

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie

**Einfluss von Prozesstechnologie und Extraktionsverfahren
auf wichtige Aromastoffe in Röstkaffee unter besonderer
Berücksichtigung der Bildung und Stabilität von
2-Furanmethanthiol**

Christof Madinger

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. K. Köhler
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 23.04.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 30.07.2012 angenommen.

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-938896-56-3

© Verlag Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA)
Lise-Meitner-Str. 34, 85354 Freising
Tel: 08161 712932
www.dfal.de

Die Informationen in diesem Buch wurden mit großer Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler, insbesondere bei der Beschreibung des Gefahrenpotentials von Versuchen, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Verlag, Autoren und ggf. Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für eventuell verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der Vervielfältigung und Verbreitung in besonderen Verfahren wie fotomechanischer Nachdruck, Fotokopie, Mikrokopie, elektronische Datenaufzeichnung einschließlich Speicherung und Übertragung auf weitere Datenträger sowie Übersetzung in andere Sprachen, behält sich der Verlag vor.

1. Auflage 2012

Druck und Bindung: printy München (www.printy.de)

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit vom Dezember 2006 bis November 2011 unter der Leitung von Professor Dr. Peter Schieberle an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie sowie am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München in Garching bei München bzw. in Freising durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Peter Schieberle, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, die sehr guten Arbeitsbedingungen, die wertvollen Gespräche, Anregungen und Diskussionen sowie das meiner Arbeit jederzeit entgegengebrachte Interesse. Ganz besonders möchte ich mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen hinsichtlich meiner Arbeit im Studentenpraktikum bedanken.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus meinen Kollegen im Studentenpraktikum, Dr. Michael Granvogl und Johannes Polster, mit denen ich eine unvergessliche und lehrreiche Zeit bei der Betreuung des Hauptstudiums verbringen durfte und die mir stets erstklassige Kollegen und Freunde waren.

Ein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Michael Czerny, der mir zu Beginn meiner Promotionszeit eine wertvolle Unterstützung war. Magdalena Uzunova möchte ich für die geleistete Arbeit im Labor herzlich danken.

Ich möchte auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München sowie der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und die Teilnahme an zahlreichen Sensoriken danken.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Laborkollegen aus Garching und Freising, Dr. Irene Chetchik, Dr. Gesa Gröhnke, Brigitte Ruisinger, Susan Poehlmann, Johannes Kiefl, Tanja Schaller, Johannes Polster, Jörg Stein und Daniela Fitzka, für das gute Laborklima und die reibungslose Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt dabei Jörg Stein, der mit seinen hilfreichen Ratschlägen unersetzbar ist.

Für die schöne Zeit in unserem Büro in Freising möchte ich mich ausdrücklich bei Johannes Polster und Johanna Kreißl bedanken. Es war wirklich eine sehr angenehme Zeit.

Ganz herzlich danke ich Ines Otte und Sami Kaviani für die Durchführung zahlreicher massenspektrometrischer Messungen. Sabine Bijewitz möchte ich für die Anfertigung zahlreicher Zeichnungen für die Dissertationsschrift danken.

Den Haustechnikern Michael Larcher und Georg Gamböck möchte ich für ihre stets kompetente Hilfe bei elektronischen Problemen danken. Vera Tuvaljevic, Helga Häusler, Anette Klein danke ich für ihre wertvolle Arbeit in der Spülküche und bei der Beschaffung von Chemikalien und sonstiger Ausrüstung.

Für die Beschaffung von Literatur danke ich Christel Hoffmann und Irmgard Bauer.

Auch meiner Kochgruppe in Freising mit Johanna Kreißl, Jörg Stein, Stephanie Frank und Veronika Mall danke ich für die vielen schönen und guten Mittagessen zu fünft.

Meinen Eltern möchte ich von Herzen danken, dass sie mir meine Ausbildung ermöglicht haben und meiner ganzen Familie, dass sie mich in all den Jahren jederzeit unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt dabei meinem Papa und meiner Schwester Birgit für die gewissenhafte und sicher nicht einfache Durchsicht des Skripts.

Abschließend will ich Karin für ihre uneingeschränkte und bedingungslose Unterstützung, Freundschaft und Liebe danken.

**Für meine Eltern Ursula und Meinhard
&
meine Schwestern Birgit und Astrid**

1	Einleitung	1
1.1	Aromastoffe und Prinzipien der Molekularen Sensorik	1
1.2	Kaffee	6
1.2.1	Botanik und Anbau	7
1.2.2	Rohkaffee	10
1.2.3	Röstkaffee und Kaffeegetränke	14
1.3	Flüchtige Verbindungen und Aromastoffe in Kaffee	17
1.3.1	Flüchtige Verbindungen und Aromastoffe in Rohkaffee	17
1.3.2	Flüchtige Verbindungen und Aromastoffe in Röstkaffee	21
1.3.3	Flüchtige Verbindungen und Aromastoffe in Kaffeegetränken	30
1.4	Einflussfaktoren auf das Kaffeearoma	40
1.4.1	Nacherntebehandlung der Kaffeekirschen	40
1.4.2	Röstbedingungen und Röstgrad	43
1.4.3	Lagerung von Röstkaffee	45
1.4.4	Extraktionstechniken zur Herstellung von Kaffeegetränken	51
1.5	Möglichkeiten der Bildungswege von Kaffeearomastoffen	53
1.5.1	Vorschläge zur Bildung ausgewählter Röstkaffeearomastoffe	53
1.5.2	Vorschläge zur Bildung von 2-Furanmethanthiol	58
1.5.3	Untersuchungen zur Bildung von Aromastoffen beim Rösten von Lebensmitteln	60
1.6	Problemstellung und Zielsetzung	65
2	Ergebnisse	67
2.1	Einflüsse auf die Gehalte wichtiger Aromastoffe von Röstkaffees und Kaffeegetränken	67
2.1.1	Einfluss der Trocknungstechnologie	67
2.1.1.1	Röstungen unterschiedlich getrockneter Rohkaffeeproben	69
2.1.1.2	Sensorische Untersuchungen von Röstkaffees und Kaffeegetränken	69
2.1.1.3	Vergleichende Aromaextraktverdünnungsanalyse und vergleichende Headspace-Verdünnungsanalyse zweier Röstkaffees	71
2.1.1.4	Identifizierungsexperimente	78
2.1.1.5	Quantitative Bestimmung ausgewählter Schlüsselaromastoffe in Röstkaffees und Kaffeegetränken	81
2.1.1.6	Unterschiede in den Aromastoffgehalten einzelner Röstkaffeebohnen	89
2.1.2	Einfluss von Extraktionstechniken	91
2.1.2.1	Sensorische Untersuchungen unterschiedlich zubereiteter Kaffeegetränke	91
2.1.2.2	Quantitative Bestimmungen ausgewählter Schlüsselaromastoffe in verschiedenen Kaffeegetränken und Berechnung von Extraktionsraten	92
2.1.3	Einfluss der Lagerung von Röstkaffees auf die Stabilität von 2-Furanmethanthiol	103

2.1.3.1	Lagerung von Röstkaffees – Vergleich von intakten Röstkaffeebohnen und Röstkaffeepulver	103
2.1.3.2	Lagerung von Röstkaffeebohnen – Vergleich von extrahierten Bohnen und nicht extrahierten Bohnen	106
2.1.3.3	Einfluss von Antioxidationsmitteln auf die Lagerstabilität von 2-Furanmethanthiol in gerösteten Kaffees	108
2.2	Vorläuferstudien von 2-Furanmethanthiol	111
2.2.1	Kaffee	111
2.2.1.1	Bildung von 2-Furanmethanthiol in verschiedenen Kaffeefraktionen	112
2.2.1.2	Vergleich der Gehalte an 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanthiol in Roh- und Röstkaffee	116
2.2.1.3	Quantifizierung von D-Ribose in Rohkaffee und Rohkaffeefraktionen und Isotopenanreicherungsversuch	118
2.2.1.4	Quantifizierung von L-Cystein in Rohkaffee und Rohkaffeefraktionen, Synthese von [³⁴ S]-L-Cystein und Isotopenanreicherungsversuch	127
2.2.2	Senf	140
2.2.2.1	Aromaextraktverdünnungsanalyse	140
2.2.2.2	Bestimmung des Gehalts an 2-Furanmethanthiol in gerösteten Senfproben	143
2.2.2.3	Vergleich der Gehalte an 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanthiol in rohem und geröstetem Senf	145
2.2.2.4	Fraktionierung von Senfsamen	147
2.2.2.5	Bestimmung des Gehalts an 2-Furanmethanthiol in geröstetem Senf und gerösteten Senffraktionen	150
2.2.2.6	Quantifizierung von L-Cystein in Senf und Senffraktionen	151
2.2.2.7	Isotopenanreicherungsversuche in Senffraktionen	155
3	Schlussfolgerungen	158
3.1	Einflüsse auf die Qualität des Kaffeearomas	158
3.1.1	Trocknungstechnologie	158
3.1.2	Extraktionstechniken	166
3.1.3	Lagerungsversuche	173
3.2	Bildung des Aromastoffs 2-Furanmethanthiol	178
3.2.1	Untersuchungen an Rohkaffee	178
3.2.2	Untersuchungen an Senfsamen	184
4	Zusammenfassung	190
5	Experimenteller Teil	194
5.1	Untersuchungsmaterial	194
5.1.1	Rohkaffee	194
5.1.2	Röstkaffee	195
5.1.3	Kaffeegetränke	196
5.1.4	Senf	197

5.1.5	Dämpfen von Rohkaffee und Senf	197
5.1.6	Fraktionierung von Rohkaffee und Senfsamen	198
5.1.7	Rekombination von Rohkaffee	200
5.1.8	Isotopenanreicherungsversuche	200
5.1.9	Gefriertrocknung von Kaffee- und Senfproben	201
5.1.10	Röstungen von Kaffee- und Senfproben	201
5.1.11	Mahlen von Röstkaffee	202
5.1.12	Lagerung von Röstkaffee	202
5.2	Chemikalien	202
5.2.1	Referenzverbindungen	202
5.2.2	Stabilisotopenmarkierte Verbindungen	203
5.2.3	Sonstige Chemikalien	204
5.3	Synthesen	206
5.3.1	[¹³ C ₄]-Diacetyl	206
5.3.2	[¹³ C ₂]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	207
5.3.3	[² H ₃]-2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	210
5.3.4	[¹³ C ₂]-2-Furancarbaldehyd	211
5.3.5	[¹³ C ₂]-2-Furanmethanol	211
5.3.6	[³⁴ S]-L-Cystein	212
5.4	Sensorische Untersuchungen	214
5.4.1	Rahmenbedingungen	214
5.4.2	Dreiecksprüfungen auf Unterscheidbarkeit	214
5.5	Isolierung von Aromastoffen	215
5.5.1	Extraktionsverfahren	215
5.5.1.1	Pulver	215
5.5.1.2	Kaffeegetränke	215
5.5.1.3	Suspensionen	216
5.5.2	Headspace-Analysen	216
5.5.3	Destillation im Hochvakuum	217
5.5.4	Fraktionierung	218
5.5.5	Konzentrierung	218
5.5.6	Säulenchromatographische Aufreinigung	218
5.6	Selektion aromarelevanter Verbindungen	219
5.7	Identifizierung aromarelevanter Verbindungen	220
5.7.1	Bestimmung von Retentionsindices	220
5.7.2	Aufnahme von Massenspektren	221
5.8	Quantifizierungen	221
5.8.1	Prinzip der Stabilisotopenverdünnungsanalyse	221
5.8.2	Konzentrationsbestimmungen von Standardlösungen	222
5.8.2.1	Aromastoffe	222

5.8.2.2	[³⁴ S]-L-Cystein	223
5.8.3	Quantifizierungen	224
5.8.3.1	Aromastoffe	224
5.8.3.2	D-Ribose	229
5.8.3.3	L-Cystein	230
5.8.3.4	Berechnung von Stoffmengenverhältnissen	232
5.8.3.5	Berechnung von Extraktionsraten	232
5.9	Analytisch-instrumentelle Methoden	233
5.9.1	Kapillargaschromatographie	233
5.9.1.1	Kapillargaschromatographie-Flammenionisationsdetektion und Kapillargaschromatographie-Olfaktometrie	233
5.9.1.2	Headspace-HRGC-FID und Headspace-HRGC-O	235
5.9.2	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie	236
5.9.3	Zweidimensionale Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie	237
5.9.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	240
5.9.5	Flash-Chromatographie	241
5.9.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie	242
5.9.7	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie	243
6	Literatur	246

Abkürzungen

AEVA	Aromaextraktverdünnungsanalyse
AW	Aromawert
CAMOLA	Carbon Module Labeling
CI	Chemische Ionisation
CR	Costa Rica
CROSSPY-Radikal	1,4-Bis-(5-amino-5-carboxy-1-pentyl)pyrazinium-Radikalkation
Cys	L-Cystein
DCM	Dichlormethan
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronensprayionisation
FCA	2-Furancarbaldehyd
FD-Faktor	Flavour-Dilution-Faktor
FFAP	Free fatty acid phase
FFT	2-Furanmethanthiol (2-Furfurylthiol)
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	2-Furanmethanol
GABA	Gamma-Aminobutansäure
HDMF	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon
HH	Technische Universität Hamburg-Harburg
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie
HRGC	High Resolution Gas Chromatography (hochauflösende Gaschromatographie, Kapillargaschromatographie)
HRGC-FID	Hochauflösende Gaschromatographie (Kapillargaschromatographie)/Flammenionisationsdetektion
HRGC/HRGC-MS	Zweidimensionale hochauflösende Gaschromatographie (Kapillargaschromatographie)/Massenspektrometrie
HRGC-MS	Hochauflösende Gaschromatographie (Kapillargaschromatographie)/Massenspektrometrie
HRGC-O	Hochauflösende Gaschromatographie (Kapillargaschromatographie)/Olfaktometrie
HS	Headspace
HVA	Headspaceverdünnungsanalyse

ICO	International Coffee Organization
kT	kontinuierliche Trocknung
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography)
LE	Lösungsmittel-extrakt
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
MIB	2-Methylisoborneol
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NBF	neutral-basische Fraktion
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanzspektroskopie)
R _F	Responsefaktor
RI	Retentionsindex
Rib	D-Ribose
RP	Reversed Phase
RT	Retentionszeit
SAFE	Solvent Assisted Flavour Evaporation
SDE	Simultane Destillation-Extraktion
SF	saure Fraktion
SG	gedämpfte Senfsamen
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
So	Sonnentrocknung
SPME	Solid Phase Microextraction
SRM-Modus	Selected Reaction Monitoring-Modus
TNR	Tag-Nacht-Rhythmus
UV	Ultraviolett
UV/VIS	Ultraviolett/Visible
vAEVA	vergleichende Aromaextraktverdünnungsanalyse
vHVA	vergleichende Headspaceverdünnungsanalyse
WE	Wasserextrakt
WEH	hochmolekularer Anteil des Wasserextrakts
WEN	niedermolekularer Anteil des Wasserextrakts
WEN U	Unterfraktion des niedermolekularen Anteils des Wasserextrakts
WR	wasserunlöslicher Rückstand

Trivialnamen

Acetoin	3-Hydroxy-2-butanon
Aceton	Propanon
Acetylformoin	2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3-furanon
Butylhydroxyanisol	3-(1,1-Dimethylethyl)-4-methoxyphenol
Catechol	1,2-Dihydroxybenzol
Chinasäure	(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-Tetrahydroxycyclohexancarbonsäure
(<i>E</i>)- β -Damascenon	(<i>E</i>)-1-(2,6,6-Trimethyl-1,3-cyclohexadienyl)-2-buten-1-on
Dansylchlorid	5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid
Ferulasäure	3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propensäure
Geosmin	(4 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aR</i>)-4,8 <i>a</i> -Dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydronaphthalin-4 <i>a</i> -ol
Kaffeesäure	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propensäure
Linalool	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol
Maltol	3-Hydroxy-2-methyl-4-pyranon
2-Methylisoborneol	1,6,7,7-Tetramethylbicyclo[2,2,1]heptan-6-ol
Octylgallat	Octyl-3,4,5-trihydroxybenzoat
Prenylalkohol	3-Methyl-2-buten-1-ol
Trichloranisol	2,4,6-Trichlormethoxybenzol
Xylol	Dimethylbenzol

1 Einleitung

1.1 Aromastoffe und Prinzipien der Molekularen Sensorik

Aromastoffe, auch Geruchsstoffe genannt, sind diejenigen flüchtigen Verbindungen, die mit dem Geruchssinn wahrgenommen werden können. Gemeinsam mit den überwiegend nicht-flüchtigen Geschmacksstoffen bilden sie das im englischsprachigen Raum als „Flavour“ bezeichnete Aroma eines Lebensmittels und sind somit ein wichtiges Qualitätskriterium (Belitz et al., 2001). Aromastoffe können auf zwei Wegen zum olfaktorischen System des Menschen gelangen: beim Einatmen durch die Nase (orthonasales Riechen) oder beim Verzehr eines Lebensmittels über den Rachenraum (retronasales Riechen). Die hierfür notwendige Flüchtigkeit erreichen die Verbindungen vor allem durch ein niedriges Molekulargewicht. Dieselbe Menge eines Aromastoffs wird deshalb in variierenden Lebensmittelmatrices aufgrund der resultierenden Unterschiede in der Flüchtigkeit verschieden intensiv wahrgenommen. Zur Aufnahme an den Geruchsrezeptoren sollten die Aromastoffe außerdem eine gewisse Wasser- sowie Lipidlöslichkeit aufweisen (Albrecht und Wiesmann, 2006).

Der am hinteren Nasendach gelegene Teil der Nasenschleimhaut stellt die Regio olfactoria dar. Die beiden Riechschleimhäute des Menschen sind etwa $2,5 \text{ cm}^2$ groß und enthalten zusammen ca. 50 Millionen Riechsinneszellen, die zur Erweiterung ihrer Oberfläche jeweils bis zu 20 fadenartige, in die Nasenschleimhaut hineinragende Plasmafortsätze besitzen, die als Zilien bezeichnet werden. Die langgestreckten Riechsinneszellen sind von Stützzellen umgeben und werden regelmäßig durch Ausdifferenzierung von Basalzellen neu gebildet (**Abb. 1.1**; Leffingwell, 2002; Albrecht und Wiesmann, 2006).

An der Riechschleimhaut ankommende Aromastoffe werden zunächst im Riechschleim gelöst, um dort von Proteinen, die eine hohe Affinität zu Geruchsstoffen aufweisen, den sogenannten „odorant binding proteins“, gebunden und anschließend zu den Geruchsrezeptoren transportiert zu werden. Letztere sind transmembrane, G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die in den Plasmamembranen der Zilien lokalisiert sind. Eine Riechsinneszelle exprimiert immer nur einen Typ von Geruchsrezeptor, der durch bestimmte Strukturmerkmale der Aromastoffe aktiviert wird. Dadurch wird in den

Riechsinneszellen eine Signalkaskade ausgelöst, in deren Verlauf Natrium- und Calciumionen in die Zelle ein- und Chloridionen aus der Nervenzelle ausströmen. Die Depolarisation der Zelle erzeugt letztlich ein Aktionspotential, das durch den Riechnerv über das Siebbein in den Riechkolben (Bulbus olfactorius) weitergeleitet wird. Nach Signalbündelung in den Glomeruli findet eine synaptische Weiterleitung der Signale in den Mitralzellen statt. Über Axone werden diese Signale schließlich aus dem Riechkolben in die Bereiche des limbischen Systems und über die Riechrinde zur Großhirnrinde geführt (**Abb. 1.1**; Leffingwell, 2002; Albrecht und Wiesmann, 2006).

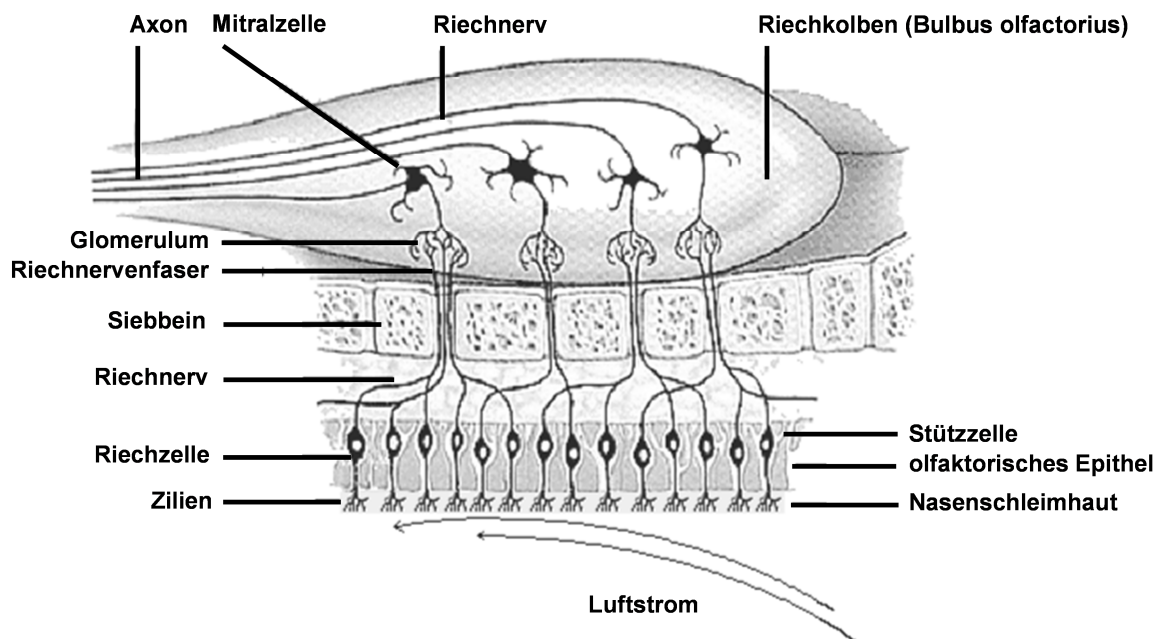


Abbildung 1.1 Physiologie der Regio olfactoria (nach Leffingwell, 2002).

Die hohe Zahl von etwa 10000 bekannten Aromastoffen kann nur deshalb von den etwa 390 Geruchsrezeptoren erkannt werden, weil einerseits eine funktionelle Gruppe eines Aromastoffs eine große Menge an Rezeptortypen mit unterschiedlicher Affinität aktiviert und andererseits ein Rezeptor von verschiedenen funktionellen Gruppen unterschiedlicher Aromastoffe stimuliert werden kann. Für jeden Duftstoff entsteht somit ein charakteristisches Muster einer unterschiedlichen Kombination an aktivierten Rezeptoren. Neben den funktionellen Gruppen kann auch die Konstitutions- und Stereochemie eines Aromastoffs für das aktivierte Rezeptormuster ausschlaggebend sein. Weiterhin spielt die Konzentration des Aromastoffs eine entscheidende Rolle. Ein Aromastoff führt in einer bestimmten Konzentration somit zu einer spezifischen

Aktivierung verschiedener Geruchsrezeptoren. Das resultierende charakteristische Muster hat das Erkennen eines Geruchseindrucks im Gehirn zur Folge. Hierbei wird diejenige Konzentration, ab der ein Aromastoff einen Geruchseindruck hervorruft, als Geruchsschwellenwert bezeichnet (Albrecht und Wiesmann, 2006).

Die enorme Vielfalt der Aromastoffe wird auf unterschiedlichsten biochemischen Reaktionswegen gebildet. Viele Duftstoffe entstehen in Pflanzen oder durch das Wirken von Mikroorganismen. Besonders charakteristische und für die Lebensmittelqualität und damit für den Verbraucher wichtige Aromastoffe werden häufig erst durch das Verarbeiten von Lebensmitteln tierischen und pflanzlichen Ursprungs, beispielsweise beim Schneiden von Gemüse, Fermentieren von Kakao, Braten von Fleisch oder Rösten von Kaffee, aus meist geruchlosen Vorläufern gebildet. Beim Verarbeitungsprozess können jedoch ebenso wie bei der Lagerung der Produkte auch unerwünschte Fehlgerüche entstehen.

Die große Bedeutung der Geruchsstoffe für die Qualität von Lebensmitteln und Lebensmittelerzeugnissen hat das Interesse der Forschung geweckt, ihre Vorläufer und Bildungswege aufzuklären, um so gegebenenfalls prozesstechnologisch auf die Entstehung der Aromastoffe Einfluss nehmen zu können. Bei zahlreichen Studien auf diesem Gebiet (**Kap. 1.5**) ist die Carbon Module Labeling (CAMOLA) Technik (Schieberle, 2005) ein vielversprechender Ansatz, um die exakte Beteiligung von nicht-flüchtigen Vorläufern am Aufbau von Aromastoffen zu klären. Hierbei wird beispielsweise ein Rohkaffee mit stabilisotopenmarkierten Präkursoren versetzt und anschließend geröstet. Dabei können aus den markierten Vorläufern, je nach Bildungsweg der Zielsubstanz, markierte Aromastoffe gebildet werden. Bei Verwendung vollständig ^{13}C -markierter Präkursoren kann die Anzahl der im Zielmolekül inkorporierten ^{13}C -Atome mittels Massenspektrometrie (MS) bestimmt werden. Die Analyse des Reaktionsprodukts mittels Nuklearer Magnetresonanzspektrometrie (NMR) ermöglicht außerdem eine Aussage darüber, ob Module des Vorläufers „en bloc“ in den Aromastoff eingebracht werden oder durch Kombination von Spaltprodukten entstehen.

Nur etwa 5 bis 10 % der flüchtigen Inhaltsstoffe eines Lebensmittels stellen aromaaktive Komponenten dar. Um diese für ein Lebensmittel entscheidenden Aromastoffe charakterisieren zu können, werden nach den Prinzipien der Molekularen Sensorik

menschliche Geruchswahrnehmungen mit analytischen Daten korreliert. Da flüchtige Substanzen eine gewisse Lipophilie gemeinsam haben, können sie zunächst, zusammen mit anderen lipophilen Inhaltsstoffen, mit niedrig siedenden organischen Lösungsmitteln aus der Lebensmittelmatrix extrahiert werden. Aus diesem Lösungsmittlextrakt werden die flüchtigen Verbindungen anschließend mittels einer schonenden Destillationsmethode, z.B. der Solvent Assisted Flavour Evaporation (SAFE, Engel et al., 1999, **Kap. 5.5.3**), von den nicht-flüchtigen Substanzen getrennt. Nach schonender Konzentrierung des Destillats wird dieses mittels Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie (HRGC-O, **Kap. 5.9.1**) analysiert und so ein Screening auf aromaaktive Verbindungen durchgeführt. Die Bedeutung der einzelnen Aromastoffe kann durch Anwendung einer Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA, Schieberle und Grosch, 1987 a, **Kap. 5.6**) abgeschätzt werden. Diejenigen Aromastoffe, die bei der AEVA noch in den stärksten Verdünnungen wahrgenommen werden und folglich die höchsten Flavour-Dilution(FD)-Faktoren erzielen, werden mit Hilfe stabilisotopenmarkierter Analoga als interne Standards (Stabilisotopenverdünnungsanalyse, SIVA, Schieberle und Grosch, 1987 b, **Kap. 5.8.1**) quantifiziert. Die Kalkulation des Aromawerts einer quantifizierten Substanz erfolgt durch Division der Konzentration mit ihrem Geruchsschwellenwert, der in einer dem untersuchten Lebensmittel entsprechenden Matrix bestimmt wird. Hierbei erfolgt eine Unterscheidung zwischen Aromastoffen mit einem Aromawert > 1 , die einen Beitrag zum Aroma des Lebensmittels leisten, und solchen mit einem Aromawert < 1 , die in nicht-aromaaktiven Konzentrationen vorliegen. Für die Herstellung eines Aromarekombinats werden schließlich alle aromarelevanten Verbindungen in einer geruchlosen, dem zu imitierenden Lebensmittel möglichst ähnlichen Matrix in den bestimmten Konzentrationen gemischt. Die Aromaanalytik wird als erfolgreich angesehen, wenn das Aroma des Rekombinats mit dem des untersuchten Lebensmittels gut übereinstimmt (Schieberle, 1995).

Dieses Konzept, das heute auch als Sensomics bezeichnet wird, ermöglicht es, die exakte molekulare Zusammensetzung von Lebensmittelaromen zu entschlüsseln. In der Forschung wird es außerdem vielfach zur objektiven Bewertung sensorisch wahrnehmbarer Beeinträchtigungen eines Lebensmittelaromas seitens der Prozesstechnologie oder durch Lagerung anhand qualitativer oder quantitativer molekularer Unterschiede herangezogen. So können durch vergleichende Analysen

beispielsweise die Auswirkungen neuer Prozessabläufe auf die Aromaqualität eines Produkts überprüft, kritische Herstellungsschritte identifiziert und die Verarbeitung letztlich optimiert werden.

1.2 Kaffee

Der Begriff „Kaffee“ stammt vom arabischen Wort „Qahwa“ bzw. vom türkischen Wort „Kahwe“ ab, was so viel wie Lebenskraft oder Stärke bedeutet. Laut den Bezeichnungen und Begriffsbestimmungen der Anlage zu den §§ 1 und 2 der Kaffeeverordnung vom 15.11.2001 ist Rohkaffee „der von Frucht- und Samenschale befreite, ungeröstete Samen von Pflanzen der Gattung *Coffea*“, während Röstkaffee als „gerösteter Rohkaffee, ungemahlen oder gemahlen, mit einem Wassergehalt von höchstens 50 Gramm in einem Kilogramm“ definiert ist. Kaffeegetränke werden durch verschiedene Extraktionsverfahren mit heißem Wasser aus gemahlenem Röstkaffee zubereitet. Im allgemeinen Sprachgebrauch versteht man unter „Kaffee“ sowohl gemahlene oder intakte Röstkaffeebohnen als auch Kaffeegetränke (Kaffeeverordnung, 2001; Belitz et al., 2001).

Die Pflanzengattung *Coffea* hat ihren Ursprung im tropischen Afrika und gelangte erst mit der Verbreitung durch den Menschen auf andere Kontinente. Als Ursprungsgebiet der Art *Coffea arabica* gilt das äthiopische Hochland. Es wird vermutet, dass Jemeniten in Abessinien auf Arabica-Kaffee gestoßen waren und diesen bereits ab dem 12. Jahrhundert großflächig im Jemen anbauten. Ab dem 15. Jahrhundert verbreitete sich das Kaffeegetränk zunächst in der arabischen Welt. Mit der Expansion des osmanischen Reichs gelangte Kaffee dann erstmalig nach Südosteuropa. Vom 17. Jahrhundert an verbreiteten vor allem die europäischen Kolonialmächte, wie die Niederlande, Frankreich und Großbritannien, die Kaffeepflanze im Tropengürtel der Welt und kultivierten sie systematisch. Gleichzeitig stieg auch der Kaffeekonsum in Europa und Nordamerika stark an. Mit der Industrialisierung im 19. und 20. Jahrhundert wurden Anbau, Transport und Verarbeitung von Kaffee wesentlich einfacher und Kaffee wurde weltweit zu einem der wichtigsten Handelsgüter (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Laut International Coffee Organization (ICO) betrug die Weltproduktion an Rohkaffee im Jahr 2010 7,983 Millionen Tonnen, was rund 133 Millionen Säcken zu je 60 kg entspricht. Vergleichbar hohe Mengen wurden zuletzt 1999 (130 Millionen Säcke) und 2008 (rund 128 Millionen Säcke) produziert. In den letzten zehn Jahren blieb die Produktionsmenge zwar relativ stabil, verglichen mit den vorhergehenden Dekaden

nahm die Rohkaffeeproduktion im letzten Jahrzehnt aber deutlich zu. Die wichtigsten Kaffeeanbauländer liegen heute in Süd- und Mittelamerika sowie Afrika und Südostasien. Größter Produzent an Rohkaffee ist seit Jahrzehnten Brasilien (2010: 2,886 Millionen Tonnen, 36,1 % der Weltproduktion), gefolgt von Vietnam (1,110 Millionen Tonnen, 13,9 %) und Kolumbien (552000 Tonnen, 6,9 %). Zu den zehn größten Rohkaffeeproduzenten gehören außerdem Indonesien (510000 Tonnen, 6,4 %), Äthiopien (447000 Tonnen, 5,6 %), Indien (284000 Tonnen, 3,6 %), Mexiko (264000 Tonnen, 3,3 %), Guatemala (240000 Tonnen, 3,0 %), Honduras (230000 Tonnen, 2,9 %) und Peru (223000 Tonnen, 2,8 %; ICO, 2011).

Die drei größten Rohkaffeeproduktionsländer sind auch die größten Rohkaffeeexporteure. 2010 exportierten Brasilien 1,982 Millionen Tonnen, Vietnam 854000 Millionen Tonnen und Kolumbien 469000 Tonnen Rohkaffee. Bei den Importen liegen die USA (2010: 1,463 Millionen Tonnen) vor Deutschland (1,236 Millionen Tonnen) und Italien (494000 Tonnen). Die gesamte Europäische Union importierte 2010 4,174 Millionen Tonnen Rohkaffee. Den größten Rohkaffeeverbrauch haben die USA (2010: 1,307 Millionen Tonnen), gefolgt von Brasilien (1,148 Millionen Tonnen) und Deutschland (558000 Tonnen). In der Europäischen Union wurden 2010 2,44 Millionen Tonnen Rohkaffee konsumiert (ICO, 2011). Der Pro-Kopf-Verbrauch an Kaffeegetränken in Deutschland lag im Jahre 2010 bei 150 Litern (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

1.2.1 Botanik und Anbau

Die Kaffeepflanze zählt zur Pflanzenfamilie der Rubiaceae. Für die Kaffeeproduktion werden fast ausschließlich die beiden Arten *Coffea arabica*, auf die etwa 61 % der Welternte entfallen, sowie *Coffea canephora var. robusta*, deren Anteil bei etwa 39 % liegt, verwendet. Die Arten *Coffea Liberica* sowie *Coffea Excelsea* sind zwar botanisch mit den beiden erstgenannten Arten eng verwandt, haben jedoch kaum wirtschaftliche Bedeutung (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Kaffeepflanzen können bis zu vier Meter hoch wachsen, werden beim großflächigen Plantagenanbau aber strauchförmig zurechtgeschnitten. An den langen Zweigen sitzen länglich-ovale, immergrüne Blätter von etwa 8 bis 15 cm Länge. Die Pflanze besitzt eine

pfahlartige Wurzel, die bis zu 2,5 m in den Boden reicht. Die Blütezeit der Kaffeepflanzen erfolgt in der Regel nach den ersten Regenfällen zu Beginn der Regenzeit. Die fünfgliedrigen Blüten sind nur wenige Stunden befruchtungsfähig. Dabei ist *Coffea arabica* im Gegensatz zu *Coffea canephora* var. *robusta* nicht auf eine Fremdbestäubung durch Insekten oder Wind angewiesen. Die Früchte, die sogenannten Kaffeekirschen, entwickeln sich sieben bis neun Monate nach der Bestäubung. Ihre Farbe wechselt während der Reifephase von grün über gelb zu einem leuchtenden Rot, bei Überreife verfärben sie sich schwarz (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

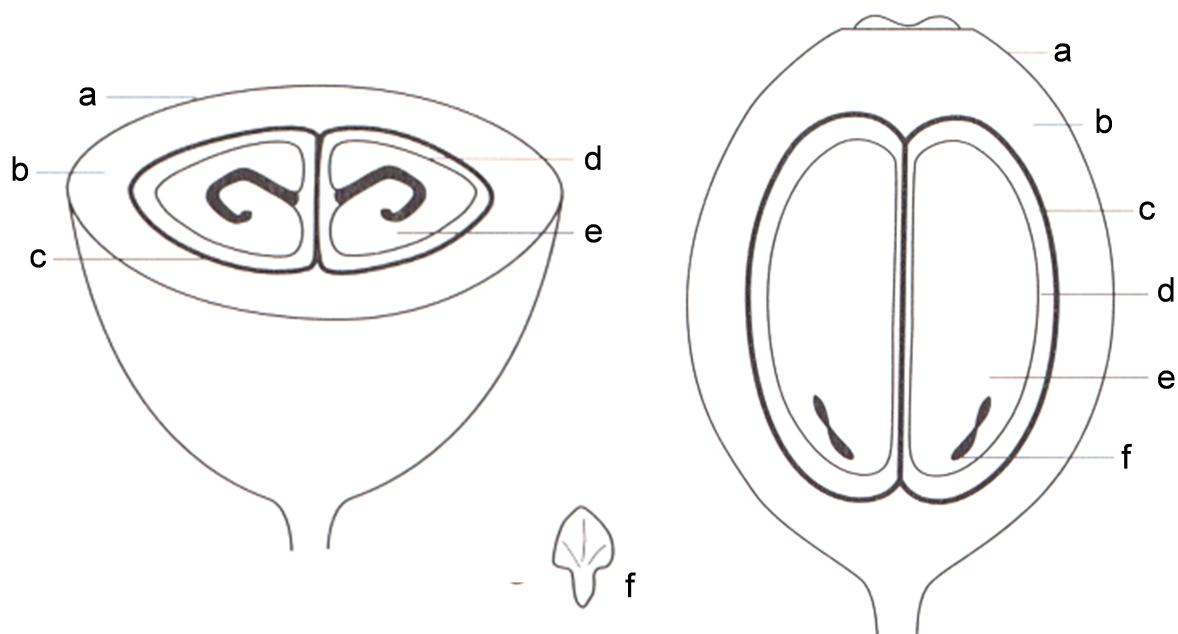


Abbildung 1.2 Transversaler und longitudinaler Querschnitt durch eine Kaffeekirsche: **a**: Epicarp (Haut); **b**: Mesocarp (Pulpe); **c**: Endocarp (Pergamenthaut); **d**: Testa (Silberhäutchen); **e**: Endosperm (Bohne); **f**: Keimling (nach Wintgens, 2004).

Unter der gelb-roten Haut der reifen Kaffeekirschen (Epicarp, **Abb. 1.2**) sitzt die Pulpe, ein weiches, weiß-gelbliches und zuckerhaltiges Fruchtfleisch (Mesocarp). Dieses umgibt die beiden Samen der Kaffeekirsche, die sogenannten Kaffeebohnen, die von einer locker aufsitzenden, dünnen und gelben Hülle, der Pergamenthaut (Endocarp), sowie von einer fest anhaftenden, dünnen Schale, dem sogenannten Silberhäutchen (Testa), geschützt werden. Die beiden Kaffeebohnen (Endosperm) sind mit den flachen Seiten, die eine charakteristische Furche besitzen, aneinander gepresst. An ihrem dem

Fruchstiel zugekehrten Ende sitzt der gekrümmte Keimling, für den die Kaffeebohne das Nährgewebe darstellt. Im frischen Zustand variiert die Farbe der Bohnen von gelblich-grau über grünlich bis blau-grau (Wintgens, 2004; Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Kaffeepflanzen stellen hohe Ansprüche an die klimatischen Begebenheiten, insbesondere an Temperatur, Niederschlagsmenge, Sonneneinstrahlung, Wind, Bodenbeschaffenheit und die Topographie des Landes. Der Anbau ist deshalb lediglich zwischen dem 22. nördlichen und dem 26. südlichen Breitengrad, dem sogenannten „Kaffeegürtel“, rund um den Äquator möglich (**Abb. 1.3**; Clarke und Macrae, 1985; Wintgens, 2004; Deutscher Kaffeeverband, 2011).



Abbildung 1.3 Anbau von Kaffee innerhalb des sogenannten „Kaffeegürtels“ (nach Clarke und Macrae, 1985).

Die beiden wirtschaftlich bedeutenden *Coffea*-Arten werden in flachen oder leicht hügeligen Landschaften mit tiefen und lockeren, gut durchlässigen Böden angebaut. Da ein Übermaß an Wind und Sonneneinstrahlung den Pflanzen schadet, stehen zwischen den Kaffeepflanzen oftmals Schattenbäume. *Coffea arabica* bevorzugt Höhenlagen von 600 bis 2100 m bei einer Luftfeuchtigkeit von etwa 60 %. Die optimale Umgebungstemperatur liegt bei 18 bis 22 °C. Temperaturen unter 4 °C und über 30 °C fügen den Pflanzen irreversible Schäden zu. Sie benötigen außerdem

Niederschlagsmengen von 1400 bis 2000 mm pro Jahr. *Coffea canephora var. robusta* bevorzugt tropischere Bedingungen als *Coffea arabica* und kann somit in einem weniger breiten Bereich um den Äquator angebaut werden. Sie verträgt bei einem Optimum zwischen 22 und 28 °C etwas höhere Temperaturen, ist jedoch deutlich empfindlicher gegen Kälte und benötigt mit 2000 bis 2500 mm pro Jahr mehr Niederschlag. Außerdem toleriert sie eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit und wächst in niedrigeren Lagen bis zu 900 m (Wintgens, 2004; Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Kaffeepflanzen, die die ersten Erträge drei bis vier Jahre nach der Pflanzung bringen, erreichen nach sechs bis acht Jahren ein Ertragsmaximum, das nach etwa 20 Jahren wieder abnimmt. Ein Kaffeebaum liefert etwa ein bis zwei Pfund Rohkaffee pro Jahr. Der Ertrag an Rohkaffee pro Hektar variiert je nach Anbauregion stark und liegt im weltweiten Durchschnitt bei etwa 680 kg/Hektar. Die Ernte der Kaffeekirschen erfolgt entweder manuell oder maschinell und findet je nach geografischer Lage ein- oder zweimal im Jahr statt. Das höchste Maß an Qualität wird hierbei durch das selektive, manuelle Pflücken ausschließlich reifer Früchte erreicht. Bei der maschinellen Ernte werden hingegen alle Kaffeekirschen eines Strauchs abgeerntet, unabhängig von ihrem jeweiligen Reifegrad (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

1.2.2 Rohkaffee

Die Weiterverarbeitung der gegebenenfalls vorsortierten Kaffeekirschen zur Gewinnung der von Haut, Fruchtfleisch, Pergamenthaut und möglichst auch dem Silberhäutchen befreiten Rohkaffeebohnen kann trocken oder nass erfolgen (**Abb. 1.4**). Eine Mischform dieser beiden Aufbereitungsarten stellt die halbtrockene Aufbereitung dar.

In Regionen, in denen das Klima warm und trocken ist und nicht genügend Wasser für eine nasse Aufbereitung zur Verfügung steht, werden die Kaffeekirschen trocken aufbereitet. Nach der zeitsparenden, maschinellen Ernte, bei der Früchte jedes Reifestadiums geerntet und zur Aufbereitung herangezogen werden, werden die Kaffeekirschen für drei bis fünf Wochen in der Sonne ausgebreitet und unter regelmäßigem Wenden getrocknet, wobei der Wassergehalt der Bohnen durch Verdampfung von anfangs 50 bis 60 % auf 10 bis 12 % reduziert wird. Nach einem Reinigungsschritt, bei dem Fremdkörper und Schmutz beseitigt werden, werden die

getrockneten Kaffeekirschen anschließend maschinell geschält, um die rohen Kaffeebohnen zu erhalten („ungewaschener“ Kaffee). Vorteile bei der trockenen Aufbereitung sind der geringe Wasser- und Energieverbrauch sowie die nicht notwendigen Investitionen in teure Maschinen. Nachteile stellen der große Flächenbedarf für die Trocknung, die lange Trocknungsdauer und die mindere Qualität durch Verwendung von Früchten jedes Reifestadiums dar. Des Weiteren bedarf die Trocknung der Kaffeekirschen größter Sorgfalt, um Fäulnis oder Überhitzung der Früchte zu vermeiden. Die trockene Aufbereitung wird für die meisten Robusta-Kaffees und einen Großteil der brasilianischen Arabicas angewandt (Clarke und Macrae, 1987; Selmar und Bytof, 2008; Deutscher Kaffeeverband, 2011).

In Anbauregionen, die aufgrund eines wechselhaften und feuchten Klimas oder wegen fehlender Platzkapazität nicht für eine trockene Aufbereitung geeignet sind, wird die nasse Aufbereitungsmethode angewandt. Hierfür werden nur reife Kaffeekirschen verwendet. Die sogenannten „Floater-Kirschen“, die überreif oder befallen sind und deshalb aufgrund ihrer geringeren Dichte obenauf schwimmen, sowie Schmutz und Steine werden im Schwemmkanal aussortiert. Die reifen Kirschen werden anschließend von Hand oder mechanisch im sogenannten Pulper weitgehend vom Fruchtfleisch befreit. Die an den entpulpten Bohnen noch anhaftende Schleimschicht (Mucus) wird durch einen 12- bis 36-stündigen Gärungsprozess in einem Fermentationsbecken verflüssigt. Nach der Fermentation werden Reste der Schleimschicht unter hohem Wasserverbrauch abgewaschen („gewaschener“ Kaffee). Eine wassersparende Alternative stellt die fermentationsfreie, mechanische Entschleimung dar, die jedoch einen höheren Energieverbrauch mit sich bringt. Im Gegensatz zur trockenen Aufbereitung werden letztlich nur Kaffeebohnen, bei denen der Großteil ihrer Umhüllung bereits entfernt wurde, zur Trocknung eingesetzt. Diese erfolgt auf Trockenplätzen (10 bis 15 Tage) oder maschinell mit Heißluft (2 bis 7 Tage). Für die maschinelle Trocknung kommen statische und vertikale Trockner sowie vor allem rotierende Trommeltrockner zum Einsatz. Die nass aufbereiteten Kaffeebohnen werden hier ebenfalls auf eine Restfeuchte von 10 bis 12 % getrocknet. Sie sind anschließend noch von der Pergamenthaut umgeben und werden daher als „Pergamentkaffee“ bezeichnet. Zur Entfernung der Pergamenthülle müssen die Bohnen nach einem Reinigungsschritt ebenfalls noch geschält werden. Die nasse Aufbereitung wird für milde Arabica-Kaffees, insbesondere in Zentral- und Lateinamerika, angewandt und führt zu Kaffees hoher

Qualität (Clarke und Macrae, 1987; Selmar und Bytof, 2008; Deutscher Kaffeeverband, 2011).

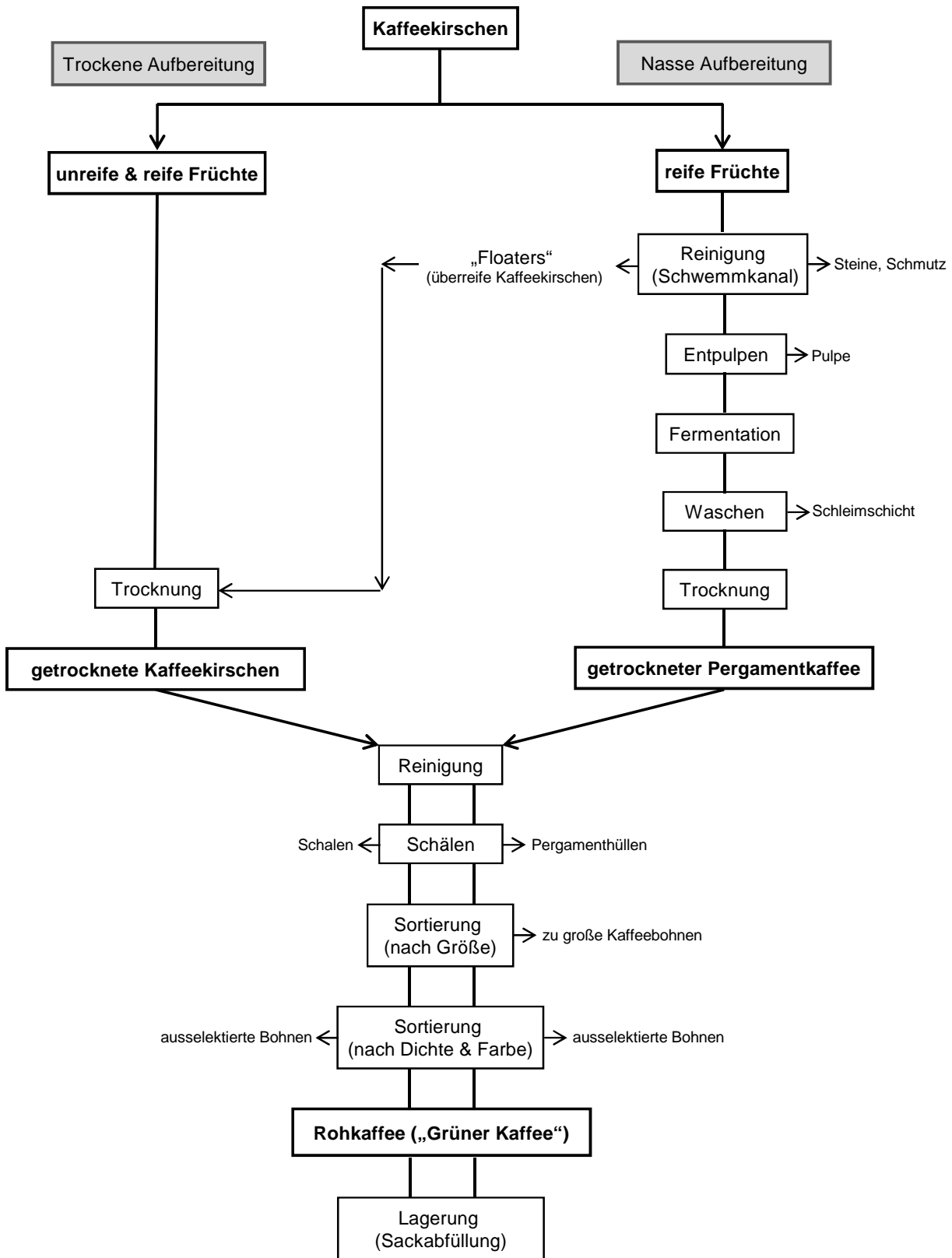


Abbildung 1.4 Schema der Kaffeeaufbereitung (nach Clarke und Macrae, 1987).

Bei der halbtrockenen Aufbereitung werden die entpulpten Bohnen nicht fermentiert, sondern zusammen mit den anhaftenden Fruchtfleischresten in der Sonne getrocknet und anschließend geschält. Im Vergleich zur nassen Aufbereitung ist diese Methode zwar zeitaufwändiger, aber wassersparender (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Da geerntete Kaffeebohnen lebende Samen darstellen, die in der Lage sind, Stoffwechsel zu betreiben, beeinflusst die Nacherntebehandlung des Rohkaffees dessen Zusammensetzung, indem die verschiedenen Prozessschritte unterschiedliche Reaktionen in den Kaffeesamen hervorrufen (Bytof et al., 2000). Durch die rasche Entfernung des Fruchtfleisches bei der nassen Kaffeeaufbereitung setzt die Keimungsaktivität der Samen wesentlich schneller ein, als dies bei der trockenen Aufbereitung der Fall ist. Dieser Vorgang wird beispielsweise mit der Expression des keimungsspezifischen Enzyms Isocitratlyase oder der Akkumulation von β -Tubulin, das als Indikator der Zellteilung fungiert, korreliert (Selmar et al., 2006). Der bei der Reduzierung des Wassergehalts der Bohnen einsetzende Trockenstress wird durch die Akkumulation stressspezifischer Komponenten wie γ -Aminobutansäure (GABA) angezeigt. Die GABA-Gehalte liegen in Kaffees trockener Aufbereitung deutlich höher als in Kaffees nasser Aufbereitung (Bytof et al., 2005). Der Gesamtgehalt der proteinogenen Aminosäuren ist dagegen in nass aufbereiteten Rohkaffees höher (Selmar et al., 2002). Während der Saccharose-Gehalt durch die Art der Aufbereitung kaum beeinflusst wird, hat die nasse Aufbereitung niedrigere Konzentrationen an Fructose und Glucose zur Folge (Knopp et al., 2006). Da kleine Moleküle wie freie Aminosäuren oder Monosaccharide als Vorläufer zahlreicher Kaffeearomastoffe dienen können, stellen unterschiedliche Aufbereitungsmethoden somit eine mögliche Ursache für Qualitätsunterschiede verschieden aufbereiteter Kaffees dar (Selmar et al., 2002). Bei der Untersuchung unterschiedlicher Trocknungsmethoden für nass aufbereitete Rohkaffees, die kontinuierlich oder mit Unterbrechungen getrocknet wurden (**Kap. 5.1.1**), zeigte die Akkumulation von GABA und die Expression stressspezifischer Dehydrine zwar abweichende Verlaufsformen, wies aber letztlich keine signifikanten Unterschiede auf (Kramer et al., 2010). Gleiches galt für die Gehalte an Mono- und Disacchariden (Kleinwächter und Selmar, 2010).

Nach dem Reinigen und Schälen werden die Rohkaffeebohnen nach Größe, Dichte und Farbe sortiert, gelagert oder direkt abgefüllt und meist mit dem Schiff versandt (Clarke

und Macrae, 1987; Deutscher Kaffeeverband, 2011). Selmar et al. (2008) zeigten, dass getrocknete Rohkaffeebohnen während der Lagerung ihre Stoffwechselaktivität einstellen und absterben. Der Einfluss der Lagerung auf das Aromaprofil von Rohkaffee und seiner Verarbeitungsprodukte wurde von Scheidig et al. (2007) und Scheidig (2009) untersucht (**Kap. 1.4.1**).

Getrockneter Rohkaffee besteht durchschnittlich aus knapp 50 % Ballaststoffen, 13 % Fett, 11 % Proteinen, 10 % Wasser, 6,7 % verwertbaren Kohlenhydraten, 4 % Mineralstoffen sowie Alkaloiden wie Coffein und Aromastoffen (Souci et al., 2008). Die Zusammensetzung hängt jedoch von Sorte, Herkunft, klimatischen Verhältnissen und Gewinnung ab und kann entsprechend variieren (Belitz et al., 2001).

1.2.3 Röstkaffee und Kaffeegetränke

Um aus Rohkaffee für den Konsum geeignete Kaffeegetränke herstellen zu können, werden die Rohkaffeebohnen geröstet, die Röstkaffeebohnen gemahlen und schließlich mit heißem Wasser oder Wasserdampf extrahiert.

Das Rösten von Kaffee ist ein zeit- und temperaturabhängiger Prozess und induziert in den Kaffeebohnen weitreichende chemische und physikalische Veränderungen. Dabei entwickelt sich das charakteristische Aroma von Röstkaffee. Die Rohkaffeebohnen werden trocken und fettfrei unter Normaldruck geröstet. Die Röstung erfolgt dabei chargenweise oder kontinuierlich, üblicherweise in horizontalen Trommelröstern. Neben der gebräuchlichen Konvektionsröstung mittels heißer Luft ist auch eine Kontaktröstung an heißen Oberflächen möglich (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Zu Beginn der Röstung wird der Wassergehalt der Bohnen von etwa 12 % auf 2 bis 3 % reduziert, wodurch die Temperatur im Röster zunächst absinkt. Nach dem Verdampfen des Wassers steigt die Temperatur je nach Röstbedingungen auf bis zu 250 °C an. Durch die oberhalb von 100 °C einsetzende Bräunung verändert sich die Farbe der Bohnen von hellgrün über gelb und hellbraun zu braun und dunkelbraun. Je nach Röststadium laufen dabei verschiedene chemische Primär- und Sekundärreaktionen wie die Maillard-Reaktion oder der Strecker-Abbau, der Abbau von Phenolsäuren oder auch Zersetzungsreaktionen ab. Das verdampfende Wasser sowie die bei den

chemischen Reaktionen freigesetzten Gase, z.B. Kohlenstoffdioxid, führen zu einer Volumenzunahme der Bohnen und einem Druckaufbau, der mit fortschreitendem Röstprozess letztlich zu einem Aufplatzen der Furche führt („crack“). Je nach Länge des Röstvorgangs treten außerdem Kaffeeöle an die Oberfläche der Bohnen (Clarke und Macrae, 1985; Belitz et al., 2001; Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Die Röstdauer variiert je nach gewünschtem Röstgrad zwischen 1,5 und 10 Minuten bei Rösttemperaturen von 200 bis 250 °C. Nach der Röstung werden die Bohnen im Luftstrom oder mit Hilfe von Wasser rasch abgekühlt, um ein Nachrösten zu verhindern. Der Gewichtsverlust der Bohnen während der Röstung, der sogenannte Einbrand, beträgt je nach anfänglichem Wassergehalt der Bohnen und abhängig von den Röstbedingungen zwischen 11 und 20 % und stellt neben der Farbe der Bohnen einen wichtigen Anhaltspunkt zur Ermittlung des Röstgrads dar. Die langsame Freisetzung der bei der Röstung gebildeten Gase hält noch Stunden nach der Röstung an und kann bis zu zwei Monate andauern (Clarke und Macrae, 1987; Belitz et al., 2001; Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Um gleich bleibende Qualität und einen markentypischen Geschmack trotz natürlich auftretender Schwankungen zu garantieren, wird Handelsware in der Regel durch einen Verschnitt von vier bis acht Kaffees unterschiedlicher Provenienzen vor oder nach der Röstung hergestellt. Die Röstkaffees kommen in der Regel luftdicht verpackt als ganze Bohnen oder auch in gemahlener Form in den Handel. Insbesondere für intakte Bohnen werden bevorzugt Ventilpackungen verwendet, bei denen ein Entweichen des aus den Kaffeebohnen diffundierenden Kohlenstoffdioxids möglich ist, die jedoch gleichzeitig den Zutritt von Luft verhindern (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Geröstete Kaffeebohnen setzen sich durchschnittlich aus etwa 58 % Ballaststoffen, 13 % Fett, 14 % Proteinen, 3 % Wasser, 4 % Mineralstoffen, 1,5 % verwertbaren Kohlenhydraten sowie Coffein und Aromastoffen zusammen (Souci et al., 2008). Die Aromastoffzusammensetzung eines Röstkaffees hängt entscheidend von den im Rohkaffee vorhandenen Vorläufern und somit von der Herkunft und Qualität des Rohkaffees ab (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Kaffeegetränke werden durch Extraktion von gemahlenem Röstkaffee mit heißem Wasser oder Wasserdampf hergestellt. Qualität und Konzentration der Getränke werden dabei neben der Sorte des verwendeten Röstkaffees durch verschiedene Faktoren, z.B. dem Mahlgrad des Kaffees, der Wasserqualität, der Dosierung des Kaffeepulvers, der Extraktionstemperatur und -dauer oder dem Zubereitungsverfahren beeinflusst. Zu den bekanntesten Kaffeegetränken zählen der Filterkaffee, bei dem das Kaffeepulver manuell oder mit einer Filterkaffeemaschine überbrüht wird, der türkische Kaffee (Mokka), bei dem Kaffeepulver und Wasser zusammen aufgeköcht werden, und der Espresso, bei dem Wasserdampf unter Druck durch das Kaffeepulver strömt und anschließend wieder kondensiert. Auch die Zubereitung mit einer Stempelkanne, bei der Kaffeepulver mit kochendem Wasser übergossen und nach einer bestimmten Standzeit abgepresst wird, ist ein gebräuchliches Verfahren. In jüngster Zeit haben Halb- und Vollautomaten sowie Kaffeemaschinen, die mit Pads und Kapseln betrieben werden, an Bedeutung gewonnen. Neben den mittels klassischer Extraktionsverfahren hergestellten Getränken kann ein Kaffeegetränk auch durch einfaches Auflösen eines Instantkaffeepulvers, das industriell durch Trocknung eines Kaffeeextrakts gewonnen wird, in heißem Wasser hergestellt werden (Deutscher Kaffeeverband, 2011).

Ein typisches Kaffeegetränk setzt sich aus 29 % unbekanntem Substanzen, 24 % Polysacchariden, 15 % Chlorogensäuren, 14 % Mineralstoffen, 6 % Proteinen, 4,8 % Coffein und in geringen Mengen aus diversen Säuren, Kohlenhydraten und anderen Bestandteilen zusammen. Flüchtige Aromastoffe haben einen durchschnittlichen Anteil von 0,4 % und bedingen durch ihre unterschiedlich gute Löslichkeit in Wasser und Wasserdampf die sensorisch wahrnehmbaren Unterschiede zwischen Kaffeepulver und daraus hergestelltem Kaffeegetränk (Belitz et al., 2001).

1.3 Flüchtige Verbindungen und Aromastoffe in Kaffee

Rohkaffee, Röstkaffee sowie Kaffeegetränke sind anhand ihrer charakteristischen Aromaprofile deutlich voneinander zu unterscheiden. Von den zahlreichen, bereits in grünen Kaffeebohnen vorhandenen flüchtigen Inhaltsstoffen trägt nur ein geringer Anteil zum Geruchseindruck des Rohkaffees bei. Durch den Röstprozess steigt aber die Anzahl an flüchtigen Verbindungen in Röstkaffee im Vergleich zum Rohkaffee deutlich an. Die flüchtigen Inhaltsstoffe des Röstkaffees stellen ein komplexes Gemisch aus aromaaktiven und nicht-aromaaktiven Verbindungen dar. Bhumiratana et al. (2011) beschrieben den Geruch von Rohkaffeebohnen als vorwiegend bohnenartig, muffig, erdig, grün und sauer. Anhand dieser Geruchsattribute grenzten sie Rohkaffee signifikant von gerösteten Kaffeeprodukten ab. In intakten Röstkaffeebohnen sowie in gemahlenem Röstkaffee nimmt die kaffeeartige, röstige, verbrannte, beißende, saure und stechende Geruchsnote mit steigendem Röstgrad zu, während die nussige, kakaoartige und süße Geruchsnote, die bei leicht gerösteten Kaffees deutlich wahrnehmbar ist, in den Hintergrund tritt. Das Aroma von gemahlenem Röstkaffee wird generell intensiver empfunden als das der intakten Bohnen. Kaffeegetränke werden deutlich weniger kaffeeartig, röstig, verbrannt und stechend, aber bohnenartiger als Röstkaffeebohnen und -pulver wahrgenommen.

1.3.1 Flüchtige Verbindungen und Aromastoffe in Rohkaffee

Die ersten Identifizierungen flüchtiger Inhaltsstoffe von Rohkaffee erfolgten im Zuge von Studien, die Rohkaffees und daraus erhaltene Röstkaffees im Hinblick auf darin enthaltene flüchtige Verbindungen verglichen. So beschrieb Rhoades (1960) erstmals 16 flüchtige Inhaltsstoffe in Rohkaffee verschiedener Herkunft, u. a. Methanthiol, Ethanal, Dimethylsulfid, Propanal, Methylpropanal, Aceton, 3-Methylbutanal, Methanol, Diacetyl und Ethanol. Merritt et al. (1970) identifizierten zahlreiche weitere Substanzen mehrerer Verbindungsklassen, darunter mehrere Kohlenwasserstoffe, Aldehyde wie 2-Methylbutanal, Ketone, mehrere Ester, Schwefelkomponenten sowie aromatische und heterocyclische Substanzen.

Vitzthum et al. (1976) beschäftigten sich ausführlich mit den flüchtigen Verbindungen von kolumbianischem Rohkaffee. Sie führten eine Wasserdampfdestillation durch und

extrahierten das Destillat mit Diethylether. Dadurch konnten sie 54 flüchtige Substanzen erstmals in Rohkaffee identifizieren, darunter 2-Furancarbaldehyd, 2-Furanmethanol und vier Methoxypyrazine, u. a. 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin und 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin. Mittels Kapillargaschromatographie-Olfaktometrie (HRGC-O) ermittelten sie die Geruchsqualität dieser beiden Verbindungen und schrieben ihnen einen Beitrag zum Geruch des Rohkaffees zu. Damit wurden erstmals bei der Analyse von Rohkaffee instrumentelle und sensorische Analysemethoden verknüpft. Außerdem zogen die Autoren den Schluss, dass die Pyrazine biosynthetisch durch die Kaffeepflanze gebildet werden müssten. Becker et al. (1988) machten einen etwa zehnfach erhöhten Gehalt an 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin in rohen Kaffees für das Auftreten eines erbsigen („peasy“) Fehlaromas in daraus gewonnenen Röstkaffees verantwortlich. Für 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin stellten sie keine Konzentrationsunterschiede zwischen Kaffees mit bzw. ohne Fehlaroma fest.

Mittels Headspaceanalysen fanden Gutmann et al. (1979) 80 weitere flüchtige Verbindungen erstmals in Rohkaffee. Außerdem konnten sie deutliche Unterschiede zwischen den Flammenionisations-Detektions(FID)-Chromatogrammen der Arten Arabica (Kolumbien), Robusta und Arabusta (beide Elfenbeinküste) aufzeigen. Auch bei den quantitativen Gehalten ausgewählter Inhaltsstoffe stellten sie Unterschiede fest.

Spadone und Liardon (1988) verglichen die über simultane Destillation-Extraktion (SDE) erhaltenen Extrakte mehrerer südamerikanischer Rohkaffees, von denen einige das typische, sogenannte „Rio off-flavour“ aufwiesen, mittels HRGC-O und HRGC-FID. Dabei stellten sie fest, dass das schimmelig, phenolisch riechende 2,4,6-Trichlormethoxybenzol (Trichloranisol) eine Schlüsselkomponente der Rohkaffees mit Fehlaroma darstellte und dass dieser Aromastoff auch nach der Röstung noch im Röstkaffee wahrnehmbar war. In den Bohnen, die das Fehlaroma aufwiesen, waren bis zu 106 µg Trichloranisol pro Kilogramm Rohkaffee bzw. bis zu 61 µg pro Kilogramm Röstkaffee enthalten. In den Vergleichsproben war der Aromastoff nicht nachweisbar oder nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Als einen möglichen Vorläufer schlugen Spadone et al. (1990) 2,4,6-Trichlorphenol vor, das sowohl biosynthetisch von Mikroorganismen, als auch durch eine chemische Kontamination gebildet werden könnte. Holscher et al. (1995) konnten bei einer Untersuchung an kenianischem Kaffee

nachweisen, dass 2,4,6-Trichlorphenol aus dem dort verwendeten Fungizid Prochloraz generiert wurde und dieses die Ursache für das Auftreten von Trichloranisol war.

Unter Anwendung schonender Extraktionsmethoden konnten Holscher und Steinhart (1995) 14 weitere Substanzen, hauptsächlich Carbonylverbindungen, erstmalig in einem kolumbianischen Rohkaffee nachweisen. Mittels HRGC-O-Analyse differenzierten sie außerdem zwischen aromaaktiven und nicht-aromaaktiven flüchtigen Inhaltsstoffen eines Rohkaffeeextrakts und stellten fest, dass lediglich 18 Substanzen eine Geruchsaktivität aufwiesen: Hexanal, 1-Octen-3-on, Nonanal, 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin, 3-(Methylthio)propanal, (*Z*)-2-Nonenal, 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin, (*E*)-2-Nonenal, Linalool, (*E,Z*)-2,6-Nonadienal, Phenylethanal, 2,4-Nonadienal-Isomer, 2- und 3-Methylbutansäure, (*E,E*)-2,4-Nonadienal, (*E,Z*)-2,4-Decadienal, (*E,E*)-2,4-Decadienal und (*E*)- β -Damascenon. Diesen ordneten sie Geruchsqualitäten und Geruchsintensitäten zu und bestimmten deren Gehalte sowie die Gehalte von neun weiteren Verbindungen mit Hilfe eines internen Standards und Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS).

Die erste Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) eines mittels SAFE gewonnenen Extrakts eines kolumbianischen Arabica-Rohkaffees führten Czerny und Grosch (2000) durch. Dabei identifizierten sie 18 Verbindungen, die einen Flavour-Dilution(FD)-Faktor ≥ 16 aufwiesen (**Tab. 1.1**). Zwölf dieser Substanzen wurden mit Hilfe der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) und HRGC-MS quantifiziert und deren Aromawerte anhand ihrer Geruchsschwellenwerte in Cellulose berechnet. Dabei wurde ersichtlich, dass 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin den höchsten Aromawert von 490 aufwies. Daraus folgerten die Autoren, dass diese Verbindung entscheidend zum Aroma des Rohkaffees beitrug. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Spadone und Liardon, 1988; Holscher und Steinhart, 1995) wurde die Bedeutung von (*E*)-2-Nonenal, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol und (*E*)- β -Damascenon, die lediglich in Konzentrationen unter oder knapp über ihrem Geruchsschwellenwert vorlagen, nicht bestätigt.

Tabelle 1.1 Wichtige Aromastoffe (Flavour-Dilution(FD)-Faktor ≥ 16) im Lösungsmittel-extrakt eines kolumbianischen Arabica-Rohkaffees nach Czerny und Grosch (2000).

Aromastoff	Geruchsqualität	FD-Faktor
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	nach Erbse	4096
2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazin	erdig	512
Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig	256
Ethyl-3-methylbutanoat	fruchtig	256
3-Isopropyl-2-methoxypyrazin	nach Erbse	128
(<i>E</i>)-2-Nonenal	fettig, nach Karton	128
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	nach Vanille	128
3-(Methylthio)propanal	nach gekochter Kartoffel	64
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(<i>5H</i>)-furanon	würzig	64
(<i>Z</i>)-2-Nonenal	fettig, nach Karton	64
4-Ethyl-2-methoxyphenol	süß	64
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	nach Nelke	64
2-/3-Methylbutansäure	schweißig	32
Hexanal	grün	16
Butansäure	schweißig	16
Pentansäure	schweißig	16
1-Octen-3-on	nach Pilz	16
Linalool	süß	16

Auch Cantergiani et al. (2001) konnten beim Vergleich der mittels Wasserdampfdestillation und Lösungsmittel-extraktion erhaltenen Extrakte zweier mexikanischer Rohkaffees, von denen einer ein erdiges und schimmliges Fehl aroma aufwies, zahlreiche Substanzen charakterisieren, darunter vier erstmals in Rohkaffee beschriebene Verbindungen. Mittels HRGC-O stellten sie außerdem fest, dass in den fehlerhaften Bohnen Geosmin, 2,4,6-Trichlormethoxyphenol, 2-Methylisoborneol und die drei Pyrazine 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin, 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin und 3-sec-Butyl-2-methoxypyrazin eine deutlich höhere Geruchsintensität aufwiesen. Die anschließende Quantifizierung dieser Substanzen bestätigte, dass insbesondere Geosmin, 2,4,6-Trichlormethoxyphenol und 2-Methylisoborneol in deutlich höheren Konzentrationen vorlagen und für das erdig-schimmlige Fehl aroma verantwortlich waren. Eine mögliche Ursache sahen sie in der trockenen Aufbereitung (**Kap. 1.4.1**) und der damit einhergehenden höheren mikrobiellen Belastung des Rohkaffees.

Im Rahmen einer Untersuchung zum Einfluss der Lagerung von Rohkaffee auf dessen Aromastoffe (**Kap. 1.4.1**) identifizierten Scheidig et al. (2007) die Aromastoffe 2-Methyl-3-(methyldithio)furan, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon und 3-Methoxyphenol erstmalig in Rohkaffee.

Mahattanatawee et al. (2007) fokussierten sich bei ihren Arbeiten mit thailändischem Arabica-Kaffee auf das Auftreten von aromaaktiven Schwefelverbindungen in Abhängigkeit vom Röstgrad des Kaffees. Nach Headspace-Solid Phase Microextraction (HS/SPME) konnten sie mittels HRGC-O in Rohkaffee elf Schwefelkomponenten eine Aromaaktivität zuschreiben.

1.3.2 Flüchtige Verbindungen und Aromastoffe in Röstkaffee

Das Aroma von Röstkaffee gehört zu den am besten untersuchten Lebensmittelaromen und wird bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts intensiv erforscht. Erste Untersuchungen wurden von Lampadius (1832) durchgeführt, der in der flüchtigen Fraktion von stark übröstetem Kaffee Ethansäure und Ammoniak nachwies. In weiteren Arbeiten wurden in den folgenden Jahrzehnten Aceton, 2-Furanmethanol, Methansäure, Methylamin, Methylbutansäure, Pyrrol und Trimethylamin als flüchtige Röstkaffeinhaltsstoffe identifiziert (Bernheimer, 1880; Jaeckle, 1898; Erdmann, 1902).

Die ersten systematischen Anstrengungen, die Zusammensetzung der flüchtigen Substanzen des Röstkaffees zu entschlüsseln, begannen mit den Arbeiten von Reichstein und Staudinger in den Jahren 1920 bis 1930. Nach Wasserdampfdestillation konnten die Autoren durch Derivatisierungen und chemische Analysen mehr als 70 Verbindungen in Kaffeeöl identifizieren, darunter erstmalig Schwefelwasserstoff, Methanthiol, 2-Furanmethanthiol, Dimethylsulfid, 2-Furancarbaldehyd, Diacetyl, 2,3-Pentandion, 2-Methoxyphenol, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol, Pyridin, Pyrazin und N-Methylpyrrol. Als eine der wichtigsten Komponenten des Röstkaffeearomas sahen sie dabei 2-Furanmethanthiol an, das in verdünnter wässriger Lösung als einzige dieser Substanzen an den Geruch von Kaffee erinnerte (Reichstein und Staudinger, 1926, 1928, 1950, 1955). Johnston und Fey (1938) wiesen in ihren Untersuchungen, bei denen sie eine schonendere Isolierung der flüchtigen Substanzen mittels Hochvakuumdestillation in inerter Atmosphäre durchführten, ebenfalls mehrere der von

Reichstein und Staudinger gefundenen Kaffeeinhaltsstoffe nach. Sie konnten außerdem erstmals 3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin) identifizieren. Prescott et al. (1937) bestätigten die Ergebnisse der vorher genannten Arbeitsgruppen.

Die Entwicklung von Analysetechniken wie Gaschromatographie, Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie ermöglichte es schließlich, dass die Anzahl der identifizierten flüchtigen Inhaltsstoffe von Röstkaffee rasch anstieg. Nach aktuellem Stand sind 834 flüchtige Verbindungen in Röstkaffee bekannt (Nijissen et al., 2010), die in die in **Tabelle 1.2** gezeigten Verbindungsklassen eingeteilt werden können.

Tabelle 1.2 In Röstkaffee identifizierte flüchtige Verbindungen, geordnet nach Substanzklassen (Nijissen et al., 2010).

Substanzklasse	Anzahl der identifizierten Verbindungen
Furane	127
Schwefelverbindungen	100
Pyrazine	87
Ketone	85
Kohlenwasserstoffe	80
Pyrrrole	72
Phenole	49
Aldehyde	37
Weitere basische Verbindungen	37
Oxazole und Oxazoline	35
Ester	33
Säuren	28
Alkohole	24
Pyridine	19
Sonstige Verbindungen	21

Zur Identifizierung dieser Substanzen trugen u. a. die Arbeiten von Rhoades (1958, 1960), Zlatkis und Sivetz (1960), Merritt et al. (1963), Gianturco und Friedel (1963), Gianturco et al. (1963, 1964a, 1964b, 1966), Bondarovich et al. (1967), Gautschi et al. (1967), Goldman et al. (1967), Stoll et al. (1967) und Stoffelsma et al. (1968) ebenso wie die Untersuchungen von Friedel et al. (1971), Parliment et al. (1973), Vitzthum und Werkhoff (1974 a, 1974 b, 1975, 1976), Tressl et al. (1978 a, 1978 b, 1981) sowie

Tressl und Silwar (1981) bei. Zusammenfassungen dieser Arbeiten wurden u. a. von Flament (1983, 1991) und Clarke und Macrae (1985) erarbeitet.

Quantitative Bestimmungen der flüchtigen Komponenten mit Hilfe eines internen Standards wurden u. a. in den Arbeiten von Rhoades (1958, 1960) Tressl et al. (1978 a, 1978 b, 1981), Radtke-Granzer und Piringner (1981), Tressl und Silwar (1981), Silwar et al. (1986, 1987) sowie Tressl (1989) vorgenommen. Silwar et al. (1987) gaben den Gesamtgehalt der flüchtigen Verbindungen in Röstkaffee mit 700 bis 800 mg/kg an.

Die Aufklärung der zwischen Arabica- und Robusta-Röstkaffees wahrnehmbaren sensorischen Unterschiede hatten mehrere Arbeitsgruppen zum Ziel. Gutmann et al. (1979) verglichen die mit einem schwefelselektiven, flammenphotometrischen Detektor aufgenommenen Gaschromatogramme verschiedener Kaffeeproben und stellten dabei fest, dass in Robusta-Röstkaffees eine höhere Anzahl an Schwefelverbindungen detektierbar war. Nurok et al. (1978) konnten mit der gleichen Methode eine höhere Intensität der schwefelhaltigen Substanzen in Robusta-Kaffees nachweisen. Tressl und Silwar (1981) sowie Silwar et al. (1986) stellten jedoch keine eindeutige Tendenz bezüglich der Gehalte an Schwefelkomponenten zwischen Arabica- und Robusta-Kaffee fest. Die Konzentration an 2-Furanmethanthiol lag jedoch bei allen Untersuchungen in Robusta-Kaffees höher. Des Weiteren konnten Tressl et al. (1978 a, 1978 b, 1981) zeigen, dass Robusta-Kaffees höhere Gehalte an 3-Hydroxy-2-methyl-4-pyranon (Maltol), N-Alkylpyrrolen, phenolischen und diphenolischen Verbindungen sowie geringere Mengen an Hydroxyfuranonen und N-Furfurylpyrrolen als Arabica-Kaffees enthielten.

In den zahlreichen, bis dato veröffentlichten Arbeiten über die flüchtigen Inhaltsstoffe von Röstkaffee wurde jedoch nicht auf die Aromarelevanz dieser Verbindungen eingegangen. Holscher et al. (1990) waren die ersten, die sich mit dem Aromabeitrag der flüchtigen Röstkaffeeinhaltsstoffe beschäftigten. Zu ihrer Isolierung aus kolumbianischem Röstkaffee wandten sie eine schonende Hochvakuumdestillation an und konnten mittels HRGC-O und HRGC-FID 61 aromaaktive Bereiche ermitteln. Dabei gelang ihnen die erstmalige Identifizierung von 1-Octen-3-on, (*Z*)-2-Nonenal, (*E,Z*)-2,6-Nonadienal, (*E,E*)-2,4-Nonadienal, (*E,E*)-2,4-Decadienal, 2-Methyl-3-furanthiol, 3-Methyl-2-buten-1-thiol, 3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol und 3-Methyl-

3-sulfanylbutylmethanoat in Röstkaffee. Mittels einer Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) schrieben die Autoren den Verbindungen 2-Methyl-3-furanthiol, 2-Furanmethanthiol, 3-(Methylthio)propanal, 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat, 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin, 2-Methylbutansäure, (*E*)- β -Damascenon und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, die auch bei einer 500-fachen Verdünnung des Extrakts mittels HRGC-O noch wahrgenommen werden konnten, den größten Beitrag zum Aroma des Röstkaffees zu. Bei ihren Untersuchungen detektierten sie allerdings zahlreiche aromaaktive Substanzen, die sie nicht identifizieren konnten.

Um die Relevanz niedrig siedender Substanzen für das Aroma von Röstkaffee beurteilen zu können, untersuchten Holscher und Steinhart (1992) außerdem statische Headspaceproben von kolumbianischem Röstkaffee mittels HRGC-O und HRGC-FID. Dabei wurden 16 aromaaktive Bereiche wahrgenommen. Bei der anschließenden Headspaceverdünnungsanalyse (HVA) waren Methanthiol und Methylpropanal noch in der höchsten Verdünnungsstufe (FD 25) sowie Diacetyl, 3-Methylbutanal, 2,3-Pentandion und 2-Furanmethanthiol in der zweithöchsten Verdünnungsstufe detektierbar.

Auch Blank et al. (1992 a, 1992 b) führten mit einem mittels Hochvakuumdestillation gewonnenen Aromaextrakt von kolumbianischem Röstkaffee eine Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) durch und konnten 38 aromaaktive Bereiche mit einem FD-Faktor ≥ 16 wahrnehmen. Dabei gelang ihnen die Identifizierung von 32 Aromastoffen (**Tab. 1.3**). Diejenigen Verbindungen, die mit hohen FD-Faktoren von ≥ 128 wahrnehmbar waren, wurden bis auf 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon und 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5*H*)-furanon bereits von Holscher et al. (1990) als aromaaktive Substanzen in Röstkaffeepulver identifiziert. Je eine fruchtig, eine röstig, schweflig, eine karamellartig und eine nach Amin riechende Verbindung sowie zwei röstig, erdig riechende Substanzen, teilweise mit hohen FD-Faktoren, konnten nicht identifiziert werden.

Tabelle 1.3 Wichtige Aromastoffe (Flavour-Dilution(FD)-Faktor ≥ 16) in einem kolumbianischen Arabica-Röstkaffeepulver nach Blank et al. (1992 a).

Aromastoff	Geruchsqualität	FD-Faktor
3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat	nach Katzenurin	2048
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	erdig, röstig	2048
(<i>E</i>)- β -Damascenon	nach Honig, fruchtig	2048
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	erdig, röstig	512
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	erdig	512
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(<i>5H</i>)-furanon	nach Würzmittel	512
5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(<i>5H</i>)-furanon	nach Würzmittel	512
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	scharf, würzig	512
2-Furanmethanthiol	nach Kaffee	256
4-Ethyl-2-methoxyphenol	scharf, würzig	256
2-Methyl-3-furanthiol	nach gekochtem Fleisch	128
3-(Methylthio)propanal	nach gekochter Kartoffel	128
3-Isopropyl-2-methoxypyrazin	erdig, röstig	128
2-/3-Methylbutansäure	schweißig	64
Trimethylpyrazin	röstig, erdig	64
Phenylethanal	nach Honig	64
2-Hydroxy-3,4-dimethyl-2-cyclopenten-1-on	nach Karamell	64
(<i>E</i>)-2-Nonenal	fettig	64
2,3-Pentandion	nach Butter	32
3-Methyl-2-buten-1-thiol	nach Amin	32
3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol	nach Fleischbrühe	32
5-Ethyl-2,4-dimethylthiazol	erdig, röstig	32
Linalool	blumig	32
2-Methoxyphenol	phenolisch, verbrannt	32
5-Methyl-5(<i>H</i>)-cyclopenta[b]pyrazin	röstig, süß	32
4-Methoxybenzaldehyd	süß, nach Minze	32
Bis(2-methyl-3-furyl)disulfid	fleischig, süß	32
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	nach Vanille	32
Diacetyl	nach Butter	16
3-Methylbutanal	malzig	16
Trimethylthiazol	röstig, erdig	16
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(<i>2H</i>)-furanon	nach Karamell	16

Blank et al. (1992 b) stellten zudem fest, dass die FD-Faktoren von 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(*5H*)-furanon und 5-Ethyl-3-hydroxy-

4-methyl-2(5*H*)-furanon bei Arabica-Kaffee höher als bei Robusta-Kaffee lagen, für 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin und 4-Ethyl-2-methoxyphenol verhielt es sich umgekehrt. Dies spiegelte sich auch in den sensorischen Gesamteindrücken der beiden Kaffeearten wider. Während bei Arabica-Kaffee die Geruchsnoten „nach Karamell“ und „süß, röstig“ dominierten, traten bei Robusta-Kaffee die Geruchseindrücke „erdig, röstig“ und „würzig, scharf“ in den Vordergrund. Diese Ergebnisse standen in Einklang mit den von Tressl et al. (1978 a, 1978 b, 1981) gefundenen Unterschieden zwischen den beiden Kaffeearten.

In einer weiteren HVA nahmen Semmelroch und Grosch (1995) in je einem kolumbianischen Arabica- und Robusta-Röstkaffeepulver insgesamt 19 aromaaktive Bereiche wahr. Dabei wurden 13 Substanzen, die in mindestens einem Pulver einen FD-Faktor ≥ 25 aufwiesen, charakterisiert: Ethanal, Diacetyl, 3-Methylbutanal, 2,3-Pentandion, 3-Methyl-2-buten-1-thiol, 2-Methyl-3-furanthiol, 3-(Methylthio)-propanal, 2-Furanmethanthiol, 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat, 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, 2-Methoxyphenol, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin und 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin. Drei weitere Aromastoffe mit hohen FD-Faktoren wurden nicht identifiziert. Mit Ausnahme von Schwefelwasserstoff und Dimethylsulfid wurden alle Aromastoffe, die auch von Holscher und Steinhart (1992) beschrieben worden waren, bestätigt. Unterschiede zwischen den Kaffeearten zeigten sich durch höhere FD-Faktoren von 2-Methyl-3-furanthiol und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin in Robusta-Kaffee.

Bereits 1991 entwickelten Sen et al. zur Quantifizierung von (*E*)- β -Damascenon eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA). Die ersten systematischen Quantifizierungen von 14 wichtigen Röstkaffeearomastoffen mittels SIVA erfolgten dann durch Semmelroch et al. (1995). Hierbei berechneten die Autoren auch erstmals die Aromawerte dieser Substanzen anhand ihrer Gehalte und ihrer orthonasalen Geruchsschwellenwerte in Wasser. Die höchsten Aromawerte wiesen 2-Furanmethanthiol, (*E*)- β -Damascenon, 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat und 5-Ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2*H*)-furanon auf. Semmelroch und Grosch (1996) ermittelten ergänzend hierzu sehr hohe Aromawerte für 3-Methyl-2-buten-1-thiol und 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin, letzteres speziell in Arabica-Röstkaffee.

Zwei von Blank et al. (1992 a) wahrgenommene, röstig, erdig riechende, jedoch nicht identifizierte Verbindungen konnten von Czerny et al. (1996) in indonesischem Röstkaffee als 2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin und 2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin charakterisiert werden. Czerny et al. (1999) gelang es außerdem, anhand eines aus 28 Aromastoffen bestehenden Modells in einer Sonnenblumenöl-Wasser-Mischung (1:20, V:V) das Aroma eines kolumbianischen Röstkaffees zu simulieren (**Tab. 1.4**).

Tabelle 1.4 Konzentrationen der für das Aromamodell von Röstkaffee verwendeten Aromastoffe nach Czerny et al. (1999).

Aromastoff	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Ethanal	139000
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	112000
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	55200
Diacetyl	48400
2,3-Pentandion	34000
Methylpropanal	32300
2-Methylbutanal	20700
3-Methylbutanal	18600
Propanal	17400
2-Ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	16800
Methanthiol	4700
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	3410
2-Methoxyphenol	3040
2-Furanmethanthiol	1680
4-Ethyl-2-methoxyphenol	1420
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon	1360
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	249
3-(Methylthio)propanal	228
(<i>E</i>)- β -Damascenon	222
5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5 <i>H</i>)-furanon	104
3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat	77,0
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	73,0
2-Methyl-3-furanthiol	68,0
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	59,0
2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin	52,0
Dimethyltrisulfid	28,0
2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin	18,0
3-Methyl-2-buten-1-thiol	8,60

Mit Hilfe von Weglassversuchen, bei denen die Unterscheidbarkeit eines um einen oder mehrere Aromastoffe reduzierten Modells vom vollständigen Aromamodell geprüft wird, unterstrichen die Autoren die Schlüsselrolle von 2-Furanmethanthiol für das Röstkaffearoma. Auch Ethanal, Propanal, Methylpropanal, 2- und 3-Methylbutanal, Alkylpyrazine, Furanone und 4-Ethenyl-2-methoxyphenol waren für die Simulation des Röstkaffearomas entscheidend. Für (*E*)- β -Damascenon, 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd sowie andere Schwefelverbindungen wie 3-Methyl-2-buten-1-thiol konnten die Autoren zeigen, dass diese nur eine untergeordnete Bedeutung hatten.

Czerny und Grosch (2000) bestimmten mittels SIVA die Konzentrationen von 13 Aromastoffen in kolumbianischem Arabica-Kaffee vor und nach der Röstung. Während beispielsweise die Gehalte von 3-(Methylthio)propanal, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon oder 4-Ethenyl-2-methoxyphenol durch die Röstung um ein Vielfaches anstiegen, blieben die Konzentrationen von 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin und 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin konstant. Da die beiden letztgenannten Aromastoffe im Gegensatz zu Rohkaffee in Röstkaffee keine Schlüsselkomponenten darstellten (u. a. Czerny et al., 1999), schlossen die Autoren, dass ihre erbsenartigen Geruchsnoten durch die zahlreichen, potenteren Aromastoffe des Röstkaffees maskiert werden. Lediglich Röstkaffees, die einen stark erhöhten Gehalt an 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin hatten, wiesen ein erbsenartiges („peasy“) Fehlaroma auf (Becker et al., 1988, **Kap. 1.3.1**).

