zobel, M. *Lexikon der Lebensmittel und der Lebensmittelchemie*, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2005**.
- Ullrich, F.; Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1987**, *184*, 277-282.

## 5 Literaturverzeichnis

---

Urbach G. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal* **1995**, *5*, 877-903.

van den Berg, G.; Meijer, W.C.; Düsterhöft, E.-M.; Smit G. Gouda and related cheeses. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology 2, 3<sup>rd</sup> edition* (Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P.; Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, NL, **2004**, 103-140.

Van Leuven, I.; Van Caelenberg, T.; Dirinck, P. Aroma characterisation of Gouda-type cheeses. *International Dairy Journal* **2008**, *18*, 790-800.

Weurman, C.; Groenen, P.J.; Van Gemert L.J. Experiments on high-vacuum transfer in food odour research. *Die Nahrung* **1970**, *14* (7), 607-616.

Widder, S.; Grosch, W. Study on the cardboard off-flavour formed in butter oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1994**, *198*, 297-301.

Williams, A.G.; Noble, J.; Banks, J.M. Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal* **2001**, *11*, 203-215.

Yvon, M.; Rijnen, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* **2001**, *11*, 185-201.

Zehentbauer, G. ; Reineccius, G. A. Determination of key aroma components of Cheddar cheese using dynamic headspace dilution assay. *Flavour and Fragrance Journal*, **2002**, *17*, 300-305.

## 6. Anhang

- Tabelle 52:** Vergleichende AEVA ( $FD \geq 1$ ) von definiert hergestelltem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch-Gouda aus sechs Reifungsstufen
- Tabelle 53:** Vergleichende AEVA ( $FD \geq 16$ ) von 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W) und Rohmilch (RM-G-30W)
- Tabelle 54:** Vergleichende AEVA ( $FD \geq 16$ ) von Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G), 0 und 30 Wochen gereift (0W, 30W)
- Tabelle 55:** Vergleichende AEVA ( $FD \geq 16$ ) von Gouda-Käse aus Rohmilch (RM-G), 0 und 30 Wochen gereift (0W, 30W)
- Tabelle 56:** Absolute Konzentrationen 16 ausgewählter Aromastoffe in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 1.Charge
- Tabelle 57:** Absolute Konzentrationen 16 ausgewählter Aromastoffe in Gouda aus Rohmilch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 1.Charge
- Tabelle 58:** Absolute Konzentrationen 16 ausgewählter Aromastoffe in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 2.Charge
- Tabelle 59:** Absolute Konzentrationen 16 ausgewählter Aromastoffe in Gouda aus Rohmilch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 2.Charge
- Tabelle 60:** Ergebnisse der Triangeltests beim Vergleich von Gouda-Käsen gem. § 64 LFGB, Prüfvorschrift (00.90-7)
- Tabelle 61:** Absolute Konzentrationen von und L- und D-Lactat in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch in 6 Reifungsstufen (0 - 30 Wochen) in zwei Chargen
- Tabelle 62:** Konzentrationen freier Aminosäuren in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 1.Charge
- Tabelle 63:** Konzentrationen freier Aminosäuren in Gouda-Käse aus Rohmilch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 1.Charge
- Tabelle 64:** Konzentrationen freier Aminosäuren in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 2.Charge
- Tabelle 65:** Konzentrationen freier Aminosäuren in Gouda-Käse aus Rohmilch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 2.Charge
- Tabelle 66:** Ergebnisse der Aromaprofilanalysen beim Vergleich von Gouda-Käsen aus Rohmilch und pasteurisierter Milch nach 0 und 30 Wochen Reifung

**Tabelle 67:** Ergebnisse der Aromaprofilanalysen beim Vergleich von Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch nach 30 Wochen Reifung und Rekombinaten (Rek.)

**Tabelle 52:** Vergleichende AEVA (FD  $\geq 1$ ) von Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch -Gouda aus sechs Reifungsstufen

Nr. a)	Geruchsstoff	FD b) Gouda aus pasteurisierter Milch						FD b) Gouda aus Rohmilch					
		1	4	7	11	19	30	1	4	7	11	19	30
		Wochen Reifung						Wochen Reifung					
1	3-Methylbutanal	1	1	4	2	2	2	1	1	4	4	2	2
2	Ethyl-2-methylpropanoat	<1	<1	1	2	2	4	<1	<1	2	8	16	16
3	2,3-Butandion	4	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1
4	Ethylbutanoat	2	16	16	32	64	128	16	32	64	512	256	512
5	Ethyl-2-methylbutanoat	<1	<1	<1	<1	<1	4	<1	2	2	4	2	8
6	Ethyl-3-methylbutanoat	<1	<1	<1	<1	1	1	<1	2	2	4	16	16
7	Hexanal	<1	2	1	1	<1	<1	1	1	2	1	<1	<1
8	1-Hexen-3-on	<1	4	2	2	1	<1	1	2	2	2	2	1
9	1-Butanol	1	1	2	4	2	<1	1	2	2	2	1	<1
10	3-Methylbutanol	2	8	8	4	16	32	2	2	8	2	8	16
11	Ethylhexanoat	<1	<1	<1	<1	<1	1	4	2	8	8	32	64
12	3-Hydroxy-2-butanon	<1	<1	1	1	<1	<1	<1	1	1	1	<1	<1
13	1-Octen-3-on	8	8	4	4	8	2	16	8	4	4	4	8
14	2-Acethyl-1-pyrrolin	16	2	2	2	<1	<1	16	2	2	2	<1	<1
15	Dimethyltrisulfid	1	2	1	1	<1	<1	2	1	1	<1	<1	<1
16	1-Nonen-3-on	1	16	4	8	<1	<1	4	16	4	4	2	2
17	Ethyl-octanoat	<1	<1	<1	<1	<1	2	2	1	4	8	16	8
18	2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazin	512	32	32	16	64	64	64	8	16	256	256	512
19	Essigsäure	1024	2048	2048	2048	2048	2048	512	2048	2048	2048	2048	4096
20	3-(Methylthio)-propanal	<1	<1	1	2	1	<1	<1	<1	2	1	1	2

