

**Analyse der Bildung und Wege zur Verminderung von  
Acrylamid in Kartoffelerzeugnissen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation

von

Eric Rottmann, Diplom in Lebensmittelchemie

2021

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Ralf G. Berger

Korreferent: apl. Prof. Dr. oec. troph. Andreas Hahn

Tag der Promotion: 09.07.2021

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger, meinem Doktorvater und Mentor, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die Möglichkeit zur freien Entfaltung bei meiner Forschung, die Bereitstellung des Themas und die vielen hilfreichen Anregungen und Lösungsvorschläge bedanken.

Herrn PD Dr. Krings danke ich vielmals für die immer offene Tür und die sehr hilfreichen, informativen und konstruktiven Gespräche, mit denen Sie mir bei meiner Forschung vielfach weiterhelfen konnten.

Frau Dr. Linke, Frau Dr. Nieter und Frau Dr. Ersoy danke ich für die immer offenen Ohren bei diversen Diskussionen und die hilfreichen Ratschläge die daraus resultierten.

Ich möchte mich gerne bei Herrn Prof. Dr. Hahn für die Übernahme des Co-Referats und bei Prof. Dr. Franke für die Übernahme des Vorsitzes meiner Disputation bedanken.

Bei der Wernsing Feinkost GmbH möchte ich mich für die finanziellen Mittel bedanken. Außerdem danke ich allen bei der Produktion beteiligten Mitarbeitern, besonders Herrn Wiltenborg, Herrn Schmidt, Herrn Landwehr und Herrn Kozul.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen Arbeitskollegen, welche mir die Doktorandentätigkeit am Institut durch die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben. Außerdem halfen die geführten Diskussionen, neue Problemlösungsansätze für meine Arbeit hervorzubringen.

Meinen wissenschaftlichen Hilfskräften Frau Hauke und Herrn Debener danke ich vielmals für die Unterstützung bei der Analyse der Vielzahl an Proben.

Frau Theobald und Frau Takenberg möchte ich für die Instandhaltung der Gerätschaften und die Unterstützung bei der Arbeit im Institut danken.

Meinen Eltern Ute und Heinrich Rottmann möchte ich herzlichst danken für die uneingeschränkte Unterstützung in jeder Situation meines bisherigen Lebens sowie während des Studiums und der Doktorandenzeit.

Als letztes möchte ich meiner Freundin Jessica Drews für die niemals nachlassende Unterstützung während des gesamten Studiums und der Doktorandenzeit von Herzen danken.

## Kurzfassung

Acrylamid als potentiell krebserregende, mutagene und reproduktionsschädigende Prozesskontaminante mit einer relativ geringeren Sicherheitsmarge der Exposition (*Margin of Exposure* (MOE)) stellt eine ernstzunehmende Bedrohung für die öffentliche Gesundheit dar. Daher gibt es Bemühungen, die Acrylamidkonzentration in Lebensmitteln so niedrig wie möglich zu halten. Erhitzte Kartoffelerzeugnisse wie Pommes frites stehen hierbei aufgrund der hohen Konzentration an freiem L-Asparagin besonders im Fokus.

Die Zugabe einer Asparaginase (PreventASe L von DSM®) zur Verminderung von Acrylamid in tiefgekühlten (TK) Pommes frites wurde im industriellen Maßstab untersucht. Der Einsatz wurde an die komplexen industriellen Prozessparameter angepasst und verschiedene Enzymkonzentrationen (0; 0,1; 0,3; 0,5 und 1,0 Gew.-%) wurden getestet. Es erfolgte eine Verminderung der Acrylamidkonzentration von bis zu 59 %. Ein Einfluss auf die Farbe (Agtron-Bestimmung) wurde ausgeschlossen. Die sensorische Bestimmung eines sauren Geschmacks durch gebildete L-Asparaginsäure wurde durch zehn Panelisten als nicht signifikant ( $\alpha = 0,05$ ) eingestuft. Das Ergebnis beschreibt die erste erfolgreiche Behandlung von TK-Pommes frites im industriellen Maßstab ohne Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften der Pommes frites.