Grosch und Mayer (2000) untersuchten die Aromastofffreisetzung eines kolumbianischen Röstkaffees unmittelbar nach dem Mahlen mittels dynamischer Headspaceanalysen. Dabei verglichen sie die Konzentrationen von 22 wichtigen Aromastoffen in frisch gemahlenem Kaffeepulver mit den innerhalb von 30 Minuten in den Kopfraum über dem Pulver freigesetzten Mengen der Verbindungen und konnten dadurch sogenannte „Abdampfraten“ der Substanzen bestimmen. Die höchsten Abdampfraten wiesen die sehr leichtflüchtigen Aromastoffe Methanthiol (66 %) und Ethanal (45 %) auf. 2-Furanmethanthiol ging beispielsweise zu 23 %, 3-Methylbutanal zu 27 %, Diacetyl zu 19 %, 3-(Methylthio)propanal zu 29 %, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin zu 13 % und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon lediglich zu 1,4 % in den Kopfraum über. Anhand dieser Daten konnte aus 21 Aromastoffen ein Headspace-Aromamodell von frisch gemahlenem Röstkaffeepulver erstellt werden. Aufgrund der Eliminierung von

Matrixeffekten wies dieses Aromamodell eine höhere Ähnlichkeit zum Aromaprofil von frisch gemahlenem Röstkaffeepulver auf, als das Aromamodell von Czerny et al. (1999), welches auf mittels Lösungsmittlextraktion bestimmten Aromastoffkonzentrationen basierte. Um die zeitliche Veränderung des Headspaceprofils von frisch gemahlenem Röstkaffee aufzuzeigen, wurde das Pulver nach dem Mahlen entweder sofort oder nach Standzeiten von 15 bis 180 Minuten bei Raumtemperatur zur dynamischen Headspaceanalyse herangezogen. Die Intensität der süßen, karamellartigen Geruchsnote verlor durch die Standzeit deutlich an Intensität, während die rauchigen und erdigen Geruchseindrücke stärker wahrgenommen wurden. Die röstig, schweflige Geruchsnote blieb weitgehend konstant. Diese sensorischen Veränderungen konnten durch quantitative Daten veranschaulicht werden. Die Headspacekonzentrationen von Methylpropanal, 2- und 3-Methylbutanal, Diacetyl und 2,3-Pentandion gingen bereits nach 15 Minuten Standzeit deutlich zurück. Methanthiol und Ethanal waren nach einer Stunde nicht mehr detektierbar. Zuletzt wurde beim Vergleich von Kaffeepulver und intakten Bohnen deutlich, dass die Abdampftraten über gemahlenem Kaffee um ein Vielfaches höher lagen als über Kaffeebohnen. Die Autoren zogen deshalb den Schluss, dass gemahlener Röstkaffee sein charakteristisches Aroma schneller als intakte Röstkaffeebohnen verliert. Übersichten über die Untersuchungen der Aromastoffe von Röstkaffee wurden von Grosch (1998) und Vitzthum (1999) verfasst.

Die für den erdigen, muffigen Geruch verschiedener Robusta-Kaffees verantwortliche Verbindung identifizierten Vitzthum et al. (1990) mit Hilfe der Sniffing-Technik (HRGC-O) und HRGC-MS als 2-Methylisoborneol (MIB). Anhand einer Verdünnungsanalyse der mittels SDE gewonnenen Aromaextrakte stellten sie fest, dass MIB in Robusta-Röstkaffees einen FD-Faktor von 16 erreichte, während es in Arabica-Röstkaffees lediglich im unverdünnten Extrakt wahrnehmbar war. Die in Robusta-Röstkaffees gefundenen Mengen lagen zwischen 200 und 600 ng/kg, in Arabica-Röstkaffees hingegen unter 50 ng/kg. Für die exakte Quantifizierung von MIB wurde 1993 von Bade-Wegner et al. eine SIVA entwickelt. Anhand quantitativer Daten in Rohkaffee und verschiedenen Röststadien konnten sie wie Rouge et al. (1993) eine Abnahme des MIB-Gehalts im Laufe der Röstung belegen. Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um Rouge sowie den mittels AEVA gewonnenen Erkenntnissen von Blank et al. (1992 a) konnten die Autoren MIB jedoch sensorisch auch in Robusta-

Röstkaffees detektieren. Die von ihnen in Arabica-Röstkaffees bestimmten MIB-Gehalte lagen unter 20 ng/kg, die Konzentrationen in Robusta-Röstkaffees zwischen 120 und 430 ng/kg. Grosch et al. (1993) wiesen mittels SIVA das MIB sowohl in Arabica-, als auch in Robusta-Rohkaffees nach, wobei die Gehalte in den Arabicas mit 80 bis 420 ng/kg deutlich niedriger lagen als in den Robustas (740 bis 1280 ng/kg). Blank und Grosch (2002) zeigten das Auftreten eines modrigen, schimmlichen Fehlromas in Arabica-Kaffeegetränken, die mit 10 bis 25 ng/kg MIB versetzt worden waren. Durch deutlich abweichende Aromaprofile dieser Kaffeegetränke gegenüber Robusta-Kaffeegetränken kamen sie zum Schluss, dass nicht MIB für das typische Aroma von Robustakaffee verantwortlich war, sondern höhere Gehalte diverser Pyrazine und phenolischer Komponenten. Als Ursache für höhere MIB-Konzentrationen sahen sie nicht die Kaffeeart, sondern die Nacherntebehandlung an (**Kap. 1.4.1**).

In einer aktuellen Untersuchung zu den sensorischen und molekularen Unterschieden zwischen Arabica- und Robusta-Röstkaffees bestätigten Cannon et al. (2010) die hohen Konzentrationen an Pyrazinen in Robusta-Röstkaffees, die sie für dessen erdig geprägtes Aromaprofil verantwortlich machten. Arabica-Röstkaffees wiesen darüber hinaus wesentlich intensivere, karamellartige und kakaoartige Geruchsnoten auf, die ihre Ursache in höheren Gehalten an Zuckerabbauprodukten, z.B. 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, hatten.

Das in manchen Röstkaffees wahrgenommene, holzige und kartonartige Fehlroma soll laut Parliment et al. (1973) durch (*E*)-2-Nonenal hervorgerufen werden, das in höheren Konzentrationen eine fettige, ölige und gurkenartige Geruchsnote aufweist. Als Quelle des Aromastoffs wurde der Abbau von Kaffeelipiden in Rohkaffee vermutet.

1.3.3 Flüchtige Verbindungen und Aromastoffe in Kaffeegetränken

Die Zusammensetzung der flüchtigen Inhaltsstoffe von Kaffeegetränken wurde weniger intensiv untersucht als diejenige des Röstkaffees. Eine der ersten Quantifizierungen flüchtiger Verbindungen in verschiedenen Kaffeegetränken erfolgte durch Rhoades (1960), der 18 Substanzen identifizierte, darunter Methanthiol, Ethanal, 3-Methylbutanal und Diacetyl. Mit Hilfe eines internen Standards bestimmte er die Konzentrationen der Verbindungen im Getränk und jeweiligen Kaffeepulver und berechnete die

Extraktionsraten dieser Substanzen bei der Getränkezubereitung. In den folgenden Jahren wurden sowohl qualitative, als auch quantitative Untersuchungen zu den flüchtigen Verbindungen von Kaffeegetränken durchgeführt, ohne jedoch den Aromabeitrag der Substanzen zu bewerten. So identifizierten und quantifizierten beispielsweise Shimoda und Shibamoto (1990) mittels Headspace-HRGC-MS 62 flüchtige Verbindungen eines Kaffeegetränks.

Blank et al. (1992 a, 1992 b) wandten erstmals das Prinzip der Molekularen Sensorik zur Untersuchung der geruchsaktiven Komponenten in Kaffeegetränken an. Bei einem Vergleich der mittels HRGC-O in den Kaffeepulvern und den Kaffeegetränken wahrgenommenen, geruchsaktiven Verbindungen konnten die Autoren zunächst feststellen, dass in den Getränken keine zusätzlichen Komponenten detektierbar waren. Dieses Erkenntnis wurde später von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Deibler et al., 1998). Anhand der über AEVA erhaltenen FD-Faktoren wurde allerdings ersichtlich, dass sich die Bedeutung einzelner Aromastoffe in den Kaffeegetränken im Vergleich zu den Kaffeepulvern veränderte. Insbesondere die hydrophileren Substanzen, z.B. 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon oder 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd, wiesen in den Getränken höhere FD-Faktoren als in den Pulvern auf. Weniger polare Verbindungen, wie 2-Furanmethanthiol, 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat oder (*E*)- β -Damascenon, zeigten in den Getränken hingegen eine geringere Geruchsintensität. Bei der Gegenüberstellung des Arabica- und des Robusta-Röstkaffeegetränks wurde ersichtlich, dass im Arabicageränk, dessen Aroma als süß und mild beschrieben wurde, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon, 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5*H*)-furanon sowie 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat einen höheren FD-Faktor als im Robustageränk aufwiesen. Für Letzteres wurden höhere FD-Faktoren der Verbindungen 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, 4-Ethyl-2-methoxyphenol sowie 4-Ethenyl-2-methoxyphenol ermittelt. Dieses Getränk zeichnete sich durch die Geruchsnoten „harsch“ und „erdig“ aus. Die Quantifizierung der wichtigsten Aromastoffe wurde von Blank et al. (1992 b) erstmals unter Anwendung der SIVA auf Kaffeegetränke durchgeführt.

Ergänzend zu den Untersuchungen von Blank et al. (1992 a, 1992 b) führten Semmelroch und Grosch (1995) eine vergleichende Headspace-Verdünnungsanalyse

(vHVA) eines Arabica- und eines Robusta-Kaffeegetränks durch. Beim Vergleich der FD-Faktoren der beiden Getränke konnten sie jedoch keine Unterschiede in der Intensität der leichtflüchtigen, aromaaktiven Verbindungen nachweisen. Aus einer Gegenüberstellung mit den ebenfalls über eine HVA in den zugehörigen Kaffeepulvern bestimmten FD-Faktoren wurde ersichtlich, dass die Intensitäten von Methanthiol, 3-Methyl-2-buten-1-thiol, 2-Methyl-3-furanthiol sowie 2-Furanmethanthiol im Vergleich zu den Kaffeepulvern niedriger lagen. Ethanal, 3-Methylbutanal und Dimethyltrisulfid hatten dagegen höhere FD-Faktoren in den Getränken.

Semmelroch und Grosch (1996) quantifizierten mittels SIVA jeweils 22 aromaaktive Substanzen in Arabica- und Robusta-Kaffeegetränken. Die höchste Konzentration aller untersuchten Substanzen erreichte in beiden Getränken 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon. Nach Berechnung der Aromawerte wurde allerdings ersichtlich, dass 2-Furanmethanthiol, (*E*)- β -Damascenon, 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat, 3-Methylbutanal, Methylpropanal und Methanthiol die potentesten Aromastoffe in den Kaffeegetränken waren. Dabei wiesen erdige und phenolische Aromastoffe, wie 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin oder 2-Methoxyphenol, höhere Aromawerte im Robusta-Getränk auf, während im Arabica-Getränk buttrige und karamellartige Aromastoffe, wie 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon oder 2,3-Pentandion, einen größeren Beitrag zum Aroma leisteten. Den Autoren gelang es anhand der quantitativen Daten, das Aroma der beiden Getränke anhand von Modellmischungen aus je 23 Aromastoffen zu simulieren. Durch Berechnung der Extraktionsraten der Aromastoffe, bezogen auf ihren Gehalt in den zur Extraktion verwendeten Kaffeepulvern, konnte außerdem gezeigt werden, dass für ihren Übergang in das Kaffeegetränk vor allem ihre Polarität ausschlaggebend war. Die Autoren zogen die Schlussfolgerung, dass die sensorischen Unterschiede zwischen Kaffeepulver und -getränk aus einer Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse zwischen den zahlreichen Geruchskomponenten aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit in Wasser resultierten und nicht auf die Bildung neuer Aromastoffe zurückzuführen waren.

Mayer et al. (2000) beschrieben die Veränderung des Aromaprofils eines Kaffeegetränks im Vergleich zu dem eines Kaffeepulvers mit einer Intensivierung der karamellartigen, butterartigen und phenolischen Geruchsnoten. Mittels Quantifizierung von 25 Aromastoffen in einem kolumbianischen Röstkaffee und einem daraus

zubereiteten Kaffeegetränk bestätigten die Autoren die Ergebnisse der vorhergehenden Studien (Blank et al., 1992 a, 1992 b; Semmelroch und Grosch, 1996) weitgehend. Für jeden Aromastoff wurden die Extraktionsraten bei der Herstellung des Kaffeegetränks berechnet (**Tab. 1.5**). Extraktionsraten über 75 % wiesen Verbindungen mit polarem Charakter, z.B. Diacetyl, 2,3-Pentandion, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd und 3-Methyl-2-buten-1-thiol auf. Die vergleichsweise schlechtere Wasserlöslichkeit von Aromastoffen wie (*E*)- β -Damascenon oder 2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin spiegelte sich in Extraktionsraten < 20 % wider. Anhand quantitativer Daten von 24 Aromastoffen wurde ein Aromamodell des Kaffeegetränks in Wasser erstellt. Weglassversuche machten deutlich, dass mehrere Alkylpyrazine, Furanone und Phenole sowie 2-Furanmethanthiol, 3-(Methylthio)propanal und 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat die wesentlichen Bestandteile des Aromas eines Kaffeegetränks waren.

Tabelle 1.5 Gehalte wichtiger Aromastoffe in einem Kaffeepulver sowie einem daraus zubereiteten Kaffeegetränk und Berechnung der Extraktionsraten (Mayer et al., 2000).

Aromastoff	Konzentration		ER ^b [%]
	Pulver [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Getränk ^a [$\mu\text{g}/\text{l}$]	
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	140000	7200	95
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	4100	210	95
2-Ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	16000	800	93
2,3-Pentandion	35000	1600	85
3-Methyl-2-buten-1-thiol	13	0,6	85
3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat	130	5,7	81
Diacetyl	49000	2100	79
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	400	170	79
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon	1900	80	78
3-(Methylthio)propanal	250	10	74
Ethanal	120000	4700	73
Methanthiol	4400	170	72
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	100	3,6	67
2-Methoxyphenol	2400	120	65
2-Methylbutanal	26000	870	62
3-Methylbutanal	17000	570	62
Methylpropanal	24000	760	59
4-Ethyl-2-methoxyphenol	1800	48	49
2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin	53	1,0	35
2-Methyl-3-furanthiol	60	1,1	34
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	45000	740	30
2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin	15	0,2	25
3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazin	120	1,5	23
2-Furanmethanthiol	1700	17	19
(<i>E</i>)- β -Damascenon	260	1,6	11

^a Zubereitung von 1 Liter Kaffeegetränk aus 54 g Kaffeepulver durch Überbrühen.

^b Extraktionsrate.

Poisson et al. (2004) berechneten für den erstmals in Kaffee identifizierten, schwefelhaltigen Aromastoff 4-Methoxy-2-methylbutan-2-thiol aufgrund seines sehr niedrigen Geruchsschwellenwerts in Wasser den hohen Aromawert von 1075 im Kaffeegetränk und schlossen daraus, dass dieser entscheidend zum Gesamtaroma beitrug.

Akiyama et al. (2007) untersuchten das Headspacearoma eines frisch zubereiteten Filterkaffeegetränks (Arabica, Äthiopien) mittels SPME. Die Probenahme erfolgte dabei während der ersten beiden Minuten nach der Getränkezubereitung. Bei der anschließenden HRGC-O- und HRGC-MS-Analyse schrieben die Autoren dem Aromastoff 4-(4'-Hydroxyphenyl)-2-butanon erstmalig einen wichtigen Beitrag zum Aroma eines frisch zubereiteten Kaffeegetränks zu. Aus einem Vergleich mit Kaffeegetränken anderer Herkunft (Akiyama et al. 2008) schlossen sie jedoch lediglich, dass 4-(4'-Hydroxyphenyl)-2-butanon eine charakteristische Komponente äthiopischer Kaffees sein könnte.

Die sensorischen Unterschiede zwischen mittels Filteraufguss und aus löslichem Instantkaffee zubereiteten Kaffeegetränken wurden von Semmelroch und Grosch (1995), Pollien et al. (1997) und Sanz et al. (2002 a) untersucht. Semmelroch und Grosch (1995) nahmen anhand einer vHVA qualitativ nur geringe Unterschiede zwischen dem Instantkaffeegetränk und den Filterkaffeegetränken wahr. Insbesondere für schwefelhaltige und phenolische Aromastoffe stellten sie im Instantkaffee jedoch niedrigere FD-Faktoren fest bzw. konnten die Substanzen im Instantkaffee nicht nachweisen. Auch Pollien et al. (1997) beschrieben das Headspace-Aromaprofil der beiden Getränke als sehr ähnlich, fanden jedoch vereinzelt höhere Intensitäten im Instantkaffeegetränk. Im Gegensatz zu den beiden vorhergehenden Untersuchungen wurden die Unterschiede in den aromaaktiven Verbindungen von Sanz et al. (2002 a) mittels einer vergleichenden Aromaextraktverdünnungsanalyse (vAEVA) herausgearbeitet. Im Filterkaffeegetränk nahmen die Autoren 40 aromaaktive Bereiche mit einem FD-Faktor ≥ 32 wahr. 27 der dafür verantwortlichen Aromastoffe konnten identifiziert werden. Für nahezu alle aromaaktiven Komponenten lagen die FD-Faktoren im Instantkaffeegetränk niedriger als im Filterkaffeegetränk, wobei insbesondere eine geringere Intensität schwefelhaltiger Verbindungen wie 2-Furanmethanthiol oder phenolischer Verbindungen wie 4-Ethenyl-2-methoxyphenol beobachtet wurde. Im Instantkaffeegetränk wiesen hingegen die karamellartig riechenden Aromastoffe wie 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon sowie die würzig riechenden Verbindungen wie 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon die höchsten FD-Faktoren auf. Somit wurde die Geruchsqualität des Instantkaffeegetränks als karamellartiger, aber weniger schweflig und erdig als die des Filterkaffeegetränks beschrieben.

Bücking und Steinhart (2002) erforschten den Einfluss der Zugabe verschiedener Additive auf die Freisetzung von Schlüsselaromastoffen in Kaffeegetränken mittels Headspace-HRGC-O und -HRGC-MS. Durch Zugabe von Milch oder Kaffeeweißer konnten die Autoren neben einer allgemeinen Reduktion der Geruchsintensität außerdem eine Verschiebung des Aromaprofils von einer kaffeeartigen und röstigen Geruchsnote bei „schwarzem Kaffee“ zu einer buttrigen, cremigen und milchigen Note bei „weißem Kaffee“ beobachten, die zu einer signifikanten Unterscheidbarkeit mittels Dreiecksprüfung führte. Das im Kopfraum detektierte 2-Furanmethanthiol wies nach Zugabe von Milch oder Kaffeeweißer, insbesondere bei hohem Fettgehalt, deutlich geringere Intensitäten auf. Die Verwendung von Saccharose zum Süßen von schwarzem Kaffee hatte dagegen keinen Einfluss auf das Aromaprofil des Getränks.

Das Aroma eines frisch zubereiteten Kaffeegetränks ist rasch einem drastischen Wandel unterworfen (Hofmann und Schieberle, 2002). Aus mehreren Arbeiten ist bekannt, dass Aromastoffe chemische Wechselwirkungen mit Bestandteilen der nichtflüchtigen Lebensmittelmatrix, wie beispielsweise Amino- oder Thiolgruppen von Proteinen, eingehen können (u. a. Mottram et al., 1996). Dieser Einfluss auf die Aromastoffgehalte wirkt sich folglich auf das Aromaprofil eines Lebensmittels aus (Hofmann et al., 2001). Eine mögliche Bindung wichtiger Aromastoffe von Kaffeegetränken an Melanoidine, eine Gruppe hochmolekularer Substanzen, die beispielsweise beim Rösten von Kaffee durch die Reaktion von Kohlenhydraten mit Aminokomponenten entstehen und eine Vielzahl an funktionellen Gruppen aufweisen, wurde von Hofmann et al. (2001) untersucht. Dabei wurde ersichtlich, dass die Zugabe von Melanoidinen zum Aromamodell eines Kaffeegetränks insbesondere die röstige, schweflige Geruchsnote deutlich abschwächte. Während die über Headspace-HRGC-MS quantifizierten Gehalte an α -Dicarbonylverbindungen und Aldehyden im Getränkmodell durch die Melanoidinzugabe nicht signifikant beeinflusst wurden, sanken die Konzentrationen von 2-Furanmethanthiol, 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat und 3-Methyl-2-buten-1-thiol rapide ab und waren 30 Minuten nach Zugabe der Melanoidine kaum mehr nachweisbar. Die Entwicklung der Gehalte der beiden erstgenannten Aromastoffe in einem auf 80 °C warmgehaltenen Kaffeegetränk wurde von Hofmann und Schieberle (2002) verfolgt. Die Konzentration an 2-Furanmethanthiol hatte nach einer Stunde bereits zu mehr als 75 % abgenommen. Nach 210 Minuten war 2-Furanmethanthiol nicht mehr nachweisbar, ähnlich verhielt es sich mit 3-Methyl-

3-sulfanylbutylmethanoat. Die Autoren konnten anhand von Modellreaktionen zeigen, dass das bei der Bildung von Melanoidinen eine zentrale Rolle spielende CROSSPY-Radikal (1,4-Bis-(5-amino-5-carboxy-1-pentyl)pyrazinium-Radikalkation) in seiner oxidierten Form als diquartäres Pyraziniumkation (**Abb. 1.5**) als Bindungsstelle für 2-Furanmethanthiol und andere aromaaktive Thiole fungieren kann, und postulierten einen nucleophilen Reaktionsmechanismus. Zwei der daraus resultierenden Thioether- und Bisthioether-Reaktionsprodukte sind ebenfalls in **Abbildung 1.5** dargestellt.

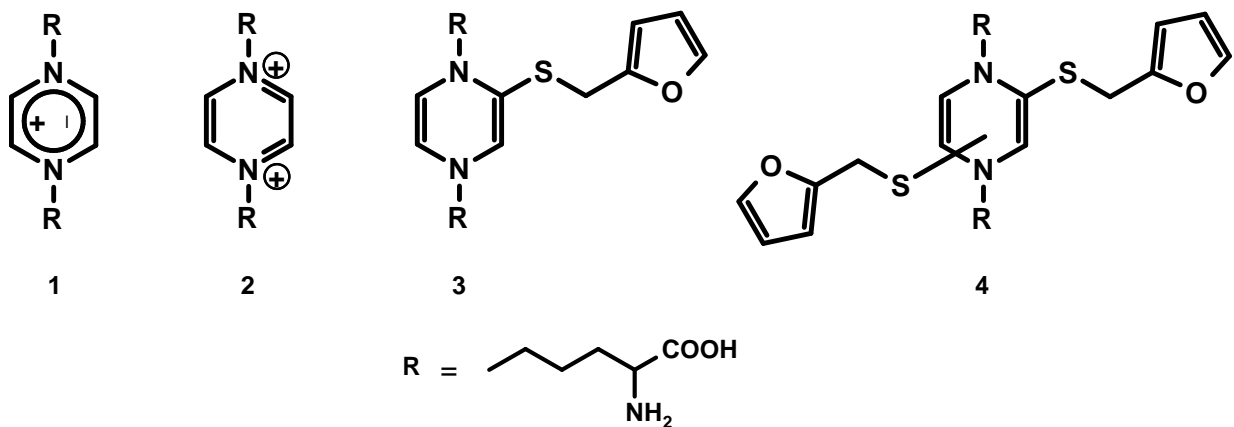


Abbildung 1.5 Intermediate (CROSSPY (1)) und diquartäres Pyraziniumkation (2)) sowie je ein Thioether- (3) und Bisthioether-Konjugat (4) der Reaktion von FFT mit Melanoidinen (nach Hofmann und Schieberle, 2002).

Auch Kumazawa und Masuda (2003) beobachteten beim Vergleich eines durch Hitze sterilisierten Dosenkaffeegetränks (121 °C, 10 Minuten) mit einem frischen Kaffeegetränk eine deutliche Abnahme der röstigen Geruchsnote sowie eine signifikante Reduktion der FD-Faktoren von 2-Furanmethanthiol sowie 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat im hitzesterilisierten Kaffee. In Modellansätzen konnten die Autoren gleichzeitig mit der Abnahme von 2-Furanmethanthiol eine Zunahme an 2,2'-(Disulfanyldimethylen)difuran, einem Oxidationsprodukt des Thiols, feststellen. Die quantifizierten Mengen des Disulfids konnten die Verluste an 2-Furanmethanthiol jedoch nur teilweise erklären. Blank et al. (2002) sahen in Wasserstoffperoxid neben Luftsauerstoff einen weiteren Initiator für Oxidationsreaktionen in Kaffeegetränken durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Die von ihnen postulierte Reaktion folgte einem radikalischen Mechanismus im Sinne einer Fentonreaktion. In Modellansätzen, bei denen Aromastofflösungen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Eisen(III)-

chlorid inkubiert wurden, wurde eine deutliche Abnahme an 2-Furanmethanthiol und die Bildung diverser Oxidationsprodukte beobachtet, von denen 2,2'-(Disulfanyldimethylen)difuran die höchsten Mengen aufwies, gefolgt von 2,2'-(Sulfanyldimethylen)difuran. Damit konnten die Autoren zeigen, dass schwefelhaltige Aromastoffe in Kaffeegetränken neben der kovalenten Bindung an nicht-flüchtige Kaffeeinhaltsstoffe auch durch Oxidationsreaktionen Veränderungen erfahren können.

Die Interaktionen von Thiolen insbesondere mit niedermolekularen Melanoidinen wurden von Charles-Bernard et al. (2005 a) bestätigt. Für Sulfide, Diketone und Pyrrole konnten schwächere Wechselwirkungen beobachtet werden. In einer weiteren Studie postulierten Charles-Bernard et al. (2005 b), dass aliphatische Thiole wie Methanthiol hauptsächlich nach einem nucleophilen Additionsmechanismus mit Bestandteilen der Kaffeematrix reagieren, während aromatische Thiole darüber hinaus auch radikalische Reaktionen eingehen können.

Müller und Hofmann (2005) nutzten erstmals die von Milo et al. (2001) entwickelte Methode von „in bean“-Modellen (**Kap. 1.5.3**), um die Bindungsstellen für Thiole in Röstkaffee näher zu charakterisieren. Hierfür wurden intakte Rohkaffeebohnen mit Wasser extrahiert, so dass die extrahierten „Bohnenhüllen“ einerseits und die wasserlöslichen Rohkaffeebestandteile andererseits erhalten wurden. Anschließend konnte die Zusammensetzung des wasserlöslichen Anteils variiert und dieser vor der Röstung wieder in die extrahierten Rohkaffeebohnen inkorporiert werden. Mit dieser Methode konnten Röstexperimente unter sehr realitätsnahen Bedingungen durchgeführt werden. Dabei wurde ersichtlich, dass der Hauptteil der 2-Furanmethanthiol-bindenden Röstkaffeebestandteile dem niedermolekularen (< 1000 Da), wasserlöslichen Teil der Rohkaffeebohnen entstammte. Die in den Kaffeegetränken beobachtete Bindungsaktivität wurde zu einem großen Teil durch Substanzen verursacht, die aus Chlorogensäuren des Rohkaffees, vor allem 5-O-Kaffeoylchinasäure, und bei Anwesenheit von Übergangsmetallionen bei der Röstung gebildet wurden. Diese Substanzen wurden von Müller et al. (2006 a) als Di- und Trihydroxybenzole, wie beispielsweise 1,2-Dihydroxybenzol (Catechol) oder 4-Methyl-1,2-dihydroxybenzol, identifiziert. Als Reaktionsmechanismus postulierten Müller et al. (2006 b) sowie Müller und Hofmann (2007) eine Oxidation der Di- und Trihydroxybenzole zu den

entsprechenden Chinonen, an die sich aromaaktive Thiole nucleophil addieren können. Durch den Nachweis solcher Phenol-2-Furanmethanthiol-Konjugate in Kaffeegetränken zogen die Autoren den Schluss, dass die Bindung von Thiolen an Röstprodukte der Chlorogensäuren zur Abnahme dieser Aromastoffe in frischen Kaffeegetränken beiträgt.

1.4 Einflussfaktoren auf das Kaffeearoma

Die weltweit unterschiedlichen Kaffeeanbaugebiete sowie die zahlreichen Prozessschritte, die zur Herstellung von Röstkaffee und Kaffeegetränken aus Kaffeekirschen notwendig sind, sind die Ursache dafür, dass verschiedene Röstkaffees und Kaffeegetränke in Aroma und Geschmack häufig voneinander unterscheidbar sind. Auf die Zusammensetzung des Kaffeearomas haben, wie bereits in **Kapitel 1.3.1** und **1.3.2** erwähnt wurde, die Sorte und Herkunft der Bohnen und die daraus resultierende unterschiedliche Komposition der Rohkaffees und der darin enthaltenen Vorläufer, aber auch die Röstbedingungen, die Röstkaffeelagerung sowie die Zubereitungsmethode des Getränks einen Einfluss (Clarke und Macrae, 1985).

1.4.1 Nacherntebehandlung der Kaffeekirschen

Geerntete Kaffeekirschen durchlaufen verschiedene Aufbereitungsschritte (**Kap. 1.2.2**), die allesamt die Zusammensetzung und Qualität des daraus gewonnen Rohkaffees und letztlich auch des Röstkaffees beeinflussen können.

Blank und Grosch (2002) führten das Auftreten aromarelevanter Mengen des erdig und schimmelig riechenden 2-Methylisoborneols (MIB, **Kap. 1.3.2**), das ein sekundäres Stoffwechselprodukt verschiedener Mikroorganismen und Pilze in Erdböden ist, auf die trockene Aufbereitung der jeweiligen Kaffeekirschen zurück, da diese hierbei für längere Zeit Kontakt mit dem Erdboden haben, so dass MIB in die grünen Kaffeebohnen migrieren kann. Die großen Variationen in den MIB-Gehalten erklärten sie mit der unterschiedlichen mikrobiologischen Flora verschiedener Erdböden. Bei einer hohen MIB-Konzentration kann auch nach der Röstung eine aromarelevante Menge des Aromastoffs erhalten bleiben, die somit für die charakteristische erdige, schimmelige Geruchsnote einiger Röstkaffees verantwortlich sein kann. Auch Cantergiani et al. (2001) begründeten die von ihnen gefundenen, hohen Gehalte an MIB sowie von 2,4,6-Trichlormethoxybenzol (Trichloranisol) und Geosmin mit der mikrobiellen Belastung eines mexikanischen Arabica-Rohkaffees bei der trockenen Aufbereitung (**Kap. 1.3.1**).

Das bei sogenannten „Stinker-Bohnen“ auftretende Fehl aroma wurde von Guyot et al. (1983) als überfermentiert charakterisiert und auf das Vorkommen der Ester Ethyl-2-methylbutanoat und 3-Methylbutylethanoat zurückgeführt. Bade-Wegner et al. (1997) sahen in den Aromastoffen Ethyl-2-methylbutanoat, Ethyl-3-methylbutanoat und Ethylcyclohexanoat die Ursache für den überfermentierten Geruch einiger gewaschener Arabica-Kaffees, aber auch trocken aufbereiteter Robusta-Kaffees. Die Autoren folgerten daraus, dass nicht nur fehlerhafte Aufbereitungsmethoden, sondern auch schlechte Bedingungen bei Lagerung oder Transport des Rohkaffees, wie beispielsweise erhöhte Temperatur oder Feuchtigkeit, die Bildung dieser Ester begünstigen konnten. Auch Full et al. (1999) wiesen das Auftreten eines fruchtigen Fehl aromas in unreifen Bohnen eines trocken aufbereiteten Arabica-Kaffees den Estern Ethyl-2-methylbutanoat, Ethyl-3-methylbutanoat, Ethyl-2-methyl-(*E*)-2-butenat und Ethylhexanoat zu.

Die Auswirkungen der verschiedenen Aufbereitungsmethoden der Kaffeekirschen wurden von Teutsch (2004) systematisch mit Hilfe der Methoden der Molekularen Sensorik untersucht. Trocken aufbereitete Arabica-Rohkaffees aus Peru und Brasilien, in deren Aromaprofilen die Attribute „fruchtig“ und „nach Essig“ dominierten, konnten sensorisch hoch signifikant von nass aufbereiteten Rohkaffees unterschieden werden. Die Ester Ethyl-2-methylbutanoat, Ethyl-3-methylbutanoat und Ethyl-2-methylpropanoat konnten ausschließlich in trocken aufbereiteten Rohkaffees nachgewiesen werden. Des Weiteren betrug die Konzentration an Ethansäure in diesen Kaffees ein Vielfaches der Gehalte, die in nass aufbereiteten Rohkaffees gefunden wurden. Auch nach der Röstung sowie der Zubereitung der Kaffeegetränke waren die sensorischen Unterschiede bemerkbar. Die drei Ethylester traten wiederum nur in Röstkaffees bzw. Kaffeegetränken trockener Aufbereitung auf. Czerny und Grosch (2000) zählten Ethyl-2-methylbutanoat und Ethyl-3-methylbutanoat zu den wichtigsten Aromastoffen von Rohkaffee (**Tab. 1.1**) und stellten kein fruchtiges Fehl aroma in den von ihnen untersuchten Kaffees fest. Die von ihnen quantifizierten Gehalte der beiden Aromastoffe, die sich durch die Röstung kaum veränderten, lagen jedoch deutlich unter den von Teutsch (2004) bestimmten Werten, so dass die fruchtigen Geruchsnoten der Ester durch die für Rohkaffee charakteristischen Aromastoffe maskiert wurden.

Steinhaus und Schieberle (2006) konnten die von Teutsch (2004) beschriebenen Ethylester auch in mittels progressiver Aufbereitungsmethoden hergestellten Rohkaffees in aromarelevanten Mengen nachweisen. Bei dieser Aufbereitung erfolgt die vollständige Entfernung des Fruchtfleisches, wie bei der traditionellen nassen Aufbereitung, vor der Trocknung, jedoch aufgrund des wesentlich geringeren Wasserverbrauchs rein mechanisch und ohne fermentativen Schritt (**Kap. 1.2.2**). Die Autoren konnten aber zeigen, dass hierbei durch eine eintägige, feuchte Zwischenlagerung der entschleimten Bohnen vor der Trocknung die Bildung dieser Ester verhindert werden konnte.

Scheidig et al. (2007) untersuchten die Auswirkungen der Lagerung von getrockneten Rohkaffeebohnen auf deren Aromaqualität. Nach einer neunmonatigen Lagerung bei Extrembedingungen von 40 °C, einem Wassergehalt von 13,5 % und einer Atmosphäre von 20 % Luftsauerstoff wies der gelagerte, im Gegensatz zum ungelagerten, Rohkaffee ausgeprägte rauchige, nelkenartige sowie fruchtige Geruchsattribute auf. Die Autoren führten die Verschiebung des Aromaprofils vor allem auf die Zunahme des phenolischen Aromastoffs 4-Ethenyl-2-methoxyphenol, der Ester Methyl-2-methylbutanoat und Methyl-3-methylbutanoat sowie von (*E*)- β -Damascenon im gelagerten Kaffee zurück. Hohe Gehalte der erstmalig in Rohkaffee identifizierten Verbindung 5-Ethenyl-2-methoxyphenol traten ausschließlich in gelagertem Rohkaffee auf, weshalb die Autoren diesen Aromastoff als Indikator für eine länger andauernde Lagerung von Rohkaffee ansahen. Die Untersuchung zeigte weiterhin, dass die Rohkaffeelagerung keine signifikante Zunahme an Lipidperoxidationsprodukten wie (*E*)-2-Nonenal zur Folge hatte. Durch eine Reihe von Variationen in den Lagerbedingungen stellten die Autoren fest, dass insbesondere eine Reduktion der Bohnenfeuchtigkeit sowie der Umgebungstemperatur die Bildung unerwünschter Aromastoffe reduzieren oder unterdrücken konnte. Nach Röstung der verschiedenen Rohkaffees und Zubereitung von Kaffeegetränken konnte Scheidig (2009) in den gelagerten Kaffees lediglich erhöhte Gehalte der beiden Methyl- sowie teilweise der Ethylester, je nach Lagerbedingungen, nachweisen. Die anderen Aromastoffe wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Rohkaffees können je nach Nacherntebehandlung und Lagerungsbedingungen Unterschiede in ihren Wassergehalten aufweisen. Baggenstoss et al. (2008 a)

untersuchten deshalb die Auswirkungen verschiedener Wassergehalte auf die Bildung von 16 Aromastoffen bei einer gemäßigten sowie einer starken Röstung. Dabei stellten sie fest, dass lediglich bei der hellen Röstung Unterschiede in den Aromastoffgehalten zwischen den vor der Röstung verschieden feuchten Kaffees auftraten, die jedoch keine Regelmäßigkeit zeigten und bei der starken Röstung nahezu ausgeglichen wurden. Die Dampfbehandlung von Rohkaffees vor der Röstung hatte teilweise deutlichere Differenzen in den Aromastoffgehalten zur Folge. Beispielsweise entstand bei der hellen Röstung in dampfbehandeltem Kaffee deutlich mehr 2-Furanmethanthiol als in unbehandeltem Kaffee, was nach der starken Röstung jedoch nicht mehr der Fall war. Mögliche Ursachen sahen die Autoren in den Bildungswegen des Aromastoffs (**Kap. 1.5**). Ob die Konzentrationsunterschiede Auswirkungen auf die sensorischen Eigenschaften der Röstkaffees hatten, wurde nicht geklärt.

1.4.2 Röstbedingungen und Röstgrad

Je nach Beschaffenheit der Rohkaffeebohnen sowie der zu ihrer Röstung verwendeten Apparatur und Temperatur bedarf es unterschiedlich langer Röstzeiten, um einen Kaffee eines bestimmten Röstgrads zu erhalten. Die Auswirkungen unterschiedlicher Röstgrade auf die Gehalte verschiedener flüchtiger Inhaltsstoffe in Röstkaffees wurden u. a. von Rhoades (1960), Kung et al. (1967), Tressl et al. (1978 a), Shibamoto et al. (1981) und Heinrich und Baltes (1987) untersucht.

Holscher und Steinhart (1992) zeigten, dass die Gesamtkonzentration der im Headspace über unterschiedlich lang gerösteten Arabica- und Robusta-Kaffees vorhandenen, flüchtigen Verbindungen mit fortschreitender Röstdauer zunächst anstieg, um bei stark gerösteten Kaffees letztlich wieder abzufallen. Während beispielsweise Methanthiol einen stetigen Konzentrationsanstieg bei zunehmender Röstzeit aufwies, erreichten andere Aromastoffe, wie Streckeraldehyde und Dicarbonylverbindungen, schon nach kurzer Röstung ein Konzentrationsmaximum, um bei einem stärkeren Röstgrad wieder abzunehmen. Die Autoren korrelierten dieses Ergebnis mit dem Wechsel des sensorischen Profils der Kaffees von einer butterartigen Note bei mittlerem Röstgrad zu einer schwefeligen, verbrannten Note bei starkem Röstgrad. Kawakami et al. (1995) untersuchten die flüchtigen Verbindungen in vier Arabicakaffees und einem Robustakaffee in jeweils neun unterschiedlichen Röststadien nach

Lösungsmittlextraktion mittels Pentan/Diethylether. Der Gesamtgehalt an flüchtigen Inhaltsstoffen stieg dabei ebenso wie die Menge an schwefelhaltigen Verbindungen, Phenolen und Pyrrolen stetig an, wohingegen beispielsweise die Konzentrationen an Säuren, Furanaldehyden oder Pyrazinen ein Maximum durchliefen und anschließend wieder abnahmen. Hashim und Chaveron (1996) bestätigten diese Erkenntnis für die Gehalte an Pyrazin und verschiedenen Methylpyrazinen. Auch Moon und Shibamoto (2009) zeigten bei einem Vergleich von je vier Röststufen dreier verschiedener Kaffeevarietäten, dass der Gesamtgehalt der flüchtigen Verbindungen nach Lösungsmittlextraktion mit steigendem Röstgrad zunahm. Durch den Vergleich der FID-Peakflächen einzelner Verbindungen konnten sie außerdem die relativen Veränderungen der Konzentrationen dieser Substanzen in Abhängigkeit vom Röstgrad beschreiben. Die Gehalte an 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon oder 5-(Hydroxymethyl)-2-furancarbaldehyd nahmen vom hellen zum dunklen Röstgrad hin ab, während die Konzentrationen an Pyridin, Dihydrofuran-2-on oder 1,2-Dihydroxybenzol deutlich anstiegen.

Mayer et al. (1999) untersuchten die Gehalte einiger Schlüsselaromastoffe eines sortenreinen Tipica-Kaffees und zweier Arabica-Blends in jeweils drei unterschiedlichen Röstgraden, die sie anhand der Farbintensitäten als hell, mittel und dunkel definierten. Während mehrere Carbonylverbindungen, wie Diacetyl, 2,3-Pentandion oder 3-Methylbutanal, mit stärkerem Röstgrad sowohl Konzentrationszunahmen als auch -abnahmen zeigten, wiesen beispielsweise die Gehalte von 4-Ethenyl-2-methoxyphenol oder mehrerer Alkylpyrazine einen leichten Anstieg mit zunehmender Röstdauer auf. Sehr starke Konzentrationszunahmen bei steigender Röstintensität waren beispielsweise für die schwefelhaltigen Aromastoffe 2-Furanmethanthiol, Methanthiol und 3-Methyl-2-buten-1-thiol oder für 2-Methoxyphenol zu beobachten. Die Gehalte von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon und anderen Aromastoffen sanken dagegen bei länger andauernder Röstung im Vergleich zur gemäßigeren Röstung wieder ab.

Gretsch et al. (1999) korrelierten die sensorischen Eindrücke fünf verschieden lang gerösteter Kaffees mit unterschiedlichen Aromastoffgehalten. Sie konnten beispielsweise zeigen, dass der Konzentrationsanstieg von 2-Furanmethanthiol, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin oder 2-Methoxyphenol bei fortschreitender Röstdauer mit

der Zunahme der röstigen, schwefligen Aromanote von stärker gerösteten Kaffees und der gleichzeitigen Maskierung des süßen, grünen und erdigen Geruchseindrucks grüner oder schwach gerösteter Kaffees korreliert werden konnte. Cannon et al. (2010) sahen die Ursache für die Intensivierung der verbrannten Geruchsnote von stark geröstetem Kaffee in der Konzentrationszunahme stickstoffhaltiger, heterocyclischer Verbindungen wie Pyridin, Pyrrolen und Pyrazinen mit steigendem Röstgrad.

Der Einfluss von Rösttemperatur und -dauer bei gleichem finalen Röstgrad auf die Gehalte wichtiger Röstkaffeearomastoffe wurde von Schenker et al. (2002) ebenso wie von Baggenstoss et al. (2008 b) untersucht. Letztere verfolgten die Entwicklung der Gehalte von 16 Aromastoffen während der Röstung unter Variation der Rösttemperatur und -zeit durch Erfassung quantitativer Daten. Dabei konnten sie beispielsweise zeigen, dass während einer langsamen Röstung mit niedrigerer Temperatur bzw. unter Anwendung eines Temperaturprofils ein höherer Gehalt an 2-Furanmethanthiol entstand als in einem Röstkaffee gleicher Farbintensität, der wesentlich kürzer, dafür bei höherer Temperatur geröstet wurde. Für weitere Schwefelverbindungen, Carbonylverbindungen und 4-Ethenyl-2-methoxyphenol verhielt es sich jedoch entgegengesetzt. Keine signifikanten Unterschiede konnten für 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin festgestellt werden.

Das Rösten von Rohkaffee unter Zugabe von Saccharose, auch als „Torrefacto“-Röstung bekannt, hatte laut Sanz et al. (2002 b) zur Folge, dass insbesondere die Gehalte an Pyrazinen, Pyridinen und Furanen im Vergleich zur Röstung von Kaffees ohne Zuckerzusatz anstiegen. Zwar bestätigten Lopez-Galilea et al. (2006) bei der Untersuchung von Kaffeegetränken, die aus Torrefacto-geröstetem oder konventionell geröstetem Kaffeepulver hergestellt worden waren, diese Erkenntnisse; die Autoren konnten jedoch auch zeigen, dass der Gesamtgehalt an flüchtigen Verbindungen in „Torrefacto“-Kaffeegetränken niedriger lag als in konventionellen Getränken. Die Ursache hierfür sahen die Autoren im schwächeren Röstgrad des „Torrefacto“-Kaffees.

1.4.3 Lagerung von Röstkaffee

Das Aroma von frisch geröstetem Kaffee ist nicht stabil. Licht, erhöhte Temperaturen, Feuchtigkeit und Sauerstoff beschleunigen die Entwicklung von Fehleraromen (Holscher

und Steinhart, 1992). Laut Arackal und Lehmann (1979) beginnt die merkliche Alterung von unverpacktem Röstkaffee, das sogenannte „Staling“, bereits zehn bis elf Tage nach der Röstung. Ein sensorisch deutlich wahrnehmbarer Alterungsgeruch und -geschmack tritt nach etwa sechs bis acht Wochen auf. Während hierfür anfangs der Verlust leichtflüchtiger Verbindungen im Vordergrund steht, nimmt die Bedeutung chemischer Veränderungen der Aromastoffe und anderer Kaffeeinhaltsstoffe im weiteren Verlauf der Lagerung an Bedeutung zu (Steinhart und Holscher, 1992). Um die Röstkaffeefrische möglichst lange zu bewahren, werden Kaffeebohnen oder -pulver in der Regel luftdicht und unter Schutzgas verpackt (Clarke und Macrae, 1987).

Die stofflichen Veränderungen bei der Alterung von Röstkaffee wurden bereits im Jahr 1937 von Prescott et al. untersucht. Die Autoren sahen als Ursache hierfür weniger eine Oxidation des nicht-flüchtigen Kaffeeöls, sondern vielmehr die Instabilität der flüchtigen Inhaltsstoffe von Röstkaffee unter Einfluss von Luftsauerstoff sowie hoher Luftfeuchtigkeit.

Radtke et al. (1963, 1966 a, 1966 b) verglichen die durch Entlüftung mit Inertgas oder Hochvakuumdünnenschichtentgasung gewonnenen flüchtigen Verbindungen frischer und unterschiedlich gelagerter Röstkaffees mittels Gaschromatographie. Sie konnten zeigen, dass in gemahlene Röstkaffeebohnen bereits nach vier Wochen Lagerung eine Reduktion der leichtflüchtigen Inhaltsstoffe um 75 % aufgetreten war, während die Abnahme in intakten Bohnen nach fünf Wochen Lagerung lediglich bei 25 % lag. Die Alterung des Röstkaffees führten sie sowohl auf die Verdampfung leicht- und mittelflüchtiger Verbindungen und die damit verbundene Verschiebung der relativen Konzentrationsverhältnisse der Einzelkomponenten als auch auf die Umsetzung der flüchtigen Substanzen zu nicht-flüchtigen Verbindungen durch Kondensations- und Polymerisationsreaktionen sowie Autoxidation zurück.

Radtke (1979) korrelierte den Sauerstoffverbrauch von Röstkaffee mit der Abnahme seiner Aromaqualität. Die Autorin konnte zum einen eine gesteigerte Sauerstoffaufnahme des Kaffees bei zunehmendem Sauerstoffgehalt der Atmosphäre und steigender Umgebungstemperatur zeigen. Weiterhin wurde deutlich, dass der Sauerstoffverbrauch von gemahlene Röstkaffee im Vergleich zu intakten Röstkaffeebohnen sowie der Sauerstoffverbrauch von Röstkaffee mit erhöhtem

Wassergehalt, der aus dem schnellen Abkühlen der Bohnen mit Wasser statt im Luftstrom unmittelbar nach der Röstung resultierte, im Vergleich zu Röstkaffee mit normalem Wassergehalt jeweils höher lag.

In älteren Studien wurden zur Beurteilung der Kaffeefrische sogenannte Aromaindices herangezogen (Arackal und Lehmann, 1979; Vitzthum und Werkhoff, 1979). Der sogenannte M/B-Index, das Peakflächenverhältnis von 2-Methylfuran und 2-Butanon, sinkt mit abnehmender Röstkaffeefrische, während gleichzeitig der sogenannte M/M-Index, das Peakflächenverhältnis von Methanol zu 2-Methylfuran, steigt. Arackal und Lehmann (1979) zeigten mittels Headspace-Analysen, dass Röstkaffeebohnen, die in Ventilpackungen unter Sauerstoffausschluss über einen Zeitraum von 30 Wochen bei Raumtemperatur gelagert wurden, keine signifikante Abnahme des M/B-Index aufwiesen. Wurden die sauerstoffdichten Packungen jedoch zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung geöffnet und unter haushaltsüblichen Bedingungen und Zutritt von Luftsauerstoff weiter aufbewahrt, nahm der M/B-Index innerhalb weniger Wochen jeweils in vergleichbarem Maße ab. Vitzthum und Werkhoff (1979) konnten die von Arackal und Lehmann (1979) für intakte Bohnen gezeigten Ergebnisse auf gemahlene Röstkaffee übertragen, der bis zu sieben Monate vakuumverpackt gelagert worden war und erst nach dem Öffnen der Packung eine Abnahme des M/B-Index bzw. eine Zunahme des M/M-Index zeigte. Für die Lagerung in luftdurchlässigen Packungen stellten sie außerdem heraus, dass der M/M-Index bei gemahlenem Röstkaffee deutlich schneller zunahm als bei intakten Bohnen. Die Autoren zeigten weiterhin die protektive Wirkung der Tiefkühlung über einen Zeitraum von 13 Tagen auf den Erhalt ausgewählter Schwefelverbindungen in intakten Röstkaffeebohnen. In einer weiteren Untersuchung bestätigten Radtke-Granzer und Piringer (1981) durch sensorische Bewertungen und Quantifizierungen ausgewählter flüchtiger Verbindungen (Methylpropanal, 2-Methylfuran, 3-Methylbutanal und Diacetyl) die Erkenntnisse von Vitzthum und Werkhoff (1979) sowie Arackal und Lehmann (1979) hinsichtlich Sauerstoff- und Temperatureinfluss auf die Röstkaffeealterung. Lindner-Steinert und Zou (1996) untersuchten die Abhängigkeit des Konzentrationsverlaufs der von Radtke-Granzer und Piringer (1981) gewählten vier Leitsubstanzen von der Art des verwendeten Verpackungsmaterials bei der Lagerung von gemahlenem Röstkaffee über 279 Tage. Sowohl beim Erhalt der flüchtigen Verbindungen als auch bei Permeationstests mit Kohlenstoffdioxid und exogenen Riechstoffen schnitt die

standardmäßig verwendete Aluminiumverbundfolie am besten ab. Weitere Indices, die in den letzten Jahren zur Beurteilung der Röstkaffeefrische herangezogen werden konnten, waren beispielsweise die Verhältnisse von Methanthiol zu 2-Butanon (Sanz et al., 2001) oder von 2-Furanmethanthiol zu Hexanal (Marin et al., 2008).

Tressl et al. (1979) sowie Tressl und Silwar (1981) untersuchten die Entwicklung der Gehalte schwefelhaltiger Aromastoffe in frisch gerösteten Kaffeebohnen bei der Lagerung in luftdurchlässigen Packungen bei Raumtemperatur. Dabei stellten sie eine signifikante Zunahme von 2-Furanmethanthiol sowie 5-Methyl-2-furanmethanthiol bei einer Lagerung über 39 Tage fest. Die Autoren vermuteten, dass die Substanzen aus 2-Furancarbaldehyd bzw. 5-Methyl-2-furancarbaldehyd und einer Schwefelwasserstoff liefernden Verbindung während der Lagerung in hohen Mengen gebildet wurden und somit zur Veränderung des Röstkaffeearomas bei der Lagerung beitrugen. Für 4-Ethenyl-2-methoxyphenol zeigten Tressl et al. (1979), dass sich die Konzentration des Aromastoffs bei Lagerung in Vakuumverpackungen auch in gemahlenem Kaffee über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr nur unwesentlich änderte. Bei der Lagerung in luftdurchlässigen Packungen dagegen nahm vor allem der Gehalt in gemahlenem Kaffee rasch und deutlich ab.

Steinhart und Holscher (1992) schrieben die Aromafrische intakter Röstkaffeebohnen insbesondere leichtflüchtigen Schwefelverbindungen, Streckeraldehyden und α -Dicarbonylverbindungen zu. Den Einfluss einer mehrwöchigen Lagerung in luftdurchlässigen Verpackungen bei Raumtemperatur konnten sie durch Quantifizierung dieser Substanzen mittels Headspace-HRGC-MS zu mehreren Zeitpunkten der Lagerung zeigen. Dabei wurde deutlich, dass die Intensität aller leichtflüchtigen Verbindungen bereits nach drei Wochen um ca. 60 % und die von Methanthiol um ca. 90 % abgenommen hatte. Die bei Raumtemperatur gelagerten Proben waren außerdem nach acht, zwölf und 22 Tagen sensorisch signifikant von den tiefgefroren aufbewahrten Proben unterscheidbar.

Czerny und Schieberle (2001) verglichen die Entwicklung wichtiger Aromastoffe in Röstkaffeepulver einer Charge, das für 20 Wochen bei Raumtemperatur gelagert wurde und hierfür unter Stickstoffatmosphäre entweder in einer speziellen Folie oder in einer Dose verpackt worden war. Anhand von Dreiecksprüfungen waren die beiden Kaffees

erstmals nach zwölf Wochen und danach bis zum Ende des Lagerversuchs signifikant unterscheidbar, wobei dem folienverpackten Kaffee eine muffige Geruchsnote und das Fehlen des Frischeindrucks zugeschrieben wurde. Mittels vergleichender Verdünnungsanalysen und Quantifizierungen von acht Schlüsselaromastoffen konnte dies auf eine deutliche Abnahme der Gehalte an Methylpropanal, 2- und 3-Methylbutanal, Diacetyl, 2,3-Pentandion, 3-Methyl-2-buten-1-thiol, 3-(Methylthio)propanal und 2-Furanmethanthiol im folienverpackten Kaffeepulver zurückgeführt werden. Dies stand in Einklang mit den Erkenntnissen von Steinhart und Holscher (1992) zur Röstkaffeefrische. Um den Einfluss von Sauerstoff auf die Alterung des Röstkaffees zu demonstrieren, wurde Röstkaffeepulver derselben Charge zusätzlich in Glasgefäßen entweder unter Sauerstoff bei 40 °C oder unter Argon bei -30 °C, jeweils für vier Wochen, aufbewahrt. Während die acht oben genannten Aromastoffe nach vierwöchiger Lagerung unter Sauerstoff vergleichbare Konzentrationen wie im folienverpackten Kaffee nach 20 Wochen aufwiesen, konnten im tiefgefroren unter Argon gelagerten Kaffeepulver deutlich höhere Aromastoffgehalte, insbesondere an 2-Furanmethanthiol und 3-(Methylthio)propanal, gemessen werden.

Auch Fischer und Schieberle (2005) verglichen die Konzentrationen von zehn Röstkaffeearomastoffen in frisch geröstetem Kaffee mit deren Gehalten in Röstkaffeepulvern derselben Charge, die bis zu sechs Wochen im Dunklen bei Raumtemperatur unter Sauerstoff- oder Argonatmosphäre in Glasgefäßen aufbewahrt wurden. Während die Gehalte an 4-Ethenyl-2-methoxyphenol, 2-Methoxyphenol und 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin vor und nach der Lagerung in etwa gleich waren, erlitten die leichtflüchtigen Aromastoffe Ethanal, 2- und 3-Methylbutanal sowie 2,3-Pentandion gemäßigte bis deutliche Verluste. Ein deutlicher Abbau wurde für die schwefelhaltigen Aromastoffe 2-Furanmethanthiol und 3-(Methylthio)propanal beobachtet, der unter Sauerstoffatmosphäre rascher erfolgte als unter Argonatmosphäre. Bereits nach einer Woche Lagerung ergab sich ein Verlust von 2-Furanmethanthiol unter Argonatmosphäre von etwa 50 % der Anfangskonzentration und unter Sauerstoffatmosphäre von etwa 70 %.

Bei ihren Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Lagerbedingungen auf ausgewählte Aromastoffe in Kaffeepads zeigten Bröhan et al. (2009), dass die Gehalte der leichtflüchtigen Aromastoffe Methylpropanal, Ethanal, Butanal, 2- und 3-Methyl-

butanal, Diacetyl und 2,3-Pentandion in ungeöffneten Originalpackungen während einer dreiwöchigen Lagerzeit nahezu konstant blieben, während sie in einer geöffneten Packung zu einem Großteil verloren gingen. Die Konzentration an Methanthiol nahm bei beiden Varianten deutlich ab. Wurden die Pads statt in der geöffneten Packung in geschlossenen Plastikflaschen bei Raumtemperatur aufbewahrt, wurden die Verluste teils deutlich reduziert. Dieser protektive Effekt konnte durch eine Reduktion der Lagertemperatur auf 4 °C noch verstärkt werden.

Baggenstoss et al. (2007) verglichen die Stabilität ausgewählter Aromastoffe bei der Lagerung von Kaffees, die nach der Röstung entweder passiv im Luftstrom oder durch Besprühen mit Wasser abgekühlt worden waren. Diese unterschiedlichen Methoden hatten verschiedene Wassergehalte der Röstkaffees zur Folge. Die Kaffees wurden als intakte Bohnen in offenen Behältern bei Raumtemperatur im Dunklen für 19 Wochen aufbewahrt und die Aromastoffgehalte zu mehreren Zeitpunkten bestimmt. Für den Konzentrationsverlauf der meisten Aromastoffe, die im Laufe der Lagerung abnahmen, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Röstkaffees mit unterschiedlichem Wassergehalt festgestellt werden. Lediglich die Zunahme der Konzentration an Dimethyltrisulfid, die die Autoren auf die Oxidation von Methanthiol zurückführten, dessen Gehalt deutlich abnahm, war bei Kaffees mit höherem Wassergehalt deutlicher ausgeprägt. Baggenstoss et al. (2008 c) konnten bei der offenen Lagerung von gemahlenem Röstkaffee mit unterschiedlichen Wassergehalten über acht Wochen vergleichbare Resultate zeigen. Signifikante Unterschiede zwischen den Kaffees zeigten sich lediglich in einem erhöhten Anfangsgehalt an Dimethyltrisulfid sowie in einer deutlicheren Zunahme des Lipidperoxidationsprodukts Hexanal im feuchteren Röstkaffeepulver. Wurden die Kaffeepulver unter normaler Atmosphäre verpackt und für 32 Wochen bei Raumtemperatur gelagert, erfolgte die Abnahme der Aromastoffe lediglich etwas verzögert. In den feuchteren Kaffees nahm der Gehalt an Dimethylsulfid schneller ab und die Endkonzentration an Dimethyltrisulfid lag deutlich höher. Die Autoren führten diese Befunde auf eine schnellere Sauerstoffdiffusion bei erhöhtem Wassergehalt zurück.

Die Auswirkungen einer mehrwöchigen Lagerung von aseptisch abgepackten Kaffeegetränken bei 4 °C bzw. 25 °C wurden von Perez-Martinez et al. (2008) untersucht. Der raschen Abnahme der Aromafrische standen insbesondere die

wachsende Intensität eines ranzigen Geruchseindrucks sowie die Veränderung anderer wichtiger Geruchsnoten gegenüber. Die Bildung neuer flüchtiger Verbindungen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Zur Korrelation der sensorisch wahrnehmbaren Veränderungen mit quantitativen Daten schlugen die Autoren sieben Aromaindices vor.

1.4.4 Extraktionstechniken zur Herstellung von Kaffeegetränken

Zur Zubereitung von Kaffeegetränken aus gemahlenem Röstkaffeepulver existiert eine Vielzahl von Extraktionsmethoden. Je nach Methode und in Abhängigkeit von weiteren Faktoren wie Mahlgrad des Pulvers, Wassertemperatur oder Kontaktzeit werden dabei unterschiedliche Anteile der Röstkaffeinhaltsstoffe extrahiert. Somit können aus einem Kaffeepulver verschiedene Getränke hergestellt werden, die sich in Geschmack und Aroma voneinander unterscheiden können (Clarke und Vitzthum, 2001).

Ratnayake et al. (1993) quantifizierten die Fettgehalte unterschiedlich zubereiteter Kaffeegetränke. Dabei stellten sie fest, dass gefilterte Kaffees einen wesentlich niedrigeren Lipidgehalt als ungefilterte Kaffees, wie beispielsweise Espresso oder türkischer Kaffee, enthielten. Laut Clarke und Vitzthum (2001) bedingt ein hoher Lipidgehalt des Kaffeegetränks auch eine höhere Extraktionsrate fettlöslicher, flüchtiger Substanzen und kann sich somit auf das Aroma des Getränks auswirken.

Maeztu et al. (2001) identifizierten in Espresso-Kaffeegetränken, die aus drei verschiedenen Röstkaffees zubereitet worden waren, dreizehn Röstkaffeearomastoffe mittels Headspace-HRGC-MS, deren Gehalte über den prozentualen Anteil der Peakflächen am Gesamtgehalt aller flüchtigen Verbindungen verglichen wurden. Anders als in einem Filterkaffeegetränk, das nach Lösungsmittelextraktion höhere Gehalte der α -Dicarbonylverbindungen Diacetyl und 2,3-Pentandion im Vergleich zu den Streckeraldehyden Methylpropanal sowie 2- und 3-Methylbutanal aufwies (Semmelroch und Grosch, 1996), lagen bei dieser Untersuchung die Peakflächen der Streckeraldehyde deutlich über denen der Diketone. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte außerdem die Einflüsse des Wasserdrucks (Andueza et al., 2002), des Mahlgrads des Kaffeepulvers (Andueza et al., 2003 a) und der Extraktionstemperatur (Andueza et al., 2003 b) auf das sensorische Profil von Espresso-Kaffeegetränken.

Bonnlaender et al. (2005) verglichen die Schlüsselaromastoffe eines jeweils aus demselben Röstkaffeepulver hergestellten Espresso- sowie Filterkaffeegetränks mittels HRGC-O und HRGC-MS nach simultaner Destillation-Extraktion (SDE). Anhand einer vAEVA fanden sie heraus, dass 3-Methyl-2-buten-1-thiol, 2-Furanmethanthiol, 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat, 2-/3-Methylbutansäure, (*E*)- β -Damascenon und 2-Methoxyphenol im Espresso mit einem FD > 2048 am intensivsten wahrgenommen wurden. 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin, 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon wiesen einen FD von 2048 auf. Die FD-Faktoren der Aromastoffe im Filterkaffee-Extrakt lagen für fast alle Schlüsselaromastoffe niedriger als beim Espresso. Dies ließ sich jedoch teilweise mit der größeren Menge an verwendetem Röstkaffeepulver zur Zubereitung des Espressos erklären. Weiterhin bestimmten die Autoren im Espresso höhere FD-Faktoren für Diacetyl sowie 2,3-Pentandion als für die Streckeraldehyde 2- und 3-Methylbutanal. Dies stand nicht im Einklang mit den über einen Vergleich der Peakflächen erzielten Ergebnissen von Maeztu et al. (2001). Lopez-Galilea et al. (2006) stellten fest, dass der Gesamtgehalt der flüchtigen Verbindungen in espressokaffee höher lag als in filterkaffee, jedoch verwendeten auch sie eine größere Menge an kaffeepulver für die espressozubereitung. Mittels HRGC-O konnten sie in beiden getränken 34 aromaaktive verbindungen detektieren. Die gefundenen unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Rocha et al. (2003) verglichen mittels Headspace-SPME/HRGC-MS die flüchtigen verbindungen von espressogetränken und von in der stempelkanne zubereiteten kaffeegetränken, die jeweils aus drei unterschiedlichen röstkaffeeblends hergestellt worden waren. Der Gesamtgehalt der flüchtigen verbindungen lag zwar in den espressi stets höher als in den stempelkannengetränken, die unterschiede zwischen einzelnen verbindungsklassen waren jedoch teilweise nur sehr gering ausgeprägt. Eine bewertung der aromarelevanz erfolgte nicht.

1.5 Möglichkeiten der Bildungswege von Kaffeearomastoffen

Nur wenige Aromastoffe, die auch in Röstkaffee auftreten, sind bereits in Rohkaffee enthalten, z.B. 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin. Für die Biosynthese der Alkylmethoxypyrazine schlugen Murray et al. (1970) einen Reaktionsweg vor, der von α -Aminosäuren sowie α -Dicarbonylverbindungen ausgeht. Der Großteil der für Röstkaffee entscheidenden Aromastoffe wird hingegen während der Röstung aus geruchslosen Vorläufern im Rohkaffee gebildet. Eine entscheidende Rolle hierbei spielt die Maillard-Reaktion, bei der aus Kohlenhydraten und Aminokomponenten, beispielsweise durch Fragmentierungen, Kondensations- oder Streckerreaktionen, eine Vielzahl an aromaaktiven Verbindungen gebildet wird. Weitere aromaaktive Substanzen entstehen beim Abbau von Chlorogensäuren, Trigonellin, Lipiden oder Carotinoiden (Yeretzian et al., 2002). Die quantitativen Veränderungen von 13 wichtigen Roh- oder Röstkaffeearomastoffen vor und nach der Röstung wurden von Czerny und Grosch (2000, **Kap. 1.3.2**) aufgezeigt. Yeretzian et al. (2002) verfolgten die Entwicklung ausgewählter flüchtiger Verbindungen während der Röstung von Kaffeebohnen mittels on-line-Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie. Während viele Substanzen ein Konzentrationsmaximum bei mittlerem Röstgrad aufwiesen, stiegen einige Verbindungen kontinuierlich an und andere nahmen sukzessive ab (**Kap. 1.4.2**).

Für die Bildungswege der wichtigsten Röstkaffeearomastoffe wurden anhand von Modellversuchen oder Markierungsexperimenten, beispielsweise der CAMOLA-Technik (**Kap. 1.1**), bereits mögliche oder wahrscheinliche Vorläufer und Reaktionsmechanismen postuliert. Übersichtsarbeiten dazu wurden u. a. von Tressl (1989), Ho et al. (1993), Holscher und Steinhart (1994), Reineccius (1995), Schieberle und Hofmann (2002) und Mottram und Mottram (2002) publiziert.

1.5.1 Vorschläge zur Bildung ausgewählter Röstkaffeearomastoffe

Der Abbau von Mono-, Di- und Oligosacchariden während der Röstung von Kaffee führt zunächst zur Bildung von Desoxyosonen, deren flüchtige Spaltprodukte wiederum als Vorläufer für wichtige Röstkaffeearomastoffe fungieren (Clarke und Vitzthum, 2001). Die aus Hexosen unter Wasserabspaltung entstehenden 1- und 3-Desoxyosone fragmentieren beispielsweise zu den flüchtigen Verbindungen 2-Oxopropanal oder

2,3-Dihydroxypropanal (Weenen und Apeldoorn, 1996). Im Folgenden können Aminosäuren mit 2-Oxopropanal und anderen α -Dicarbonylverbindungen beim sogenannten Strecker-Abbau zu wichtigen aromaaktiven Aldehyden reagieren. Grigg und Thianpatanagul (1984) schlugen hierfür einen 1,3-bipolaren Übergangszustand vor, dessen Spaltung nach Wasseranlagerung in der Freisetzung von 1-Amino-2-propanon und dem Streckeraldehyd resultierte, wie in **Abbildung 1.6** am Beispiel des 2-Methylbutanals veranschaulicht ist.

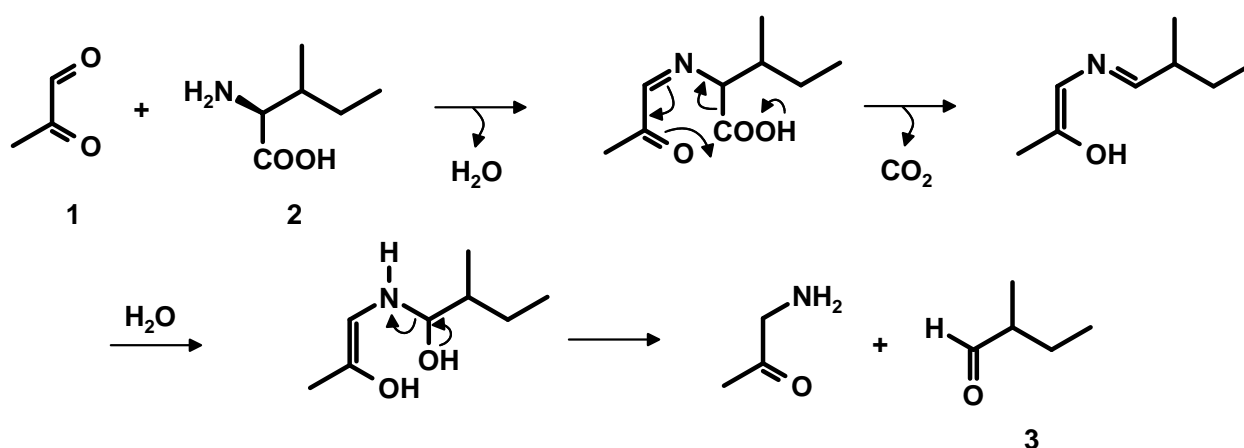


Abbildung 1.6 Bildung von 2-Methylbutanal (3) durch Streckerreaktion von L-Isoleucin (2) mit 2-Oxopropanal (1; nach Grigg und Thianpatanagul, 1984).

Nach diesem Mechanismus werden aus Isoleucin 2-Methylbutanal, aus Leucin 3-Methylbutanal, aus Valin Methylpropanal und aus Methionin 3-(Methylthio)propanal gebildet. Hofmann et al. (2000) zeigten außerdem, dass durch Variation der Reaktionsbedingungen aus 2-Oxopropanal und Aminosäuren auch die entsprechenden Streckersäuren gebildet werden können. Des Weiteren schlugen sie einen Mechanismus für die direkte Bildung des Streckeraldehyds aus dem 3-Desoxyoson vor. Hofmann und Schieberle (2000) zeigten zudem die Möglichkeit eines oxidativen Abbaus des zu Beginn der Maillard-Reaktion entstehenden Amadori-Produkts zum Streckeraldehyd.

Die α -Dicarbonylverbindungen Diacetyl und 2,3-Pentandion werden nach Weenen und Apeldoorn (1996) überwiegend durch den Abbau von Kohlenhydraten oder laut Hofmann (1995) durch Aldolkondensation der Kohlenhydratfragmente Ethanal und

Hydroxyethanal bzw. Hydroxypropanon gebildet. Yaylayan und Keyhani (1999) bestätigten anhand von Studien mit ^{13}C -markierten Aminosäuren, dass die beiden nach Butter riechenden Aromastoffe auch durch Kondensation von Kohlenhydratfragmenten wie 2-Oxopropanal mit Aminosäuren wie L-Alanin oder Glycin unter Decarboxylierung und Abspaltung von Ammoniak entstehen können (**Abb. 1.7**).

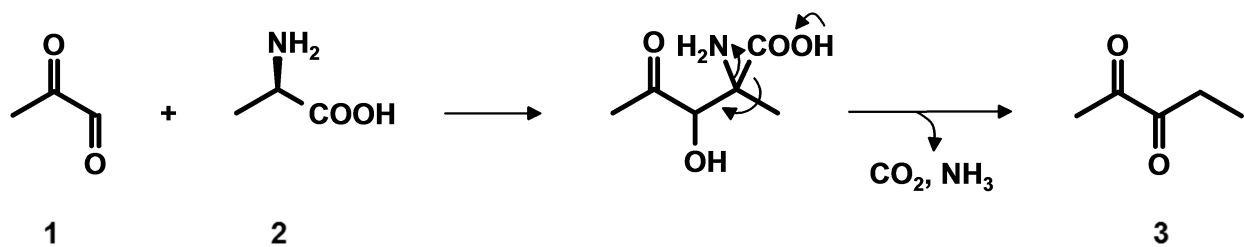


Abbildung 1.7 Bildung von 2,3-Pentandion (3) aus 2-Oxopropanal (1) und L-Alanin (2; nach Yaylayan und Keyhani, 1999).

Schieberle (1992) fand bei seinen Untersuchungen zu Vorstufen in Bäckerhefe heraus, dass Hexosen und insbesondere Fructose-1,6-diphosphat effektive Vorläufer für 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon darstellen und postulierte einen Reaktionsmechanismus, der über das 1-Desoxyoson und 2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3-furanon (Acetylformoin) zur Bildung des Hydroxyfuranons führt (**Abb. 1.8**). Diese Theorie wurde durch Markierungsexperimente von Tressl et al. (1994) bekräftigt. Blank et al. (1998) konnten hohe Mengen des Aromastoffs 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon bei der Erhitzung des aus Glycin und Glucose gebildeten Amadori-Produkts N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-glycin generieren. Blank und Fay (1996) sowie Blank et al. (1997) konnten anhand von Studien mit [^{13}C]-markierten Aminosäuren außerdem einen Bildungsweg aus Pentosen über das 1-Desoxyoson mit anschließender Kettenverlängerung durch das aus der Aminosäure Glycin entstandene Methanal aufzeigen. Die Ergebnisse ließen zudem eine Kettenverlängerung der Pentose durch Kohlenhydratfragmente, ohne Beteiligung der Aminosäure, vermuten. Auch Hofmann (1995) postulierte die Bildung diverser aromaaktiver Hydroxyfuranone durch Aldolkondensation von Kohlenhydratfragmenten, beispielsweise von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon aus 2-Oxopropanal und Hydroxypropanon (**Abb. 1.8**) oder von 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon aus Diacetyl und Hydroxyethanal. Schieberle (2005) bestätigte die Bildung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon durch Kondensation von Kohlenhydratfragmenten mittels CAMOLA-Experimenten unter

Verwendung von [$^{13}\text{C}_6$]-Glucose. Limacher et al. (2008) konnten durch CAMOLA-Experimente mit ^{13}C -markierten Monosacchariden und Aminosäuren außerdem die Bildung von Furanen aus Kohlenhydrat- und Aminosäurefragmenten zeigen.

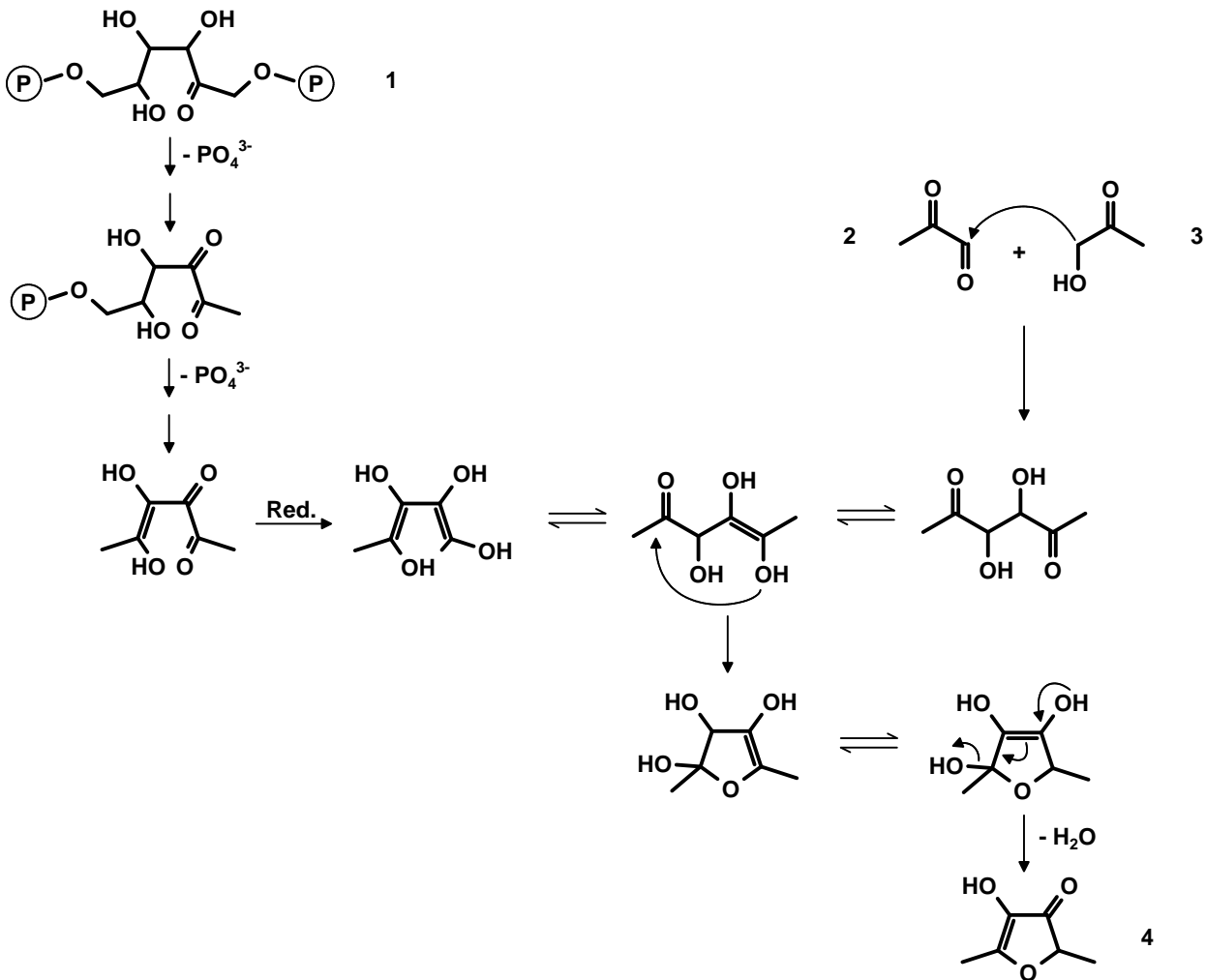


Abbildung 1.8 Bildung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (4) aus Fructose-1,6-diphosphat (1; nach Schieberle, 1992) bzw. aus der Kondensation von 2-Oxopropanal (2) und Hydroxypropanon (3; nach Hofmann, 1995).

Die aus der Reaktion von Kohlenhydratfragmenten wie 2-Oxopropanal oder Hydroxypropanon mit Ammoniak (Shibamoto und Bernhard, 1977) oder Aminosäuren (Weenen und Tjan, 1992) freigesetzten Aminocarbonylverbindungen stellen die Vorläufer für die Bildung von Alkylpyrazinen dar. Aus der Kondensation zweier Aminocarbonylverbindungen, beispielsweise Aminopropanon und 2-Aminopropanal, entstehen Dihydropyrazine, die zu Pyrazinen oxidiert werden (Weenen und Tjan, 1992).

Eine Möglichkeit zur Anlagerung einer weiteren Alkylseitenkette formulierten Cerny und Grosch (1994) für die Bildung des aromaaktiven 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazins durch Addition des beim Streckerabbau von L-Alanin freigesetzten Ethanal an das aus Aminopropanon sowie 2-Aminopropanal gebildete 2,6-Dimethyldihydropyrazin mit anschließender Dehydratisierung (**Abb. 1.9**).

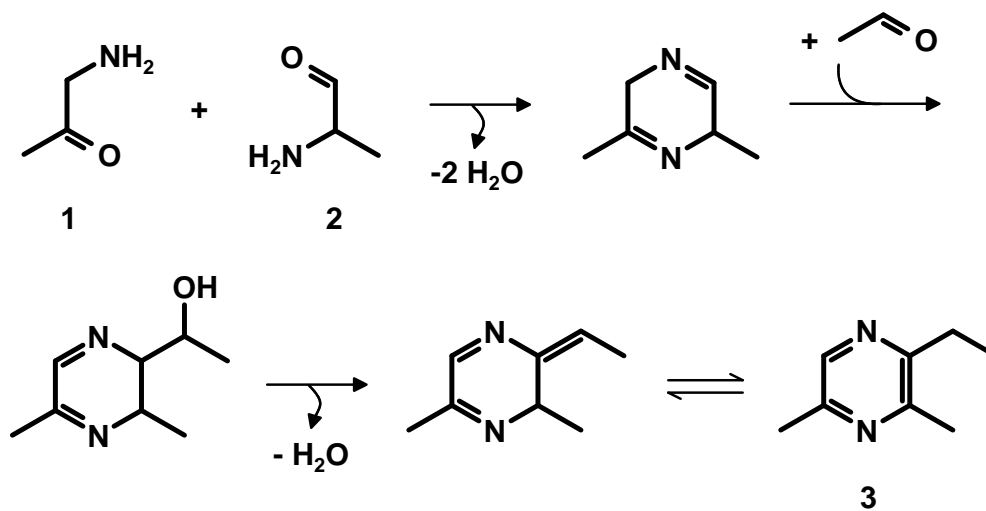


Abbildung 1.9 Bildung von 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (3) aus der Kondensation von Aminopropanon (1) und 2-Aminopropanal (2) und anschließender Addition von Ethanal (nach Cerny und Grosch, 1994).

Die Beteiligung des Streckeraldehyds wurde anhand von Markierungsexperimenten mit ^{13}C -markierten Aminosäuren später von Amrani-Hemaimi et al. (1995) bestätigt. Für die Bildung von 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin schlugen die Autoren eine Beteiligung von 1-Amino-2-butanon vor. Low et al. (2007) erklärten dessen Entstehung durch Aldolkondensation von Methanal mit Carbonylverbindungen und anschließender Streckerreaktion zum α -Aminoketon. Durch Zugabe der markierten Aminosäure ^{13}C -Glycin beim Erhitzen von Kartoffeln konnten die Autoren anhand der unterschiedlichen entstandenen Alkylpyrazine die Bedeutung der verschiedenen Bildungswege in einer Lebensmittelmatrix aufzeigen. Die Entstehung von 2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin erklärten Hofmann und Schieberle (1998 a) mit der Kondensation von 2-Aminopropanal und 1-Desoxy-3-aminoribulose mit anschließender Wasserabspaltung.

Als Vorläufer der in Röstkaffee wichtigen Schwefelverbindungen 3-Methyl-2-buten-1-thiol, 3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol und 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat sahen Holscher et al. (1992) das in Rohkaffee vorkommende 3-Methyl-2-buten-1-ol (Prenylalkohol) an. Durch Erhitzen eines Modellansatzes mit Cystein und Prenylalkohol konnten sie den von Tressl et al. (1983) postulierten Reaktionsmechanismus bekräftigen, bei dem aus schwefelhaltigen Aminosäuren freigesetzter Schwefelwasserstoff entweder an die Doppelbindung von Prenylalkohol addierte oder die Hydroxygruppe substituierte. Die Veresterung von 3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol mit Methansäure führte zur Bildung von 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat.

Durch Erhitzen von Ferulasäure konnten Tressl et al. (1976) die wichtigen Röstkaffeearomastoffe 2-Methoxyphenol, 4-Ethyl-2-methoxyphenol und 4-Ethenyl-2-methoxyphenol generieren. Die Autoren schlugen hierfür eine radikalisch initiierte Decarboxylierung zum 4-Ethenyl-2-methoxyphenol und nachfolgende Oxidations- bzw. Decarboxylierungsschritte vor. Tressl (1989) erweiterte diesen Mechanismus der thermischen Fragmentierung auf verschiedene, zu den Chlorogensäuren zählende Feruloylchinasäuren.

1.5.2 Vorschläge zur Bildung von 2-Furanmethanthiol

In verschiedenen Studien mit Modellreaktionsansätzen konnte 2-Furanmethanthiol u. a. von Shibamoto (1977) als Reaktionsprodukt von 2-Furancarbaldehyd, Schwefelwasserstoff und Ammoniak, von Silwar und Tressl (1989) beim Erhitzen einer Mischung aus 2-Furancarbaldehyd mit Cystein und Methionin, von Farmer et al. (1989) bei der Reaktion von Cystein mit Ribose und Phospholipiden und von Hofmann und Schieberle (1995) nach Erhitzen einer wässrigen Cystein-Ribose-Mischung nachgewiesen werden. Tressl et al. (1989) formulierten die Bildung aus einem 3-Desoxypentosen und dem aus Cystein freigesetzten Schwefelwasserstoff.

Parliment und Stahl (1994) wiesen beim Erhitzen einer Modellmischung aus Ribose und Cystein im sauren Milieu einen Anstieg des Gehalts an 2-Furanmethanthiol bei steigendem Röstgrad und höherer Rösttemperatur nach. Die Detektion von 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd in den Reaktionsansätzen ließ die Autoren zudem vermuten, dass die beiden Substanzen Intermediate des Bildungswegs von

2-Furanmethanthiol seien. Unter Variation der Edukte in ihren Modellreaktionsansätzen konnten Parliment und Stahl (1995) zeigen, dass Pentosen ein höheres Potential zur Generierung von 2-Furanmethanthiol aufwiesen als Hexosen und bei Verwendung von 2-Furancarbaldehyd die größten Mengen des Aromastoffs erzeugt wurden. Beim Einsatz von 2-Furanmethanol dagegen lag die Ausbeute an 2-Furanmethanthiol etwa um den Faktor 10 niedriger. Auch isoliertes Arabinogalactan, ein Polysaccharid des Rohkaffees (Bradbury und Halliday, 1988), das durch die vom leicht sauren pH-Wert und Wassergehalt des Rohkaffees geförderte Hydrolyse beim Rösten Kohlenhydratmonomere freisetzen kann, führte bei Reaktion mit Cystein zur Bildung geringer Mengen an 2-Furanmethanthiol. Weiterhin stellten die Autoren fest, dass das Tripeptid Glutathion zu einer höheren Entstehung von 2-Furanmethanthiol führte als freies Cystein und schlossen daraus, dass die in den Kaffeezellwänden vorhandenen Arabinogalactane als Kohlenhydratquelle und die cysteinhaltigen Proteine als Schwefelquelle für die Bildung von 2-Furanmethanthiol bei der Kaffeeröstung dienen könnten.

Hofmann (1995) konnte in Reaktionsmischungen aus 2-Furancarbaldehyd und Schwefelwasserstoff hohe Mengen an 2-Furanmethanthiol generieren. Als Quelle für 2-Furancarbaldehyd sah der Autor die aus Pentosen hervorgehenden 3-Desoxypentosone an. Er schlug daraufhin den Mechanismus einer reduktiven Sulfhydrierung von 2-Furancarbaldehyd vor (**Abb. 1.10**).

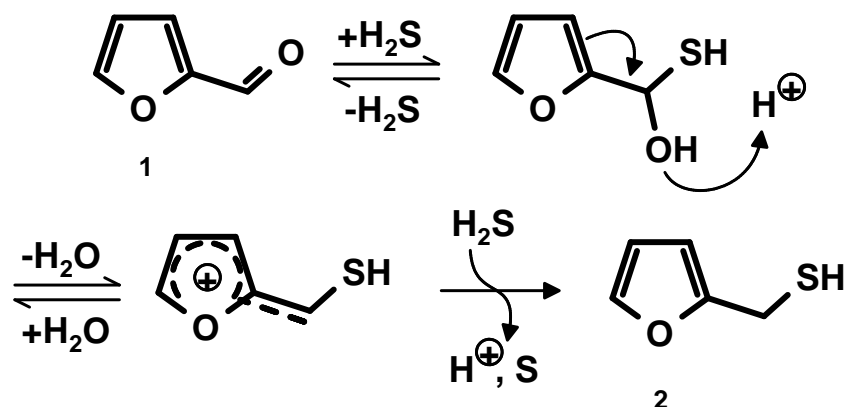


Abbildung 1.10 Entstehung von 2-Furanmethanthiol (2) aus 2-Furancarbaldehyd (1) und Schwefelwasserstoff (nach Hofmann, 1995).

Als Alternative kommt eine reduktive Sulfhydrierung des aus dem 3-Desoxypentosen gebildeten 5-Hydroxy-2-oxo-3-pentenals in Betracht, das durch Cyclisierung und Wasserabspaltung 2-Furanmethanthiol freisetzt. Der Autor konnte außerdem zeigen, dass das Reaktionsintermediat 3-Desoxypentosen auch durch Kondensation von Kohlenhydratfragmenten wie Hydroxyethanal und 2-Oxopropanal und somit aus Hexosen gebildet werden kann. Dies bekräftigten Hofmann und Schieberle (1997) durch den Nachweis von 2-Furanmethanthiol in Glucose-Cystein-Modellmischungen. Die Möglichkeit eines weiteren Bildungswegs zu 2-Furanmethanthiol formulierten ebenfalls Hofmann und Schieberle (1998 b) mit der Reaktion von Hydroxyethanal und dem aus 2-Oxopropanal und Schwefelwasserstoff generierten 2-Oxopropanthiol zu 4,5-Dihydroxy-1-sulfanyl-2-pentanon, das nach Cyclisierung und Wasserabspaltung ebenfalls 2-Furanmethanthiol freisetzt.