Fortsetzung von Tabelle 52:

Nr. <sup>a)</sup>	Geruchsstoff	Reifung in Wochen						Reifung in Wochen					
		1	4	7	11	19	30	1	4	7	11	19	30
		<b>FD<sup>b)</sup> konventioneller Gouda</b>						<b>FD<sup>b)</sup> Rohmilch-Gouda</b>					
21	(Z)-2-Nonenal	16	8	16	128	128	64	64	16	16	64	16	128
22	Propionsäure	2	1	2	2	4	4	2	1	4	4	8	8
23	(E)-2-Nonenal	32	16	32	256	128	256	64	16	32	64	32	512
24	2-Methylpropanensäure	256	256	562	256	512	512	256	256	256	256	512	512
25	(E,Z)-2,6-Nonadienal	8	4	4	2	2	2	16	4	4	4	4	8
26	(Z)-2-Decenal	16	4	2	< 1	< 1	< 1	16	2	2	< 1	< 1	< 1
27	Buttersäure	512	4096	4096	4096	4096	4096	2048	4096	4096	4096	4096	8192
28	2- und 3-Methylbuttersäure	2048	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096
29	Pentansäure	1	16	8	16	8	32	4	16	16	32	16	64
30	(E)-2-Undecenal	4	4	2	2	2	< 1	8	4	2	1	4	4
31	2-Acetyl-2-thiazolin	16	8	8	32	4	8	16	4	8	8	32	16
32	Hexansäure	2	4	2	8	8	16	4	4	8	8	16	32
33	2-Methoxyphenol	32	32	4	2	4	4	32	32	4	4	< 1	< 1
34	2-Phenylethanol	512	64	128	512	64	512	512	64	128	32	32	512
35	γ-Octalacton	2	4	8	2	4	4	1	2	4	4	4	8
36	δ-Octalacton	8	2	4	2	2	4	2	8	4	4	1	4
37	trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decal	128	128	128	128	32	32	1024	128	128	16	32	16
38	γ-Nonalacton	16	32	16	16	8	16	16	32	32	16	16	16
39	γ-Decalacton	32	32	16	8	16	16	16	32	16	8	8	32
40	4-Ethylactansäure	512	2048	1024	1024	1024	512	1024	2048	1024	1024	512	512

Fortsetzung von Tabelle 52:

Nr. <sup>a)</sup>	Geruchsstoff	Reifung in Wochen						Reifung in Wochen						
		1	4	7	11	19	30	1	4	7	11	19	30	
		<b>FD<sup>b)</sup> konventioneller Gouda</b>						<b>FD<sup>b)</sup> Rohmilch-Gouda</b>						
41	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	512	1024	1024	512	2048	512	1024	1024	1024	1024	1024	1024	128
42	δ-Decalacton	64	64	128	512	256	512	64	256	256	512	256	256	256
43	unbekannt	256	2048	1024	1024	1024	512	512	2048	1024	1024	256	512	512
44	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon	1024	2048	1024	1024	1024	1024	1024	2048	1024	2048	4096	512	512
45	γ-Dodecalacton	8	8	32	64	32	64	8	32	64	32	16	64	64
46	(Z)-6-Dodecen-γ-lacton	2	4	4	8	8	8	2	2	4	8	4	8	8
47	δ-Dodecalacton	16	32	64	128	128	512	32	128	128	256	128	512	512
48	3-Methylindol	<1	4	4	8	2	<1	2	1	4	4	<1	1	1
49	Phenyllessigsäure	32	128	128	1024	1024	1024	128	128	128	64	256	512	512
50	4-Hydroxy-3-Methoxybenzaldehyd	64	128	128	128	256	1024	64	128	128	512	256	256	256

a) Die Nummerierung entspricht der Elutionsreihenfolge der Aromastoffe auf der FFAP-Kapillarsäule.

b) FD = FD-Faktor: Flavour Dilution-Faktor (vgl. 1.7.3)

## 6 Anhang

**Tabelle 53:** Vergleichende AEVA (FD  $\geq$  16) von 30 Wochen gereiftem Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch (PM-G-30W) und Rohmilch (RM-G-30W)