Die Wirkung von Phenolsäuren auf die Bildung von Acrylamid wird kontrovers diskutiert. Zur Bestimmung ihrer Wirksamkeit wurden Gemische aus den Phenolsäuren *p*-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure sowie Zimtsäure als Kontrolle mit Acrylamid erhitzt und auf eine mögliche Additionsreaktion untersucht. UPLC-HR-MS-qToF Messungen zeigten eine einfach addierte Bildung unter Wasserabspaltung bei allen vier Phenylacrylsäuren. Fragmentanalysen deuteten auf eine oxa-MICHAEL-Addition hin. Der Beweis erfolgte mittels Strukturanalyse über NMR Spektrometrie. In den Modellsystemen wurden 3-Amino-2-oxo-phenylacrylate nachgewiesen. In Untersuchungen von realen Proben aus Kartoffeln und Süßkartoffeln konnte keine Adduktbildung nachgewiesen werden. Aufgrund ebenfalls geringer Acrylamidkonzentration wurde eine Konzentration unter der Nachweisgrenze diskutiert.

Schlagwörter: Acrylamid, Pommes frites, Kartoffel, Süßkartoffel, Asparaginase, Industriemaßstab, Verminderung, Phenylacrylsäuren, oxa-MICHAEL-Addition, 3-Amino-2-oxopropyl-phenylacrylat

## Abstract

Acrylamide as a potentially carcinogenic, mutagenic, and reprotoxic process contaminant with a relatively low margin of exposure poses a serious threat to public health. Efforts are therefore undertaken to keep acrylamide concentrations in foods as low as possible. Due to the high concentration of free L-asparagine, there is a special focus on heated potato products such as French fries.

The use of an asparaginase (PreventASe L from DSM®) to mitigate acrylamide in frozen French fries on an industrial-scale was investigated. The application was adapted to the complex industrial process parameters and different enzyme concentrations (0, 0.1; 0.3; 0.5 and 1.0 % (w/w)) were tested. A mitigation of the acrylamide concentration of up to 59 % was achieved. An influence on the colour (agtron determination) was excluded. The sensorial determination of a sour taste due to the formation of L-aspartic acid, was classified as insignificant by ten panelists ( $\alpha = 0.05$ ). This result describes the first successful treatment of frozen French fries on an industrial-scale without affecting the sensorial properties of the French fries.

The effect of phenolic acids on the formation of acrylamide is discussed controversially. To determine their effectiveness, mixtures of the phenolic acids *p*-coumaric, caffeic, and ferulic acid and cinnamic acid as a control were heated with acrylamide and analysed for adduct formation. UPLC-HR-MS-qToF measurements showed a single adduct formation with the elimination of water for all four phenylacrylic acids. Fragment analyses indicated an oxa-Michael-addition. This was confirmed by structural analysis *via* NMR spectrometry. 3-Amino-2-oxo-phenyl-acrylates were identified in the model systems. However, the examination of real samples from potatoes and sweet potatoes showed no adduct formation. Due to the low acrylamide concentration, a concentration below the detection limit was discussed.

Keywords: Acrylamide, French fries, Potato, Sweet potato, Asparaginase, Industrial scale, Reduction, Phenylacrylic acids, oxa-Michael-addition, 3-Amino-2-oxopropyl-phenylacrylate

## Vorbemerkungen

Diese Arbeit basiert auf zwei in *peer reviewed* Zeitschriften veröffentlichten oder vor der Veröffentlichung stehenden Artikeln.

- Rottmann, E., Hauke, K. F., Krings, U., & Berger, R. G. (2020). Enzymatic acrylamide mitigation in French fries – An industrial-scale case study. *Food Control*, 107739.
- Rottmann, E. Volkmann, K., Fohrer, J., Krings, U., & Berger, R. G. (2021). Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration *via* oxa-Michael-addition during frying. *Current Research in Food Science*, accepted 08.04.2021.

Nachfolgend gelistete Poster sowie Patente sind im Rahmen dieser Doktorarbeit entstanden, jedoch nicht Teil dieser Dissertationsschrift.

Poster:

Rottmann, E., Berger, R. G, Agro-industrielle Nebenströme als Substrate zur Gewinnung lebensmitteltechnologisch nutzbarer Enzyme, 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, Deutschland.

Große, M., Krahe, N.-K., Rottmann, E., Berger, R. G, Cultivation of Enzyme Secreting Higher Fungi on Side Streams of the Food Processing Industries, 2018, 9th International Congress on Biocatalysis, Biocat, Hamburg, Deutschland.