Durch Erhitzen einer Modellmischung aus Cystein, Ribose und [$^{13}\text{C}_5$]-Ribose wiesen Cerny und Davidek (2003) nach, dass die Kohlenstoffkette von 2-Furanmethanthiol der intakten Ribose entstammte, da lediglich unmarkiertes 2-Furanmethanthiol und [$^{13}\text{C}_5$]-2-Furanmethanthiol detektiert werden konnten. Der Ersatz von unmarkierter Ribose durch 2-Furancarbaldehyd führte zu einer deutlichen Verschiebung des Verhältnisses zugunsten des unmarkierten 2-Furanmethanthiols. Aus dieser Erkenntnis schlossen die Autoren, dass 2-Furanmethanthiol wesentlich effektiver aus 2-Furancarbaldehyd generiert werden konnte und dieser Aldehyd somit ein wichtiges Intermediat bei der Bildung des Aromastoffs sein müsste.

1.5.3 Untersuchungen zur Bildung von Aromastoffen beim Rösten von Lebensmitteln

Da die Reaktionsbedingungen in Modellmischungen die komplexen Verhältnisse in einer Lebensmittelmatrix nicht oder nur bedingt nachahmen können, sind die Ergebnisse solcher Experimente nur als Anhaltspunkt zu verstehen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, Aromastoffbildungswege anhand von Studien mit den entsprechenden Lebensmittelmatrices aufzuklären. Die Fraktionierung von Lebensmitteln mit dem Ziel, den von diesen Fraktionen bei thermischer Behandlung gebildeten Aromastoffen mögliche Vorläufer zuschreiben zu können, wurde von mehreren Arbeitsgruppen durchgeführt. De Maria et al. (1994, 1996) extrahierten

zunächst entfettetes Rohkaffeepulver mit warmem Wasser und anschließend die erhaltenen wasserlöslichen Rohkaffeinhaltsstoffe mit 80 %igem Ethanol, um eine hochmolekulare, ethanolunlösliche und eine niedermolekulare, ethanollösliche Fraktion des Rohkaffees zu isolieren. Sie stellten fest, dass der höhermolekulare Anteil der wasserlöslichen Rohkaffeekomponenten hauptsächlich aus Polysacchariden, speziell aus Arabinogalactan, sowie wasserlöslichen Proteinen bestand. Die niedermolekulare Fraktion setzte sich vor allem aus Saccharose, Trigonellin, Chlorogensäuren, Aminosäuren und Peptiden zusammen. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Fraktionen wirkte sich auf das Spektrum der bei ihrer Röstung gebildeten flüchtigen Verbindungen aus. Beim quantitativen Vergleich des gerösteten, entfetteten Kaffeepulvers einerseits und der beiden wasserlöslichen Unterfraktionen andererseits fiel beispielsweise auf, dass 2-Furancarbaldehyd oder 2-Methoxyphenol hauptsächlich von der niedermolekularen, wasserlöslichen Rohkaffeefraktion gebildet wurden. Ein Großteil der Pyrazine dagegen entstand beim Rösten der höhermolekularen, wasserlöslichen Rohkaffeefraktion. 2-Furanmethanol wiederum trat in beiden gerösteten wasserlöslichen Fraktionen in vergleichbarer Menge wie im nicht-fraktionierten Kaffee auf.

Um die Lokalisierung möglicher Vorläufer von 2-Furanmethanthiol in Rohkaffee eingrenzen zu können, fraktionierten Grosch et al. (2000) entfettetes Rohkaffeepulver mittels Wasserextraktion und anschließender Ultrafiltration des Wasserextrakts (Trenngrenze bei Molekulargewicht 1000 Da) und bestimmten anschließend die Gehalte an Arabinose und Hexosen nach Hydrolyse sowie an freiem Cystein in den verschiedenen Rohkaffeeproben. Die Röstung der Fraktionen erfolgte in einem Autoklaven unter Argon bei 200 °C für eine Stunde und zeigte, dass sowohl der wasserlösliche als auch der wasserunlösliche Rohkaffeeanteil wesentlich weniger 2-Furanmethanthiol bildeten als der entfettete Rohkaffee. Die Autoren führten dies auf die Trennung von freiem Cystein, das sie in der wasserlöslichen Fraktion detektierten, und polymer gebundener Arabinose, welche in der wasserunlöslichen Fraktion vorlag, zurück. Diese Hypothese wurde durch einen signifikanten Anstieg des Gehalts an 2-Furanmethanthiol nach Röstung der mit Cystein versetzten wasserunlöslichen Fraktion bekräftigt. In Modellversuchen erwies sich eine Mischung aus Arabinose und Cystein am effektivsten zur Bildung von 2-Furanmethanthiol, doch auch das aus

Rohkaffee isolierte Arabinogalactan vermochte nach Zugabe von Cystein 2-Furanmethanthiol in signifikanten Mengen zu generieren.

Milo et al. (2001) extrahierten intakte Rohkaffeebohnen mit heißem Wasser, um die Aromastoffbildung bei Abwesenheit der wasserlöslichen Substanzen unter Beibehaltung der Bohnenstruktur untersuchen zu können. Durch die Wasserextraktion wurden die Gehalte an Coffein, Chlorogensäuren und Feruloylchinasäuren in den extrahierten Rohkaffeebohnen signifikant reduziert. Nach der Röstung wiesen die extrahierten Kaffeebohnen deutlich niedrigere Mengen an Streckeraldehyden, Diketonen, Dimethylsulfid, phenolischen Aromastoffen, (*E*)- β -Damascenon, Pyrazinen, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon und 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat auf. Der Gehalt an 2-Furanmethanthiol lag dagegen in den extrahierten Bohnen etwa doppelt so hoch wie im nicht-extrahierten Kaffee. Diese Beobachtung stützte die These, dass 2-Furanmethanthiol vorwiegend aus höhermolekularen Polysacchariden und Proteinen generiert werden könnte und stand im Einklang mit den Erkenntnissen von Parliment und Stahl (1995). Die Möglichkeit der Entstehung von anderen aromaaktiven Substanzen wie Streckeraldehyden oder Pyrazinen beim Erhitzen von Peptiden war bereits durch frühere Studien (Rizzi, 1989; Ho et al., 1992) bekannt. Milo et al. (2001) zogen für die erhöhte Bildung von 2-Furanmethanthiol in den extrahierten Bohnen außerdem das mögliche Fehlen von konkurrierenden Reaktionen in Betracht.

Auch die Fraktionierung gemahlener, weißer Sesamsamen und die anschließende Röstung dieser Fraktionen zeigte, dass der wasserunlösliche Teil des Sesams deutlich mehr 2-Furanmethanthiol bildete als der wasserlösliche Extrakt (Schieberle, 1993).

Poisson et al. (2009) nutzten die von Milo et al. (2001) beschriebene Technik, um mit Hilfe sogenannter „in-bean“-Modelle den Einfluss verschiedener wasserlöslicher Rohkaffeinhaltsstoffe auf die Bildung wichtiger Röstkaffeearomastoffe in der realen Kaffeematrix zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst die Zusammensetzung des Rohkaffeeextrakts analysiert und aus Einzelsubstanzen ein dem Extrakt nahezu äquivalentes Extraktrekombinat zusammengestellt. Durch gezieltes Weglassen, die Zugabe einzelner Substanzen bzw. Stoffgruppen oder den Zusatz isopenmarkierter Verbindungen und anschließende Reinkorporierung des modifizierten Extrakts in die extrahierten Rohkaffeebohnen konnte eine Veränderung der Zusammensetzung der

wasserlöslichen Rohkaffeebestandteilen erreicht werden. Anhand verschiedener Versuchsreihen konnten die Autoren im Einklang mit den Daten von Milo et al. (2001) zunächst zeigen, dass beim Rösten extrahierter Rohkaffeebohnen deutlich mehr 2-Furanmethanthiol gebildet wurde, als im nicht extrahierten Referenzkaffee (**Tab. 1.6**). Für 2-Furancarbaldehyd verhielt es sich jedoch umgekehrt. Beim Rösten von Kaffeebohnen unter Weglassen der freien Kohlenhydrate im Extraktäquivalent stieg der Gehalt an 2-Furanmethanthiol im Vergleich zum nicht manipulierten Referenzkaffee deutlich an, während die Konzentration an 2-Furancarbaldehyd signifikant abnahm. Das Weglassen der freien Aminosäuren dagegen beeinflusste die Gehalte der beiden Verbindungen kaum.

Tabelle 1.6 Gehalte an 2-Furanmethanthiol (FFT) und 2-Furancarbaldehyd (FCA) nach Röstung verschiedener Rohkaffees (Referenzkaffee, extrahierter Rohkaffee, mit Originalextrakt oder Extraktäquivalent rekonstituierter Kaffee (Rekonst.) und jeweilige Variationen, nach Poisson et al., 2009).

Kaffeeprobe	Konzentration [mg/kg Trockenmasse]	
	FFT	FCA
Referenzkaffee	1,15	166
Extrahierter Rohkaffee	1,85	134
Rekonst.-Originalextrakt	1,05	147
Rekonst.-Extraktäquivalent	1,07	113
Rekonst.-Extraktäquivalent ohne freie Aminosäuren	1,12	146
Rekonst.-Extraktäquivalent ohne freie Kohlenhydrate	1,73	38,3
Referenzkaffee + Saccharose	0,78	267
Referenzkaffee + Glucose	1,08	196
Referenzkaffee + Arabinose	1,18	157
Referenzkaffee + Rhamnose	1,12	174
Referenzkaffee + Alanin	1,14	152
Referenzkaffee + Cystein	1,71	163

Ein Konzentrationsanstieg von 2-Furanmethanthiol im gerösteten Referenzkaffee war nach der Zugabe von Cystein zu den Referenzbohnen zu verzeichnen, der Gehalt lag jedoch immer noch niedriger als nach Röstung der extrahierten Bohnen. Die Autoren schlossen daraus, dass Cystein zwar eine wichtige Schwefelquelle bei der Bildung von

2-Furanmethanthiol darstellt, dieser jedoch hauptsächlich dem proteingebundenen Cystein entstammt. Die Infusion der Referenzbohnen mit verschiedenen Kohlenhydraten bewirkte keinen Anstieg des Gehalts an 2-Furanmethanthiol, stattdessen hatte die Zugabe von Saccharose eine Abnahme der Konzentration zur Folge. Dies bestätigte die Vermutung, dass die zur Bildung von 2-Furanmethanthiol benötigten Kohlenhydrate aus der Hydrolyse nicht-wasserlöslicher Polysaccharide stammen. Die generierten Mengen an 2-Furancarbaldehyd dagegen wurden durch die Zugabe von Saccharose und Glucose deutlich erhöht und durch Cystein nicht beeinflusst (**Tab. 1.6**).

Der Zusatz von Saccharose mit [¹³C₆]-markierter Fructose zum Extraktäquivalent unter Weglassen aller weiteren freien Kohlenhydrate führte zur Bildung eines geringen Anteils an fünffach markiertem 2-Furancarbaldehyd, während im 2-Furanmethanthiol diese Markierung nicht zu finden war. Des Weiteren resultierte die Zugabe von [²H₄]-2-Furancarbaldehyd nicht in der Generierung von markiertem 2-Furanmethanthiol. Aus diesen und den vorgenannten Erkenntnissen schlossen die Autoren, dass die Entstehung von 2-Furanmethanthiol und 2-Furancarbaldehyd in Kaffeebohnen nicht direkt zusammenhängen, sondern unterschiedlichen Bildungswegen folgten.

Bei der Betrachtung von diversen Alkylpyrazinen, den Diketonen Diacetyl und 2,3-Pentandion sowie 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon wurden die Erkenntnisse verschiedener Modellversuche weitgehend bestätigt, wenngleich deutlich wurde, dass aufgrund der Vielzahl vorhandener und teilweise konkurrierender Substanzen in der Kaffeebohne auch andere als die bislang postulierten Reaktionswege zur Aromastoffbildung ablaufen können.

Ebenfalls anhand von „in-bean“-Experimenten konnten Degenhardt et al. (2005) die Bedeutung von Carotinoiden bei der Bildung von Röstkaffeearomastoffen zeigen. β -Ionon entstand beispielsweise bei der Röstung von extrahiertem Rohkaffee, der mit β -Carotin versetzt worden war.

1.6 Problemstellung und Zielsetzung

Für das Aroma von Röstkaffee sind maximal 30 Verbindungen von Bedeutung. Unter diesen Aromastoffen nimmt 2-Furanmethanthiol eine wesentliche Rolle ein, da es als einzige dieser Substanzen in hoher Verdünnung einen kaffeeartigen Geruch aufweist.

Während die unterschiedlichen Auswirkungen der nassen und trockenen Rohkaffeeaufbereitung auf die wichtigsten Aromastoffe von Röstkaffee und Kaffeegetränken bereits untersucht wurden, sind bislang keine Studien zum Einfluss der Trocknungstechnologie des Rohkaffees auf die Aromaqualität von Röstkaffee bekannt. Anhand der qualitativen und quantitativen Aromastoffzusammensetzung der aus unterschiedlich getrockneten Rohkaffees hergestellten Röstkaffees und Kaffeegetränke sollte daher in dieser Arbeit ein möglicher Einfluss der verschiedenen Trocknungsverfahren beleuchtet werden.

Weiterhin gibt es bis dato keine Daten über die Gehalte der wichtigsten Aromastoffe von Kaffeegetränken, die mit verschiedenen, im täglichen Gebrauch üblichen Zubereitungsmethoden hergestellt wurden. Durch die jeweilige Verwendung der gleichen Menge desselben Röstkaffeepulvers und Wassers zur Herstellung von Kaffeegetränken mittels vier unterschiedlicher Zubereitungsverfahren (Kaffeemaschine, Stempelkanne, Espresso- und Mokkatopf) sollte die Abhängigkeit der Aromastoffgehalte von der jeweils verwendeten Extraktionsmethode aufgezeigt werden.

In den bisherigen Studien zur Lagerstabilität des Röstkaffeearomas wurden diverse Einflüsse auf den Gesamtgehalt aller flüchtigen Verbindungen, auf das Verhältnis bestimmter Leitsubstanzen, ausgedrückt in sogenannten Aromaindices, sowie auf die Gehalte einzelner Aromastoffe untersucht. Dabei wurden teilweise widersprüchliche Ergebnisse, insbesondere zum Verhalten von 2-Furanmethanthiol, erzielt. In dieser Arbeit wurde deshalb die Entwicklung des Gehalts des Schlüsselaromastoffs 2-Furanmethanthiol in unterschiedlich gelagerten Röstkaffees mit Hilfe der Stabilisotopenverdünnungsanalyse untersucht, um Aussagen über die entscheidenden Faktoren für dessen Konzentrationsabnahme bei der Lagerung von Röstkaffee treffen zu können.

Außerdem ist die Kenntnis des Bildungswegs von 2-Furanmethanthiol in der Kaffeematrix von Interesse. Zwar konnte 2-Furanmethanthiol in zahlreichen Modellversuchen beispielsweise aus monomeren Vorläufern wie L-Cystein, D-Ribose oder 2-Furancarbaldehyd generiert werden, doch neuere Studien mit Rohkaffee lassen im Gegensatz dazu eine Beteiligung von höhermolekularen Substanzen wie Polysacchariden und cysteinhaltigen Peptiden aus der Lebensmittelmatrix vermuten. Weiterhin konnte bislang weder aus Rohkaffee, noch aus einem anderen Lebensmittel, welches bei Erhitzung 2-Furanmethanthiol bildet, z.B. weiße Senfsamen, eine möglichst einfach zusammengesetzte Fraktion, die ein hohes Potential zur Generierung von 2-Furanmethanthiol aufweist, oder ein Vorläufer von 2-Furanmethanthiol isoliert werden. In dieser Arbeit sollte deshalb die Bedeutung der bislang postulierten Vorläufersubstanzen L-Cystein sowie D-Ribose bei der Bildung von 2-Furanmethanthiol in Rohkaffee und Senfsamen anhand von Isotopenanreicherungsversuchen geklärt sowie ein möglicher Zusammenhang der Entstehung von 2-Furanmethanthiol mit der Bildung von 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanol näher betrachtet werden. Des Weiteren sollte über Fraktionierungen von Rohkaffee und Senfsamen eine Fraktion mit hohem Generierungspotential für 2-Furanmethanthiol isoliert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Einflüsse auf die Gehalte wichtiger Aromastoffe von Röstkaffees und Kaffeegetränken

Bei der Produktion von Kaffee gibt es zahlreiche Parameter, die das Aroma und damit die Qualität des Endprodukts, die sogenannte Tassenqualität eines Kaffeegetränks, beeinflussen können (**Kap. 1.4**). Zu diesen Parametern zählen unter anderem die Trocknung des Rohkaffees, die Lagerung von geröstetem Kaffee sowie die verschiedenen Zubereitungsmethoden von Kaffeegetränken. Um den Einfluss dieser Faktoren auf das Kaffeearoma objektiv bewerten zu können, wurden in verschiedenen Versuchsreihen die Aromastoffe von Kaffeeproben mit Hilfe der Molekularen Sensorik untersucht.

2.1.1 Einfluss der Trocknungstechnologie

Zur Untersuchung des Einflusses der Trocknung eines hochwertigen, nass aufbereiteten (**Kap. 1.2.2**) Arabica-Rohkaffees aus Tarrazu, Costa Rica (CR), auf die Entwicklung der Aromastoffe im späteren Röstprodukt, wurden die entpulpten, fermentierten und gewaschenen Kaffeebohnen im Anbauland sowohl in der Sonne als auch mechanisch getrocknet. Bei der etwa sechstägigen Sonnentrocknung (So) durchliefen die Bohnen gemäß dem Tag-Nacht-Rhythmus Trocknungs- und Ruhephasen. Für die maschinelle, maximal 71 Stunden andauernde Trocknung kamen horizontale Trommeltrockner, sogenannte „Guardiolas“, zum Einsatz. Dabei wurden die Bohnen unter langsamer Rotation mit warmer Luft in Kontakt gebracht. Die maschinelle Trocknung wurde zudem dahingehend variiert, dass die Trocknung entweder kontinuierlich (kT) bei derselben Temperatur oder in Intervallen, die den Tag-Nacht-Rhythmus (TNR) einer Sonnentrocknung simulieren sollten und zwischen Erhitzung und Ruhephasen wechselten, erfolgte. Weiterhin wurden bei diesen Methoden verschiedene Temperaturen oder auch Stufentrocknungen (Stufe) angewandt, bei denen mit fortschreitender Trocknungsdauer die Temperatur reduziert wurde. Darüber hinaus wurden im Erntejahr 2007 von den Trocknungsvarianten „Sonnentrocknung“ und „maschinelle, den Tag-Nacht-Rhythmus simulierende Trocknung bei 40 °C“ sowie in

den Erntejahren 2007 und 2008 von der Variante „maschinelle, kontinuierliche Trocknung bei 50 °C“ jeweils zwei Chargen produziert und untersucht (**Tab. 2.1** und **Kap. 5.1.1**).

Tabelle 2.1 Übersicht über die angewandten Trocknungsmethoden an nass aufbereitetem *Coffea arabica* unter Angabe des im weiteren Verlauf verwendeten Probencodes.

Trocknungsort & -jahr Probencode	angewandte Trocknungsmethode
Costa Rica 2007	
CR 07 So a	Sonnentrocknung (Charge a)
CR 07 So b	Sonnentrocknung (Charge b)
CR 07 kT 50 a	maschinell, kontinuierlich, 50 °C (Charge a)
CR 07 kT 50 b	maschinell, kontinuierlich, 50 °C (Charge b)
CR 07 TNR 40 a	maschinell, Tag-Nacht-Rhythmus, 40 °C (Charge a)
CR 07 TNR 40 b	maschinell, Tag-Nacht-Rhythmus, 40 °C (Charge b)
CR 07 TNR 50	maschinell, Tag-Nacht-Rhythmus, 50 °C
Hamburg 2007	
HH 07 kT 30	maschinell, kontinuierlich, 30 °C
HH 07 kT 40 a	maschinell, kontinuierlich, 40 °C (Charge a)
HH 07 kT 40 b	maschinell, kontinuierlich, 40 °C (Charge b)
HH 07 kT 50	maschinell, kontinuierlich, 50 °C
HH 07 TNR 30	maschinell, Tag-Nacht-Rhythmus, 30 °C
HH 07 TNR 40 a	maschinell, Tag-Nacht-Rhythmus, 40 °C (Charge a)
HH 07 TNR 40 b	maschinell, Tag-Nacht-Rhythmus, 40 °C (Charge b)
Costa Rica 2008	
CR 08 So	Sonnentrocknung
CR 08 kT 50 a	maschinell, kontinuierlich, 50 °C (Charge a)
CR 08 kT 50 b	maschinell, kontinuierlich, 50 °C (Charge b)
CR 08 TNR 50	maschinell, Tag-Nacht-Rhythmus, 50 °C
CR 08 Stufe	maschinell, Stufentrocknung, 60 °C - 50 °C - 40 °C
Hamburg 2008	
HH 08 kT 50	maschinell, kontinuierlich, 50 °C
HH 08 TNR 50	maschinell, Tag-Nacht-Rhythmus, 50 °C
HH 08 Stufe	maschinell, Stufentrocknung, 60 °C - 50 °C - 40 °C

Außerdem wurden feuchte, entpulpte Rohkaffees in beiden Erntejahren per Luftfracht nach Hamburg versandt und an der Technischen Universität Hamburg-Harburg (HH) maschinell in nachgebauten Guardiola-Trocknern unter Anwendung vergleichbarer Methoden wie im Anbauland getrocknet. Im Erntejahr 2007 wurden auch hier von den Trocknungsvarianten „maschinelle, kontinuierliche Trocknung bei 40 °C“ sowie „maschinelle, den Tag-Nacht-Rhythmus simulierende Trocknung bei 40 °C“ jeweils zwei Chargen produziert (**Tab. 2.1**).

2.1.1.1 Röstungen unterschiedlich getrockneter Rohkaffeeproben

Die Röstungen der unterschiedlich getrockneten Rohkaffeeproben des Erntejahres 2007 wurden mit einem Kaffeeröster der Firma Probat bei 180 °C durchgeführt. Dabei wurde das Röstergebnis über die Farbintensität des gemahlten Pulvers im Vergleich zu einem von der Industrie zur Verfügung gestellten Röstmuster eingeordnet (**Kap. 5.1.10**). Die Rohkaffeeproben des Erntejahres 2008 wurden an der Technischen Universität Hamburg-Harburg bis zu einem definierten Farbwert geröstet.

2.1.1.2 Sensorische Untersuchungen von Röstkaffees und Kaffeegetränken

Die nach den Röstungen erhaltenen Röstkaffees des Erntejahres 2007 wurden gemahlen und mittels Dreiecksprüfungen auf Unterscheidbarkeit getestet (§64 LFGB Methode L 00.90-7, **Kap. 5.4.2**). Das Sensorikpanel musste dabei in Dreierreihen die jeweils abweichende Probe nach der „Forced Choice Methode“ bestimmen. Als Bezugsproben dienten dabei jeweils die maschinell, kontinuierlich bei 50 °C getrockneten Proben (kT 50, Standardtrocknung), da diese Bedingungen in der Regel bei der Trocknung in den Guardiolas angewandt werden (**Kap. 5.1.1**). Das Röstkaffeepulver jeder weiteren Trocknungsmethode wurde mindestens einmal auf einen signifikanten orthonasalen Geruchsunterschied gegenüber einem Röstkaffeepulver der Standardtrocknung getestet. Hierbei wurden nur solche Röstkaffeeproben miteinander verglichen, die am selben Ort getrocknet worden waren. Für eine signifikante Unterscheidbarkeit zweier Röstkaffeeproben wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse der Dreiecksprüfungen der Röstkaffeepulver sind in **Tabelle 2.2** zusammengefasst.

Tabelle 2.2 Ergebnisse der Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit verschiedener Röstkaffeepulver aus dem Jahr 2007.

Pulver 1 ^a	Pulver 2 ^a	Anzahl Teilnehmer	Richtige Antworten	Falsche Antworten	Signifikanzniveau α
CR 07 kT 50 b	CR 07 TNR 50	16	10	6	0,01 - 0,05
CR 07 kT 50 a	CR 07 TNR 40 a	16	9	7	0,05 - 0,10
CR 07 kT 50 b	CR 07 So b	16	9	7	0,05 - 0,10
CR 07 kT 50 b	CR 07 TNR 40 b	16	9	7	0,05 - 0,10
CR 07 kT 50 a	CR 07 So a	16	8	8	0,20
CR 07 kT 50 a	CR 07 TNR 50	16	7	9	> 0,20
HH 07 kT 50	HH 07 TNR 40 a	16	11	5	0,01
HH 07 kT 50	HH 07 kT 40 b	16	10	6	0,01 - 0,05
HH 07 kT 50	HH 07 kT 30	16	10	6	0,01 - 0,05
HH 07 kT 50	HH 07 TNR 40 b	16	10	6	0,01 - 0,05
HH 07 kT 50	HH 07 kT 40 a	16	9	7	0,05 - 0,10
HH 07 kT 50	HH 07 TNR 30	16	8	8	0,20

^a Probencodierung **Tabelle 2.1**.

Lediglich die Röstkaffees CR 07 kT 50 b und CR 07 TNR 50 wiesen eine Unterscheidbarkeit mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01 - 0,05$ auf. Vom Standardröstkaffee CR 07 kT 50 a hingegen war der Röstkaffee CR 07 TNR 50 nicht signifikant orthonasal unterscheidbar ($\alpha > 0,20$). Auch die Röstkaffees CR 07 So a, CR 07 So b, CR 07 TNR 40 a und CR 07 TNR 40 b waren vom Standardröstkaffee CR 07 kT 50 der Chargen a bzw. b nicht signifikant unterscheidbar. Bei den in Hamburg getrockneten Kaffees trat beim Vergleich der Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a eine Unterscheidbarkeit mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ auf. Die Röstkaffees HH 07 kT 40 b, HH 07 kT 30 sowie HH 07 TNR 40 b waren vom Standardröstkaffee mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01 - 0,05$ unterscheidbar. Die Röstkaffees HH 07 kT 40 a und HH 07 TNR 30 waren vom Standardröstkaffee HH 07 kT 50 nicht signifikant unterscheidbar.

Um festzustellen, ob die sensorische Unterscheidbarkeit der Röstkaffeepulver zum Standardröstkaffee (Signifikanzniveau $\alpha < 0,05$, **Tab. 2.2**) auch nach der Getränkezubereitung noch gegeben war, wurde aus den Röstkaffeepulvern CR 07 TNR 50, HH 07 TNR 40 a, HH 07 TNR 40 b, HH 07 kT 30 und HH 07 kT 40 b ein standardisiertes Kaffeegetränk hergestellt (Maschinenzubereitung, **Kap. 5.1.3**) und die sensorische

Unterscheidbarkeit zu den entsprechenden Kaffeegetränken aus den Standardröstkaffees (CR 07 kT 50 b, HH 07 kT 50) untersucht. Mit den auf Trinktemperatur temperierten Kaffeegetränken (60 °C) wurden hierfür dann ebenfalls Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit durchgeführt (**Tab. 2.3**).

Tabelle 2.3 Ergebnisse der Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit verschiedener Röstkaffeegetränke, hergestellt aus den Röstkaffeepulvern des Jahres 2007.

Getränk 1 ^a	Getränk 2 ^a	Anzahl Teilnehmer	Richtige Antworten	Falsche Antworten	Signifikanzniveau α
CR 07 kT 50 b	CR 07 TNR 50	13	3	10	> 0,20
HH 07 kT 50	HH 07 TNR 40 a	13	9	4	0,01
HH 07 kT 50	HH 07 TNR 40 b	12	7	5	0,10
HH 07 kT 50	HH 07 kT 30	12	5	7	> 0,20
HH 07 kT 50	HH 07 kT 40 b	13	5	8	> 0,20

^a Probencodierung **Tabelle 2.1**.

Zwischen den aus den Röstkaffees HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a zubereiteten Kaffeegetränken konnte eine Unterscheidbarkeit mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ festgestellt werden. Alle anderen Kaffeegetränke waren orthonasal nicht signifikant voneinander unterscheidbar (Signifikanzniveau $\alpha > 0,05$). Deshalb wurden die beiden Röstkaffees HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a für eine Untersuchung möglicher qualitativer Unterschiede in der Aromastoffzusammensetzung herangezogen. Der Unterschied in der Herstellung dieser beiden Proben bestand darin, dass der Rohkaffee HH 07 kT 50 ohne Pause bei 50 °C getrocknet wurde, während die Trocknung des Rohkaffees HH 07 TNR 40 a bei 40 °C analog der Tag-Nacht-Rhythmik regelmäßig unterbrochen wurde (**Tab. 2.1**).

2.1.1.3 Vergleichende Aromaextraktverdünnungsanalyse und vergleichende Headspace-Verdünnungsanalyse zweier Röstkaffees

Um das Aroma der Röstkaffeeproben auf molekularer Ebene charakterisieren und die festgestellten sensorischen Unterschiede klären zu können, wurde zunächst ein Screening auf aromaaktive Verbindungen mit Hilfe der Aromaextraktverdünnungs-

analyse (AEVA) und der Headspace-Verdünnungsanalyse (HVA) durchgeführt. Dabei wurden exemplarisch die beiden Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a, deren Getränke im Triangeltest ebenfalls orthonasal unterscheidbar waren (**Kap. 2.1.1.2**), jeweils durch eine vergleichende Aromaextraktverdünnungsanalyse (vAEVA) und eine vergleichende Headspace-Verdünnungsanalyse (vHVA) gegenübergestellt.

Zur Herstellung der Aromaextrakte wurden je 5 g Röstkaffeepulver zweimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert (**Kap. 5.5**). Die vereinigten organischen Extrakte wurden anschließend der Solvent Assisted Flavour Evaporation (SAFE, Engel et al. 1999) unterzogen, wobei die flüchtigen Bestandteile von den nicht flüchtigen Bestandteilen im Hochvakuum abgetrennt wurden. Das erhaltene Dichlormethandestillat wurde in die Fraktion der neutralen und basischen Verbindungen (neutral-basische Fraktion, NBF) und die Fraktion der sauren Verbindungen (saure Fraktion, SF) aufgetrennt. Beide Fraktionen wurden schonend auf 500 µl eingeeengt und mittels hochauflösender Gaschromatographie (HRGC, **Kap. 5.9.1**) unter Verwendung einer polaren Kapillarsäule (FFAP) vermessen. Die Detektion erfolgte simultan mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und Olfaktometrie (O), so dass die geruchsaktiven Bereiche im HRGC-FID-Chromatogramm markiert werden konnten. Für jede geruchsaktive Verbindung wurde dann der Retentionsindex (RI-Wert, **Kap. 5.7.1**) berechnet. Durch sukzessive Verdünnung der Fraktionen mit Lösungsmittel (1+1, V+V) und jeweilige Vermessung per HRGC-O wurde für jede geruchsaktive Verbindung zudem ein Flavour-Dilution-Faktor (FD-Faktor) ermittelt, welcher diejenige Verdünnungsstufe des Aromaextrakts angibt, bei der die Verbindung zuletzt olfaktorisch wahrgenommen werden konnte (**Kap. 5.6**).

Abbildung 2.1 zeigt das FID-Chromatogramm der NBF des Aromaextrakts des Röstkaffeepulvers HH 07 kT 50 in der zweiten Verdünnungsstufe (FD-Faktor 4). Die AEVA der NBF dieser Probe ergab 13 geruchsaktive Bereiche, die mit einem FD-Faktor ≥ 64 wahrgenommen werden konnten und deren Geruchsqualitäten in **Abbildung 2.1** markiert wurden.

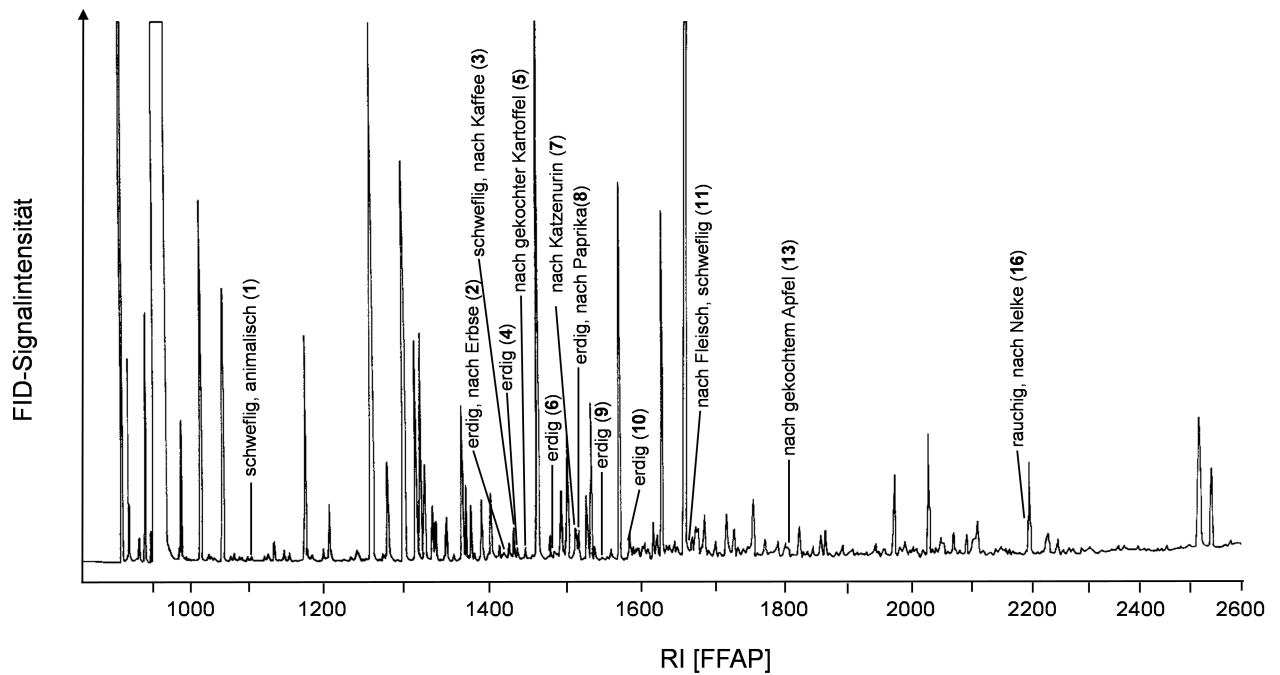


Abbildung 2.1 FID-Chromatogramm der zweiten Verdünnungsstufe (FD-Faktor 4) der neutral-basischen Fraktion des Röstkaffeepulvers HH 07 KT 50 mit 13 geruchsaktiven Bereichen, die einen FD-Faktor ≥ 64 aufwiesen.

Die in der NBF mindestens einer der beiden Aromaextrakte der Röstkaffeepulver HH 07 KT 50 und HH 07 TNR 40 a mit einem FD-Faktor ≥ 64 detektierten Bereiche, ihre Retentionsindices sowie die Unterschiede in den FD-Faktoren sind in **Tabelle 2.4** dargestellt. Den höchsten FD-Faktor im Röstkaffeepulver HH 07 KT 50 erreichte die erdig und nach Erbse riechende Verbindung Nr. 2 (FD 2048). Die schweflig und nach Kaffee riechende Verbindung Nr. 3 (FD 512) sowie die erdig riechenden Substanzen Nr. 6 (FD 1024), Nr. 9 (FD 512) und Nr. 10 (FD 512) und die erdig und nach Paprika riechende Verbindung Nr. 8 (FD 1024) wiesen ebenfalls hohe FD-Faktoren auf. Verbindung Nr. 5 roch nach gekochter Kartoffel und wurde mit einem FD-Faktor von 1024 detektiert. Substanz Nr. 13 (FD 512) zeichnete sich durch einen Geruch nach gekochtem Apfel aus. Mit FD 256 wurde die rauchig und nach Nelke riechende Verbindung Nr. 16 wahrgenommen. Die schweflig und animalisch riechende Verbindung Nr. 1 und die an Katzenurin erinnernde Verbindung Nr. 7 wiesen einen FD-Faktor von 128 auf. Des Weiteren wurden die erdig riechende Substanz Nr. 4 (FD 64) und die schweflig und nach Fleisch riechende Verbindung Nr. 11 (FD 64) wahrgenommen. Die NBF des Aromaextrakts des Röstkaffeepulvers HH 07 TNR 40 a

wies dieselben geruchsaktiven Verbindungen wie die des Röstkaffeepulvers HH 07 kT 50 auf. Durch die Berechnung der Unterschiede zwischen den FD-Faktoren ($|\Delta \text{FD}|$) konnte gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Röstkaffeepulvern vorlagen, da die maximale Abweichung bei lediglich einer Verdünnungsstufe lag.

Tabelle 2.4 Geruchsaktive Verbindungen (Flavour-Dilution(FD)-Faktor ≥ 64 in mindestens einem der beiden Extrakte) in den neutral-basischen Fraktionen der Röstkaffeepulverextrakte HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a.

Nr. ^a	Geruchsqualität ^b	RI-Wert FFAP ^c	FD-Faktor ^d		$ \Delta \text{FD} ^f$
			HH 07 kT 50 ^e	HH 07 TNR 40 a ^e	
1	schweflig, animalisch	1102	128	128	0
2	erdig, nach Erbse	1430	2048	2048	0
3	schweflig, nach Kaffee	1432	512	512	0
4	erdig	1436	64	64	0
5	nach gekochter Kartoffel	1452	1024	1024	0
6	erdig	1484	1024	512	1
7	nach Katzenurin	1514	128	128	0
8	erdig, nach Paprika	1517	1024	1024	0
9	erdig	1550	512	256	1
10	erdig	1583	512	512	0
11	nach Fleisch, schweflig	1663	64	64	0
13	nach gekochtem Apfel	1811	512	512	0
16	rauchig, nach Nelke	2203	256	256	0

^a Die Nummerierung der geruchsaktiven Verbindungen erfolgte in der Elutionsreihenfolge auf der Kapillarsäule FFAP.

^b Geruchsqualität, die während der HRGC-O am Sniffing-Port wahrgenommen wurde.

^c RI = Retentionsindex.

^d FD = Flavour Dilution; der FD-Faktor gibt diejenige Verdünnungsstufe der AEVA an, bei welcher der jeweilige Aromastoff zuletzt olfaktorisch wahrgenommen werden konnte.

^e Probencodierung **Tabelle 2.1**.

^f $|\Delta \text{FD}|$ gibt den Betrag des Unterschieds der FD-Faktoren an, wobei gilt: $\Delta \text{FD} = \ln_2(\text{FD HH 07 kT 50}) - \ln_2(\text{HH 07 TNR 40 a})$.

Abbildung 2.2 zeigt das FID-Chromatogramm der zweiten Verdünnungsstufe (FD-Faktor 4) der SF des Aromaextrakts des Röstkaffeepulvers HH 07 kT 50. Mit Hilfe der AEVA der SF dieses Röstkaffeearomaextrakts konnten sechs geruchsaktive

Bereiche, die einen FD-Faktor ≥ 64 aufwiesen, detektiert werden. Die Geruchsqualitäten dieser Bereiche sind in **Abbildung 2.2** gekennzeichnet.

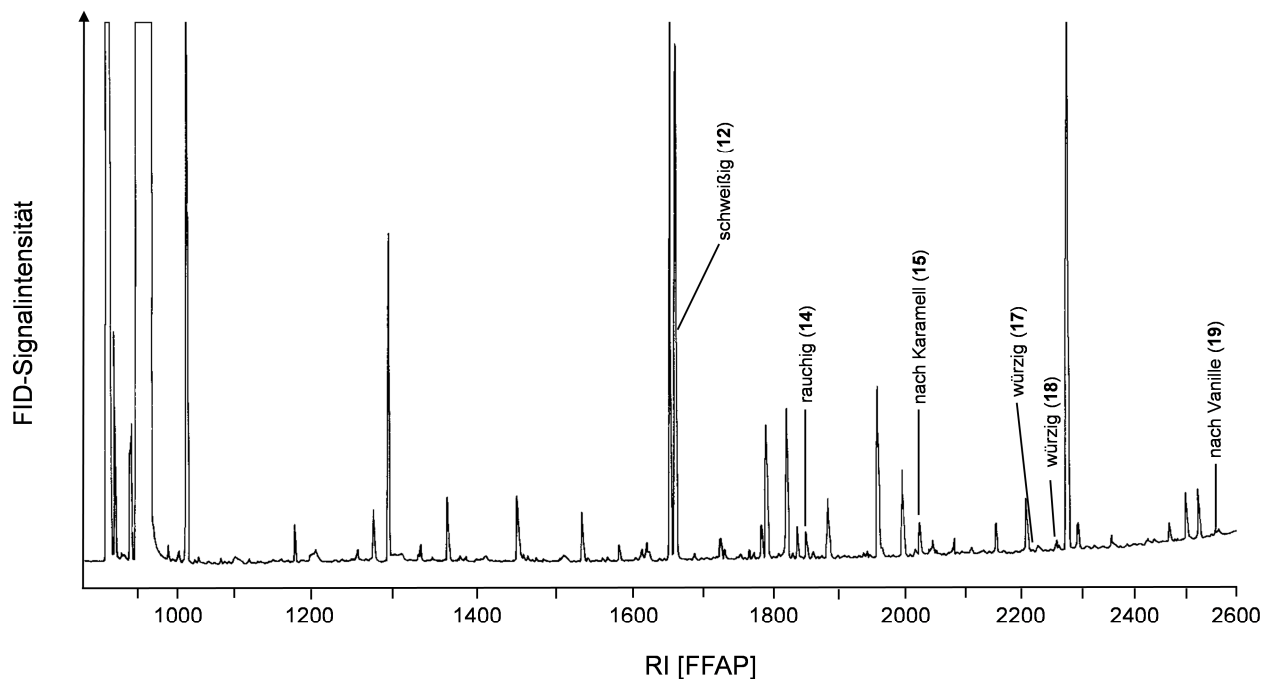


Abbildung 2.2 FID-Chromatogramm der zweiten Verdünnungsstufe (FD-Faktor 4) der sauren Fraktion des Röstkaffeepulvers HH 07 kT 50 mit sechs geruchsaktiven Bereichen, die einen FD-Faktor ≥ 64 aufwiesen.

Die in der SF mindestens einer der beiden Aromaextrakte der Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a mit einem FD-Faktor ≥ 64 detektierten Bereiche, ihre Retentionsindices sowie die Unterschiede in den FD-Faktoren sind in **Tabelle 2.5** dargestellt. Verbindung Nr. **12** wies mit einem schweißigen Geruch in der SF des Aromaextrakts des Röstkaffeepulvers HH 07 kT 50 den höchsten FD-Faktor (FD 256) auf. Weiterhin wurden die karamellartige Substanz Nr. **15** (FD 128), die zwei würzig riechenden Substanzen Nr. **17** (FD 128) und Nr. **18** (FD 64) sowie die nach Vanille riechende Verbindung Nr. **19** (FD 128) wahrgenommen. Mit einem FD-Faktor von 64 wurde die rauchig riechende Verbindung Nr. **14** detektiert. In der SF des Aromaextrakts des Röstkaffeepulvers HH 07 TNR 40 a wurden dieselben geruchsaktiven Verbindungen wahrgenommen. Die Berechnung der Unterschiede in den FD-Faktoren ergab auch hier eine maximale Abweichung von zwei Verdünnungsstufen und damit keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Röstkaffeepulvern.

Tabelle 2.5 Geruchsaktive Verbindungen (Flavour-Dilution(FD)-Faktor ≥ 64 in mindestens einem der beiden Extrakte) in der sauren Fraktion der Röstkaffeepulverextrakte HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a.

Nr. ^a	Geruchsqualität ^b	RI-Wert FFAP ^c	FD-Faktor ^d		Δ FD ^f
			HH 07 kT 50 ^e	HH 07 TNR 40 a ^e	
12	schweißig	1668	256	256	0
14	rauchig	1861	64	32	1
15	nach Karamell	2039	128	32	2
17	würzig	2206	128	128	0
18	würzig	2274	64	32	1
19	nach Vanille	2585	128	128	0

^a Die Nummerierung der geruchsaktiven Verbindungen erfolgte in der Elutionsreihenfolge auf der Kapillarsäule FFAP.

^b Geruchsqualität, die während der HRGC-O am Sniffing-Port wahrgenommen wurde.

^c RI = Retentionsindex.

^d FD = Flavour Dilution; der FD-Faktor gibt diejenige Verdünnungsstufe der AEVA an, bei welcher der jeweilige Aromastoff zuletzt olfaktorisch wahrgenommen werden konnte.

^e Probencodierung **Tabelle 2.1**.

^f | Δ FD| gibt den Betrag des Unterschieds der FD-Faktoren an, wobei gilt: Δ FD = $\ln_2(\text{FD HH 07 kT 50}) - \ln_2(\text{HH 07 TNR 40 a})$.

Da bei der AEVA leichtflüchtige Verbindungen meist nur unvollständig erfasst werden können, wurde mit beiden Röstkaffeepulvern zusätzlich eine vergleichende Headspace-Verdünnungsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde je 1 g Röstkaffeepulver in ein 120 ml-Headspacegefäß gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur äquilibriert (**Kap. 5.5.2**). Anschließend wurden 20 ml des Gasraumes über der Probe entnommen und über HRGC unter Verwendung einer unpolaren Kapillarsäule (DB-5) vermessen. Der Gaschromatograph war hierbei mit einer Kühlfalle ausgestattet, die das injizierte Gasvolumen vor Beginn der chromatographischen Trennung zunächst mit Hilfe von flüssigem Stickstoff kryofokussierte. Die Detektion erfolgte ebenfalls über FID und Olfaktometrie. Durch sukzessive Halbierung des zur HRGC-Messung entnommenen Gasvolumens wurde eine Abnahme der Mengen der geruchsaktiven Verbindungen erreicht. Somit konnten auch bei der HVA für jede Verbindung ein RI-Wert und ein FD-Faktor bestimmt werden. Mittels der vHVA beider Röstkaffeepulver konnten acht zusätzliche geruchsaktive Substanzen detektiert werden, die in mindestens einer der beiden Proben mit einem FD-Faktor ≥ 16 wahrgenommen wurden (**Tab. 2.6**).

Tabelle 2.6 Geruchsaktive Verbindungen (Flavour-Dilution(FD)-Faktor ≥ 16 in mindestens einem der beiden Röstkaffeepulver) bei der Headspace-Analyse der Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a.

Nr. ^a	Geruchsqualität ^b	RI-Wert DB-5 ^c	FD-Faktor ^d		Δ FD ^f
			HH 07 kT 50 ^e	HH 07 TNR 40 a ^e	
20	frisch, grün	485	64	32	1
21	schweflig, nach Kohl	497	16	16	0
22	fruchtig, frisch	527	32	32	0
23	malzig	571	256	128	1
24	nach Butter	595	512	512	0
25	malzig	656	256	256	0
26	malzig	666	128	128	0
27	nach Butter	699	64	128	1

^a Die Nummerierung der geruchsaktiven Verbindungen erfolgte in Fortsetzung der bei der vAEVA wahrgenommenen 19 Substanzen sowie der Elutionsreihenfolge auf der Kapillarsäule DB-5.

^b Geruchsqualität, die während der Headspace-HRGC-O am Sniffing-Port wahrgenommen wurde.

^c RI = Retentionsindex.

^d FD = Flavour Dilution; der FD-Faktor gibt diejenige Verdünnungsstufe der HVA an, bei welcher der jeweilige Aromastoff zuletzt olfaktorisch wahrgenommen werden konnte.

^e Probencodierung **Tabelle 2.1**.

^f | Δ FD| gibt den Betrag des Unterschieds der FD-Faktoren an, wobei gilt: Δ FD = $\ln_2(\text{FD HH 07 kT 50}) - \ln_2(\text{HH 07 TNR 40 a})$.

Die nach Butter riechende Verbindung Nr. **24** erreichte bei der HVA des Röstkaffeepulvers HH 07 kT 50 den höchsten FD-Faktor (FD 512). Die malzig riechenden Substanzen Nr. **23** (FD 256), Nr. **25** (FD 256) und Nr. **26** (FD 128) wiesen ebenfalls sehr hohe FD-Faktoren auf. Mit einem FD-Faktor von 64 wurden die frisch und grün riechende Verbindung Nr. **20** und die nach Butter riechende Substanz Nr. **27** wahrgenommen. Weiterhin konnten die fruchtig und frisch riechende Verbindung Nr. **22** (FD 32) und die an Schwefel und Kohl erinnernde Verbindung Nr. **21** (FD 16) detektiert werden. Bei der HVA des Röstkaffeepulvers HH 07 TNR 40 a wurden die gleichen flüchtigen Verbindungen detektiert, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 festgestellt wurden. Beim Vergleich der beiden Röstkaffeepulver waren somit weder über die vAEVA noch über die vHVA signifikante Unterschiede in den FD-Faktoren der geruchsaktiven Verbindungen feststellbar.

2.1.1.4 Identifizierungsexperimente

Zur Identifizierung der bei den Aromaextraktverdünnungsanalysen wahrgenommenen geruchsaktiven Verbindungen wurden die NBF und die SF der Aromaextrakte der beiden Röstkaffees mittels HRGC-O zusätzlich auf einer unpolaren stationären Phase (DB-5) vermessen und die RI-Werte berechnet. Anhand zahlreicher Studien zum Aroma von Röstkaffee der vergangenen Jahrzehnte sowie einer hauseigenen Datenbank führten die ermittelten Geruchsqualitäten und die RI-Werte der unbekannt geruchsaktiven Verbindungen zu einer Vorauswahl möglicher Substanzen, die für die Geruchseindrücke verantwortlich sein könnten.

Des Weiteren wurden für die geruchsaktiven Bereiche in den Fraktionen der Aromaextrakte nach gaschromatographischer Trennung auf zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität Massenspektren mit Elektronenstoßionisation (EI-Modus) und chemischer Ionisation (CI-Modus) aufgenommen (HRGC-MS, **Kap. 5.9.2**). Die entsprechenden, vorausgewählten Referenzaromastoffe wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Aromaextrakte per HRGC-O und HRGC-FID sowie HRGC-MS vermessen. Stimmt die unbekannte geruchsaktive Verbindung und ein Referenzaromastoff im Geruch, dem RI-Wert und den Massenspektren überein, so wurden abschließend die Geruchsqualitäten der Referenzverbindung und der unbekannt Substanz bei gleicher Signalintensität am FID verglichen. Bei Übereinstimmung der genannten Charakteristika von Referenzverbindung und unbekannter Verbindung galt diese als identifiziert (**Kap. 5.7**).

Die Identifizierung der leichtflüchtigen unbekannt aromaaktiven Verbindungen, die mittels HVA erhalten worden waren, erfolgte analog mit Hilfe eines Headspace-HRGC-MS-Geräts (**Kap. 5.9.2**).

Auf der Grundlage des beschriebenen Verfahrens konnten in der NBF beider Röstkaffeepulverextrakte die Verbindungen 3-Methyl-2-buten-1-thiol (Nr. **1**, schweflig, animalisch), 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin (Nr. **2**, erdig, nach Erbse), 2-Furanmethanthiol (Nr. **3**, schweflig, nach Kaffee), 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (Nr. **4**, erdig), 3-(Methylthio)propanal (Nr. **5**, nach gekochter Kartoffel), 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (Nr. **6**, erdig), 3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat (Nr. **7**, nach Katzenurin), 3-Isobutyl-

2-methoxypyrazin (Nr. **8**, erdig, nach Paprika), 2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin (Nr. **9**, erdig), 2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin (Nr. **10**, erdig), 3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol (Nr. **11**, nach Fleisch, schweflig), (*E*)- β -Damascenon (Nr. **13**, nach gekochtem Apfel) und 4-Ethenyl-2-methoxyphenol (Nr. **16**, rauchig, nach Nelke) identifiziert werden. Die in den SF beider Röstkaffeepulverextrakte wahrgenommenen Verbindungen wurden als 2-/3-Methylbutansäure (Nr. **12**, schweißig), 2-Methoxyphenol (Nr. **14**, rauchig), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(*2H*)-furanon (Nr. **15**, karamellartig), 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(*5H*)-furanon (Nr. **17**, würzig), 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(*5H*)-furanon (Nr. **18**, würzig) und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Nr. **19**, nach Vanille) identifiziert (**Tab. 2.7**).

Tabelle 2.7 Aromaaktive Verbindungen in den Lösungsmittel-extrakten der Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a (Flavour-Dilution(FD)-Faktor ≥ 64 in mindestens einem Extrakt).

Nr. ^a	Aromastoff ^b	Fraktion ^c	RI-Wert ^d		FD-Faktor ^e		Lit ^g
			FFAP	DB-5	HH 07 kT 50 ^f	HH 07 TNR 40 a ^f	
1	3-Methyl-2-buten-1-thiol	NBF	1102	818	128	128	H90
2	3-Isopropyl-2-methoxypyrazin	NBF	1430	1096	2048	2048	H90
3	2-Furanmethanthiol	NBF	1432	906	512	512	H90
4	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	NBF	1436	1082	64	64	H90
5	3-(Methylthio)propanal	NBF	1452	902	1024	1024	H90
6	2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	NBF	1484	1157	1024	512	B92
7	3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat	NBF	1514	1021	128	128	H90
8	3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	NBF	1517	1181	1024	1024	H90
9	2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin	NBF	1550	1105	512	256	C96
10	2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin	NBF	1583	1177	512	512	C96
11	3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol	NBF	1663	973	64	64	H90
12	2-/3-Methylbutansäure	SF	1668	888	256	256	H90
13	(<i>E</i>)- β -Damascenon	NBF	1811	1390	512	512	H90
14	2-Methoxyphenol	SF	1861	1091	64	32	H90
15	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	SF	2039	1057	128	32	H90
16	4-Ethenyl-2-methoxyphenol	NBF	2203	1319	256	256	H90
17	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon	SF	2206	1109	128	128	B92
18	5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5 <i>H</i>)-furanon	SF	2274	1187	64	32	B92
19	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	SF	2585	1407	128	128	B92

^a Die Nummerierung der geruchsaktiven Verbindungen erfolgte in der Elutionsreihenfolge auf der Kapillarsäule FFAP.

^b Der Aromastoff wurde nach den in **Kapitel 5.7** genannten Kriterien identifiziert.

^c Fraktion, in der der Aromastoff identifiziert wurde: NBF = neutral-basische Fraktion, SF = saure Fraktion.

^d RI = Retentionsindex.

^e FD = Flavour Dilution.

^f Probencodierung **Tabelle 2.1**.

^g Literaturstelle der Studie, in der der Aromastoff zum ersten Mal mittels HRGC-O in Röstkaffee identifiziert wurde:

H90 = Holscher et al., 1990; B92 = Blank et al., 1992 a; S95 = Semmelroch und Grosch, 1995; C96 = Czerny et al., 1996.

Bei den leichtflüchtigen geruchsaktiven Bestandteilen des Röstkaffeearomas handelte es sich um Ethanal (Nr. **20**, frisch, grün), Methanthiol (Nr. **21**, schweflig, nach Kohl), Propanal (Nr. **22**, fruchtig, frisch), Methylpropanal (Nr. **23**, malzig), Diacetyl (Nr. **24**, nach Butter), 3-Methylbutanal (Nr. **25**, malzig), 2-Methylbutanal (Nr. **26**, malzig) und 2,3-Pentandion (Nr. **27**, nach Butter, **Tab. 2.8**).

Tabelle 2.8 Aromaaktive Verbindungen im Headspace der Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a (Flavour-Dilution(FD)-Faktor ≥ 16 in mindestens einer Probe).

Nr. ^a	Aromastoff ^b	RI-Wert DB-5 ^c	FD-Faktor ^d		Lit ^f
			HH 07 kT 50 ^e	HH 07 TNR 40 a ^e	
20	Ethanal	485	64	32	S95
21	Methanthiol	497	16	16	H90
22	Propanal	527	32	32	S95
23	Methylpropanal	571	256	128	H90
24	Diacetyl	595	512	512	H90
25	3-Methylbutanal	656	256	256	H90
26	2-Methylbutanal	666	128	128	H90
27	2,3-Pentandion	699	64	128	H90

^a Die Nummerierung der geruchsaktiven Verbindungen erfolgte in Fortsetzung der bei der vAEVA wahrgenommenen 19 Substanzen sowie der Elutionsreihenfolge auf der Kapillarsäule DB-5.

^b Der Aromastoff wurde nach den in **Kapitel 5.7** genannten Kriterien identifiziert.

^c RI = Retentionsindex.

^d FD = Flavour Dilution.

^e Probencodierung **Tabelle 2.1**.

^f Literaturstelle der Studie, in der der Aromastoff zum ersten Mal mittels HRGC-O in Röstkaffee identifiziert wurde: H90 = Holscher et al., 1990; S95 = Semmelroch und Grosch, 1995.

2.1.1.5 Quantitative Bestimmung ausgewählter Schlüsselaromastoffe in Röstkaffees und Kaffegetränken

Bei den Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit konnte zwischen einigen Pulvern der unterschiedlich getrockneten und anschließend gerösteten Kaffees eine geringe Abweichung festgestellt werden (**Tab. 2.2** und **Tab. 2.3**). Das Screening auf aromaaktive Verbindungen in den Aromaextrakten der Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a zeigte jedoch weder qualitative Unterschiede der aromaaktiven

Verbindungen, noch signifikante Differenzen in den FD-Faktoren der beiden Röstkaffeepulver auf.

Um zu überprüfen, ob die sensorischen Wahrnehmungen mit quantitativen Daten korreliert werden können, wurden Röstkaffee-Schlüsselaromastoffe verschiedener Substanzklassen zur Quantifizierung in den in den **Tabellen 2.9** bis **2.12** aufgeführten Röstkaffeepulvern herangezogen: 2-Furanmethanthiol (Nr. **3**), 3-(Methylthio)propanal (Nr. **5**), 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (Nr. **6**), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (Nr. **15**), 4-Ethenyl-2-methoxyphenol (Nr. **16**), Diacetyl (Nr. **24**), 3-Methylbutanal (Nr. **25**) und 2-Methylbutanal (Nr. **26**).

Bei der HRGC-O-Analyse des Aromaextrakts eines aus dem Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 hergestellten Kaffeegetränks wurden keine zusätzlichen aromaaktiven Bereiche detektiert. Bereits Semmelroch und Grosch (1996, **Kap. 1.3.3**) zeigten, dass die Schlüsselaromastoffe von Röstkaffeepulvern und Kaffeegetränken identisch sind und die sensorisch wahrnehmbaren Unterschiede zwischen Röstkaffeepulvern und Kaffeegetränken lediglich auf zum Teil deutlich veränderte Konzentrationsverhältnisse zwischen den Schlüsselaromastoffen zurückzuführen sind. Deshalb wurden die Gehalte der oben genannten Aromastoffe in den aus den Röstkaffeepulvern HH 08 kT 50, HH 08 TNR 50 und HH 08 Stufe mit Hilfe einer Kaffeemaschine hergestellten Kaffeegetränken ebenfalls bestimmt.

Die Quantifizierung erfolgte mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA, **Kap. 5.8.1**), bei der für jeden Aromastoff ein stabilisotopenmarkiertes Analogon als interner Standard vor der Aufarbeitung zugesetzt wurde (**Kap. 5.8.3.1**). Als Standards wurden die in **Abbildung 2.3** dargestellten deuterierten bzw. ^{13}C -markierten Verbindungen eingesetzt.

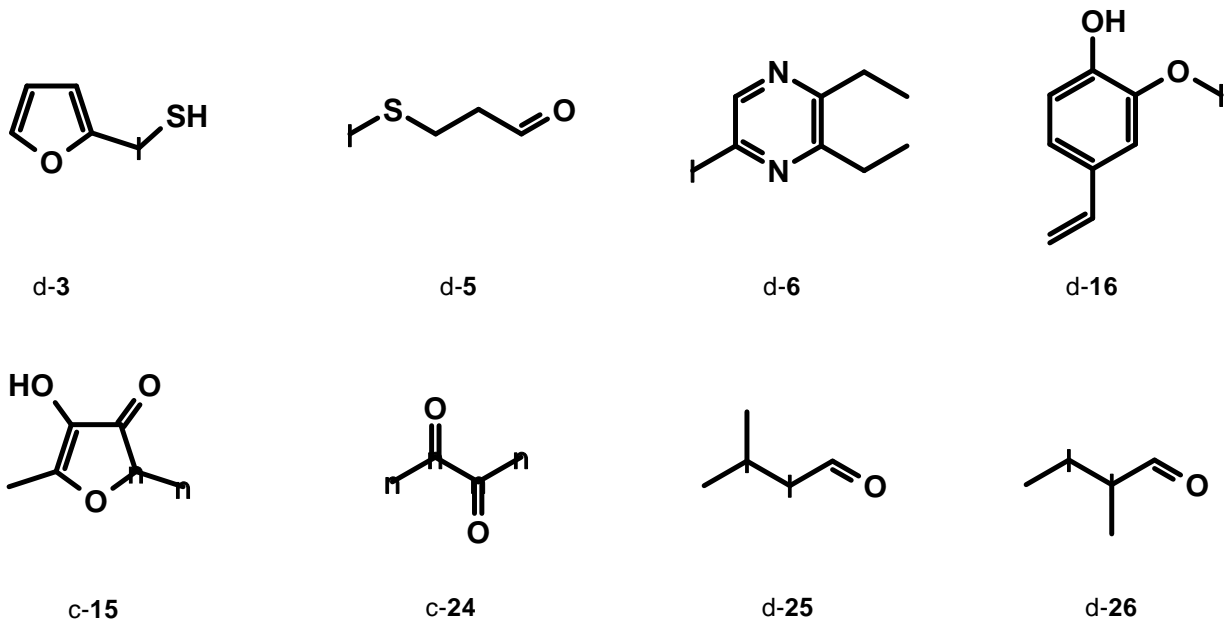


Abbildung 2.3 Isotopenmarkierte Standards für die Stabilisotopenverdünnungsanalyse (● C-Atom, dessen Wasserstoffatome ganz oder teilweise durch Deuteriumatome ersetzt wurden; ■ ^{13}C -Atom):

- d-3: [$^2\text{H}_2$]-2-Furanmethanthiol
- d-5: [$^2\text{H}_3$]-3-(Methylthio)propanal
- d-6: [$^2\text{H}_3$]-2,3-Diethyl-5-methylpyrazin
- d-16: [$^2\text{H}_3$]-4-Ethenyl-2-methoxyphenol
- c-15: [$^{13}\text{C}_2$]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon
- c-24: [$^{13}\text{C}_4$]-Diacetyl
- d-25: [$^2\text{H}_2$]-3-Methylbutanal
- d-26: [$^2\text{H}_2$]-2-Methylbutanal

Die leichtflüchtigen Aromastoffe 2- und 3-Methylbutanal wurden sowohl in den Kaffeepulvern als auch in den Kaffegetränken über ein Headspace-HRGC-MS/CI-System (**Kap. 5.9.2**) quantifiziert. Die anderen Aromastoffe wurden in beiden Matrices nach Lösungsmittelextraktion, SAFE und Konzentrierung des Destillats mittels HRGC/HRGC-MS/CI-Messung analysiert. Für die Quantifizierung von 2-Furanmethanthiol wurde der jeweilige destillierte und konzentrierte Aromaextrakt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (**Kap. 5.5.6**). Die den Aromastoff enthaltende Fraktion wurde anschließend konzentriert und zur Messung eingesetzt. Aus den bei den HRGC/HRGC-MS/CI-Messungen erhaltenen Peakflächenverhältnissen von

Analyt und Standard wurden die jeweiligen Konzentrationen der Aromastoffe analog **Kapitel 5.8.3.1** berechnet.

In den Röstkaffees des Erntejahrs 2007 wurden zunächst lediglich die fünf Aromastoffe 2-Furanmethanthiol, 3-(Methylthio)propanal, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol sowie 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon quantifiziert. Von den aus Costa Rica stammenden Rohkaffees wurden in der Sonne (CR 07 So b) oder maschinell getrocknete Kaffees ausgewählt. Die maschinelle Trocknung erfolgte entweder kontinuierlich bei 50°C (CR 07 kT 50 a und b) oder im Tag-Nacht-Rhythmus bei 50 °C (CR 07 TNR 50). Die aus diesen Rohkaffees erhaltenen Röstkaffeepulver unterschieden sich kaum in ihren Gehalten an 4-Ethenyl-2-methoxyphenol sowie 3-(Methylthio)propanal (**Tab. 2.9**). Die Röstkaffeepulver CR 07 kT 50 b und CR 07 So b wiesen jedoch deutlich höhere Gehalte an 2-Furanmethanthiol (1050 bzw. 1180 µg/kg) und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (190 bzw. 194 µg/kg) sowie niedrigere Konzentrationen an 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (40400 bzw. 33900 µg/kg) im Vergleich zu den Röstkaffeepulvern CR 07 kT 50 a und CR 07 TNR 50 auf. Auffällig waren hierbei insbesondere die teilweise signifikanten Unterschiede in den Aromastoffgehalten zwischen den beiden Chargen des Röstkaffeepulvers CR 07 kT 50, die aus mit der gleichen Technologie getrockneten Rohkaffees erhalten worden waren. Die Differenzen in den Aromastoffgehalten konnten außerdem mit den Ergebnissen der Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit (**Tab. 2.2**) korreliert werden. Beispielsweise waren die Röstkaffeepulver CR 07 kT 50 a und CR 07 TNR 50 orthonasal nicht signifikant unterscheidbar und wiesen auch ähnliche Aromastoffgehalte auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Röstkaffeepulver CR 07 kT 50 b und CR 07 TNR 50 deutliche Unterschiede in den Gehalten an 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, 2-Furanmethanthiol sowie 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin und konnten auch orthonasal signifikant unterschieden werden.

Tabelle 2.9 Konzentrationen von fünf Schlüsselaromastoffen in vier Röstkaffee-pulvern, die aus in Costa Rica im Jahr 2007 unterschiedlich getrockneten Rohkaffees erhalten wurden.

Aromastoff	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] ^a in CR 07 ^b			
	kT 50 a	kT 50 b	So b	TNR 50
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	48300	40400	33900	50200
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	23200	28700	24200	25300
2-Furanmethanthiol	548	1050	1180	766
3-(Methylthio)propanal	103	91,5	94,2	99,1
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	90,5	190	194	73,9

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

^b Probencodierung **Tabelle 2.1**.

Die in Hamburg bearbeiteten Rohkaffees wurden maschinell getrocknet. Die Trocknung der ausgewählten Rohkaffees erfolgte einerseits kontinuierlich bei 40 °C (HH 07 kT 40 b) oder bei 50 °C (HH 07 kT 50) und andererseits im Tag-Nacht-Rhythmus bei 40 °C (HH 07 TNR 40 a und b). Die aus diesen Rohkaffees hergestellten Röstkaffeepulver (**Tab. 2.10**) wiesen nur geringe Unterschiede in den Gehalten an 4-Ethenyl-2-methoxyphenol, 2-Furanmethanthiol und 3-(Methylthio)propanal auf. Das Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 zeigte im Vergleich zu den anderen drei Röstkaffeepulvern mit einem Gehalt von 172 $\mu\text{g}/\text{kg}$ eine erhöhte Konzentration an 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin. Das Röstkaffeepulver HH 07 TNR 40 b dagegen fiel mit 73500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durch einen deutlich höheren Gehalt an 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon auf, womit es sich auch signifikant vom Röstkaffeepulver HH 07 TNR 40 a, das aus einem mit der gleichen Methode getrockneten Rohkaffees erhalten worden war, unterschied (44300 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Die Ergebnisse der Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit (**Tab. 2.2**) konnten bei diesen Röstkaffeepulvern somit lediglich mit den Konzentrationsunterschieden von 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin oder 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon korreliert werden.

Tabelle 2.10 Konzentrationen von fünf Schlüsselaromastoffen in vier Röstkaffee-pulvern, die aus in Hamburg im Jahr 2007 unterschiedlich getrockneten Rohkaffees erhalten wurden.

Aromastoff	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] ^a in HH 07 ^b			
	kT 50	TNR 40 a	TNR 40 b	kT 40 b
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	42200	44300	73500	40400
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	26100	27000	30700	27300
2-Furanmethanthiol	917	790	916	895
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	172	74,4	96,9	88,0
3-(Methylthio)propanal	114	94,2	102	113

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

^b Probencodierung **Tabelle 2.1**.

Bei den Röstkaffees des Erntejahrs 2008 wurden zusätzlich auch die leichtflüchtigen Aromastoffe 2- und 3-Methylbutanal sowie Diacetyl quantifiziert. Von den aus Costa Rica stammenden Rohkaffees wurden solche Rohkaffees ausgewählt, die in der Sonne (CR 08 So) oder maschinell getrocknet worden waren. Die maschinelle Trocknung erfolgte kontinuierlich bei 50 °C (CR 08 kT 50 a und b), kontinuierlich, aber mit abnehmender Temperatur bei 60 bis 40 °C (CR 08 Stufe) oder im Tag-Nacht-Rhythmus bei 50 °C (CR 08 TNR 50). Beim Vergleich der aus diesen Rohkaffees erhaltenen Röstkaffeepulver (**Tab. 2.11**) wurde ersichtlich, dass in den Gehalten an 4-Ethenyl-2-methoxyphenol, 2-Furanmethanthiol sowie 3-(Methylthio)propanal kaum Unterschiede auftraten. Mit 104000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zeigte das Röstkaffeepulver CR 08 kT 50 a die niedrigste Konzentration an 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, wohingegen das Röstkaffeepulver CR 08 So mit 129000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ den höchsten Gehalt aufwies. Das Röstkaffeepulver CR 08 Stufe enthielt die geringsten Gehalte an Diacetyl (18400 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und darüber hinaus ebenso wie das Röstkaffeepulver CR 08 kT 50 a deutlich niedrigere Gehalte an 2-Methylbutanal (jeweils 1040 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und 3-Methylbutanal (803 bzw. 798 $\mu\text{g}/\text{kg}$) als die anderen drei Röstkaffeepulver, die zwar aus Rohkaffees unterschiedlichster Trocknungstechnologien hergestellt worden waren, aber jeweils ähnliche Gehalte der beiden Streckeraldehyde aufwiesen. Die Röstkaffeepulver CR 08 kT 50 b (114 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und CR 08 So (107 $\mu\text{g}/\text{kg}$) wiesen die geringsten Konzentrationen des Aromastoffs 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin auf, während die drei anderen Röstkaffees sehr ähnliche Gehalte des Pyrazins enthielten. Auffällig waren die deutlichen Unterschiede in den Gehalten der Aromastoffe 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon,

2- und 3-Methylbutanal sowie 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin der beiden Chargen des Röstkaffeepulvers CR 08 kT 50.

Tabelle 2.11 Konzentrationen von acht Schlüsselaromastoffen in fünf Röstkaffeepulvern, die aus in Costa Rica im Jahr 2008 unterschiedlich getrockneten Rohkaffees erhalten wurden.

Aromastoff	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] ^a in CR 08 ^b				
	kT 50 a	kT 50 b	Stufe	TNR 50	So
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	104000	121000	113000	123000	129000
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	37100	38300	38100	37900	38000
Diacetyl	22900	25200	18400	23700	24300
2-Furanmethanthiol	1110	1120	1270	1350	1180
2-Methylbutanal	1040	2060	1040	1760	2040
3-Methylbutanal	798	1500	803	1450	1410
3-(Methylthio)propanal	618	567	550	609	627
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	161	114	160	156	107

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

^b Probencodierung **Tabelle 2.1**.

Die in Hamburg behandelten Rohkaffees wurden maschinell entweder kontinuierlich bei 50 °C (HH 08 kT 50), kontinuierlich, aber mit abnehmender Temperatur bei 60 bis 40 °C (HH 08 Stufe) oder im Tag-Nacht-Rhythmus bei 50 °C (HH 08 TNR 50) getrocknet. Die aus diesen Rohkaffees hergestellten Röstkaffeepulver (**Tab. 2.12**) zeigten kaum Unterschiede in den Gehalten an 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol sowie 3-(Methylthio)propanal. Das Röstkaffeepulver HH 08 Stufe wies die höchsten Konzentrationen an 2-Methylbutanal (4460 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 3-Methylbutanal (3550 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 2-Furanmethanthiol (1370 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (533 $\mu\text{g}/\text{kg}$) auf, während das Röstkaffeepulver HH 08 kT 50 die niedrigsten Gehalte an Diacetyl (20800 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 2-Methylbutanal (3750 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 2-Furanmethanthiol (932 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (282 $\mu\text{g}/\text{kg}$) zeigte.

Tabelle 2.12 Konzentrationen von acht Schlüsselaromastoffen in drei Röstkaffee-pulvern, die aus in Hamburg im Jahr 2008 unterschiedlich getrockneten Rohkaffees erhalten wurden.

Aromastoff	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] ^a in HH 08 ^b		
	kT 50	TNR 50	Stufe
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	114000	110000	116000
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	41100	44100	42700
Diacetyl	20800	31800	29800
2-Methylbutanal	3750	3960	4460
3-Methylbutanal	3240	3170	3550
2-Furanmethanthiol	932	1100	1370
3-(Methylthio)propanal	681	579	639
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	282	351	533

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

^b Probencodierung **Tabelle 2.1**.

Aus den drei letztgenannten Röstkaffeepulvern wurden außerdem Kaffeegetränke mit einer Kaffeemaschine (**Kap. 5.1.3**) zubereitet und darin die Gehalte der auch in den Röstkaffeepulvern quantifizierten Schlüsselaromastoffe bestimmt (**Tab. 2.13**). Beim Vergleich der Aromastoffgehalte in den Kaffeegetränken fiel zunächst auf, dass die bei den Röstkaffeepulvern festgestellten Tendenzen in den Kaffeegetränken nicht wiedergefunden werden konnten. Das aus dem Röstkaffeepulver HH 08 TNR 50 hergestellte Kaffeegetränk zeigte die höchsten Gehalte an 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (4020 $\mu\text{g}/\text{l}$), 4-Ethenyl-2-methoxyphenol (926 $\mu\text{g}/\text{l}$), Diacetyl (937 $\mu\text{g}/\text{l}$), 3-Methylbutanal (101 $\mu\text{g}/\text{l}$), 2-Methylbutanal (99,0 $\mu\text{g}/\text{l}$) und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (1,3 $\mu\text{g}/\text{l}$), während bei den entsprechenden Röstkaffeepulvern die Probe HH 08 Stufe jeweils die höchsten Konzentrationen an 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, 2-Furanmethanthiol sowie 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin aufwies (**Tab. 2.12**). Für 3-(Methylthio)propanal und 2-Furanmethanthiol ließen sich zwischen den drei untersuchten Getränken nur sehr geringe Unterschiede feststellen.

Tabelle 2.13 Konzentrationen von acht Schlüsselaromastoffen in drei Kaffeegetränken, die aus in Hamburg im Jahr 2008 unterschiedlich getrockneten Rohkaffees hergestellt wurden.

Aromastoff	Konzentration [$\mu\text{g/l}$] ^a in HH 08 ^b		
	kT 50	TNR 50	Stufe
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	3380	4020	3370
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	691	926	838
Diacetyl	636	937	641
3-Methylbutanal	82,4	101	88,2
2-Methylbutanal	77,0	99,0	76,8
3-(Methylthio)propanal	19,6	19,9	21,8
2-Furanmethanthiol	10,4	9,3	12,6
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	0,8	1,3	0,9

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

^b Probencodierung **Tabelle 2.1**.

2.1.1.6 Unterschiede in den Aromastoffgehalten einzelner Röstkaffeebohnen

Um die Schwankungsbreite von Kaffeearomastoffen zwischen einzelnen Bohnen einer Röstkaffeeprobe darzustellen, wurden fünf einzelne Kaffeebohnen eines frisch gerösteten Kaffees (HH 08 kT 50), die nach visueller Prüfung einen vergleichbaren Farbton und eine ähnliche Größe besaßen, separat gemahlen. Anschließend wurden die Gehalte der Aromastoffe 2-Furanmethanthiol (Nr. **3**), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (Nr. **15**), Diacetyl (Nr. **24**) und 2-Methylbutanal (Nr. **26**) über SIVA quantifiziert. Nach zweimaliger Extraktion der gemahlenden Kaffeebohnen (je 150 bis 200 mg) wurden die Lösungsmittelextrakte mittels SAFE destilliert, konzentriert und mittels HRGC/HRGC-MS/CI bzw. für 2-Methylbutanal mittels Flüssiginjektion am Headspace-HRGC-MS/CI (**Kap. 5.9.1.2**) vermessen. Wie die Ergebnisse in **Tabelle 2.14** verdeutlichen, wiesen die fünf Bohnen quantitative Unterschiede in den Verbindungen 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon von bis zu 22300 $\mu\text{g/kg}$, Diacetyl von bis zu 4700 $\mu\text{g/kg}$, 2-Methylbutanal von bis zu 1970 $\mu\text{g/kg}$ und 2-Furanmethanthiol von bis zu 180 $\mu\text{g/kg}$ auf. Die aus den Gehalten der Einzelbohnen berechneten Mittelwerte wurden weiterhin mit den jeweiligen Konzentrationen der Aromastoffe im Röstkaffeepulver HH 08 kT 50 (**Tab. 2.12**) verglichen. Der Vergleich des Mittelwertes der Aromastoffgehalte in fünf Einzelbohnen mit den Gehalten im Kaffeepulver, welches

aus einer Vielzahl an Röstkaffeebohnen gewonnen wurde, zeigte, dass die Konzentrationen von Röstkaffeearomastoffen innerhalb eines Röstguts deutlichen Schwankungen unterworfen sind (**Tab. 2.14**).

Tabelle 2.14 Konzentrationen von vier Aromastoffen in fünf einzelnen Kaffeebohnen einer Röstkaffeecharge (HH 08 kT 50, Probencodierung **Tab. 2.1**) und Vergleich des Mittelwerts der fünf Einzelbohnen mit der Konzentration im Röstkaffeepulver (**Tab. 2.12**).

Probe	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	Diacetyl	2-Methylbutanal	2-Furanmethanthiol
Bohne 1	68600	25800	4030	560
Bohne 2	69600	22800	3530	512
Bohne 3	75700	22200	4050	414
Bohne 4	79700	24200	4330	594
Bohne 5	90900	21100	5500	531
Mittelwert ^a	76900	23200	4290	522
Pulver ^b	114000	20800	3750	932

^a Mittelwert der Konzentrationen der Aromastoffe in den fünf Einzelbohnen.

^b Konzentration im Röstkaffeepulver HH 08 kT 50 (**Tab. 2.12**).

Zusammenfassend war festzustellen, dass keine der untersuchten Rohkaffeetrocknungsvarianten eine eindeutige Tendenz bezüglich der Aromastoffgehalte der daraus gewonnenen Röstkaffees und Kaffeegetränke zur Folge hatte und die jeweils höchsten Aromastoffgehalte nicht mit der Verwendung einer Trocknungstechnologie korreliert werden konnten. Dies wurde durch den Vergleich verschiedener Chargen einer Trocknungsvariante bekräftigt, die deutlich unterschiedliche Aromastoffgehalte aufwiesen.

2.1.2 Einfluss von Extraktionstechniken

Das Prinzip der Herstellung von Kaffeegetränken beruht auf der Extraktion von Röstkaffeepulver mit heißem Wasser oder Wasserdampf. Durch verschiedene Extraktionstechniken, die sich beispielsweise in der Kontaktzeit zwischen Wasser und Röstkaffeepulver unterscheiden, lässt sich eine Vielfalt an unterschiedlichen Kaffeegetränken herstellen. Um den Einfluss der verschiedenen Zubereitungsmethoden auf die Aromastoffzusammensetzung eines Kaffeegetränks festzustellen, wurden aus mehreren Röstkaffeepulvern jeweils mit einer Kaffeemaschine, einer Stempelkanne, einem Espressotopf und einer Mokkakanne Kaffeegetränke zubereitet (**Kap. 5.1.3**) und anschließend wichtige Aromastoffe quantifiziert. Es wurden hierfür drei sortenreine Röstkaffeepulver unterschiedlicher Herkunft verwendet. Diese hatten gegenüber handelsüblichen Röstkaffeeblands den Vorteil, dass sie aus lediglich einer Sorte Rohkaffee geröstet worden waren.

2.1.2.1 Sensorische Untersuchungen unterschiedlich zubereiteter Kaffeegetränke

Für die sensorischen Untersuchungen wurden aus einem sortenreinen Röstkaffeepulver aus Costa Rica vier verschiedene Kaffeegetränke frisch zubereitet (**Kap. 5.1.3**). Mit den auf Trinktemperatur temperierten Kaffeegetränken (60 °C) wurden anschließend Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit durchgeführt (§ 64 LFGB Methode L 00.90-7, **Kap. 5.4.2**). Das Sensorikpanel musste dabei in Dreierreihen die jeweils abweichende Probe nach der „Forced Choice Methode“ bestimmen.

Das in der Kaffeemaschine zubereitete Getränk war orthonasal hochsignifikant vom Getränk aus der Stempelkanne ($\alpha < 0,001$) und dem Espresso ($\alpha = 0,001$) unterscheidbar (**Tab. 2.15**). Die orthonasale Unterscheidbarkeit von Mokka und in der Kaffeemaschine zubereitetem Getränk hatte ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01 - 0,05$.

Tabelle 2.15 Ergebnisse der Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit verschieden hergestellter Kaffeegetränke aus einer Röstkaffeecharge.

Getränk 1	Getränk 2	Anzahl Teilnehmer	Richtige Antworten	Falsche Antworten	Signifikanzniveau α
Kaffeemaschine	Stempelkanne	18	16	2	< 0,001
Kaffeemaschine	Espresso	18	13	5	0,001
Kaffeemaschine	Mokka	18	11	7	0,01 - 0,05

2.1.2.2 Quantitative Bestimmungen ausgewählter Schlüsselaromastoffe in verschiedenen Kaffeegetränken und Berechnung von Extraktionsraten

Um quantitative Unterschiede der wichtigsten Aromastoffe verschieden zubereiteter Kaffeegetränke zu bestimmen, wurden zunächst aus drei verschiedenen, sortenreinen Röstkaffeepulvern aus Costa Rica, Kenia und Papua-Neuguinea jeweils vier Kaffeegetränke zubereitet (**Kap. 5.1.3**). Anschließend wurden sowohl in den Röstkaffeepulvern als auch in den daraus zubereiteten Kaffeegetränken zehn Schlüsselaromastoffe mittels SIVA (**Kap. 5.8.1**) quantifiziert. Neben den in **Abbildung 2.3** dargestellten isotopenmarkierten Verbindungen wurden zusätzlich [$^2\text{H}_3$]-2-Methoxyphenol (d-14), [$^2\text{H}_3$]-4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (d-19) und [$^{13}\text{C}_2$]-2,3-Pentandion (c-27) verwendet (**Abb. 2.4**).

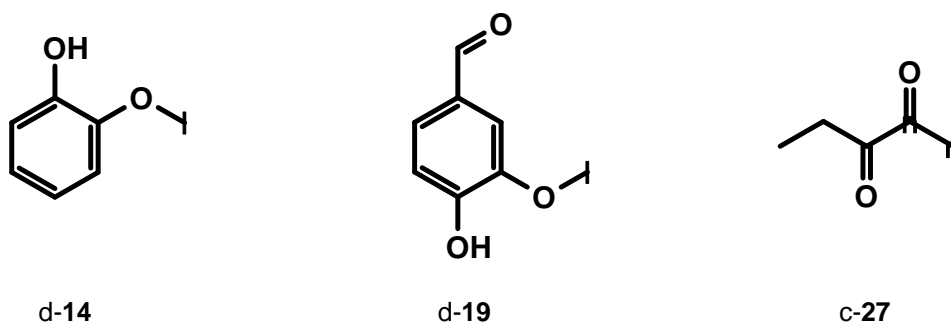


Abbildung 2.4 Isotopenmarkierte Standards für die Stabilisotopenverdünnungsanalyse (● C-Atom, dessen Wasserstoffatome ganz oder teilweise durch Deuteriumatome ersetzt wurden; ■ ^{13}C -Atom):
 d-14: [$^2\text{H}_3$]-2-Methoxyphenol
 d-19: [$^2\text{H}_3$]-4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd
 c-27: [$^{13}\text{C}_2$]-2,3-Pentandion

Die Aufarbeitungen der Röstkaffeepulver und Kaffeegetränke erfolgten analog **Kapitel 2.1.1.5** mittels Lösungsmittlextraktion und anschließender SAFE-Destillation. Dabei wurde 2-Furanmethanthiol aus den Kaffeegetränken mit Hilfe einer Mischung aus n-Pentan und Diethylether extrahiert. Zur Extraktion von 3-(Methylthio)propanal und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin wurde Dichlormethan verwendet (**Kap. 5.5**). Der Gehalt von 2-Methylbutanal in den Röstkaffeepulvern und Kaffeegetränken wurde mittels Headspace-HRGC-MS bestimmt.

Alle Kaffeegetränke wurden unabhängig von der Zubereitungsmethode stets mit der gleichen Menge an Kaffeepulver und Wasser hergestellt, um für jeden Aromastoff die Abhängigkeit seines Gehalts ausschließlich von der jeweils angewandten Extraktionsmethode darstellen zu können. Um die quantitativen Daten eines Aromastoffs in verschiedenen Kaffeegetränken in Relation stellen zu können, wurden außerdem die jeweiligen Extraktionsraten der Substanzen berechnet (**Kap. 5.8.3.5**).

Die Quantifizierung verdeutlichte, dass die Gehalte der zehn Aromastoffe in einem Bereich von 80 µg/kg bis 80 mg/kg in den drei Röstkaffeepulvern auftraten (**Tab. 2.16**).

Tabelle 2.16 Konzentrationen von zehn Aromastoffen in drei sortenreinen Röstkaffeepulvern unterschiedlicher Herkunft (Costa Rica (CR), Kenia (KEN), Papua Neuguinea (PAP)).

Aromastoff	Konzentration [µg/kg] im Röstkaffeepulver ^a		
	CR	KEN	PAP
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	67900	81500	68200
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	54500	61800	49600
2,3-Pentandion	24300	26300	24700
Diacetyl	21200	32400	25300
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	5060	5340	3600
2-Methoxyphenol	3790	4070	4120
2-Methylbutanal	3690	4690	2520
2-Furanmethanthiol	915	732	553
3-(Methylthio)propanal	370	371	371
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	143	81	119

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens ± 10 %.

Weiterhin wurde ersichtlich, dass die Konzentrationsunterschiede eines Aromastoffs zwischen den Röstkaffees verschiedener Herkunft unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Während beispielsweise 2,3-Pentandion oder 3-(Methylthio)propanal einen ähnlichen Gehalt in den drei Röstkaffees aufwiesen, waren die Unterschiede bei Diacetyl oder 2-Furanmethanthiol deutlich erkennbar.

Für die Gegenüberstellung der Aromastoffgehalte der Röstkaffeepulver und der daraus zubereiteten Kaffeegetränke wurden die Konzentrationen der Aromastoffe pro 54 g Röstkaffeepulver angegeben, da diese Menge zur Herstellung von jeweils einem Liter Kaffeegetränk verwendet wurde. Ein Vergleich der Gehalte der beiden Streckeraldehyde 2-Methylbutanal und 3-(Methylthio)propanal (**Tab. 2.17**) zeigte, dass 3-(Methylthio)propanal in den Röstkaffeepulvern und Kaffeegetränken in deutlich niedrigeren Konzentrationen vorlag als 2-Methylbutanal. Die höchsten Gehalte an 3-(Methylthio)propanal wurden jeweils in den im Espressotopf und in der Stempelkanne zubereiteten Kaffeegetränken festgestellt. Für 2-Methylbutanal wurde jeweils im Stempelkannengetränk die höchste Konzentration ermittelt.

Tabelle 2.17 Konzentrationen von 2-Methylbutanal und 3-(Methylthio)propanal in je 54 g Röstkaffeepulver aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) und jeweils vier daraus zubereiteten Kaffeegetränken.