Geruchsstoff <sup>a)</sup>	Geruchsqualität <sup>b)</sup>	RI <sup>c)</sup>	FD <sup>d)</sup>	
			PM-G-30W	RM-G-30W
3-Methylbutanal	malzig	931	2	2
Ethyl-2-methylpropanoat	fruchtig	976	4	16
2,3-Butandion	butterartig	995	1	1
Ethylbutanoat	fruchtig	1045	128	512
Ethyl-3-methylbutanoat	fruchtig	1079	1	16
3-Methylbutanol	malzig	1225	32	16
Ethylhexanoat	fruchtig	1245	1	64
2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazin	grüne Paprika	1451	64	512
Essigsäure	essigsauer	1468	2048	4096
(Z)-2-Nonenal	grün, fettig	1529	64	128
(E)-2-Nonenal	grün, fettig	1560	256	512
2-Methylpropansäure	schweißig, fruchtig	1589	512	512
Buttersäure	schweißig, ranzig	1649	4096	8192
2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig, käsige	1691	4096	4096
Pentansäure	schweißig	1763	32	64
2-Acetyl-2-thiazolin	röstig, popcornartig	1798	8	16
Hexansäure	schweißig, ziegenartig	1874	16	32
2-Phenylethanol	blumig	1952	512	512
trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal	metallisch	2041	32	16
$\gamma$ -Nonalacton	pfirsichartig	2081	16	16
$\gamma$ -Decalacton	pfirsichartig	2203	16	32
4-Ethyl-octansäure	ziegenartig	2240	512	512
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	würzig, maggiartig	2260	512	128
$\delta$ -Decalacton	kokosnussartig	2268	512	256
Unbekannt	lederartig	2288	512	512
5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon	würzig, maggiartig	2327	1024	512
$\gamma$ -Dodecalacton	pfirsichartig	2438	64	64
$\delta$ -Dodecalacton	pfirsichartig	2484	512	512
Phenyllessigsäure	honigartig	2575	1024	512
4-Hydroxy-3-Methoxybenzaldehyd	vanilleartig	2599	1024	256



**Legende zu Tabelle 53:**

- a) Die Identifizierung der Aromastoffe erfolgt durch Vergleich mit Referenzsubstanzen auf der Basis folgender Kriterien: Geruchsqualität und RI-Werte auf drei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität (FFAP, OV-1701, DB-5), MS-Spektren (EI/CI-Modus).
- b) Geruchsqualität des Aromastoffs am Sniffing-Port während der HRGC-O
- c) Linearer Retentionsindex (RI) nach Kovats (vgl. **3.6.2**) auf der angegebenen Kapillarsäule
- d) FD = FD-Faktor: Flavour Dilution-Faktor (vgl. **1.7.3**)

**Tabelle 54:** Vergleichende AEVA (FD  $\geq$  16) von Gouda-Käse auspasteurisierter Milch (PM-G), 0 und 30 Wochen gereift (0W, 30W)

Nr.	Geruchsstoff	Geruchsqualität <sup>a)</sup>	FD <sup>b)</sup>	
			PM-G-0W	PM-G-30W
1	3-Methylbutanal	malzig	1	2
3	2,3-Butandion	butterartig	4	1
4	Ethylbutanoat	fruchtig	2	128
10	3-Methylbutanol	malzig	2	32
14	2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig, popcornartig	16	< 1
18	2-Isopropyl-3-methoxypyrazin	grüne Paprika	512	64
19	Essigsäure	essigsauer	1024	2048
21	(Z)-2-Nonenal	grün, fettig	16	64
23	(E)-2-Nonenal	grün, fettig	32	256
24	2-Methylpropansäure	schweißig, fruchtig	256	512
26	(Z)-2-Decenal	grün, fettig	16	< 1
27	Buttersäure	schweißig, ranzig	512	4096
28	2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig, käsig	2048	4096
29	Pentansäure	schweißig	1	32
31	2-Acetyl-2-thiazolin	röstig, popcornartig	16	4
32	Hexansäure	schweißig, ziegenartig	2	16
33	2-Methoxyphenol	rauchig, nelkenartig	32	4
34	2-Phenylethanol	blumig	512	512
37	trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal	metallisch	128	32
38	$\gamma$ -Nonalacton	pfirsichartig	16	16
39	$\gamma$ -Decalacton	pfirsichartig	32	16
40	4-Ethyl-octansäure	ziegenartig	512	512
41	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	würzig, maggiartig	512	512
42	$\delta$ -Decalacton	kokosnussartig	64	512
43	Unbekannt	lederartig	256	512
44	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon	würzig, maggiartig	1024	1024
45	$\gamma$ -Dodecalacton	pfirsichartig	8	64
47	$\delta$ -Dodecalacton	pfirsichartig	16	512
49	Phenyllessigsäure	honigartig	32	1024
50	4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd	vanilleartig	64	1024

<sup>a)</sup> Geruchsqualität des Aromastoffs am Sniffing-Port während der HRGC-O

<sup>b)</sup> FD = FD-Faktor: Flavour Dilution-Faktor (vgl. 1.7.3)