Patente:

Mussmann, N., Wieland, S., Prueser, I., Van Lier, M., Degering, C., Berger, R.G., Rottmann, E., 2020, Laccase-containing detergent having improved cleaning power WO/2020/002187, DE102018210570, PCT/EP2019/066589

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>III</b>
<b>Kurzfassung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Vorbemerkungen</b> .....	<b>VI</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1. Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur</b> .....	<b>1</b>
1.1. Exposition mit Acrylamid.....	1
1.2. Chemische Eigenschaften und Verwendung .....	2
1.3. Acrylamidbildung in Lebensmitteln .....	2
1.3.1. Reaktionsmechanismus der Acrylamidbildung .....	3
1.3.2. Einfluss der Wasseraktivität auf die Acrylamidbildung .....	6
1.3.3. Einfluss der Temperatur auf die Acrylamidbildung .....	6
1.3.4. Acrylamid in verschiedenen Lebensmitteln.....	7
1.4. Kartoffelerzeugnisse .....	8
1.4.1. Pommes frites.....	8
1.4.2. Prozesskontaminanten im Zuge der Zubereitung von Pommes frites .....	11
1.5. Toxikologische Daten .....	11
1.6. Gesetzliche und andere Grenzwerte für den Acrylamidgehalt in Kartoffelprodukten .....	15
1.7. Strategien zur Verminderung von Acrylamid.....	16
1.7.1. Säuren .....	17
1.7.2. Salze.....	17
1.7.3. Aminosäuren .....	18
1.7.4. Antioxidantien und phenolische Verbindungen.....	19
1.7.5. Enzyme .....	21
1.7.6. Gentechnisch veränderte Sorten .....	22

1.7.7.	Einsatz von Vakuumfritteusen .....	22
1.8.	Transfer in einen industriellen Prozess .....	23
1.9.	Zielsetzung .....	27
<b>2.</b>	<b>Vorwort zur Publikation „Enzymatic acrylamide mitigation in French fries - an industrial case study“ .....</b>	<b>28</b>
<b>3.</b>	<b>Enzymatic acrylamide mitigation in French fries - an industrial case study. 29</b>	
3.1.	Highlights.....	29
3.2.	Abstract .....	29
3.3.	Keywords .....	30
3.4.	Introduction.....	30
3.5.	Material & Methods .....	32
3.5.1.	Sample and chemicals.....	32
3.5.2.	Pre-treatments and frying.....	32
3.5.3.	Asparaginase activity .....	33
3.5.4.	Amino acids and monosaccharide measurement .....	34
3.5.5.	Acrylamide measurement .....	35
3.5.6.	Colour measurement .....	36
3.5.7.	Sensory analysis and statistical evaluation .....	36
3.6.	Results and discussion .....	36
3.6.1.	Implementation of enzymatic acrylamide mitigation into an industrial production line of French fries (Table 3.5-1).....	36
3.6.2.	Enzyme activity .....	37
3.6.3.	Effects on amino acid conversion and acrylamide mitigation .....	39
3.6.4.	Sensorial analysis.....	40
3.7.	Conclusion .....	41
3.8.	CRediT authorship contribution statement .....	42
3.9.	Acknowledgments.....	43
<b>4.</b>	<b>Vorwort zur Publikation „Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration <i>via</i> oxa-Michael-addition during frying.“ .....</b>	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration <i>via</i> oxa-Michael-addition during frying. ....</b>	<b>46</b>
5.1.	Graphical Abstract .....	46
5.2.	Highlights.....	46



5.3.	Abstract .....	47
5.4.	Keywords .....	47
5.5.	Introduction.....	48
5.6.	Material & Methods.....	50
5.6.1.	Sample, chemicals, and materials .....	50
5.6.2.	Adduct synthesis with acrylamide in a model system .....	51
5.6.3.	Adduct synthesis with 3-chloropropanamide.....	51
5.6.4.	Adduct synthesis of <i>p</i> -coumaric acid with 3-chloropropanamide for NMR analysis .....	51
5.6.5.	Pre-treatments and frying.....	52
5.6.6.	Extraction of acrylamide and acrylamide adducts – Potato and sweet potato samples .....	53
5.6.7.	Extraction of acrylamide and acrylamide adducts - Model system and syntheses	53
5.6.8.	Determination of the acrylamide concentration <i>via</i> tandem mass spectrometry ...	54
5.6.9.	Enzymatically determination of the reducing sugar D-glucose and D-fructose .....	54
5.6.10.	Analysis of extracts via tandem mass spectrometry .....	54
5.6.11.	Determination of the exact mass <i>via</i> UPLC-QToF-MS/MS.....	55
5.6.12.	Determination of molecule structure <i>via</i> NMR .....	55
5.6.13.	Statistical evaluation .....	55
5.7.	Theory .....	56
5.8.	Results and discussion .....	57
5.8.1.	Acrylamide mitigation effect of phenylacrylic acids.....	57
5.8.2.	Reaction of acrylamide with phenylacrylic acids in a model system .....	59
5.8.3.	Synthesis of phenylacrylic acid esters with 3-chloropropanamide.....	62
5.8.4.	Structure elucidation <i>via</i> NMR .....	62
5.8.5.	Phenylacrylic acid ester formation in fried potato and sweet potato .....	63
5.9.	Conclusion .....	66
5.10.	Declaration of Competing interests .....	67
5.11.	Acknowledgements.....	67
5.12.	Supplementary material .....	68
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>74</b>
6.1.	Zusammenfassung.....	74
6.2.	Ausblick .....	76