Probe	Konzentration [$\mu\text{g}/54 \text{ g Kaffeeepulver}^{\text{a}}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l Kaffeegetränk}^{\text{b}}$]					
	2-Methylbutanal			3-(Methylthio)propanal		
	CR	KEN	PAP	CR	KEN	PAP
Kaffeepulver	199	253	136	20,0	20,0	20,0
Maschine	169	130	84,3	16,9	16,4	16,2
Stempelkanne	321	339	241	18,8	19,7	17,4
Espresso	170	130	106	17,8	20,3	18,9
Mokka	86,8	63,9	56,2	14,0	14,3	14,7

^a Zur Herstellung eines Liters Kaffeegetränk wurden 54 g Röstkaffeepulver verwendet (**Kap. 5.1.3**).

^b Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10 \%$.

Diacetyl und 2,3-Pentandion lagen in den untersuchten Röstkaffeepulvern in vergleichbaren Konzentrationen vor (**Tab. 2.18**). In den jeweils aus den Röstkaffeepulvern zubereiteten Kaffeegetränken lagen die Gehalte an Diacetyl jedoch deutlich über den Gehalten an 2,3-Pentandion. Beide Aromastoffe wiesen stets die höchsten Gehalte in den mit der Stempelkanne zubereiteten Kaffeegetränken auf, während in den in der Kaffeemaschine gekochten Getränken tendenziell die niedrigsten Gehalte der beiden Aromastoffe auftraten.

Tabelle 2.18 Konzentrationen von Diacetyl und 2,3-Pentandion in je 54 g Röstkaffeepulver aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) und jeweils vier daraus zubereiteten Kaffeegetränken.

Probe	Konzentration [$\mu\text{g}/54 \text{ g Pulver}^{\text{a}}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l Getränk}^{\text{b}}$]					
	Diacetyl			2,3-Pentandion		
	CR	KEN	PAP	CR	KEN	PAP
Kaffeepulver	1140	1750	1370	1310	1420	1330
Maschine	702	1260	1210	564	689	738
Stempelkanne	1050	1600	1330	897	1010	862
Espresso	843	1420	1260	622	740	800
Mokka	1020	1530	859	712	718	419

^a Zur Herstellung eines Liters Kaffeegetränk wurden 54 g Röstkaffeepulver verwendet (**Kap. 5.1.3**).

^b Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10 \%$.

Tabelle 2.19 verdeutlicht, dass 2-Furanmethanthiol in den Röstkaffeepulvern verschiedener Herkunft deutlich unterschiedliche Gehalte aufwies (29,9 bis 49,4 $\mu\text{g}/54 \text{ g}$). Dies spiegelte sich auch in den jeweils daraus zubereiteten Getränken wider. Die höchsten Konzentrationen an 2-Furanmethanthiol zeigten dabei für alle drei Röstkaffees jeweils die in der Stempelkanne zubereiteten Kaffeegetränke, die niedrigsten Gehalte jeweils die drei Espresso.

Tabelle 2.19 Konzentrationen von 2-Furanmethanthiol in je 54 g Röstkaffeepulver aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) und jeweils vier daraus zubereiteten Kaffeegetränken.

Probe	Konzentration [$\mu\text{g}/54 \text{ g Pulver}^{\text{a}}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l Getränk}^{\text{b}}$]		
	CR	KEN	PAP
Kaffeepulver	49,4	39,5	29,9
Maschine	11,3	9,1	6,9
Stempelkanne	13,0	10,1	7,5
Espresso	6,6	4,9	4,5
Mokka	8,5	7,2	6,2

^a Zur Herstellung eines Liters Kaffeegetränk wurden 54 g Röstkaffeepulver verwendet (**Kap. 5.1.3**).

^b Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10 \%$.

Die Konzentrationen von 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin lagen in den Röstkaffeepulvern in einem Bereich von 4,4 bis 7,4 $\mu\text{g}/54 \text{ g}$ und in den daraus zubereiteten Kaffeegetränken lediglich zwischen 1,0 und 3,8 $\mu\text{g}/\text{l}$ (**Tab. 2.20**). Die mit der Stempelkanne zubereiteten Getränke wiesen dabei jeweils die höchsten Gehalte des Aromastoffs auf, während die Konzentrationen in den Mokkagetränken jeweils am niedrigsten waren.

Tabelle 2.20 Konzentrationen von 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin in je 54 g Röstkaffeepulver aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) und jeweils vier daraus zubereiteten Kaffeegetränken.

Probe	Konzentration [$\mu\text{g}/54 \text{ g Pulver}^{\text{a}}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l Getränk}^{\text{b}}$]		
	CR	KEN	PAP
Kaffeepulver	7,7	4,4	6,4
Maschine	2,8	1,9	2,8
Stempelkanne	3,8	2,1	2,9
Espresso	3,3	1,8	2,3
Mokka	1,9	1,0	1,7

^a Zur Herstellung eines Liters Kaffeegetränk wurden 54 g Röstkaffeepulver verwendet (**Kap. 5.1.3**).

^b Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10 \%$.

4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon zeigte sowohl in den Röstkaffeepulvern (3670 bis 4400 µg/54 g) als auch in allen Kaffeegetränken (3110 bis 5010 µg/l) die jeweils höchste Konzentration aller untersuchten Aromastoffe. Die niedrigsten Gehalte des Aromastoffs wurden hierbei jeweils in den mit der Kaffeemaschine gekochten Getränken festgestellt, die höchsten Konzentrationen in den Espressi (**Tab. 2.21**).

Tabelle 2.21 Konzentrationen von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon in je 54 g Röstkaffeepulver aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) und jeweils vier daraus zubereiteten Kaffeegetränken.

Probe	Konzentration [µg/54 g Pulver ^a bzw. µg/l Getränk] ^b		
	CR	KEN	PAP
Kaffeepulver	3670	4400	3680
Maschine	3180	3380	3110
Stempelkanne	3940	4020	3370
Espresso	5010	4400	4390
Mokka	4270	3760	3430

^a Zur Herstellung eines Liters Kaffeegetränk wurden 54 g Röstkaffeepulver verwendet (**Kap. 5.1.3**).

^b Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens ± 10 %.

Die phenolischen Aromastoffe 2-Methoxyphenol, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd waren entsprechend ihrer unterschiedlichen Gehalte in den Röstkaffeepulvern auch in den Kaffeegetränken in deutlich unterschiedlichen Konzentrationen enthalten (**Tab. 2.22**). Die höchsten Gehalte der drei Aromastoffe konnten für alle drei Röstkaffees jeweils in den Espressi bestimmt werden, während die niedrigsten Werte tendenziell in den mit der Kaffeemaschine gekochten Getränken festgestellt wurden.

Tabelle 2.22 Konzentrationen von 2-Methoxyphenol, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd in je 54 g Röstkaffeepulver aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) und jeweils vier daraus zubereiteten Kaffeegetränken.

Probe	Konzentration [$\mu\text{g}/54 \text{ g Pulver}^{\text{a}}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{l Getränk}^{\text{b}}$]								
	2-Methoxyphenol			4-Ethenyl-2-methoxyphenol			4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd		
	CR	KEN	PAP	CR	KEN	PAP	CR	KEN	PAP
Kaffeepulver	205	220	222	2940	3340	2680	273	288	194
Maschine	135	118	155	980	1420	1150	186	192	152
Stempelkanne	178	162	204	1540	1790	1510	210	208	157
Espresso	185	174	224	1750	1940	1900	408	436	299
Mokka	165	161	187	1500	1900	1690	190	182	182

^a Zur Herstellung eines Liters Kaffeegetränk wurden 54 g Röstkaffeepulver verwendet (**Kap. 5.1.3**).

^b Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10 \%$.

Zur Berechnung der Extraktionsraten der Aromastoffe aus den Röstkaffeepulvern in die Kaffeegetränke wurden die Aromastoffgehalte im Röstkaffeepulver, die für die Getränkezubereitung verwendete Menge an Röstkaffeepulver sowie die erhaltene Menge des Kaffeegetränks berücksichtigt (**Kap. 5.8.3.5**). Bei Betrachtung der Extraktionsraten der beiden untersuchten Streckeraldehyde (**Tab. 2.23**) fiel auf, dass die jeweiligen Unterschiede zwischen den vier verschiedenen Kaffeegetränken bei 2-Methylbutanal mit einer Schwankungsbreite von 23 bis 137 Prozent deutlich stärker ausgeprägt waren als bei 3-(Methylthio)propanal (64 bis 94 %). Für beide Aromastoffe wurden die jeweils niedrigsten Extraktionsraten in den Mokkagetränken und die höchsten durch die Zubereitung mit der Stempelkanne erzielt.

Tabelle 2.23 Extraktionsraten der Aromastoffe 2-Methylbutanal und 3-(Methylthio)propanal aus Röstkaffeepulvern aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) in verschiedenen zubereitete Kaffeegetränke.

Probe	Extraktionsrate [%] ^a					
	2-Methylbutanal			3-(Methylthio)propanal		
	CR	KEN	PAP	CR	KEN	PAP
Maschine	79	46	56	83	81	78
Stempelkanne	126	104	137	89	94	83
Espresso	53	33	50	76	86	81
Mokka	39	23	38	65	64	69

^a Die zugrunde gelegten quantitativen Daten sind **Tabelle 2.17** zu entnehmen.

Die Extraktionsraten für Diacetyl (45 bis 85 %) lagen generell höher als die für 2,3-Pentandion (36 bis 62 %, **Tab. 2.24**). Beim Vergleich der vier verschiedenen Kaffeegetränke wurde deutlich, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Extraktionsmethoden weniger regelmäßig ausgeprägt waren als bei den Streckeraldehyden. Für 2,3-Pentandion wurden die höchsten Extraktionsraten jeweils durch die Zubereitung mit der Stempelkanne erreicht, die niedrigsten bei den Röstkaffees aus Costa Rica und Kenia durch Herstellung des Espressos und beim Röstkaffee aus Papua-Neuguinea durch das Mokkagetränk. Bei den Röstkaffees aus Kenia und Papua-Neuguinea wies das mit der Stempelkanne zubereitete Kaffeegetränk die höchste Extraktionsrate für Diacetyl auf, während beim Röstkaffee aus Costa Rica das Mokkagetränk den größten Anteil extrahierte. Die niedrigsten Extraktionsraten wurden für Diacetyl wie für 2,3-Pentandion bei den Röstkaffees aus Costa Rica und Kenia durch Zubereitung mit dem Espressotopf, beim Röstkaffee aus Papua-Neuguinea durch das Mokkagetränk erreicht.

Tabelle 2.24 Extraktionsraten der Aromastoffe Diacetyl und 2,3-Pentandion aus Röstkaffeepulvern aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) in verschiedenen zubereitete Kaffeegetränke.

Probe	Extraktionsrate [%] ^a					
	Diacetyl			2,3-Pentandion		
	CR	KEN	PAP	CR	KEN	PAP
Maschine	54	65	78	38	44	49
Stempelkanne	73	80	85	55	62	56
Espresso	45	54	56	29	35	36
Mokka	82	79	53	49	45	27

^a Die zugrunde gelegten quantitativen Daten sind **Tabelle 2.18** zu entnehmen.

Die Extraktionsraten für 2-Furanmethanthiol lagen vergleichsweise niedrig (≤ 25 %, **Tab. 2.25**). Die Unterschiede zwischen den Zubereitungsmethoden waren aber dennoch sehr deutlich erkennbar. Die höchsten Werte wurden hierbei bei allen drei Röstkaffeepulvern jeweils durch Zubereitung der Kaffeegetränke mittels Stempelkanne erzielt, die niedrigsten bei den Espressi.

Tabelle 2.25 Extraktionsraten des Aromastoffs 2-Furanmethanthiol aus Röstkaffeepulvern aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) in verschiedenen zubereitete Kaffeegetränke.

Probe	Extraktionsrate [%] ^a		
	CR	KEN	PAP
Maschine	23	23	23
Stempelkanne	25	25	25
Espresso	11	11	12
Mokka	16	17	19

^a Die zugrunde gelegten quantitativen Daten sind **Tabelle 2.19** zu entnehmen.

Beim Vergleich der Extraktionsraten von 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (20 bis 47 %, **Tab. 2.26**) in den verschiedenen Kaffeegetränken wurden deutliche Unterschiede festgestellt. Auch für diesen Aromastoff hatte die Getränkezubereitung mittels Stempelkanne die jeweils höchsten Extraktionsraten zur Folge, während diese bei den Mokkagetränken am niedrigsten lagen.

Tabelle 2.26 Extraktionsraten des Aromastoffs 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin aus Röstkaffeepulvern aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) in verschiedenen zubereitete Kaffeegetränke.

Probe	Extraktionsrate [%] ^a		
	CR	KEN	PAP
Maschine	36	43	42
Stempelkanne	47	47	44
Espresso	37	35	29
Mokka	23	20	23

^a Die zugrunde gelegten quantitativen Daten sind **Tabelle 2.20** zu entnehmen.

Für den hydrophilen Aromastoff 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon wurden vergleichsweise hohe Extraktionsraten erzielt (72 bis 113 %, **Tab. 2.27**), die bei Zubereitung mit dem Espressotopf am höchsten und in einem Mokkagetränk (Kenia) bzw. zwei mit Hilfe der Kaffeemaschine zubereiteten Getränken (Costa Rica und Papua-Neuguinea) am niedrigsten lagen.

Tabelle 2.27 Extraktionsraten des Aromastoffs 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon aus Röstkaffeepulvern aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) in verschiedenen zubereitete Kaffeegetränke.

Probe	Extraktionsrate [%] ^a		
	CR	KEN	PAP
Maschine	81	74	79
Stempelkanne	97	82	83
Espresso	113	82	97
Mokka	97	72	81

^a Die zugrunde gelegten quantitativen Daten sind **Tabelle 2.21** zu entnehmen.

Bei den phenolischen Aromastoffen lagen die Extraktionsraten des hydrophilen 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyds (57 bis 96 %) höher als bei 2-Methoxyphenol (48 bis 80 %) und 4-Ethenyl-2-methoxyphenol (30 bis 53 %, **Tab. 2.28**). Zwischen den verschiedenen Zubereitungsmethoden waren dabei deutliche Unterschiede festzustellen. Alle drei Verbindungen zeigten die jeweils niedrigste Extraktionsrate in

den Getränken aus der Kaffeemaschine. Die höchsten Extraktionsraten waren nicht eindeutig einer Methode zuzuordnen. Während 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd die höchsten Werte jeweils durch Zubereitung der Espressi erzielte, war dies für 4-Ethenyl-2-methoxyphenol jeweils in den Mokkagetränken und für 2-Methoxyphenol in den Mokkagetränken bzw. einem Stempelkannengetränk (Costa Rica) der Fall.

Tabelle 2.28 Extraktionsraten der Aromastoffe 2-Methoxyphenol, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd aus Röstkaffeepulvern aus Costa Rica (CR), Kenia (KEN) und Papua Neuguinea (PAP) in verschiedenen zubereitete Kaffeegetränke.

Probe	Extraktionsrate [%] ^a								
	2-Methoxyphenol			4-Ethenyl-2-methoxyphenol			4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd		
	CR	KEN	PAP	CR	KEN	PAP	CR	KEN	PAP
Maschine	59	48	61	30	38	38	60	59	70
Stempelkanne	76	63	80	46	46	49	67	62	70
Espresso	58	51	61	38	37	43	96	96	93
Mokka	72	67	71	46	52	53	62	57	79

^a Die zugrunde gelegten quantitativen Daten sind **Tabelle 2.22** zu entnehmen.

Der Vergleich der Extraktionsraten von wichtigen Aromastoffen aus Röstkaffeepulvern verschiedener Herkunft in daraus jeweils unterschiedlich zubereitete Kaffeegetränke verdeutlichte, dass die Extraktionsmethode einen deutlichen Einfluss auf die Gehalte dieser Substanzen in den verschiedenen Kaffeegetränken hatte.

2.1.3 Einfluss der Lagerung von Röstkaffees auf die Stabilität von 2-Furanmethanthiol

Sowohl im Handel als auch im Haushalt kommt es üblicherweise zu einer Vorratshaltung von geröstetem Kaffee, da es nicht praktikabel ist, die Kaffeebohnen vor der Zubereitung des Getränks selbst zu rösten. Nach der Röstung kommt es jedoch im Laufe der Zeit zu einer Abnahme wertgebender Kaffeearomastoffe wie 2-Furanmethanthiol (u. a. Czerny und Schieberle, 2001). In mehreren Versuchsreihen sollten verschiedene Aspekte der Lagerung von geröstetem Kaffee untersucht und die Abnahme von 2-Furanmethanthiol in Abhängigkeit von der Lagerart und der Zeit quantitativ dargestellt werden.

2.1.3.1 Lagerung von Röstkaffees – Vergleich von intakten Röstkaffeebohnen und Röstkaffeepulver

Um zu untersuchen, ob die Lagerung eines Röstkaffees in Form von intakten Bohnen oder in Pulverform unterschiedlich schnelle Abnahmen des Gehalts an 2-Furanmethanthiol zur Folge hatte, wurde in einer Kaffeerösterei frischer Röstkaffee erworben. Die Hälfte der Röstkaffeebohnen wurde portionsweise zu 125 g in Packungen gefüllt, die zwar beschichtet, aber nicht luftdicht verschlossen waren. Die andere Hälfte der Röstkaffeebohnen wurde gemahlen und direkt im Anschluss analog zu den intakten Röstkaffeebohnen in 125 g-Portionen verpackt. Die Lagerung der Päckchen erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Quantifizierung von 2-Furanmethanthiol erfolgte analog **Kapitel 2.1.1.5**.

Um die Konzentrationsveränderungen von 2-Furanmethanthiol über einen Zeitraum von 5 Monaten verfolgen zu können, erfolgten die Quantifizierungen direkt nach dem Erwerb des Röstkaffees, d.h. zu Beginn der Lagerung (Zeitpunkt 1), sowie nach 29 (Zeitpunkt 2), 51 (Zeitpunkt 3), 86 (Zeitpunkt 4), 126 (Zeitpunkt 5) und 147 Tagen Lagerung (Zeitpunkt 6). Für die Quantifizierungen wurde jeweils eine noch ungeöffnete Packung der intakten Röstkaffeebohnen bzw. des gemahlten Röstkaffeepulvers herangezogen.

Der Anfangsgehalt wurde für beide Lagerformen aus einer Portion des gemahlene Röstkaffees direkt nach dessen Erwerb bestimmt (Zeitpunkt 1) und betrug 1640 µg 2-Furanmethanthiol/kg Röstkaffee (**Tab. 2.29**). Bereits nach knapp einem Monat Lagerung (Zeitpunkt 2) hatten die Gehalte an 2-Furanmethanthiol sowohl in den intakten Röstkaffeebohnen als auch im Röstkaffeepulver deutlich abgenommen und lagen bei weniger als 50 % des Ausgangswerts.

Tabelle 2.29 Entwicklung der Konzentration an 2-Furanmethanthiol (FFT) in intakten Röstkaffeebohnen und in Röstkaffeepulver bei Lagerung in sauerstoffdurchlässigen Packungen über einen Zeitraum von 126 Tagen.

Messzeitpunkt	Konzentration FFT [µg/kg] ^a (prozentuale Abnahme)	
	intakte Bohnen	Pulver
Nach 0 Tagen (Zeitpunkt 1)	1640	1640
Nach 29 Tagen (Zeitpunkt 2)	669 (-59,3 %)	558 (-66,1 %)
Nach 51 Tagen (Zeitpunkt 3)	662 (-59,7 %)	567 (-65,5 %)
Nach 86 Tagen (Zeitpunkt 4)	439 (-73,3 %)	347 (-78,9 %)
Nach 126 Tagen (Zeitpunkt 5)	423 (-74,3 %)	477 (-71,0 %)
Nach 147 Tagen (Zeitpunkt 6)	512 (-68,9 %)	455 (-72,3 %)

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens ± 10 %.

Während der folgenden Monate wurde sowohl in den intakten Röstkaffeebohnen, als auch im Röstkaffeepulver keine weitere signifikante Abnahme von 2-Furanmethanthiol festgestellt. Der zeitliche Verlauf der Gehalte an 2-Furanmethanthiol zeigte somit eindeutig, dass beide Lagerformen eine in etwa gleich starke Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol im Röstkaffee zur Folge hatten, wobei der größte Verlust des Aromastoffs in einem relativ kurzen Zeitraum nach der Röstung auftrat.

Für einen weiteren Lagerversuch wurden erneut in einer Kaffeerösterei frisch geröstete Kaffeebohnen erworben. Um den Einfluss der Atmosphäre in der Packung auf die Konzentrationsabnahme von 2-Furanmethanthiol während einer mehrmonatigen Lagerung bewerten zu können, wurde die Hälfte des frisch erworbenen Röstkaffees in Form intakter Röstkaffeebohnen und die andere Hälfte gemahlen in Plastikbeuteln abgepackt, wobei die Luft durch Stickstoff ersetzt wurde. Die Packungen wurden anschließend luftdicht verschweißt. Außerdem wurden von derselben Kaffeerösterei im

Einzelhandel je vier Packungen Röstkaffeebohnen und gemahlener Röstkaffee einer Charge erworben, um einen Vergleich der selbst abgepackten Röstkaffees mit industriell vakuumverpackten Röstkaffees ziehen zu können. Die Lagerung der selbstgepackten Beutel und der kommerziell erstandenen Packungen erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Quantifizierung von 2-Furanmethanthiol erfolgte am Tag des Erwerbs der Kaffees (Zeitpunkt 1) sowie nach 20 (Zeitpunkt 2), 43 (Zeitpunkt 3) und 64 Tagen Lagerung (Zeitpunkt 4).

Die Anfangsgehalte an 2-Furanmethanthiol wurden hierbei jeweils aus einer Portion des frisch gemahlene Röstkaffees sowie jeweils einer Packung der originalverpackten Röstkaffees (Bohnen und Pulver) bestimmt (**Tab. 2.30**). Diese lagen mit 1130 µg/kg beim frisch gemahlene Röstkaffee sowie 1070 µg/kg (Bohnen) bzw. 920 µg/kg (Pulver) bei den originalverpackten Röstkaffees deutlich niedriger als beim vorhergehenden Lagerversuch. Für die folgenden Quantifizierungen wurden jeweils eine Originalpackung der Röstkaffeebohnen und des Röstkaffeepulvers geöffnet bzw. je eine Portion der selbst abgepackten intakten Röstkaffeebohnen sowie des Röstkaffeepulvers entnommen. Die selbst abgepackten Röstkaffeeproben wurden anschließend zur weiteren Lagerung wieder unter Stickstoffatmosphäre verschweißt.

Nach drei Wochen Lagerung war die Konzentration an 2-Furanmethanthiol in den vakuumverpackten Röstkaffees um weniger als 10 % gesunken (Bohnen 7,6 %, Pulver 8,4 %). In den selbst verpackten Röstkaffees betrug die Abnahme dagegen bereits 25,7 % (Bohnen) bzw. 24,8 % (Pulver). Nach weiteren drei Wochen war der Gehalt an 2-Furanmethanthiol in den selbst verpackten Röstkaffees auf etwa 50 % des Anfangswerts gefallen (jeweils 45,1 % Abnahme in Röstkaffeebohnen und Röstkaffeepulver). Bei den originalverpackten Röstkaffees war die Abnahme wiederum weniger stark ausgeprägt und es zeigte sich ein Unterschied zwischen den intakten Röstkaffeebohnen (25,0 % Abnahme) und dem Röstkaffeepulver (13,1 % Abnahme), der jedoch nach etwa zwei Monaten Lagerung (Zeitpunkt 4) nicht mehr zu erkennen war (Röstkaffeebohnen 37,0 %, Röstkaffeepulver 35,5 %). Bei den selbst verpackten Röstkaffees änderte sich der Gehalt an 2-Furanmethanthiol zwischen der dritten und vierten Messung nur noch geringfügig. Zudem war auch bei diesen Proben kein nennenswerter Unterschied zwischen intakten Röstkaffeebohnen (48,7 % Abnahme) und Röstkaffeepulver (46,9 % Abnahme) festzustellen. Nach 64 Tagen Lagerung waren

die Gehalte an 2-Furanmethanthiol der selbst verpackten Röstkaffees und der vakuumverpackten Röstkaffees somit vergleichbar hoch.

Tabelle 2.30 Entwicklung der Konzentration an 2-Furanmethanthiol (FFT) in intakten Röstkaffeebohnen und in Röstkaffeepulver bei Lagerung unter Stickstoffatmosphäre oder in Originalpackungen (Vakuumverpackung) über einen Zeitraum von 64 Tagen.

Messzeitpunkt	Konzentration FFT [$\mu\text{g}/\text{kg}$] ^a (prozentuale Abnahme)			
	Stickstoffatmosphäre		Vakuumverpackung	
	intakte Bohnen	Pulver	intakte Bohnen	Pulver
Nach 0 Tagen (Zeitpunkt 1)	1130	1130	920	1070
Nach 20 Tagen (Zeitpunkt 2)	840 (-25,7 %)	850 (-24,8 %)	850 (- 7,6 %)	980 (- 8,4 %)
Nach 43 Tagen (Zeitpunkt 3)	620 (-45,1 %)	620 (-45,1 %)	690 (-25,0 %)	930 (-13,1 %)
Nach 64 Tagen (Zeitpunkt 4)	580 (-48,7 %)	600 (-46,9 %)	580 (-37,0 %)	690 (-35,5 %)

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

Durch die beiden Lagerversuche konnte gezeigt werden, dass der Gehalt des wichtigen Kaffeearomastoffs 2-Furanmethanthiol nach der Röstung, unabhängig von Verpackung und Lagerform, innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums deutlich abnahm.

2.1.3.2 Lagerung von Röstkaffeebohnen – Vergleich von extrahierten Bohnen und nicht extrahierten Bohnen

Aus intakten Rohkaffeebohnen lassen sich durch Extraktion mit heißem Wasser wasserlösliche Substanzen auswaschen. Nach anschließender Gefriertrocknung erhält man den wasserlöslichen Rohkaffeeextrakt sowie extrahierte Rohkaffeebohnen (**Kap. 1.5.3**). Milo et al. (2001) zeigten, dass bei der Röstung extrahierter Rohkaffeebohnen in der Regel höhere Mengen an 2-Furanmethanthiol als bei der Röstung nicht-extrahierter Rohkaffeebohnen gebildet werden.

In einem weiteren Lagerversuch sollte deshalb untersucht werden, ob die Stabilität von 2-Furanmethanthiol in der Matrix extrahierter, gerösteter Kaffeebohnen höher war als in der Matrix eines „normalen“, nicht-extrahierten Röstkaffees, der im Folgenden als Referenzkaffee bezeichnet wird. Dazu wurden extrahierte Rohkaffeebohnen und Referenzrohkaffeebohnen derselben Charge im Probat-Röster bei 180 °C für sieben bzw. acht Minuten geröstet (**Kap. 5.1.10**), wobei die extrahierten Rohkaffeebohnen im Vergleich zu den Referenzrohkaffeebohnen weniger lang geröstet werden mussten, um einen vergleichbaren Farbton zu erzielen. Nach einer mehrstündigen Entgasungszeit, in der ein Großteil des bei der Röstung gebildeten Kohlenstoffdioxids aus den gerösteten Kaffeebohnen entweichen konnte, wurden die erhaltenen Röstkaffees in Form intakter Bohnen in Plastikbeuteln abgepackt, wobei der Luftsauerstoff durch Begasung mit Stickstoff verdrängt wurde. Die Lagerung der Beutel erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Die Quantifizierung von 2-Furanmethanthiol in den Röstkaffeeproben wurde analog **Kap. 2.1.3.1** durchgeführt und erfolgte am Tag der Röstung (Zeitpunkt 1) sowie einen Tag (Zeitpunkt 2), zwei (Zeitpunkt 3), drei (Zeitpunkt 4), neun (Zeitpunkt 5), 15 (Zeitpunkt 6) und 28 Tage (Zeitpunkt 7) nach der Röstung. Für jede Quantifizierung wurde je eine Portion Röstkaffeebohnen aus den verpackten Beuteln entnommen, anschließend wurden die Beutel unter Stickstoffatmosphäre wieder verschweißt.

Die anfangs bestimmte Konzentration an 2-Furanmethanthiol im aus den extrahierten Rohkaffeebohnen erhaltenen Röstkaffee (2830 µg/kg, **Tab. 2.31**) war etwa dreimal so hoch wie im Referenzröstkaffee (934 µg/kg). Nach drei Tagen Lagerung (Zeitpunkte 2 bis 4) lagen die prozentualen Verluste an 2-Furanmethanthiol in beiden Röstkaffees bei etwa 10 % der Anfangskonzentrationen. Im weiteren Verlauf der Lagerung nahm der Gehalt an 2-Furanmethanthiol im Referenzröstkaffee im Vergleich zum den gerösteten extrahierten Kaffeebohnen stärker ab (35,9 %) und erreichte nach vier Wochen (Zeitpunkt 7) mit 599 µg/kg ein vergleichbares Niveau wie bei den vorhergehenden Lagerversuchen (**Kap. 2.1.3.1**). In den gerösteten extrahierten Kaffeebohnen dagegen fiel die prozentuale Abnahme geringer aus, da nach vier Wochen ein Verlust von 22,6 % beobachtet wurde. Die absolute Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol war allerdings stärker ausgeprägt als in den Referenzröstkaffeebohnen. Mit 2190 µg/kg lag die Konzentration an 2-Furanmethanthiol in den gerösteten extrahierten

Kaffeebohnen nach vier Wochen Lagerung jedoch immer noch deutlich über der Anfangskonzentration des Referenzröstkaffees.

Tabelle 2.31 Entwicklung der Konzentration an 2-Furanmethanthiol (FFT) in gerösteten extrahierten Kaffeebohnen und gerösteten Referenzkaffeebohnen bei Lagerung unter Stickstoffatmosphäre über einen Zeitraum von 28 Tagen.

Messzeitpunkt	Konzentration FFT [$\mu\text{g}/\text{kg}$] ^a (prozentuale Abnahme)	
	Referenzkaffee	Extrahierter Kaffee
Nach 0 Tagen (Zeitpunkt 1)	934	2830
Nach 1 Tag (Zeitpunkt 2)	878 (- 6,0 %)	2630 (- 7,1 %)
Nach 2 Tagen (Zeitpunkt 3)	882 (- 5,6 %)	2550 (- 9,9 %)
Nach 3 Tagen (Zeitpunkt 4)	875 (- 6,3 %)	2590 (- 8,5 %)
Nach 9 Tagen (Zeitpunkt 5)	736 (-21,2 %)	2590 (- 8,5 %)
Nach 15 Tagen (Zeitpunkt 6)	590 (-36,8 %)	2150 (-24,0 %)
Nach 28 Tagen (Zeitpunkt 7)	599 (-35,9 %)	2190 (-22,6 %)

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

Somit konnte festgestellt werden, dass auch in gerösteten, extrahierten Kaffeebohnen ein Verlust des Aromastoffs 2-Furanmethanthiol stattfand, der Anfangsgehalt jedoch wesentlich höher als in gerösteten Referenzkaffeebohnen lag.

2.1.3.3 Einfluss von Antioxidationsmitteln auf die Lagerstabilität von 2-Furanmethanthiol in gerösteten Kaffees

Der bei der Extraktion von Rohkaffee gewonnene Rohkaffeeextrakt und die extrahierten Rohkaffeebohnen lassen sich unter genauer Beachtung der Gewichtsanteile und der Verwendung von warmem Wasser unter mehrstündigem Rühren rekombinieren (**Kap. 5.1.7**). Die Zusammensetzung der daraus gewonnenen, im Folgenden als „rekombiniert“ bezeichneten Rohkaffeebohnen lässt sich außerdem bei Bedarf variieren. So kann beispielsweise eine Zugabe von natürlich vorkommenden Rohkaffeeinhaltsstoffen oder isotoopenmarkierter Analoga zur Aufklärung von Reaktionswegen erfolgen oder der Extrakt vollständig gegen eine Komposition mehrerer wasserlöslicher Einzelsubstanzen ausgetauscht werden (**Kap. 1.5.3**).

Um einen möglichen Einfluss antioxidativ wirkender Substanzen auf die Stabilität von 2-Furanmethanthiol bei der Lagerung von Röstkaffee untersuchen zu können, wurden drei Rekombinationsversuche durchgeführt. Der erste Rekombinationsansatz von Rohkaffee diente als Referenz, da kein Zusatz von Antioxidationsmitteln erfolgte (Rekombination 1), während bei einem zweiten Rekombinationsansatz Butylhydroxyanisol (230 mg/kg, Rekombination 2) und bei einem dritten Octylgallat (217 mg/kg, Rekombination 3) zugesetzt wurde. Nach Gefriertrocknung wurden die erhaltenen Rohkaffee-Rekombinate im Kaffeeröster fünf Minuten bei 200 °C geröstet und nach einer mehrstündigen Entgasungsphase (**Kap. 2.1.3.2**) die Anfangskonzentrationen an 2-Furanmethanthiol bestimmt. Anschließend wurden die Röstkaffeebohnen in sauerstoffdurchlässigen Verpackungen (**Kap. 2.1.3.1**) bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Die Quantifizierung von 2-Furanmethanthiol in den drei Röstkaffees wurde analog **Kapitel 2.1.3.1** durchgeführt und erfolgte am Tag der Röstung (Zeitpunkt 1) sowie zwei (Zeitpunkt 2), sieben (Zeitpunkt 3), 16 (Zeitpunkt 4) und 30 Tage (Zeitpunkt 5) nach der Röstung. Für jede Quantifizierung wurde eine Portion intakter Röstkaffeebohnen aus den jeweiligen Beuteln entnommen und gemahlen. Im gerösteten Rekombinat 3, welchem Octylgallat zugesetzt worden war, bildete sich bei der Röstung deutlich mehr 2-Furanmethanthiol als in den gerösteten Rekombinaten 1 und 2 (**Tab. 2.32**). In den beiden letztgenannten hatte der Gehalt an 2-Furanmethanthiol bereits nach drei Tagen Lagerung um mehr als 30 Prozent abgenommen. Nach 30 Tagen enthielten die gerösteten Rekombinate 1 und 2 nur noch etwa 50 % des bei der Röstung gebildeten 2-Furanmethanthiols. Im gerösteten Rekombinat 3 wurde eine vergleichsweise langsame und insgesamt geringere Abnahme beobachtet. Nach 30 Tagen betrug die Abnahme in dieser Kaffeeprobe 38,4 %.

Tabelle 2.32 Entwicklung der Konzentration an 2-Furanmethanthiol (FFT) in gerösteten, rekombinierten^a Kaffeebohnen bei Lagerung in sauerstoffdurchlässigen Packungen über einen Zeitraum von 30 Tagen.

Messzeitpunkt	Konzentration FFT [$\mu\text{g}/\text{kg}$] ^b (prozentuale Abnahme)		
	Rekombinat 1 ^c	Rekombinat 2 ^d	Rekombinat 3 ^e
Nach 1 Tag (Zeitpunkt 1)	1840	1940	2580
Nach 3 Tagen (Zeitpunkt 2)	1190 (-35,3 %)	1290 (-33,5 %)	2080 (-19,4 %)
Nach 7 Tagen (Zeitpunkt 3)	1170 (-36,4 %)	1140 (-41,2 %)	1860 (-27,9 %)
Nach 16 Tagen (Zeitpunkt 4)	1030 (-44,0 %)	1110 (-42,8 %)	1850 (-28,3 %)
Nach 30 Tagen (Zeitpunkt 5)	933 (-49,3 %)	1010 (-47,9 %)	1590 (-38,4 %)

^a Rohkaffeebohnen, die durch Rekombination von extrahierten Rohkaffeebohnen und Rohkaffeeextrakt hergestellt wurden.

^b Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

^c Rekombination ohne Zugabe eines Antioxidationsmittels.

^d Rekombination unter Zugabe des Antioxidationsmittels Butylhydroxyanisol.

^e Rekombination unter Zugabe des Antioxidationsmittels Octylgallat.

Das Antioxidationsmittel Butylhydroxyanisol hatte in der zugesetzten Konzentration von 230 mg/kg keinen Einfluss auf die Stabilität von 2-Furanmethanthiol in geröstetem, rekombiniertem Kaffee. Durch Zugabe von Octylgallat konnte die Abnahme des Aromastoffs verlangsamt, aber nicht verhindert werden.

2.2 Vorläuferstudien von 2-Furanmethanthiol

Um den Bildungsweg des Aromastoffs 2-Furanmethanthiol aufzuklären, wurden in der Vergangenheit bereits zahlreiche Modellversuche durchgeführt. Hierbei konnte 2-Furanmethanthiol u. a. aus Cystein und Ribose (Parliment und Stahl, 1994; Hofmann und Schieberle, 1995; Cerny und Davidek, 2003) oder aus 2-Furancarbaldehyd und Schwefelwasserstoff (Hofmann, 1995) generiert werden (**Kap. 1.5.2**), so dass ein einfacher Reaktionsmechanismus vorgeschlagen wurde (**Abb. 1.10**). Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass dieser Bildungsweg in komplexen Matrices nur eine untergeordnete Rolle spielt und die Vorläufer des Aromastoffs in Polysacchariden und Proteinen lokalisiert sein könnten (Parliment und Stahl, 1994; Grosch, 2000; Milo et al., 2001; Poisson et al., 2009, **Kap. 1.5.3**).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Lagerversuche (**Kap. 2.1.3**) zeigten, dass die durch die Röstung gebildete Menge an 2-Furanmethanthiol in Röstkaffeebohnen schon in den ersten Wochen nach der Röstung um mehr als die Hälfte abnahm. Auch die Zugabe von Antioxidationsmitteln vor der Röstung konnte diesen Prozess nicht verhindern. Durch Kenntnis der Vorläuferverbindungen und Informationen über die Bildungswege von 2-Furanmethanthiol könnten aber sowohl die Bildung als auch die Stabilität des Aromastoffs technologisch positiv beeinflusst werden.

2.2.1 Kaffee

Über eine grobe Fraktionierung von Rohkaffee wurden zunächst Versuche unternommen, um eine Vorläufersubstanz von 2-Furanmethanthiol in verschiedenen Rohkaffeefraktionen zu lokalisieren. Das Nestlé Product Technology Centre (Orbe, Schweiz) stellte hierfür Rohkaffeebohnen (Referenzkaffee) sowie den daraus nach Extraktion mit heißem Wasser gewonnenen und gefriergetrockneten Rohkaffeeextrakt und zudem die gefriergetrockneten extrahierten Rohkaffeebohnen zur Verfügung (**Kap. 5.1.6**). Diese Proben eröffneten Möglichkeiten zur Rekombination von Rohkaffeebohnen aus extrahierten Rohkaffeebohnen und dem originalen bzw. einem modifizierten Rohkaffeeextrakt (**Kap. 5.1.7**) und damit auch für sogenannte „in-bean“-Experimente (**Kap. 1.5.3**). Bei diesen Untersuchungen konnten über die in die extrahierten Rohkaffeebohnen eingebrachten Substanzen und die bei der Röstung

entstandenen Reaktionsprodukte wichtige Erkenntnisse über die Rolle möglicher Präkursoren des Aromastoffs 2-Furanmethanthiol bei der Röstung von Kaffee gewonnen werden.

2.2.1.1 Bildung von 2-Furanmethanthiol in verschiedenen Kaffeefraktionen

Für die folgenden Quantifizierungen von 2-Furanmethanthiol erfolgten die Aufarbeitungen zur Isolierung des Aromastoffs aus gemahlene Röstkaffees analog **Kapitel 2.1.1.5** mittels SIVA unter Verwendung des isotopenmarkierten Standards [²H₂]-2-Furanmethanthiol (d-3, **Abb. 2.3**).

Zunächst wurde die Abhängigkeit der bei der Röstung von Rohkaffee gebildeten Menge an 2-Furanmethanthiol von der Dauer der Erhitzung überprüft. Dabei wurden je 80 g intakte Referenzkaffeebohnen zwischen zwei und acht Minuten im Kaffeeröster bei 180 °C geröstet. Die in **Tabelle 2.33** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass 2-Furanmethanthiol im Rohkaffee nicht vorkommt, aber im Verlauf der Röstung entsteht. Eine längere Röstdauer hatte eine höhere Konzentration an 2-Furanmethanthiol zur Folge. Aufgrund der zunehmenden Verkohlung des Röstprodukts war eine über acht Minuten hinausgehende Röstung nicht sinnvoll. Die Röstdauer für die in diesen Untersuchungen verwendeten intakten Rohkaffeebohnen im Kaffeeröster wurde entsprechend diesen Ergebnissen zwischen sechs und acht Minuten gewählt.

Tabelle 2.33 Bildung von 2-Furanmethanthiol (FFT) in Referenzkaffeebohnen in Abhängigkeit von der Dauer der Röstung im Kaffeeröster bei 180 °C.

Röstdauer [min]	Konzentration FFT [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
2	4,0
4	36,7
6	339
7	1450
8	2130

Das Potential verschiedener Rohkaffeebraktionen zur Bildung von 2-Furanmethanthiol sollte über die Röstung der Fraktionen mit anschließender Quantifizierung der

gebildeten Menge an 2-Furanmethanthiol abgeschätzt werden. Zwischen der in einer Fraktion des Rohkaffees vorhandenen Menge an Vorläufersubstanzen und der bei der Röstung gebildeten Menge an Aromastoff wurde ein direkter Zusammenhang vermutet. Wie in **Kapitel 1.5.3** gezeigt wurde, stellten bereits Milo et al. (2001) fest, dass das Extrahieren von Rohkaffeebohnen keine negativen Auswirkungen auf die Bildung von 2-Furanmethanthiol während der nachfolgenden Röstung hatte. Stattdessen wurden in gerösteten, extrahierten Kaffeebohnen sogar höhere Konzentrationen an 2-Furanmethanthiol als im gerösteten Referenzkaffee gefunden.

Zunächst wurden extrahierte Rohkaffeebohnen und der originale Rohkaffeeextrakt rekombiniert (**Kap. 5.1.7**). Anschließend wurden die rekombinierten Rohkaffeebohnen sowie Referenzkaffeebohnen und extrahierte Rohkaffeebohnen (je 80 g) der gleichen Charge im Kaffeeröster für jeweils acht Minuten bei 180 °C geröstet und anschließend die entstandene Menge an 2-Furanmethanthiol bestimmt. Aus den Ergebnissen (**Tab. 2.34**) wurde ersichtlich, dass im gerösteten Referenzkaffee mit 4210 µg 2-Furanmethanthiol/kg Kaffee eine ähnlich hohe Menge an 2-Furanmethanthiol gebildet wurde wie in den gerösteten, rekombinierten Kaffeebohnen (4430 µg/kg). In den gerösteten extrahierten Kaffeebohnen wurde hingegen ein etwas höherer Gehalt an 2-Furanmethanthiol (5070 µg/kg) festgestellt. Um die Werte jedoch in Relation zueinander betrachten zu können, musste der prozentuale Gewichtsanteil der extrahierten Rohkaffeebohnen am Referenzkaffee (83 %) in das Ergebnis einberechnet werden. Damit betrug der Gehalt an 2-Furanmethanthiol in den gerösteten extrahierten Kaffeebohnen 4210 µg/kg Originalmaterial und war somit mit dem Gehalt des gerösteten Referenzkaffees vergleichbar.

Tabelle 2.34 Bildung von 2-Furanmethanthiol (FFT) bei der Röstung von Referenzkaffeebohnen, rekombinierten Rohkaffeebohnen und extrahierten Rohkaffeebohnen im Kaffeeröster bei 180 °C.

Kaffeeprobe (prozentualer Anteil am Referenzkaffee)	Konzentration FFT [µg/kg] ^a in	
	Fraktion	Originalmaterial
Referenzkaffee (100 %)	---	4210
Rekombinierter Rohkaffee (100 %)	---	4430
Extrahierter Rohkaffee (83 %)	5070	4210 ^b

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens ± 10 %.

^b Berechnet aus prozentualem Anteil des extrahierten Rohkaffees am Originalmaterial.

Für eine weitere Fraktionierung zur Isolierung und Charakterisierung des Vorläufers von 2-Furanmethanthiol wurde der Rohkaffee gemahlen. Beim Zerkleinern von pflanzlichen Lebensmitteln finden allerdings häufig enzymatische Vorgänge statt, die die Zusammensetzung der im rohen Lebensmittel vorhandenen Substanzen grundlegend verändern können. Diese Variationen in der Zusammensetzung können bei danach folgenden Erhitzungsschritten die Generierung von Aromastoffen qualitativ und quantitativ beeinflussen. Deshalb wurde zunächst der Einfluss des Mahlens von Rohkaffee vor der Röstung auf die Bildung von 2-Furanmethanthiol untersucht. Für gemahlene Rohkaffee musste hierzu eine alternative Röstmethode zum Kaffeeröster gefunden werden, da in diesem kein Pulver erhitzt werden kann.

Hierzu wurden 10 g Referenzkaffee gemahlen und in einem Röstofen für 30 Minuten bei 180 °C geröstet (**Kap. 5.1.10**). Zum Vergleich wurden außerdem 80 g intakte Referenzkaffeebohnen im Kaffeeröster für sieben Minuten bei 180 °C geröstet. Anschließend wurde in beiden gerösteten Proben der Gehalt an 2-Furanmethanthiol bestimmt (**Tab. 2.35**). Der gemahlene Referenzkaffee bildete bei der Röstung im Röstofen lediglich 63 µg 2-Furanmethanthiol/kg im Vergleich zu 1830 µg 2-Furanmethanthiol/kg bei der Röstung der Referenzkaffeebohnen im Kaffeeröster.

Tabelle 2.35 Einfluss des Röstverfahrens (Kaffeeröster, Röstofen, Sonnenblumenöl) auf die entstehende Menge an 2-Furanmethanthiol (FFT) bei der Röstung verschiedener Referenzkaffeeproben (intakte Bohnen, gemahlen, gedämpft und gemahlen).

Röstmethode	Konzentration FFT [µg/kg]		
	intakte Bohnen	gemahlen	gedämpft und gemahlen
Kaffeeröster, 180 °C, 7 Min.	1830	n. b. ^a	n. b. ^a
Röstofen, 180 °C, 30 Min.	n. b. ^a	63	59
Röstofen, 180 °C, 60 Min.	478	93	n. b. ^a
Sonnenblumenöl, 180 °C, 60 Min.	n. b. ^a	915	n. b. ^a
Sonnenblumenöl, 180 °C, 120 Min.	n. b. ^a	1870	n. b. ^a

^a nicht bestimmt.

Als Ursache für diesen Unterschied kam zum einen eine hohe Enzymaktivität im gemahlene Referenzkaffee in Frage, die die Menge an Vorläufersubstanzen für

2-Furanmethanthiol deutlich verringern könnte. Dies sollte durch Dämpfen der intakten Referenzkaffeebohnen mit heißem Wasserdampf in einem Schnellkochtopf (**Kap. 5.1.5**) für mehrere Minuten verhindert werden. Nach Gefriertrocknung wurden die gedämpften Referenzkaffeebohnen gemahlen. Die anschließende Röstung von 10 g des gedämpften und gemahlene Referenzkaffees im Röstofen für 30 Minuten bei 180 °C hatte jedoch lediglich eine Konzentration an 2-Furanmethanthiol von 59 µg/kg zur Folge. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Dämpfung des Referenzkaffees gegebenenfalls keine ausreichende Inaktivierung der Enzyme bewirkte.

Weiterhin konnte die verwendete Röstmethode der Grund für die geringe Bildung von 2-Furanmethanthiol sein. Durch Erhöhung der Röstdauer auf 60 Minuten (Röstofen, 180 °C) wurden in gemahlenem Referenzkaffee 93 µg 2-Furanmethanthiol/kg gebildet, während die Röstung intakter Referenzkaffeebohnen unter denselben Bedingungen 478 µg 2-Furanmethanthiol/kg zur Folge hatte. In beiden Fällen lagen die Konzentrationen jedoch wesentlich niedriger als im Vergleich zur Röstung der intakten Referenzkaffeebohnen im Kaffeeröster. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass die Röstung von gemahlenem Referenzkaffee im Röstofen nicht geeignet war, vergleichbare Mengen an 2-Furanmethanthiol zu generieren wie die Röstung intakter Referenzkaffeebohnen im Kaffeeröster (**Tab. 2.35**).

Als weitere Röstvariante wurden deshalb 100 mg bis 1 g frisch gemahlene, nicht gedämpfte Referenzkaffeepulver in je 10 ml Sonnenblumenöl homogen suspendiert und in verschlossenen Sovirelgläsern bei 180 °C für 60 bzw. 120 Minuten in einem metallischen Heizblock erhitzt (**Kap. 5.1.10**). Nach der Röstung wurden Sonnenblumenöl und Röstgut gemeinsam mit je 50 ml Diethylether unter Zugabe des isotopenmarkierten Standards extrahiert. Dieses Öl-Lösungsmittel-Gemisch wurde anschließend der weiteren Aufarbeitung unterzogen (**Kap. 5.5.1.3**). Bei dieser Röstmethode wurden 915 (60 Minuten) bzw. 1870 µg 2-Furanmethanthiol/kg Kaffee (120 Minuten) gebildet. Beim Erhitzen von 10 ml Sonnenblumenöl ohne Zugabe einer Rohkaffeeprobe (120 Minuten, 180 °C) konnte kein 2-Furanmethanthiol nachgewiesen werden. Das Rösten in Sonnenblumenöl war deshalb für gemahlene Kaffeeproben am besten geeignet und wurde somit für die folgenden Versuche angewendet.

Zur weiteren Fraktionierung wurde der aus dem Referenzkaffee gewonnene Rohkaffeeextrakt mittels Ultrafiltration (Trennung bis zu einem Molekulargewicht von 1000 Da, **Kap. 5.1.6**) in eine höher- (> 1000 Da, 6,5 % des Rohkaffeeextrakts) und eine niedermolekulare wasserlösliche Fraktion (< 1000 Da, 93,5 % des Rohkaffeeextrakts) aufgetrennt und beide Fraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet. Je 100 bis 500 mg des Rohkaffeeextrakts sowie der beiden gefriergetrockneten Unterfraktionen des Rohkaffeeextrakts wurden in Sonnenblumenöl bei 180 °C für 60 Minuten geröstet. Sowohl im gerösteten Rohkaffeeextrakt als auch in den beiden gerösteten Unterfraktionen des Rohkaffeeextrakts konnte jedoch kein 2-Furanmethanthiol nachgewiesen werden, so dass die Annahme bestätigt wurde, dass im wasserlöslichen Rohkaffeeextrakt keine nennenswerten Mengen an Vorläufersubstanzen für 2-Furanmethanthiol lokalisiert sind.

2.2.1.2 Vergleich der Gehalte an 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanthiol in Roh- und Röstkaffee

Da 2-Furanmethanthiol in Modellversuchen durch Reaktion von 2-Furancarbaldehyd mit Schwefelwasserstoff oder Cystein generiert werden konnte (Shibamoto, 1977; Parliment und Stahl, 1994; Hofmann, 1995; Cerny und Davidek, 2003, **Kap. 1.5.2**), wurde von Hofmann (1995) ein Reaktionsmechanismus zur Bildung von 2-Furanmethanthiol mit 2-Furancarbaldehyd als Intermediat postuliert (**Abb. 1.10**). Des Weiteren wurde eine Verknüpfung mit der Bildung von 2-Furanmethanol vermutet (Parliment und Stahl, 1994). Der Zusammenhang der Entstehung der beiden Furanverbindungen 2-Furanmethanthiol und 2-Furancarbaldehyd wurde in neueren Untersuchungen auf der Grundlage von „in-bean“-Experimenten jedoch angezweifelt (Poisson et al., 2009).

Ein möglicher Zusammenhang der Bildungswege von 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanthiol sollte zunächst durch einen Vergleich der Entwicklung der Konzentrationen der drei Substanzen während der Röstung von Referenzkaffeebohnen untersucht werden. Hierfür wurden sowohl in rohem als auch in unterschiedlich lang geröstetem Referenzkaffee (Kaffeeröster, fünf bzw. sieben Minuten, 180 °C) die Gehalte an 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanthiol nach Lösungsmittlextraktion und SAFE-Destillation mittels SIVA

unter Verwendung der isotopenmarkierten Standards [$^{13}\text{C}_2$]-2-Furanmethanol (c-29), [$^{13}\text{C}_2$]-2-Furancarbaldehyd (c-28, **Abb. 2.5**) und [$^2\text{H}_2$]-2-Furanmethanthiol (d-3, **Abb. 2.3**) mittels HRGC/HRGC-MS/CI bestimmt (**Kap. 2.1.1.5**). Die Verbindungen [$^{13}\text{C}_2$]-2-Furanmethanol und [$^{13}\text{C}_2$]-2-Furancarbaldehyd wurden hierfür wie in den **Kapiteln 5.3.4** und **5.3.5** beschrieben synthetisiert.

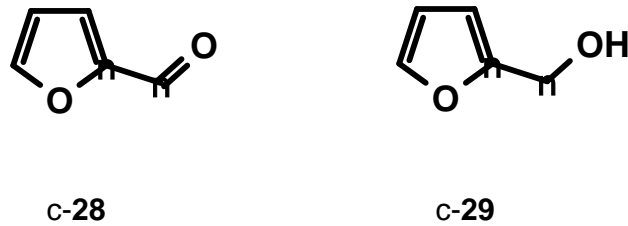


Abbildung 2.5 Isotopenmarkierte Standards für die Stabilisotopenverdünnungsanalyse (■ ^{13}C -Atom):
 c-28: [$^{13}\text{C}_2$]-2-Furancarbaldehyd
 c-29: [$^{13}\text{C}_2$]-2-Furanmethanol

Die in **Tabelle 2.36** dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass 2-Furanmethanol bereits in rohem Referenzkaffee mit einem Gehalt von 1,48 mg/kg enthalten war. Nach fünf Minuten Röstung war der Gehalt um einen Faktor von rund 400 auf 559 mg/kg angestiegen. Während der weiteren Röstung erhöhte sich der Gehalt an 2-Furanmethanol nochmals um einen Faktor von etwa 1,8 verglichen mit der nach fünf Minuten Röstung gemessenen Konzentration, auf 1020 mg/kg. Ähnlich verhielt es sich mit 2-Furancarbaldehyd, dessen Gehalt von 344 $\mu\text{g}/\text{kg}$ im rohen Referenzkaffee auf 76,0 mg/kg (Faktor 200) nach fünf Minuten Röstung bzw. auf 108 mg/kg (Faktor 1,4) nach sieben Minuten Röstung anstieg. 2-Furanmethanthiol war im rohen Referenzkaffee nicht nachweisbar. Nach fünf Minuten Röstung enthielt der geröstete Referenzkaffee 418 μg 2-Furanmethanthiol/kg und nach sieben Minuten Röstung 1,53 mg/kg (Faktor 3,7). Die Konzentrationen der drei Verbindungen nahmen während der Röstung des Rohkaffees erwartungsgemäß zu, waren jedoch deutlich unterschiedlich. Nach sieben Minuten Röstung lag der Gehalt von 2-Furanmethanol etwa 670-fach und der von 2-Furancarbaldehyd rund 70-fach über dem Gehalt von 2-Furanmethanthiol. Bei einer isolierten Betrachtung des Konzentrationsanstiegs der drei Substanzen während der letzten beiden Minuten der Röstung fällt auf, dass der

Gehalt an 2-Furanmethanthiol zum Ende der Röstung mit einem Faktor von 3,7 stärker zunahm als die Gehalte an 2-Furanmethanol (Faktor 1,8) und 2-Furancarbaldehyd (Faktor 1,4).

Tabelle 2.36 Konzentrationen an 2-Furanmethanol (FM), 2-Furancarbaldehyd (FCA) und 2-Furanmethanthiol (FFT) in rohem sowie unterschiedlich lang geröstetem Referenzkaffee (5 bzw. 7 Min., 180 °C, Kaffeeröster).

Kaffeeprobe	Konzentration [mg/kg]		
	FM	FCA	FFT
roher Referenzkaffee	1,48	0,344	n. m. ^a
gerösteter Referenzkaffee (5 Min.)	559	76,0	0,418
gerösteter Referenzkaffee (7 Min.)	1020	108	1,53

^a nicht messbar.

Im Folgenden wurde daher die mögliche Bildung von 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd aus freier D-Ribose im Zuge von Isotopenanreicherungsversuchen untersucht.

2.2.1.3 Quantifizierung von D-Ribose in Rohkaffee und Rohkaffeefractionen und Isotopenanreicherungsversuch

Isotopenmarkierungsversuche oder CAMOLA-Experimente dienen dazu, mit Hilfe stabilisotopenmarkierter Edukte diejenigen Moleküle oder Molekülbestandteile zu identifizieren, die am Aufbau von Aromastoffen beteiligt sind. Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, wurde beim Erhitzen eines Ribose und Cystein enthaltenden Modellansatzes 2-Furanmethanthiol gebildet (Parliment und Stahl, 1994; Hofmann und Schieberle, 1995; Cerny und Davidek, 2003). Um die Reaktionen zwischen potentiellen Vorläufersubstanzen von 2-Furanmethanthiol unter möglichst realitätsnahen Bedingungen in der Lebensmittelmatrix simulieren zu können, wurde für die folgenden Isotopenanreicherungsversuche in Kaffee das „in-bean“-Modell angewandt (**Kap. 1.5.3**).

Zur Quantifizierung des Gehalts an frei vorliegender D-Ribose (**Abb. 2.6**) in verschiedenen ungerösteten Kaffeeprobe wurde zunächst eine Stabilisotopen-

verdünnungsanalyse (SIVA) in Anlehnung an Clarke et al. (2006) unter Verwendung ubiquitär ^{13}C -markierter D-Ribose ($[^{13}\text{C}_5]$ -D-Ribose, **Abb. 2.6**) entwickelt. Die Detektion der Kohlenhydrate erfolgte dabei nach chromatographischer Trennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) über Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS, **Kap. 5.9.7**).

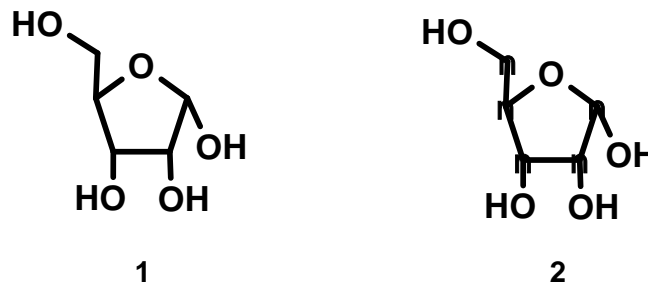


Abbildung 2.6 D-Ribose (1) und $[^{13}\text{C}_5]$ -D-Ribose (2).

Die HPLC-MS/MS-Methode wurde sowohl für D-Ribose als auch für den internen Standard $[^{13}\text{C}_5]$ -D-Ribose optimiert. Anhand des Massenspektrums von D-Ribose im ESI-negativ-Modus (**Abb. 2.7 (A)**) wurde ersichtlich, dass das Fragment mit dem m/z -Verhältnis 89 die höchste Intensität aufwies. Zur Quantifizierung im MS/MS (SRM-Modus) wurde deshalb die Bildung dieses Fragments aus der Molekülmasse mit dem m/z -Verhältnis 149 $[\text{M}(\text{D-Ribose})-1]$ herangezogen.

Das Massenspektrum von $[^{13}\text{C}_5]$ -D-Ribose dagegen wies das Fragment mit dem m/z -Verhältnis 92 als Spaltprodukt mit der höchsten Intensität auf (**Abb. 2.7 (B)**). Zur Quantifizierung des isopenmarkierten Standards im MS/MS (SRM-Modus) wurde somit die Bildung des Fragments 92 aus der Molekülmasse mit dem m/z -Verhältnis 154 $[\text{M}([^{13}\text{C}_5]\text{-D-Ribose})-1]$ herangezogen.

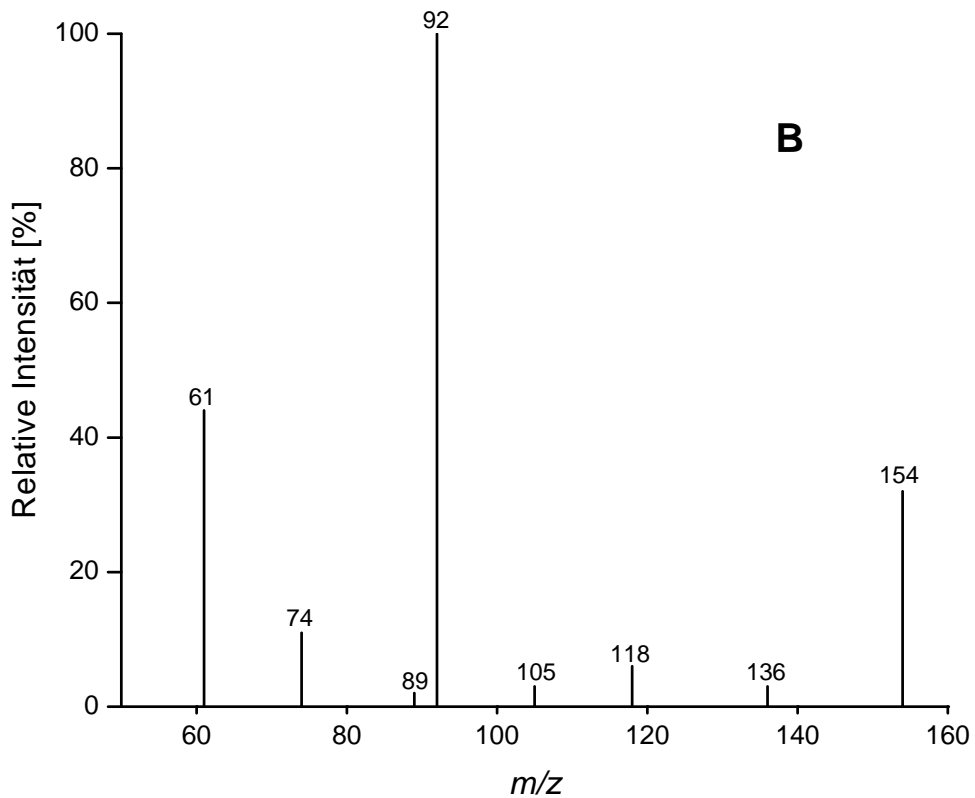
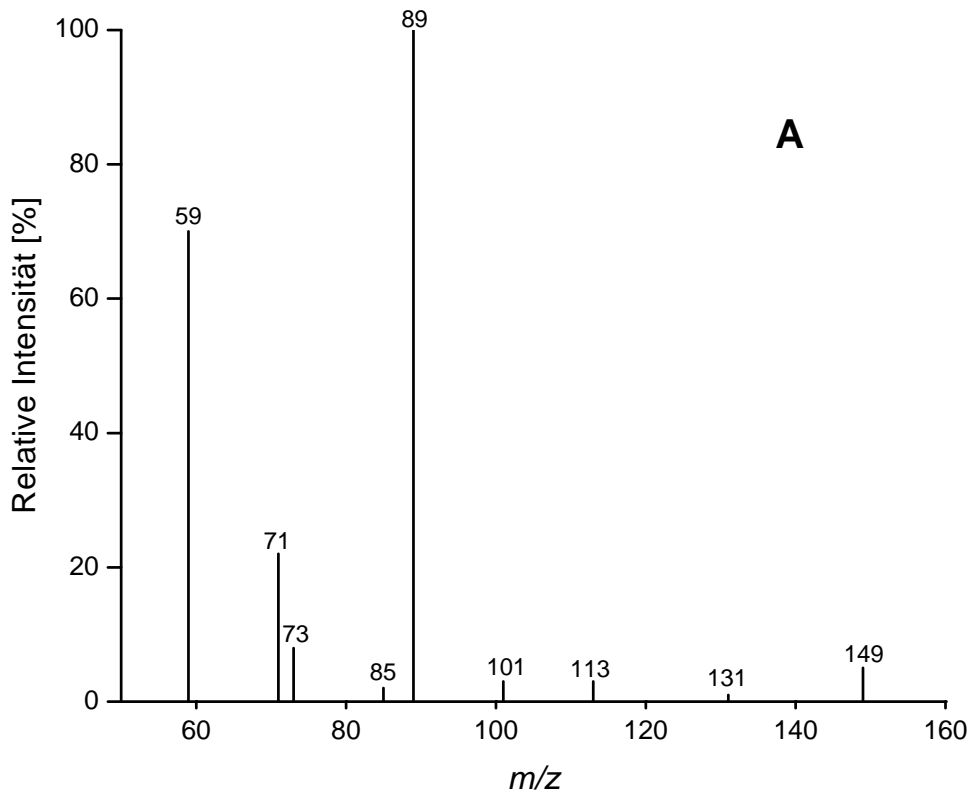


Abbildung 2.7 Massenspektren (MS/ESI negativ) von D-Ribose (**A**) sowie $^{13}\text{C}_5$ -D-Ribose (**B**).

Um Unterschiede bei der Detektion von Analyt und Standard zu berücksichtigen und ausgleichen zu können, wurde ein Responsefaktor R_F zwischen unmarkierter D-Ribose und isotopenmarkierter [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose ermittelt. Dieser konnte aus der Steigung der Kalibriergeraden abgelesen werden und betrug 1,07 (**Abb. 2.8**).

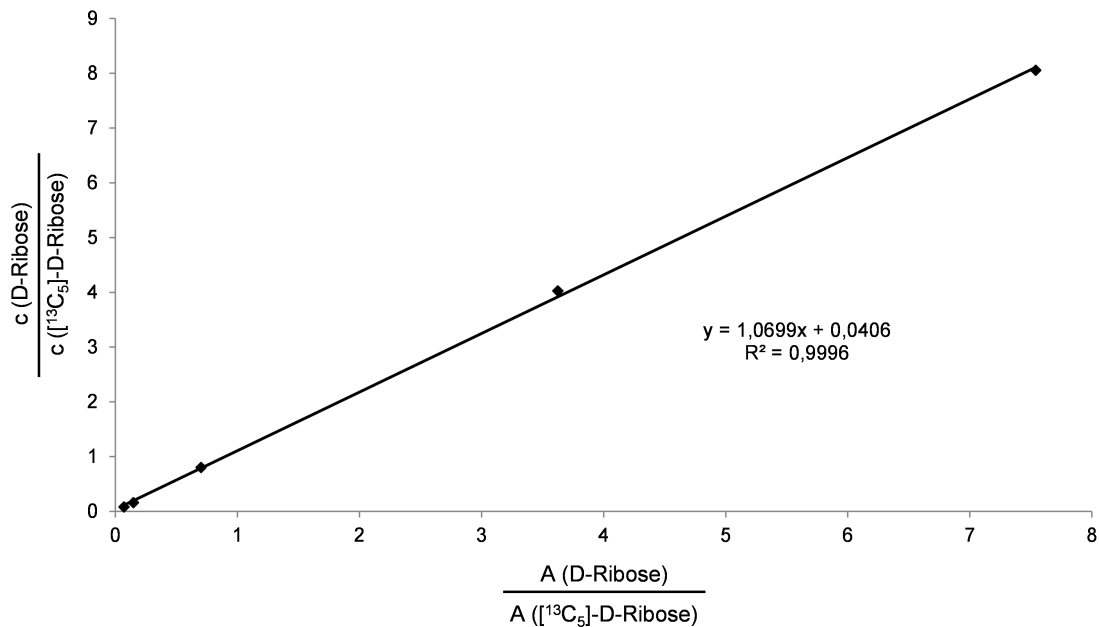


Abbildung 2.8 Kalibriergerade zur Responsefaktorbestimmung von D-Ribose und [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose bei der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS; c = Konzentration; A = Peakfläche des jeweiligen Fragments).

Für die Quantifizierung von D-Ribose im Referenzkaffee, in den extrahierten Rohkaffeebohnen und im Rohkaffeeextrakt wurden die Proben gemahlen und unter Zugabe des isotopenmarkierten Standards [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose mit Wasser extrahiert. Der Wasserextrakt wurde ultrazentrifugiert, das Filtrat mit Acetonitril verdünnt und zur HPLC-MS/MS-Analyse eingesetzt (**Kap. 5.8.3.2** und **Abb. 2.9**).

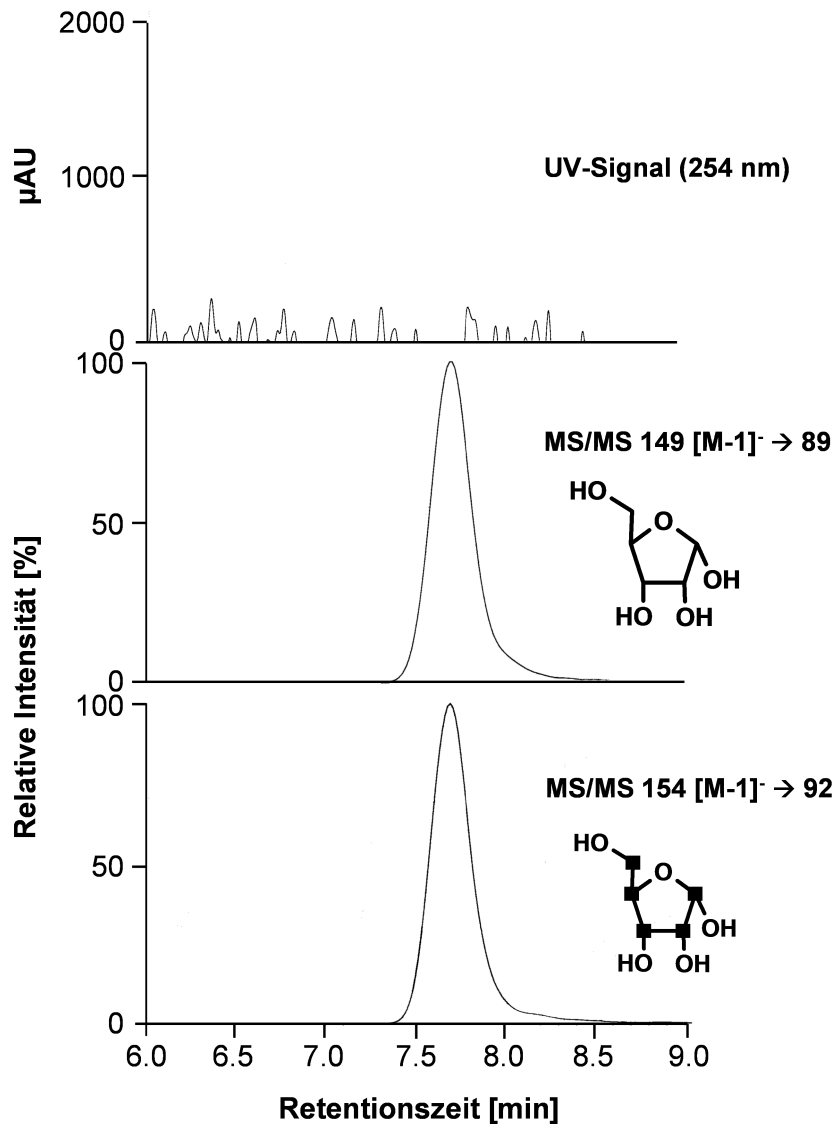


Abbildung 2.9 HPLC-MS/MS-Chromatogramme eines Rohkaffeeextrakts mit den Massenübergängen von D-Ribose ($m/z = 89$ aus 149) und [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose ($m/z = 92$ aus 154).

Auf diese Weise konnte der Gehalt an D-Ribose zu 34,5 mg pro Kilogramm Referenzkaffee bestimmt werden (**Tab. 2.37**). Die extrahierten Rohkaffeebohnen enthielten lediglich 6,44 mg D-Ribose/kg, während der Rohkaffeeextrakt mit 114 mg/kg erwartungsgemäß die höchste Konzentration an D-Ribose aufwies. Der Beitrag dieser beiden Fraktionen zum Gesamtgehalt der D-Ribose im nicht-fraktionierten Referenzkaffee wurde durch Einberechnung des Fraktionsanteils auf die Gesamtmasse an Referenzkaffee, aus dem die jeweilige Fraktion gewonnen worden war, ersichtlich. Demzufolge betrug die Summe der Gehalte an D-Ribose in extrahierten Rohkaffeebohnen und im Rohkaffeeextrakt 24,8 mg/kg. Die Extraktion und Trocknung

des Referenzkaffees führte folglich zu einem Verlust an frei vorliegender D-Ribose von nahezu 30 %. Beim Vergleich dieses theoretisch berechneten Werts mit der in rekombinierten Rohkaffeebohnen bestimmten D-Ribosemenge (14,3 mg/kg) fiel ein weiterer Verlust an D-Ribose durch das Rekombinationsverfahren von gut 40 % auf. Die Bestimmung der D-Ribosekonzentration rekombinierter Rohkaffeebohnen erfolgte deshalb grundsätzlich nach der Rekombination der Bohnen.

Tabelle 2.37 Konzentrationen an D-Ribose in Referenzkaffee, extrahiertem Referenzkaffee, Referenzkaffeeextrakt und rekombiniertem Rohkaffee.

Kaffeeprobe (prozentualer Anteil am Referenzkaffee)	Konzentration D-Ribose [mg/kg] ^a in	
	Fraktion	Originalmaterial
Referenzkaffee (100 %)	---	34,5
Extrahierter Rohkaffee (83 %)	6,44	5,35 ^b
Rohkaffeeextrakt (17 %)	114	19,4 ^b
Rekombinierter Rohkaffee (100 %)	---	14,3

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens ± 15 %.

^b Berechnet aus prozentualem Anteil der jeweiligen Rohkaffeeextraktfraktion am Originalmaterial.

Gemäß des von Hofmann (1995) postulierten Bildungswegs zu 2-Furanmethanthiol (**Abb. 1.10**) entstammte das Kohlenstoffgerüst des Aromastoffs vollständig der Pentose, was in einem Modellansatz mit Hilfe von [¹³C₅]-D-Ribose von Cerny und Davidek (2003) bewiesen wurde (**Kap. 1.5.2**). Um prüfen zu können, ob dieser Reaktionsweg auch beim Rösten von Kaffeebohnen abläuft, wurden Rohkaffeebohnen aus extrahierten Rohkaffeebohnen und einer entsprechenden Menge an Rohkaffeeextrakt (**Kap. 5.1.7**) rekombiniert. Dabei wurde dem Rohkaffeeextrakt eine seinem natürlichen D-Ribosegehalt vergleichbare Menge an isotonenmarkierter [¹³C₅]-D-Ribose zugesetzt. Die auf diese Weise hergestellten rekombinierten Rohkaffees enthielten somit sowohl freie D-Ribose als auch freie [¹³C₅]-D-Ribose. Unter der Annahme, dass während der Röstung das komplette Kohlenstoffgerüst der freien D-Ribose in das 2-Furanmethanthiol-Molekül eingebaut wird, müsste sowohl 2-Furanmethanthiol mit der Molmasse 114 g/mol aus unmarkierter D-Ribose als auch 2-Furanmethanthiol mit der Molmasse 119 g/mol aus ¹³C₅-markierter D-Ribose im definierten Verhältnis entstehen (**Abb. 2.10**).

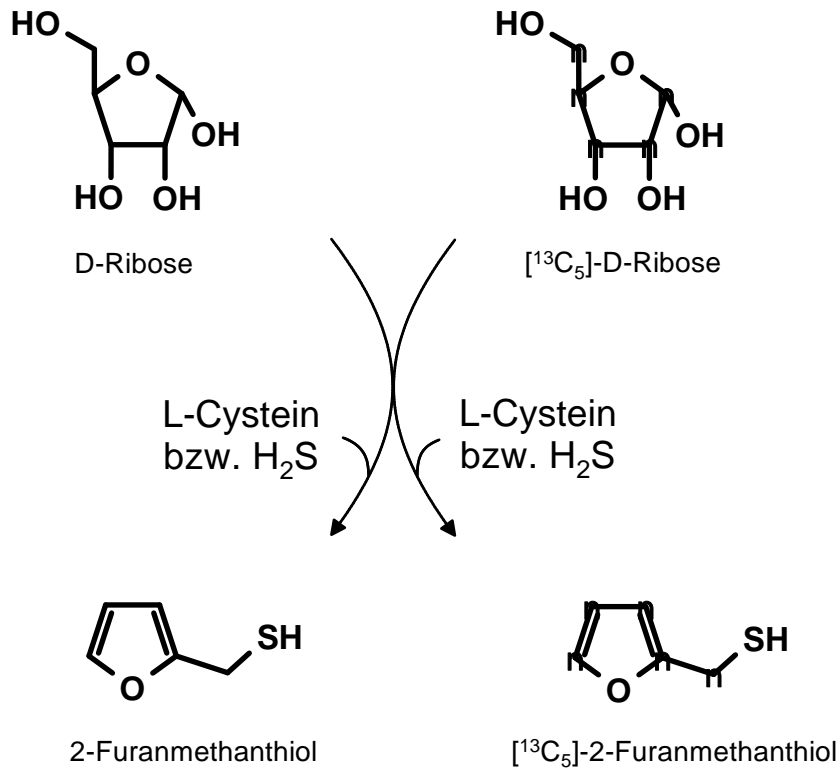


Abbildung 2.10 Theoretischer Einbau der Kohlenstoffkette von D-Ribose in 2-Furanmethanliol.

Entscheidend für die Beurteilung der Beteiligung frei vorliegender D-Ribose an der Bildung von 2-Furanmethanliol war der Vergleich der Stoffmengenverhältnisse von $n(\text{D-Ribose})$ zu $n([\text{}^{13}\text{C}_5\text{-D-Ribose})$ in den rekombinierten Rohkaffeebohnen vor der Röstung und von $n(2\text{-Furanmethanliol})$ zu $n([\text{}^{13}\text{C}_5\text{-}2\text{-Furanmethanliol})$ im daraus erhaltenen Röstkaffee nach der Röstung. Hierfür wurde nach der Gefriertrocknung der rekombinierten Rohkaffeebohnen das tatsächliche Riboseverhältnis über HPLC-MS/MS (**Kap. 5.9.7**) bestimmt, um mögliche Verluste an [¹³C₅]-D-Ribose bei der Rekombination der Rohkaffeebohnen zu berücksichtigen. Die Rekombinate wiesen Verhältnisse von 3,77 zu 1 und 3,22 zu 1 für D-Ribose zu [¹³C₅]-D-Ribose auf (**Tab. 2.38**).

Die getrockneten, rekombinierten Rohkaffeebohnen wurden anschließend im Kaffeeröster für sechs Minuten bei 200 °C geröstet. In den erhaltenen Röstkaffees erfolgte die Bestimmung des Stoffmengenverhältnisses von $n(2\text{-Furanmethanliol})$ zu $n([\text{}^{13}\text{C}_5\text{-}2\text{-Furanmethanliol})$ analog **Kapitel 5.5**, wobei die säulenchromatographisch aufgereinigten SAFE-Destillate am HRGC/HRGC-MS im CI-Modus vermessen wurden. Da hierbei das Fragment, das unter Abspaltung der Thiolgruppe aus 2-Furanmethanliol entstand, die jeweils höchste Intensität aufwies (**Abb. 2.11**), wurden

die Massenspuren mit den m/z -Verhältnissen 81 (2-Furanmethanthiol unter SH-Abspaltung) und 86 ($[^{13}\text{C}_5]$ -2-Furanmethanthiol unter SH-Abspaltung) in Analogie zu **Kapitel 5.8.3.1** für die Bestimmung des Stoffmengenverhältnisses herangezogen.

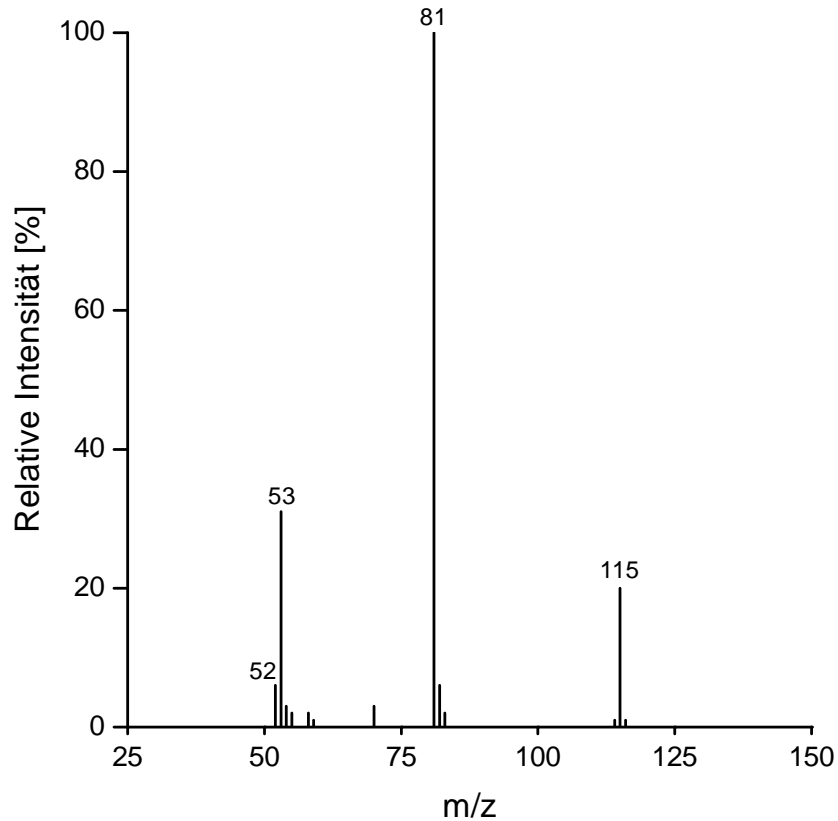


Abbildung 2.11 Massenspektrum (MS/CI) von 2-Furanmethanthiol.

Für die Annahme, dass das Kohlenstoffgerüst von 2-Furanmethanthiol überwiegend aus frei vorliegender D-Ribose stammt, müssten die Stoffmengenverhältnisse von $n(\text{D-Ribose})$ zu $n([^{13}\text{C}_5]\text{-D-Ribose})$ in den rekombinierten Rohkaffees und von $n(2\text{-Furanmethanthiol})$ zu $n([^{13}\text{C}_5]\text{-}2\text{-Furanmethanthiol})$ in den gerösteten Rekombinaten vergleichbar sein. Wie **Abbildung 2.12** jedoch veranschaulicht, wies die Massenspur mit dem m/z -Verhältnis 81 (unmarkiertes 2-Furanmethanthiol) eine hohe Signalintensität auf, während die Massenspur mit dem m/z -Verhältnis 86 ($[^{13}\text{C}_5]$ -2-Furanmethanthiol) kaum nachgewiesen werden konnte (**Tab. 2.38**). Andere Massenspuren, die auf einen partiellen Einbau des Kohlenstoffgerüsts der D-Ribose hätten schließen lassen können, traten nicht auf. Eine Beteiligung von frei vorliegender D-Ribose an der Bildung von 2-Furanmethanthiol bei der Röstung von rekombinierten Kaffeebohnen konnte damit ausgeschlossen werden.

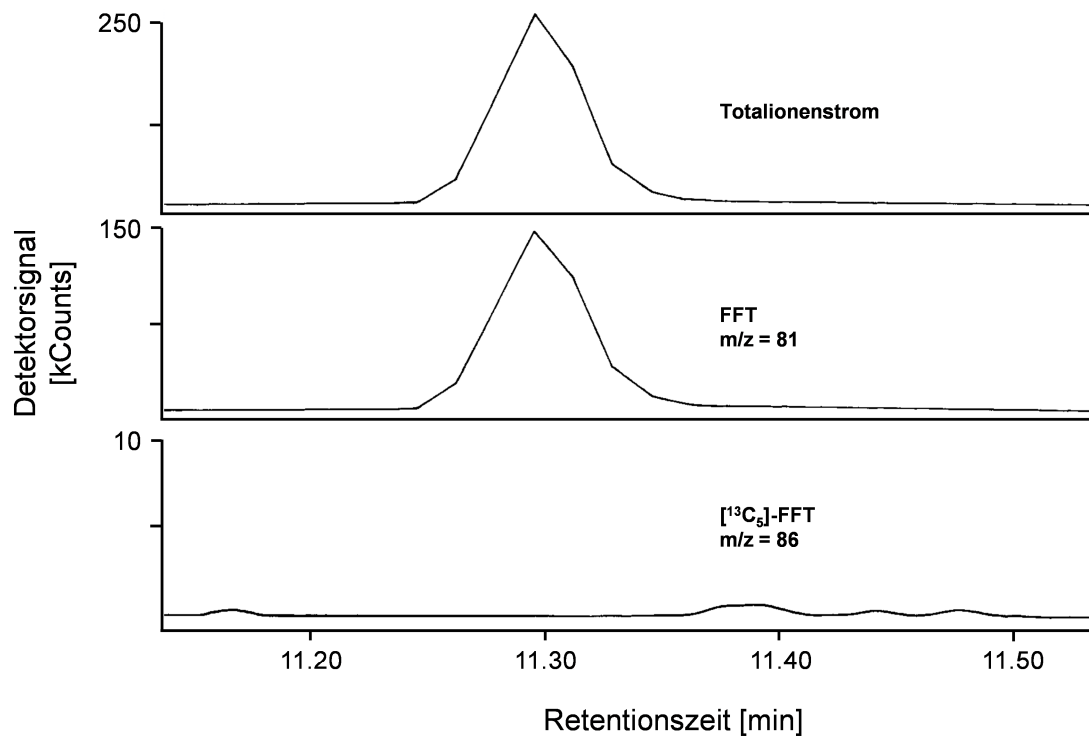


Abbildung 2.12 Totalionenstrom und Massenspuren von 2-Furanmethanthiol (FFT, $m/z = 81$) sowie $[^{13}\text{C}_5]$ -2-Furanmethanthiol ($[^{13}\text{C}_5]$ -FFT, $m/z = 86$) bei der Messung mittels HRGC/HRGC-MS.

Ob 2-Furanmethanol bzw. 2-Furancarbaldehyd bei der Röstung von Kaffee aus freier D-Ribose gebildet werden konnten, wurde ebenfalls anhand dieses Isotopenanreicherungsversuchs durch Berechnung der Stoffmengenverhältnisse von 2-Furancarbaldehyd zu $[^{13}\text{C}_5]$ -2-Furancarbaldehyd bzw. 2-Furanmethanol zu $[^{13}\text{C}_5]$ -2-Furanmethanol über HRGC/HRGC-MS/CI-Analysen überprüft. Da im MS/CI von 2-Furancarbaldehyd das Molekülion $[\text{M}+\text{H}]^+$ die höchste Intensität aufwies, wurden zur Berechnung des Stoffmengenverhältnisses von 2-Furancarbaldehyd zu $[^{13}\text{C}_5]$ -2-Furancarbaldehyd die Massenspuren mit den m/z -Verhältnissen 97 ($\text{M}(2\text{-Furancarbaldehyd})+\text{H}^+$) bzw. 102 ($\text{M}([^{13}\text{C}_5]\text{-2-Furancarbaldehyd})+\text{H}^+$) herangezogen. Im MS/CI von 2-Furanmethanol zeigte das unter Abspaltung der Hydroxygruppe entstehende Fragment die höchste Intensität, so dass zur Berechnung des Stoffmengenverhältnisses von 2-Furanmethanol zu $[^{13}\text{C}_5]$ -2-Furanmethanol die Massenspuren mit den m/z -Verhältnissen 81 (2-Furanmethanol unter OH-Abspaltung) bzw. 86 ($[^{13}\text{C}_5]$ -2-Furanmethanol unter OH-Abspaltung) integriert wurden. Wie die Ergebnisse in **Tabelle 2.38** zeigen, konnten sowohl $^{13}\text{C}_5$ -markiertes 2-Furancarbaldehyd ($m/z = 102$) als auch $^{13}\text{C}_5$ -markiertes 2-Furanmethanol ($m/z = 86$) kaum

nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der Entstehung von 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanol aus freier D-Ribose in Rohkaffee keine Bedeutung zukam.

Tabelle 2.38 Stoffmengenverhältnisse von D-Ribose zu [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose in rekombinierten Rohkaffees (Rekombination 1 und 2) und von 2-Furanmethanthiol (FFT) zu [$^{13}\text{C}_5$]-FFT, 2-Furancarbaldehyd (FCA) zu [$^{13}\text{C}_5$]-FCA und 2-Furanmethanol (FM) zu [$^{13}\text{C}_5$]-FM in daraus hergestellten Röstkaffees.