**Tabelle 55:** Vergleichende AEVA (FD  $\geq$  16) von Gouda-Käse aus Rohmilch(RM-G), 0 und 30 Wochen gereift (0W, 30W)

Nr.	Geruchsstoff	Geruchsqualität <sup>a)</sup>	FD <sup>b)</sup>	
			RM-G-0W	RM-G-30W
1	3-Methylbutanal	malzig	1	2
2	Ethyl-2-methylpropanoat	fruchtig	< 1	16
3	2,3-Butandion	butterartig	2	1
4	Ethylbutanoat	fruchtig	16	512
6	Ethyl-3-methylbutanoat	fruchtig	< 1	16
10	3-Methylbutanol	malzig	2	16
11	Ethylhexanoat	fruchtig	4	64
14	2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig, popcornartig	16	< 1
18	2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazin	grüne Paprika	64	512
19	Essigsäure	essigsauer	512	4096
21	(Z)-2-Nonenal	grün, fettig	64	128
23	(E)-2-Nonenal	grün, fettig	64	512
24	2-Methylpropansäure	schweißig, fruchtig	256	512
25	(E,Z)-2,6-Nonadienal	gurkenartig	16	8
26	(Z)-2-Decenal	grün, fettig	16	< 1
27	Buttersäure	schweißig, ranzig	2048	8192
28	2- und 3-Methylbuttersäure	schweißig, käsig	4096	4096
29	Pentansäure	schweißig	4	64
31	2-Acetyl-2-thiazolin	röstig, popcornartig	16	16
32	Hexansäure	schweißig, ziegenartig	4	32
33	2-Methoxyphenol	rauchig, nelkenartig	32	< 1
34	2-Phenylethanol	blumig	512	512
37	trans-4,5-Epoxy-2-(E)-decenal	metallisch	1024	16
38	$\gamma$ -Nonalacton	pfirsichartig	16	16
39	$\gamma$ -Decalacton	pfirsichartig	16	32
40	4-Ethyl-octansäure	ziegenartig	1024	512
41	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2-(5H)-furanon	würzig, maggiartig	1024	128
42	$\delta$ -Decalacton	kokosnussartig	64	256
43	Unbekannt	lederartig	512	512
44	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-furan-2(5H)-on	würzig, maggiartig	1024	512
45	$\gamma$ -Dodecalacton	pfirsichartig	8	64
47	$\delta$ -Dodecalacton	pfirsichartig	32	512
49	Phenyllessigsäure	honigartig	128	512
50	4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd	vanilleartig	64	256

<sup>a)</sup> Geruchsqualität des Aromastoffs am Sniffing-Port während der HRGC-O

<sup>b)</sup> FD = FD-Faktor: Flavour Dilution-Faktor (vgl. 1.7.3)

## 6 Anhang

**Tabelle 56:** Absolute Konzentrationen 16 ausgewählter Aromastoffe in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 1.Charge

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a)</sup>					
	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
3-Methylbutanal	124	132	164	157	102	93
2,3-Butandion	1394	2168	1937	1456	1448	1266
Ethylbutanoat	9,0	9,9	11	13	21	35
3-Methylbutanol	57	89	95	100	165	171
Ethylhexanoat	1,3	2,3	2,8	3,8	8,2	16
Essigsäure	411135	552352	672257	686838	692013	843501
2-Methylpropansäure	269	3550	4755	6819	8928	11049
Buttersäure	3084	8224	20086	25188	37228	59205
2-Methylbuttersäure	52	741	2171	2443	3172	3980
3-Methylbuttersäure	359	4735	16677	19998	21186	25608
Pentansäure	70	87	152	185	260	390
Hexansäure	3046	5781	5733	5681	7751	10183
2-Phenylethanol	83	120	147	168	179	217
$\delta$ -Decalacton	1108	1468	1599	1644	1562	1618
$\delta$ -Dodecalacton	1396	1830	2122	2331	2363	2566
Phenyllessigsäure	360	400	517	739	845	1295

<sup>a)</sup> Absolute Konzentrationen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] aus Doppelbestimmungen ohne Bezug auf die Trockenmasse

**Tabelle 57:** Absolute Konzentrationen 16 ausgewählter Aromastoffe in Gouda aus Rohmilch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 1.Charge

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a)</sup>					
	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
3-Methylbutanal	43	43	71	87	69	53
2,3-Butandion	678	1151	1395	987	849	437
Ethylbutanoat	22	24	35	45	84	131
3-Methylbutanol	18	42	53	63	101	106
Ethylhexanoat	12	19	37	45	93	154
Essigsäure	236874	405865	588901	705789	729176	909719
2-Methylpropansäure	272	3922	4874	6416	9562	11626
Buttersäure	5958	20006	30138	37503	66966	92305
2-Methylbuttersäure	38	387	582	750	1542	2286
3-Methylbuttersäure	376	4655	5508	9387	15580	17692
Pentansäure	102	145	246	298	505	657
Hexansäure	5446	8636	9101	9141	18726	32377
2-Phenylethanol	68	88	95	97	136	159
$\delta$ -Decalacton	1233	1433	1459	1525	1502	1593
$\delta$ -Dodecalacton	1244	1850	2224	2331	2446	2507
Phenyllessigsäure	137	226	317	712	938	1648

<sup>a)</sup> Absolute Konzentrationen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] aus Doppelbestimmungen ohne Bezug auf die Trockenmasse

## 6 Anhang

**Tabelle 58:** Absolute Konzentrationen 16 ausgewählter Aromastoffe in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 2.Charge