<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>86</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1-1:	Abkürzungsverzeichnis mit Bedeutungen der Abkürzungen.....	XIV
Table 3.5-1:	Typical line for the industrial production of par-fried and frozen French fries (Medeiros Vinci <i>et al.</i> , 2011, Wernsing Feinkost GmbH, 2020) Highlighted in grey: Operational steps suitable for an enzymatic treatment; (–) = not determined; RT = room temperature. ....	33
Table 3.6-1:	Chemical and optical properties of the French Fries examined. Measured enzyme activity <i>versus</i> theoretical activity. Different enzyme solutions (% v/v) prepared in 0.045 mmol*L <sup>-1</sup> SAPP, pH 5, 60 °C. Theoretical activities calculated according to manufacturer information. Effect of different concentrations of enzyme solutions [% v/v] in 0.045 mmol*L <sup>-1</sup> SAPP of PreventASe L on the concentrations of L-aspartic acid and L-asparagine. Effect of different concentrations of PreventASe L on the concentrations of free acrylamide in French fries and the colour expressed as Agtron values. All analyses were done in duplicate except Agtron values.....	38
Table 5.8-1:	Postulated adducts of phenylacrylic acids with acrylamide in fried potato and sweet potato (measured according to 2.7). ....	59
Table 5.8-2:	Measured accurate mass of the protonated molecule ions, elemental composition and most abundant fragment ions of reaction products of phenylacrylic acids and acrylamide in a model system. Accurate mass is described as mass-to-charge-ratio [m/z]. The errors in atomic mass units (amu) between measured and calculated mass are shown in parenthesis.	61
Table 5.8-3:	Evaluation of phenylacrylic acid adduct formation in potato and sweet potato.....	65