Kaffeeprobe	Stoffmengenverhältnisse n (unmarkiert) / n (markiert) ^a			
	D-Ribose im Rohkaffee	FFT im Röstkaffee	FCA im Röstkaffee	FM im Röstkaffee
Rekombination 1	3,27 : 1	> 10000 : 1	> 10000 : 1	> 10000 : 1
Rekombination 2	3,77 : 1	> 5000 : 1	> 10000 : 1	> 10000 : 1

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 15\%$.

2.2.1.4 Quantifizierung von L-Cystein in Rohkaffee und Rohkaffeefractionen, Synthese von [^{34}S]-L-Cystein und Isotopenanreicherungsversuch

Auch die mögliche Beteiligung der freien Aminosäure L-Cystein (**Abb. 2.13**) an der Bildung des Aromastoffs 2-Furanmethanthiol wurde über die Isotopenanreicherungstechnik mit Hilfe des „in-bean“-Modells untersucht.

Hierzu waren zunächst die Gehalte an freiem L-Cystein in den verschiedenen Rohkaffeeprouben von Interesse. Für die Quantifizierung wurde eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse in Anlehnung an Reinbold et al. (2008) entwickelt. Dabei wurde [$^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}$]-L-Cystein (**Abb. 2.13**) als isotopenmarkierter Standard verwendet.

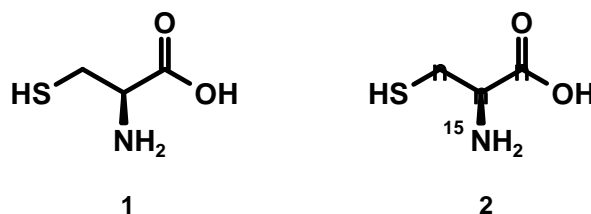


Abbildung 2.13 L-Cystein (1) und [$^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}$]-L-Cystein (2)

Die Detektion der Aminosäure erfolgte nach Derivatisierung mit Dansylchlorid und chromatographischer Trennung über HPLC mittels Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS, **Kap. 5.9.7**). Vor der Derivatisierung musste außerdem die Thiolgruppe durch eine Umsetzung mit Iodethansäure geschützt werden (**Kap. 5.8.3.3** und **Abb. 2.14**).

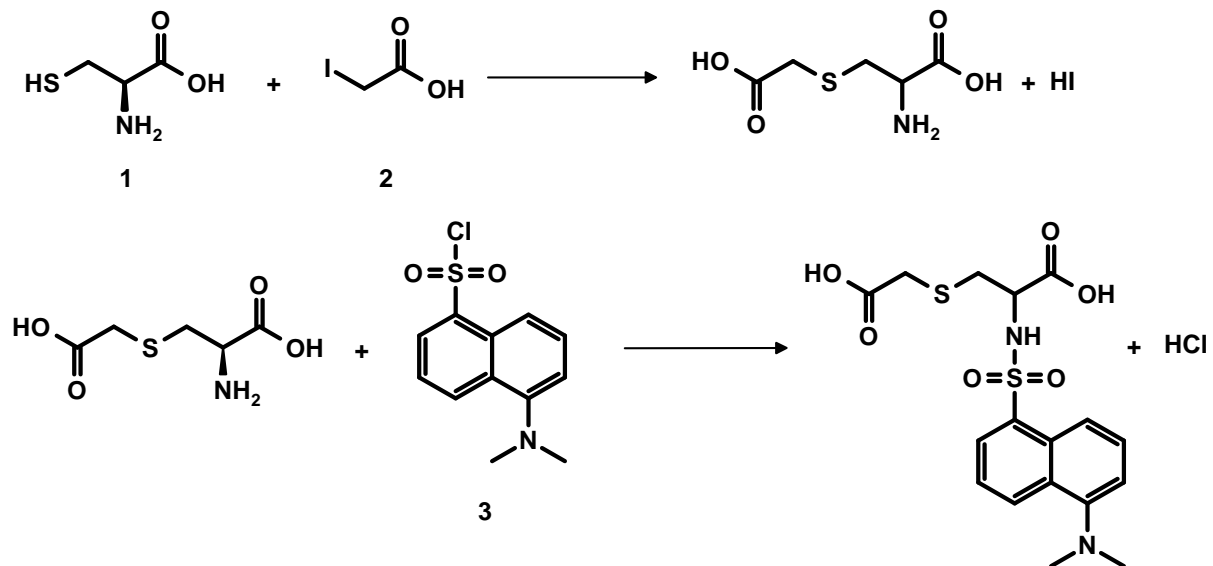


Abbildung 2.14 Derivatisierung von L-Cystein (1) mit Iodethansäure (2) und Dansylchlorid (3).

Die Optimierung der HPLC-MS/MS-Methode erfolgte sowohl für das dansylierte, geschützte L-Cystein, als auch für das dansylierte, geschützte [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-L-Cystein. In den im ESI-positiv-Modus aufgenommenen Massenspektren beider Moleküle wies jeweils das Fragment mit dem m/z -Verhältnis 252 die höchste Intensität auf (**Abb. 2.15 (A)** und **Abb. 2.15 (B)**). Für die Quantifizierungen im MS/MS (SRM-Modus) wurde deshalb die Bildung dieses Fragments aus den Molekülmassen mit dem m/z -Verhältnis 413 [M(derivatisiertes L-Cystein)+1] bzw. 417 [M(derivatisiertes [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-L-Cystein)+1] herangezogen.

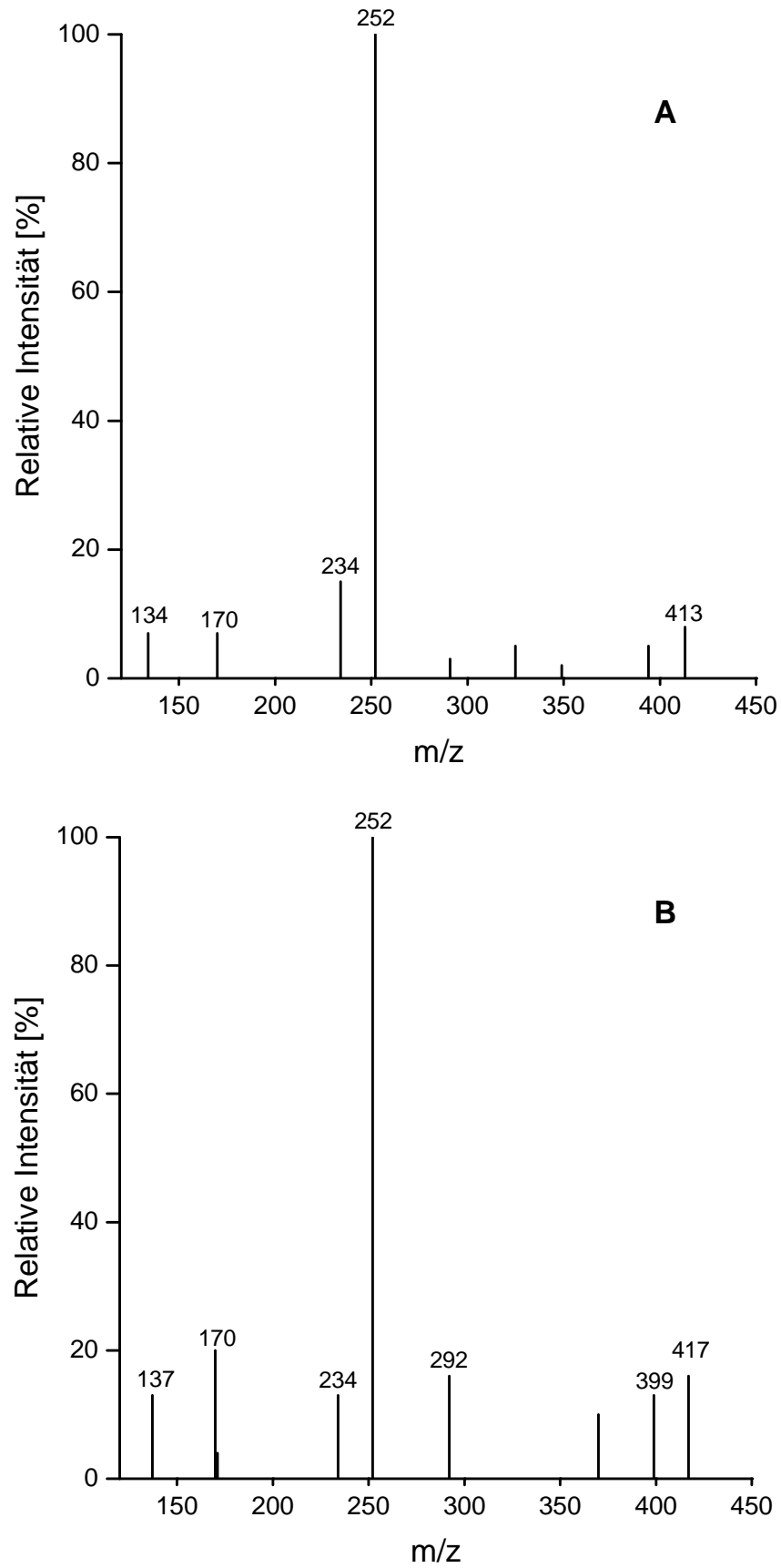


Abbildung 2.15 Massenspektrum (MS/ESI positiv) von derivatisiertem L-Cystein (**A**) sowie derivatisiertem [¹³C₃, ¹⁵N]-L-Cystein (**B**).

Zum Ausgleich von Detektionsunterschieden zwischen Analyt und Standard am MS wurde der Responsefaktor R_F zwischen unmarkiertem, derivatisiertem L-Cystein und isotopenmarkiertem, derivatisiertem $[^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ -L-Cystein durch Vermessung von Kalibrierlösungen bestimmt. Die Steigung der hierbei erhaltenen Kalibriergerade betrug 0,991 (**Abb. 2.16**).

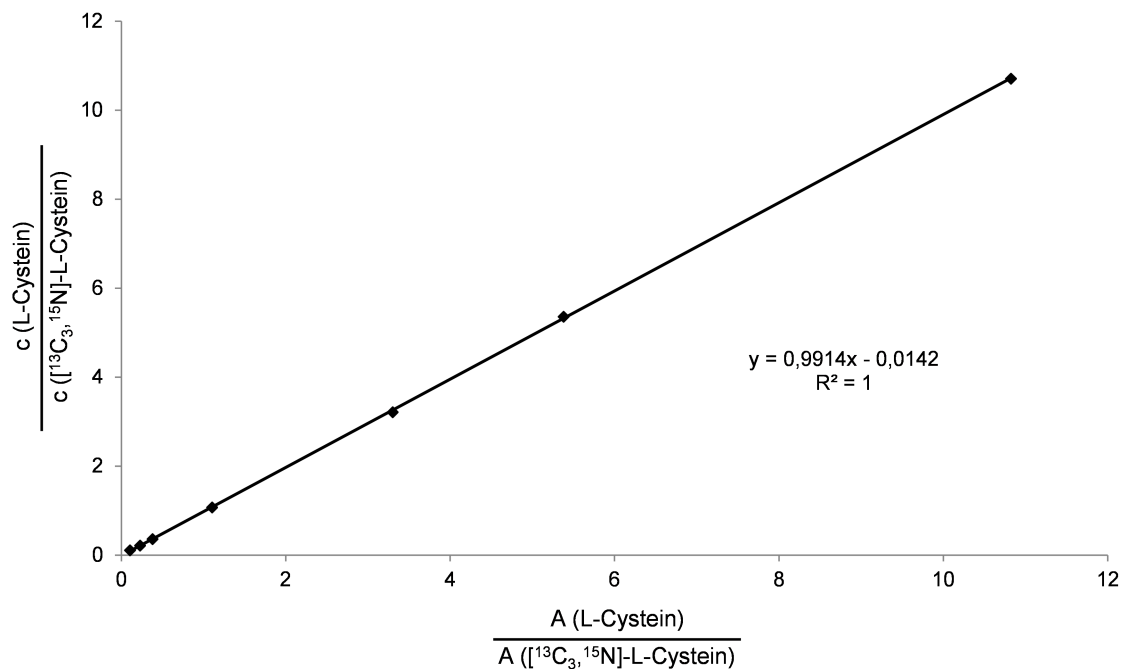


Abbildung 2.16 Kalibriergerade zur Responsefaktorbestimmung von derivatisiertem L-Cystein und derivatisiertem $[^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ -L-Cystein bei der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS; c = Konzentration; A = Peakfläche des jeweiligen Fragments).

Zur Quantifizierung von freiem L-Cystein wurden die gemahlene Rohkaffeeproben mit Wasser extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend ultrazentrifugiert und das Filtrat zur weiteren Aufarbeitung herangezogen. Nach Zugabe eines Reduktionsmittels zur Spaltung eventuell vorhandener Disulfidbrücken und dem Schutz der Thiolgruppe mittels Iodethansäure erfolgte die Derivatisierung mit Dansylchlorid. Die wässrige Phase wurde filtriert und zur HPLC-MS/MS-Analyse eingesetzt (**Kap. 5.9.7** und **Abb. 2.20**).

Auf diese Weise wurde im Referenzkaffee ein Gehalt von 15,2 mg L-Cystein/kg Kaffee ermittelt (**Tab. 2.39**). Ähnlich wie bei D-Ribose war auch hier auffällig, dass die

Extraktion der Referenzkaffeebohnen zu einem deutlichen Verlust an L-Cystein führte. Die Konzentration im Rohkaffeeextrakt lag zwar bei 14,3 mg/kg, in den extrahierten Rohkaffeebohnen betrug sie aber lediglich 1,99 mg/kg. Unter Berücksichtigung der prozentualen Anteile der beiden Fraktionen am Referenzkaffee wurde die Summe der L-Cystein-Gehalte in den daraus rekombinierten Bohnen mit 4,08 mg/kg berechnet. Die tatsächliche Konzentration von L-Cystein in den rekombinierten Rohkaffeebohnen wurde mit 4,28 mg/kg bestimmt. Dies bestätigte einerseits den deutlich niedrigeren Gehalt im Vergleich zum Referenzkaffee, zeigte andererseits aber auch, dass bei der Rekombination der beiden Rohkaffeeaktionen der Rohkaffeeextrakt nahezu vollständig in die extrahierten Rohkaffeebohnen eingesaugt wurde.

Tabelle 2.39 Konzentrationen an L-Cystein in Referenzkaffee, extrahiertem Rohkaffee, Rohkaffeeextrakt und rekombiniertem Rohkaffee.

Kaffeeprobe (prozentualer Anteil am Referenzkaffee)	Konzentration L-Cystein [mg/kg] ^a in	
	Fraktion	Originalmaterial
Referenzkaffee (100 %)	---	15,2
Extrahierter Rohkaffee (83 %)	1,99	1,65 ^b
Rohkaffeeextrakt (17 %)	14,3	2,43 ^b
Rekombinierter Rohkaffee (100 %)	---	4,28

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

^b Berechnet aus prozentualem Anteil der jeweiligen Rohkaffeeaktion am Originalmaterial.

Nach Hofmann (**Abb. 1.10**) dient Schwefelwasserstoff, der beispielsweise aus L-Cystein freigesetzt werden kann, als Schwefelquelle beim Aufbau von 2-Furanmethanthiol. Modellversuche, bei denen der Aromastoff beim Erhitzen von Cystein und Ribose generiert wurde (u. a. Hofmann und Schieberle, 1995), bekräftigen diese Annahme. Um den Einbau des Schwefelatoms von L-Cysteins in das 2-Furanmethanthiol-Molekül anhand eines Isotopenanreicherungsversuchs verfolgen zu können, wurde ³⁴S-markiertes L-Cystein benötigt, das hierfür, wie im Folgenden dargestellt, synthetisiert wurde.

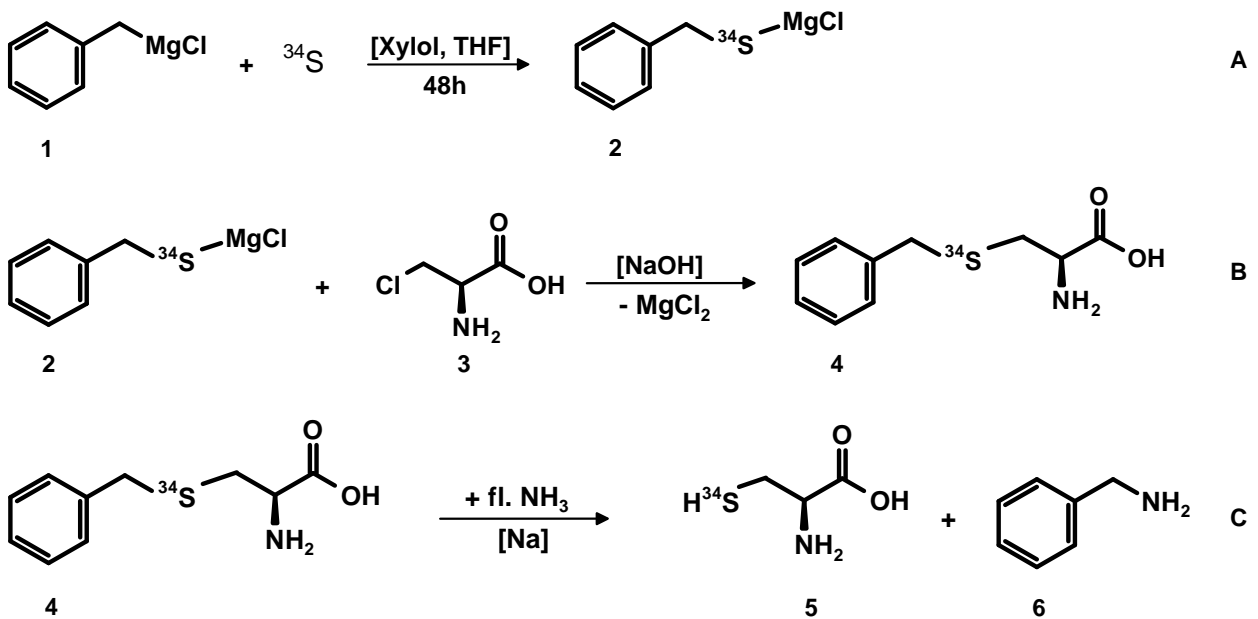


Abbildung 2.17 Inkorporierung von ^{34}S in Benzylmagnesiumchlorid (1, A). Umsetzung von ^{34}S -Phenylmethanthiolmagnesiumchlorid (2) mit β -Chlor-L-alanin (3) zu ^{34}S -Benzyl-L-cystein (4, B). Ammonolyse von ^{34}S -Benzyl-L-cystein in flüssigem Ammoniak zu ^{34}S -L-Cystein (5) und Benzylamin (6, C).

Die dreistufige Synthese wurde in Anlehnung an Wood und du Vigneaud (1939), Wood und van Middlesworth (1949) sowie White (1988) durchgeführt (**Kap. 5.3.6**). Zu diesem Zweck wurde mit schwerem Schwefelisotop ^{34}S zu 98 % angereicherter, elementarer Schwefel mit Benzylmagnesiumchlorid durch eine Einlagerungsreaktion zu ^{34}S -Phenylmethanthiolmagnesiumchlorid umgesetzt (**Abb. 2.17 (A)**). Im alkalischen Milieu wurde ^{34}S -Phenylmethanthiol freigesetzt, welches anschließend mit β -Chlor-L-alaninhydrochlorid zu ^{34}S -Benzyl-L-cystein kondensiert wurde (**Abb. 2.17 (B)**). **Abbildung 2.18** zeigt das über HPLC-MS im ESI-positiv-Modus erhaltene Massenspektrum des mittels Flash-Chromatographie aufgereinigten ^{34}S -Benzyl-L-cysteins. Dieses wurde anschließend einer Ammonolyse unter Bildung von Benzylamin und ^{34}S -L-Cystein unterworfen (**Abb. 2.17 (C)**).

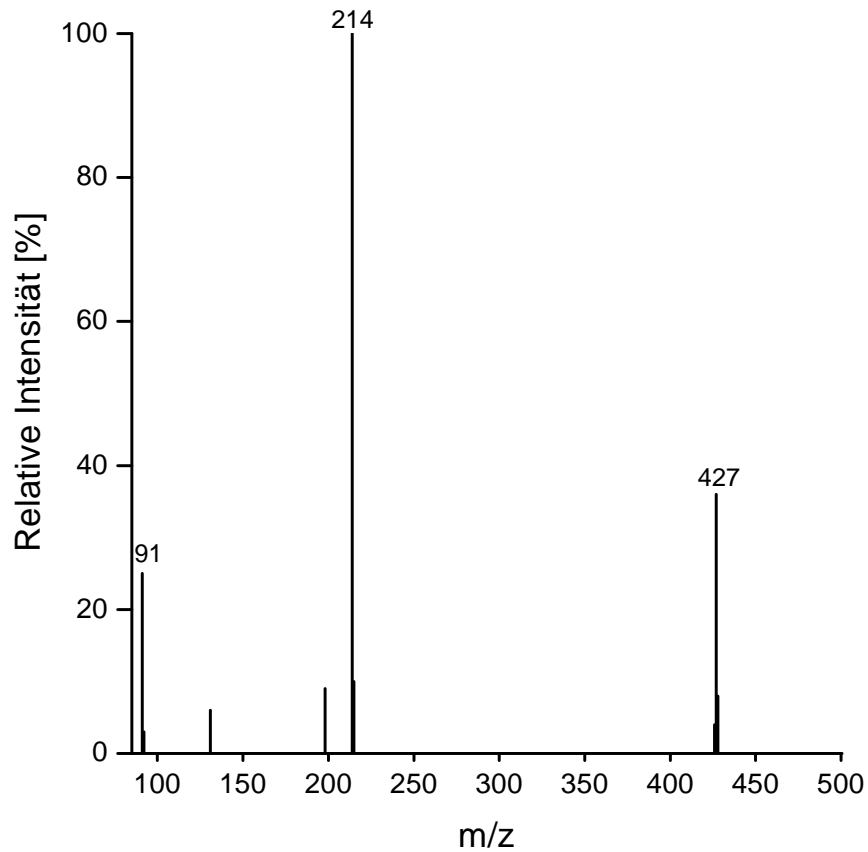


Abbildung 2.18 Massenspektrum (MS/ESI positiv) von [^{34}S]-Benzyl-L-cystein.

Die Konzentration der wässrigen Lösung an [^{34}S]-L-Cystein wurde durch Quantifizierung mittels SIVA über HPLC-MS/MS analog zur Quantifizierung von unmarkiertem L-Cystein bestimmt. Hierzu wurde die HPLC-MS/MS-Methode für dansyliertes, geschütztes [^{34}S]-L-Cystein erweitert. Auch bei diesem Zerfallsspektrum (**Abb. 2.19**) hatte das Fragment mit dem m/z -Verhältnis 252 die höchste Intensität.

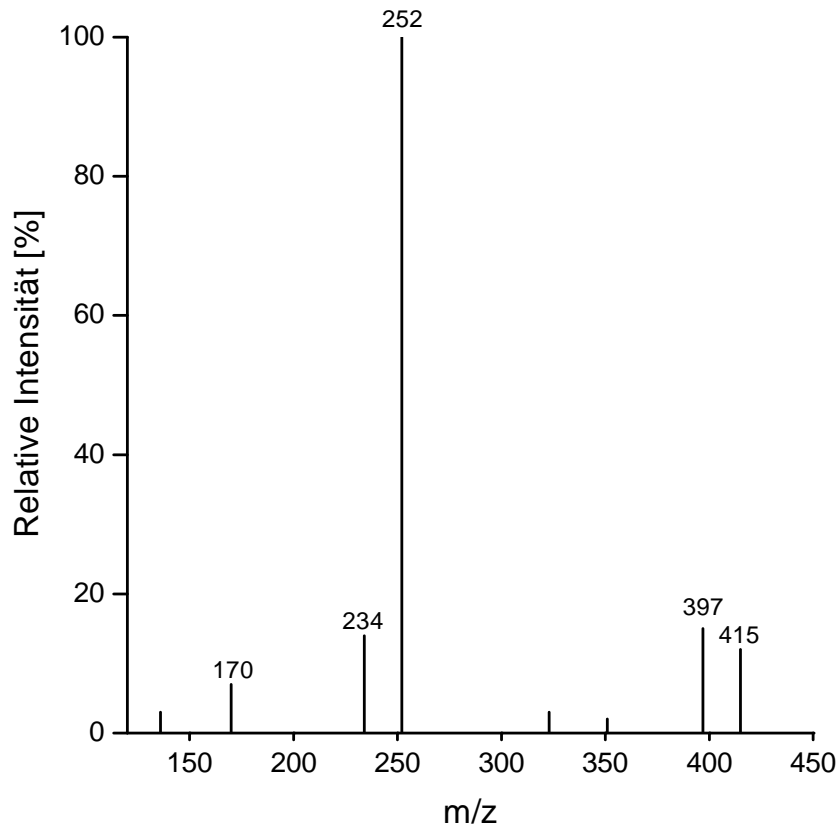


Abbildung 2.19 Massenspektrum (MS/ESI positiv) von derivatisiertem $[^{34}\text{S}]$ -L-Cystein.

Zur Messung wurde deshalb die Bildung dieses Fragments aus dem Molekülpeak mit dem m/z -Verhältnis 415 $[\text{M}([^{34}\text{S}]\text{-L-Cystein})+1]$ herangezogen (**Abb. 2.20**). Als Korrekturfaktor wurde der theoretisch berechnete Responsefaktor R_F zwischen den Derivaten von isotoopenmarkiertem $[^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ -L-Cystein und synthetisiertem $[^{34}\text{S}]$ -L-Cystein verwendet (**Kap. 5.8.2.2**).

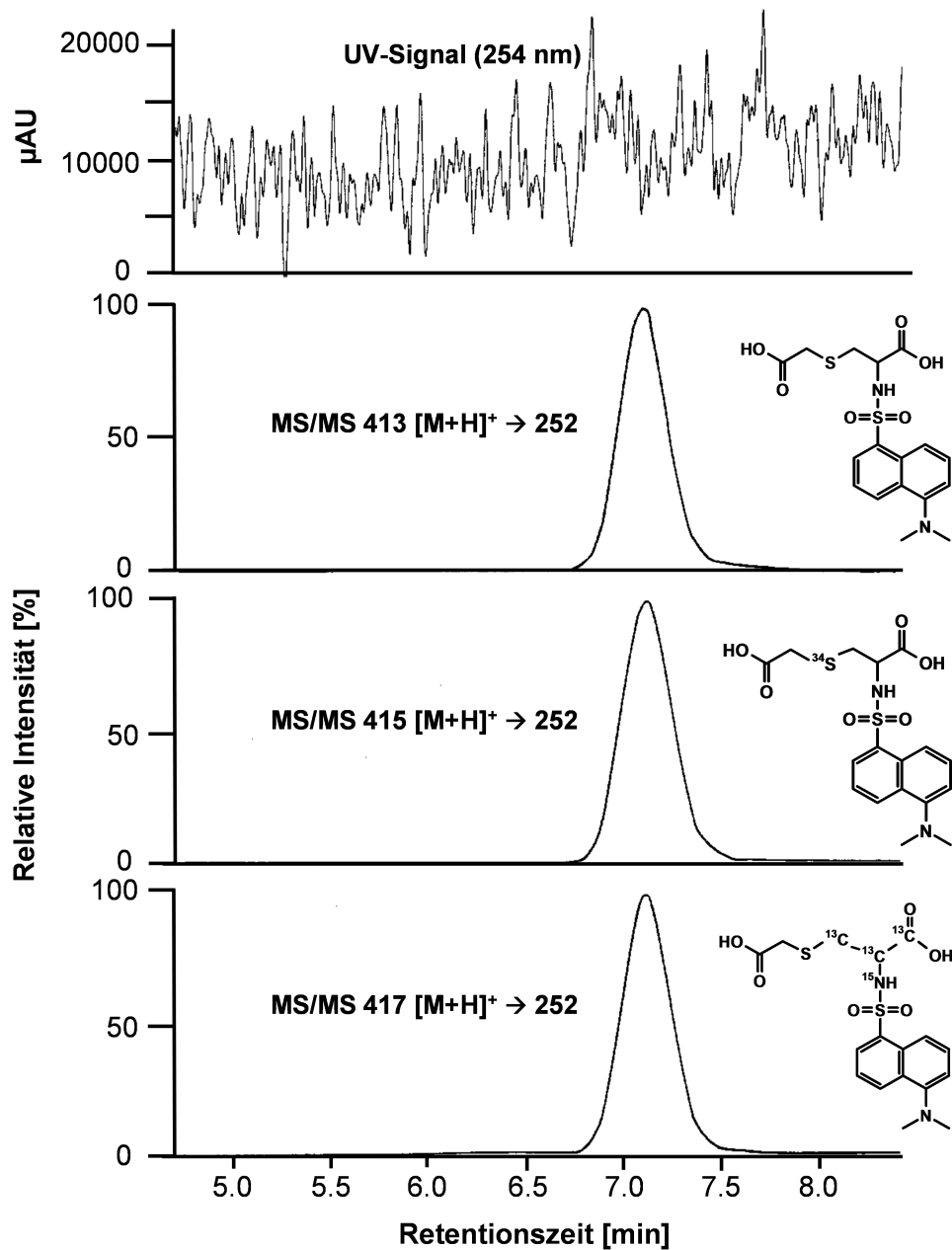


Abbildung 2.20 HPLC-MS/MS-Chromatogramme eines Kaffeeextrakts mit den Massenübergängen von derivatisiertem L-Cystein ($m/z = 252$ aus 413), derivatisiertem [^{34}S]-L-Cystein ($m/z = 252$ aus 415) und derivatisiertem [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$]-L-Cystein ($m/z = 252$ aus 417).

Um den Beitrag der freien Aminosäure L-Cystein an der Bildung von 2-Furanmethanthiol bei der Röstung von Kaffeebohnen beleuchten zu können, wurde isotoopenmarkiertes [^{34}S]-L-Cystein in die Rohkaffeebohnen eingebracht. Dies wurde durch eine Zugabe der wässrigen Lösung von [^{34}S]-L-Cystein zum Rohkaffeeextrakt und anschließende Rekombination des erhaltenen, modifizierten Rohkaffeeextrakts mit einer entsprechenden Menge an extrahierten Rohkaffeebohnen erreicht (**Kap. 5.1.7**).

Der auf diese Weise erhaltene rekombinierte Rohkaffee enthielt somit sowohl freies L-Cystein, als auch freies [^{34}S]-L-Cystein. Unter der Annahme, dass 2-Furanmethanthiol bei der Röstung von Kaffee überwiegend unter Beteiligung von freiem L-Cystein gebildet wird, wäre ein Einbau des markierten Schwefelatoms von [^{34}S]-L-Cystein in das 2-Furanmethanthiol-Molekül zu erwarten. Folglich würde bei der Röstung sowohl 2-Furanmethanthiol mit der Molmasse 114 g/mol aus unmarkiertem L-Cystein als auch 2-Furanmethanthiol mit der Molmasse 116 g/mol aus ^{34}S -markiertem L-Cystein entstehen (**Abb. 2.21**).

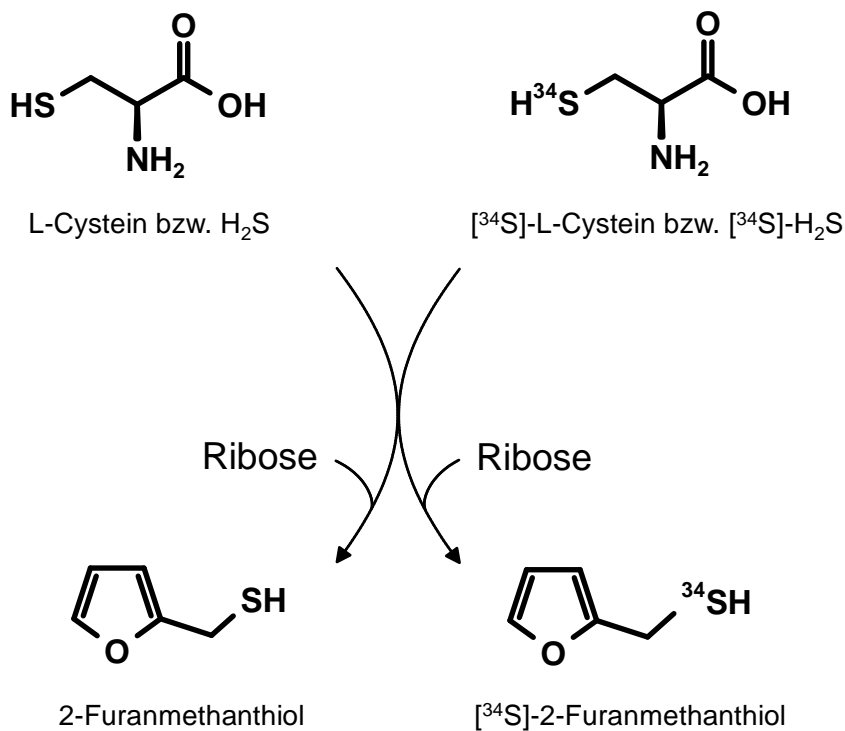


Abbildung 2.21 Theoretischer Einbau des Schwefelatoms von L-Cystein in 2-Furanmethanthiol.

Der Anteil der Bildung von 2-Furanmethanthiol aus freiem L-Cystein konnte über einen Vergleich der Stoffmengenverhältnisse von $n(\text{L-Cystein})$ zu $n([\mathbf{^{34}S}]\text{-L-Cystein})$ in den rekombinierten, gefriergetrockneten Rohkaffeebohnen vor der Röstung und von $n(2\text{-Furanmethanthiol})$ zu $n([\mathbf{^{34}S}]\text{-2-Furanmethanthiol})$ im daraus erhaltenen Röstkaffee herausgearbeitet werden. Die in den rekombinierten Rohkaffeebohnen mittels HPLC-MS/MS (**Kap. 5.9.7**) ermittelten tatsächlichen Stoffmengenverhältnisse zwischen unmarkiertem und isotonenmarkiertem L-Cystein lagen bei 2,73 zu 1, 2,60 zu 1 und 2,70 zu 1 (**Tab. 2.40**).

Tabelle 2.40 Stoffmengenverhältnisse von L-Cystein zu [³⁴S]-L-Cystein in rekombinierten Rohkaffees (Rekombination 1 bis 3) und von 2-Furanmethanthiol (FFT) zu [³⁴S]-FFT in daraus erhaltenen Röstkaffees.

Kaffeeprobe	Stoffmengenverhältnisse n (unmarkiert) / n (markiert) ^a	
	L-Cystein im Rohkaffee	FFT im Röstkaffee
Rekombination 1	2,73 : 1	18,3 : 1
Rekombination 2	2,60 : 1	21,0 : 1
Rekombination 3	2,70 : 1	22,3 : 1

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

Nach der Röstung der rekombinierten Rohkaffees im Kaffeeröster für sechs Minuten bei 200 °C erfolgten die Aufarbeitungen der Röstkaffeepulver analog **Kapitel 5.5**. Die Stoffmengenverhältnisse von n(2-Furanmethanthiol) zu n([³⁴S]-2-Furanmethanthiol) wurden auch hier über eine Messung der aufgereinigten SAFE-Destillate mittels HRGC/HRGC-MS im CI-Modus bestimmt. Das Fragment, das durch Abspaltung der Thiolgruppe entstand und die höchste Intensität aufwies (**Kap. 2.2.1.3**), eignete sich hier nicht zur Quantifizierung, da es bei beiden möglichen 2-Furanmethanthiol-Molekülen ein *m/z*-Verhältnis von 81 aufwies. Deswegen wurden die Flächen der Massenspuren mit den *m/z*-Verhältnissen 115 [M(2-Furanmethanthiol)+H⁺] und 117 [M([³⁴S]-2-Furanmethanthiol)+H⁺] verglichen.

Sollte freies L-Cystein eine entscheidende Rolle bei der Bildung von 2-Furanmethanthiol spielen, so müssten die Stoffmengenverhältnisse von n(L-Cystein) zu n([³⁴S]-L-Cystein) in den rekombinierten Rohkaffeebohnen und von n(2-Furanmethanthiol) zu n([³⁴S]-2-Furanmethanthiol) in den gerösteten Rekombinaten vergleichbar sein. Während die Massenspur mit dem *m/z*-Verhältnis 115 (unmarkiertes 2-Furanmethanthiol) in den gerösteten Rekombinaten deutlich detektiert wurde, wurde die Massenspur mit dem *m/z*-Verhältnis 117 ([³⁴S]-2-Furanmethanthiol) mit vergleichsweise niedriger Intensität nachgewiesen (**Abb. 2.22**). Die Stoffmengenverhältnisse von n(2-Furanmethanthiol) zu n([³⁴S]-2-Furanmethanthiol) lagen zwischen 18,3 und 22,3 zu 1 (**Tab. 2.40**).

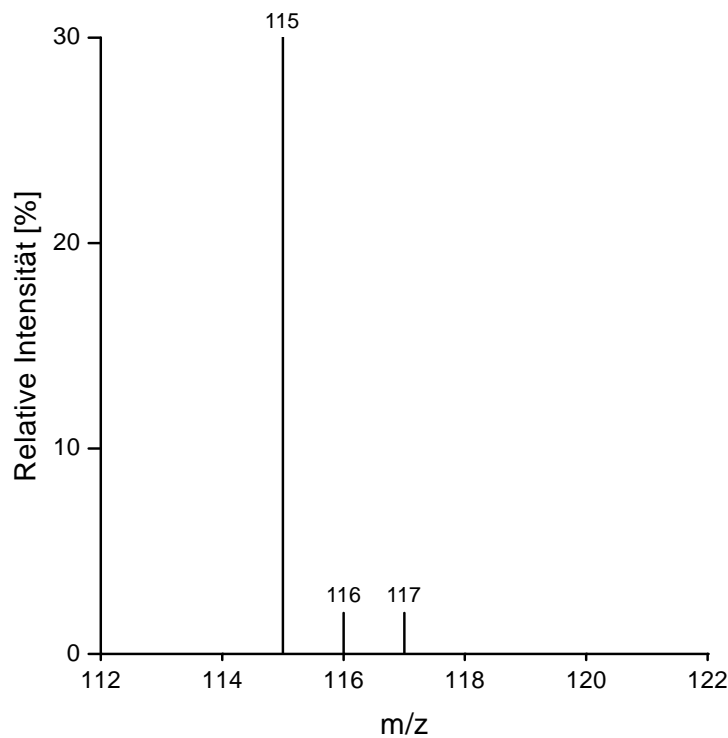


Abbildung 2.22 Vergleich der relativen Intensitäten der m/z -Verhältnisse 115 und 117 im Massenspektrum (MS/CI) von 2-Furanmethanthiol nach Isotopenanreicherungsversuch.

Hieraus konnte geschlossen werden, dass 2-Furanmethanthiol bei der Röstung rekombinierter Rohkaffeebohnen zwar möglicherweise zu einem geringen Anteil aus frei vorliegendem L-Cystein gebildet wurde, dieser Reaktionsweg aber lediglich eine untergeordnete Rolle spielt, da sich das Stoffmengenverhältnis von $n(2\text{-Furanmethanthiol})$ zu $n([^{34}\text{S}]\text{-}2\text{-Furanmethanthiol})$ im Vergleich zum Stoffmengenverhältnis von $n(\text{L-Cystein})$ zu $n([^{34}\text{S}]\text{-L-Cystein})$ signifikant zugunsten des unmarkierten Aromastoffmoleküls verschob.

In einem weiteren Isotopenanreicherungsversuch wurde der Rohkaffeeextrakt sowohl mit $[^{34}\text{S}]\text{-L-Cystein}$ als auch mit $[^{13}\text{C}_5]\text{-D-Ribose}$ versetzt und in extrahierte Rohkaffeebohnen eingebracht. Die Stoffmengenverhältnisse von $n(\text{L-Cystein})$ zu $n([^{34}\text{S}]\text{-L-Cystein})$ bzw. $n(\text{D-Ribose})$ zu $n([^{13}\text{C}_5]\text{-D-Ribose})$ lagen in den rekombinierten Rohkaffees bei 1,29 zu 1 bzw. 1 zu 1,12 (**Tab. 2.41**). Nach Röstung des Rekombinats sollten gemäß dem postulierten Reaktionsmechanismus 2-Furanmethanthiol-Moleküle mit markiertem Kohlenstoffgerüst ($M = 119 \text{ g/mol}$), mit markiertem Schwefelatom

(M = 116 g/mol), mit einer Kombination aus beiden Markierungen (M = 121 g/mol) sowie unmarkierte 2-Furanmethanthiol-Moleküle (M = 114 g/mol) entstanden sein. Die über HRGC/HRGC-MS anhand der Massenspuren mit den m/z -Verhältnissen 115, 117, 120 und 122 ermittelten Stoffmengenverhältnisse der möglichen 2-Furanmethanthiol-Moleküle bestätigten jedoch die Ergebnisse der beiden vorher durchgeführten Isotopenanreicherungsversuche, da neben dem unmarkierten 2-Furanmethanthiol (m/z -Verhältnis 115) lediglich wenig zweifach markiertes 2-Furanmethanthiol (m/z -Verhältnis 117, im Stoffmengenverhältnis 2-Furanmethanthiol zu [^{34}S]-2-Furanmethanthiol = 30,3 zu 1) nachgewiesen werden konnte. Die Massenspuren der beiden darüber hinaus möglicherweise entstandenen 2-Furanmethanthiol-Moleküle mit den m/z -Verhältnissen 120 bzw. 122 konnten dagegen kaum detektiert werden (**Tab. 2.41**). Folglich könnte freies L-Cystein eine Nebenrolle bei der Entstehung von 2-Furanmethanthiol spielen, wohingegen freie D-Ribose offenbar nicht zur Bildung von 2-Furanmethanthiol beiträgt.

Tabelle 2.41 Stoffmengenverhältnisse von L-Cystein zu [^{34}S]-L-Cystein bzw. von D-Ribose zu [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose in rekombiniertem Rohkaffee sowie von unmarkiertem und unterschiedlich markiertem 2-Furanmethanthiol (FFT) im daraus erhaltenen Röstkaffee.

Stoffmengenverhältnisse im Rohkaffee ^a		Stoffmengenverhältnisse im Röstkaffee ^a		
L-Cystein/ [^{34}S]-L-Cystein	D-Ribose/ [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose	FFT/ [^{34}S]-FFT	FFT/ [$^{13}\text{C}_5$]-FFT	FFT/ [$^{13}\text{C}_5, ^{34}\text{S}$]-FFT
1,29 : 1	1 : 1,12	30,3 : 1	> 10000 : 1	> 10000 : 1

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 15\%$.

2.2.2 Senf

In Kaffee konnte mit Hilfe von „in-bean“-Experimenten bestätigt werden, dass freies L-Cystein sowie freie D-Ribose bei der Bildung des wichtigen Röstkaffeearomastoffs 2-Furanmethanthiol keine bzw. eine untergeordnete Rolle spielen (**Kap. 2.2.1**). Die Isolierung möglicher Vorläufer von 2-Furanmethanthiol aus dem nicht-wasserlöslichen Gerüst des Rohkaffees ließ sich jedoch nur schwer realisieren. Als weiteres 2-Furanmethanthiol-bildendes Lebensmittel kamen weiße Senfsamen, die nach dem Rösten einen deutlich schweflig-röstigen Geruch aufweisen, für eine Lokalisierung und Identifizierung der Vorläufersubstanzen des Aromastoffs in Frage. Durch die Lokalisierung der Präkursoren von 2-Furanmethanthiol anhand von Fraktionierungs- und Röstexperimenten sowie Isotopenanreicherungsversuchen sollten neben Daten zur Bildung von 2-Furanmethanthiol in Kaffee auch Rückschlüsse auf die Entstehung des Aromastoffs in Senf gezogen werden.

2.2.2.1 Aromaextraktverdünnungsanalyse

Um die für den schweflig-röstigen Geruch gerösteter Senfsamen verantwortlichen Aromastoffe zu identifizieren, wurde ein Screening auf aromaaktive Verbindungen von geröstetem Senf mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) durchgeführt. Hierfür wurden weiße Senfsamen in einem Röstofen bei 180 °C für 30 Minuten geröstet, anschließend gemahlen und zweimal mit Dichlormethan extrahiert (**Kap. 5.5**). Nach SAFE-Destillation des Lösungsmittelextrakts und Konzentrierung des Destillats wurden der erhaltene Aromaextrakt und seine entsprechenden Verdünnungsstufen einer simultanen HRGC-FID- und HRGC-O-Analyse unterzogen (**Kap. 2.1.1.3** und **Kap. 5.6**).

Abbildung 2.23 zeigt das FID-Chromatogramm des unverdünnten Aromaextrakts von geröstetem Senf. Bei der AEVA konnten in der achten Verdünnungsstufe (FD-Faktor 256) 15 geruchsaktive Bereiche wahrgenommen werden (**Tab. 2.42**), die in **Abbildung 2.23** markiert wurden. Anhand der Retentionsindices auf der FFAP-Kapillarsäule sowie der Geruchsqualitäten wurden Vorschläge für Verbindungen gemacht, die für diese geruchsaktiven Bereiche verantwortlich sein konnten.

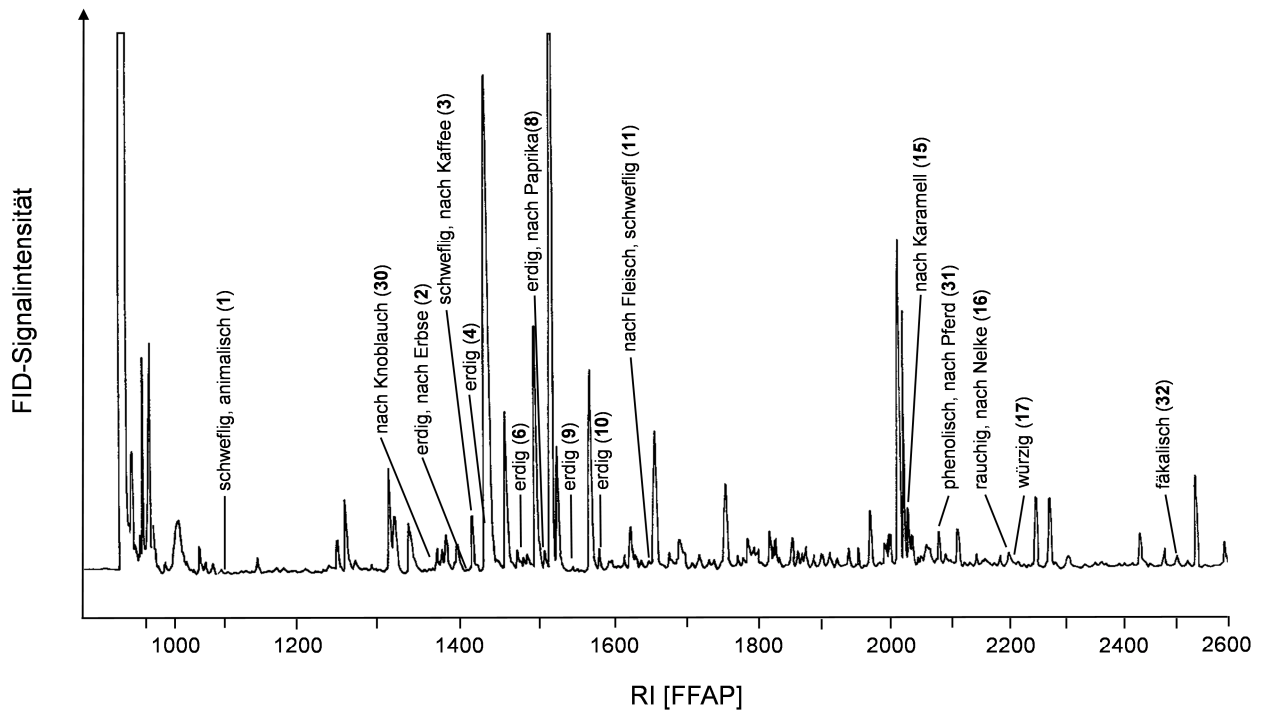


Abbildung 2.23 FID-Chromatogramm (FD-Faktor 1) des Aromaextrakts von geröstetem Senf mit 15 geruchsaktiven Bereichen, die einen FD-Faktor ≥ 256 aufwiesen.

Für die folgenden sieben Verbindungen war mittels HRGC-MS eine eindeutige Zuordnung möglich (**Kap. 5.7**): das schweflig und nach Kaffee riechende 2-Furanmethanthiol (Nr. **3**), welches bei der AEVA den höchsten FD-Faktor erreichte (FD 4096), die beiden erdig riechenden Verbindungen Nr. **6**, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (FD 2048), und Nr. **4**, 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (FD 1024), sowie das nach Knoblauch riechende Dimethyltrisulfid (Nr. **30**, FD 256), das nach Karamell riechende 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (Nr. **15**, FD 256), das phenolisch und nach Pferd riechende 4-Methylphenol (Nr. **31**, FD 256) und das rauchig und nach Nelke riechende 4-Ethenyl-2-methoxyphenol (Nr. **16**, FD 256).

Bei der schweflig und nach Fleisch riechenden Verbindung Nr. **11**, die mit 2-Furanmethanthiol zu den geruchsaktivsten Verbindungen des Extrakts zählte (FD 4096), handelte es sich vermutlich um 3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol. Für die erdig und nach Paprika riechende Verbindung Nr. **8** und für die die würzig riechende Verbindung Nr. **17**, die beide mit einem FD-Faktor von 1024 wahrgenommen wurden, konnten die Verbindungen 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin und 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon vorgeschlagen werden. Des Weiteren waren vermutlich für den

schwefligen und animalischen Geruch des Bereichs Nr. 1 die Verbindung 3-Methyl-2-buten-1-thiol (FD 512), für die erdig riechenden Bereiche Nr. 9 und Nr. 10 die Verbindungen 2-Ethenyl-2,5-dimethylpyrazin (FD 256) bzw. 2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin (FD 512), für den erdig und nach Erbse riechenden Bereich Nr. 2 die Verbindung 3-Isopropyl-2-methoxy-pyrazin (FD 256) sowie für den fäkalisch riechenden Bereich Nr. 32 die Verbindung 3-Methylindol (FD 256) verantwortlich.

Tabelle 2.42 Geruchsaktive Verbindungen (Flavour-Dilution(FD)-Faktor \geq 256) im Aromaextrakt von gerösteten Senfsamen.

Nr. ^a	Geruchsqualität ^b	FD-Faktor ^c	RI-Wert FFAP ^d	vorgeschlagene Verbindung ^e
3	schweflig, nach Kaffee	4096	1432	2-Furanmethanthiol ^f
11	nach Fleisch, schweflig	4096	1663	3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol
6	erdig	2048	1484	2,3-Diethyl-5-methylpyrazin ^f
4	erdig	1024	1436	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin ^f
8	erdig, nach Paprika	1024	1517	3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazin
17	würzig	1024	2206	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon
1	schweflig, animalisch	512	1102	3-Methyl-2-buten-1-thiol
10	erdig	512	1583	2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin
30	nach Knoblauch	256	1370	Dimethyltrisulfid ^f
2	erdig, nach Erbse	256	1430	3-Isopropyl-2-methoxy-pyrazin
9	erdig	256	1550	2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin
15	nach Karamell	256	2039	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon ^f
31	phenolisch, nach Pferd	256	2085	4-Methylphenol ^f
16	rauchig, nach Nelke	256	2203	4-Ethenyl-2-methoxyphenol ^f
32	fäkalisch	256	2493	3-Methylindol

^a Die Nummerierung der geruchsaktiven Verbindungen erfolgte in der Elutionsreihenfolge auf der Kapillarsäule FFAP unter Berücksichtigung der bereits zugewiesenen Nummerierungen in **Tabelle 2.7**.

^b Geruchsqualität, die während der HRGC-O am Sniffing-Port wahrgenommen wurde.

^c FD = Flavour Dilution; der FD-Faktor gibt diejenige Verdünnungsstufe der AEVA an, bei welcher der jeweilige Aromastoff zuletzt olfaktorisch wahrgenommen werden konnte.

^d RI = Retentionsindex.

^e Der Aromastoff wurde aufgrund der Geruchsqualität und des Retentionsindex identifiziert.

^f Der Aromastoff wurde zusätzlich über Massenspektrometrie identifiziert.

Hiermit konnte die wichtige Bedeutung des Aromastoffs 2-Furanmethanthiol für das Aroma von geröstetem Senf aufgezeigt werden. Weiße Senfsamen sollten sich demnach für eine Lokalisierung des Vorläufers von 2-Furanmethanthiol eignen. Im

Rahmen verschiedener Röstexperimente wurden anschließend die Gehalte des Aromastoffs in gerösteten Senfsamen bestimmt.

2.2.2.2 Bestimmung des Gehalts an 2-Furanmethanthiol in gerösteten Senfproben

Um den Einfluss der Röstdauer von Senfsamen auf die Menge an gebildetem 2-Furanmethanthiol feststellen zu können, wurden intakte weiße Senfsamen zunächst in einem Röstofen bei 180 °C für 20, 30 oder 40 Minuten geröstet (**Kap. 5.1.10**). Die Quantifizierung von 2-Furanmethanthiol erfolgte analog **Kapitel 2.1.1.5. Tabelle 2.43** verdeutlicht, dass nach 30 Minuten Röstung die höchste Konzentration an 2-Furanmethanthiol entstanden war (5120 µg/kg). Da der Gehalt nach 40 Minuten Röstung wieder leicht abgenommen hatte, wurde für die nächsten Senfröstungen die Dauer von 30 Minuten gewählt.

Tabelle 2.43 Generierung von 2-Furanmethanthiol (FFT) in Senfsamen in Abhängigkeit von der Dauer der Röstung bei 180 °C.

Röstdauer [min]	Konzentration FFT [µg/kg]
20	4440
30	5120
40	4640

Für die Lokalisierung der Vorläuferverbindung von 2-Furanmethanthiol wurden die Senfsamen verschiedenen Fraktionierungsschritten unterzogen, weshalb sie zunächst gemahlen wurden. Ob das Mahlen der Senfsamen einen Einfluss auf die bei der Röstung gebildete Menge an 2-Furanmethanthiol hatte, wurde durch Röstung von gemahlenem Senf im Röstofen bei 180 °C für 30 Minuten überprüft. Dabei entstanden lediglich 813 µg 2-Furanmethanthiol/kg Senf, während in intakten Senfsamen 4930 µg/kg gebildet wurden (**Tab. 2.44**). Ähnlich wie bei Rohkaffee wurde hier eine enzymatische Aktivität, die möglicherweise beim Zerkleinern der Senfsamen einsetzte und zu einem Abbau von 2-Furanmethanthiol-bildenden Vorläufern führte, als Ursache in Betracht gezogen. Die mögliche Enzymaktivität sollte durch ein Dämpfen der intakten Senfsamen vor der Röstung mit Wasserdampf im Schnellkochtopf für mehrere Minuten (**Kap. 5.1.5**) verhindert werden. Die dabei erhaltenen gedämpften Senfsamen wurden

zunächst gefriergetrocknet, anschließend gemahlen und letztlich ebenfalls im Röstofen bei 180 °C für 30 Minuten geröstet. Dabei wurden 3230 µg 2-Furanmethanthiol/kg Senf gebildet. Diese Konzentration lag zwar etwa 30 % unter dem Wert der intakt gerösteten Senfsamen, zeigte jedoch, dass ein Dämpfen der Senfkörner vor der Zerkleinerung die Ausbeute an 2-Furanmethanthiol bei der Röstung von gemahlenem Senf im Vergleich zur Röstung ohne vorherige Dampfbehandlung deutlich erhöhte.

Für gemahlene Senfproben kam jedoch ebenso wie für gemahlene Rohkaffee die Röstung in heißem Sonnenblumenöl in verschlossenen Sovirelgläsern bei 180 °C im metallischen Heizblock (**Kap. 5.1.10**) in Frage. Hierfür wurden je 50 mg bis 1 g Probe in je 10 ml Sonnenblumenöl homogen suspendiert. Mit dieser Methode wurden sowohl gedämpfter und gemahlener Senf, als auch nicht-gedämpfter und gemahlener Senf jeweils 60 Minuten lang geröstet. Die Aufarbeitung und Quantifizierung erfolgte analog **Kapitel 2.2.1.1** und **Kapitel 5.5.1.3**. Beide Senfproben bildeten hierbei erheblich höhere Mengen an 2-Furanmethanthiol als bei den Röstungen im Röstofen (**Tab. 2.44**). Zudem lag nur ein relativ geringer Unterschied zwischen gedämpftem und ungedämpftem Senf vor. Die folgenden Röstungen von je 10 mg bis 1 g Senf bzw. Senffractionen wurden deshalb jeweils für 30 bzw. 60 Minuten bei 180 °C in je 10 ml Sonnenblumenöl durchgeführt.

Tabelle 2.44 Einfluss des Röstverfahrens (Röstofen, Sonnenblumenöl) auf die bei der Röstung gebildete Menge an 2-Furanmethanthiol (FFT) in verschiedenen Senfproben (intakte, gemahlene sowie gedämpfte und gemahlene Senfsamen).

Röstmethode	Konzentration FFT [µg/kg]		
	intakt	gemahlen	gedämpft und gemahlen
Röstofen, 180 °C, 30 Min.	4930	813	3230
Sonnenblumenöl, 180 °C, 60 Min.	n. b. ^a	9890	11460

^a nicht bestimmt.

2.2.2.3 Vergleich der Gehalte an 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanthiol in rohem und geröstetem Senf

Um einen möglichen Zusammenhang der Bildungswege von 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanthiol in Senf aufzeigen zu können, wurden die Gehalte der drei Verbindungen in rohen Senfsamen und unterschiedlich lang geröstetem Senf (10 bzw. 30 Minuten bei 180 °C in Sonnenblumenöl) mittels SIVA unter Verwendung der isotopenmarkierten Standards [¹³C₂]-2-Furanmethanol (c-29), [¹³C₂]-2-Furancarbaldehyd (c-28) und [²H₂]-2-Furanmethanthiol (d-3, **Abb. 2.3**, **Abb. 2.5** und **Kap. 2.2.1.2**) über HRGC/HRGC-MS quantifiziert. Die Aufarbeitungen der gerösteten Senfproben erfolgten zusammen mit dem Sonnenblumenöl analog **Kapitel 2.2.1.1**, die der ungerösteten Senfsamen analog **Kapitel 5.5.1.1**.

2-Furanmethanol lag bereits in rohem Senf mit einem Gehalt von 10 µg/kg vor (**Tab. 2.45**). Nach zehn Minuten Röstung betrug seine Konzentration 18,1 mg/kg, was einem 1800-fachen Anstieg des Gehalts entsprach. Nach weiteren 20 Minuten Röstung enthielt der geröstete Senf 94,3 mg 2-Furanmethanol/kg, womit sich die Konzentration nochmals um den Faktor 5,2 erhöht hatte. 2-Furancarbaldehyd, dessen Gehalt in ungeröstetem Senf zu 5,6 µg/kg bestimmt wurde, wies nach zehn Minuten Röstung eine Konzentration von 12,2 mg 2-Furancarbaldehyd/kg (Faktor 2200) und nach 30 Minuten Röstung von 64,5 mg 2-Furancarbaldehyd/kg auf, was einem zusätzlichen Anstieg um den Faktor 5,3 entsprach. 2-Furanmethanthiol war in ungeröstetem Senf nicht nachweisbar. Nach zehn Minuten Röstung wurde ein Gehalt von 600 µg/kg bestimmt, der nach weiteren 20 Minuten Röstung um das 18-fache angestiegen war (10,8 mg/kg).

Die drei Furanverbindungen wurden durch die Erhitzung der Senfsamen in hohen Mengen gebildet. Allerdings lag die Konzentration an 2-Furanmethanol nach 30 Minuten Röstung etwa 9-fach und der Gehalt an 2-Furancarbaldehyd etwa 6-fach über der Konzentration an 2-Furanmethanthiol. Beim Vergleich der relativen Zunahmen der drei Substanzen im zweiten Abschnitt der Röstung wurde ersichtlich, dass der Gehalt an 2-Furanmethanthiol mit einem Faktor von 18 stärker zunahm als die Konzentrationen an 2-Furanmethanol (Faktor 5,2) und 2-Furancarbaldehyd (Faktor 5,3).

Tabelle 2.45 Konzentrationen an 2-Furanmethanol (FM), 2-Furancarbaldehyd (FCA) und 2-Furanmethanthiol (FFT) in rohem und unterschiedlich lang geröstetem Senf (Sonnenblumenöl, 180 °C, 10 bzw. 30 Minuten).

Senfprobe	Konzentration [mg/kg]		
	FM	FCA	FFT
Rohes Senfmehl	0,010	0,0056	n. m. ^a
Geröstetes Senfmehl (10 Min.)	18,1	12,2	0,60
Geröstetes Senfmehl (30 Min.)	94,3	64,5	10,8

^a nicht messbar.

Eine mögliche Beteiligung von freier D-Ribose an der Bildung von 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd in Senffractionen sowie eine mögliche Verknüpfung mit der Entstehung von 2-Furanmethanthiol wurde anhand von Isotopenanreicherungsversuchen (**Kap. 2.2.2.7**) untersucht.

2.2.2.4 Fraktionierung von Senfsamen

Um den bzw. die Vorläufer des Aromastoffs 2-Furanmethanthiol in Senfsamen genauer lokalisieren zu können, wurden rohe, gedämpfte Senfsamen (**Kap. 5.1.5**) in mehreren Schritten fraktioniert (**Kap. 5.1.6**), um anschließend das Potential der Fraktionen untersuchen zu können, beim Rösten 2-Furanmethanthiol zu bilden. Nach jedem Trennschritt wurden die erhaltenen Senffraktionen gefriergetrocknet. Eine Übersicht über alle bei Senf angewandten Fraktionierungsschritte zeigt **Abbildung 2.24**.

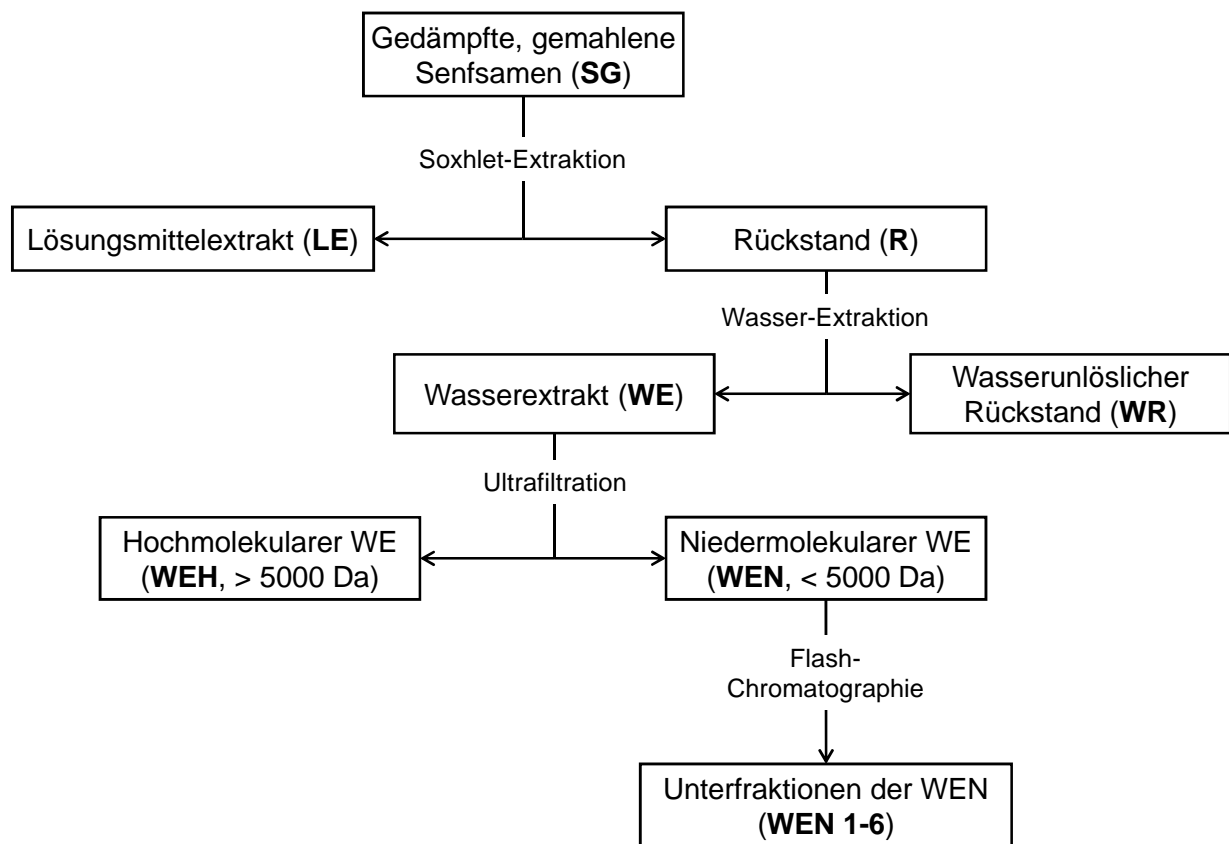


Abbildung 2.24 Fraktionierungsschema für gedämpfte und gemahlene Senfsamen.

Der gedämpfte Senf (SG) wurde zunächst gemahlen und einer Soxhlet-Extraktion mit Petrolether unterzogen. Der dabei abgetrennte Fettanteil der Senfsamen (Lösungsmittel-extrakt, Fraktion LE) hatte einen Gewichtsanteil von 26,5 % am Ausgangsmaterial (**Tab. 2.46**), der Anteil des entfetteten Senfs (entfetteter Rückstand, Fraktion R) betrug 73,5 %. Der entfettete Senf wurde in destilliertem Wasser suspendiert und bei 70 °C zweimal für zwei Stunden extrahiert. Der Gewichtsanteil des

Wasserextrakts (Fraktion WE) am Senf betrug 21,0 %, der des wasserunlöslichen Rückstands (Fraktion WR) 52,5 %.

Der Wasserextrakt wurde anschließend mittels Ultrafiltration (Trennung bis zu einem Molekulargewicht von 5000 Da) in eine höhermolekulare, wasserlösliche Fraktion (WEH, Molekulargewicht > 5000 Da) und eine niedermolekulare, wasserlösliche Fraktion (WEN, Molekulargewicht < 5000 Da) aufgetrennt. Der Anteil der WEH am Senf betrug dabei 5,1 %, während der Anteil der WEN bei 15,9 % lag.

Tabelle 2.46 Gewichtsanteile der bei der Fraktionierung von Senfsamen erhaltenen Fraktionen an nicht-fraktionierten Senfsamen.

Fraktion	Gewichtsanteil an nicht-fraktionierten Senfsamen [%]
Lösungsmittlextrakt (LE)	26,5
entfetteter Rückstand (R)	73,5
Wasserunlöslicher Rückstand (WR)	52,5
Wasserextrakt (WE)	21,0
Wasserextrakt, > 5000 Da (WEH)	5,1
Wasserextrakt, < 5000 Da (WEN)	15,9

Bei einer weiteren Ultrafiltration der Fraktion WEN (Trennung bis zu einem Molekulargewicht von 1000 Da) wurde überwiegend die Fraktion mit einem Molekulargewicht kleiner 1000 Da (über 90 %) erhalten, weshalb dieser Fraktionierungsschritt im Folgenden nicht berücksichtigt wurde. Um eine weitere Auftrennung der Senffraktion WEN zu erreichen, wurde diese daher einer Flash-Chromatographie an einer unpolaren stationären Phase unterzogen (**Tab. 2.47**). Der organische Anteil des Fließmittelgemisches wurde dabei im Lauf der Trennung erhöht (**Kap. 5.9.5**), so dass in denjenigen Fraktionen, die später eluiert wurden, ein höherer Anteil an unpolaren Verbindungen und Substanzen mit größerer Molekülmasse erwartet werden konnte. Die Festlegung der Fraktionsgrenzen erfolgte anhand des bei 254 nm erhaltenen UV-Signals.

Tabelle 2.47 Fraktionierung des niedermolekularen Anteils des wasserlöslichen Senfextrakts (WEN, Molekulargewicht < 5000 Da) mittels Flash-Chromatographie und Gewichtsanteile der dabei erhaltenen Unterfraktionen (WEN U) an nicht-fraktionierten Senfsamen.

WEN-Fraktion	Gewichtsanteil an nicht-fraktionierten Senfsamen [%]
Fraktion 1 (WEN U1)	0,4
Fraktion 2 (WEN U2)	7,7
Fraktion 3 (WEN U3)	2,5
Fraktion 4 (WEN U4)	2,8
Fraktion 5 (WEN U5)	2,0
Fraktion 6 (WEN U6)	0,5

In **Abbildung 2.25** ist das Flash-Chromatogramm der Fraktion WEN unter Markierung der Fraktionsbereiche 1 bis 6 dargestellt. Aufgrund der geringen Gewichtsanteile der Fraktionen WEN U1 und WEN U6 wurden für die weiteren Untersuchungen lediglich die Fraktionen WEN U2 bis WEN U5 herangezogen.

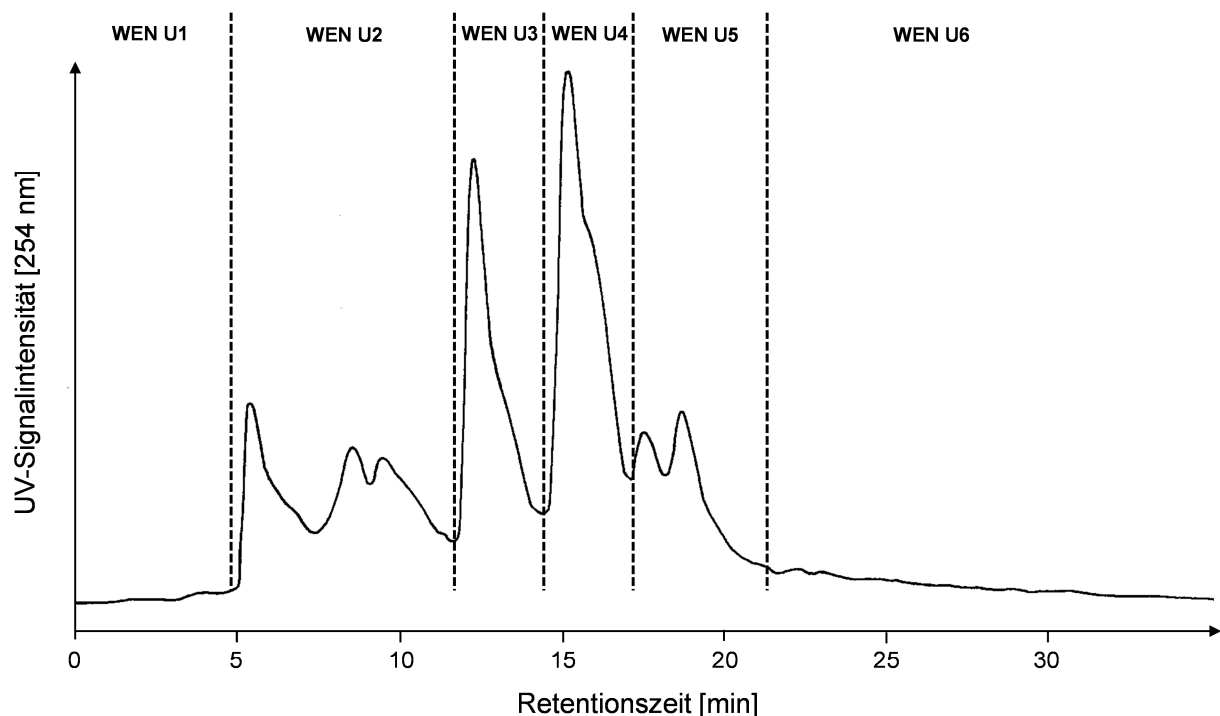


Abbildung 2.25 Fraktionierung des niedermolekularen Anteils der wasserlöslichen Senffraktion (WEN) mittels Flash-Chromatographie in sechs Unterfraktionen (WEN U1 bis WEN U6).

2.2.2.5 Bestimmung des Gehalts an 2-Furanmethanthiol in geröstetem Senf und gerösteten Senffractionen

Gedämpfte Senfsamen und die über ihre Fraktionierung erhaltenen Fraktionen (**Kap. 2.2.2.4**) wurden in Portionen von je 10 mg bis 1 g in 10 ml Sonnenblumenöl bei 180 °C für 60 Minuten geröstet. Die dabei gebildeten Mengen an 2-Furanmethanthiol wurden analog **Kapitel 2.2.1.1** quantifiziert.

In gedämpftem Senf (SG) entstand bei der Röstung 7360 µg 2-Furanmethanthiol/kg Senf (**Tab. 2.48**), während der nach der Soxhlet-Extraktion verbleibende Rückstand (R) 9910 µg 2-Furanmethanthiol/kg bildete. Der wasserlösliche Extrakt (WE) dieses Rückstands generierte bei der Röstung mit 19700 µg/kg um ein Vielfaches mehr 2-Furanmethanthiol als die nicht-wasserlösliche Fraktion (WR, 667 µg/kg). Die weitere Auftrennung des Wasserextrakts zeigte außerdem, dass der niedermolekulare Teil des Wasserextrakts (WEN, 15600 µg/kg) mehr als doppelt so viel 2-Furanmethanthiol bildete wie die höhermolekulare Fraktion (WEH, 6960 µg/kg). Die bei der Flash-Chromatographie von WEN erhaltenen Unterfraktionen generierten sehr unterschiedliche Mengen an 2-Furanmethanthiol. So enthielt die bei etwa 35 bis 40 % Methanol eluierte Fraktion WEN U4 nach der Röstung mit 26200 µg/kg die höchsten Mengen an 2-Furanmethanthiol und etwa zehnmal mehr als die restlichen Unterfraktionen.

Zur Veranschaulichung, welchen Beitrag die Fraktionen des Senfs an der insgesamt in Senfsamen gebildeten Menge an 2-Furanmethanthiol hatten, wurden die Gewichtsanteile der jeweiligen Fraktionen am Senf in die quantitativen Daten einberechnet (**Tab. 2.48**). Die dabei für den entfetteten Rückstand (R) berechnete Menge an 2-Furanmethanthiol (7280 µg/kg Senf) war mit dem im gedämpften Senf (SG) gebildeten Gehalt des Aromastoffs (7360 µg/kg) vergleichbar. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Fraktion WE mit 4140 µg/kg Senf wesentlich mehr zur Entstehung von 2-Furanmethanthiol in den Senfsamen beitrug als die Fraktion WR (350 µg/kg Senf). Vom Wasserextrakt des Senfs wiederum hatte die Fraktion WEN mit 2480 µg 2-Furanmethanthiol/kg Senf einen deutlich höheren Anteil an der Bildung des Aromastoffs als die Fraktion WEH (355 µg/kg Senf). Von den Unterfraktionen des niedermolekularen Anteils des Wasserextrakts trug hierbei vor allem die Fraktion

WEN U4 mit 734 µg 2-Furanmethanthiol/kg Senf zur Generierung von 2-Furanmethanthiol bei.

Tabelle 2.48 Gehalte an 2-Furanmethanthiol (FFT), die bei der Röstung von gedämpften und gemahlene Senfsamen sowie Senffractionen entstanden.

Senfprobe (prozentualer Anteil am Senf)	Konzentration FFT [µg/kg] ^a in	
	Fraktion	Originalmaterial ^b
gedämpfte, gemahlene Senfsamen	---	7360
entfetteter Rückstand (73,5 %)	9910	7280
Wasserunlöslicher Rückstand (52,5 %)	667	350
Wasserextrakt (21,0 %)	19700	4140
Wasserextrakt, > 5000 Da (5,1 %)	6960	355
Wasserextrakt, < 5000 Da (15,9 %)	15600	2480
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 2 (7,7 %)	2390	184
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 3 (2,5 %)	3290	82,3
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 4 (2,8 %)	26200	734
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 5 (2,0 %)	1940	38,8

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens ± 10 %.

^b Die Einberechnung des Gewichtsanteils jeder Fraktion ergab die auf die Masse von nicht-fraktioniertem Senf bezogene Konzentration an FFT.

2.2.2.6 Quantifizierung von L-Cystein in Senf und Senffractionen

Auch in Senfsamen kommt freies L-Cystein als Vorläufer für den Aromastoff 2-Furanmethanthiol in Frage. Um die Menge an L-Cystein in ungerösteten Senfsamen und Senffractionen mit dem bei der Röstung gebildeten Gehalt an 2-Furanmethanthiol korrelieren zu können, wurden in ungerösteten gedämpften Senfsamen und Senffractionen (**Kap. 2.2.2.4**) die Gehalte an freiem L-Cystein (**Kap. 5.9.7**) quantifiziert. Für die Quantifizierungen wurden jeweils 10 mg bis 1 g der Senfproben analog **Kapitel 2.2.1.4** aufgearbeitet.

In gedämpftem Senf (SG) waren 7,42 mg L-Cystein/kg enthalten (**Tab. 2.49**). Im wasserlöslichen Extrakt (WE) wurde ein Gehalt von 38,1 mg/kg bestimmt, während der Gehalt im wasserunlöslichen Rückstand erwartungsgemäß unter der Bestimmungsgrenze lag. Dasselbe galt für den höhermolekularen Anteil des

wasserlöslichen Extrakts (WEH). In der niedermolekularen Fraktion des Wasserextrakts (WEN) lag der Gehalt an freiem L-Cystein bei 36,1 mg/kg. Die Unterfraktionen des niedermolekularen Extraktanteils enthielten zwischen 15,6 und 55,4 mg L-Cystein pro Kilogramm der jeweiligen Fraktion, wobei die Gehalte während der Fraktionierung mit steigendem Anteil an organischem Elutionsmittel abnahmen.

Unter Einberechnung der Gewichtsanteile der jeweiligen Fraktionen an den nicht-fraktionierten Senfsamen wurde ersichtlich, dass der Gehalt an L-Cystein einer „übergeordneten“ Fraktion und die Summe der Gehalte der aus ihr gewonnenen Unterfraktionen übereinstimmten (**Tab. 2.49**). So enthielt beispielsweise der wasserlösliche Senfextrakt (WE) mit 8,00 mg L-Cystein/kg Senf eine vergleichbare Menge der freien Aminosäure wie die nicht-fraktionierten, gedämpften Senfsamen (7,42 mg/kg). Die Summe der auf die intakten Senfsamen bezogenen L-Cystein-Gehalte der Unterfraktionen WEN U2 bis WEN U5 des wasserlöslichen Senfextrakts lag mit 6,53 mg/kg etwas über dem Wert der Fraktion WEN (5,74 mg/kg).

Tabelle 2.49 Gehalte an freiem L-Cystein in gedämpften und gemahlene Senfsamen sowie Senffractionen.

Senfprobe (prozentualer Anteil am Senf)	Konzentration L-Cystein [mg/kg] ^a in	
	Fraktion	Originalmaterial ^b
gedämpfte, gemahlene Senfsamen	---	7,42
Wasserextrakt (21,0 %)	38,1	8,00
Wasserextrakt, < 5000 Da (15,9 %)	36,1	5,74
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 2 (7,7 %)	55,4	4,27
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 3 (2,5 %)	47,0	1,18
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 4 (2,8 %)	27,6	0,77
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 5 (2,0 %)	15,6	0,31

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

^b Die Einberechnung des Gewichtsanteils jeder Fraktion ergab die auf die Masse von nicht-fraktioniertem Senf bezogene Konzentration an freiem L-Cystein.

Beim Vergleich der Stoffmengen des in den gedämpften Senfsamen oder den Senffractionen vorhandenen, freien L-Cysteins mit den Stoffmengen des jeweils bei den Röstungen gebildeten 2-Furanmethanthiols wurde deutlich, dass im Senf (SG) sowie in der Fraktion WEN U4 die Stoffmenge an 2-Furanmethanthiol größer war als die

Stoffmenge an freiem L-Cystein ($n(2\text{-Furanmethanthiol})$ zu $n(\text{L-Cystein}) > 1$, **Tab. 2.50**). Allein aus diesem Grund konnte freies L-Cystein nicht die alleinige Schwefelquelle für 2-Furanmethanthiol darstellen.

Tabelle 2.50 Stoffmengen von vor der Röstung frei vorliegendem L-Cystein und dem durch die Röstung gebildeten 2-Furanmethanthiol (FFT) in gedämpften und gemahlene Senfsamen sowie in Senffractionen: Berechnung des Stoffmengenverhältnisses.

Senfprobe	Stoffmenge [μmol]		Stoffmengenverhältnis FFT/L-Cystein
	FFT	L-Cystein	
gedämpfte, gemahlene Senfsamen	64,6	61,3	1,05
Wasserextrakt	173	315	0,55
Wasserextrakt, < 5000 Da	137	298	0,46
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 2	21,0	458	0,05
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 3	28,9	388	0,07
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 4	230	228	1,01
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 5	17,0	129	0,13

Da als Schwefelquelle für 2-Furanmethanthiol jedoch auch gebundenes L-Cystein, z.B. aus Polypeptiden oder Proteinen, in Frage kommt, war auch der Gesamtgehalt an L-Cystein in den ungerösteten gedämpften Senfsamen sowie den ungerösteten Senffractionen von Interesse. Zur Bestimmung der Summe aus freiem und gebundenem L-Cystein (Gesamtcystein) musste zunächst eine geeignete Aufarbeitungsmethode für die SIVA entwickelt werden. Je 10 bis 100 mg der Probe wurden hierfür unter Zugabe des isotopenmarkierten Standards [$^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}$]-L-Cystein (**Abb. 2.13**) zunächst mit Iodethansäure zum Schutz der Thiolgruppen umgesetzt. Anschließend wurde die Suspension mit Salzsäure (6 mol/l) bei 110 °C für 20 Stunden zur Hydrolyse der Peptidbindungen erhitzt (**Kap. 5.8.3.3**). Nach Zentrifugation und Einstellen des pH-Werts auf 8,5 wurde das in der Lösung nun monomer vorliegende, mit Iodethansäure geschützte L-Cystein mit Dansylchlorid analog **Kapitel 2.1.1.4** derivatisiert und mittels HPLC-MS/MS (**Kap. 5.9.7**) vermessen.

In den untersuchten Senffractionen lagen die Gesamtcysteingehalte etwa 30- bis 800fach über den jeweils entsprechenden Gehalten an freiem L-Cystein (**Tab. 2.51**). Der wasserunlösliche Anteil der Senfsamen enthielt hierbei mit 7990 mg/kg mehr

L-Cystein als die wasserlösliche Fraktion (3260 mg/kg). Der Gesamtcysteingehalt der Fraktion WEH lag mit 4570 mg/kg deutlich über dem der Fraktion WEN (2950 mg/kg). Von den mittels Flash-Chromatographie erhaltenen WEN-Unterfraktionen stieg mit zunehmendem Anteil des organischen Elutionsmittels auch die enthaltene Menge an Gesamtcystein.

Tabelle 2.51 Gehalte an Gesamtcystein in gedämpften und gemahlene Senfsamen sowie Senffractionen.

Senfprobe (prozentualer Anteil am Senf)	Konzentration Gesamtcystein [mg/kg] ^a in	
	Fraktion	Originalmaterial ^b
gedämpfte, gemahlene Senfsamen	---	4730
Wasserunlöslicher Rückstand (52,5 %)	7990	4190
Wasserextrakt (21,0 %)	3260	685
Wasserextrakt, > 5000 Da (5,1 %)	4570	233
Wasserextrakt, < 5000 Da (15,9 %)	2950	469
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 2 (7,7 %)	1840	142
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 3 (2,5 %)	2590	64,8
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 4 (2,8 %)	2980	83,4
Wasserextrakt, < 5000 Da, Fraktion 5 (2,0 %)	12600	252

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 10\%$.

^b Die Einberechnung des Gewichtsanteils jeder Fraktion ergab die auf die Masse von nicht-fractioniertem Senf bezogene Konzentration an Gesamtcystein.

Durch Einberechnung der Gewichtsanteile der Senffractionen an den Senfsamen (**Tab. 2.51**) wurde ersichtlich, dass der Hauptteil des in nicht-fractionierten Senfsamen (SG) enthaltenen Gesamtcysteins (4730 mg/kg) in der nicht-wasserlöslichen Fraktion (WR) wiederzufinden war. Diese wies 4190 mg Gesamtcystein/kg Senf auf, während der Wasserextrakt (WE) nur mit 685 mg/kg zum Gesamtcysteingehalt des Senfs beitrug. Die Summe der Gehalte von WEH und WEN (702 mg/kg) war mit dem ermittelten Gehalt an Gesamtcystein des Wasserextrakts (685 mg/kg) vergleichbar. Von den WEN-Unterfraktionen wies WEN U5, die bei 40 bis 50 % Anteil des organischen Elutionsmittels eluiert wurde, mit 252 mg/kg den höchsten Anteil am wasserlöslichen Teil des Gesamtcysteins auf. Für die Bildung von 2-Furanmethanthiol beim Rösten von Senfsamen kommen somit aufgrund ihrer Gehalte an Cystein sowohl die nicht-wasserlöslichen als auch die wasserlöslichen Senffractionen in Frage.

2.2.2.7 Isotopenanreicherungsversuche in Senffractionen

Eine mögliche Beteiligung von freiem L-Cystein und freier D-Ribose bei der Bildung von 2-Furanmethanthiol sowie 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd während der Röstung wasserlöslicher Senffractionen (**Kap. 1.5.2, 2.2.1.3 und 2.2.1.4**) wurde mittels Isotopenanreicherungsversuchen untersucht. Hierfür wurden der wasserlösliche Senfextrakt (WE) sowie dessen niedermolekularer Anteil (WEN) ausgewählt und zunächst die Gehalte an freier D-Ribose in je 100 bis 500 mg dieser Fraktionen bestimmt (**Kap. 2.2.1.3 und Kap. 5.8.3.2**). Dabei wurde ersichtlich, dass die mittels Ultrafiltration aus der Fraktion WE gewonnene Fraktion WEN mit 78,7 mg/kg Fraktion deutlich mehr D-Ribose enthielt als die Fraktion WE (**Tab. 2.52**).

Tabelle 2.52 Gehalte an D-Ribose in Senffractionen.

Senffraction	Konzentration D-Ribose [mg/kg] ^a
Wasserextrakt (WE)	8,27
Wasserextrakt, < 5000 Da (WEN)	78,7

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 15\%$.

Für die Isotopenanreicherungsversuche wurden die Senffractionen WE und WEN in demineralisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde diesen Lösungen [³⁴S]-L-Cystein bzw. [¹³C₅]-D-Ribose in einer den in **Tabelle 2.49** und **Tabelle 2.52** genannten Gehalten an L-Cystein bzw. D-Ribose vergleichbaren Menge zugegeben. Nach Homogenisierung und Gefriertrocknung wurden die tatsächlichen Stoffmengenverhältnisse von n(L-Cystein) zu n([³⁴S]-L-Cystein) bzw. n(D-Ribose) zu n([¹³C₅]-D-Ribose) in den modifizierten Senffractionen mittels HPLC-MS/MS bestimmt (**Kap. 5.9.7**).

Anschließend wurden je 10 mg bis 1 g dieser Fraktionen in 10 ml Sonnenblumenöl bei 180 °C für 60 Minuten geröstet (**Kap. 2.2.2.5**) und zur Aufarbeitung analog **Kapitel 5.5** herangezogen. Die Bestimmung der Stoffmengenverhältnisse der möglichen entstandenen 2-Furanmethanthiol- sowie 2-Furanmethanol- und 2-Furancarbaldehyd-Moleküle erfolgte mittels HRGC/HRGC-MS (**Kap. 5.9.3**) analog **Kapitel 2.2.1.3** und **2.2.1.4**.