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a)</sup>					
	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
3-Methylbutanal	n.b. <sup>b)</sup>	146	n.b. <sup>b)</sup>	278	n.b. <sup>b)</sup>	211
2,3-Butandion	782	3232	3526	3060	2715	2435
Ethylbutanoat	n.b. <sup>b)</sup>	8,6	n.b. <sup>b)</sup>	13	n.b. <sup>b)</sup>	28
3-Methylbutanol	n.b. <sup>b)</sup>	90	n.b. <sup>b)</sup>	110	n.b. <sup>b)</sup>	228
Ethylhexanoat	n.b. <sup>b)</sup>	2,1	n.b. <sup>b)</sup>	3,8	n.b. <sup>b)</sup>	9,6
Essigsäure	n.b. <sup>b)</sup>	1148417	n.b. <sup>b)</sup>	1177566	n.b. <sup>b)</sup>	1394525
2-Methylpropansäure	n.b. <sup>b)</sup>	1626	n.b. <sup>b)</sup>	6569	n.b. <sup>b)</sup>	22860
Buttersäure	n.b. <sup>b)</sup>	6942	n.b. <sup>b)</sup>	26035	n.b. <sup>b)</sup>	103638
2-Methylbuttersäure	n.b. <sup>b)</sup>	90	n.b. <sup>b)</sup>	754	n.b. <sup>b)</sup>	1928
3-Methylbuttersäure	n.b. <sup>b)</sup>	503	n.b. <sup>b)</sup>	9272	n.b. <sup>b)</sup>	18448
Pentansäure	n.b. <sup>b)</sup>	102	n.b. <sup>b)</sup>	155	n.b. <sup>b)</sup>	369
Hexansäure	n.b. <sup>b)</sup>	2577	n.b. <sup>b)</sup>	4419	n.b. <sup>b)</sup>	9175
2-Phenylethanol	n.b. <sup>b)</sup>	66	n.b. <sup>b)</sup>	119	n.b. <sup>b)</sup>	275
$\delta$ -Decalacton	n.b. <sup>b)</sup>	1342	n.b. <sup>b)</sup>	1518	n.b. <sup>b)</sup>	1687
$\delta$ -Dodecalacton	n.b. <sup>b)</sup>	1818	n.b. <sup>b)</sup>	3261	n.b. <sup>b)</sup>	3596
Phenyllessigsäure	n.b. <sup>b)</sup>	251	n.b. <sup>b)</sup>	627	n.b. <sup>b)</sup>	1059

<sup>a)</sup> Absolute Konzentrationen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] aus Doppelbestimmungen ohne Bezug auf die Trockenmasse

<sup>b)</sup> n.b. = nicht bestimmt

**Tabelle 59:** Absolute Konzentrationen 16 ausgewählter Aromastoffe in Gouda aus Rohmilch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 2.Charge

Geruchsstoff	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a)</sup>					
	0	4	7	11	19	30
Wochen Reifung						
3-Methylbutanal	n.b. <sup>b)</sup>	54	n.b. <sup>b)</sup>	161	n.b. <sup>b)</sup>	124
2,3-Butandion	513	2743	2631	1229	748	696
Ethylbutanoat	n.b. <sup>b)</sup>	14	n.b. <sup>b)</sup>	30	n.b. <sup>b)</sup>	88
3-Methylbutanol	n.b. <sup>b)</sup>	47	n.b. <sup>b)</sup>	72	n.b. <sup>b)</sup>	150
Ethylhexanoat	n.b. <sup>b)</sup>	17	n.b. <sup>b)</sup>	37	n.b. <sup>b)</sup>	90
Essigsäure	n.b. <sup>b)</sup>	1014867	n.b. <sup>b)</sup>	1253217	n.b. <sup>b)</sup>	1680038
2-Methylpropansäure	n.b. <sup>b)</sup>	1387	n.b. <sup>b)</sup>	7050	n.b. <sup>b)</sup>	22876
Buttersäure	n.b. <sup>b)</sup>	14523	n.b. <sup>b)</sup>	51102	n.b. <sup>b)</sup>	169068
2-Methylbuttersäure	n.b. <sup>b)</sup>	53	n.b. <sup>b)</sup>	346	n.b. <sup>b)</sup>	1224
3-Methylbuttersäure	n.b. <sup>b)</sup>	427	n.b. <sup>b)</sup>	5701	n.b. <sup>b)</sup>	11208
Pentansäure	n.b. <sup>b)</sup>	155	n.b. <sup>b)</sup>	249	n.b. <sup>b)</sup>	732
Hexansäure	n.b. <sup>b)</sup>	6518	n.b. <sup>b)</sup>	11412	n.b. <sup>b)</sup>	29620
2-Phenylethanol	n.b. <sup>b)</sup>	50	n.b. <sup>b)</sup>	80	n.b. <sup>b)</sup>	227
$\delta$ -Decalacton	n.b. <sup>b)</sup>	1300	n.b. <sup>b)</sup>	1524	n.b. <sup>b)</sup>	1673
$\delta$ -Dodecalacton	n.b. <sup>b)</sup>	1801	n.b. <sup>b)</sup>	2945	n.b. <sup>b)</sup>	3508
Phenyllessigsäure	n.b. <sup>b)</sup>	146	n.b. <sup>b)</sup>	726	n.b. <sup>b)</sup>	1372