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2-1: Strukturformel von Acrylamid.....	2
Abbildung 1.3-1: Mechanismus der Acrylamidbildung am Beispiel der Reaktion des Carbonyls Glucose mit Asparagin (geändert nach (Zyzak <i>et al.</i> , 2003))... 4	4
Abbildung 1.4-1: Prozessdiagramm (gekürzt) für die industrielle Produktion von TK-Pommes frites mit den Prozessschritten, welche einen Einfluss auf die Acrylamidbildung sowie deren Minimierung haben können (geändert nach (Wernsing Feinkost GmbH, 2020)).....	10
Abbildung 1.5-1: Mesomere Grenzstruktur des Acrylamids.....	12
Abbildung 1.5-2: Vorgeschlagener Metabolismus von Acrylamid. Direkte Reaktionsmöglichkeiten sowie die enzymatische Epoxygenierung zu Glycidamid und dessen Reaktionswege sind dargestellt (geändert nach (Capuano and Fogliano, 2011)).....	14
Abbildung 1.7-1: MICHAEL-Typ Reaktion der relativ nucleophilsten funktionellen Gruppe der Aminosäuren L-Serin, L-Lysin und L-Cystein mit der $\alpha,\beta$ -ungesättigten Vinylgruppe des Acrylamids bei pH 7 (Adams <i>et al.</i> , 2010).....	19
Abbildung 1.7-2: Katalytische Reaktion der Glucose-Oxidase (GOD).....	21
Abbildung 1.7-3: Katalytische Reaktion der Asparaginase.....	22
Abbildung 1.8-1: Schematische Darstellung der Schwemmrinne mit Zu- und Abflüssen... 25	25
Figure 3.6-1: Penetration depth of water soluble ink (Lamy, Heidelberg, Germany) in raw 64 mm <sup>2</sup> French fries at different incubations times. A) 10 s, B) 30 s C) 60 s. ....	38
Figure 3.6-2: Sensorical evaluation of sour-taste in potato dough with added L-aspartic acid. Sensorical analysis was performed by ten panelists. Samples were tasted blindly and randomly. Assessment scale was from 0 (no sour taste at all) to 10 (maximally acidic). Standard deviation is shown as error bars. Linear correlation of L-aspartic acid concentration and sour taste was determined as $0.1714x + 0.8014$ ; $R^2 = 0,973$ . The untreated sample was excluded. ....	41
Figure 5.7-1: Acrylamide concentrations [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] of potato and sweet potato cubes, which were dipped for 10 minutes in different 0.1 mol/L solutions (water = blank, cinnamic acid, <i>p</i> -coumaric acid, caffeic acid, and ferulic acid) and deep-fried for 6 minutes at 180°C. Data are mean ( $n = 2$ ) $\pm$ standard deviation. ....	56
Figure 5.8-1: Structure of postulated Michael-adducts of acrylamide/3-oxopropenamide with phenylacrylic acids ( $R_1$ and $R_2$ according to (Yuan <i>et al.</i> (2019) $R_3$ according to Xu and An (2016). A) shows the postulated adduct in <i>para</i> -position for <i>p</i> -coumaric-, caffeic-, and ferulic acid. B) shows the postulated adduct in <i>meta</i> -position for cinnamic-, <i>p</i> -coumaric-, caffeic-, and ferulic acid. C) shows the postulated adduct in <i>ortho</i> -position for cinnamic-, <i>p</i> -coumaric-, caffeic-, and ferulic acid. The substituents of the different phenylacrylic acids, which are not a part of the adduct formation reactions are shown as $R_1$ , $R_2$ , and $R_3$ . All substituents are described in more detail in Table 5.8-1. ....	58

Figure 5.8-2:	<i>p</i> -Coumaric acid acrylamide ester adduct: Ionisation, base ion formation and resonance stabilisation. Calculated exact mass and elemental composition are shown under each structure. ....	61
Figure 5.8-3:	Reaction mechanism of <i>p</i> -coumaric acid with acrylamide (A) and 3-chloropropanamide (B). Reaction A follows an oxa-Michael-mechanism, reaction B follows S <sub>N</sub> 2. ....	62
Figure 5.8-4:	UPLC-HR-MS-qToF extracted ion chromatogram (EIC) at 258 ± 0.1 m/z of two samples (overlaid). Grey: Sweet potato cubes dipped in 0.1 mol/L <i>p</i> -coumaric acid and acrylamide, which were fried for 6 minutes at 180 °C. Black: Sweet potato cubes dipped in 0.1 mol/L <i>p</i> -coumaric acid and acrylamide, which were fried for 6 minutes at 180 °C. The peak at 14.3 has not been identified. It was presumed to be an AGE. The peak at 15.2 min is the sodium adduct of 3-amino-3-oxopropyl cinnamate.....	66
Figure 5.12-1:	Assignment of the atoms of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.....	68
Figure 5.12-2:	600 MHz 1D- <sup>1</sup> H-spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.....	69
Figure 5.12-3:	600 MHz 1D- <sup>13</sup> C-spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.....	70
Figure 5.12-4:	600 MHz 2D-DQF-COSY-spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.....	71
Figure 5.12-5:	600 MHz heteronuclear 2D-HMBC-spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate. <sup>3</sup> JCH-coupling of the saturated protons (4.44 ppm, 8-H) with the carboxylic carbon (167.7 ppm, C-7) is marked (red arrow). ....	72
Figure 5.12-6:	600 MHz heteronuclear 2D-HSQC-spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate. ....	73

## Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 1.1-1:** Abkürzungsverzeichnis mit Bedeutungen der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
$\mu$	Mikro-
3-MCPD	3-Monochlorpropandiol
AAMA	<i>Acrylamide Mercapturic Acid</i> ; Acrylamid Mercaptursäure; N-acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ASPU*L <sup>-1</sup>	Asparaginase Units ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ )
ATP	Adenosintriphosphat
BMDL <sub>10</sub>	<i>Benchmark dose lower confidence limit 10%</i>
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
CYP2E1	Cytochrom P450 2E1
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
GAMA	<i>Glycidamide Mercapturic Acid</i> ; Glycidamidmercaptursäure; N-(R/S)-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
HILIC	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i>
HNE	4-Hydroxynoneal
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
LCI	Lebensmittelchemisches Institut
m/z	<i>Mass-to-charge-ratio</i>
mg	Milligramm
min	Minute
MOE	<i>Margin of Exposure</i>
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NOEL	<i>No observed effect level</i>
oPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
Pa	Pascal
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
QToF-MS/MS	<i>Quadropole-time-of-flight tandem massspectrometry</i>
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i> oder G-Kraft
RP	<i>Reversed-phase</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAPP	<i>Sodium acid pyrophosphate</i> (Dinatriumdihydrogendiphosphat)
t	Tonne
TK	Tiefkühl-
TNC	Trinatriumcitrat
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
V	Volt

## **1. Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

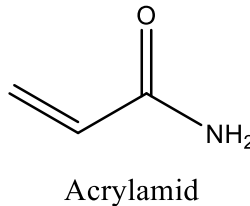
### **1.1. Exposition mit Acrylamid**

Im Jahr 2002 sorgte eine bereits seit langem bekannte Substanz erneut für Aufregung, als schwedische Wissenschaftler unter der Leitung von Margareta Törnqvist hohe Konzentrationen an Acrylamid in stärke-reichen Lebensmitteln fanden (Törnqvist, 2002). Bereits früh konnte nachgewiesen werden, dass Acrylamid und strukturell ähnliche Substanzen neurotoxische Eigenschaften besitzen (Spencer and Schaumburg, 1974). Über die Gefahren der Reinsubstanz bewusst, begann die Suche nach anderen Acrylamidquellen erst nach einem Unglück während eines Tunnelbaus zwischen Schweden und Norwegen. Zwischen 1995 und 1997 wurde das Acrylamid und N-Hydroxymethylacrylamid enthaltende Dichtungsmittel Rhoca-Gil (Siprogel) zum Verschluss von Wasserleckagen verwendet. Die Abdichtung führte nicht zum gewünschten Erfolg und große Mengen Wasser, angereichert mit Acrylamid, führten flussabwärts zu ersten Symptomen bei Fischen und Rindern (Weideborg *et al.*, 1998). Ab 1997 wurden große Mengen des Dichtungsmittels verwendet, wodurch auch die Mitarbeiter erste Vergiftungserscheinungen zeigten (Kjuus *et al.*, 1998). Bei Blutuntersuchungen konnten Hämoglobinaddukte des Acrylamids nachgewiesen werden (Törnqvist and Landin, 1995). Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass auch in Kontrollgruppen geringe Mengen dieser Addukte nachweisbar waren (Bergmark, 1997, Hagmar *et al.*, 2001), während wilde Tiere keine Anzeichen einer Acrylamidexposition zeigten. Da bereits vermutet wurde, dass sich Acrylamid in Tabakrauch befindet, wurden erhitzte Lebensmittel verfüttert, wodurch erstmals Acrylamid in Lebensmitteln nachgewiesen wurde (Tareke *et al.*, 2000).



## **1.2. Chemische Eigenschaften und Verwendung**

Acrylamid ist bei Raumtemperatur ein farbloser, geruchloser und kristalliner Feststoff (Haberman *et al.*, 1991). Es hat eine molare Masse von 71,08 g/mol und folgende Strukturformel:



**Abbildung 1.2-1:** Strukturformel von Acrylamid.

Der Schmelzpunkt liegt bei 84 °C (Lide, 1991) und es neigt oberhalb dieser Temperatur zur Polymerisation. Aufgrund seiner polaren Amidgruppe ist der Stoff leicht in Wasser, Ethanol, Methanol und Aceton löslich (Budavari *et al.*, 1989). Der log P-Wert beträgt -0,78 (Sangster, 1989). Die CAS-Nummer lautet 79-06-1. Die Vinylgruppe neigt unter Lichteinfluss zur Polymerisation (Stoffdatenbank, 2020).

Erstmals wurde Acrylamid im Jahr 1949 synthetisiert, und heutzutage werden allein in der Europäischen Union 100.000 Tonnen jährlich hergestellt. Die Haupteinsatzgebiete sind die Polyacrylamide, welche bei der Abwasserreinigung, Papier- und Zellstoffverarbeitung sowie der Mineralaufbereitung Verwendung finden. Als Zusatzstoff in Kosmetika und Farben wird es ebenfalls genutzt. Die toxikologischen Eigenschaften lassen sich auf die Monomere zurückführen, wodurch Polyacrylamide nur durch Rückstände an Monomeren toxisch wirken können (Madle *et al.*, 2003).