Die ermittelten Stoffmengenverhältnisse von n(L-Cystein) zu n(^{34}S]-L-Cystein) bzw. von n(D-Ribose) zu n($^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose) lagen im wasserlöslichen Extrakt bei 1 zu 2,05 bzw. 1 zu 1,93 sowie im niedermolekularen Teil des Wasserextrakts bei 1 zu 1,44 und 1,33 zu 1 (**Tab. 2.53**). Beim Vergleich der Intensitäten der Massenspuren der möglichen entstandenen 2-Furanmethanthiol-Moleküle (**Tab. 2.53**) wurde deutlich, dass bei der Röstung der drei Senffractionen von den beiden isopenmarkierten Verbindungen lediglich ^{34}S]-L-Cystein, wenn auch in einer untergeordneten Rolle, am Aufbau von 2-Furanmethanthiol beteiligt sein könnte. Das Stoffmengenverhältnis n(L-Cystein) zu n(^{34}S]-L-Cystein) verschob sich jedoch signifikant zu Gunsten des unmarkierten Aromastoffs. Massenspuren, die auf eine Beteiligung freier D-Ribose an der Bildung von 2-Furanmethanthiol hingedeutet hätten ($m/z = 86$ bzw. 122), wiesen jedoch nur eine kaum detektierbare Signalintensität auf.

Tabelle 2.53 Stoffmengenverhältnisse von L-Cystein (Cys) zu ^{34}S]-L-Cystein (^{34}S]-Cys) bzw. von D-Ribose (Rib) zu $^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose ($^{13}\text{C}_5$]-Rib) in ungerösteten Senffractionen sowie von unmarkiertem und unterschiedlich markiertem 2-Furanmethanthiol (FFT) in gerösteten Senffractionen.

Senffraktion	Stoffmengenverhältnis in ungerösteter Fraktion ^a		Stoffmengenverhältnis in gerösteter Fraktion ^a		
	Cys/ ^{34}S]-Cys	Rib/ $^{13}\text{C}_5$]-Rib	FFT/ ^{34}S]-FFT	FFT/ $^{13}\text{C}_5$]-FFT	FFT/ $^{13}\text{C}_5, ^{34}\text{S}$]-FFT
Wasserextrakt	1 : 2,05	1 : 1,93	24,7 : 1	> 1000 : 1	> 1000 : 1
Wasserextrakt, < 5000 Da	1 : 1,44	1,33 : 1	24,4 : 1	> 1000 : 1	> 1000 : 1

^a Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Abweichung vom Mittelwert betrug höchstens $\pm 15\%$.

Die Massenspuren des aus der Beteiligung von $^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose entstandenen $^{13}\text{C}_5$]-2-Furanmethanols sowie des $^{13}\text{C}_5$]-2-Furancarbaldehyds mit den m/z -Verhältnissen 102 bzw. 86 konnten ebenfalls kaum nachgewiesen werden (**Tab. 2.54**).

Tabelle 2.54 Stoffmengenverhältnisse von D-Ribose zu [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose in ungerösteten Senffractionen sowie von unmarkiertem und markiertem 2-Furancarbaldehyd (FCA) bzw. 2-Furanmethanol (FM) in gerösteten Senffractionen.

Senffraktion	Stoffmengenverhältnis in ungerösteter Fraktion	Stoffmengenverhältnis in gerösteter Fraktion	
	D-Ribose/[$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose	FCA/[$^{13}\text{C}_5$]-FCA	FM/[$^{13}\text{C}_5$]-FM
Wasserextrakt	1 : 1,93	> 10000 : 1	> 10000 : 1
Wasserextrakt, < 5000 Da	1,33 : 1	> 10000 : 1	> 10000 : 1

Eine Beteiligung von freier D-Ribose an der Bildung von 2-Furanmethanol sowie 2-Furancarbaldehyd konnte deshalb auch bei der Röstung wasserlöslicher Senffractionen ausgeschlossen werden, während freies L-Cystein in einer untergeordneten Rolle an der Bildung von 2-Furanmethanthiol in wasserlöslichen Senffractionen beteiligt sein könnte.

3 Schlussfolgerungen

3.1 Einflüsse auf die Qualität des Kaffeearomas

Aroma und Qualität von Röstkaffee und Kaffeegetränken können mit den Methoden der Molekularen Sensorik bewertet werden. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Rohkaffeetrocknungen, verschiedener Zubereitungsmethoden von Kaffeegetränken sowie der Lagerung von Röstkaffee unter variierenden Bedingungen untersucht (**Kap. 2.1**).

3.1.1 Trocknungstechnologie

Nass aufbereiteter Rohkaffee kann in der Sonne oder maschinell getrocknet werden. Bei den maschinellen Verfahren wird üblicherweise eine kontinuierliche Trocknung bei 50 °C angewandt (Standardtrocknung). In dieser Arbeit wurden neben der Sonnen- und Standardtrocknung folgende Varianten des maschinellen Trocknungsverfahrens untersucht: rhythmische Trocknungen (Wechsel zwischen Trocknung und Ruhephase) bei unterschiedlichen Temperaturen, Stufentrocknungen mit abnehmender Temperatur bei zunehmender Trocknungsdauer sowie von der Standardtemperatur abweichende kontinuierliche Trocknungen. Die Trocknungen wurden in Costa Rica und in Hamburg durchgeführt (**Kap. 2.1.1** und **Tab. 2.1**). Die aus diesen unterschiedlich getrockneten Rohkaffees erhaltenen Röstkaffees des Erntejahrs 2007 wurden mittels Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit untersucht (**Kap. 2.1.1.2**, **Tab. 2.2** und **Tab. 2.3**), wobei als Bezugsproben jeweils die Röstkaffeepulver der Standardtrocknung dienten. Hierbei konnte teilweise eine orthonasale Unterscheidbarkeit festgestellt werden, wobei die signifikanteste Unterscheidbarkeit zwischen dem Röstkaffeepulver der Standardtrocknung in Hamburg (HH 07 kT 50, Probencodierung **Tab. 2.1**) und einem Röstkaffeepulver des in Hamburg im Tag-Nacht-Rhythmus bei 40 °C getrockneten Rohkaffees (HH 07 TNR 40 a) bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ lag. Allerdings war der überwiegende Teil der Röstkaffeepulver nicht signifikant orthonasal unterscheidbar. Zudem waren die festgestellten Unterschiede nicht immer reproduzierbar, wie das Beispiel der kontinuierlich, bei 50 °C in Costa Rica getrockneten Kaffees zeigte. So war eine Charge

dieses Röstkaffeepulvers (CR 07 kT 50 b) signifikant vom Röstkaffee CR 07 TNR 50 unterscheidbar, eine zweite Charge (CR 07 kT 50 a) jedoch nicht.

Um dennoch zu überprüfen, ob unterschiedliche Trocknungsvarianten die qualitative oder quantitative Zusammensetzung der Röstkaffeearomastoffe beeinflussen können, wurden zunächst die beiden orthonasal am deutlichsten unterscheidbaren Röstkaffeepulver (HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a) mittels vAEVA und vHVA untersucht. Dabei konnten 27 aromaaktive Verbindungen, die in mindestens einem der Röstkaffees einen FD-Faktor ≥ 64 aufwiesen, identifiziert werden (**Kap. 2.1.1.4, Tab. 2.7** und **Tab. 2.8**). Jede der 27 Substanzen wurde bereits in den Arbeiten von Holscher et al. (1990), Blank et al. (1992 a), Semmelroch und Grosch (1995) oder Czerny et al. (1996) als aromaaktive Röstkaffeekomponente mittels HRGC-O nachgewiesen. Der Vergleich mit den von Czerny et al. (1999) zur Erstellung eines Aromamodells von Röstkaffeepulver verwendeten 28 Verbindungen (**Kap. 1.3.2** und **Tab. 1.4**) verdeutlichte, dass 24 dieser Aromastoffe mit den in dieser Arbeit identifizierten, mit einem FD-Faktor ≥ 64 vorliegenden Verbindungen übereinstimmten. Im Gegensatz dazu konnten allerdings die Aromastoffe 2-Ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon, 4-Ethyl-2-methoxyphenol, 2-Methyl-3-furanthiol und Dimethyltrisulfid in der vAEVA bzw. vHVA dieser Arbeit nur mit FD-Faktoren < 64 wahrgenommen werden. Andererseits wiesen das erdig und nach Erbse riechende 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin, das nach Fleisch und schweflig riechende 3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol sowie die schweißig riechenden Verbindungen 2- und 3-Methylbutansäure in mindestens einem der beiden Röstkaffeepulver einen FD-Faktor ≥ 64 auf. Diese wurden von Czerny et al. (1999) jedoch nicht zur Erstellung eines Röstkaffeepulver-Aromamodells herangezogen.

Beim Vergleich der aromaaktiven Verbindungen der beiden orthonasal signifikant unterscheidbaren Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 (kontinuierliche Trocknung bei 50 °C) und HH 07 TNR 40 a (Trocknung im Tag-Nacht-Rhythmus bei 40 °C) fiel zudem auf, dass keine qualitativen Unterschiede vorlagen. Im Gegensatz dazu hatten die von Teutsch (2004) untersuchten Varianten der Aufbereitungsmethoden von Rohkaffee (**Kap. 1.4.1**) signifikante qualitative Unterschiede in den aromaaktiven Komponenten sowohl bei Roh- als auch bei Röstkaffee zur Folge. Die ausschließlich in trocken aufbereiteten Rohkaffees identifizierten Ethylester konnte der Autor in nass

aufbereiteten Rohkaffees nicht detektieren. Nach Röstung sowie Zubereitung eines Kaffeegetränks trugen die Ester laut Teutsch (2004) entscheidend zum unterschiedlichen Aromaprofil von Röstkaffees bzw. Kaffeegetränken aus unterschiedlicher Aufbereitung bei.

Die in dieser Arbeit ermittelten FD-Faktoren der wichtigsten Verbindungen der Röstkaffeepulver HH 07 kT 50 und HH 07 TNR 40 a wiesen darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede auf, so dass die orthonasale Unterscheidbarkeit lediglich durch quantitative Unterschiede in den Gehalten wichtiger Aromastoffe bedingt sein konnte. Deshalb wurden diese sowie die anderen, orthonasal unterscheidbaren Röstkaffeepulver des Erntejahrs 2007 und außerdem die Röstkaffeepulver des Erntejahrs 2008 zur Quantifizierung wichtiger ausgewählter Röstkaffeearomastoffe herangezogen. Mit Hilfe von Weglassversuchen konnten Czerny et al. (1999) die entscheidende Bedeutung von 2-Furanmethanthiol, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol, mehreren Alkylpyrazinen und Furanonen sowie der Streckeraldehyde Ethanal, Propanal, Methylpropanal, 2- und 3-Methylbutanal für das Aroma von Röstkaffee belegen. Deshalb wurde in dieser Arbeit bei den Quantifizierungen der Fokus auf 2-Furanmethanthiol, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon und 2- und 3-Methylbutanal sowie zusätzlich auf Diacetyl und 3-(Methylthio)propanal gelegt. Die Gehalte dieser Aromastoffe wurden in den orthonasal unterscheidbaren Röstkaffeepulvern (**Tab. 2.2** und **Tab. 2.3**) sowie daraus hergestellten Kaffeegetränken mit Hilfe der Stabilisotopenverdünnungsanalyse bestimmt, um die möglicherweise technologisch bedingten Unterschiede im Aromaprofil objektiv darstellen zu können.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Aromastoffe in den untersuchten Röstkaffeepulvern jeweils deutlich unterschiedliche Konzentrationen aufwiesen (**Kap. 2.1.1.5** und **Tab. 2.9** bis **Tab. 2.12**). Aufgrund ihrer individuellen Geruchsschwellenwerte sind die Verbindungen jedoch in stark unterschiedlichen Mengen aromaaktiv. Um also die Bedeutung der einzelnen Aromastoffe für das Gesamtroma der Röstkaffeepulver vergleichen zu können, wurden beispielhaft für drei Röstkaffees, die aus im Jahr 2008 in Hamburg getrockneten Rohkaffees erhalten worden waren, die Aromawerte wichtiger Aromastoffe aus dem Quotient aus der jeweiligen Konzentration (**Tab. 2.12**) und dem entsprechenden Geruchsschwellenwert

berechnet: HH 08 kT 50 (kontinuierliche Trocknung bei 50 °C), HH 08 TNR 50 (Trocknung im Tag-Nacht-Rhythmus bei 40 °C) und HH 08 Stufe (Trocknung mit abnehmender Temperatur bei 60 bis 40 °C). Als Vergleich wurden anhand der von Mayer et al. (2000) in einem kolumbianischen Arabica-Röstkaffee bestimmten Aromastoffkonzentrationen (**Tab. 1.5**) ebenfalls die Aromawerte berechnet. Hierfür wurden die in dieser Arbeit verwendeten Geruchsschwellenwerte zugrunde gelegt. Die Gegenüberstellung ist in **Tabelle 3.1** wiedergegeben.

Tabelle 3.1 Aromawerte wichtiger Aromastoffe in einem kolumbianischen Röstkaffee und in Röstkaffees, die aus im Jahr 2008 in Hamburg getrockneten Rohkaffees erhalten wurden.

Aromastoff	GS ^a [µg/kg]	Aromawert im Röstkaffeepulver			
		Kolumbien ^e	HH 08 kT 50 ^f	HH 08 TNR 50 ^f	HH 08 Stufe ^f
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	13 ^b	11000	8800	8500	8900
Diacetyl	6,5 ^b	7500	3200	4900	4600
2-Furanmethanthiol	0,30 ^c	5700	3100	3700	4600
3-(Methylthio)propanal	0,27 ^b	930	2500	2100	2400
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	18 ^b	2500	2300	2500	2400
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	0,14 ^d	710	2000	2500	3800
3-Methylbutanal	32 ^b	530	100	100	110
2-Methylbutanal	53 ^b	490	71	75	84

^a Geruchsschwellenwert in Stärke bzw. Cellulose.

^b Rychlik und Grosch (1996), Angabe des Geruchsschwellenwerts in µg/kg Stärke.

^c Mayer (2000), Angabe des Geruchsschwellenwerts in µg/kg Cellulose.

^d Zehentbauer (1997), Angabe des Geruchsschwellenwerts in µg/kg Stärke.

^e Berechnet aus den Konzentrationen der Aromastoffe in einem Röstkaffeepulver aus Kolumbien nach Mayer et al. (2000).

^f Probencodierung **Tabelle 2.1**.

Die Aromawerte der Aromastoffe der in dieser Arbeit untersuchten Röstkaffeepulver (HH 08 kT 50, HH 08 TNR 50 und HH 08 Stufe) verdeutlichen zunächst, dass 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon mit 8500 bis 8900 die höchsten Aromawerte unter den acht Aromastoffen aufwies, gefolgt von Diacetyl und 2-Furanmethanthiol sowie 3-(Methylthio)propanal, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, deren Aromawerte (AW) in einem vergleichbaren Bereich lagen. Die Verbindungen 2-Furanmethanthiol, 3-(Methylthio)propanal und 2,3-Diethyl-

5-methylpyrazin gehörten damit trotz ihrer jeweils niedrigen Gehalte zu den potentesten Aromastoffen in den untersuchten Röstkaffees. Die beiden Streckeraldehyde 2- und 3-Methylbutanal wiesen dagegen aufgrund ihrer vergleichsweise hohen Geruchsschwellenwerte jeweils deutlich niedrigere Aromawerte auf als die anderen sechs Aromastoffe. Die Gegenüberstellung mit den in der Studie von Mayer et al. (2000) berechneten Aromawerten zeigt weiterhin, dass die acht Aromastoffe jeweils eine vergleichbare Bedeutung hatten. Die Unterschiede sind unter anderem mit der variierenden Herkunft der Kaffees, unterschiedlichen Nacherntebehandlungen sowie eventuell abweichenden Röstgraden der Kaffees zu erklären. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Unterschiede in den Aromawerten der Aromastoffe der Röstkaffeepulver HH 08 kT 50, HH 08 TNR 50 und HH 08 Stufe jeweils relativ gering ausgeprägt waren. Die größten prozentualen Unterschiede konnten dabei zwischen den Röstkaffeepulvern HH 08 kT 50 und HH 08 Stufe für die Aromastoffe 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (AW 2000 und AW 3800) und 2-Furanmethanthiol (AW 3100 und AW 4600) festgestellt werden.

Weiterhin wurde überprüft, ob die Unterschiede in den Aromastoffgehalten auch in den Kaffeegetränken nachweisbar waren, die aus den Röstkaffeepulvern HH 08 kT 50, HH 08 TNR 50 und HH 08 Stufe zubereitet wurden (**Kap. 2.1.1.5** und **Tab. 2.13**). Um die Bedeutung der Verbindungen in den Kaffeegetränken vergleichen zu können, wurden auch hier die Aromawerte auf Grundlage der entsprechenden Geruchsschwellenwerte der Aromastoffe in Wasser (Czerny et al., 2008) berechnet. Diese Geruchsschwellenwerte wurden zudem zur Berechnung der Aromawerte der Aromastoffe in einem Kaffeegetränk, das aus einem kolumbianischen Arabica-Röstkaffee hergestellt wurde, anhand der von Mayer et al. (2000) bestimmten Konzentrationen (**Tab. 1.5**) herangezogen. **Tabelle 3.2** zeigt die Gegenüberstellung der Aromawerte.

Tabelle 3.2 Aromawerte wichtiger Aromastoffe in einem aus kolumbianischem Röstkaffee hergestellten Kaffeegetränk und Kaffeegetränken, die aus im Jahr 2008 in Hamburg getrockneten Rohkaffees erhalten wurden.

Aromastoff	GS ^a [µg/l]	Aromawert im Kaffeegetränk			
		Kolumbien ^b	HH 08 kT 50 ^c	HH 08 TNR 50 ^c	HH 08 Stufe ^c
Diacetyl	1,0	2100	640	940	640
2-Furanmethanthiol	0,036	3400	290	260	350
3-Methylbutanal	0,50	1100	160	200	180
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	5,1	150	140	180	160
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	40	180	85	100	84
2-Methylbutanal	1,5	580	51	66	51
3-(Methylthio)propanal	0,43	23	46	46	51
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	0,031	120	26	42	29

^a Geruchsschwellenwert in Wasser (Czerny et al., 2008).

^b Berechnet aus den Konzentrationen der Aromastoffe in einem Kaffeegetränk (hergestellt aus Röstkaffeepulver aus Kolumbien) nach Mayer et al. (2000).

^c Probencodierung **Tabelle 2.1**.

Ein Vergleich der Aromawerte der Aromastoffe in den Kaffeegetränken und den Röstkaffees verdeutlicht zunächst, dass sich die Bedeutung der acht Aromastoffe durch die Zubereitung der Kaffeegetränke verschoben hatte. Während in den Röstkaffeepulvern 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon die jeweils höchsten Aromawerte aufwies, war dies in allen in dieser Arbeit untersuchten Kaffeegetränken für Diacetyl der Fall (AW 640 bis 940). Zudem erreichten hier auch 2-Furanmethanthiol, 3-Methylbutanal sowie 4-Ethenyl-2-methoxyphenol höhere Aromawerte (AW 140 bis 350) als 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (AW 84 bis 100). Die niedrigsten Aromawerte wurden für 2-Methylbutanal, 3-(Methylthio)propanal sowie 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (alle AW < 70) festgestellt. Letzteres wies in den Röstkaffeepulvern deutlich höhere Aromawerte als die beiden Methylbutanale auf (**Tab. 3.1**). In dem von Mayer et al. (2000) zubereiteten Kaffeegetränk erreichte hingegen 2-Furanmethanthiol den höchsten Aromawert. Zudem wiesen 2- und 3-Methylbutanal sowie 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin deutlich höhere Aromawerte auf als in den in dieser Arbeit untersuchten Kaffeegetränken. Diese Unterschiede sind sowohl auf die Verwendung verschiedener Röstkaffees als auch auf die Anwendung unterschiedlicher Zubereitungsverfahren der Getränke zurückzuführen.

Der anschließende Vergleich der Aromawerte in den in dieser Arbeit zubereiteten drei Kaffeegetränken zeigt, dass die Unterschiede ebenfalls gering ausgeprägt waren. So wurden maximale Unterschiede für 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin zwischen den Kaffeegetränken HH 08 TNR 50 (AW 42) und HH 08 kT 50 (AW 26) sowie für Diacetyl zwischen dem Getränk HH 08 TNR 50 (AW 940) und den beiden Getränken HH 08 kT 50 und HH 08 Stufe (AW jeweils 640) ermittelt.

Es stellte sich nun die Frage, ob die geringen quantitativen Unterschiede wichtiger Aromastoffe der untersuchten Röstkaffees tatsächlich durch Variationen in der Trocknungstechnologie der entsprechenden Rohkaffees hervorgerufen wurden. Anhand der Berechnung der Aromawerte der fünf in den Röstkaffeeproben CR 07 kT 50 a, CR 07 kT 50 b sowie CR 07 So b analysierten Aromastoffe (**Tab. 2.9**) wurde ersichtlich, dass die Aromawerte der Röstkaffees CR 07 kT 50 b, hergestellt aus einem Rohkaffee kontinuierlicher, maschineller Trocknung, sowie CR 07 So b, gewonnen aus einem sonnengetrockneten Rohkaffee, insbesondere für 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin und 3-(Methylthio)propanal, im gleichen Bereich lagen (**Tab. 3.3**).

Tabelle 3.3 Aromawerte wichtiger Aromastoffe in Röstkaffees, die aus im Jahr 2007 in Costa Rica getrockneten Rohkaffees erhalten wurden.

Aromastoff	GS ^a [µg/kg]	Aromawert in CR 07		
		kT 50 a ^e	kT 50 b ^e	So b ^e
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	13 ^b	3700	3100	2600
2-Furanmethanthiol	0,30 ^c	1800	3500	3900
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	18 ^b	1300	1600	1300
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	0,14 ^d	650	1400	1400
3-(Methylthio)propanal	0,27 ^b	380	340	350

^a Geruchsschwellenwert in Stärke bzw. Cellulose.

^b Rychlik und Grosch (1996), Angabe des Geruchsschwellenwerts in µg/kg Stärke.

^c Mayer (2000), Angabe des Geruchsschwellenwerts in µg/kg Cellulose.

^d Zehentbauer (1997), Angabe des Geruchsschwellenwerts in µg/kg Stärke.

^e Probencodierung **Tabelle 2.1**.

Im Gegensatz dazu wurden größere Unterschiede in den Aromawerten zwischen den beiden Chargen des Röstkaffees CR 07 kT 50 (a und b), insbesondere für 2-Furanmethanthiol und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, festgestellt. Somit waren die Schwankungen der Aromastoffgehalte zwischen zwei Chargen der gleichen

Trocknungstechnologie stärker ausgeprägt als zwischen Röstkaffees unterschiedlicher Trocknungsvarianten. Auch bei Betrachtung aller weiteren im Laufe dieser Untersuchungen erhaltenen quantitativen Daten (**Kap. 2.1.1.5** und **Tab. 2.9** bis **2.12**) zeigte sich, dass die jeweils höchsten bzw. niedrigsten Aromastoffgehalte keiner Trocknungstechnologie eindeutig zugeordnet werden konnten. Eine Korrelation zwischen den unterschiedlichen Trocknungstechnologien der Rohkaffees und den Aromastoffgehalten in den entsprechenden Röstkaffees konnte somit nicht festgestellt werden. Die Konzentrationsunterschiede und die daraus resultierende sensorische Unterscheidbarkeit mancher Röstkaffeepulver mussten demzufolge eine andere Ursache haben. Die Konzentrationsunterschiede der untersuchten Röstkaffees und Kaffeegetränke lagen in einer Größenordnung, die vielmehr auf Abweichungen im Röstgrad der Kaffeeproben zurückzuführen sein könnte. So zeigte beispielsweise die Entwicklung des Gehalts von 2-Furanmethanthiol bei unterschiedlich langer Röstdauer (**Kap. 2.2.1.1** und **Tab. 2.33**), dass schon eine Differenz von einer Minute Röstdauer (1450 µg/kg (Aromawert 4800) nach sieben Minuten bzw. 2130 µg/kg (Aromawert 7100) nach acht Minuten) einen signifikanten Konzentrationsunterschied von 2-Furanmethanthiol in Röstkaffee hervorrief. Unterschiedliche Röstergebnisse trotz Gewährleistung gleicher Röstbedingungen (Apparatur, Dauer, Temperatur) waren hierbei beispielsweise durch unterschiedliche Wassergehalte der getrockneten Rohkaffees und damit verbundene Abweichungen im Temperaturverlauf der Röstung erklärbar.

Insbesondere zeigte die Quantifizierung der vier Aromastoffe 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, Diacetyl, 2-Methylbutanal und 2-Furanmethanthiol in fünf einzelnen, der frisch gerösteten Probe HH 08 kT 50 entnommenen Röstkaffeebohnen (**Kap. 2.1.1.5** und **Tab. 2.14**), dass bei der Röstung von Kaffee keine Homogenität zwischen den einzelnen Bohnen erreicht werden kann. Die quantitativen Unterschiede wichtiger Aromastoffe, die in den Röstkaffees und Kaffeegetränken aus unterschiedlich getrockneten Rohkaffees gefunden wurden (**Tab. 2.9** bis **Tab. 2.13**), lagen in der gleichen Größenordnung wie die durch die Röstung auftretenden Schwankungen innerhalb eines Röstguts, wie am Beispiel von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon deutlich wurde.

Somit wurde ersichtlich, dass Parameter wie beispielsweise der Röstgrad die Aromastoffgehalte in Röstkaffees vermutlich mehr beeinflussen als unterschiedliche Trocknungstechnologien. Des Weiteren zeigten die Unterschiede in den Aromastoffkonzentrationen der Röstkaffees, die aus unterschiedlich getrockneten Rohkaffees gewonnenen worden waren, keine eindeutige und reproduzierbare Tendenz, wie der Vergleich verschiedener Chargen verdeutlichte. Eine signifikante und eindeutige Beeinflussung der Aromaqualität von Röstkaffees und Kaffeegetränken durch die Anwendung unterschiedlicher Trocknungsmethoden der entsprechenden Rohkaffees konnte deshalb nicht festgestellt werden.

3.1.2 Extraktionstechniken

In den Arbeiten von Blank et al. (1992 a), Semmelroch und Grosch (1995, 1996) sowie Mayer et al. (2000) wurden die wichtigsten Aromastoffe von Kaffeegetränken identifiziert und quantifiziert (**Kap. 1.3.3**). Diese Aromastoffe entsprachen zwar qualitativ den Schlüsselaromastoffen von Röstkaffee, doch änderte sich je nach Polarität und Löslichkeit des jeweiligen Aromastoffs ihre Bedeutung im Vergleich zu Röstkaffee. Die Extraktionsraten einzelner Aromastoffe wurden erstmals von Semmelroch und Grosch (1996) sowie später von Mayer et al. (2000) berechnet (**Kap. 1.3.3**). Hierbei wurden die Getränke stets durch einfaches Überbrühen einer definierten Menge an Röstkaffeepulver mit einer bestimmten Menge an heißem Wasser hergestellt.

In dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der Extraktionsraten wichtiger Röstkaffeearomastoffe von verschiedenen Extraktionstechniken untersucht. Für die quantitativen Analysen wurden zehn Aromastoffe, die bereits im Röstkaffeearomamodell von Czerny et al. (1999, **Kap. 1.3.2**) sowie im Aromamodell eines Kaffeegetränks von Semmelroch und Grosch (1996) von Bedeutung waren, als Vertreter der wichtigsten Aromastoffgruppen ausgewählt. Dies waren 2-Methylbutanal und 3-(Methylthio)propanal, Diacetyl und 2,3-Pentandion, 2-Furanmethanthiol, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon sowie die phenolischen Verbindungen 2-Methoxyphenol, 4-Ethenyl-2-methoxyphenol und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (**Kap. 2.1.2.2**).

Die Gehalte dieser zehn Substanzen wurden in Kaffeegetränken, die aus dem gleichen Röstkaffeepulver unter Einhaltung des immer gleichen Verhältnisses von Wasser und Röstkaffeepulver mittels vier verschiedener Zubereitungsmethoden hergestellt wurden (**Kap. 5.1.3**), miteinander verglichen. Dadurch und durch das rasche Abkühlen der frisch zubereiteten Getränke auf 30 °C vor der Quantifizierung der Aromastoffe war gewährleistet, dass Unterschiede in den Extraktionsraten zwischen den verschiedenen Getränken ausschließlich von der Art der Extraktionsmethode abhängig waren. In den Studien von Bonnlaender et al. (2005) sowie Lopez-Galilea et al. (2006) wurde dagegen beispielsweise für die Zubereitung von Espressi eine höhere Menge an Röstkaffeepulver verwendet als für die Zubereitung der Filterkaffeegetränke, was die Ursache für die größere Intensität der untersuchten Verbindungen in den Espressi sein könnte (**Kap. 1.4.4**).

Die signifikante orthonasale Unterscheidbarkeit des in der Kaffeemaschine hergestellten Kaffeegetränks von Espresso- und Mokkagetränk sowie dem in der Stempelkanne zubereiteten Kaffeegetränk (**Kap. 2.1.2.1** und **Tab. 2.15**) sollte durch einen Vergleich der Gehalte der zehn genannten Aromastoffe in den vier unterschiedlichen Getränken erklärt werden. Um beim Vergleich dieser Konzentrationen (**Kap. 2.1.2.2** und **Tab. 2.17** bis **Tab. 2.22**) die unterschiedlichen Volumina der erhaltenen Getränke (**Kap. 5.1.3**), die Menge des eingesetzten Röstkaffeepulvers sowie den Gehalt des jeweiligen Aromastoffs in den entsprechenden Röstkaffeepulvern zu berücksichtigen, wurden die Extraktionsraten anhand der in **Kapitel 5.8.3.5** genannten Formel berechnet (**Tab. 2.23** bis **Tab. 2.28**). Die Untersuchungen wurden jeweils für drei sortenreine Röstkaffeepulver unterschiedlicher Provenienzen aus Costa Rica, Kenia und Papua-Neuguinea durchgeführt.

Die höchsten Gehalte aller in dieser Arbeit in Kaffeegetränken bestimmten Aromastoffe wies jeweils 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon auf (**Tab. 2.17** bis **Tab. 2.22**). Auch Semmelroch und Grosch (1996) hatten in Kaffeegetränken für diesen Aromastoff die höchsten Konzentrationen beschrieben. Die Unterschiede in den Aromastoffgehalten der vier verschiedenen, in dieser Arbeit untersuchten Kaffeegetränke waren je nach Aromastoff unterschiedlich stark ausgeprägt. Mehr als doppelt so hohe Gehalte wurden beispielsweise für 2-Methylbutanal in den Stempelkannengetränken der Röstkaffees aus Kenia und Papua-Neuguinea als in den entsprechenden anderen drei

Kaffeegetränken, für 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin in den Stempelkannengetränk der Röstkaffees aus Costa Rica und Kenia gegenüber den entsprechenden Mokkagetränken oder auch für 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd in den Espressogetränken gegenüber den entsprechenden Kaffeemaschinen- sowie Mokkagetränken der Röstkaffees aus Costa Rica und Kenia gefunden. Dagegen waren die Unterschiede in den Gehalten von 3-(Methylthio)propanal oder 2-Methoxyphenol generell weniger stark ausgeprägt. Außerdem fiel auf, dass für alle drei Röstkaffees die jeweils höchsten Aromastoffgehalte entweder im Kaffeegetränk, das mit der Stempelkanne zubereitet wurde, oder im Espressogetränk auftraten.

Um die Bedeutung der Aromastoffe für die Kaffeegetränke darzustellen, wurden in den vier unterschiedlich zubereiteten Kaffeegetränken aus dem Röstkaffee aus Costa Rica die jeweiligen Aromawerte berechnet (**Tab. 3.4**).

Tabelle 3.4 Aromawerte zehn ausgewählter Aromastoffe in vier unterschiedlich zubereiteten Kaffeegetränken aus dem Röstkaffee aus Costa Rica.

Aromastoff	GS ^a [µg/kg]	Zubereitungsmethode			
		Maschine	Stempelkanne	Espresso	Mokka
Diacetyl	1,0 ^b	700	1100	840	1000
2-Furanmethanthiol	0,036 ^b	310	360	180	240
4-Ethenyl- 2-methoxyphenol	5,1 ^b	190	300	340	290
2-Methoxyphenol	0,84 ^b	160	210	220	200
2-Methylbutanal	1,5 ^b	110	210	110	58
2,3-Diethyl-5- methylpyrazin	0,031 ^b	90	120	110	61
4-Hydroxy-2,5-dimethyl- 3(2 <i>H</i>)-furanon	40 ^b	80	99	130	110
3-(Methylthio)propanal	0,43 ^b	39	44	41	33
2,3-Pentandion	30 ^c	19	30	21	24
4-Hydroxy- 3-methoxybenzaldehyd	53 ^b	3,5	4,0	7,7	3,6

^a GS = Geruchsschwellenwert.

^b Geruchsschwellenwert in Wasser (Czerny et al. 2008).

^c Geruchsschwellenwert in Wasser (Blank et al., 1992 b).

So wies beispielsweise Diacetyl in den vier Kaffeegetränken um den Faktor 109 bis 278 höhere Aromawerte (minimal beim Espresso-, maximal beim Mokkagetränk) auf als 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd. Des Weiteren waren die Unterschiede zwischen den Aromawerten in den unterschiedlich zubereiteten Kaffeegetränken deutlich stärker ausgeprägt als zwischen Kaffeegetränken, die aus Röstkaffees unterschiedlicher Trocknungstechnologien mit der gleichen Extraktionsmethode hergestellt worden waren (**Kap. 3.1.1** und **Tab. 3.2**). Beispielsweise lag die Differenz der Aromawerte von 2-Furanmethanthiol im Stempelkannengetränk (AW 360) und im Espressogetränk (AW 180) bei 180, wohingegen die Abweichung in den Kaffeegetränken, die aus Röstkaffees unterschiedlicher Trocknungstechnologien zubereitet worden waren, maximal 90 betrug (zwischen dem Kaffeegetränk HH 08 TNR 50 und dem Kaffeegetränk HH 08 Stufe). Dies macht deutlich, dass durch unterschiedliche Getränkezubereitungen die Gehalte der Aromastoffe im Kaffeegetränk in deutlich größerem Ausmaß beeinflusst werden, als durch die Verwendung verschiedener Trocknungstechnologien bei Rohkaffee.

In **Tabelle 3.5** sind die Extraktionsraten der analysierten Aromastoffe in den mit der Kaffeemaschine zubereiteten Kaffeegetränken der Röstkaffees aus Papua-Neuguinea, Costa Rica und Kenia (**Tab. 2.23** bis **Tab. 2.28**) den Daten von Mayer et al. (2000) in einem von Hand aufgebrühten Kaffeegetränk gegenüber gestellt. Generell waren die in dieser Arbeit bestimmten Extraktionsraten mit den Daten von Mayer et al. (2000) vergleichbar. 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd, 2,3-Pentandion sowie 2,3-Diethyl-5-methyl-pyrazin wiesen jedoch in der Studie von Mayer et al. (2000) deutlich höhere Extraktionsraten auf. Auch 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon sowie Diacetyl und 2-Methoxyphenol wurden laut Mayer et al. (2000) zu einem größeren Anteil aus dem Röstkaffeepulver extrahiert, als in dieser Arbeit festgestellt werden konnte. Die Abweichungen sind durch Unterschiede zwischen den angewandten Extraktionsverfahren, durch Verwendung unterschiedlicher Röstkaffees sowie durch verschiedene Berechnungen der Extraktionsraten erklärbar, da Mayer et al. (2000) bei ihrer Kalkulation das erhaltene Volumen der Kaffeegetränke nicht berücksichtigten.

Tabelle 3.5 Vergleich der Extraktionsraten von zehn Aromastoffen in Filterkaffeegetränken (Kolumbien sowie Papua-Neuguinea (PAP), Costa Rica (CR) und Kenia (KEN)).

Aromastoff	Extraktionsrate [%]			
	Kolumbien ^a	PAP	CR	KEN
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	95	79	81	74
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	95	70	60	59
2,3-Pentandion	85	49	38	44
Diacetyl	79	78	54	65
3-(Methylthio)propanal	74	78	83	81
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	67	42	36	43
2-Methoxyphenol	65	61	59	48
2-Methylbutanal	62	56	79	46
4-Ethenyl-2-methoxyphenol	30	38	30	38
2-Furanmethanthiol	19	23	23	23

^a Daten eines Kaffeegetränks aus einem kolumbianischen Röstkaffee, aus Mayer et al. (2000).

Für 2-Methylbutanal (**Tab. 2.23**) wurden für die Kaffeegetränke, die mit der Stempelkanne zubereitet wurden, Extraktionsraten von über 100 % ermittelt. Bereits Schuh und Schieberle (2006) stellten für Methylbutanale sowie weitere Aromastoffe in Tee und daraus hergestellten Teegetränken Extraktionsraten über 100 % fest. Daraufhin wurde geschlossen, dass durch den Kontakt der untersuchten Röstkaffeepulver mit heißem Wasser zusätzliches 2-Methylbutanal aus Vorläufern freigesetzt wurde. Diese Vermutung wurde von Buhr et al. (2010) untermauert, die die Gehalte an Streckeraldehyden in trockenen Lebensmitteln wie Kakao oder Malz bestimmten und nach Zugabe von Wasser zu diesen Lebensmitteln einen signifikanten Anstieg der Streckeraldehydkonzentrationen beobachten konnten. Einen weiteren Beleg für diese Theorie lieferten jüngst die Untersuchungen von Granvogl et al. (in Vorbereitung) mit Kakaoprodukten. In dieser Studie konnten die Autoren bei Zugabe von Wasser zu Lebensmitteln sowie zu synthetisch hergestellten, in Lebensmitteln vorkommenden Vorläufern von Streckeraldehyden in Modellansätzen eine deutliche Zunahme der Aromastoffkonzentrationen zeigen. Auch die in dieser Arbeit ermittelten relativ hohen Extraktionsraten des Streckeraldehyds 3-(Methylthio)propanal von bis zu 94 % waren vermutlich auf die Freisetzung des Aromastoffs bei Wasserkontakt zurückzuführen. Für beide Streckeraldehyde wurden die höchsten Extraktionsraten bei

Zubereitung des Kaffeegetränks mit der Stempelkanne erreicht. Bei dieser Methode betrug die Kontaktzeit des Röstkaffeepulvers mit dem heißen Wasser fünf Minuten und war somit länger als bei den anderen Zubereitungsmethoden. Die niedrigeren Extraktionsraten bei Herstellung des Mokkagetränks, insbesondere für das leichtflüchtige 2-Methylbutanal, sind mit Verlusten während des zweiminütigen Aufkochens des Röstkaffeepulvers im nicht geschlossenen System erklärbar.

Von Diacetyl und 2,3-Pentandion wurde der erstgenannte Aromastoff zu einem höheren prozentualen Anteil aus den Röstkaffeepulvern extrahiert (**Tab. 2.24**), was vermutlich auf seinen hydrophileren Charakter zurückzuführen war. Zudem konnten Schieberle und Pfner (1999) bei ihren Untersuchungen zu Schokolade zeigen, dass die Gehalte an Diacetyl durch Hitzeeinwirkung stark anstiegen. Die höchsten Extraktionsraten erreichten auch diese beiden Aromastoffe im Stempelkannengetränk. Die relativ niedrigen Extraktionsraten bei Zubereitung des Espressogetränks ließen zudem auf eine relativ schlechte Wasserdampflöslichkeit der beiden strukturell eng verwandten Substanzen schließen. Die Erkenntnisse von Schieberle und Pfner (1999) ließen außerdem vermuten, dass Extraktionsmethoden mit längerer Kontaktzeit des heißen Wassers mit dem Röstkaffeepulver zusätzlich Diacetyl aus gebundener Form freisetzen konnten.

2-Furanmethanthiol erzielte von allen analysierten Aromastoffen die niedrigsten Extraktionsraten (**Tab. 2.25**). Neben der mäßigen Wasserlöslichkeit der Verbindung könnte hierfür eine rasche Bindung des Aromastoffs an röstbedingt gebildete Substanzen verantwortlich sein. Wie Hofmann et al. (2001) sowie Hofmann und Schieberle (2002) zeigten, nimmt der Gehalt an 2-Furanmethanthiol in Kaffeegetränken bereits unmittelbar nach der Zubereitung durch Bindung des Thiols an Melanoidine rasch ab. Müller und Hofmann (2007) wiesen außerdem die Existenz von Phenol-2-Furanmethanthiol-Konjugaten in Kaffeegetränken nach (**Kap. 1.3.3**). Ebenso wie 2-Furanmethanthiol erreichte 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin die höchsten Extraktionsraten im Kaffeegetränk, das mit der Stempelkanne zubereitet wurde (**Tab. 2.26**), da hier die Expositionsdauer des Röstkaffeepulvers im heißen Wasser am längsten war. Aufgrund der Lipophilie des Pyrazins wurden jedoch ebenfalls nur geringe Extraktionsraten erreicht.

Im Gegensatz dazu führte der hydrophile Charakter von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon zu hohen Extraktionsausbeuten des Aromastoffs. Das aus dem Röstkaffee aus Costa Rica hergestellte Espressogetränk zeigte sogar eine Extraktionsrate von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon von über 100 % (**Tab. 2.27**). Schuh und Schieberle (2006) beobachteten in Teegetränken ähnlich wie für Streckeraldehyde auch für 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon Extraktionsraten von über 100 %, die sie mit der hydrolytischen Freisetzung aus einem Aromastoffvorläufer bei Wasserkontakt erklärten. Auch wenn Takeoka (1989) bei Untersuchungen mit Ananas eine niedrige Wasserdampflichkeit von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon aufgrund dessen hoher Hydrophilie feststellte, wurden in den Untersuchungen dieser Arbeit die höchsten Extraktionsraten für 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon mittels Espressozubereitung erzielt.

4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd besitzt durch die Hydroxygruppe sowie eine Carbonylfunktion ähnliche Strukturmerkmale wie 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon. Zwar wies 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd tendenziell etwas niedrigere Extraktionsraten als 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon auf, doch auch für diesen Aromastoff erzielte die Herstellung der Espressogetränke die jeweils höchsten Extraktionsraten (**Tab. 2.28**). Im Gegensatz zur Untersuchung von Teegetränken durch Schuh und Schieberle (2006) wurden jedoch für 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd keine Extraktionsraten von über 100 % festgestellt. Von den beiden phenolischen Aromastoffen 2-Methoxyphenol und 4-Ethenyl-2-methoxyphenol (**Tab. 2.28**) wurde das hydrophilere 2-Methoxyphenol bei der Kaffeegetränkezubereitung durch das heiße Wasser stärker extrahiert. Für beide Substanzen wurden bei der Stempelkannen- und Mokkagetränkzubereitung, vermutlich aufgrund der längeren Extraktionsdauer, deutlich höhere Extraktionsraten als bei der Kaffeemaschinen- und Espressogetränkzubereitung erreicht.

Die Berechnung der Extraktionsraten zeigte, dass strukturell verwandte Aromastoffe, wie beispielsweise die Streckeraldehyde 2-Methylbutanal und 3-(Methylthio)propanal, die Diketone Diacetyl und 2,3-Pentandion, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd oder die Phenole 2-Methoxyphenol und 4-Ethenyl-2-methoxyphenol, durch Anwendung verschiedener Extraktionstechniken, u. a. bedingt durch ihre Löslichkeit in Wasser oder Wasserdampf, vergleichbar stark extrahiert

werden. Die Methode der Stempelkannenzubereitung führt hierbei aufgrund der längeren Kontaktzeit zwischen Röstkaffeepulver und heißem Wasser tendenziell zu den höchsten Extraktionsraten. Auch bei Zubereitung des Mokkagetränks, bei der das Röstkaffeepulver mit dem Wasser zusammen aufgeköcht wird, ist die Extraktionsdauer länger als bei Herstellung des Filterkaffeegetränks mit der Kaffeemaschine. Das Kochen des Getränks im nicht geschlossenen System der Mokkaanne hatte jedoch auch Verluste insbesondere leicht flüchtiger Aromastoffe zur Folge, so dass hierbei zumeist geringere Extraktionsraten erzielt wurden. Bei der Zubereitung mit der Kaffeemaschine werden hingegen tendenziell geringere Mengen an Aromastoffen aus dem Röstkaffeepulver extrahiert, was vermutlich durch das sukzessive Durchtropfen des Wassers und der daraus resultierenden kürzeren Kontaktzeit bedingt ist. Bei der Herstellung der Espressogetränke erfolgt die Extraktion der Aromastoffe durch Wasserdampf, womit sich die Methode deutlich von den anderen Extraktionstechniken unterscheidet. Zudem spielen die hohe Extraktionstemperatur sowie der Druck des Wasserdampfs eine wichtige Rolle. Sehr hohe Extraktionsraten wurden bei der Espressozubereitung insbesondere für die Aromastoffe 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd beobachtet.

Bei Verwendung des gleichen Röstkaffeepulvers können somit unter Anwendung verschiedener Zubereitungsverfahren aufgrund unterschiedlicher Extraktionsraten verschiedener Aromastoffgruppen Kaffeegetränke gewonnen werden, die Unterschiede in ihren Aromastoffgehalten aufweisen und damit orthonasal signifikant unterscheidbar sind.

3.1.3 Lagerungsversuche

Bezüglich der lagerungsbedingten Konzentrationsänderungen des wichtigen Kaffeearomastoffs 2-Furanmethanthiol in Röstkaffee existieren bis dato widersprüchliche Aussagen. Tressl et al. (1979) sowie Tressl und Silwar (1981) beobachteten bei der Lagerung von intakten Röstkaffeebohnen in luftdurchlässigen Verpackungen eine Zunahme von 2-Furanmethanthiol, die sie mit der Bildung aus 2-Furancarbaldehyd während der Aufbewahrung erklärten. Dagegen nahm der Gehalt des Aromastoffs in den Untersuchungen von Czerny und Schieberle (2001) sowie

Fischer und Schieberle (2005) bei der Lagerung von gemahlenem Röstkaffee in verschiedenen Atmosphären rasch und deutlich ab (**Kap. 1.4.3**).

Die Ergebnisse des ersten in dieser Arbeit durchgeführten Lagerversuchs, bei dem intakte Röstkaffeebohnen sowie gemahlener Röstkaffee in luftdurchlässigen Packungen aufbewahrt wurden (**Kap. 2.1.3.1** und **Tab. 2.29**), zeigten eine rasche Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol in gemahlenem Röstkaffee. Nach 29 Tagen Lagerung hatte der Aromastoffgehalt bereits um mehr als 60 % abgenommen. Dem starken Rückgang innerhalb des ersten Monats folgte nur noch eine geringe Reduktion des Gehalts an 2-Furanmethanthiol während der weiteren Lagerung, so dass die Aromastoffkonzentration bei etwa 30 % des Ausgangswerts verblieb. Die teilweise festgestellten, geringfügigen „Zunahmen“ der Konzentrationen von 2-Furanmethanthiol konnten durch das Verwenden einer neuen Packung zu jedem Zeitpunkt der Quantifizierung erklärt werden. Auch Fischer und Schieberle (2005) hatten in gemahlenem Röstkaffee unter Sauerstoffeinfluss eine Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol von etwa 70 % bereits innerhalb einer Woche beobachtet. Während sich bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen die Konzentration an 2-Furanmethanthiol ab der fünften Woche der Lagerung nur noch geringfügig veränderte und eine maximale Abnahme von etwas mehr als 70 % zeigte, war laut Fischer und Schieberle (2005) der Aromastoff bereits nach vier Wochen Lagerung nicht mehr nachweisbar. Weiterhin wurde aus den Ergebnissen dieser Arbeit ersichtlich, dass intakte Röstkaffeebohnen unter Sauerstoffeinfluss eine vergleichbar rasche Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol wie gemahlener Röstkaffee erfuhren und nach 29 Tagen nur noch etwa 40 % der Anfangskonzentration aufwiesen. Anschließend verringerte sich die Konzentration an 2-Furanmethanthiol nur noch geringfügig. Radtke et al. (1963, 1996 a, 1996 b) sowie Vitzthum und Werkhoff (1979) hatten für die Aufbewahrung von Röstkaffee in luftdurchlässigen Packungen eine deutlich schnellere Abnahme flüchtiger Verbindungen in Röstkaffeepulver im Vergleich zu intakten Röstkaffeebohnen beschrieben. Für den Gehalt an 2-Furanmethanthiol konnte dies in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Für den zweiten in dieser Arbeit durchgeführten Lagerungsversuch (**Kap. 2.1.3.1** und **Tab. 2.30**) wurde die Entwicklung des Gehalts an 2-Furanmethanthiol in intakten Röstkaffeebohnen und gemahlenem Röstkaffee unter Stickstoffatmosphäre sowie in

Vakuumverpackungen bewertet. Sowohl die Lagerung intakter Röstkaffeebohnen als auch der gemahlene Röstkaffees zeigte unter Stickstoffatmosphäre wie auch in den Vakuumverpackungen eine vergleichbare Abnahme der Konzentration an 2-Furanmethanthiol, was die Erkenntnisse des ersten Lagerversuchs unterstrich. Zudem wurde ersichtlich, dass die prozentuale Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol in den vakuumverpackten Röstkaffees mit maximal 37 % geringer ausfiel als in den Röstkaffees, die unter Stickstoffatmosphäre gelagert wurden (Abnahme 49 %). Bei beiden Lagerungen wiesen die nach 64 Tagen bestimmten Konzentrationen an 2-Furanmethanthiol jedoch ähnliche Werte auf. Die geringere prozentuale Abnahme in den Vakuumverpackungen könnte somit auch mit den darin vorliegenden niedrigeren Anfangsgehalten erklärt werden. Im Vergleich zu den in luftdurchlässigen Verpackungen gelagerten Röstkaffees des ersten Lagerversuchs fiel die Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol prozentual zwar geringer aus, allerdings müssen hierbei auch der niedrigere Anfangsgehalt im zweiten Lagerversuch und insbesondere die bereits im Handel vorangegangene Lagerzeit in Betracht gezogen werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bestätigen somit nicht die Aussage von Vitzthum und Werkhoff (1979), die innerhalb von sieben Monaten keine signifikante Abnahme von flüchtigen Verbindungen in Röstkaffees, die vakuumverpackt sowohl in Form intakter Bohnen als auch gemahlen gelagert wurden, feststellen konnten, wenngleich eine gesonderte Betrachtung von 2-Furanmethanthiol durch die Autoren nicht durchgeführt wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit standen dagegen in Einklang mit den Untersuchungen von Czerny und Schieberle (2001), die in unter Stickstoffatmosphäre verpacktem, gemahlenem Röstkaffee ebenfalls eine rasche Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol feststellten. Laut Fischer und Schieberle (2005) war selbst unter Argonatmosphäre nach einer vierwöchigen Lagerung von gemahlenem Röstkaffee kein 2-Furanmethanthiol mehr im Röstkaffee nachweisbar.

Eine mehrwöchige Lagerung von gerösteten Kaffees, entweder als intakte Röstkaffeebohnen oder als Röstkaffeepulver, in Vakuumverpackungen, unter Schutzgas oder in haushaltsüblichen Beuteln, ist somit im Hinblick auf den Erhalt der maximalen Aromaqualität nicht zweckmäßig. Dabei hatten weder modifizierte Atmosphären noch die Lagerung in Form intakter Röstkaffeebohnen eine positive

Auswirkung auf die Stabilität des Thiols 2-Furanmethanthiol. Weiterhin lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass der Kontakt mit Luftsauerstoff vermutlich keine entscheidende Rolle beim Abbau von 2-Furanmethanthiol spielt.

Durch Rekombination von Rohkaffees mit bzw. ohne Zugabe von Antioxidationsmitteln (**Kap. 2.1.3.3** und **Tab. 2.32**) und anschließende Röstung und Lagerung der intakten Röstkaffeebohnen in sauerstoffdurchlässigen Verpackungen konnte gezeigt werden, dass die Antioxidantien Butylhydroxyanisol bzw. Octylgallat keinen signifikanten, stabilisierenden Einfluss auf die Konzentration an 2-Furanmethanthiol in den Röstkaffeebohnen hatten. Dieser Befund sprach gegen einen radikalischen Abbau von 2-Furanmethanthiol, wie er von Blank et al. (2002) in Kaffeegetränken gemäß einer Fenton-Reaktion postuliert worden war. Vielmehr führten diese und die Ergebnisse der vorangegangenen Lagerversuche zu der Vermutung, dass 2-Furanmethanthiol im Röstkaffee analog zu Kaffeegetränken (Hofmann et al., 2001; Hofmann und Schieberle, 2002) durch makromolekulare Bestandteile des Röstkaffees gebunden werden könnte. Die Tatsache, dass die Konzentration an 2-Furanmethanthiol ab einem bestimmten Niveau nicht weiter absinkt, könnte außerdem für eine gewisse Sättigung der möglichen Bindungsstellen in den Makromolekülen sprechen.

Um Aussagen über die Ursachen des Verlusts an 2-Furanmethanthiol treffen zu können, wurde außerdem der Einfluss der umgebenden Matrix auf die Stabilität des Aromastoffs untersucht (**Kap. 2.1.3.2** und **Tab. 2.31**). Dazu wurden Röstkaffeebohnen (Referenzkaffee) sowie geröstete, extrahierte Kaffeebohnen (**Kap. 2.2.1.1**) unter Stickstoffatmosphäre gelagert. Den gerösteten, extrahierten Kaffeebohnen fehlten dabei weitgehend auch die Substanzen, die während der Röstung aus den wasserlöslichen Inhaltsstoffen des Rohkaffees gebildet wurden. In den extrahierten Kaffeebohnen wurde bei der Röstung etwa die dreifache Menge an 2-Furanmethanthiol gebildet wie in den Referenzkaffeebohnen. Die prozentuale Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol innerhalb von vier Wochen fiel zwar in den gerösteten, extrahierten Kaffeebohnen geringer aus als in den Referenzkaffeebohnen; der absolute Verlust an 2-Furanmethanthiol war aber in den gerösteten, extrahierten Kaffeebohnen aufgrund des höheren Anfangsgehalts deutlich größer. Dies lässt darauf schließen, dass in beiden Matrices Reaktionen, die einen Verlust an freiem 2-Furanmethanthiol zur Folge haben, in einem ähnlichen Umfang ablaufen. Somit kann vermutet werden, dass

insbesondere Substanzen, die aus nicht-wasserlöslichen Rohkaffeeinhaltsstoffen gebildet werden, am Abbau von 2-Furanmethanthiol beteiligt sind.

3.2 Bildung des Aromastoffs 2-Furanmethanthiol

In zahlreichen Studien wurden bereits anhand von Modellreaktionen Möglichkeiten zur Entstehung der schweflig, röstig und nach Kaffee riechenden Substanz 2-Furanmethanthiol, einem der wichtigsten Röstkaffeearomastoffe, dargestellt (**Kap. 1.5.2**). Dennoch ist die Bildung des Aromastoffs in komplexen Lebensmittelmatrices wie der Kaffeebohne noch unklar. In dieser Arbeit wurde die Entstehung von 2-Furanmethanthiol in Kaffee und Kaffeefraktionen sowie dem ebenfalls 2-Furanmethanthiol-bildenden Senfsamen und dessen Fraktionen untersucht und eine Lokalisierung der Vorläufersubstanzen angestrebt (**Kap. 2.2**).

3.2.1 Untersuchungen an Rohkaffee

Um den Zusammenhang zwischen den Röstbedingungen und der Generierung von 2-Furanmethanthiol bei der Röstung von Rohkaffee zu untersuchen, wurden Rohkaffeebohnen unterschiedlich lange, in Form intakter Bohnen oder gemahlen, sowie mittels verschiedener Methoden geröstet. Bei der Röstung intakter Kaffeebohnen im Kaffeeröster stieg die Konzentration an 2-Furanmethanthiol mit zunehmender Röstdauer signifikant an (**Kap. 2.2.1.1** und **Tab. 2.33**), während die Farbe des Röstkaffees stetig dunkler wurde, bis zuletzt eine Verkohlung der Bohnen eintrat. So betragen die Konzentrationsunterschiede von 2-Furanmethanthiol zwischen dem für sechs und dem für sieben Minuten gerösteten Röstkaffee etwa 1100 µg/kg sowie zwischen dem für sieben und dem für acht Minuten gerösteten Röstkaffee etwa 700 µg/kg. Dies bestätigte die Erkenntnisse von Mayer et al. (1999), die ebenfalls einen stetigen Anstieg der Konzentration von 2-Furanmethanthiol bei zunehmendem Röstgrad und dunklerer Farbe der Bohnen festgestellt hatten. Die Konzentrationsunterschiede von 2-Furanmethanthiol, die durch Variationen im Röstgrad hervorgerufen wurden, waren dabei von größerem Ausmaß als die Unterschiede, die unterschiedliche Nacherntebehandlungen von Rohkaffees zur Folge hatten (**Kap. 3.1.1**).

Um die Vorläuferverbindung von 2-Furanmethanthiol lokalisieren zu können, wurde Rohkaffee zunächst fraktioniert. Da hierfür ein Mahlen des Rohkaffees notwendig war, wurde nach einer effektiven, alternativen Röstmethode für Rohkaffee gesucht, da eine Röstung gemahlener Proben im Kaffeeröster nicht möglich war. Bei der Röstung

intakter Rohkaffeebohnen im Röstofen wurde jedoch trotz der sehr langen Röstdauer von 60 Minuten signifikant weniger 2-Furanmethanthiol gebildet als bei der Röstung im Kaffeeröster (**Tab. 2.35**). Eine Erklärung hierfür könnte eine weniger effektive Wärmeübertragung im Röstofen im Vergleich zum Kaffeeröster sein. Bei der Röstung von gemahlenem Rohkaffee im Röstofen wurde darüber hinaus nochmals weniger 2-Furanmethanthiol gebildet. Als Ursache hierfür kam ein Abbau von Vorläufern von 2-Furanmethanthiol beim Zerkleinern von Rohkaffee, z.B. durch Enzyme in Frage (**Kap. 2.2.1.1**). Um eine mögliche Enzymaktivität zu inhibieren, wurden die intakten Rohkaffeebohnen daher vor dem Mahlen mit Wasserdampf behandelt (Dämpfen). Doch auch das Dämpfen des Rohkaffees hatte keine erhöhte Bildung an 2-Furanmethanthiol beim Erhitzen des gemahlene Rohkaffees zur Folge (**Tab. 2.35**), so dass die geringen Gehalte des Aromastoffs wohl nicht auf einen enzymatischen Abbau seiner Präkursoren zurückzuführen waren. Beim Rösten intakter Kaffeebohnen entsteht durch verdampfendes Wasser und freigesetzte Gase ein gewisser Druck, der gegen Ende der Röstung zu einem Aufplatzen der gerösteten Kaffeebohnen führt. Da intakte Rohkaffeebohnen beim Rösten im Röstofen ungleich mehr 2-Furanmethanthiol bilden als gemahlener Rohkaffee, könnte zur Entstehung von 2-Furanmethanthiol beim Rösten von Kaffee ein bestimmter Druck notwendig sein, der sich beim Rösten von Rohkaffeepulver jedoch nicht aufbauen kann. Um eine bessere Wärmeübertragung zu gewährleisten und einen Druckaufbau während der Röstung zu ermöglichen, wurden gemahlene Rohkaffees anschließend in verschlossenen Sovirelgläsern in Sonnenblumenöl erhitzt. Die dabei entstandenen Mengen an 2-Furanmethanthiol (**Tab. 2.35**) belegten, dass es sich hierbei um eine geeignete Methode zur Röstung von gemahlenem Rohkaffee handelte, sofern die Röstung ausreichend lang durchgeführt wurde. Intakte Rohkaffeebohnen dagegen wurden weiterhin im Kaffeeröster und nicht in Sonnenblumenöl geröstet, da sie zur Extraktion der flüchtigen Verbindungen nach der Röstung gemahlen werden mussten und dies nach einer Röstung in Sonnenblumenöl nicht möglich war.

Für eine Lokalisierung der Vorläuferverbindungen von 2-Furanmethanthiol wurden Rohkaffeebohnen zunächst mit Wasser extrahiert und die dabei gewonnenen Fraktionen (Rohkaffeeextrakt und extrahierte Rohkaffeebohnen, **Kap. 2.2**) sowie auch die nicht-extrahierten Rohkaffeebohnen der gleichen Charge geröstet, um anhand der gebildeten Mengen an 2-Furanmethanthiol eine erste Lokalisierung der

2-Furanmethanthiol-bildenden Vorläufersubstanzen vornehmen zu können. Die Abwesenheit der wasserlöslichen Rohkaffeesubstanzen bei der Röstung der extrahierten Rohkaffeebohnen im Kaffeeröster führte dennoch zu einem vergleichbaren Gehalt an 2-Furanmethanthiol wie bei der Röstung nicht-extrahierter Kaffeebohnen (**Tab. 2.34**). Bei der Röstung des Rohkaffeeextrakts in Sonnenblumenöl dagegen konnte kein 2-Furanmethanthiol nachgewiesen werden. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass die Vorläufersubstanzen von 2-Furanmethanthiol in Rohkaffeebohnen offenbar in den nicht-wasserlöslichen Gerüstsubstanzen lokalisiert sind, während die wasserlöslichen Substanzen des Rohkaffeeextrakts keine entscheidende Rolle bei der Bildung des Aromastoffs spielen. Diese Vermutung steht in Einklang mit den Erkenntnissen von Milo et al. (2001), die beim Rösten extrahierter Rohkaffeebohnen sogar einen deutlich höheren Gehalt an 2-Furanmethanthiol als beim Rösten von nicht-extrahiertem Rohkaffee feststellten und deshalb den nicht-wasserlöslichen Rohkaffeebestandteilen die entscheidende Rolle bei der Bildung von 2-Furanmethanthiol zuschrieben. Auch Poisson et al. (2009) kamen durch Rekombination von Rohkaffees aus extrahierten Rohkaffeebohnen mit modifizierten Rohkaffeeextrakten (**Kap. 1.5.3**) und anschließenden Röstversuchen zum Schluss, dass 2-Furanmethanthiol aus proteingebundenem Cystein und Polysaccharideinheiten gebildet werden müsste.

Um zu überprüfen, ob 2-Furanmethanthiol in Kaffeebohnen während der Röstung aus freier D-Ribose bzw. freiem L-Cystein gemäß den Modellstudien u. a. von Parliment und Stahl (1994), Hofmann und Schieberle (1995) und Cerny und Davidek (2003) gebildet werden kann, wurden Isotopenanreicherungsversuche mit modifizierten Rohkaffeebohnen durchgeführt. Hierfür wurden extrahierte Rohkaffeebohnen und Rohkaffeeextrakt unter Zugabe der isotopenmarkierten Verbindungen [³⁴S]-L-Cystein bzw. [¹³C₅]-D-Ribose rekombiniert (**Kap. 2.2.1.4** und **Kap. 2.2.1.3**). Die dabei erhaltenen rekombinierten Rohkaffeebohnen enthielten zum einen unmarkiertes L-Cystein und unmarkierte D-Ribose und zum anderen die stabilisotopenmarkierten Analoga [³⁴S]-L-Cystein und [¹³C₅]-D-Ribose. Durch Berechnung der Stoffmengenverhältnisse dieser Verbindungen vor der Röstung sowie der Stoffmengenverhältnisse der bei der Röstung gebildeten Aromastoffmoleküle mit und ohne Markierung konnte gemäß Schieberle (2005) auf eine mögliche Beteiligung von L-Cystein und D-Ribose an der Bildung von 2-Furanmethanthiol geschlossen werden.

Hierfür wurden zunächst die Gehalte an freier D-Ribose und freiem L-Cystein in Rohkaffee, Rohkaffeeextraktionen und rekombinierten Rohkaffees bestimmt (**Tab. 2.37** und **Tab. 2.39**). Die ermittelten Gehalte machen deutlich, dass die Extraktion von Rohkaffeebohnen mit warmem Wasser insbesondere zu Verlusten an L-Cystein, aber auch an D-Ribose führte. Die Rekombination der Rohkaffeebohnen hingegen führte zu keinen weiteren Verlusten an L-Cystein, da der Gehalt der Aminosäure im rekombinierten Rohkaffee vergleichbar mit der Summe ihrer Konzentrationen im Rohkaffeeextrakt und den extrahierten Rohkaffeebohnen war. Für D-Ribose traten dagegen auch während der Rekombination des Rohkaffees Verluste auf. Für die Isotopenanreicherungsversuche wurde den Rohkaffeeextrakten schließlich [³⁴S]-L-Cystein sowie [¹³C₅]-D-Ribose zudosiert, wobei die Mengen jeweils der Summe der ermittelten Gehalte im Rohkaffeeextrakt und den extrahierten Rohkaffeebohnen entsprachen. Aufgrund der festgestellten Verluste bei den Fraktionierungs- und Rekombinationsschritten wurde das Stoffmengenverhältnis zwischen markiertem und unmarkiertem potentiellen Vorläufer jedoch erst nach der Rekombination der Rohkaffeebohnen bestimmt. In drei Ansätzen von Isotopenanreicherungsversuchen wurden entweder ausschließlich [³⁴S]-L-Cystein bzw. [¹³C₅]-D-Ribose oder aber beide stabilisotopenmarkierte Verbindungen in Rohkaffeebohnen inkorporiert und das Stoffmengenverhältnis von 2-Furanmethanthiol und den möglicherweise entstandenen stabilisotopenmarkierten 2-Furanmethanthiol-Molekülen nach der Röstung der rekombinierten Rohkaffeebohnen bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten zum einen, dass sich das Stoffmengenverhältnis von unmarkiertem zu markiertem L-Cystein nicht im Stoffmengenverhältnis von unmarkiertem zu zweifach markiertem 2-Furanmethanthiol widerspiegelte (**Tab. 2.40** und **Tab. 2.41** sowie **Abb. 2.22**), sondern deutlich mehr unmarkiertes 2-Furanmethanthiol im Röstkaffee vorlag. Dies lässt darauf schließen, dass das Schwefelatom von 2-Furanmethanthiol primär einem anderen Molekül als freiem L-Cystein entstammen muss und dass freies L-Cystein lediglich in einer untergeordneten Rolle an der Bildung von 2-Furanmethanthiol beteiligt sein könnte. Das Verhältnis der Massenspektren mit den *m/z*-Verhältnissen 115 ($[M(2\text{-Furanmethanthiol})+H]^+$) und 117 ($[M([34\text{S}]\text{-}2\text{-Furanmethanthiol})+H]^+$) entsprach darüber hinaus etwa der natürlichen Isotopenverteilung von 2-Furanmethanthiol, die zwischen den Molmassen 114 (2-Furanmethanthiol) und 116 ($[34\text{S}]\text{-}2\text{-Furanmethanthiol}$)

bei etwa 20 zu 1 liegt. Die Erkenntnis, dass freies L-Cystein in Kaffee vermutlich keine Bedeutung bei der Bildung von 2-Furanmethanthiol hat, unterstreicht wiederum die Aussagen von Parliment und Stahl (1995) sowie Poisson et al. (2009), die insbesondere eine Beteiligung von proteingebundenem L-Cystein und anderen Schwefelverbindungen an der Bildung von 2-Furanmethanthiol vermuteten.

Die Flächenverhältnisse von 2-Furanmethanthiol zu fünffach bzw. siebenfach markiertem 2-Furanmethanthiol aus dem Einbau von [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose bzw. beiden isotonenmarkierten Verbindungen in das Gerüst des Aromastoffs lagen sehr deutlich auf Seiten des unmarkierten 2-Furanmethanthiols, da die Massenspuren von fünffach bzw. siebenfach markiertem 2-Furanmethanthiol kaum detektierbar waren (**Tab. 2.38** und **Tab. 2.41** sowie **Abb. 2.12**). Daraus kann geschlossen werden, dass freie D-Ribose beim Rösten von Kaffeebohnen nicht an der Bildung von 2-Furanmethanthiol beteiligt ist. In einer Modellstudie fanden Cerny und Davidek (2003) dagegen nach dem Erhitzen einer Mischung von D-Ribose und [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose mit L-Cystein ein mit dem Stoffmengenverhältnis der Ribose-Moleküle vergleichbares Stoffmengenverhältnis von 2-Furanmethanthiol und [$^{13}\text{C}_5$]-2-Furanmethanthiol. Im Gegensatz dazu werden die Vermutungen von Parliment und Stahl (1995) sowie Poisson et al. (2009), dass die zur Bildung von 2-Furanmethanthiol benötigten Kohlenhydrate vornehmlich aus einem bereits 1969 von Thaler und Arneth beschriebenen thermischen Abbau nicht-wasserlöslicher Polysaccharide freigesetzt werden, unterstrichen. Dies steht zudem im Einklang mit der in dieser Arbeit und von Milo et al. (2001) sowie Poisson et al. (2009) festgestellten Tatsache, dass 2-Furanmethanthiol in Kaffeebohnen zum überwiegenden Teil aus dem nicht-wasserlöslichen Anteil des Rohkaffees generiert wird.

In mehreren Modellversuchen wurde weiterhin postuliert, dass 2-Furancarbaldehyd ein Intermediat des Bildungswegs von 2-Furanmethanthiol aus Ribose und Cystein sei (Parliment und Stahl, 1994; Cerny und Davidek, 2003) bzw. 2-Furanmethanthiol aus 2-Furancarbaldehyd und Schwefelwasserstoff gebildet werden könnte (Hofmann, 1995). Ebenso wäre eine Entstehung aus 2-Furanmethanol denkbar (Parliment und Stahl, 1994). Auch wenn bereits gezeigt wurde, dass 2-Furanmethanthiol beim Rösten von Kaffeebohnen nicht aus freier D-Ribose und freiem L-Cystein gebildet wird, könnten dennoch andere gemeinsame Vorläufer der drei Substanzen existieren. Zunächst sollte daher ein Vergleich der Gehalte an 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und

2-Furanmethanthiol in Rohkaffee und zwei verschiedenen lang gerösteten Kaffees einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang der Bildungswege geben. 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd lagen bereits in Rohkaffee vor und wurden somit offenbar nicht ausschließlich durch Hitzeeinwirkung gebildet. 2-Furanmethanthiol dagegen war in Rohkaffee nicht nachweisbar (**Tab. 2.36**). Durch die Röstung stieg der Gehalt der drei flüchtigen Verbindungen erwartungsgemäß signifikant an. In den gerösteten Kaffees unterschieden sich die Konzentrationen der drei Substanzen deutlich voneinander. Der signifikante Konzentrationsanstieg von 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd während der ersten fünf Minuten der Röstung (Faktor 400 bzw. 200) war in den beiden folgenden Minuten kaum mehr gegeben. In dieser späteren Phase der Röstung zeigte 2-Furanmethanthiol mit einem Zuwachs des Gehalts um den Faktor 3,7 eine mehr als doppelt so rasche Entwicklung wie 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd. Generell könnte die Tatsache, dass der Zuwachs des Gehalts an 2-Furanmethanthiol in der späteren Phase der Röstung deutlicher ausfällt als bei 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd, dafür sprechen, dass 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd zu Beginn eines gemeinsamen Reaktionswegs in großen Mengen gebildet werden und 2-Furanmethanthiol aus diesen Substanzen im weiteren Verlauf dieses Bildungswegs entsteht. Andererseits könnte 2-Furanmethanthiol aber auch über einen anderen Reaktionsweg, der erst bei höherer Temperatur initiiert wird, generiert werden. Auch Poisson et al. (2009) vermuteten aufgrund eines Isotopenanreicherungsversuchs, dass der Bildungsweg von 2-Furanmethanthiol mit 2-Furancarbaldehyd als Intermediat nur eine untergeordnete Bedeutung hat. Ob 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanthiol aus einem gemeinsamen Vorläufer generiert werden oder unterschiedliche Bildungswege aufweisen, ließ sich anhand der in dieser Untersuchung erhaltenen Daten jedoch nicht klären. Allerdings konnte anhand der Isotopenanreicherungsversuche mit [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose in dieser Arbeit überprüft werden, ob, wie von Parliment und Stahl (1994) aufgrund ihrer Modellversuche vermutet worden war, 2-Furanmethanol sowie 2-Furancarbaldehyd bei der Röstung von Kaffee jeweils aus freier D-Ribose entstehen. Da aber auch von diesen beiden Verbindungen nach der Röstung von mit [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose versetztem Rohkaffee die unmarkierten Moleküle mit einer vielfach höheren Intensität detektiert wurden als die entsprechenden markierten Moleküle (**Tab. 2.38** und **Tab. 2.41**), spielte freie D-Ribose offenbar auch für deren Bildung beim Rösten von Kaffee keine Rolle.

Die Ergebnisse der hier diskutierten Untersuchungen verdeutlichen somit einerseits, dass selbst gesicherte Erkenntnisse aus Modellversuchen mit überwiegend wasserlöslichen Reaktionspartnern oftmals nicht auf die realen Abläufe in einer Lebensmittelmatrix übertragen werden können und dass der Aromastoff 2-Furanmethanthiol in Kaffee offenbar aus nicht-wasserlöslichen Vorläufern gebildet wird. Dies wurde durch Isotopenanreicherungsversuche belegt, bei denen gezeigt werden konnte, dass freies L-Cystein und freie D-Ribose beim Rösten von Kaffee offenbar keine Rolle beim Aufbau der strukturverwandten Verbindungen 2-Furanmethanol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanthiol spielen.

3.2.2 Untersuchungen an Senfsamen

Der nicht-wasserlösliche Teil des Rohkaffees eignete sich aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung nicht für eine weitergehende Fraktionierung zur Charakterisierung von Vorläuferverbindungen von 2-Furanmethanthiol. Darüber hinaus war eine Fraktionierung des wasserlöslichen Rohkaffeeextrakts nicht sinnvoll, da dieser beim Rösten kein 2-Furanmethanthiol bildete. Deshalb wurde zunächst nach einem alternativen Lebensmittel gesucht, das beim Erhitzen hohe Mengen an 2-Furanmethanthiol bildet und dessen wasserlöslicher Anteil darüber hinaus ein höheres Potential zur Generierung von 2-Furanmethanthiol besitzt als der Rohkaffeeextrakt. Schieberle (1993) gelang dies beispielsweise bei einer Fraktionierung von Sesam, wobei die in den Sesamfraktionen gebildeten Gehalte an 2-Furanmethanthiol niedriger lagen als in Kaffee. Da auch weiße Senfsamen beim Rösten einen röstigen und schwefligen Geruch entwickeln, wurde zunächst ein Screening auf aromaaktive Verbindungen in geröstetem Senf mit Hilfe einer Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) durchgeführt. Die dabei anhand der Geruchsqualitäten und der Retentionsindices sowie teilweise auch mittels Massenspektrometrie identifizierten Aromastoffe mit hohen FD-Faktoren zeigten eine hohe Übereinstimmung mit den Schlüsselaromastoffen von Röstkaffee. Hierbei wurde vor allem ersichtlich, dass 2-Furanmethanthiol (FD-Faktor 4096) für das Aroma von geröstetem Senf eine bedeutende Rolle einnimmt (**Tab. 2.42**). Dies ließ vermuten, dass weiße Senfsamen hohe Gehalte der Vorläuferverbindungen von 2-Furanmethanthiol enthalten und folglich für deren Lokalisierung geeignet waren.

Zunächst wurde die Konzentration an 2-Furanmethanthiol in gerösteten Senfsamen in verschiedenen Röstexperimenten bestimmt. Hierbei wurden nach Lösungsmittelextraktion von intakt gerösteten Senfsamen im Röstofen mittels SIVA höhere Gehalte an 2-Furanmethanthiol als im Röstkaffee festgestellt (**Kap. 2.2.2.2** und **Tab. 2.43**). Der Gehalt des Aromastoffs erreichte dabei ein Maximum nach 30 Minuten und nahm bei einer länger andauernden Röstung wieder leicht ab. Mit 5120 µg/kg enthielten im Röstofen geröstete Senfsamen dabei deutlich mehr 2-Furanmethanthiol als im Röstofen gerösteter Kaffee (1830 µg/kg, **Tab. 2.35**). Senfsamen stellen somit aufgrund des hohen Potentials zur Bildung von 2-Furanmethanthiol ein geeignetes Lebensmittel zur Lokalisierung der Vorläuferverbindungen von 2-Furanmethanthiol dar. Für die hierzu notwendige Fraktionierung der Senfsamen wurden diese zunächst gemahlen. Die Gehalte an 2-Furanmethanthiol, die beim Rösten von gemahlene Senfsamen sowie der erhaltenen Senffractionen generiert werden, sollten anschließend mit dem Vorhandensein und der Menge an Vorläufersubstanzen von 2-Furanmethanthiol in der jeweils zur Röstung verwendeten Senffraction korreliert werden. Hierfür wurden zunächst mehrere Röstvarianten gemahlener Senfsamen auf das Potential untersucht, 2-Furanmethanthiol zu bilden (**Tab. 2.44**). So entstand beim Rösten im Röstofen signifikant weniger 2-Furanmethanthiol als beim Rösten der intakten Senfsamen. Anders als bei Rohkaffee hatte das Dämpfen intakter Senfsamen vor der Röstung hingegen die Entstehung deutlich höherer Mengen an 2-Furanmethanthiol bei der Röstung im Röstofen zur Folge. Somit scheinen beim Zerkleinern von Senfsamen, anders als in Rohkaffee, enzymatische Abläufe für einen Abbau der Vorläufersubstanzen von 2-Furanmethanthiol mitverantwortlich zu sein. Außerdem konnte die gebildete Menge an 2-Furanmethanthiol auch durch Rösten von gemahlene Senfsamen in Sonnenblumenöl im verschlossenen Sovirelglas signifikant gesteigert werden. Als Ursachen hierfür kamen, vergleichbar wie bei Kaffee, eine bessere Wärmeübertragung durch das heiße Sonnenblumenöl sowie der Druckaufbau im Sovirelglas in Frage. Somit wurde das Rösten sowohl gedämpfter und gemahlener Senfsamen als auch der Senffractionen in Sonnenblumenöl im Sovirelglas als geeignetste Methode gewählt, um das Potential dieser Proben zur Generierung von 2-Furanmethanthiol zu vergleichen.

Ziel war es, eine Senffraction möglichst wenig komplexer Zusammensetzung zu isolieren (**Kap. 2.2.2.4**), die beim Rösten hohe Mengen an 2-Furanmethanthiol bildet.

Hierfür wurden zunächst die lipophilen Bestandteile der Senfsamen extrahiert. Mittels einer der Fraktionierung intakter Rohkaffeebohnen analogen Extraktionsmethode wurden im Folgenden die wasserlöslichen Senfbestandteile mit warmem Wasser aus dem entfetteten Senfpulver gelöst. Der Anteil des Wasserextrakts (WE) lag hierbei bei 21,0 % (**Tab. 2.46**). Für eine Auftrennung der wasserlöslichen Senfinhaltsstoffe nach Molekülmasse (kleiner bzw. größer als 5000 Da) wurde die Fraktion WE einer Ultrafiltration unterzogen. Das Ergebnis hierbei verdeutlicht, dass die niedermolekulare Fraktion (< 5000 Da, WEN) mehr als 75 % des Wasserextrakts ausmachte und sich durch eine weitere Ultrafiltration mit Trennungsgrenze 1000 Da nicht weiter auftrennen ließ. Die Fraktion WEN konnte allerdings anschließend mittels Flash-Chromatographie an einer unpolaren stationären Phase anhand ihrer Polarität und Molekülgröße weiter fraktioniert werden. Die Gewichtsanteile der dabei erhaltenen Unterfraktionen (WEN U1 bis WEN U6, **Tab. 2.47**) lässt vermuten, dass etwa die Hälfte der Fraktion WEN aus relativ hydrophilen Molekülen mit geringer Molekülmasse besteht, die bereits bei einem Wasseranteil von 95 % eluiert werden (**Abb. 2.25**). Diejenigen Fraktionen, die bei steigendem Anteil des organischen Lösungsmittels Methanol eluiert wurden, enthalten vermutlich größere Moleküle, die weniger stark hydrophil sind.

Bei der anschließenden Röstung der Senfsamen und der daraus gewonnenen Fraktionen wurde festgestellt, dass der wasserlösliche Anteil von Senfsamen (WE) beim Rösten im Gegensatz zum wasserlöslichen Rohkaffeeextrakt signifikant mehr 2-Furanmethanthiol bildete als der nicht-wasserlösliche Rückstand (WR, **Kap. 2.2.2.5** und **Tab. 2.48**). Darüber hinaus hatte die Fraktion WEN ein deutlich höheres Potential zur Bildung von 2-Furanmethanthiol als der hochmolekulare Anteil der Fraktion WE (WEH). Dies konnte anhand der Gehalte an 2-Furanmethanthiol in den gerösteten, mittels Flash-Chromatographie aus der Fraktion WEN gewonnenen Senffractionen konkretisiert werden. Die Unterfraktion WEN U4, die bei einem Methanol-Anteil von etwa 35 bis 40 % eluiert wurde, bildete beim Rösten signifikant höhere Mengen an 2-Furanmethanthiol als die restlichen Unterfraktionen. Diese Fraktion wurde daher für weitere Untersuchungen herangezogen, da sie die höchsten Gehalte an Vorläuferverbindungen besitzen musste. Die Tatsache, dass 2-Furanmethanthiol von allen Senffractionen, wenn auch in sehr unterschiedlichen Mengen, beim Rösten gebildet wird, lässt zum einen vermuten, dass die Vorläuferverbindungen von 2-Furanmethanthiol in Senfsamen und Rohkaffee nicht identisch sind und zum anderen,

dass in Senf eine Vielzahl an Vorläuferverbindungen existiert, welche unterschiedliche Molekülmassen und Löslichkeiten aufweisen.

Das hohe Potential der Senffraktion WEN U4 ließ die Möglichkeit einer Beteiligung von freier D-Ribose sowie freiem L-Cystein an der Bildung von 2-Furanmethanthiol in Senfsamen gemäß dem von Hofmann (1995) postulierten Reaktionsmechanismus sowie den u. a. von Parliment und Stahl (1994), Hofmann und Schieberle (1995) sowie Cerny und Davidek (2003) aus Modellstudien gewonnenen Erkenntnissen bestehen. Um die Rolle von freiem L-Cystein näher beleuchten zu können, wurden zunächst die Gehalte der freien Aminosäure in Senf und seinen Fraktionen bestimmt. In den Fraktionen WR sowie WEH konnte freies L-Cystein erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden (**Kap. 2.2.2.6** und **Tab. 2.49**). Des Weiteren nahmen die L-Cysteingehalte in den Fraktionen WEN U2 bis WEN U5 bei der Flash-Chromatographie mit abnehmendem wässrigem Anteil am Fließmittel ab. Einen ersten Aufschluss über die Bedeutung von freiem L-Cystein für die Generierung von 2-Furanmethanthiol beim Rösten der Senffractionen ergibt eine Gegenüberstellung der Stoffmengen von freiem L-Cystein in den ungerösteten Fraktionen und von 2-Furanmethanthiol nach der Röstung (**Tab. 2.50**). Die Tatsache, dass beim Rösten von nicht-fraktioniertem Senf sowie der Fraktion WEN U4 mehr 2-Furanmethanthiol gebildet wurde als freies L-Cystein vor der Röstung zur Verfügung stand ($n(2\text{-Furanmethanthiol})$ zu $n(\text{L-Cystein}) > 1$), verdeutlicht, dass freies L-Cystein nicht als alleinige Schwefelquelle für den Aufbau von 2-Furanmethanthiol fungieren kann.

Wie von Parliment und Stahl (1995) sowie Poisson et al. (2009) bereits beschrieben wurde, kommt auch in Peptidketten gebundenes L-Cystein als Schwefelquelle für 2-Furanmethanthiol in Frage. Daraufhin wurde der Gesamtcysteingehalt, die Summe aus freiem und gebundenem L-Cystein, in Senfsamen und Senffractionen nach saurer Hydrolyse bestimmt (**Kap. 2.2.2.6** und **Tab. 2.51**). Hierbei überstieg die Menge an gebundenem L-Cystein insbesondere in den WEN-Unterfraktionen WEN U3 bis WEN U5 die des freien L-Cysteins um ein Vielfaches. Darüber hinaus wiesen auch die Fraktionen WR sowie WEH, die kein freies L-Cystein enthielten, hohe Mengen an gebundenem L-Cystein auf. Somit kommt gebundenes L-Cystein als Vorläufer für die in den gerösteten Fraktionen nachgewiesenen Mengen an 2-Furanmethanthiol in Frage.

Die Senffractionen WE und WEN wurden daraufhin aufgrund ihres hohen Potentials zur Bildung von 2-Furanmethanthiol und der Tatsache, dass die darin gebildeten Stoffmengen an 2-Furanmethanthiol jeweils geringer waren als die in den ungerösteten Fraktionen vorliegenden Stoffmengen an freiem L-Cystein (**Tab. 2.50**), für Isotopenanreicherungsversuche ausgewählt. So sollte überprüft werden, ob in diesen Fraktionen freies L-Cystein sowie freie D-Ribose an der Bildung von 2-Furanmethanthiol beteiligt sind. Nach Bestimmung der Gehalte an freier D-Ribose (**Kap. 2.2.2.7** und **Tab. 2.52**) und freiem L-Cystein in den beiden Fraktionen WE und WEN wurden entsprechende Mengen der isotopenmarkierten Verbindungen [³⁴S]-L-Cystein sowie [¹³C₅]-D-Ribose zudosiert. Durch einen Vergleich der Stoffmengenverhältnisse von unmarkiertem und markiertem L-Cystein bzw. unmarkierter und markierter D-Ribose vor der Röstung mit den Stoffmengenverhältnissen der gebildeten 2-Furanmethanthiol-Moleküle nach der Röstung wurde die Bedeutung der Substanzen an der Bildung von 2-Furanmethanthiol beurteilt. Wie auch bei den Versuchen mit Kaffee festgestellt wurde, entsprach das Verhältnis der Molmassen 114 (2-Furanmethanthiol) zu 116 ([³⁴S]-2-Furanmethanthiol) in den hier untersuchten, gerösteten Senffractionen in etwa der natürlichen Isotopenverteilung von 2-Furanmethanthiol, so dass lediglich von einer untergeordneten Beteiligung des freien L-Cysteins an der Bildung von 2-Furanmethanthiol ausgegangen werden kann. Das potentiell aus [¹³C₅]-D-Ribose entstandene fünffach markierte 2-Furanmethanthiol bzw. das aus beiden isotopenmarkierten Verbindungen gebildete siebenfach markierte 2-Furanmethanthiol konnte, im Gegensatz zum unmarkierten 2-Furanmethanthiol, in beiden gerösteten Senffractionen kaum nachgewiesen werden. Weder freie D-Ribose, noch freies L-Cystein führten somit beim Rösten der wasserlöslichen Senffractionen zur Generierung von 2-Furanmethanthiol (**Tab. 2.53**).

Abschließend sollte untersucht werden, ob Hinweise auf einen Zusammenhang der Bildungswege von 2-Furanmethanthiol, 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd beim Rösten von Senfsamen existieren. Wie Rohkaffee enthielten auch ungeröstete Senfsamen bereits geringe Mengen an 2-Furanmethanol sowie 2-Furancarbaldehyd, während 2-Furanmethanthiol nicht nachweisbar war (**Tab. 2.45**). Im Laufe der ersten zehn Minuten der Senfröstung stieg der Gehalt von 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd um den Faktor 1800 (2-Furanmethanol) bzw. 2200 (2-Furancarbaldehyd) signifikant an und fiel zudem im Vergleich mit dem

Konzentrationsanstieg während der ersten fünf Minuten der Kaffeeröstung (**Kap. 2.2.1.2** und **Tab. 2.36**) deutlicher aus. Vergleichbar mit den Vorgängen beim Rösten von Kaffee war die Tatsache, dass der Gehalt an 2-Furanmethanthiol während der zweiten Röstphase des Senfs signifikant stärker anstieg (Faktor 18) als die Gehalte von 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd (Faktor 5,2 bzw. 5,3). Hieraus ließ sich wie bei Kaffee ableiten, dass 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd in deutlich höheren Mengen und bei niedrigerer Temperatur als 2-Furanmethanthiol gebildet werden und 2-Furanmethanthiol entweder in einem späteren Schritt desselben Reaktionswegs oder über einen anderen Bildungsweg entsteht. Des Weiteren wurde bei den Isotopenanreicherungsversuchen mit [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose auch das Verhältnis der entstandenen 2-Furanmethanol- sowie 2-Furancarbaldehyd-Moleküle bestimmt. Hierbei wurde weder ein Einbau von ^{13}C -Atomen in 2-Furanmethanol noch in 2-Furancarbaldehyd gefunden (**Tab. 2.54**). Somit werden offenbar auch beim Rösten wasserlöslicher Senffractionen 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd nicht aus freier D-Ribose gebildet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Fraktionierung von Senfsamen mehrere Fraktionen isoliert werden konnten, die beim Rösten 2-Furanmethanthiol bildeten. Die Fraktionen unterschieden sich jedoch in ihrem Potential, den Aromastoff beim Erhitzen freizusetzen, signifikant. Daher kann vermutet werden, dass sie unterschiedliche Mengen an Präkursoren für 2-Furanmethanthiol enthalten, wobei es sich um eine Vielzahl von verschiedenen Molekülen, wie beispielsweise cysteinhaltigen Peptiden oder pentosehaltigen Polysacchariden, handelt. Weiterhin konnte die Beteiligung von freiem L-Cystein sowie freier D-Ribose an der Bildung von 2-Furanmethanthiol, 2-Furanmethanol und 2-Furancarbaldehyd beim Rösten von Senffractionen ausgeschlossen werden. Eine eingehendere Untersuchung der Senffractionen, die beim Rösten hohe Mengen an 2-Furanmethanthiol bilden, könnte zu einer Isolierung und Charakterisierung sowie zur Synthese von Vorläuferverbindungen von 2-Furanmethanthiol führen und weitere Studien zur Freisetzung des Aromastoffs ermöglichen.