<sup>a)</sup> Absolute Konzentrationen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] aus Doppelbestimmungen ohne Bezug auf die Trockenmasse

<sup>b)</sup> n.b. = nicht bestimmt

## 6 Anhang

---

**Tabelle 60:** Ergebnisse der Triangeltests beim Vergleich von Gouda-Käsen gem. § 64 LFGB, Prüfvorschrift (00.90-7)

<b>Prüfsatz <sup>a)</sup></b>	<b>korrekte Antworten <sup>b)</sup></b>	<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> <sup>c)</sup></b>
<b>Gouda aus pasteurisierter Milch</b> 0 Wochen vs. 30 Wochen gereift	17/20	0,001 (0,1%)
<b>Gouda aus Rohmilch</b> 0 Wochen vs. 30 Wochen gereift	18/20	0,001 (0,1%)
<b>0 Wochen gereift</b> Gouda aus pasteurisierter Milch vs. Gouda aus Rohmilch	13/20	0,01 (1%)
<b>30 Wochen gereift</b> Gouda aus pasteurisierter Milch vs. Gouda aus Rohmilch	17/20	0,001 (0,1%)

---

<sup>a)</sup> Prüfsatz: Gegenüberstellung (vs.) der Gouda-Käse, die miteinander verglichen wurden

<sup>b)</sup> Zahl der korrekten Antworten von 20 Teilnehmern des geschulten, sensorischen Panels

<sup>c)</sup> Signifikanzniveau gemäß § 64 LFGB, Prüfvorschrift (00.90-7) (ehem. § 35 LMBG)



**Tabelle 61:** Absolute Konzentrationen von und L- und D-Lactat in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch und Rohmilch in 6 Reifungsstufen (0 - 30 Wochen) in zwei Chargen

Gouda-Variante	Konzentration (mg/100 g) <sup>a)</sup>					
	0	4	7	11	19	30
Wochen Reifung						
L-Lactat, Charge 1						
<b>Gouda aus pasteurisierter Milch</b>	1553	1525	1562	1717	1904	1928
<b>Gouda aus Rohmilch</b>	1515	1434	1524	1455	1490	1510
L-Lactat, Charge 2						
<b>Gouda aus pasteurisierter Milch</b>	n.b. <sup>b)</sup>	1401	n.b. <sup>b)</sup>	1462	n.b. <sup>b)</sup>	1641
<b>Gouda aus Rohmilch</b>	n.b. <sup>b)</sup>	1475	n.b. <sup>b)</sup>	1396	n.b. <sup>b)</sup>	1397
D-Lactat, Charge 1						
<b>Gouda aus pasteurisierter Milch</b>	6,7	12	16	20	26	31
<b>Gouda aus Rohmilch</b>	6,4	44	54	202	321	506
D-Lactat, Charge 2						
<b>Gouda aus pasteurisierter Milch</b>	n.b. <sup>b)</sup>	29	n.b. <sup>b)</sup>	53	n.b. <sup>b)</sup>	74
<b>Gouda aus Rohmilch</b>	n.b. <sup>b)</sup>	45	n.b. <sup>b)</sup>	241	n.b. <sup>b)</sup>	727

<sup>a)</sup> Werte aus Dreifachbestimmungen

<sup>b)</sup> n.b. = nicht bestimmt

**Tabelle 62:** Konzentrationen freier Aminosäuren in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 1.Charge

Aminosäure	Konzentration (mg/kg) <sup>a)</sup>					
	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
Asparaginsäure	84	156	199	331	581	863
Threonin	99	211	317	529	841	1216
Serin	89	171	255	430	672	983
Asparagin	262	745	1048	1417	1958	2533
Glutaminsäure	406	849	1586	2035	3641	5477
Glutamin	283	562	892	1136	1484	1650
Glycin	91	239	389	575	988	1324
Alanin	133	257	375	562	927	1291
Citrullin	81	215	357	557	842	1087
Valin	332	876	1417	2263	3438	4805
Methionin	78	152	260	350	576	860
Isoleucin	93	215	384	607	1099	1807
Leucin	500	1397	2001	2690	3354	4042
Tyrosin	151	231	314	513	671	964
Phenylalanin	200	498	711	1045	1428	1844
γ-Aminobuttersäure	220	564	628	1196	1012	970
Histidin	46	88	137	194	409	742
Ornithin	119	302	391	487	632	826
Lysin	256	526	854	1244	2367	3897

<sup>a)</sup> Absolute Konzentrationen [mg/kg] aus Doppelbestimmungen ohne Bezug auf die Trockenmasse

**Tabelle 63:** Konzentrationen freier Aminosäuren in Gouda-Käse aus Rohmilch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 1.Charge

Aminosäure	Konzentration (mg/kg) <sup>a)</sup>					
	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
Asparaginsäure	50	104	126	211	333	610
Threonin	76	176	272	445	702	1196
Serin	81	157	241	376	617	979
Asparagin	190	519	757	1163	1536	2293
Glutaminsäure	225	726	1052	1691	2649	4773
Glutamin	167	331	423	609	723	921
Glycin	63	128	184	327	490	958
Alanin	126	194	271	455	660	993
Citrullin	83	215	357	557	842	1087
Valin	229	596	834	1497	1998	3456
Methionin	53	136	175	366	522	842
Isoleucin	56	127	183	415	610	1323
Leucin	298	819	1164	1972	2525	3586
Tyrosin	96	179	213	318	451	748
Phenylalanin	155	444	612	858	1091	1594
$\gamma$ -Aminobuttersäure	303	355	388	509	698	763
Histidin	41	66	86	139	237	544
Ornithin	45	205	274	524	756	1267
Lysin	178	328	399	858	1166	2764

<sup>a)</sup> Absolute Konzentrationen [mg/kg] aus Doppelbestimmungen ohne Bezug auf die Trockenmasse

**Tabelle 64:** Konzentrationen freier Aminosäuren in Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 2.Charge

Aminosäure	Konzentration (mg/kg) <sup>a)</sup>					
	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
Asparaginsäure	n.b. <sup>b)</sup>	142	n.b. <sup>b)</sup>	273	n.b. <sup>b)</sup>	663
Threonin	n.b. <sup>b)</sup>	214	n.b. <sup>b)</sup>	454	n.b. <sup>b)</sup>	904
Serin	n.b. <sup>b)</sup>	198	n.b. <sup>b)</sup>	334	n.b. <sup>b)</sup>	652
Asparagin	n.b. <sup>b)</sup>	739	n.b. <sup>b)</sup>	1373	n.b. <sup>b)</sup>	2214
Glutaminsäure	n.b. <sup>b)</sup>	1159	n.b. <sup>b)</sup>	2464	n.b. <sup>b)</sup>	4715
Glutamin	n.b. <sup>b)</sup>	425	n.b. <sup>b)</sup>	906	n.b. <sup>b)</sup>	1143
Glycin	n.b. <sup>b)</sup>	211	n.b. <sup>b)</sup>	448	n.b. <sup>b)</sup>	897
Alanin	n.b. <sup>b)</sup>	315	n.b. <sup>b)</sup>	506	n.b. <sup>b)</sup>	1013
Citrullin	n.b. <sup>b)</sup>	168	n.b. <sup>b)</sup>	279	n.b. <sup>b)</sup>	740
Valin	n.b. <sup>b)</sup>	852	n.b. <sup>b)</sup>	1917	n.b. <sup>b)</sup>	3908
Methionin	n.b. <sup>b)</sup>	206	n.b. <sup>b)</sup>	381	n.b. <sup>b)</sup>	762
Isoleucin	n.b. <sup>b)</sup>	221	n.b. <sup>b)</sup>	535	n.b. <sup>b)</sup>	1370
Leucin	n.b. <sup>b)</sup>	1423	n.b. <sup>b)</sup>	2676	n.b. <sup>b)</sup>	4169
Tyrosin	n.b. <sup>b)</sup>	243	n.b. <sup>b)</sup>	455	n.b. <sup>b)</sup>	698
Phenylalanin	n.b. <sup>b)</sup>	442	n.b. <sup>b)</sup>	1019	n.b. <sup>b)</sup>	1647
γ-Aminobuttersäure	n.b. <sup>b)</sup>	396	n.b. <sup>b)</sup>	826	n.b. <sup>b)</sup>	1204
Histidin	n.b. <sup>b)</sup>	99	n.b. <sup>b)</sup>	223	n.b. <sup>b)</sup>	527
Ornithin	n.b. <sup>b)</sup>	231	n.b. <sup>b)</sup>	438	n.b. <sup>b)</sup>	675
Lysin	n.b. <sup>b)</sup>	623	n.b. <sup>b)</sup>	1282	n.b. <sup>b)</sup>	3152

<sup>a)</sup> Absolute Konzentrationen [mg/kg] aus Doppelbestimmungen ohne Bezug auf die Trockenmasse

<sup>b)</sup> n.b. = nicht bestimmt

**Tabelle 65:** Konzentrationen freier Aminosäuren in Gouda-Käse aus Rohmilch im Reifungsverlauf von 0 - 30 Wochen, 2.Charge