4 Zusammenfassung

Das einzigartige Aroma von Röstkaffee sowie der daraus hergestellten Kaffeegetränken ist vom Anbau der Kaffeepflanze über die Verarbeitung und Behandlung von Roh- und Röstkaffee bis hin zur Zubereitung der Kaffeegetränke verschiedenen Einflüssen unterworfen.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Auswirkungen unterschiedlicher Trocknungstechnologien des Rohkaffees auf die qualitative und quantitative Aromastoffzusammensetzung der daraus gewonnen Röstkaffees und Kaffeegetränke zu untersuchen. Hierfür wurde ein nass aufbereiteter Arabicakaffee aus Costa Rica industriell sowohl in der Sonne als auch in Guardiola-Trocknern sowie im Labormaßstab maschinell unter Anwendung verschiedener Temperaturprogramme getrocknet. Die hierbei erhaltenen Rohkaffees wurden unter Einhaltung konstanter Bedingungen geröstet und anschließend gemahlen. Mittels Dreiecksprüfungen auf orthonasale Unterscheidbarkeit wurden in ihrem Aromaprofil voneinander abweichende Röstkaffeepulver identifiziert und für weitere Analysen mit den Methoden der Molekularen Sensorik herangezogen. Ebenso wurde anhand von aus diesen Röstkaffeepulvern hergestellten Kaffeegetränken verfahren. Mittels vergleichender Verdünnungsanalysen sowie quantitativer Bestimmungen ausgewählter Röstkaffeearomastoffe wurde festgestellt, dass die orthonasale Unterscheidbarkeit der Röstkaffees und Kaffeegetränke nicht auf qualitative Unterschiede in der Aromastoffzusammensetzung zurückzuführen war. Die verschiedenen Trocknungsmethoden hatten zwar geringfügig unterschiedliche Aromastoffgehalte in den resultierenden Röstkaffees zur Folge; eine eindeutige Tendenz war aber aufgrund von Ergebnissen der Untersuchungen mehrerer Chargen nicht erkennbar. Ein Vergleich mit den Auswirkungen unterschiedlicher Röstbedingungen sowie mit den bei der Röstung auftretenden Schwankungen zwischen einzelnen Bohnen einer Röstkaffeeprobe ließ die Schlussfolgerung zu, dass die festgestellten quantitativen Unterschiede zwischen den Röstkaffees aus verschieden getrockneten Rohkaffees vielmehr durch Schwankungen im Röstgrad als durch unterschiedliche Trocknungsverfahren hervorgerufen wurden.

Inwiefern unterschiedliche Zubereitungsverfahren die Aromastoffgehalte von Kaffeegetränken beeinflussen, die mit der jeweils gleichen Menge an Wasser und aus der gleichen Menge des gleichen Röstkaffeepulvers hergestellt wurden, wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurden aus drei sortenreinen Röstkaffeepulvern jeweils vier Kaffeegetränke mittels Kaffeemaschine, Stempelkanne, Espresso- und Mokkatopf zubereitet und auf ihre sensorische Unterscheidbarkeit getestet. Da eine signifikante orthonasale Unterscheidbarkeit zwischen den Getränken festgestellt werden konnte, wurden daraufhin die Extraktionsraten von jeweils zehn wichtigen Aromastoffen unterschiedlicher Stoffgruppen ermittelt. Die jeweils höchsten Extraktionsraten wurden für Streckeraldehyde, Diketone, 2-Furanmethanthiol, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, 2-Methoxyphenol sowie 4-Ethenyl-2-methoxyphenol bei Zubereitung mit der Stempelkanne bzw. für die beiden letztgenannten phenolischen Aromastoffe auch im Mokkagetränk, für 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon sowie 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd dagegen im Espressogetränk erhalten. Die Unterschiede korrelierten dabei mit der jeweiligen Löslichkeit der Aromastoffe in Wasser oder Wasserdampf und waren außerdem auf die unterschiedlich langen Kontaktzeiten des Röstkaffeepulvers mit dem Extraktionsmittel sowie vermutlich auf die Freisetzung von Aromastoffen aus Vorläufern bei Wasserkontakt zurückzuführen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die orthonasale Unterscheidbarkeit der Kaffeegetränke im Wesentlichen durch deutlich unterschiedliche Extraktionsraten wichtiger Aromastoffe hervorgerufen wurde.

Zur Benennung möglicher Faktoren, die die Stabilität des Schlüsselaromastoffs 2-Furanmethanthiol in Röstkaffees beeinflussen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Lagerversuche mit Röstkaffees durchgeführt. Dabei wurde zum einen ersichtlich, dass der Gehalt an 2-Furanmethanthiol in frisch gerösteten Kaffees bei Aufbewahrung in sauerstoffdurchlässigen Verpackungen innerhalb der ersten vier Wochen um etwa 60 % abnahmen, während bei der weiteren Lagerung keine nennenswerten Verluste mehr auftraten. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch der Ausschluss von Luftsauerstoff keinen stabilisierenden Effekt auf den Gehalt an 2-Furanmethanthiol hatte, da die Verluste bei Lagerung von Röstkaffee in Vakuumverpackungen oder unter Stickstoffatmosphäre in einem vergleichbaren Bereich lagen. Zwischen intakten Röstkaffeebohnen und gemahlenem Röstkaffee konnten generell keine signifikanten Unterschiede in der Stabilität von 2-Furanmethanthiol bei der Lagerung festgestellt

werden. Sowohl in extrahierten, gerösteten Kaffeebohnen als auch nach Inkorporierung von Antioxidationsmitteln in die Kaffeebohnen vor der Röstung konnte die lagerungsbedingte Abnahme des Gehalts an 2-Furanmethanthiol nicht signifikant verlangsamt werden. Dies wiederum ließ die Schlussfolgerung zu, dass für den Verlust an 2-Furanmethanthiol weder ein radikalischer Mechanismus noch wasserlösliche Kaffeebestandteile verantwortlich sein können.

Um den Bildungsweg von 2-Furanmethanthiol und die Rolle seiner potentiellen Vorläuferverbindungen bzw. der Reaktionsintermediate L-Cystein, D-Ribose, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanol näher zu untersuchen, wurden Rohkaffeebohnen einer Wasserextraktion unterzogen. Bei der Röstung der dabei erhaltenen, extrahierten Rohkaffeebohnen konnte zunächst festgestellt werden, dass die Abwesenheit wasserlöslicher Rohkaffeesubstanzen keine Auswirkung auf die bei der Röstung gebildete Menge an 2-Furanmethanthiol hatte. Des Weiteren konnte durch Röstung des Extrakts keine nennenswerte Menge an 2-Furanmethanthiol generiert werden. Diese Ergebnisse ließen eine überwiegende Beteiligung nicht-wasserlöslicher Substanzen an der Bildung von 2-Furanmethanthiol in der Kaffeematrix vermuten, was eine weitere Charakterisierung der Vorläufersubstanzen von 2-Furanmethanthiol deutlich erschwerte. Durch die Extraktion der Rohkaffeebohnen war es außerdem möglich, die Zusammensetzung des Rohkaffeeextrakts zu modifizieren und anschließend wieder in die extrahierten Rohkaffeebohnen einzubringen. Mittels Inkorporierung der stabilisotopenmarkierten Substanzen [³⁴S]-L-Cystein, dessen Synthese aus ³⁴S gelang, sowie [¹³C₅]-D-Ribose in extrahierte Rohkaffeebohnen und deren anschließende Röstung konnte gezeigt werden, dass die freie Aminosäure L-Cystein sowie freie D-Ribose keine Rolle für die Bildung von 2-Furanmethanthiol bei der Röstung von Kaffee spielen. Außerdem wurde ersichtlich, dass 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanol ebenfalls nicht aus freier D-Ribose generiert werden. Ob 2-Furanmethanthiol, 2-Furancarbaldehyd und 2-Furanmethanol gemeinsame Vorläuferverbindungen besitzen, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht geklärt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine möglichst wenig komplex zusammengesetzte Lebensmittelfraktion zu isolieren, die beim Rösten hohe Mengen an 2-Furanmethanthiol generiert. Da dies bei Rohkaffee aufgrund der Komplexität des

nicht-wasserlöslichen Anteils nicht möglich war, wurden weiße Senfsamen, die beim Rösten ebenfalls 2-Furanmethanthiol bilden, zur Fraktionierung herangezogen. Dabei wurde das entfettete Senfmehl zunächst mit Wasser extrahiert. Im Gegensatz zu Rohkaffee bildete der wasserlösliche Anteil der Senfsamen beim Rösten deutlich mehr 2-Furanmethanthiol als der nicht-wasserlösliche Rückstand. Aufgrund dessen erfolgte die weitere Fraktionierung des Wasserextrakts zunächst nach Molekülgröße mittels Ultrafiltration. Der dabei erhaltene niedermolekulare Anteil des Wasserextrakts konnte anschließend über Flash-Chromatographie weiter aufgetrennt werden. Eine der dabei erhaltenen Unterfraktionen wies bei der Röstung der Fraktionen ein sehr hohes Potential zur Bildung von 2-Furanmethanthiol auf. Ein Vergleich der Stoffmengen von in dieser Fraktion vor der Röstung vorliegendem freiem L-Cystein und während der Röstung gebildetem 2-Furanmethanthiol verdeutlichte hierbei, dass freies L-Cystein nicht die alleinige Schwefelquelle für 2-Furanmethanthiol darstellen kann. Eine nähere Charakterisierung der in dieser Fraktion enthaltenen, 2-Furanmethanthiol-bildenden Substanzen war bis dato jedoch noch nicht möglich. Anhand von Isotopenanreicherungsversuchen unter Zugabe von [^{34}S]-L-Cystein und [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose zum Wasserextrakt sowie dem niedermolekularen Anteil des Wasserextrakts konnte jedoch eindeutig bestätigt werden, dass freies L-Cystein sowie freie D-Ribose in diesen Fraktionen nicht an der Bildung von 2-Furanmethanthiol beteiligt sind. Auch die Generierung von 2-Furancarbaldehyd sowie 2-Furanmethanol aus freier D-Ribose bei Erhitzung dieser beiden Senffraktionen konnte ausgeschlossen werden.

Somit ist es wahrscheinlich, dass höhermolekulare Vorläuferverbindungen, z.B. peptidgebundenes Cystein und pentosehaltige Saccharide, an der Entstehung von 2-Furanmethanthiol beim Rösten von Senf sowie von Kaffee beteiligt sind. Die Kenntnis dieser Präkursoren könnte ihre Isolierung oder Synthese ermöglichen und letztlich zu Freisetzungsversuchen sowie einer Aufklärung des Bildungswegs von 2-Furanmethanthiol in Lebensmittelmatrices führen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Untersuchungsmaterial

5.1.1 Rohkaffee

Der für die Untersuchungen zur Trocknungstechnologie herangezogene Arabica-Rohkaffee stammte vom Beneficio Palmichal in der Hochlandregion Tarrazu in Costa Rica. Die Ernte erfolgte in den Jahren 2007 und 2008. In Costa Rica wurden die entpulpten Kaffeekirschen zunächst mechanisch entschleimt und anschließend in Kaskadentrocknern („Oreadoras de Cascada“) mit etwa 60 °C warmer Luft vorgetrocknet (Oberflächentrocknung).

Die Haupttrocknung erfolgte anschließend in Trommeltrocknern („Guardiolas“) bei einer Temperatur von 50 °C bis zu einer Restfeuchte von 10 bis 12 % und dauerte 36 Stunden (Referenztrocknung). Der Endpunkt der Trocknung wurde anhand von Erfahrungswerten der sensorischen Parameter, wie beispielsweise Farbe und Härte der Bohnen, festgelegt. Nach dieser Trocknung wiesen die Bohnen eine grünliche Färbung auf.

Stufentrocknung:

Die kontinuierliche Trocknung des Rohkaffees in den Guardiolas mit abnehmender Temperatur wurde mit 60 °C für sieben Stunden begonnen, anschließend für 12 Stunden bei 50 °C fortgeführt und letztlich bei 40 °C für 21 Stunden beschlossen. Die Gesamttrocknungsdauer bis zu einem Restfeuchtegehalt von 10 bis 12 % betrug 40 Stunden.

Sonnentrocknung:

Die entpulpten Kaffeebohnen wurden auf einer Folie in der Sonne ausgebreitet und tagsüber in regelmäßigen Abständen gewendet. Nachts sowie bei schlechter Witterung wurden die Bohnen mit einer Folie zum Schutz vor Feuchtigkeit abgedeckt. Die Dauer der Trocknung betrug etwa sechs Tage. Die sonnengetrockneten Bohnen wiesen in der Regel eine bräunliche Farbe auf.

Trocknung mit simulierter „Tag-Nacht-Rhythmik“:

Nach jeweils sechs Stunden Trocknung des Rohkaffees in den Guardiola-Trocknern bei 40 °C oder 50 °C wurden diese zur Simulation der Nachtphase, die bei einer Sontentrocknung auftritt, für 12 Stunden abgeschaltet. Die Gesamttrocknungsdauer betrug dabei bis zu 71 Stunden und der Restfeuchtegehalt jeweils 10 bis 12 %.

In Costa Rica frisch entpulperte Rohkaffeebohnen wurden darüber hinaus in geruchsneutralen PET-Behältern per Luftfracht nach Hamburg transportiert. An der Technischen Universität Hamburg-Harburg wurden sie in eigens gefertigten Guardiola-Nachbauten im Labormaßstab auf jeweils 11 Prozent Restfeuchte getrocknet. Hierbei wurden ebenfalls verschiedene Trocknungsmethoden angewandt.

Die kontinuierlichen Trocknungen wurden bei 30 °C, 40 °C oder 50 °C durchgeführt, wobei die Trocknungsdauer zwischen 26 und 58 Stunden variierte. Die kontinuierliche Trocknung bei 50 °C stellte auch in Hamburg die Referenzdrocknung dar. Die kontinuierliche Trocknung mit abnehmender Temperatur (Stufentrocknung) wurde analog der Stufentrocknung in Costa Rica bei 60 °C für sieben Stunden begonnen, anschließend für 12 Stunden bei 50 °C fortgesetzt und nach 21 Stunden Trocknung bei 40 °C beendet. Die die Tag-Nacht-Rhythmik simulierenden Trocknungen wurden ebenfalls bei 30 °C, 40 °C oder 50 °C durchgeführt und beinhalteten nach einer Trocknungsphase von 10 Stunden (Tagphase) eine Ruhephasen von jeweils 14 Stunden (Nachtphase). Die Bohnen mussten dabei zum Erreichen der Restfeuchte von 11 % zwischen 58 und 82 Stunden getrocknet werden.

Die für die Vorläuferstudien verwendeten Rohkaffeeproben (Referenzkaffee, extrahierte Rohkaffeebohnen und Rohkaffeeextrakt) wurden vom Nestlé Product Technology Centre (Orbe, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Arabica-Rohkaffee aus Kolumbien (**Kap. 5.1.6**).

5.1.2 Röstkaffee

Für die Dreiecksprüfungen auf Unterscheidbarkeit sowie die quantitativen Untersuchungen der Kaffeetränke wurden drei sortenreine, gemahlene Röstkaffees

von der Kaffeerösterei Supremo (Unterhaching) bezogen. Die Kaffees stammten aus Costa Rica (Amapola), Kenia (Top Massai) und Papua Neuguinea (Plantation Sigri A).

Für die Lagerversuche wurden einerseits frisch geröstete Kaffees bei der Kaffeerösterei Dallmayr (München) gemahlen oder in Form intakter Röstkaffeebohnen gekauft. Weiterhin wurden aus dem Einzelhandel gemahlener Röstkaffee in 250 g-Packungen und Röstkaffeebohnen in 500 g-Packungen der Marke Dallmayr prodomo, Dallmayr KG (München) erworben.

5.1.3 Kaffeegetränke

Die Kaffeegetränke wurden aus den oben genannten gekauften Röstkaffees oder den selbst gerösteten Kaffees zubereitet. Hierzu wurden stets 5,4 g gemahlener Röstkaffee pro 110 ml eingesetztes Wasser (Volumen vor dem Kochen) herangezogen.

Kaffeemaschine:

In einen Kaffeefilter (Melitta 1x4, Melitta, Bremen) wurde Röstkaffeepulver eingewogen und der Filter in einen Kaffeeautomaten (ProAroma, Krups, Offenbach) eingesetzt. Mit dem entsprechenden Volumen an Wasser wurde anschließend das Getränk zubereitet. Aus 440 ml eingesetztem Wasser wurden durchschnittlich 379 ml Getränk erhalten.

Stempelkanne:

In eine Stempelkanne (WMF Coffee Press ZENO Cromargan®, WMF, Geislingen) wurde Röstkaffeepulver eingewogen, mit der entsprechenden Menge kochendem Wasser übergossen und die Suspension wurde für fünf Minuten ziehen gelassen. Anschließend wurde mit dem Stempel das Kaffeepulver nach unten abgepresst und das überstehende Getränk abgegossen. Aus 440 ml eingesetztem Wasser wurden durchschnittlich 361 ml Getränk erhalten.

Espresso:

In das Pulverextraktionsbehältnis eines Espressotopfs (WMF Espressomaschine CONCEPT Cromargan®, WMF, Geislingen) wurde Röstkaffeepulver eingewogen. Die entsprechende Menge an Wasser wurde in den unteren Teil des Topfs gegeben, das Extraktionsbehältnis wurde eingesetzt und der obere Teil des Topfs aufgeschraubt. Auf

einer Kochplatte wurde der Topf anschließend so lange erhitzt, bis kein Dampf mehr aus dem oberen Teil des Topfs entwich. Anschließend konnte das Getränk ausgegossen werden. Aus 440 ml eingesetztem Wasser wurden durchschnittlich 330 ml Getränk erhalten.

Mokka:

In eine Mokkakanne (KEYIF, Buquet Versand, Barsbüttel) wurde Röstkaffeepulver eingewogen und mit der entsprechenden Menge an Wasser übergossen. Diese Suspension wurde auf der Heizplatte erhitzt und zwei Minuten gekocht. Anschließend wurde das Getränk abdekantiert. Aus 440 ml eingesetztem Wasser wurden durchschnittlich 340 ml Getränk erhalten.

Unmittelbar nach Zubereitung der Kaffeegetränke wurden diese mit Hilfe eines Eisbads unter Rühren auf 30 °C abgekühlt. Außerdem wurde die Masse des jeweils erhaltenen Kaffeegetränks bestimmt.

5.1.4 Senf

Weißer Senfsamen der Firma Flügge-Diät GmbH & Co. KG (Bruckmühl) wurden im Einzelhandel in 500 g-Säckchen gekauft.

5.1.5 Dämpfen von Rohkaffee und Senf

In einem 2,5-Liter-Schnellkochtopf (Fissler, Idar-Oberstein) wurden 600 ml Wasser gegeben. Das Probenmaterial wurde in ein Teesieb gefüllt, das so auf einem Topfeinsatz befestigt wurde, dass die Probe nicht mit dem Wasser in Berührung kam. Der Topf wurde auf einer Kochplatte auf höchster Stufe erhitzt und dort für 10 Minuten belassen, sobald die Druckanzeige des Topfs die zweite Stufe erreicht hatte. Rohkaffee und Senfsamen wurden in Portionen zu je 25 g gedämpft.

5.1.6 Fraktionierung von Rohkaffee und Senfsamen

Rohkaffee:

Arabica-Rohkaffee aus Kolumbien wurde vom Nestlé Product Technology Centre (Orbe, Schweiz) fraktioniert. Die intakten Rohkaffeebohnen wurden hierzu mit demineralisiertem Wasser bei 80 °C für vier Stunden gerührt. Anschließend wurden sowohl die Extraktionslösung, als auch die extrahierten Rohkaffeebohnen eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gewichtsanteil des gewonnenen Rohkaffeeextrakts betrug dabei 17,0 % des Rohkaffees, der der extrahierten Bohnen 83,0 %.

Für eine weitere Auftrennung des wasserlöslichen Rohkaffeeanteils wurde 1 g des Rohkaffeeextrakts in demineralisiertem Wasser gelöst und in einer Ultrafiltrationsrührzelle über eine YM1-Cellulose-Membran (beides: Amicon, Millipore, Billerica, USA) mit Trennungsgrenze 1000 Da filtriert. Sowohl das Filtrat als auch der Rückstand wurden anschließend gefriergetrocknet. Die höhermolekulare Fraktion (> 1000 Da) hatte einen Anteil von 1,1 %, die niedermolekulare Fraktion (< 1000 Da) von 15,9 % am Rohkaffee (Summe: 17,0 % Rohkaffeeextrakt).

Senfsamen:

Weißer Senfsamen wurden nach Dämpfung und Gefrier Trocknung mehreren Fraktionierungsschritten unterzogen. Eine Übersicht hierzu ist in **Abbildung 2.24** dargestellt. Die Ausbeute der einzelnen Fraktionen zeigen die **Tabellen 2.46** und **2.47** (**Kap. 2.2.2.4**).

1) Soxhlet-Extraktion:

Je 240 g der gedämpften, gefriergetrockneten und anschließend gemahlene Senfsamen (SG) wurden in einer Extraktionshülse einer 1l-Soxhlet-Apparatur mit 1,2 l Petrolether (Siedebereich 40-60°C) bei 75°C für ca. 24 Stunden extrahiert. Nach Beendigung der Extraktion wurde der Rückstand luftgetrocknet. Zur Gewinnung der fettlöslichen Fraktion (Lösungsmittlextrakt, LE) wurde das Extraktionsmittel am Rotationsverdampfer schonend verdampft. Der ölige Rückstand hatte einen prozentualen Anteil von 26,5 %, der entfettete Rückstand (R) einen Anteil von 73,5 % der eingesetzten Senfmasse.

2) Wasserextraktion:

Der entfettete Rückstand (R) wurde in Portionen zu je 160 g mit etwa der fünffachen Menge an demineralisiertem Wasser bei 70°C für zwei Stunden extrahiert. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (Jouan GR 412, gekühlte Zentrifuge, Thermo, Dreieich) und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wurde nochmals mit der gleichen Menge Wasser unter denselben Bedingungen extrahiert und zentrifugiert. Die vereinigten Extrakte sowie der Rückstand wurden gefriergetrocknet. Die wasserunlösliche Fraktion (WR) hatte einen Gewichtsanteil von 52,5 %, die wasserlösliche Fraktion (WE) einen Anteil von 21,0 % der eingesetzten Senfmasse.

3) Ultrafiltration:

Der getrocknete Senfextrakt (WE) wurde in Portionen zu je 1 g in 200 ml demineralisiertem Wasser aufgelöst und in einer Druckzelle Vivacell 250 (Sartorius, Göttingen) bei einem Druck von 4 bar unter langsamem Schütteln über eine MWCO 5000 Polyethersulfon-Filtermembran (Sartorius, Göttingen) mit Trennungsgrenze 5000 Da getrennt. Sowohl das Filtrat als auch der Rückstand wurden gefriergetrocknet. Die aus dem Rückstand erhaltene höhermolekulare Fraktion (> 5000 Da, WEH) hatte einen Anteil von 5,1 %, die aus dem Filtrat erhaltene niedermolekulare Fraktion (< 5000 Da, WEN) einen Anteil von 15,9 % der eingesetzten Senfmasse. Für eine weitere Auftrennung der Fraktion WEN wurden 500 mg dieser Fraktion in demineralisiertem Wasser gelöst und in einer Ultrafiltrationsrührzelle über eine YM1-Cellulose-Membran (beides: Amicon, Millipore, Billerica, USA) mit Trennungsgrenze 1000 Da filtriert. Dabei hatte der höhermolekulare Teil (1000 bis 5000 Da) lediglich einen Anteil von 1,6 % an der eingesetzten Senfmasse, während der niedermolekulare Teil einen Anteil von 14,3 % besaß, so dass zur weiteren Fraktionierung auf die Ultrafiltration mit cut-off 1000 Da verzichtet wurde.

4) Flash-Chromatographie:

Je 200 bis 400 mg der gefriergetrockneten Fraktion WEN wurden in je 10 bis 20 ml Millipore-Wasser gelöst und mittels Flash-Chromatographie an einer unpolaren stationären Phase aufgetrennt (**Kap. 5.9.5**). Die Trennung erfolgte dabei nach Polarität und Molekülgröße. Von der Fraktion WEN wurden dabei sechs Unterfraktionen gesammelt, die nach Abziehen des Lösungsmittels gefriergetrocknet wurden. Die Gewichtsanteile der erhaltenen Fraktionen am Senf sind in **Tabelle 2.47** dargestellt.

5.1.7 Rekombination von Rohkaffee

Der bei der Extraktion von Rohkaffee erhaltene Rohkaffeeextrakt (Anteil an der Rohkaffeetrockenmasse: 17 %) wurde in einem Rundkolben mit 70 °C warmem, demineralisiertem Wasser (doppelte Menge des Rohkaffeeextrakts) versetzt und die entsprechende Menge an gesiebten, extrahierten Rohkaffeebohnen Rohkaffeeextrakt (Anteil an der Rohkaffeetrockenmasse: 83 %) über einen Trichter zugegeben. Die Mischung wurde für 4 Stunden bei 70 °C an einem Rotationsverdampfer umgewälzt und anschließend für weitere 16 Stunden ohne Temperaturzufuhr gerührt. Die rekombinierten, rieselfähigen, aber noch feuchten Kaffeebohnen wurden danach in einer großen Kristallisierschale eingefroren und gefriergetrocknet.

Für Lagerversuche unter Zugabe von Antioxidationsmitteln wurde der Rohkaffeeextraktlösung vor der Inkorporierung in die extrahierten Rohkaffeebohnen die entsprechende Menge des Antioxidationsmittels zugesetzt.

5.1.8 Isotopenanreicherungsversuche

Für „in-bean“-Experimente mit isotoopenmarkierten Standards wurde der Rohkaffeeextraktlösung vor der Inkorporierung in die extrahierten Rohkaffeebohnen eine entsprechende Menge an [¹³C₅]-D-Ribose- bzw. [³⁴S]-L-Cystein-Lösung zugesetzt. Die Rohkaffeebohnen wurden anschließend analog **Kapitel 5.1.7** rekombiniert und für weitere Untersuchungen herangezogen.

Für Isotopenanreicherungsversuche in Senffractionen wurde je 1 g Senffraction in 20 ml demineralisiertem Wasser gelöst und eine entsprechende Menge an [¹³C₅]-D-Ribose- bzw. [³⁴S]-L-Cystein-Lösung zugegeben. Nach Homogenisierung wurde die modifizierte Fraction gefriergetrocknet und anschließend für weitere Untersuchungen herangezogen.

5.1.9 Gefriertrocknung von Kaffee- und Senfproben

Wasserhaltige Proben oder wässrige, lösungsmittelfreie Suspensionen wurden in Kristallisierschalen (6 bis 28 cm Durchmesser) eingefroren und anschließend in einer LOC-1M Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage (Christ, Osterode) für 48 bis 96 Stunden mit Hilfe einer Trivac-Pumpe (Leybold-Heraeus, Köln) bei einem Enddruck von 0,4 Pa getrocknet. Die Einfriertemperatur betrug -32 °C , die Plattentemperatur 16 °C und die Kondensatortemperatur -84 °C .

5.1.10 Röstungen von Kaffee- und Senfproben

Kaffeeröster:

Die Röstung intakter Kaffeebohnen erfolgte in Portionen zu je 80 bis 100 g mit einem Trommel-Probenröster BRZ 4 der Firma Probat (Emmerich). Je nach Röstgut wurden die Kaffeebohnen für fünf bis acht Minuten bei einer Starttemperatur von 170 bis 200 °C geröstet. Der Regulator für die Luftzufuhr stand dabei zunächst auf der niedrigsten Stufe und wurde nach fünf Minuten Röstdauer geöffnet, um eine zu schnelle Überhitzung der Bohnen zu vermeiden. Nach Beendigung der Röstung wurden die Bohnen für drei Minuten im Luftstrom unter mehrmaligem Schütteln abgekühlt. Der erzielte Röstgrad konnte einerseits über die Bestimmung des Einbrands, der prozentualen Massenabnahme zwischen rohen und gerösteten Kaffeebohnen, und andererseits über die Messung des Farbwerts L mit einem spectro-color-Messer (Dr. Lange, Düsseldorf) anhand der gemahlten Proben definiert werden. Der Wert L entspricht dabei der relativen Dunkelheit, wobei kleinere L-Werte eine dunklere Farbe beschreiben.

Röstofen:

Intakte Kaffeebohnen und Senfsamen sowie Kaffee- und Senfpulver wurden in einem Röstofen der Firma Binder (Tuttlingen) in Portionen zu je 10 g geröstet. Dazu wurde der Ofen auf 180 °C vorgeheizt. Die Probe wurde dann in einer flachen Kristallisationsschale (14 cm Durchmesser) auf den in der Mitte des Ofens positionierten Rost gestellt. Die Röstdauer variierte je nach Röstgut zwischen 20 und 60 Minuten.

Röstungen in Sonnenblumenöl:

Je 10 mg bis 2 g Kaffee- bzw. Senfpulver wurden in je 10 ml Sonnenblumenöl in verschlossenen 15 cm-Sovirelgläsern in einem Labtherm-Heizblock der Firma Liebisch (Bielefeld) für 30 bis 120 Minuten bei 180 °C erhitzt. Die ölige Suspension wurde währenddessen mehrmals kurz geschüttelt.

5.1.11 Mahlen von Röstkaffee

Röstkaffeebohnen wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend in einer Ultra-Zentrifugalmühle (Retsch ZM 1, Haan) mit Siebgröße 2 mm gemahlen.

5.1.12 Lagerung von Röstkaffee

Nicht originalverpackte Röstkaffeeproben wurden entweder in luftdurchlässigen, innen beschichteten Packungen oder in mit Stickstoff gespülten, verschweißten PE-Beuteln gelagert. Für die Untersuchung der Lagerstabilität wurden die selbstverpackten sowie originalverpackten Röstkaffees bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Alle anderen Proben wurden tiefgefroren (-25 °C) gelagert.

5.2 Chemikalien

Kommerziell erhältliche Chemikalien wurden von den angegebenen Quellen, sofern nicht anders vermerkt, in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen. Kommerziell nicht erhältliche Verbindungen wurden nach den angegebenen Literaturstellen synthetisiert und freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

5.2.1 Referenzverbindungen

S-Benzyl-L-cystein, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

L-Cystein, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

(E)- β -Damascenon, Symrise AG, Holzminden

Diacetyl, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Dimethyltrisulfid, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Ethanal, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin, Synthese Czerny et al., 1996
2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin, Synthese Czerny et al., 1996
4-Ethenyl-2-methoxyphenol, Lancaster, Mühlheim/Main
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5*H*)-furanon, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2-Furancarbaldehyd, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2-Furanmethanol, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2-Furanmethanthiol, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Hexanal, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3-Isopropyl-2-methoxypyrazin, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methanthiol, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2-Methoxyphenol, Serva, Heidelberg
3-Methyl-2-buten-1-thiol, Jacobs, Bremen
3-Methylindol, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4-Methylphenol, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3-Methyl-3-sulfanyl-1-butanol, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3-Methyl-3-sulfanylbutylmethanoat, Synthese Blank et al., 1992 a
3-(Methylthio)propanal, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2-Methylbutanal, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
3-Methylbutanal, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2-Methylbutansäure, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methyloctanoat, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methylpropanal, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2,3-Pentandion, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Propanal, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
D-Ribose, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

5.2.2 Stabilisotopenmarkierte Verbindungen

[¹³C₂]-Ethanal, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

[¹³C₃, ¹⁵N]-L-Cystein, 98 %, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA

- [³⁴S]-L-Cystein (Synthese nach Wood und du Vigneaud, 1939 sowie Wood und van Middlesworth, 1949, **Kap. 5.3.6**)
- [¹³C₄]-Diacetyl (Synthese nach Schieberle und Hofmann 1997, **Kap. 5.3.1**)
- [²H₃]-2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (Synthese nach Cerny und Grosch, 1993, **Kap. 5.3.3**)
- [²H₃]-4-Ethenyl-2-methoxyphenol (Semmelroch et al., 1995)
- [²H₃]-2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (Cerny und Grosch, 1993)
- [¹³C₂]-2-Furancarbaldehyd (Synthese, **Kap. 5.3.4**)
- [¹³C₂]-2-Furanmethanol (Synthese, **Kap. 5.3.5**)
- [²H₂]-2-Furanmethanthiol (Sen und Grosch, 1991)
- [¹³C₂]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (Synthese nach Blank et al., 1997, **Kap. 5.3.2**)
- [²H₃]-4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Semmelroch et al., 1995)
- [²H₃]-2-Methoxyphenol (Cerny und Grosch, 1993)
- Methyl-[²H₃]-Lithium/Lithiumiodid-Komplex, 0,5 molar in Diethylether, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- [²H₃]-3-(Methylthio)propanal (Sen und Grosch, 1991)
- [²H₂]-2-Methylbutanal (Christlbauer, 2002)
- [²H₃]-3-Methylbutanal (Semmelroch und Grosch, 1996)
- [¹³C₂]-2,3-Pentandion (Mayer et al., 1999)
- [¹³C₂]-D-Ribose, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- [¹³C₅]-D-Ribose, Omicron Biochemicals, South Bend, USA
- ³⁴Schwefel, ≥ 98 %, Isotec, Miamisburg, USA

5.2.3 Sonstige Chemikalien

- Aceton, Suprasolv®, Merck, Darmstadt
- Acetonitril LiChrosolv®, Merck, Darmstadt
- Ameisensäure, p.A., Merck, Darmstadt
- Ammoniaklösung, 25 %, Merck, Darmstadt
- Ammoniumchlorid, p.A., Merck, Darmstadt
- Argon reinst, Westfalen, Münster
- 3-Benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliumchlorid, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- Benzylmagnesiumchlorid, 2,0 mol/l in Tetrahydrofuran, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- Bismuth-(III)-oxid, Alfa Aesar, Karlsruhe
- Borsäure, p.A., Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- 3-Butin-2-ol, 55 % in Wasser, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- Butylhydroxyanisol, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Celite® S, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
β-Chlor-L-alanin-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Chloroform, stabilisiert mit 0,5 % Ethanol, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Citronensäure, wasserfrei, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dansylchlorid, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dichlormethan, destilliert, Merck, Darmstadt
Diethylether, destilliert, Merck, Darmstadt
2,3-Diethylpyrazin, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4-Dimethylaminopyridin, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Di-*tert*-butyldicarbonat, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethandisäure, wasserfrei, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethanol LiChrosolv®, Merck, Darmstadt
Ethansäure, Merck, Darmstadt
Helium, 99,999 %, Messer Griesheim, Düsseldorf
Iodethansäure, p.A., Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kaliumpermanganat, Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm), Merck, Darmstadt (gereinigt nach *Esterbauer 1968*)
Kieselgel DC 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt
Lichroprep® RP-18 Säulenmaterial, 25-40 µm, Merck, Darmstadt
Lithiumaluminiumhydrid, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Lithiumdiisopropylamid-Tetrahydrofuran-Komplex, 1,5 mol/l in Cyclohexan, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Lithiumhydroxid, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methanol LiChrosolv®, Merck, Darmstadt
Natrium, metallisch, Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat p. A., Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p. A., Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat p.A., Merck, Darmstadt
Natriumhydrogensulfit, 40 %ige Lösung in Wasser, Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, Plätzchen p.A., Merck, Darmstadt
Natriumsulfat p. A., wasserfrei, Merck, Darmstadt
Octylgallat, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Oxalsäure, wasserfrei, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
n-Pentan, destilliert, Merck, Darmstadt
Petrolether 40-60 °C, p.A., Merck, Darmstadt
2-Propanol, Merck, Darmstadt
Salzsäure 37 %, p. A., Merck, Darmstadt

Schwefel, gefällt, reinst, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Schwefelsäure, 98 %, Merck, Darmstadt

Seesand, reinst, Merck, Darmstadt

Stickstoff, 99,999 %, Messer Griesheim, Düsseldorf

Stickstoff, flüssig, Linde, München

Tetrahydrofuran, wasserfrei, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Triethylamin, wasserfrei, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Triscarboxyethylphosphin, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Trockeneis, Pellets, Cleanas Trockeneis-direkt.de, Internetversand

Wasser, demineralisiert, über Milli-Q-Anlage, Millipore GmbH, Schwalbach

Wasserstoff, 99,9 % Messer Griesheim, Düsseldorf

Xylol, reinst, Merck, Darmstadt

5.3 Synthesen

5.3.1 [¹³C₄]-Diacetyl

Die einstufige Synthese wurde gemäß Schieberle und Hofmann (1997) durchgeführt.

3-Benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliumchlorid (153,8 mg; 57 mmol) und wasserfreies Triethylamin (347,1 mg; 3,43 mmol) wurden in einem Sovirelglas unter Argonatmosphäre vorgelegt. Anschließend wurde [¹³C₂]-Ethanal (524,4 mg; 11,4 mmol) zugegeben und unter Rühren unter Verschluss bei 80 °C für 90 Minuten zu [¹³C₄]-2-Hydroxy-3-butanon umgesetzt. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung mit Ethansäure (20 ml) versetzt und in einen Spitzkolben mit Destillationsbrücke, Thermometer und Kühleranschluss überführt. Die Oxidation zu [¹³C₄]-Diacetyl erfolgte durch Zugabe von Bismut-(III)-oxid (931,9 mg; 2 mmol) und Erhitzen auf 90 °C für 60 Minuten. Durch stärkeres Erhitzen wurde das Reaktionsprodukt anschließend zusammen mit Ethansäure abdestilliert (Siedebereich 110-120 °C). Zur Entfernung der Ethansäure wurde das eisgekühlte Destillat zunächst mit festem Natriumcarbonat und dann mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,5 mol/l) versetzt. Nach Beendigung des Schäumens und Erreichen eines leicht basischen pH-Werts (7,5) wurde zur Isolierung des Reaktionsprodukts mehrmals mit Diethylether (3 x 50 ml) ausgeschüttelt. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, am Rotationsverdampfer konzentriert und schließlich auf ein Volumen von 50 ml

aufgefüllt. Die Bestimmung des Gehalts der Lösung an [$^{13}\text{C}_4$]-Diacetyl erfolgte mittels HRGC-FID auf einer Kapillarsäule (FFAP) mit Hilfe des internen Standards Methyl octanoat und der unmarkierten Referenzsubstanz (**Kap. 5.8.2.1**).

Ergebnis: 150,94 mg [$^{13}\text{C}_4$]-Diacetyl (1,68 mmol = 29,5 % der Theorie)
Geruch (HRGC-O): buttrig
RI (FFAP): 981; RI (DB-5): 595
MS/EI, m/z (%): 45 (100), 90 (19), 44 (9)
MS/CI (Methanol), m/z (%): 91 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 90 (5)

5.3.2 [$^{13}\text{C}_2$]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon

Die Synthese wurde gemäß Blank et al. (1997) durchgeführt. In vier Stufen wurde zunächst 3-Butin-2-ol mit Di-*tert*-butyldicarbonat und [$^{13}\text{C}_2$]-Ethanal zu einem zweifach geschützten Diol umgesetzt. Nach Oxidation der Dreifachbindung zum Diketon erfolgte unter Abspaltung der Schutzgruppen eine Cyclisierung zum [$^{13}\text{C}_2$]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon.

3-Butin-2-yl-*tert*-butylcarbonat

Eine wässrige Lösung von 3-Butin-2-ol (55 %ig; 3 g; 23,6 mmol) wurde zweimal mit Dichlormethan (je 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und in einen Spitzkolben überführt. Nach Zugabe von 4-Dimethylaminopyridin (40 mg; 0,33 mmol) als Katalysator wurde Di-*tert*-butyldicarbonat (5,6 g; 25,6 mmol, gelöst in 20 ml Dichlormethan) über einen Tropftrichter langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde dann für zwei Stunden bei 30 °C und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Waschen mit demineralisiertem Wasser (40 ml), Natriumhydrogencarbonatlösung (gesättigt; 40 ml) und Citronensäurelösung (10 %ig; 40 ml) wurde die Dichlormethanphase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und in einem Rundkolben am Rotationsverdampfer abgezogen (Ausbeute: 3,27 g).

MS/EI (3-Butin-2-yl-*tert*-butylcarbonat), m/z (%):
57 (100), 53 (95), 41 (80), 114 (24), 69 (24), 155 (2)

[1,2-¹³C₂]-3-Hexin-2,5-diyl-di(*tert*-butylcarbonat)

3-Butin-2-yl-*tert*-butylcarbonat wurde unter Nachspülen mit Tetrahydrofuran (15 ml) in einen Dreihalskolben mit Tropftrichter, Argonzufuhr und Septum überführt. Nach Abkühlen in einem Aceton-Trockeneis-Gemisch auf -78 °C wurde über den Tropftrichter eine Lösung von Lithiumdiisopropylamid-Tetrahydrofuran-Komplex in Cyclohexan (1,5 mol/l; 8 ml; 12 mmol) unter Rühren innerhalb von 20 Minuten zugetropft. Nachdem mit Tetrahydrofuran (3 ml) nachgespült und weitere 30 Minuten gerührt wurde, wurde [¹³C₂]-Ethanal (500 mg; 10,9 mmol), gelöst in Tetrahydrofuran (2 ml), über das Septum mittels einer gekühlten Spritze unter Rühren zugegeben und eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wurde Di-*tert*-butyldicarbonat (2,84 g; 13 mmol) in Tetrahydrofuran (10 ml) gelöst und über den Tropftrichter innerhalb von 20 Minuten unter Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde eine weitere Stunde bei -78 °C gerührt, bevor es auf Raumtemperatur erwärmt wurde und mit Diethylether (50 ml) in einen Scheidetrichter überführt wurde. Nach dem Waschen mit Natriumhydroxidlösung (2 mol/l; 40 ml), Natriumchloridlösung (gesättigt; 40 ml) und Citronensäurelösung (10 %ig, 40 ml) wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und in einem Rundkolben am Rotationsverdampfer abgezogen. Es wurde ein gelblich-braunes Öl erhalten (Ausbeute: 4,64 g).

MS/EI ([1,2-¹³C₂]-3-Hexin-2,5-diyl-di(*tert*-butylcarbonat)), *m/z* (%):

41 (100), 57 (49), 81 (12), 98 (12), 143 (10), 160 (2)

[1,2-¹³C₂]-3,4-Hexandion-2,5-diyl-di(*tert*-butylcarbonat)

Kaliumpermanganat (2,43 g; 15,4 mmol) wurde in einer Mischung aus Aceton (70 ml), demineralisiertem Wasser (14 ml) und Ethansäure (2,1 ml) in einem Erlenmeyerkolben gelöst und für 15 Minuten in einem Eisbad gerührt. [1,2-¹³C₂]-3-Hexin-2,5-diyl-di(*tert*-butylcarbonat) wurde in Aceton (10 ml) gelöst, zur Kaliumpermanganat-Lösung zugegeben und drei weitere Stunden unter Eiskühlung gerührt. Zur Zerstörung von überschüssigem Kaliumpermanganat wurde eine Natriumhydrogensulfidlösung (40 %ig, 2 ml) zugegeben. Die braune Suspension wurde anschließend über Celite[®] in einen Rundkolben filtriert. Es wurde mit Aceton (20 ml) und demineralisiertem Wasser (50 ml) nachgespült, Aceton am Rotationsverdampfer abgezogen und die zurückbleibende gelbe Lösung unter Nachspülen mit demineralisiertem Wasser (10 ml) in einen Scheidetrichter überführt. Es wurde zweimal mit Dichlormethan (je 50 ml)

ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen mit einer Natriumhydrogencarbonatlösung (gesättigt; 100 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Es wurde ein gelbes Öl erhalten (Ausbeute: 2,62 g).

MS/EI ([1,2-¹³C₂]-3,4-Hexandion-2,5-diyl-di(*tert*-butylcarbonat)), *m/z* (%):

57 (100), 41 (75), 130 (10), 85 (5), 91 (3), 113 (3)

[¹³C₂]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon

[1,2-¹³C₂]-3,4-Hexandion-2,5-diyl-di(*tert*-butylcarbonat) wurde in demineralisiertem Wasser (18 ml) gelöst, in einen Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Argonzufuhr überführt und nach Zugabe von wasserfreier Ethandisäure (1,7 g; 19 mmol) für fünf Stunden unter Rückfluss bei 100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung mit demineralisiertem Wasser (30 ml) verdünnt, unter Nachspülen in einen Scheidetrichter überführt und fünfmal mit Dichlormethan (je 30 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumhydrogencarbonatlösung (gesättigt; 100 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, mit Methanol (50 ml) versetzt, und schließlich das Dichlormethan am Rotationsverdampfer abgezogen. Die verbleibende methanolische Lösung wurde auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt und unter Argonatmosphäre gelagert. Die Bestimmung des Gehalts der Lösung an [¹³C₂]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon erfolgte mittels HRGC-FID auf einer Kapillarsäule (FFAP) mit Hilfe des internen Standards Methyl octanoat und der unmarkierten Referenzsubstanz (**Kap. 5.8.2.1**).

Ergebnis: 33,6 mg [¹³C₂]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (0,26 mmol = 2,4 % der Theorie)

Geruch (HRGC-O): nach Karamell

RI (FFAP): 2047, RI (DB-5): 1058

MS/EI, *m/z* (%): 130 (100), 45 (62), 43 (61), 57 (32), 59 (25), 85 (14), 87 (13), 74 (11)

MS/CI (Methanol), *m/z* (%): 131 (100, [M+H]⁺)

5.3.3 [²H₃]-2,3-Diethyl-5-methylpyrazin

Die einstufige Synthese wurde gemäß Cerny und Grosch (1993) durchgeführt.

In einen Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Tropftrichter und Stickstoffzufuhr wurde [²H₃]-Methylithium-/Lithiumiodid-Komplex-Lösung (0,5 mol/l in Diethylether; 20 ml; 10 mmol) unter Stickstoffatmosphäre zum Sieden gebracht (45 °C). Anschließend wurde 2,3-Diethylpyrazin (78,8 mg; 0,58 mmol) in Diethylether (20 ml) gelöst und innerhalb von 30 Minuten über den Tropftrichter zugetropft. Nach einer weiteren Stunde Rühren unter Rückfluss und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit demineralisiertem Wasser (20 ml) vorsichtig hydrolysiert. Danach wurde die wässrige Phase abgetrennt und noch dreimal mit Diethylether (je 50 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, am Rotationsverdampfer konzentriert und anschließend auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie an Kieselgel-60-F₂₅₄-Platten (Laufmittel n-Pentan + Diethylether, 6+4, V+V). Die Identifizierung erfolgte unter UV-Licht (254 nm) und mittels Cochromatographie der unmarkierten Referenzverbindung ($R_f = 0,50$). [²H₃]-2,3-Diethyl-5-methylpyrazin wurde durch Aufnahme des Kieselgels um den Bereich $R_f = 0,50$ in Diethylether erhalten. Nach Filtration der Suspension wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer konzentriert und die Lösung anschließend auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Die Bestimmung des Gehalts der Lösung an [²H₃]-2,3-Diethyl-5-methylpyrazin erfolgte mittels HRGC-FID auf einer Kapillarsäule (FFAP) mit Hilfe des internen Standards Methyl octanoat und der unmarkierten Referenzsubstanz (**Kap. 5.8.2.1**).

Ergebnis: 3,13 mg [²H₃]-2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (0,02 mmol = 3,5 % der Theorie)
Geruch (HRGC-O): erdig
RI (FFAP): 1491, RI (DB-5): 1153
MS/EI, m/z (%): 153 (100), 138 (62), 152 (58), 57 (25), 124 (16),
41 (12), 125 (6)
MS/CI (Methanol), m/z (%): 154 (100, [M+H]⁺)

5.3.4 [¹³C₂]-2-Furancarbaldehyd

2-Furancarbaldehyd wird durch Erhitzen von Pentosen im sauren Milieu gebildet (Hurd und Isenhour, 1932; Belitz et al. 2001).

[¹³C₂]-D-Ribose (140 mg; 0,92 mmol) und verdünnte Schwefelsäure (0,1 mol/l; 15 ml) wurden in einem Rundkolben mit Rückflusskühler für 3,5 Stunden bei 160 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung dreimal mit Diethylether (je 40 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zunächst mit Natriumcarbonatlösung (0,5 mol/l, 60 ml) gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, am Rotationsverdampfer konzentriert und auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Die Bestimmung des Gehalts der Lösung an [¹³C₂]-2-Furancarbaldehyd erfolgte mittels HRGC-FID auf einer Kapillarsäule (FFAP) mit Hilfe des internen Standards Methyl octanoat und der unmarkierten Referenzsubstanz (Kap. 5.8.2.1).

Ergebnis: 5,49 mg [¹³C₂]-2-Furancarbaldehyd (0,06 mmol = 6,5 % der Theorie)
Geruch (HRGC-O): schwach süß
RI (FFAP): 1470, RI (DB-5): 829
MS/EI, *m/z* (%): 98 (100), 97 (96), 39 (37), 40 (27), 38 (12), 68 (6)
MS/CI (Methanol), *m/z* (%): 99 (100, [M+H]⁺)

5.3.5 [¹³C₂]-2-Furanmethanol

Aldehyde wie 2-Furancarbaldehyd werden durch Reduktionsmittel wie Lithiumaluminiumhydrid und Erhitzen zu Alkoholen reduziert (Organikum, 2001).

In einem Zweihalskolben mit Tropftrichter und Rückflusskühler wurde Lithiumaluminiumhydrid (10 mg; 0,26 mmol) in wasserfreiem Diethylether (5 ml) vorgelegt. Über den Tropftrichter wurde eine Lösung von [¹³C₂]-2-Furancarbaldehyd in Diethylether (54,78 µg/ml; 10 ml; 5,6 µmol) langsam zugetropft und anschließend unter Rückfluss eine Stunde bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur wurde über den Tropftrichter so lange vorsichtig Eiswasser zugetropft, bis keine Gasentwicklung mehr sichtbar war. Der gebildete Niederschlag wurde durch

tropfenweise Zugabe von Schwefelsäure (10 %ig) aufgelöst. Die entstandenen Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt. Die wässrige Phase wurde anschließend noch dreimal mit Diethylether (je 20 ml) extrahiert und alle organischen Phasen vereinigt. Nach dem Waschen mit Natriumchloridlösung (gesättigt; 100 ml) wurden die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, am Rotationsverdampfer konzentriert und auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Die Bestimmung des Gehalts der Lösung an [$^{13}\text{C}_2$]-2-Furanmethanol erfolgte mittels HRGC-FID auf einer Kapillarsäule (FFAP) mit Hilfe des internen Standards Methyloctanoat und der unmarkierten Referenzsubstanz (**Kap. 5.8.2.1**).

Ergebnis: 247 μg [$^{13}\text{C}_2$]-2-Furanmethanol (2,47 μmol = 44,2 % der Theorie)
Geruch (HRGC-O): kein Geruchseindruck
RI (FFAP): 1666, RI (DB-5): 852
MS/EI, m/z (%): 100 (100), 99 (49), 83 (45), 55 (32), 42 (30), 71 (23), 43 (25)
MS/CI (Methanol), m/z (%): 100 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 99 (34), 101 (25)

5.3.6 [^{34}S]-L-Cystein

Die Synthese wurde gemäß Wood und du Vigneaud (1939) sowie Wood und van Middlesworth (1949) durchgeführt.

Elementarer ^{34}S Schwefel (100 mg; 2,94 mmol) wurde in einem 100 ml-Dreihalskolben in Xylol (10 ml) suspendiert und mit Benzylmagnesiumchlorid-Lösung in Tetrahydrofuran (2 mol/l; 7,8 ml; 1,56 mmol) versetzt. Dieses Gemisch wurde 48 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dabei fand eine Inkorporierung des Schwefels zum [^{34}S]-Phenylmethanthiolmagnesiumchlorid statt (**Abb. 2.17 (A)**).

Die Fällung des Reaktionsprodukts konnte durch Zugabe von frisch destilliertem Petrolether (20 ml) bewirkt werden. Nach Zentrifugation wurde der Niederschlag erneut mit Petrolether (10 ml) gewaschen und zentrifugiert. Durch Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung (5 mol/l; 6,25 ml; 31,3 mmol) unter Eiskühlung wurde [^{34}S]-Phenylmethanthiol freigesetzt. Schließlich wurde in einem Wasserbad bei 50 °C β -Chlor-L-alanin-Hydrochlorid (750 mg; 4,69 mmol), gelöst in wenigen Millilitern

demineralisiertem Wasser, innerhalb von fünf Minuten zugetropft und anschließend eineinhalb Stunden bei 50 °C gerührt. [³⁴S]-Benzyl-L-cystein wurde dabei durch eine Kondensationsreaktion gebildet (**Abb. 2.17 (B)**). Nach Beendigung der Reaktion wurde Ethansäure im Überschuss (20 ml) zugegeben, um die Lösung auf einen pH-Wert von etwa 3,5 einzustellen. Nach Ausschütteln mit Petrolether (20 ml) wurde [³⁴S]-Benzyl-L-cystein aus der Wasserphase über Flash-Chromatographie (**Kap. 5.9.5**) isoliert. Die Identifizierung erfolgte mittels HPLC (**Kap. 5.9.4**) sowie HPLC-MS (**Kap. 5.9.6** und **Abb. 2.18**) mit Hilfe der unmarkierten Referenzsubstanz.

25 %ige Ammoniaklösung wurde bei 40 °C erwärmt und das dabei freiwerdende Ammoniakgas in einen durch eine Trockeneis-2-Propanol-Mischung auf -78 °C gekühlten Dreihalskolben geleitet (Maslowsky, 2000). Hierbei wurde flüssiger Ammoniak (etwa 20 ml) generiert und das gereinigte und gefriergetrocknete [³⁴S]-Benzyl-L-cystein anschließend darin suspendiert. Unter Rühren wurde zerkleinertes, elementares Natrium zugegeben, was zu einer Dunkelblaufärbung der Flüssigkeit führte. Bei Nachlassen der Blaufärbung wurde weiteres Natrium dazu gegeben. Die Reaktion wurde als abgeschlossen angesehen, wenn die dunkelblaue Färbung für mehr als 15 Minuten anhielt. [³⁴S]-Benzyl-L-cystein wurde dabei in [³⁴S]-L-Cystein und Benzylamin gespalten (**Abb. 2.17 (C)**). Nach Beendigung der Reaktion wurde überschüssiges Natrium durch Zugabe einer Spatelspitze Ammoniumchlorid abreagiert. Anschließend konnte Ammoniak durch Entfernung der Kühlung und Öffnen des Kolbens verdampfen. Der verbleibende Rückstand wurde in Eiswasser (20 ml) aufgenommen und mit Diethylether (20 ml) gewaschen. Zur Identifizierung und Quantifizierung von [³⁴S]-L-Cystein in der wässrigen Phase (pH ca. 11) wurde ein Aliquot der Lösung analog **Kapitel 5.8.3.3** derivatisiert und mittels HPLC-MS/MS vermessen (**Kap. 5.8.2.2**).

Ergebnis: 12,5 mg [³⁴S]-L-Cystein (102 µmol = 3,5 % der Theorie)

5.4 Sensorische Untersuchungen

5.4.1 Rahmenbedingungen

Die sensorischen Untersuchungen wurden in einem eigens dafür eingerichteten, gut belüfteten Sensorikraum bei Tageslicht und Raumtemperatur durchgeführt. Die einzelnen Prüfplätze waren durch Stellwände voneinander getrennt. Die zu untersuchenden Proben wurden in Portionen von 1 g (Kaffeepulver) bzw. 20 ml (Kaffeetränke) in Sensorikgläsern (7 cm Höhe, 3,5 cm Durchmesser) mit Schliffdeckel gereicht. Die Getränkeproben wurden vor der sensorischen Prüfung für zehn Minuten in einem Brutschrank bei 60 °C temperiert. Das geschulte Sensorikpanel bestand aus 12 bis 18 Personen im Alter von 24 bis 45 Jahren.

5.4.2 Dreiecksprüfungen auf Unterscheidbarkeit

Zur Feststellung der sensorischen Unterscheidbarkeit zweier Kaffeeproben wurden Dreiecksprüfungen auf Unterscheidbarkeit (Triangeltests) gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Methode L 00.90-7 (2006) durchgeführt. Dabei wurden den Prüfern drei mit jeweils einem dreistelligen Zahlencode versehene Sensorikgläser in zufälliger Reihenfolge dargeboten. Zwei Sensorikgläser waren dabei mit Aliquoten derselben Probe befüllt, während eines ein Aliquot der abweichenden Probe enthielt. Der Zahlencode der abweichenden Probe musste von den Prüfern auf dem Prüfungsformular markiert werden. Nach dem „Forced-Choice-Prinzip“ musste auch dann eine Entscheidung getroffen werden, wenn kein Unterschied festgestellt werden konnte, um die statistische Gültigkeit des Triangeltests sicherzustellen. Das Ergebnis wurde mit Hilfe der Signifikanztabelle nach § 64 LFGB Methode L 00.90-7 (Anhang A.1) statistisch ausgewertet. Unter Beachtung der Gesamtzahl an vorliegenden Antworten wird anhand der Anzahl korrekter Ergebnisse ein bestimmtes Signifikanzniveau α erreicht. Dieses gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein falsches Ergebnis als richtig angenommen wird. Bei $\alpha \leq 0,001$ wird in sehr hohem Maß, bei $0,001 < \alpha \leq 0,01$ in hohem Maß angezeigt, dass ein Unterschied zwischen den Proben vorliegt.

5.5 Isolierung von Aromastoffen

Für eine schonende Isolierung flüchtiger Verbindungen aus Lebensmittelproben hat sich die Kaltextraktion mit niedrig siedenden Lösungsmitteln wie Diethylether oder Dichlormethan, gefolgt von einer Destillation des Lösungsmittelextrakts im Hochvakuum, bewährt. Die verschiedenen Lebensmittelmatrizes erforderten dabei unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden. Für eine optimale Detektion einzelner Analyten waren ggf. weitere Fraktionierungs- und Aufreinigungsschritte notwendig.

5.5.1 Extraktionsverfahren

5.5.1.1 Pulver

Je 50 mg bis 10 g gemahlene Kaffee- bzw. Senfproben wurden mit je 50 bis 200 ml Dichlormethan (DCM) versetzt und zwei Stunden gerührt. Nach Filtration wurde der Filtrerrückstand erneut mit derselben Menge an DCM für weitere zwei Stunden extrahiert. Die beiden organischen Extrakte wurden vereinigt.

5.5.1.2 Kaffeegetränke

Nach Zubereitung der frischen Kaffeegetränke (**Kap. 5.1.3**) wurden diese mit Hilfe eines Eisbads unter Rühren auf 30 °C abgekühlt, um die Extraktion mit niedrig siedenden Lösungsmitteln zu ermöglichen.

Extraktion mit wassergesättigtem Diethylether:

1 bis 200 ml des auf 30 °C temperierten Kaffeegetränks wurden mit 5 bis 400 ml wassergesättigtem Diethylether extrahiert. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde der wässrige Rückstand nochmals mit der gleichen Menge an wassergesättigtem Diethylether extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen vereinigt.

Extraktion mit n-Pentan/Diethylether:

200 ml des auf 30 °C temperierten Kaffeegetränks wurden mit 400 ml einer Mischung aus n-Pentan und Diethylether (2+1, V+V) versetzt, geschüttelt und 18 Stunden gerührt.

Nach Abtrennen der organischen Phase in einem Scheidetrichter wurde diese über Natriumsulfat getrocknet und filtriert.

Extraktion mit Dichlormethan:

300 ml des auf 30 °C temperierten Kaffeegetränks wurden mit 500 ml Dichlormethan in einem Scheidetrichter extrahiert. Zur Trennung der Phasen wurde die Emulsion anschließend bei 10 °C und 4000 Umdrehungen/min für 20 Minuten zentrifugiert (Jouan GR 412, gekühlte Zentrifuge, Thermo, Dreieich). Nach Abdekantieren des wässrigen Überstands wurde die Dichlormethanphase über Natriumsulfat getrocknet und filtriert.

5.5.1.3 Suspensionen

Die nach der Röstung gemahlener Proben in 10 ml Sonnenblumenöl vorliegende Suspension (**Kap. 5.1.10**) wurde in einen 100 ml-Iodzahlkolben überführt und mit 50 ml Diethylether versetzt, kurz geschüttelt und anschließend für 30 Minuten gerührt. Nach Filtration wurde das Öl-Lösungsmittel-Gemisch der weiteren Aufarbeitung unterzogen.

5.5.2 Headspace-Analysen

Für die Identifizierung und Quantifizierung leichtflüchtiger Verbindungen wurden je 1 bis 4 g Röstkaffeepulver bzw. je 2,5 bis 10 ml auf 30 °C temperierte Kaffeegetränke in ein 120 ml-Headspace-Analysengefäß gegeben und dieses mit einem Deckel mit Septum gasdicht verschlossen. Zur Gleichgewichtseinstellung der Konzentrationen leichtflüchtiger Substanzen in der Probenmatrix und dem darüber liegenden Gasraum wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde mittels einer gasdichten Spritze durch das Septum hindurch aus dem Kopfraum über der Probe das zur Analyse per Headspace-HRGC-O, Headspace-HRGC-FID oder Headspace-HRGC-MS benötigte Volumen entnommen.

5.5.3 Destillation im Hochvakuum

Zur Trennung der flüchtigen und der nicht-flüchtigen, lipophilen Inhaltsstoffen der Lösungsmittel-extrakte wurde eine Solvent Assisted Flavour Evaporation (SAFE) mit Hilfe einer Apparatur nach Engel et al. (1999, **Abb. 5.1**) durchgeführt.

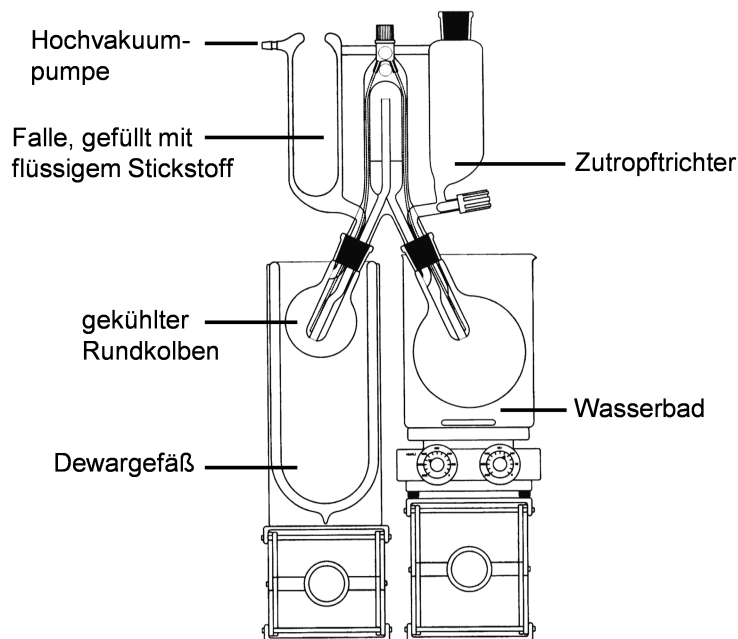


Abbildung 5.1 Apparatur für die Solvent Assisted Flavour Evaporation (nach Engel et al., 1999).

Für die Destillation wurden die beheizbaren Teile der Apparatur sowie das Wasserbad, das sich unter dem Kolben befand, in den die Probe eingelassen wurde, auf 40 °C temperiert. Anschließend wurde mittels eines Hochvakuum-pumpenstands PD 40 (Leybold-Heraeus, Köln) in der Glasapparatur ein Hochvakuum von 10^{-3} bis 10^{-4} Pa angelegt. Der jeweilige Lösungsmittel-extrakt wurde portionsweise über einen Tropftrichter in den temperierten Rundkolben eingelassen, wobei die flüchtigen Probeninhaltsstoffe und das Lösungsmittel explosionsartig verdampften und die nichtflüchtigen Verbindungen als Rückstand im Kolben zurückblieben. Die verdampften, flüchtigen Probenbestandteile wurden in einem zweiten Rundkolben, der in ein mit flüssigem Stickstoff befülltes Dewar-Gefäß eintauchte, ausgefroren. Die ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlte Falle diente dem Schutz der Vakuumpumpe. Nach Beendigung der Destillation wurde die Apparatur vorsichtig belüftet und das Destillat bei Raumtemperatur zur weiteren Bearbeitung aufgetaut.

5.5.4 Fraktionierung

Für die jeweilige Trennung der erhaltenen Aromastoffextrakte in eine Fraktion der neutralen und basischen Verbindungen (NBF) und eine Fraktion der sauren Verbindungen (SF) wurde das nach der SAFE-Destillation erhaltene Destillat zweimal mit jeweils der Hälfte des Volumens an Natriumcarbonatlösung (0,5 mol/l) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit dem gleichen Volumen an gesättigter Natriumchloridlösung versetzt und mit der Hälfte des Volumens an Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat stellte die NBF des Aromastoffextrakts dar. Die alkalische, wässrige Phase wurde mit Salzsäure (2 mol/l) auf einen pH-Wert von 1 eingestellt und dreimal mit jeweils der Hälfte des Volumens an Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethan-Extrakte wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat stellte die SF des Aromastoffextrakts dar.

5.5.5 Konzentrierung

Die Lösungsmittelextrakte bzw. die daraus gewonnenen Fraktionen wurden an einer Vigreux-Kolonne (40 x 1 cm) auf einem Wasserbad, das auf die Siedetemperatur des jeweiligen verwendeten Lösungsmittels erwärmt wurde, schonend auf ein Volumen von 1 bis 4 ml konzentriert. Der konzentrierte Lösungsmittelextrakt wurde anschließend ebenfalls unter Erwärmen an einer Mikrodestillationsapparatur (Bemelmans, 1979) auf ein Endvolumen von 0,1 bis 0,5 ml konzentriert.

5.5.6 Säulenchromatographische Aufreinigung

Für die Quantifizierung von 2-Furanmethanthiol wurde das auf 0,5 ml konzentrierte SAFE-Destillat mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Wassergehalt 5%; Aufreinigung nach Esterbauer, 1968) aufgetrennt. Hierzu wurde eine wassergekühlte Glassäule (25 x 1 cm) zunächst luftblasenfrei mit n-Pentan gefüllt. Anschließend wurde die Säule mit entfetteter Watte unten abgedichtet, bevor sie mit in n-Pentan angeschlämmtem Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm, 10 bis 20 g) gefüllt wurde. Die konzentrierte Probe wurde mittels einer Pipette aufgegeben und mit 200 ml einer

Mischung aus n-Pentan und Diethylether (95+5, V+V) bei einem Fluss von ca. 2 ml/min eluiert. Die Konzentrierung des Eluats erfolgte analog **Kapitel 5.5.5**.

5.6 Selektion aromarelevanter Verbindungen

Zur Unterscheidung zwischen Aromastoffen und nicht aromaaktiven, flüchtigen Verbindungen in den nach **Kapitel 5.5.4** erhaltenen und konzentrierten Fraktionen, wurden diese mittels Kapillargaschromatographie-Olfaktometrie und Kapillargaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (HRGC-O und HRGC-FID, **Kap. 5.9.1**) vermessen. Die geruchsaktiven Bereiche wurden dabei mittels Sniffing-Technik detektiert und im HRGC-FID-Chromatogramm gekennzeichnet.

Um eine Abschätzung der relativen Bedeutung der einzelnen Aromastoffe untereinander zu ermöglichen, wurde im nächsten Schritt eine Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA; Schieberle und Grosch, 1987 a) durchgeführt. Hierfür wurden je 5 g Röstkaffeepulver bzw. je 5 g gerösteter und gemahlener Senf gemäß **Kapitel 5.5** aufgearbeitet. Das Prinzip der AEVA beruht auf einer schrittweisen Verdünnung der konzentrierten Fraktionen mit Lösungsmittel (1+1, V+V) und der jeweiligen Durchführung von HRGC-O für jede einzelne Verdünnungsstufe. Die letzte Verdünnungsstufe, bei der eine geruchsaktive Verbindung per HRGC-O noch wahrgenommen werden konnte, wird hierbei als Flavour-Dilution-Faktor (FD-Faktor) bezeichnet. Dies wurde solange durchgeführt, bis keine geruchsaktive Verbindung mehr detektiert werden konnte. Durch Auftragen der FD-Faktoren der Aromastoffe in einer Fraktion gegen ihre jeweiligen Retentionsindices (**Kap. 5.7.1**) wurden die Ergebnisse der AEVA in einem FD-Chromatogramm veranschaulicht. Bei einer vergleichenden Aromaextraktverdünnungsanalyse (vAEVA) werden die FD-Faktoren der aromaaktiven Verbindungen in mehreren Probenextrakten direkt miteinander verglichen. Hierfür wurden exakt gleiche Mengen der unterschiedlichen Proben unter den gleichen Bedingungen aufgearbeitet. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf das gleiche Volumen eingengt und gleiche Aliquote der Extrakte zur HRGC-O eingesetzt. Diese Methode eignete sich beispielsweise als Screeningmethode, um eventuell vorhandene qualitative, technologisch bedingte Unterschiede im Aroma verschiedener Kaffeeproben zu detektieren.

Für die Headspaceverdünnungsanalyse (HVA) wurden 20 ml des Gasraums über 1 g Röstkaffeepulver (120 ml-Headspacevials, **Kap. 5.5.2**) mittels Headspace-HRGC-O und Headspace-HRGC-FID analysiert. Die abnehmenden Mengen der Aromastoffe wurden hierbei über eine sukzessive Halbierung der zur Analyse entnommenen Volumina erreicht. Der FD-Faktor eines Aromastoffs entsprach demnach dem Quotienten aus dem anfangs entnommenen Volumen und dem Volumen, bei dem die aromaaktive Substanz zuletzt olfaktorisch detektiert werden konnte. Bei der vergleichenden Headspaceverdünnungsanalyse (vHVA) wurden die gleichen Probenmengen verschiedener Röstkaffees in jeweils ein Headspace-Analysengefäß gegeben und nach gleich langer Äquilibrierungszeit wurde jeweils das gleiche Headspace-Volumen zur Headspace-HRGC-O-Analyse eingesetzt.

5.7 Identifizierung aromarelevanter Verbindungen

Die Identifizierung der bei der AEVA und HVA detektierten Aromastoffe wurde durch den Vergleich wichtiger Charakteristika mit Referenzsubstanzen vorgenommen. Dabei wurden die mittels HRGC-O detektierten Geruchsqualitäten unter Berücksichtigung der Geruchsschwellenwerte, die auf zwei HRGC-Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität (FFAP und DB-5) bestimmten Retentionsindices sowie die durch HRGC-MS auf zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität (FFAP und DB-5) erhaltenen Massenspektren der unbekannt Substanzen und der jeweiligen Referenzverbindungen verglichen.

5.7.1 Bestimmung von Retentionsindices

Der Kováts Retentionsindex (Retentionsindex, RI; Kováts, 1958) gibt die normalisierte Retentionszeit (RT) einer Verbindung an. Für jeden Aromastoff wurde der RI durch Cochromatographie eines Extrakts bzw. einer Referenzlösung mit einer Lösung von n-Alkanen (C_6 - C_{26} für FFAP bzw. C_6 - C_{18} für DB-5) in einer Konzentration von 0,25 mg/ml in n-Pentan durch lineare Interpolation nach folgender Formel (1) bestimmt (Van den Dool und Kratz, 1963):

$$RI = 100 \times \left(N + \frac{RT_A - RT_n}{RT_{n+1} - RT_n} \right) \quad (1)$$

RI Retentionsindex

N Anzahl der C-Atome des vor dem Aromastoff eluierenden Alkans n

RT_A Retentionszeit des Aromastoffs [min]

RT_n Retentionszeit des vor dem Aromastoff eluierenden Alkans mit n C-Atomen [min]

RT_{n+1} Retentionszeit des nach dem Aromastoff eluierenden Alkans mit n+1 C-Atomen [min]

5.7.2 Aufnahme von Massenspektren

Zur zweifelsfreien Identifizierung eines unbekanntes Aromastoffs wurden neben der Bestimmung von Geruchsqualität und Retentionsindex auch Massenspektren nach Elektronenstoßionisation (EI) sowie nach Chemischer Ionisation (CI) aufgenommen und mit den Massenspektren von Referenzverbindungen verglichen. Die vor der Massenspektrometrie notwendige Trennung der Aromastoffe wurde durch HRGC (**Kap. 5.9.2**) oder zweidimensionale Kapillargaschromatographie (**Kap. 5.9.3**) auf zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität erreicht.

5.8 Quantifizierungen

Die Quantifizierungen von Aromastoffgehalten sowie von anderen, nicht flüchtigen Verbindungen wie L-Cystein und D-Ribose erfolgten nach dem Prinzip der Stabilisotopenverdünnungsanalyse.

5.8.1 Prinzip der Stabilisotopenverdünnungsanalyse

Bei der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) werden als interne Standards mit stabilen Isotopen (^2H -Atome, ^{13}C -Atome, ^{15}N -Atome oder ^{34}S -Atome) markierte Analoga der jeweils zu analysierenden Substanzen eingesetzt. Sie werden der Probe vor der Aufarbeitung zur Quantifizierung zugesetzt und haben den Vorteil, dass sie, von geringen Isotopeneffekten abgesehen, dieselben physikalischen und chemischen Eigenschaften wie die Analytverbindung besitzen. Dadurch können Verluste des Analyten während der Aufarbeitung nahezu vollständig kompensiert werden (Schieberle

und Grosch, 1987 b). Die hierfür verwendeten stabilisotopenmarkierten Verbindungen wurden durch Synthesen dargestellt oder käuflich erworben (**Kap. 5.2.2** und **Kap. 5.3**). Die Reinheit ihrer Markierung sowie eine mögliche Anwesenheit der unmarkierten Verbindung wurde mittels HRGC/HRGC-MS (**Kap. 5.9.3**) oder HPLC-MS/MS (**Kap. 5.9.7**) überprüft. Die Konzentration derjenigen Standards, die nicht als Reinstoff, sondern gelöst vorlagen, wurde mittels HRGC-FID (**Kap. 5.8.2**) bzw. HPLC-MS/MS (**Kap. 5.9.7**) bestimmt. Um eine möglicherweise uneinheitlich vorliegende Markierung der Standardverbindung (Mischung von Isotopomeren) sowie Unterschiede im Ionisierungsverhalten von Analyt und Standard während der massenspektrometrischen Detektion zu berücksichtigen, wurde für jede zu quantifizierende Verbindung und den entsprechenden Standard ein Responsefaktor (R_F) bestimmt (**Kap. 5.8.3**).

5.8.2 Konzentrationsbestimmungen von Standardlösungen

Zunächst wurden die Konzentrationen der für die Quantifizierungen verwendeten Lösungen von stabilisotopenmarkierten Verbindungen bestimmt.

5.8.2.1 Aromastoffe

Die Konzentrationen der Lösungen isotopenmarkierter Aromastoffe wurden mittels HRGC-FID (**Kap. 5.9.1**) gegen Methyloctanoat als internen Standard ermittelt. Unter Verwendung der unmarkierten Referenzaromastoffe wurde, zum Ausgleich der unterschiedlichen Detektierbarkeit von Methyloctanoat und dem jeweiligen Aromastoff am FID, zunächst ein Korrekturfaktor R bestimmt. Hierfür wurden Lösungen von Methyloctanoat (Standard) und unmarkiertem Aromastoff (Analyt) im Konzentrationsverhältnis von 1:1 hergestellt und per HRGC-FID vermessen. Der Korrekturfaktor wurde schließlich nach folgender Formel (2) berechnet.

$$R = \frac{c(A) \times A(S)}{c(S) \times A(A)} \quad (2)$$

- R Korrekturfaktor
c(A) Konzentration des zu analysierenden Aromastoffs [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
A(S) Peakfläche des Standards
c(S) Konzentration des Standards [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
A(A) Peakfläche des zu analysierenden Aromastoffs

Anschließend wurde mit den Lösungen unbekannter Konzentration an isotopenmarkiertem Aromastoff und Methyloctanoat analog verfahren. Mit dem zuvor bestimmten Korrekturfaktor konnte Formel (2) nach c(A) aufgelöst werden. Zur Berechnung der Konzentration des isotopenmarkierten Aromastoffs wurde außerdem der molare Massenunterschied des markierten Aromastoffs im Vergleich zur unmarkierten Verbindung berücksichtigt.

5.8.2.2 [^{34}S]-L-Cystein

Die Konzentration der bei der Synthese von [^{34}S]-L-Cystein (**Kap. 5.3.6**) erhaltenen wässrigen Lösung wurde analog der Quantifizierung von L-Cystein (**Kap. 5.8.3.3**) mit Hilfe des isotopenmarkierten Standards [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$]-L-Cystein nach Derivatisierung mit Dansylchlorid per HPLC-MS/MS-Messung bestimmt. Hierfür wurden 20 μl der bei der Synthese erhaltenen wässrigen Lösung und 10 μg des isotopenmarkierten Standards [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$]-L-Cystein der Derivatisierung unterzogen (**Kap. 5.8.3.3** und **Kap. 5.9.7**). Für die Konzentrationsberechnung von [^{34}S]-L-Cystein analog **Kapitel 5.8.3.3** wurde mit dem theoretischen Responsefaktor zwischen [^{34}S]-L-Cystein und [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$]-L-Cystein gerechnet, da kein Korrekturfaktor anhand einer Kalibriergeraden bestimmt werden konnte. Da die über Massenspektrometrie ermittelten Peakflächen direkt proportional zur jeweiligen Stoffmenge der detektierten Substanz sind, entspricht der theoretische Responsefaktor zwischen [^{34}S]-L-Cystein und [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$]-L-Cystein ihrem Molmassenverhältnis von 0,98.

5.8.3 Quantifizierungen

5.8.3.1 Aromastoffe

Zur Bestimmung des Responsefaktors R_F wurden für jeden Aromastoff Kalibriergeraden zwischen unmarkierter Referenzsubstanz und isotopenmarkiertem Standard bestimmt. Hierzu wurden Lösungen von Referenzsubstanz und Isotopenstandard in den Konzentrationsverhältnissen von etwa 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 und 1:10 mittels HRGC/HRGC-MS/CI (**Kap. 5.9.3**) vermessen. Die Auswertung der bei der Massenspektrometrie erhaltenen Chromatogramme erfolgte über die Peakflächen der relativen Intensitäten der Molekülpeaks. Im Falle von Diacetyl, 2,3-Pentandion, 2-Furanmethanol und 2-Furanmethanthiol erfolgte die Quantifizierung über die Fragmente bzw. Addukte mit der jeweils höchsten Intensität (**Kap. 2.2.1.3**).

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die Konzentrationsverhältnisse von Standard und Analyt gegen die entsprechenden Peakflächenverhältnisse aufgetragen. Die erhaltene Kalibriergerade verdeutlichte, ob im untersuchten Konzentrationsbereich die Peakflächenverhältnisse zu den Konzentrationsverhältnissen konstant blieben. Aus der Steigung der Geraden wurde der R_F erhalten (**Abb. 5.2**).

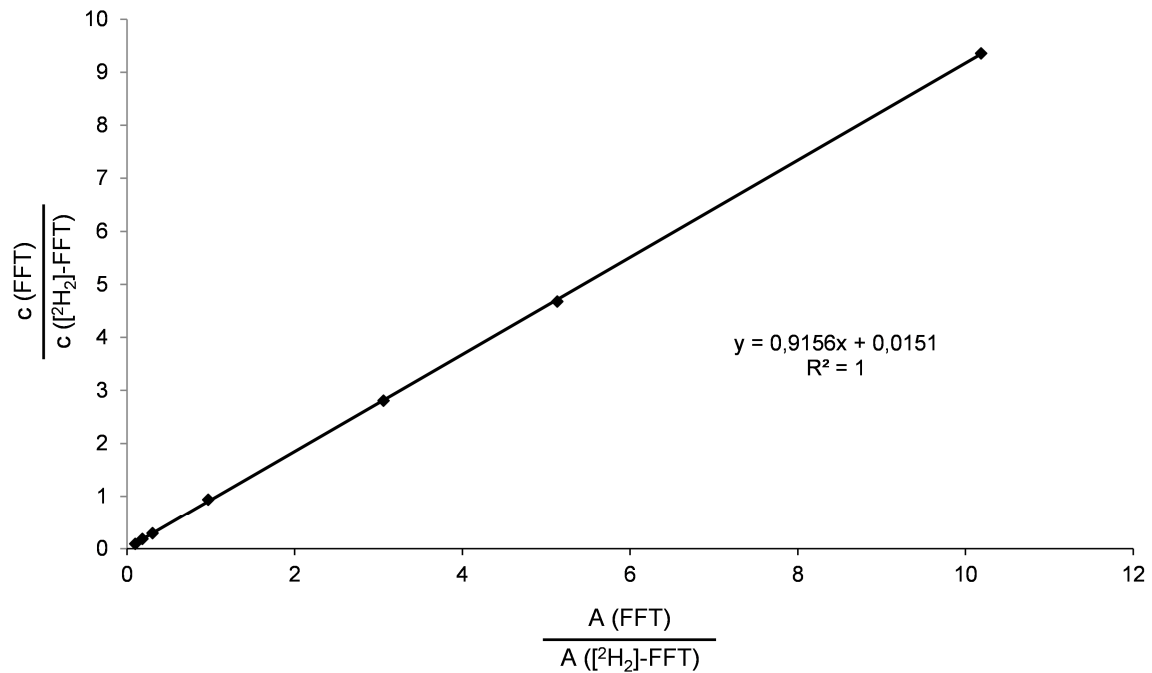


Abbildung 5.2 Kalibriergerade zur Responsefaktorbestimmung von 2-Furanmethanthiol (FFT) und $[\text{2H}_2]$ -2-Furanmethanthiol ($[\text{2H}_2]$ -FFT) bei der Massenspektrometrie (c = Konzentration; A = Peakfläche des jeweiligen Moleküls)

Der R_F stellt den Quotienten aus dem Massenverhältnis und dem Peakflächenverhältnis von zu analysierendem Aromastoff und isotoopenmarkiertem Aromastoff dar.

$$R_F = \frac{c(A) \times A(S)}{c(S) \times A(A)} \quad (3)$$

R_F Responsefaktor

$c(A)$ Konzentration des unmarkierten, zu analysierenden Aromastoffs [μg]

$A(S)$ Peakfläche des isotoopenmarkierten Standard-Aromastoffs

$c(S)$ Konzentration des isotoopenmarkierten Standard-Aromastoffs [μg]

$A(A)$ Peakfläche des unmarkierten, zu analysierenden Aromastoffs

Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über die zur Quantifizierung ausgewählten Massenspuren (m/z -Verhältnisse) der Aromastoffe, die entsprechenden stabilisotopenmarkierten Standards und die zugehörigen Responsefaktoren.

Tabelle 5.1 Isotopenmarkierte Standards, die zur Quantifizierung der Aromastoffe und der entsprechenden Standards herangezogenen Massenspuren mit dem jeweiligen m/z -Verhältnis sowie die Responsefaktoren R_F .

Nr.	Aromastoff (Analyt)	Isotopenmarkierter Standard	Massenspuren m/z		R_F
			Analyt	Standard	
3	2-Furanmethanthiol	[² H ₂]-2-Furanmethanthiol	81	83	0,96
5	3-(Methylthio)propanal	[² H ₃]-3-(Methylthio)propanal	105	108	1,04
6	2,3-Diethyl- 5-methylpyrazin	[² H ₃]-2,3-Diethyl- 5-methylpyrazin	151	154	1,04
14	2-Methoxyphenol	[² H ₃]-2-Methoxyphenol	125	128	0,90
15	4-Hydroxy-2,5-dimethyl- 3(2 <i>H</i>)-furanon	[¹³ C ₂]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl- 3(2 <i>H</i>)-furanon	129	131	0,97
16	4-Ethenyl- 2-methoxyphenol	[² H ₃]-4-Ethenyl- 2-methoxyphenol	151	154	1,10
19	4-Hydroxy- 3-methoxybenzaldehyd	[² H ₃]-4-Hydroxy- 3-methoxybenzaldehyd	153	156	0,97
24	Diacetyl	[¹³ C ₄]-Diacetyl	101	105	0,95
25	3-Methylbutanal	[² H ₂]-3-Methylbutanal	69	70+71	1,02
26	2-Methylbutanal	[² H ₂]-2-Methylbutanal	87	89	0,81
27	2,3-Pentandion	[¹³ C ₂]-2,3-Pentandion	115	117	0,88
28	2-Furancarbaldehyd	[¹³ C ₂]-2-Furancarbaldehyd	97	99	0,99
29	2-Furanmethanol	[¹³ C ₂]-2-Furanmethanol	81	83	0,96

Zu Beginn der Aufarbeitung zur quantitativen Bestimmung von Aromastoffen in verschiedenen Kaffee- und Senfproben wurde der Probe eine entsprechende Menge an isotopenmarkiertem Standard so zugesetzt, dass das Konzentrationsverhältnis von Analyt und Standard im linearen Bereich der jeweiligen Kalibriergerade lag.

Kaffee- und Senfpulver:

50 mg bis 10 g Kaffeepulver bzw. 300 mg bis 2 g Senfprobe wurden nach Zugabe von 50 bis 200 ml Dichlormethan mit 0,2 bis 10 µg der entsprechenden isotopenmarkierten Standards versetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog **Kapitel 5.5**.

In Sonnenblumenöl geröstete Kaffee- und Senfpulver:

100 mg bis 2 g Kaffeeprobe bzw. 10 mg bis 1 g Senfprobe wurden in 10 ml Sonnenblumenöl geröstet. Nach Abkühlen der öligen Suspension und Überführung in einen Iodzahlkolben mit Hilfe von 50 ml Diethylether wurden 0,5 bis 5 µg der

entsprechenden isotoopenmarkierten Standards zugesetzt und anschließend analog **Kapitel 5.5** verfahren.

Kaffeegetränke:

Nach dem Temperieren der frisch zubereiteten Kaffeegetränke auf 30 °C wurden je nach zu quantifizierendem Aromastoff 1 bis 300 ml Kaffeegetränk mit 400 ml n-Pentandithylether-Gemisch (2+1, V+V; 2-Furanmethanthiol), 500 ml Dichlormethan (3-(Methylthio)propanal und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin) oder 5 bis 400 ml wassergesättigtem Diethylether (alle weiteren Aromastoffe) versetzt und 0,2 bis 10 µg des jeweiligen stabilisotoopenmarkierten Standards zugegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog **Kapitel 5.5**.

Headspaceproben:

0,5 bis 1,5 µg der isotoopenmarkierten Standards wurden direkt zu 1 bis 4 g Kaffeepulver bzw. 2,5 bis 10 ml Kaffeegetränk in ein 120 ml-Headspace-Analysengefäß gegeben und gut homogenisiert. Vor der Analyse wurde zwei Stunden äquilibriert (**Kap. 5.5.2**).