Aminosäure	Konzentration (mg/kg) <sup>a)</sup>					
	0	4	7	11	19	30
	Wochen Reifung					
Asparaginsäure	n.b. <sup>b)</sup>	78	n.b. <sup>b)</sup>	200	n.b. <sup>b)</sup>	403
Threonin	n.b. <sup>b)</sup>	176	n.b. <sup>b)</sup>	393	n.b. <sup>b)</sup>	818
Serin	n.b. <sup>b)</sup>	164	n.b. <sup>b)</sup>	298	n.b. <sup>b)</sup>	713
Asparagin	n.b. <sup>b)</sup>	453	n.b. <sup>b)</sup>	839	n.b. <sup>b)</sup>	1597
Glutaminsäure	n.b. <sup>b)</sup>	773	n.b. <sup>b)</sup>	1917	n.b. <sup>b)</sup>	4040
Glutamin	n.b. <sup>b)</sup>	296	n.b. <sup>b)</sup>	449	n.b. <sup>b)</sup>	586
Glycin	n.b. <sup>b)</sup>	128	n.b. <sup>b)</sup>	283	n.b. <sup>b)</sup>	645
Alanin	n.b. <sup>b)</sup>	193	n.b. <sup>b)</sup>	379	n.b. <sup>b)</sup>	696
Citrullin	n.b. <sup>b)</sup>	116	n.b. <sup>b)</sup>	209	n.b. <sup>b)</sup>	422
Valin	n.b. <sup>b)</sup>	558	n.b. <sup>b)</sup>	1228	n.b. <sup>b)</sup>	2475
Methionin	n.b. <sup>b)</sup>	181	n.b. <sup>b)</sup>	335	n.b. <sup>b)</sup>	800
Isoleucin	n.b. <sup>b)</sup>	184	n.b. <sup>b)</sup>	393	n.b. <sup>b)</sup>	1080
Leucin	n.b. <sup>b)</sup>	822	n.b. <sup>b)</sup>	1645	n.b. <sup>b)</sup>	3131
Tyrosin	n.b. <sup>b)</sup>	160	n.b. <sup>b)</sup>	307	n.b. <sup>b)</sup>	444
Phenylalanin	n.b. <sup>b)</sup>	371	n.b. <sup>b)</sup>	808	n.b. <sup>b)</sup>	1340
$\gamma$ -Aminobuttersäure	n.b. <sup>b)</sup>	217	n.b. <sup>b)</sup>	267	n.b. <sup>b)</sup>	306
Histidin	n.b. <sup>b)</sup>	71	n.b. <sup>b)</sup>	151	n.b. <sup>b)</sup>	395
Ornithin	n.b. <sup>b)</sup>	173	n.b. <sup>b)</sup>	373	n.b. <sup>b)</sup>	766
Lysin	n.b. <sup>b)</sup>	309	n.b. <sup>b)</sup>	816	n.b. <sup>b)</sup>	1573

<sup>a)</sup> Absolute Konzentrationen [mg/kg] aus Doppelbestimmungen ohne Bezug auf die Trockenmasse

<sup>b)</sup> n.b. = nicht bestimmt

## 6 Anhang

**Tabelle 66:** Ergebnisse der Aromaprofilanalysen beim Vergleich von Gouda-Käsen aus Rohmilch und pasteurisierter Milch nach 0 und 30 Wochen Reifung

Geruchsqualität <sup>a)</sup>	Referenzaromastoff <sup>b)</sup>	Intensität der Geruchsqualität <sup>c)</sup>			
		Gouda-Käse <sup>d)</sup>			
		PM-G-0W	RM-G-0W	PM-G-30W	RM-G-30W
kokosnussartig	$\delta$ -Decalacton	0,5	0,6	0,6	0,5
schweißig, ranzig	Buttersäure	1,4	1,9	1,9	2,4
schweißig, käsig	3-Methylbuttersäure	1,8	1,9	2,5	2,3
essigsauer	Essigsäure	1,2	1,3	1,5	1,4
honigartig	Phenyllessigsäure	0,8	0,7	1,3	1,2
butterartig	2,3-Butandion	2,0	1,9	2,0	1,9
malzig	3-Methylbutanal	0,9	0,8	1,6	1,3
fruchtig	Ethylbutanoat	1,4	1,4	1,4	2,0

<sup>a)</sup> Geruchsqualität als definierter Deskriptor (vgl. 3.8.2)

<sup>b)</sup> Referenzaromastoff, der als Vergleich diente

<sup>c)</sup> Intensität der Geruchsqualität auf einer Skala von 0 bis 3 (0 = nicht wahrnehmbar, 1 = schwach wahrnehmbar, 2 = wahrnehmbar, 3 = stark wahrnehmbar) bei der Aromaprofilanalyse (vgl. 3.8.2),

<sup>d)</sup> Käsenomenklatur (vgl. 3.1.2)

**Tabelle 67:** Ergebnisse der Aromaprofilanalysen beim Vergleich von Gouda-Käse aus pasteurisierter Milch nach 30 Wochen Reifung und Rekombinaten (Rek.)

Geruchsqualität <sup>a)</sup>	Referenzaromastoff <sup>b)</sup>	Intensität der Geruchsqualität <sup>c)</sup>		
		Gouda-Käse <sup>d)</sup>		
		PM-G-30W	PM-G-30W Rek. <sup>e)</sup>	RM-G-30W Rek. <sup>e)</sup>
kokosnussartig	$\delta$ -Decalacton	0,7	0,7	0,6
schweißig, ranzig	Buttersäure	1,6	1,7	2,5
schweißig, käsig	3-Methylbuttersäure	2,4	2,1	1,7
essigsauer	Essigsäure	1,6	1,5	1,5
honigartig	Phenylelessigsäure	1,1	1,1	1,0
butterartig	2,3-Butandion	2,0	2,4	1,9
malzig	3-Methylbutanal	1,3	1,4	1,0
fruchtig	Ethylbutanoat	1,3	1,2	2,1

<sup>a)</sup> Geruchsqualität als definierter Deskriptor (vgl. 3.8.2)

<sup>b)</sup> Referenzaromastoff, der als Vergleich diente

<sup>c)</sup> Intensität der Geruchsqualität auf einer Skala von 0 bis 3 (0 = nicht wahrnehmbar, 1 = schwach wahrnehmbar, 2 = wahrnehmbar, 3 = stark wahrnehmbar) bei der Aromaprofilanalyse (vgl. 3.8.2)

<sup>d)</sup> Käsenomenklatur (vgl. 3.1.2)

<sup>e)</sup> Rekombinat, hergestellt nach 3.8.4