Zur Quantifizierung wurden Aliquote (1-4 µl) der konzentrierten, nach **Kapitel 5.5** erhaltenen Aromaextrakte bzw. bei Headspaceanalysen 0,5 bis 20 ml des Kopfraums mittels HRGC/HRGC-MS/CI (**Kap. 5.9.3**) bzw. Headspace-HRGC-MS/CI (**Kap. 5.9.2**) vermessen. Die Detektion von Analyt und Standard erfolgte mittels Massenspektrometrie im CI-Modus. Die quantitative Auswertung wurde hierbei über die Peakflächen der relativen Intensitäten der in **Tabelle 5.1** genannten Massenspuren (m/z -Verhältnis, **Abb. 5.3**) vorgenommen.

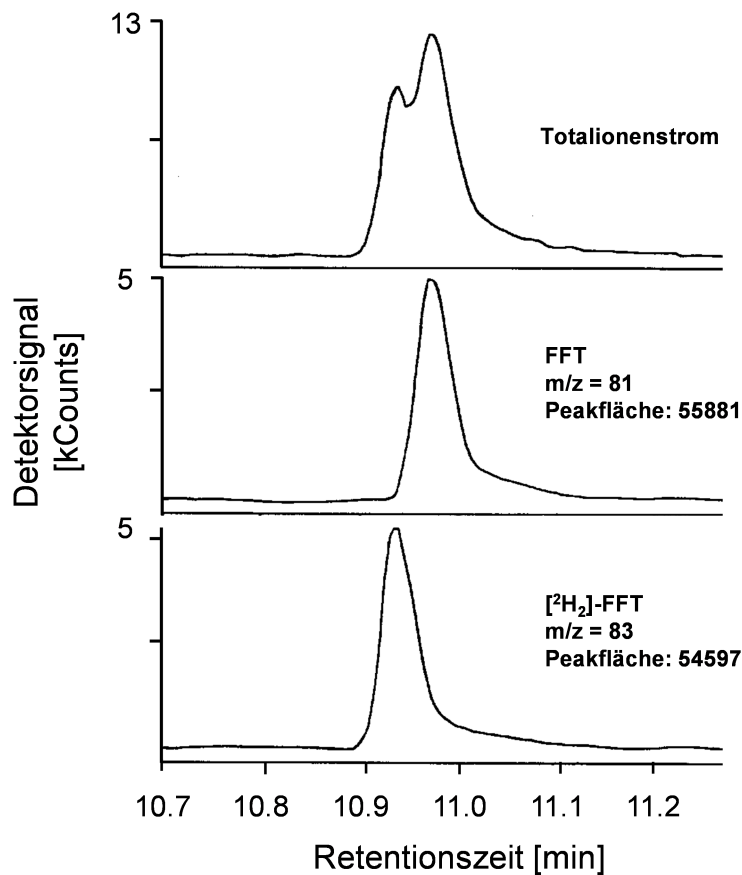


Abbildung 5.3 Totalionenstrom und Massenspuren für 2-Furanmethanthiol (FFT, $m/z = 81$) sowie $[^2\text{H}_2]$ -2-Furanmethanthiol ($[^2\text{H}_2]$ -FFT, $m/z = 83$) bei der Quantifizierung mittels HRGC/HRGC-MS/CI.

Mit Hilfe des aus der Kalibriergeraden erhaltenen Responsefaktors R_F konnte die unbekannte Konzentration des Aromastoffs in der Probe anhand folgender Formel (4) berechnet werden:

$$c(A) = \frac{R_F \times m(S) \times A(A)}{A(S) \times E} \quad (4)$$

$c(A)$ Konzentration des zu analysierenden Aromastoffs [$\mu\text{g}/\text{kg}$]

R_F Responsefaktor

$m(S)$ Masse des eingesetzten isotonenmarkierten Aromastoffs (Standard) [μg]

$A(A)$ Peakfläche des zu analysierenden Aromastoffs

$A(S)$ Peakfläche des isotonenmarkierten Aromastoffs (Standard)

E Einwaage der Probe [kg]

5.8.3.2 D-Ribose

Die Quantifizierung des Monosaccharids D-Ribose erfolgte nach Wasserextraktion der Senf- und Kaffeeproben mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) unter Verwendung des isotopenmarkierten Standards [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose. Zur Optimierung der HPLC-MS/MS-Methode wurden Lösungen von D-Ribose und [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose per Direkteinlass massenspektrometrisch vermessen (**Kap. 5.9.7**). Für die Quantifizierung im MS/MS (SRM-Modus) wurden die Massenübergänge (m/z - m/z) 149 à 89 und 149 à 113 für D-Ribose bzw. 154 à 92 und 154 à 118 für [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose herangezogen (**Kap. 2.2.1.3** und **Kap. 5.9.7** sowie **Abb. 2.7** und **Abb. 2.9**).

Für die Ermittlung des Responsefaktors R_F wurden Lösungen von D-Ribose und [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose in einer Mischung aus Millipore-Wasser und Acetonitril (1+1, V+V), das mit 0,1 % Ameisensäure angesäuert war, in den Konzentrationsverhältnissen von 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 und 1:10 mittels HPLC-MS/MS (**Kap. 5.9.7**) vermessen. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die Konzentrationsverhältnisse gegen die entsprechenden Peakflächenverhältnisse aufgetragen. Aus der Steigung der Kalibriergerade konnte der R_F abgelesen werden (**Abb. 2.8**).

Bei der zugegeben Menge des isotopenmarkierten Standards wurde beachtet, dass das Konzentrationsverhältnis zwischen D-Ribose und [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose im linearen Bereich der Kalibriergerade lag. Hierzu wurden 250 mg bis 10 g der jeweiligen Probe mit je 5 bis 50 ml Millipore-Wasser versetzt, 10 bis 50 μg des isotopenmarkierten Standards [$^{13}\text{C}_5$]-D-Ribose zugegeben und 30 Minuten extrahiert. Gegebenenfalls nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile wurde die Lösung für eine Stunde bei 4500 Umdrehungen/min ultrazentrifugiert (20 ml, Abtrennung bis zu einem Molekulargewicht von 3000 Da, Sartorius, Göttingen), das Filtrat mit Acetonitril verdünnt (1+1, V+V) und ein Aliquot der Mischung (10-20 μl) zur HPLC-MS/MS-Messung herangezogen.

Die Berechnung der Konzentration an D-Ribose erfolgte abschließend mit Hilfe der Formel (4) analog **Kapitel 5.8.3.1**. Hierzu wurden die Peakflächen der relativen Intensitäten der Massenübergänge 149 à 89 und 154 à 92 integriert.

5.8.3.3 L-Cystein

Die frei vorliegende oder nach salzsaurer Hydrolyse freigesetzte Aminosäure L-Cystein wurde nach Derivatisierung mit Dansylchlorid mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) mit Hilfe des isotopenmarkierten Standards [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-L-Cystein quantifiziert. Diese Methode wurde auch zur Konzentrationsbestimmung des isotopenmarkierten [^{34}S]-L-Cysteins (**Kap. 5.8.2.2**) und zur Bestimmung der Stoffmengenverhältnisse zwischen L-Cystein und [^{34}S]-L-Cystein (**Kap. 5.8.3.4**) angewandt. Zur Optimierung der HPLC-MS/MS-Methode wurden Lösungen von derivatisiertem L-Cystein, derivatisiertem [^{34}S]-L-Cystein und derivatisiertem [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-L-Cystein mittels Direkteinlass massenspektrometrisch vermessen. Zur Quantifizierung im MS/MS (SRM-Modus) wurden die Massenübergänge (m/z - m/z) 413 à 252 und 413 à 170 für L-Cystein, 415 à 252 und 415 à 170 für [^{34}S]-L-Cystein sowie 417 à 252 und 417 à 170 für [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-L-Cystein verwendet (**Kap. 2.2.1.4** und **Kap. 5.9.7** sowie **Abb. 2.15** und **Abb. 2.20**).

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden Lösungen von L-Cystein und [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-L-Cystein in Millipore-Wasser in den Konzentrationsverhältnissen von 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 und 1:10 hergestellt und analog Reinbold et al. (2008) derivatisiert. Die Lösung wurde hierbei zur Spaltung vorhandener Disulfidbindungen mit 200 μl einer Lösung an Triscarboxyethylphosphin in 0,1%iger, wässriger Ameisensäurelösung (6,0 mg/ml) versetzt und 15 Minuten gerührt. Anschließend wurden 600 μl einer Iodethansäure-Lösung in Borsäure/Lithiumhydroxid-Puffer (pH 8,5, 3,0 mg/ml) zum Schutz der frei vorliegenden Thiolgruppen zugegeben und die Lösung 30 Minuten im Dunklen gerührt. Nach Überprüfung und gegebenenfalls Korrektur des pH-Werts mit 0,5 molarer Natriumhydroxidlösung auf $8,5 \pm 0,5$ erfolgte die Derivatisierung der Aminogruppe mit Dansylchlorid durch einstündiges Rühren im Dunklen nach Zugabe von 500 μl einer Dansylchloridlösung in Acetonitril (1,0 mg/ml, Reaktion **Abb. 2.14**). Zum Abbruch der Reaktion wurden letztlich 800 μl Chloroform zugesetzt und der Reaktionsansatz geschüttelt, um überschüssiges Dansylchlorid abzutrennen. Die zweiphasige Emulsion wurde bei 4500 Umdrehungen/min für 20 Minuten zentrifugiert (Jouan GR 412, gekühlte Zentrifuge, Thermo, Dreieich). Die wässrige Phase wurde filtriert (0,45 μm , Spartan 13/0,45RC, Whatman[®], Whatman GmbH Dassel) und vom

erhaltenen Filtrat ein Aliquot (10-20 μ l) per HPLC-MS/MS (**Kap. 5.9.7**) vermessen. Anschließend wurden die Konzentrationsverhältnisse gegen die entsprechenden Peakflächenverhältnisse aufgetragen und der R_F aus der Steigung der Kalibriergeraden ermittelt (**Abb. 2.16**).

Die für die Quantifizierungen jeweils zugesetzten Mengen an isotopenmarkiertem Standard wurden so gewählt, dass das Konzentrationsverhältnis zwischen L-Cystein bzw. [^{34}S]-L-Cystein und [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-L-Cystein im linearen Bereich der Kalibriergerade lag. Bei der Bestimmung von frei vorliegendem L-Cystein wurden 20 mg bis 1 g Rohkaffee bzw. Senfprobe mit 0,2 bis 5 ml Millipore-Wasser nach Zugabe von 0,5 bis 5 μ g [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-L-Cystein für 15 Minuten gerührt. Gegebenenfalls nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile wurde die Lösung für eine Stunde bei 4500 Umdrehungen/min ultrazentrifugiert (20 ml, Abtrennung bis zu einem Molekulargewicht von 3000 Da). Das Filtrat wurde anschließend zur Derivatisierung analog den Kalibrierlösungen herangezogen.

Zur Quantifizierung des Gesamtgehalts an L-Cystein nach Proteinhydrolyse wurden 10 bis 100 mg Kaffee- bzw. Senfprobe mit 0,2 bis 1 ml Millipore-Wasser angeschlämmt und 10 bis 100 μ g [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-L-Cystein zugegeben. Anschließend erfolgte eine dem freien L-Cystein entsprechende Umsetzung mit Triscarboxyethylphosphin- und Iodethansäure-Lösung. Die Reaktionsmischung wurde dann mit 200 μ l Salzsäure (6 mol/l) versetzt und im verschlossenen Sovirelglas für 20 Stunden in einem 110 °C heißen Ölbad im Dunklen hydrolysiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Hydrolysat zunächst zentrifugiert (20 Minuten, 4500 Umdrehungen/min), der Überstand in ein Ultrazentrifugationsgefäß (20 ml, Abtrennung bis zu einem Molekulargewicht von 3000 Da) gegeben und für eine Stunde bei 4500 Umdrehungen/min erneut zentrifugiert. Das Filtrat wurde mit einigen Tropfen Natriumhydroxidlösung (2,5 mol/l) auf einen pH-Wert von $8,5 \pm 0,5$ eingestellt und anschließend mit 500 μ l einer Dansylchloridlösung in Acetonitril (2,0 mg/ml) eine Stunde im Dunklen gerührt. Zur Beendigung der Derivatisierung wurde 1,0 ml Chloroform zugesetzt und der Reaktionsansatz geschüttelt. Mit der erhaltenen Emulsion wurde analog der Bestimmung von freiem L-Cystein weiter verfahren. Die filtrierten Lösungen wurden für die HPLC-MS/MS-Messungen gegebenenfalls mit Millipore-Wasser 1:10 oder 1:100 verdünnt.

Die Berechnung der unbekanntenen Mengen an L-Cystein bzw. [³⁴S]-L-Cystein erfolgte abschließend mit Hilfe der Formel (4) analog **Kapitel 5.8.3.1**. Hierfür wurden die Peakflächen der relativen Intensitäten der Massenübergänge 413 à 252 bzw. 415 à 252 und 417 à 252 integriert.

5.8.3.4 Berechnung von Stoffmengenverhältnissen

Da bei einer massenspektrometrischen Detektion die relative Intensität der Massenspur (*m/z*-Verhältnis) einer Verbindung direkt proportional zu ihrer Stoffmenge ist, wurde im Zuge der Isotopenanreicherungsversuche (**Kap. 2.2.1.3**, **Kap. 2.2.1.4** und **Kap. 2.2.2.7**) das Peakflächenverhältnis der beiden Verbindungen für die Bestimmung der Stoffmengenverhältnisse von unmarkierter und markierter Substanz berechnet.

Die Bestimmung der Verhältnisse von D-Ribose und [¹³C₅]-D-Ribose sowie L-Cystein und [³⁴S]-L-Cystein erfolgte analog den in **Kapitel 5.8.3.2** und **Kapitel 5.8.3.3** genannten Aufarbeitungen, jedoch ohne Zugabe der üblicherweise zur Quantifizierung verwendeten isotopenmarkierten Standards [¹³C₅]-D-Ribose bzw. [¹³C₃,¹⁵N]-L-Cystein. Zur Berechnung der Stoffmengenverhältnisse wurden die per HPLC-MS/MS-Messung erhaltenen Peakflächen herangezogen.

Die mit stabilisotopenmarkierten Substanzen angereicherten Rohkaffees oder Senffractionen wurden anschließend geröstet und die jeweiligen Proben analog **Kapitel 5.8.3.1** zur Bestimmung der Aromastoffe aufgearbeitet, jedoch ebenfalls ohne Zugabe der üblicherweise zur Quantifizierung verwendeten stabilisotopenmarkierten Standards. Die Stoffmengenverhältnisse von 2-Furanmethanthiol zu [³⁴S]-2-Furanmethanthiol bzw. zu [¹³C₅]-2-Furanmethanthiol, von 2-Furanmethanol zu [¹³C₅]-2-Furanmethanol sowie von 2-Furancarbaldehyd zu [¹³C₅]-2-Furancarbaldehyd wurden anhand der über HRGC/HRGC-MS/CI-Messung erhaltenen Peakflächen berechnet (**Kap. 2.2.1.3**, **Kap. 2.2.1.4** und **Kap. 2.2.2.7**).

5.8.3.5 Berechnung von Extraktionsraten

Zur Berechnung der Extraktionsrate eines Aromastoffs bei der Herstellung eines Kaffeegetränks wurden zunächst die Aromastoffgehalte im zur Herstellung des

Kaffeegetränks verwendeten Röstkaffeepulver nach **Kapitel 5.8.3.1** quantifiziert. Weiterhin wurde die nach der Getränkezubereitung erhaltene Menge des jeweiligen Getränks bestimmt. Aus einem abgewogenen Aliquot des Kaffeegetränks wurden schließlich die Aromastoffgehalte analog **Kapitel 5.8.3.1** bestimmt. Anschließend wurden die Extraktionsraten mit folgender Formel (5) berechnet:

$$ER = \frac{m_A \times m_G}{m_{Ali} \times m_P \times c_P} \quad (5)$$

ER	Extraktionsrate
m_A	Menge des zu analysierenden Aromastoffs im Aliquot des Getränks [μg]
m_G	Menge des zubereiteten Kaffeegetränks [kg]
m_{Ali}	Menge des zur Quantifizierung verwendeten Aliquots des Getränks [kg]
m_P	Menge des zur Herstellung des Getränks eingesetzten Kaffeepulvers [kg]
c_P	Konzentration des zu analysierenden Aromastoffs im Kaffeepulver [$\mu\text{g}/\text{kg}$]

5.9 Analytisch-instrumentelle Methoden

5.9.1 Kapillargaschromatographie

5.9.1.1 Kapillargaschromatographie-Flammenionisationsdetektion und Kapillargaschromatographie-Olfaktometrie

Für die Untersuchung von Aliquoten (0,5 bis 4 μl) der gemäß **Kapitel 5.5** erhaltenen Lösungsmittelextrakte wurde ein Gaschromatograph vom Typ Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) mit cold-on-column-Injektor sowie Flammenionisationsdetektor (HRGC-FID) und „Sniffing-Port“ zur olfaktometrischen Detektion (HRGC-O) verwendet. Der „Sniffing-Port“ bestand aus einem auf 250 °C geheizten Aluminiumelement mit Bohrung zur Aufnahme der Kapillare. Die cold-on-column-Injektion bei 40 °C wurde angewandt, um eine Zerstörung thermolabiler Substanzen und die Bildung von Artefakten, die bei Verwendung beheizter Injektorsysteme auftreten können, zu vermeiden. Für die gaschromatographische Trennung kamen folgende Kapillarsäulen zum Einsatz:

FFAP:	30 m x 0,32 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Filmdicke (J&W Scientific, Agilent Technologies, Waldbronn)
DB-5:	30 m x 0,32 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Filmdicke (J&W Scientific, Agilent Technologies, Waldbronn)

Zum Abfangen möglicher Verunreinigungen war nach dem Injektor eine inaktivierte Fused Silica-Kapillare (5 m x 0,25 mm Innendurchmesser) der Trennkapillarsäule vorgeschaltet (Vorsäule, J&W Scientific, Agilent Technologies, Waldbronn). Am Ende der Trennkapillare wurde der Trägergasstrom im Säulenofen durch einen y-förmigen Glassplitter (Chrompack, Frankfurt am Main) im Verhältnis 1:1 aufgetrennt und über zwei weitere Kapillaren aus inaktiviertem Fused Silica (je 0,5 m x 0,25 mm Innendurchmesser) zum FID und dem „Sniffing-Port“ geleitet. Während der FID alle oxidierbaren, organischen Verbindungen erfasste, wurden am „Sniffing-Port“ über Olfaktometrie nur geruchsaktive Substanzen detektiert. Wegen der zeitgleichen Detektion konnten die geruchsaktiven Bereiche im FID-Chromatogramm, das mit einem Schreiber (Servogor 124 LEM, ABB Metrawatt, Nürnberg) aufgezeichnet wurde, markiert werden. Mit diesem Verfahren wurden die geruchsaktiven Aromastoffe von den geruchsinaktiven Substanzen differenziert und über ihren linearen Retentionsindex auf der jeweiligen Trennkapillare (**Kap. 5.7.1**) und ihre Geruchsqualität charakterisiert. Auch hochpotente geruchsaktive Substanzen, die lediglich in Konzentrationen vorlagen, die kein Signal am FID hervorriefen, wurden auf diese Weise erfasst.

HRGC-Parameter:

Trägergas:	Helium (Vordruck FFAP: 85 kPa; Vordruck DB-5: 120 kPa)
Temperaturprogramm:	Starttemperatur: 40 °C (2 min), Heizrate: 6 °C/min, Endtemperatur: 230 °C (5 min)
FID-Temperatur:	250 °C
FID-Brenngase:	Wasserstoff (Fluss: 20 ml/min) und Luft (Fluss: 200 ml/min)
FID-Make-up-Gas:	Stickstoff (Fluss: 30 ml/min)
Schreiberabschwächung:	10 mV bis 100 mV
Papiervorschub:	1 bis 2 cm/min

Für die Konzentrationsbestimmungen von Lösungen isotopenmarkierter Standards (**Kap. 5.8.2.1**) kam ein Gaschromatograph Trace GC mit Autosampler AS 2000, cold-on-column-Injektor und FID (alle: Thermo Fisher Scientific, Dreieich) zum Einsatz. Das

Signal des FID wurde mit Hilfe der Software Chrom-Card Data System (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) aufgezeichnet. Die zur Trennung verwendeten Kapillarsäulen sowie die GC-Parameter entsprachen den oben genannten. Als Vorsäule kam hier eine inaktivierte Fused Silica-Kapillare (5 m) mit 0,53 mm Innendurchmesser (J&W Scientific, Agilent Technologies, Waldbronn) zum Einsatz. Das verwendete Temperaturprogramm entsprach dem oben genannten.

5.9.1.2 Headspace-HRGC-FID und Headspace-HRGC-O

Für die Untersuchung leichtflüchtiger Aromastoffe wurde ein Gaschromatograph vom Typ Trace GC Ultra mit cold-on-column-Injektor, split-/splitless-Injektor, Ofenkühlung, Kühlfalle Cold Trap 915, FID (alle: Thermo Fisher Scientific, Dreieich), „Sniffing-Port“ und Combi-PAL Autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) verwendet. 0,1 bis 20 ml Gasvolumen bzw. im Falle einer Flüssiginjektion 0,5 bis 2 µl Lösungsmittel-extrakt wurden injiziert und zunächst auf einer unbeschichteten, beheizbaren Fused Silica-Kapillare (0,4 m x 0,53 mm Innendurchmesser) mit flüssigem Stickstoff bei -150 °C kryofokussiert. Durch schnelles Erhitzen mit einer Heizrate von 15 °C/min auf 250 °C wurden die Aromastoffe anschließend thermodesorbiert und gelangten mit dem Trägergas auf die Trennkapillare. Für die Trennung wurde die in **Kapitel 5.9.1.1** genannte DB-5-Säule verwendet. Am Ende der Kapillarsäule wurde der Trägergasstrom analog **Kapitel 5.9.1.1** zum FID und „Sniffing Port“ gesplittet. Die Aufzeichnung des FID-Chromatogramms erfolgte mit Hilfe der Software Chrom-Card Data System (Thermo Fisher Scientific, Dreieich).

Headspace-HRGC-Parameter:

Trägergas:	Helium (Vordruck: 100 kPa)
Temperaturprogramm:	Starttemperatur: 0 °C (3 min), Heizrate: 6 °C/min, Endtemperatur: 200 °C (5 min)
Sniffing-Port-Temperatur:	250 °C
FID-Temperatur:	250 °C
FID-Brenngase:	Wasserstoff (Fluss: 35 ml/min) und Luft (Fluss: 250 ml/min)
FID-Make-up-Gas:	Stickstoff (Fluss: 30 ml/min)

5.9.2 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie

Zur Identifizierung und Quantifizierung von flüchtigen Verbindungen und Aromastoffen wurden Systeme angewandt, bei denen Kapillargaschromatographie und Massenspektrometrie gekoppelt waren (HRGC-MS). Die Dimensionen der jeweils verwendeten Kapillarsäulen entsprachen, wenn nicht explizit aufgeführt, den in **Kapitel 5.9.1.1** beschriebenen, ebenso wie die Temperaturprogramme für die Gaschromatographie.

System I, MAT 95 S:

Im Rahmen der Identifizierung von Aromastoffen wurde ein Gaschromatograph 5890 Series II (Hewlett Packard, Waldbronn) in Verbindung mit einem Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95 S (Finnigan MAT, Bremen) verwendet. Die Aufnahme der EI-Spektren erfolgte bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV, die der CI-Spektren bei 115 eV, wobei Isobutan als Reaktandgas diente. Die Injektion der Aliquote (0,5 bis 2 µl) erfolgte cold-on-column, als Trägergas diente Helium. Zur Auswertung der Massenspektren wurde die Software Icis (Version 8.3, Finnigan MAT, Bremen) herangezogen.

System II, MD 800:

Synthesewenigenprodukte sowie Syntheseprodukte wurden an einem HRGC-MS-System überprüft, das aus einem Gaschromatographen vom Typ GC 8000 Series und einem Quadrupol Massenspektrometer MD 800 (beide: Fisons Instruments, Mainz) bestand. Die Detektion erfolgte im EI-Modus bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV. Hierbei wurden Aliquote der Syntheselösungen (0,5 bis 2 µl) bei einem Split-Verhältnis von 1:20 auf eine ZB-1701-Kapillarsäule (30 m x 0,32 mm Innendicke; 0,25 µm Filmdicke; Phenomenex®, Aschaffenburg) injiziert, als Trägergas diente Helium. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit der Software Masslab (Version 1.4, Fisons Instruments, Mainz).

System III, Saturn 2100 T:

Für die massenspektrometrische Identifizierung und Quantifizierung besonders leichtflüchtiger Substanzen (Headspace-HRGC-MS) wurde der in **Kapitel 5.9.1.2** beschriebene Gaschromatograph vom Typ Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific,

Dreieich) und Combi-PAL Autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer Saturn 2100 T (Varian, Darmstadt) gekoppelt. Die Aufnahme der Spektren im EI-Modus erfolgte bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV, im CI-Modus bei 70 eV mit Methanol als Reaktandgas. Zur Auswertung der Massenspektren diente die Software MS Workstation (Version 6.4, Varian, Darmstadt).

5.9.3 Zweidimensionale Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie

Aromaaktive Minorkomponenten können bei einer eindimensionalen gaschromatographischen Trennung von coeluerenden Verbindungen überlagert werden. Zum Erhalt charakteristischer Massenspektren oder Molekülpeaks dieser Verbindungen wurde deshalb ein zweidimensionales Gaschromatographie-System verwendet, bei dem zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität hintereinandergeschaltet und mit einem Massenspektrometer gekoppelt waren (HRGC/HRGC-MS, **Abb. 5.4**). Somit wurden sowohl die chromatographische Trennleistung als auch die Messempfindlichkeit erhöht.

Mit Hilfe eines Combi-PAL Autosamplers (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) wurden Aliquote (1 bis 4 μ l) der konzentrierten Lösungsmittlextrakte cold-on-column auf die erste Trennkapillare injiziert. Im ersten GC-Ofen (Trace GC Ultra, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) wurde eine polare Säule (FFAP; 30 m x 0,32 mm Innendurchmesser; 0,25 μ m Filmdicke; J&W Scientific, Agilent Technologies, Waldbronn) in Kombination mit einer inaktivierten Vorsäule (5 m x 0,53 mm Innendurchmesser; J&W Scientific, Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Am Ende der ersten Kapillarsäule im ersten GC-Ofen wurde mittels eines Moving Column Stream Switching (MCSS) Systems (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) geregelt, ob das Eluat über eine Transferkapillare auf die zweite Kapillarsäule in den zweiten GC-Ofen oder zu FID und „Sniffing-Port“ des ersten GC-Ofens geleitet wurde.

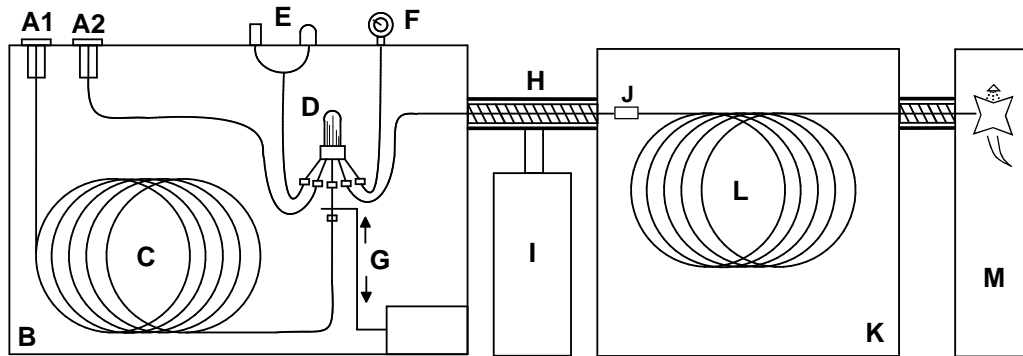


Abbildung 5.4 Schematische Darstellung des HRGC/HRGC-MS-Systems

- A1: On-Column-Injektor
- A2: Injektor zur Aufrechterhaltung des Trägergasdrucks im MCSS-System
- B: erster Gaschromatograph des Systems
- C: erste Kapillartrennsäule
- D: MCSS-System
- E: FID und Sniffing-Port
- F: Manometer zur Druckkontrolle des MCSS-Systems
- G: mechanische Steuereinheit des MCSS-Systems
- H: Transferkapillare
- I: Steuereinheit zur Thermostatisierung der Transferkapillare
- J: Kühlfalle
- K: zweiter Gaschromatograph des Systems
- L: zweite Kapillartrennsäule
- M: Ionenfallen-Massenspektrometer

Mittels HRGC-O und HRGC-FID wurden zunächst Lösungen von Referenzsubstanzen der zu analysierenden Verbindungen in einer Konzentration von 50 bis 100 µg/ml in Dichlormethan vermessen, um ihre Retentionszeiten zu bestimmen. Das FID-Chromatogramm wurde hierfür mittels der Software Chrom-Card Data System (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) aufgezeichnet. Über diese Software konnte außerdem die mechanische Steuereinheit des MCSS-Systems (**Abb. 5.5**) programmiert werden.

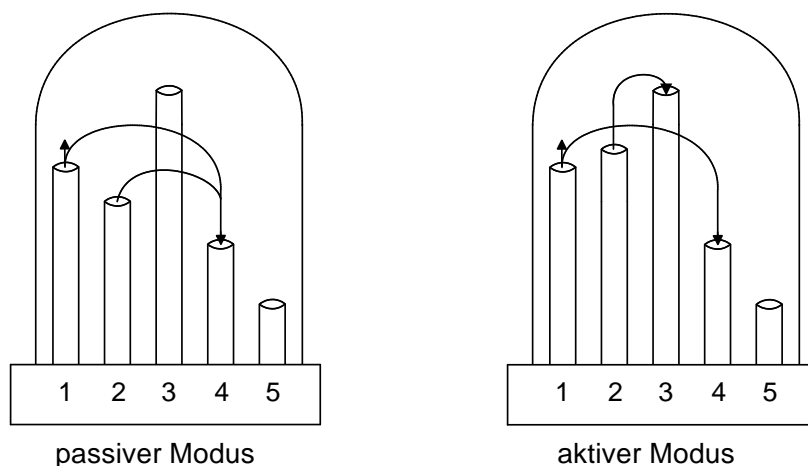


Abbildung 5.5 Schematische Darstellung des Moving Column Stream Switching (MCSS)-Systems (Buchstabencodierung gemäß **Abbildung 5.4**).

- 1: Heliumzuleitung von A2
- 2: Säulenende der Kapillartrennsäule C
- 3: Transferkapillare H
- 4: Zuleitung zu FID und Sniffingport E
- 5: Kapillare zum Manometer F

Im passiven Modus waren die Kapillaren des MCSS-Systems so angeordnet, dass das vom Injektor zugeleitete Helium in der Kuppel des „Doms“ als Barriere wirkte und das Säuleneluat zu FID und „Sniffing-Port“ leitete. Mittels der fünften, mit einem Manometer verbundenen Kapillare, wurde der Druck des Systems kontrolliert. Zur Retentionszeit der zu analysierenden Verbindung („Cut“) wurde der aktive Modus des Systems initiiert, bei dem das Ende der Trennkapillare vertikal verschoben wurde und somit das Säuleneluat auf die Transferkapillare umgeleitet wurde, wodurch es auf die zweite Trennkapillare im zweiten GC-Ofen gelangen konnte. Um sicherzustellen, dass die Zielverbindungen quantitativ auf die zweite Trennsäule gelangten, war die Transferkapillare von einem Schlauch ummantelt, der mittels einer Steuereinheit auf 250 °C beheizt wurde. Im zweiten GC-Ofen (CP 3800, Varian, Darmstadt) wurde das Säuleneluat zunächst in einer Kühlfalle (SGE, Griesheim) mit Hilfe von flüssigem Stickstoff kryofokussiert. Nach dem Ende des „Cuts“ wurden die Verbindungen thermodesorbiert und über die zweite, unpolare Trennkapillare (DB-1701; 30 m x 0,25 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Filmdicke; J&W Scientific, Agilent Technologies, Waldbronn) erneut gaschromatographisch getrennt. Das Säulenende der zweiten Trennkapillare war mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer vom Typ Saturn 2200

(Varian, Darmstadt) verbunden, das im EI- und CI-Modus jeweils mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV betrieben wurde. Als Reaktandgas zur Chemischen Ionisation diente Methanol. Die Auswertung der erhaltenen Massenspektren erfolgte mit Hilfe der Software MS Workstation (Version 6.4, Varian, Darmstadt).

Die Temperaturprogramme in beiden GC-Dimensionen wurden je nach zu analysierender Verbindung angepasst. Die Starttemperatur betrug dabei zwischen 35 und 40 °C und wurde für 2 bis 5 Minuten gehalten. Die Erhöhung der Temperatur erfolgte bei einem Gradienten von 4 bis 10 °C/min bis zu einer Endtemperatur von 230 °C, die für 2 bis 10 Minuten konstant gehalten wurde.

5.9.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Zur chromatographischen Überprüfung des Synthesewenigprodukts [³⁴S]-Benzyl-L-cystein (**Kap. 5.3.6**) wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Das HPLC-System (Bio-Tek Kontron Instruments, Eching) bestand aus zwei Pumpen (Typ 522), einem UV-Detektor (Typ 535) und einem Rheodyne-Injektor (7725i) mit einer 100 µl-Probenschleife. Die Steuerung des Systems und die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Kroma System 2000.

Zur Trennung von 100 µl der Syntheselösung bei einem Fluss von 1,6 ml/min kam als stationäre Phase eine Nucleosil 100-5 RP-18-Edelstahlsäule (250 x 8 mm, 5 µm, Macherey-Nagel, Düren) mit RP-18-Vorsäule (4 x 3 mm, Phenomenex®, Aschaffenburg) zum Einsatz. Das Fließmittelgemisch (**Tab. 5.2**) setzte sich aus mit jeweils 0,1 % Ameisensäure angesäuertem Millipore-Wasser (Fließmittel A) und Methanol Lichrosolv (Fließmittel B) zusammen. Die Detektion am UV-Detektor erfolgte bei 210 und 254 nm. Für massenspektrometrische Untersuchungen wurden ausgewählte Teile des Eluats gesammelt und nach **Kapitel 5.9.6** bzw. **Kapitel 5.9.7** analysiert.

Tabelle 5.2 Gradientenprogramm für HPLC-Messungen. Fließmittel A: 0,1% Ameisensäure in Millipore-Wasser, Fließmittel B: 0,1% Ameisensäure in Methanol.

Zeit [min]	Anteil Fließmittel A [%]	Anteil Fließmittel B [%]
0	100	0
5	100	0
24	0	100
33	0	100
39	100	0
45	100	0

5.9.5 Flash-Chromatographie

Für die Aufreinigung des Synthesezwischenprodukts [³⁴S]-Benzyl-L-cystein bzw. zur Fraktionierung des niedermolekularen Anteils der wasserlöslichen Senffraktion wurde ein Flash-Chromatographiesystem (Mitteldruckflüssigkeitschromatographie) von Büchi (Flawil, Schweiz) verwendet, welches aus einer Kontrolleinheit (Typ C-620), zwei Pumpen (Typ C-605), einem UV/VIS-Detektor (Typ C-635) und einem Fraktionssammler (Typ C-660) bestand. Die Trennung erfolgte über eine mit Lichroprep® RP-18-Säulenmaterial befüllte Polypropylenkartusche (150 x 40 mm) mit einem Fließmittelgemisch aus mit jeweils 0,1 % Ameisensäure angesäuertem Millipore-Wasser (Fließmittel A) und Methanol Lichrosolv (Fließmittel B, **Tab. 5.3**).

Tabelle 5.3 Gradientenprogramm der Flash-Chromatographie. Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure in Millipore-Wasser, Fließmittel B: 0,1 % Ameisensäure in Methanol.

Zeit [min]	Anteil Fließmittel A [%]	Anteil Fließmittel B [%]
0	95	5
5	95	5
30	0	100
38	0	100
48	95	5
53	95	5

1 bis 10 ml der Syntheselösung bzw. 50 bis 250 mg Probensubstanz, gelöst in 10 bis 20 ml Millipore-Wasser, wurden über eine 20 ml-Probenschleife injiziert und mit einem Fluss von 40 ml/min eluiert. Die Aufnahme des UV-Signals erfolgte bei 254 nm. Für die Steuerung des Systems und die Auswertung der Chromatogramme wurde die Software SepacoreControl (Version 1.0, Büchi, Flawil, Schweiz) verwendet. Die Fraktionen wurden in Portionen zu maximal 50 ml gesammelt.

5.9.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

Nicht flüchtige Verbindungen konnten durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, gekoppelt mit einem Massenspektrometer (HPLC-MS), charakterisiert werden. Die chromatographische Trennung wurde mit den gleichen Bedingungen bzgl. stationärer Phase, mobiler Phase und Fließmittelgradient, die bei der HPLC-UV angewandt worden waren, durchgeführt. Hierfür wurde eine Thermo Separations HPLC Anlage mit Pumpe P4000 und Niederdruckgradientenmischer, Autosampler AS 3000 und UV-Detektor UV 1000 verwendet, die mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer LCQ Classic (alles Finnigan MAT, Bremen) gekoppelt war. Das Injektionsvolumen der zu vermessenden Lösungen betrug 50 μ l. Die massenspektrometrischen Messungen wurden im Elektronensprayionisations-Modus mit positiver Polarisierung (ESI-positiv-Modus) und im Fullscan-Modus (80 bis 500 amu) durchgeführt. Die hierfür notwendigen Bedingungen zeigt **Tabelle 5.4**. Die Auswertungen der Massenchromatogramme erfolgten mit der Software XCaliburTM (Thermo Scientific, Dreieich).

Tabelle 5.4 Parameter der HPLC-MS-Messung im ESI-positiv-Modus.

Source Voltage [V]	4500
Source Current [μ A]	80
Sheath Gas Flow [arb]	80
Aux Gas Flow [arb]	20
Capillary Temperature [$^{\circ}$ C]	200
Capillary Voltage [V]	34

5.9.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie

Die Quantifizierung nichtflüchtiger Substanzen erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (Triple Quadrupole Massenspektrometer, MS/MS).

HPLC-Bedingungen:

Die flüssigkeitschromatographische Trennung vor der massenspektrometrischen Analyse wurde an einem Finnigan Surveyor Plus HPLC-System (Thermo Finnigan, Dreieich) mit temperiertem Autosampler (15 °C), Doppelkopf-Niederdruck-Pumpe (Surveyor LC pump) und eingebautem Vakuum-Degasser durchgeführt. Die HPLC-Trennsäule (stationäre Phase) wurde im Säulenofen auf 30 °C temperiert. Die mobile Phase setzte sich aus variablen Mischungen von Ameisensäure (0,1 % in Millipore-Wasser; Fließmittel A) und mit Ameisensäure angesäuertem Acetonitril (0,1 %; Fließmittel B) zusammen (**Tab. 5.5**). Die Trennung bei einem Fluss von 0,2 ml/min wurde für D-Ribose auf einer Supelcosil LC-NH₂-Säule (250 mm x 3,0 mm, 5 µm, Phenomenex®, Aschaffenburg), für derivatisiertes L-Cystein auf einer Hydro-RP-18-Säule (150 mm x 2,0 mm, 4 µm, 80 Å, Phenomenex®, Aschaffenburg) durchgeführt, wobei jeweils eine RP-18-Vorsäule (4 mm x 2,0 mm, Phenomenex®, Aschaffenburg) vorgeschaltet war. Das Injektionsvolumen betrug je 10 µl. Vor dem MS-Einlass bestand zudem die Möglichkeit, die chromatographische Trennung mittels eines PDA-UV-Detektors (Thermo Finnigan, Dreieich) bei einer Wellenlänge von 254 nm zu verfolgen.

Tabelle 5.5 Gradientenprogramme bei der Quantifizierung von D-Ribose bzw. L-Cystein über HPLC-MS/MS. Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure in Millipore-Wasser, Fließmittel B: 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril.

D-Ribose			L-Cystein		
Zeit [min]	A [%]	B [%]	Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95	0	70	30
13	5	95	10	0	100
20	100	0	13	0	100
25	100	0	15	70	30
26	5	95	---	---	---

Zwischen zwei Läufen wurde die Säule für je 15 Minuten äquilibriert. Das „divert valve“ sorgte dafür, dass nur der Bereich, in dem die Analyten von der Säule eluierten (Retentionszeit \pm 2 min), in das Massenspektrometer gelangten, und wurde entsprechend den zu analysierenden Verbindungen angepasst.

MS/MS-Bedingungen:

Die Massenspektren wurden mit einem Triple Quadrupole Massenspektrometer (Finnigan TSQ Quantum Discovery, Thermo Finnigan, Dreieich) im Elektronensprayionisations-Modus mit negativer Polarisierung (ESI-negativ-Modus) für D-Ribose bzw. im Elektronensprayionisations-Modus mit positiver Polarisierung (ESI-positiv-Modus) für L-Cystein aufgenommen.

Fullscan-MS-Spektren wurden im Quadrupol 3 über einen Massenbereich von $m/z = 60$ bis 500 bei einer Scan Time von 0,2 s aufgenommen. Um einen Überblick über das Fragmentierungsmuster der zu analysierenden Verbindungen zu erhalten, wurden Lösungen der Referenzsubstanzen durch Direkteinlass („Loop“) ins Massenspektrometer vermessen, wobei die intensivsten Übergänge des Vorläuferions (parent) bestimmt und durch Anpassung der Kollisionsenergie die Ausbeute an Produktionen (product) optimiert wurde. Die Quantifizierungen wurden im Selected-
Reaction-Monitoring-(SRM)-Modus durchgeführt. Die hierfür verwendeten Parameter sind in **Tabelle 5.6** zusammengefasst.

Bei den MS/MS-Messungen im SRM-Modus wurden folgende Scan-Events aufgezeichnet ($m/z(\text{parent})-m/z(\text{product})$ bei Collision Energy [V]):

D-Ribose: 149 à 113 (4), 149 à 89 (4), 154 à 118 (4), 154 à 92 (4)

L-Cystein: 413 à 252 (16), 413 à 170 (22), 415 à 252 (16), 415 à 170 (22), 417 à 252 (16),
417 à 170 (22)

Die Auswertungen der Massenchromatogramme erfolgten mit Hilfe der Software XCaliburTM (Thermo Scientific, Dreieich).

Tabelle 5.6 Parameter der HPLC-MS/MS-Messungen im ESI-negativ-Modus (D-Ribose) bzw. im ESI-positiv-Modus (L-Cystein).

Parameter	D-Ribose, ESI-negativ	L-Cystein, ESI-positiv
Spray Voltage [V]	3200	3300
Sheath Gas Pressure [arb]	40	35
Aux Gas Pressure [arb]	10	10
Capillary Temperature [°C]	300	310
Capillary Offset [V]	-35	35
Collision Gas Pressure [mTorr]	1	1
Peak width Q1 [amu]	0,8	0,8
Peak width Q3 [amu]	0,8	0,8
Scan Time [s]	0,2	0,2

6 Literatur

Albrecht, J.; Wiesmann, M. Das olfaktorische System des Menschen. Anatomie und Physiologie. *Nervenarzt* **2006**, *77*, 931-939.

Akiyama, M.; Murakami, K.; Ikeda, M.; Iwatsuki, K.; Wada, A.; Tokuno, K.; Onishi, M.; Iwabuchi, H. Analysis of the headspace volatiles of freshly brewed Arabica coffee using solid-phase microextraction. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, 388-396.

Akiyama, M.; Murakami, K.; Hirano, Y.; Ikeda, M.; Iwatsuki, K.; Wada, A.; Tokuno, K.; Onishi, M.; Iwabuchi, H. Characterization of headspace aroma compounds of freshly brewed Arabica coffees and studies on a characteristic aroma compound of Ethiopian coffee. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, 335-346.

Amrani-Hemaimi, M.; Cerny, C.; Fay, L. B. Mechanism of formation of alkylpyrazines in the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2818-2822.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Band I (L). L 00.90-7: Dreiecksprüfung. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, September **2006**.

Andueza, S.; Maeztu, L.; Dean, B.; de Pena, M. P.; Bello, J.; Cid, C. Influence of water pressure on the final quality of Arabica espresso coffee. Application of multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7426-7431.

Andueza, S.; de Pena, M. P.; Cid, C. Chemical and sensorial characteristics of espresso coffee as affected by grinding and torrefacto roast. *J. Agric. Food Chem.* **2003 a**, *51*, 7034-7039.

Andueza, S.; Maeztu, L.; Pascual, L.; Ibanez, C.; de Pena, M. P.; Cid, C. Influence of extraction temperature on the final quality of espresso coffee. *J. Sci. Food Agric.* **2003 b**, *83*, 240-248.

Arackal, T.; Lehmann, G. Messung des Quotienten 2-Methylfuran/2-Butanon von ungemahlenem Röstkaffee während der Lagerung unter Luftausschluss. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1979**, *6*, 43-47.

Bade-Wegner, H.; Holscher, W.; Vitzthum, O. G. Quantification of 2-methylisoborneol in roasted coffee by GC-MS. In: *15th International Scientific Colloquium on Coffee, Montpellier, 1993*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1993**, 537-544.

Bade-Wegner, H.; Bendig, I.; Holscher, W.; Wollmann, R. Volatile compounds associated with the over-fermented flavor defect. In: *17th International Scientific Colloquium on Coffee, Nairobi, 1997*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1997**, 176-182.

Baggenstoss, J.; Poisson, L.; Luethi, R.; Perren, R.; Escher, F. Influence of water quench cooling on degassing and aroma stability of roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6685-6691.

Baggenstoss, J.; Poisson, L.; Kaegi, R.; Perren, R.; Escher, F. Roasting and aroma formation: effect of initial moisture content and steam treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2008 a**, *56*, 5847-5851.

Baggenstoss, J.; Poisson, L.; Kaegi, R.; Perren, R.; Escher, F. Coffee roasting and aroma formation: application of different time-temperature conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2008 b**, *56*, 5836-5846.

Baggenstoss, J.; Perren, R.; Escher, F. Water content of roasted coffee: impact on grinding behaviour, extraction, and aroma retention. *Eur. Food Res. Technol.* **2008 c**, *227*, 1357-1365.

Becker, R.; Döhla, B.; Nitz, S.; Vitzthum, O. G. Identification of the „peasy“ off-flavour note in central African coffees. In: *12th International Scientific Colloquium on Coffee, Montreux, 1987*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1988**, 203-215.

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

Bemelmans, J. M. H. Review of isolation and concentration techniques. In: *Progress in flavour research*. Land, G. G., Nursten, H. E. (Hrsg.), Applied Science Publishers, London, New York, **1979**, 79-88.

Bernheimer, O. Zur Kenntnis der Röstprodukte des Caffeés. *Monatsh. Chem.* **1880**, *1*, 456-467.

Bhumiratana, N.; Adhikari, K.; Chambers, E. Evolution of sensory aroma attributes from coffee beans to brewed coffee. *Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 2185-2192.

Blank, I.; Sen, A.; Grosch, W. Potent odorants of the roasted powder and brew of Arabica coffee. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992 a**, *195*, 239-245.

Blank, I.; Sen, A.; Grosch, W. Aroma impact compounds of Arabica and Robusta coffee. Qualitative and quantitative investigations. In: *14th International Scientific Colloquium on Coffee, San Francisco, 1991*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1992 b**, 117-129.

Blank, I.; Fay, L. B. Formation of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone and 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone through Maillard reaction based on pentose sugars. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 531-536.

Blank, I.; Fay, L. B.; Lakner, F. J.; Schlosser, M. Determination of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone and 2(or 5)-ethyl-4-hydroxy-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone in pentose sugar-based Maillard model systems by isotope dilution assays. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2642-2648.

Blank, I.; Devaud, S.; Fay, L.B. Study on the formation and decomposition of the Amadori compound N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine in Maillard model systems. In: *Maillard reaction in foods and medicine*. O'Brien, J.; Nursten, H. E.; Crabbe, M. J. C.; Ames, J. M. (Hrsg.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1998**, 43-50.

Blank, I.; Pascual, E. C.; Devaud, S.; Fay, L. B.; Stadler, R. H.; Yeretian, C.; Goodman, B. A. Degradation of the coffee flavor compound furfuryl mercaptan in model Fenton-type reaction systems. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2356-2364.

Blank, I.; Grosch, W. On the role of (-)-2-methylisoborneol for the aroma of Robusta coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4653-4656.

Bondarovich, H. A.; Friedel, P.; Krampl, V.; Renner, J. A.; Shephard, F. W.; Gianturco, M. A. Volatile constituents of coffee. Pyrazines and other compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 1093-1099.

Bonnlaender, B.; Lonzarich, V.; Suggi Liverani, F. Aroma extract dilution analysis of espresso coffee. In: *20th International Scientific Colloquium on Coffee, Bangalore, 2004*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **2005**, 186-192.

Bradbury, A. G. W.; Halliday, D. J. Polysaccharides in green coffee beans. In: *12th International Scientific Colloquium on Coffee, Montreux, 1987*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1988**, 265-269.

Bröhan, M.; Huybrighs, T.; Wouters, C.; van der Bruggen, B. Influence of storage conditions on aroma compounds in coffee pads using static headspace GC-MS. *Food Chem.* **2009**, *116*, 480-483.

Bücking, M.; Steinhart, H. Headspace GC and sensory analysis characterization of the influence of different milk additives on the flavor release of coffee beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1529-1534.

Buhr, K.; Pammer, C.; Schieberle, P. Influence of water on the generation of Strecker aldehydes from dry processed foods. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *230*, 375-381.

Bytof, G.; Selmar, D.; Schieberle, P. New aspects of coffee processing. How do different post harvest treatments influence the formation of potential flavour precursors? *J. Appl. Bot.* **2000**, *74*, 131-136.

Bytof, G.; Knopp, S.-E.; Schieberle, P.; Teutsch, I.; Selmar, D. Influence of processing on the generation of γ -aminobutyric acid in green coffee beans. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *220*, 245-250.

Cannon, R. J.; Trinnaman, L.; Grainger, B.; Trail, A. The key odorants of coffee from various geographical locations. In: *Flavor in noncarbonated beverages*. Da Costa, N. C.; Cannon, R. J. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **2010**, 77-90.

Cantergiani, E.; Brevard, H.; Krebs, Y.; Feria-Morales, A.; Amado, R.; Yeretian, C. Characterisation of the aroma of green Mexican coffee and identification of mouldy/earthy defect. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *212*, 648-657.

Cerny, C.; Grosch, W. Quantification of character-impact odor compounds of roasted beef. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *196*, 417-422.

Cerny, C.; Grosch, W. Precursors of ethyldimethylpyrazine isomers and 2,3-diethyl-5-methylpyrazine formed in roasted beef. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1994**, *198*, 210-214.

Cerny, C.; Davidek, T. Formation of aroma compounds from ribose and cysteine during the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2714-2721.

Charles-Bernard, M.; Kraehenbuehl, K.; Rytz, A.; Roberts, D. D. Interactions between volatile and nonvolatile coffee components. 1. Screening of nonvolatile components. *J. Agric. Food Chem.* **2005 a**, *53*, 4417-4425.

Charles-Bernard, M.; Roberts, D. D.; Kraehenbuehl, K. Interactions between volatile and nonvolatile coffee components. 2. Mechanistic study focused on volatile thiols. *J. Agric. Food Chem.* **2005 b**, *53*, 4426-4433.

Christlbauer, M. Unveröffentlichte Ergebnisse, **2002**.

Clarke, R. J.; Macrae, R. Coffee. Volume 1: Chemistry. Elsevier Applied Science Publishers, London, New York, **1985**.

Clarke, R. J.; Macrae, R. Coffee. Volume 2: Technology. Elsevier Applied Science Publishers, London, New York, **1987**.

Clarke, R. J.; Vitzthum, O. G. Coffee. Recent Developments. Blackwell Science, Oxford, **2001**.

Clarke, M. B.; Bezabeh, D. Z.; Howard, C. T. Determination of carbohydrates in tobacco products by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry: a comparison with ion chromatography and application to product discrimination. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1975-1981.

Czerny, M.; Wagner, R.; Grosch, W. Detection of odor-active ethenylalkylpyrazines in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3268-3272.

Czerny, M.; Mayer, F.; Grosch, W. Sensory study on the character impact odorants of roasted Arabica coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 695-699.

Czerny, M.; Grosch, W. Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 868-872.

Czerny, M.; Schieberle, P. Changes in roasted coffee aroma during storage – influence of the packaging. In: *19th International Scientific Colloquium on Coffee, Trieste, 2001*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **2001**, 145-150.

Czerny, M.; Christlbauer, Ma.; Christlbauer, Mo.; Fischer, A.; Granvogl, M.; Hammer, M.; Hartl, C.; Moran Hernandez, N.; Schieberle, P. Re-investigations on odour thresholds of key aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *228*, 265-273.

Degenhardt, A.; Bradbury, A.; Ullrich, F. Identification of carotenoids and carotenoid degradation products in coffee. In: *20th International Scientific Colloquium on Coffee, Bangalore, 2004*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **2005**, 204-210.

Deibler, K. D.; Acree, T. E.; Lavin, E. H. Aroma analysis of coffee brew by gas chromatography-olfactometry. In: *Developments in Food Science, Food Flavors: Formation, analysis and packaging influences, Proceedings of the 9th International Flavor Conference, Limnos, 1997*. Contis, E. H.; Ho, C.-T.; Mussinan, C. J.; Parliment, T. H.; Shahidi, F.; Spanier, A. M. (Hrsg.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1998**, 69-78.

De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Moreira, R. F. A.; Werneck, C. C. Composition of green coffee fractions and their contribution to the volatile profile formed during roasting. *Food Chem.* **1994**, *50*, 141-145.

De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Aquino Neto, F. R.; Moreira, R. F. A.; Alviano, C. S. Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chem.* **1996**, *55*, 203-207.

Deutscher Kaffeverband, Kaffeewissen. Deutscher Kaffeverband (Hrsg.), Hamburg, **2011**.

Engel, W.; Bahr, W.; Schieberle, P. Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 237-241.

Erdmann, E. Beitrag zur Kenntnis des Kaffeeöles. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 1846-1855.

Esterbauer, H. Über die Autoxydation von Linolsäuremethylester in Wasser III: Chromatographische Auftrennung der wasserlöslichen Reaktionsprodukte. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **1968**, *70*, 1-4.

Farmer, L. J.; Mottram, D. S.; Whitfield, F. B. Volatile compounds produced in Maillard reactions involving cysteine, ribose and phospholipid. *J. Sci. Food Agric.* **1989**, *49*, 347-368.

Fischer, A.; Schieberle, P. Einfluss von Lagerung und Sauerstoff auf die Aromastabilität von gemahlenem Röstkaffee. In: *Bericht 2005*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (Hrsg.), **2005**, 48-51.

Flament, I. Coffee, cacao and tea flavours: a review of present knowledge. In: *International symposium on food flavours, Paris, 1982*. Adda, J.; Richard, H. (Hrsg.), Technique et documentation-Lavoisier, Paris, **1983**, 82-105.

Flament, I. Coffee, cocoa, and tea. In: *Volatile compounds in foods and beverages*. Maarse, H. (Hrsg.), Marcel Decker, New York, Basel, Hongkong, **1991**, 617-669.

Friedel, P.; Krampl, V.; Radford, T.; Renner, J. A.; Shephard, F. W.; Gianturco, M. A. Some constituents of the aroma complex of coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 530-532.

Full, G.; Lonzarich, V.; Suggi-Liverani, F. Differences in chemical composition of electronically sorted green coffee beans. In: *18th International Scientific Colloquium on Coffee, Helsinki, 1999*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1999**, 35-42.

Gautschi, F.; Winter, M.; Flament, Y.; Willhalm, B.; Stoll, M. New developments in coffee aroma research. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 15-23.

Gianturco, M. A.; Friedel, P. Synthesis of cyclic diketones isolated from coffee. *Tetrahedron* **1963**, *19*, 2039-2049.

Gianturco, M. A.; Giammarino, A. S.; Pitcher, R. G. Structures of five cyclic diketones isolated from coffee. *Tetrahedron* **1963**, *19*, 2051-2059.

Gianturco, M. A.; Friedel, P.; Giammarino, A. S. Volatile constituents of coffee. III. Structures of two heterocyclic compounds and the synthesis of tetrahydrofuranones. *Tetrahedron* **1964 a**, *20*, 1763-1772.

Gianturco, M. A.; Giammarino, A. S.; Friedel, P.; Flanagan, V. Volatile constituents of coffee. IV. Furanic and pyrrolic compounds. *Tetrahedron* **1964 b**, *20*, 2951-2961.

Gianturco, M. A.; Giammarino, A. S.; Friedel, P. Volatile constituents of coffee – V. *Nature* **1966**, *210*, 1358.

Goldman, I. M.; Seibl, J.; Flament, I.; Gautschi, F.; Winter, M.; Willhalm, B.; Stoll, M. Research on aromas. XIV. Coffee aroma. 2. Pyrazines and pyridine. *Helv. Chim. Acta* **1967**, *50*(2), 694-705.

Granvogl, M.; Beksan, E.; Schieberle, P. New insights into the formation of Strecker aldehydes from 3-oxazolines as transient intermediates. In Vorbereitung.

Gretsch, C.; Sarrazin, C.; Liardon, R. Evolution of coffee aroma characteristics during roasting. In: *18th International Scientific Colloquium on Coffee, Helsinki, 1999*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1999**, 27-34.

Grigg, R.; Thianpatanagul, S. Decarboxylative transamination. Mechanism and applications to the synthesis of heterocyclic compounds. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, *3*, 180-181.

Grosch, W.; Semmelroch, P.; Masanetz, C. Quantification of potent odorants in coffee. In: *15th International Scientific Colloquium on Coffee, Montpellier, 1993*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1993**, 545-549.

Grosch, W. Flavour of coffee. A review. *Nahrung* **1998**, *42*, 344-350.

Grosch, W.; Mayer, F. Release of odorants from roasted coffee. In: *Flavor Release*. Roberts, D. D.; Taylor, A. J. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **2000**, 430-438.

Grosch, W.; Czerny, M.; Mayer, F.; Moors, A. Sensory studies on the key odorants of roasted coffee. In: *Caffeinated beverages*. Parliment, T. H.; Ho, C.-T.; Schieberle, P. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **2000**, 202-209.

Gutmann, W.; Werkhoff, P.; Barthels, M.; Vitzthum, O. G. Vergleich der Headspace-Aromaprofile von Arabusta-Kaffee mit Arabica- und Robusta-Sorten. In: *8th International Scientific Colloquium on Coffee, Abidjan, 1977*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1979**, 153-161.

Guyot, B.; Cros, E.; Vincent, J. C. Characterization and identification of compounds in the volatile fraction of a healthy Arabian green coffee and a foul-smelling Arabian green coffee. In: *10th International Scientific Colloquium on Coffee, Salvador-Bahia, 1982*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1983**, 253-269.

Hashim, L.; Chaveron, H. Use of methylpyrazine ratios to monitor the coffee roasting. *Food Res. Intern.* **1996**, 28, 619-623.

Heinrich, L.; Baltes, W. Über die Bestimmung von Phenolen im Kaffeegetränk. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, 185, 362-365.

Ho, C.-T.; Oh, Y.-C.; Zhang, Y.; Shu, C.-K. Peptides as flavor precursors in model Maillard reactions. In: *Flavor Precursors. Thermal and enzymatic conversions*. Teranishi, R.; Takeoka, G. R. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1992**, 193-202.

Ho, C.-T.; Hwang, H.-I.; Yu, T.-H.; Zhang, J. An overview of the Maillard reactions related to aroma generation in coffee. In: *15th International Scientific Colloquium on Coffee, Montpellier, 1993*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1993**, 519-527.

Hofmann, T. Charakterisierung intensiver Geruchsstoffe in Kohlenhydrat/Cystein-Modellreaktionen und Klärung von Bildungswegen. Ein Beitrag zur Maillard-Reaktion. Dissertation, Technische Universität München, **1995**.

Hofmann, T.; Schieberle, P. Evaluation of the key odorants in a thermally treated solution of ribose and cysteine by aroma extract dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2187-2194.

Hofmann, T.; Schieberle, P. Identification of potent aroma compounds in thermally treated mixtures of glucose/cysteine and rhamnose/cysteine using aroma extract dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 898-906.

Hofmann, T.; Schieberle, P. Identification of key aroma compounds generated from cysteine and carbohydrates under roasting conditions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1998 a**, *207*, 229-236.

Hofmann, T.; Schieberle, P. Quantitative model studies on the effectiveness of different precursor systems in the formation of the intense food odorants 2-furfurylthiol and 2-methyl-3-furanthiol. *J. Agric. Food Chem.* **1998 b**, *46*, 235-241.

Hofmann, T.; Schieberle, P. Formation of aroma-active Strecker-aldehydes by a direct oxidative degradation of Amadori compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4301-4305.

Hofmann, T.; Münch, P.; Schieberle, P. Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by Strecker-type reactions. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 434-440.

Hofmann, T.; Czerny, M.; Calligaris, S.; Schieberle, P. Model studies on the influence of coffee melanoidins on flavor volatiles of coffee beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2382-2386.

Hofmann, T.; Schieberle, P. Chemical interactions between odor-active thiols and melanoidins involved in the aroma staling of coffee beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 319-326.

Holscher, W.; Vitzthum, O. G.; Steinhart, H. Identification and sensorial evaluation of aroma-impact-compounds in roasted Colombian coffee. *Café Cacao Thé*, **1990**, *34*, 205-212.

Holscher, W.; Steinhart, H. Investigation of roasted coffee freshness with an improved headspace technique. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 33-38.

Holscher, W.; Vitzthum, O. G.; Steinhart, H. Prenyl alcohol – source for odorants in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 655-658.

Holscher, W.; Steinhart, H. Formation pathways for primary roasted coffee aroma compounds. In: *Thermally generated flavors*. Parliment, T. H.; Morello, M. J.; McGorin, R. J. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1994**, 206-217.

Holscher, W.; Steinhart, H. Aroma compounds in green coffee. In: *Developments in Food Science. Food Flavors: Generation, analysis and process influence. Proceedings of the 8th International Flavor Conference, Cos, 1994*. Charalambous, G. (Hrsg.), Elsevier Applied Science Publishers, London, New York, **1995**, 785-803.

Holscher, W.; Bade-Wegner, H.; Bendig, I.; Wolkenhauer, P.; Vitzthum, O. G. Off-flavor elucidation in certain batches of Kenyan coffee. In: *16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, 1995*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1995**, 174-182.

Hurd, C. D.; Isenhour, L. L. Pentose reactions. I. Furfural formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 317-330.

International Coffee Organization (ICO), Trade statistics, Online-Datenbank: www.ico.org. London, **2011**.

Jaeckle, H. Studien über die Produkte der Kaffeeröstung, ein Beitrag zur Kenntnis des sogen. Kaffeearomas (Caffeol). *Chem. Zentralblatt* **1898**, *69*, 447-448.

Johnston, W. R.; Frey, C. N. The volatile constituents of roasted coffee. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 1624-1627.

Kaffeeverordnung. Verordnung über Kaffee, Kaffee- und Zichorien-Extrakte vom 15. November 2001 (BGBl. I S. 3107), zuletzt geändert durch Artikel 10 der Verordnung zur Änderung lebensmittelrechtlicher und tabakrechtlicher Bestimmungen vom 22.02.2006 (BGBl. I S. 444). In: *Lebensmittelrecht II, Textsammlung*. Meyer, H. (Hrsg.), Verlag C. H. Beck, München, **2010**.

Kawakami, Y.; Kunieda, S.; Sato, A.; Takashima, Y.; Kanisawa, T. Studies on volatile compounds in a series of roasted coffee beans. Changes of the amounts of volatile compounds

and total sulfur. In: *16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, 1995*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1995**, 332-339.

Kleinwächter, M.; Selmar, D. Influence of drying on the content of sugars in wet processed green Arabica coffees. *Food Chem.* **2010**, *119*, 500-504.

Knopp, S.; Bytof, G.; Selmar, D. Influence of processing on the content of sugars in Arabica coffee beans. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *223*, 195-201.

Kováts, E. Gaschromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta* **1958**, *206*, 1915-1932.

Kramer, D.; Breitenstein, B.; Kleinwächter, M.; Selmar, D. Stress metabolism in green coffee beans (*Coffea Arabica* L.): expression of dehydrins and accumulation of GABA during drying. *Plant Cell Physiol.* **2010**, *51*, 546-553.

Kumazawa, K.; Masuda, H. Investigation on the change in the flavor of a coffee drink during heat processing. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2674-2678.

Kung, J. T.; McNaught, R. P.; Yeransian, J. A. Determining volatile acids in coffee beverages by NMR and gas chromatography. *J. Food Sci.* **1967**, *32*, 455-458.

Lampadius, W. A. Über den Caffee. *Pharm. Zentralblatt* **1832**, *3*, 225-232.

Leffingwell, J. C. Olfaction – Update no. 5. *Leffingwell Reports*, **2002**, *2*, 1-34.

Limacher, A.; Kerler, J.; Davidek, T.; Schmalzried, F.; Blank, I. Formation of furan and methylfuran by Maillard-type reactions in model systems and food. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3639-3647.

Lindner-Steinert, A.; Zou, M. Aromaveränderung von vakuumverpacktem Kaffee bei unterschiedlichen Packstoffen. *Verpackungs-Rundschau* **1996**, *1*, 40-42.

Lopez-Galilea, I.; Fournier, N.; Cid, C.; Guichard, E. Changes in headspace volatile concentrations of coffee brews caused by the roasting process and the brewing procedure. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8560-8566.

Low, Y. L.; Parker, J. K.; Mottram, D. S. Mechanism of alkylpyrazine formation in a potato model system containing added glycine. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4087-4094.

Mahattanatawee, K.; Perez-Cacho, M. P. R.; Rattanapanone, N.; Rouseff, R. Aroma active sulfur volatiles in Arabica coffee and degree of roasting effects. In: *Recent Highlights in Flavor Chemistry & Biology, Proceedings of the 8th Wartburg Symposium, Eisenach, 2007*. Hofmann, T.; Meyerhof, W.; Schieberle, P. (Hrsg.), **2007**, 111-116.

Maeztu, L.; Sanz, C.; Andueza, S.; de Pena, M. P.; Bello, J.; Cid, C. Characterization of espresso coffee aroma by static headspace GC-MS and sensory flavor profile. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5437-5444.

Marin, K.; Pozrl, T.; Zlatic, E.; Plestenjak, A. A new aroma index to determine the aroma quality of roasted and ground coffee during storage. *Food Technol. Biotechnol.* **2008**, *46*, 442-447.

Maslowsky, E. Microscale synthesis of hexaamminechromium(III) nitrate using liquid ammonia generated in the laboratory. *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*, 760-761.

Mayer, F.; Czerny, M.; Grosch, W. Influence of provenance and roast degree on the composition of potent odorants in Arabica coffees. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 242-250.

Mayer, F. Untersuchungen über das Aroma von Arabica-Kaffee: Einfluss von Provenienz und Röstgrad auf Phenol- und Schwefel-Verbindungen und (*E*)- β -Damascenon – Bestimmung von Abdampfraten von Aromastoffen. Dissertation, Technische Universität München, **2000**.

Mayer, F.; Czerny, M.; Grosch, W. Sensory study of the character impact aroma compounds of a coffee beverage. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *211*, 272-276.

Merritt, C.; Blazinet, M. L.; Sullivan, J. H.; Robertson, D. H. Mass spectrometric determination of the volatile components from ground coffee. *Agric. Food Chem.* **1963**, *11*, 152-155.

Merritt, C.; Robertson, D. H.; McAdoo, D. J. The relationship of volatile compounds in roasted coffee beans to their precursors. In: *4th International Scientific Colloquium on Coffee, Amsterdam, 1968*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1970**, 144-148.

Milo, C.; Badoud, R.; Fumeaux, R.; Bobillot, S.; Fleury, Y.; Huynh-Ba, T. Coffee flavour precursors: contribution of water non-extractable green bean components to roasted coffee flavour. In: *19th International Scientific Colloquium on Coffee, Trieste, 2001*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **2001**, 87-96.

Moon, J.-K.; Shibamoto, T. Role of roasting conditions in the profile of volatile flavor chemicals formed from coffee beans. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5823-5831.

Mottram, D. S.; Szauman-Szumski, C.; Dodson, A. Interaction of thiol and disulfide flavor compounds with food components. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2349-2351.

Mottram, D. S.; Mottram, H. R. An overview of the contribution of sulfur-containing compounds to the aroma in heated foods. In: *Heteroatomic aroma compounds*. Reineccius, G. A.; Reineccius, T. A. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **2002**, 73-92.

Müller, C.; Hofmann, T. Screening of raw coffee for thiol binding site precursors using „in bean“ model roasting experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2623-2629.

Müller, C.; Lang, R.; Hofmann, T. Quantitative precursor studies on di- and trihydroxybenzene formation during coffee roasting using „in bean“ model experiments and stable isotope dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2006 a**, *54*, 10086-10091.

Müller, C.; Hemmersbach, S.; Slot, G. van't; Hofmann, T. Synthesis and structure determination of covalent conjugates formed from the sulfury-roasty-smelling 2-furfurylthiol and di- or trihydroxybenzenes and their identification in coffee brew. *J. Agric. Food Chem.* **2006 b**, *54*, 10076-10085.

Müller, C.; Hofmann, T. Quantitative studies on the formation of phenol/2-furfurylthiol conjugates in coffee beverages toward understanding of the molecular mechanism of coffee aroma staling. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4095-4102.

Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B. 2-Methoxypyrazines and the flavour of green peas (*Pisum sativum*). *Chem. Ind.* **1970**, 27, 897-898.

Nijssen, L. M.; Ingen-Visscher, C. A. van; Donders, J. J. H. VCF – Volatile Compounds in Food, Database, Version 12.3. TNO Quality of Life, Zeist, Niederlande, **2010**.

Nurok, D.; Anderson, J. W.; Zlatkis, A. Profiles of sulfur containing compounds obtained from Arabica and Robusta coffees by capillary column gas chromatography. *Chromatogr.* **1978**, 11, 188-192.

Organikum. Becker, H. G. O.; Beckert, R.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Habicher, W. D.; Metz, P.; Pavel, D.; Schwetlick, K. (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.

Parliment, T. H.; Clinton, W.; Scarpellino, R. *trans*-2-Nonenal: Coffee compound with novel organoleptic properties. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, 21, 485-487.

Parliment, T. H.; Stahl, H. D. Generation of furfuryl mercaptan in cysteine-pentose model systems in relation to roasted coffee. In: *Sulfur compounds in foods*. Mussinan, C. J.; Keelan, M. E. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1994**, 160-170.

Parliment, T. H.; Stahl, H. D. Formation of furfuryl mercaptan in coffee model systems. In: *Developments in Food Science. Food Flavors: Generation, analysis and process influence. Proceedings of the 8th International Flavor Conference, Cos, 1994*. Charalambous, G. (Hrsg.), Elsevier Applied Science Publishers, London, New York, **1995**, 805-813.

Perez-Martinez, M.; Sopelana, P.; de Pena, M. P.; Cid, C. Changes in volatile compounds and overall aroma profile during storage of coffee brews at 4 and 25 °C. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 3145-3154.

Poisson, L.; Kerler, J.; Liardon, R. Assessment of the contribution of new aroma compounds found in coffee to the aroma of coffee brews. In: *State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology, Proceedings of the 7th Wartburg Symposium, Eisenach, 2004*. Hofmann, T.; Rothe, M.; Schieberle, P. (Hrsg.), Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, **2004**, 495-498.

Poisson, L.; Schmalzried, F.; Davidek, T.; Blank, I.; Kerler, J. Study on the role of precursors in coffee flavor formation using in-bean experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 9923-9931.

Pollien, P.; Krebs, Y.; Chaintreau, A. Comparison of a brew and an instant coffee using a new GC-olfactometric method. In: *17th International Scientific Colloquium on Coffee, Nairobi, 1997*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1997**, 191-196.

Prescott, S. C.; Emerson, R. L.; Peakes, L. V. The staling of coffee. *Food Res.* **1937**, 2, 1-20.

Radtke, R.; Springer, R.; Mohr, W.; Heiss, R. Untersuchungen über die chemischen Vorgänge beim Altern von Röstkaffee. I. Mitteilung. Gaschromatographische Analyse der leichtflüchtigen Aromabestandteile. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1963**, 119, 293-302.

Radtke, R.; Springer, R.; Mohr, W. Zur Kenntnis der Kaffee-Aromas und seiner Veränderungen im Laufe der Lagerung von Röstkaffee. II. Mitteilung. Bedeutung der Aromafraktion mittlerer Flüchtigkeit. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1966 a**, 128, 321-333.

Radtke, R.; Mohr, W.; Springer, R. Zur Kenntnis der Kaffee-Aromas und seiner Veränderungen im Laufe der Lagerung von Röstkaffee. III. Mitteilung. Untersuchung der schwerflüchtigen Aromaverbindungen und der flüchtigen Säuren. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1966 b**, 129, 349-359.

Radtke, R. Zur Kenntnis des Sauerstoffverbrauchs von Röstkaffee und seiner Auswirkung auf die sensorisch ermittelte Qualität des Kaffeegetränks. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1979**, 6, 36-42.

Radtke-Granzer, R.; Piringer, O.-G. Zur Problematik der Qualitätsbeurteilung von Röstkaffee durch quantitative Spurenanalyse flüchtiger Aromakomponenten. *Dt. Lebensm. Rundsch.* **1981**, 77, 203-210.

Ratnayake, W. M. N.; Hollywood, R.; O'Grady, E.; Stavric, B. Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. *Food Chem. Toxic.* **1993**, 31, 263-269.

Reichstein, T.; Staudinger, H. *Britisches Patent 246454*, **1926**.

Reichstein, T.; Staudinger, H. *Britisches Patent 260960*, **1928**.

Reichstein, T.; Staudinger, H. Über das Kaffeearoma. *Angew. Chem.* **1950**, 62, 92.

Reichstein, T.; Staudinger, H. The aroma of coffee. *Perf. Essent. Oil. Rec.* **1955**, 46, 86-88.

Reinbold, J.; Rychlik, M.; Asam, S.; Wieser, H.; Köhler, P. Concentrations of total glutathione and cysteine in wheat flour as affected by sulfur deficiency and correlation to quality parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6844-6850.

Reineccius, G. A. The Maillard reaction and coffee flavor. In: *16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, 1995*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1995**, 249-257.

Rhoades, J. W. Sampling method for analysis of coffee volatiles by gas chromatography. *Food Res.* **1958**, *23*, 254-261.

Rhoades, J. W. Analysis of the volatile constituents of coffee. *Agric. Food Chem.* **1960**, *8*, 136-141.

Rizzi, G. P. Heat-induced flavor formation from peptides. In: *Thermal generation of aromas*. Parliment, T. H.; McGorin, R. J.; Ho, C.-T. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1989**, 172-181.

Rocha, S.; Maeztu, L.; Barros, A.; Cid, C.; Coimbra, M. A. Screening and distinction of coffee brews based on headspace solid phase microextraction/gas chromatography/principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *84*, 43-51.

Rouge, F.; Gretsch, C.; Christensen, K.; Liardon, R. Thermal stability of 2-methylisoborneol in Robusta coffee. In: *15th International Scientific Colloquium on Coffee, Montpellier, 1993*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1993**, 866-868.

Rychlik, M.; Grosch, W. Identification and quantification of potent odorants formed by toasting of wheat bread. *Food Sci. Technol.* **1996**, *29*, 515-525.

Sanz, C.; Pascual, L.; Zapelena, M.; Cid, M.C. A new „aroma index“ to determine the aroma quality of a blend of roasted coffee beans. In: *19th International Scientific Colloquium on Coffee, Trieste, 2001*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **2001**, 338-343.

Sanz, C.; Czerny, M.; Concepcion, C.; Schieberle, P. Comparison of potent odorants in a filtered coffee brew and in an instant coffee beverage by aroma extract dilution analysis. *Eur. Food Res. Technol.* **2002 a**, *214*, 299-302.

Sanz, C.; Maeztu, L.; Zapelena, M. J.; Bello, J.; Cid, C. Profiles of volatile compounds and sensory analysis of three blends of coffee: influence of different proportions of Arabica and Robusta and influence of roasting coffee with sugar. *J. Sci. Food Agric.* **2002** *b*, *82*, 840-847.

Scheidig, C.; Czerny, M.; Schieberle, P. Changes in key odorants of raw coffee beans during storage under defined conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5768-5775.

Scheidig, C. Einfluss der Lagerung von Rohkaffee auf die Aromastoffe von Rohkaffee, Röstkaffee und Kaffeegetränk. Dissertation, Technische Universität München, **2009**.

Schenker, S.; Heinemann, C.; Huber, M.; Pompizzi, R.; Perren, R.; Escher, F. Impact of roasting conditions on the formation of aroma compounds in coffee beans. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 60-66.

Schieberle, P.; Grosch, W. Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987** *a*, *185*, 111-113.

Schieberle, P.; Grosch, W. Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1987** *b*, *35*, 252-257.

Schieberle, P. Formation of furaneol in heat-processed foods. In: *Flavor Precursors. Thermal and enzymatic conversions*. Teranishi, R. ; Takeoka, G. R. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1992**, 164-174.

Schieberle, P. Studies on the flavour of roasted white sesame seeds. In: *Progress in flavour precursor studies*. Schreier, P.; Winterhalter, P. (Hrsg.), Allured Publishing Corporation, Carol Stream, **1993**, 343-360.

Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile compounds and their precursors. In: *Characterization of food: emerging methods*. Goankar, A. G. (Hrsg.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1995**, 403-431.

Schieberle, P.; Hofmann, T. Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 227-232.

Schieberle, P.; Pfner, P. Characterization of key odorants in chocolate. In: *Flavor chemistry. Thirty years of progress*. Teranishi, R.; Wick, E. L.; Hornstein, I. (Hrsg.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moskau, **1999**, 147-153.

Schieberle, P.; Hofmann, T. Flavor contribution and formation of heterocyclic oxygen-containing key aroma compounds in thermally processed foods. In: *Heteroatomic aroma compounds*. Reineccius, G. A.; Reineccius, T. A. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **2002**, 207-226.

Schieberle, P. The carbon module labeling (CAMOLA) technique. A useful tool for identifying transient intermediates in the formation of Maillard-type target molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, 1043, 236-248.

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. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 916-924.

Selmar, D.; Bytof, G.; Knopp, S.-E. New aspects of coffee processing: the relation between seed germination and coffee quality. In: *19th International Scientific Colloquium on Coffee, Trieste, 2001*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **2002**.

Selmar, D.; Bytof, G.; Knopp, S.-E.; Breitenstein, B. Germination of coffee seeds and its significance for coffee quality. *Plant Biol.* **2006**, 8, 260-264.

Selmar, D.; Bytof, G. Biochemische Grundlagen der Nacherntebehandlung: Das Geheimnis eines guten Kaffees. *Biol. Unserer Zeit* **2008**, 38, 158-167.

Selmar, D.; Bytof, G.; Knopp, S.-E. The storage of green coffee (*Coffea Arabica*): decrease of viability and changes of potential aroma precursors. *Annals of Botany* **2008**, 101, 31-38.

Semmelroch, P.; Grosch, W. Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, 28, 310-313.

Semmelroch, P.; Laskawy, G.; Blank, I.; Grosch, W. Determination of potent odourants in roasted coffee by stable isotope dilution assays. *Flavour Fragrance J.* **1995**, 10, 1-7.

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

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

Sen, A.; Laskawy, G.; Schieberle, P.; Grosch, W. Quantitative determination of β -damascenone in foods using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 757-759.

Shibamoto, T. Formation of sulfur- and nitrogen-containing compounds from the reaction of furfural with hydrogen sulfide and ammonia. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 206-208.

Shibamoto, T.; Bernhard, R. A. Investigation of pyrazine formation pathways in sugar-ammonia model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 609-614.

Shibamoto, T.; Harada, K.; Mihara, S.; Nishimura, S.; Yamaguchi, K.; Aitoku, A.; Fukada, T. Application of HPLC for evaluation of coffee flavor quality. In: *The quality of foods and beverages. Chemistry and Technology. Volume 2*. Charalambous, G.; Inglett, G. (Hrsg.), Academic Press, New York, **1981**, 311-334.

Shimoda, M.; Shibamoto, T. Isolation and identification of headspace volatiles from brewed coffee with an on-column GC/MS method. *J. Agrid. Food Chem.* **1990**, *38*, 802-804.

Silwar, R.; Bendig, I.; Walter, G.; Dommers, D. Kapillargaschromatographische Untersuchungen flüchtiger Schwefelverbindungen des Kaffeearomas durch simultane FID/FPD-Detektion. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* **1986**, *40*, 84-88.

Silwar, R.; Kamperschröer, H.; Tressl, R. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen des Röstkaffeearomas – Quantitative Bestimmung wasserdampf-flüchtiger Aromastoffe. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1987**, *10*, 176-187.

Silwar, R.; Tressl, R. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung der im Modellsystem Cystein/Methionin/Furfural unter Röstbedingungen gebildeten Aromastoffe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1989**, *189*, 205-211.

Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H. Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen. MedPharm Scientific Publishers, Stuttgart, **2008**.

Spadone, J. C.; Liardon, R. Identification of specific volatile components in Rio coffee beans. In: *12th International Scientific Colloquium on Coffee, Montreux, 1987*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1988**, 194-202.

Spadone, J. C.; Takeoka, G.; Liardon, R. Analytical investigation of Rio off-flavor in green coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 226-233.

Steinhart, H.; Holscher, W. Storage-related changes of low-boiling volatiles in whole coffee beans. In: *14th International Scientific Colloquium on Coffee, San Francisco, 1991*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1992**, 156-164.

Steinhaus, M.; Schieberle, P. Zum Einfluss progressiver Methoden der Rohkaffeeaufbereitung auf den Gehalt typischer Fehl aromastoffe in Kaffee. In: *Bericht 2006*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (Hrsg.), **2006**, 20-23.

Stoffelsma, J.; Spima, G.; Kettenes, D. K.; Pypker, J. New volatile components of roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1968**, *16*, 1000-1004.

Stoll, M.; Winter, M.; Gautschi, F.; Flament, I.; Willhalm, B. 68. Recherches sur les arômes. Sur l'arôme de café. *Helv. Chim. Acta* **1967**, *50*, 629-694.

Takeoka, G.; Buttery, R. G.; Flath, R. A.; Teranishi, R.; Wheeler, E. L.; Wieczorek, R. L.; Guentert, M. Volatile constituents of pineapple (*Ananas Comosus* [L.] Merr.). In: *Flavor chemistry. Trends and developments*. Teranishi, R.; Buttery, R. G.; Shahidi, F. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1989**, 233-237.

Teutsch, I. A. Einfluss der Rohkaffeeverarbeitung auf Aromastoffveränderungen in gerösteten Kaffeebohnen sowie im Kaffeegetränk. Dissertation, Technische Universität München, **2004**.

Thaler, H.; Arneth, W. Untersuchungen an Kaffee und Kaffee-Ersatz. XIII. Mitteilung. Verhalten der Polysaccharid-Komplexe des rohen Arabica-Kaffees beim Rösten. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1969**, *140*, 101-109.

Tressl, R.; Kossa, T.; Renner, R.; Köppler, H. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung über die Bildung von Phenolen und aromatischen Kohlenwasserstoffen in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1976**, *162*, 123-130.

Tressl, R.; Grünewald, K. G.; Köppler, H.; Silwar, R. Flüchtige Phenole in Röstkaffees verschiedener Sorten. I. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1978 a**, *167*, 108-110.

Tressl, R.; Bahri, D.; Köppler, H.; Jensen, A. Diphenole und Caramelkomponenten in Röstkaffees verschiedener Sorten. II. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1978 b**, *167*, 111-114.

Tressl, R.; Grünewald, K. G.; Kamperschröer, H.; Silwar, R. Verhalten einiger schwererflüchtiger Aromastoffe während der Alterung von Röstkaffee. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1979**, *6*, 52-57.

Tressl, R.; Grünewald, K. G.; Silwar, R. Gas chromatographic-mass spectrometric study of N-alkyl- and N-furfurylpyrroles in roasted coffee. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1981**, *7*, 28-32.

Tressl, R.; Silwar, R. Investigation of sulfur-containing components in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 1078-1082.

Tressl, R.; Holzer, M.; Kamperschröer, H. Formation of aromatic substances in roasted coffee in relation to the levels of free amino acids and reducing sugars. In: *10th International Scientific Colloquium on Coffee, Salvador-Bahia, 1982*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1983**, 279-292.

Tressl, R. Formation of flavor components in roasted coffee. In: *Thermal generation of aromas*. Parliment, T. H.; McGorin, R. J.; Ho, C.-T. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1989**, 285-301.

Tressl, R.; Helak, B.; Martin, N.; Kersten, E. Formation of amino acid specific Maillard products and their contribution to thermally generated aromas. In: *Thermal generation of aromas*. Parliment, T. H.; McGorin, R. J.; Ho, C.-T. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1989**, 156-171.

Tressl, R., Kersten, E.; Nittka, C.; Rewicki, D. Formation of sulfur-containing flavor compounds from [¹³C]-labeled sugars, cysteine, and methionine. In: *Sulfur compounds in foods*. Mussinan, C. J.; Keelan, M. E. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1994**, 224-235.

Van den Dool, H.; Kratz, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatog.* **1963**, *11*, 463-471.

Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P. Oxazoles and thiazoles in coffee aroma. *J. Food Sci.* **1974 a**, *39*, 1210-1215.

Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P. Neu entdeckte Stickstoffheterocyclen im Kaffee-Aroma. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1974 b**, *156*, 300-307.

Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P. Cycloalkylpyrazines in coffee aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 510-516.

Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P. Steam volatile aroma constituents of roasted coffee: neutral fraction. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1976**, *160*, 277-291.

Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P.; Ablanque, E. Flüchtige Inhaltsstoffe des Rohkaffees. In: *7th International Scientific Colloquium on Coffee, Hamburg, 1975*. Association Scientifique Internationale pour le Café (Hrsg.), Paris, **1976**, 115-123.

Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P. Messbare Aromaveränderungen bei Bohnenkaffee in sauerstoffdurchlässiger Verpackung. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1979**, *6*, 25-30.

Vitzthum, O. G.; Weisemann, C.; Becker, R.; Köhler, H. S. Identification of an aroma key compound in Robusta coffees. *Café Cacao Thé*, **1990**, *34*, 27-33.

Vitzthum, O. G. Thirty years of coffee chemistry research. In: *Flavor chemistry. Thirty years of progress*. Teranishi, R.; Wick, E. L.; Hornstein, I. (Hrsg.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moskau, **1999**, 117-133.

Weenen, H.; Tjan, S. B. Analysis, structure, and reactivity of 3-deoxyglucosone. In: *Flavor Precursors. Thermal and enzymatic conversions*. Teranishi, R.; Takeoka, G. R. (Hrsg.), American Chemical Society, Washington DC, **1992**, 217-231.

Weenen, H.; Apeldoorn, W. Carbohydrate cleavage in the Maillard reaction. In: *Flavour Science, Recent Developments*. Taylor, A. J.; Mottram, D. S. (Hrsg.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1996**, 211-216.

White, R. H. Characterization of the enzymatic conversion of sulfoacetaldehyde and L-cysteine into coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid). *Biochem.* **1988**, *27*, 7458-7462.

Wintgens, J. N. Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production. Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.

Wood, J. L.; du Vigneaud, V. A new synthesis of cystine. *J. Biol. Chem.* **1939**, *131*, 267-271.

Wood, J. L.; van Middlesworth, L. Preparation of cystine from radioactive sulfur. *J. Biol. Chem.* **1949**, *179*, 529-533.

Yaylayan, V. A.; Keyhani, A. Origin of 2,3-pentandione and 2,3-butandione in D-glucose/L-alanin Maillard model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3280-3284.

Yeretzian, C.; Jordan, A.; Badoud, R.; Lindinger, W. From the green bean to the cup of coffee: investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *214*, 92-104.

Zehentbauer, G. Krustenaromastoffe von französischem Weißbrot in Abhängigkeit von Rezeptur, Herstellung und Brotalter. Dissertation, Technische Universität München, **1997**.

Zlatkis, A.; Sivetz, M. Analysis of coffee volatiles by gas chromatography. *Food Res.* **1960**, *25*, 395-398.