## **1.3. Acrylamidbildung in Lebensmitteln**

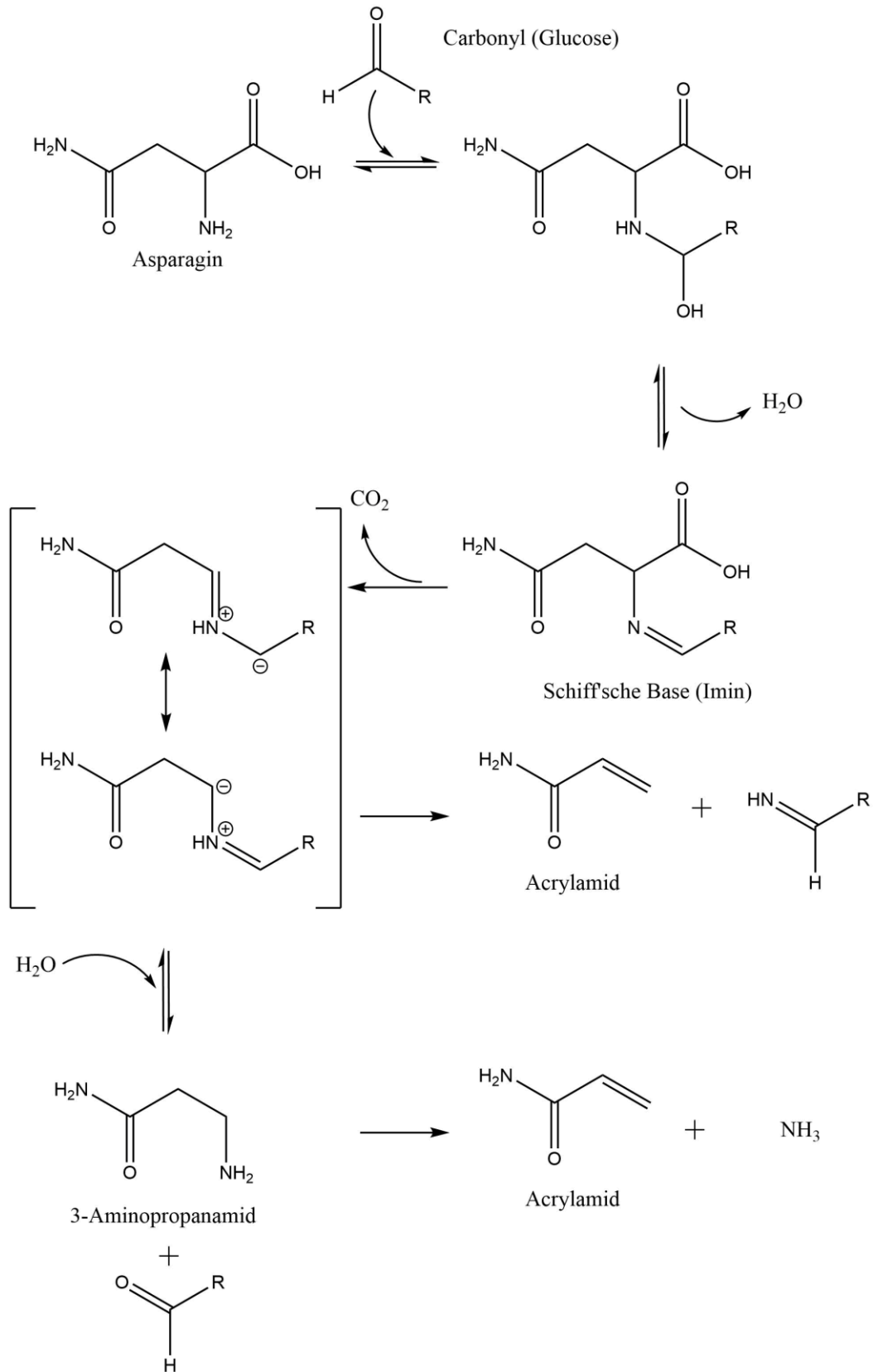
Nachdem Anfang 2002 hohe Konzentrationen von Acrylamid in stärkehaltigen Lebensmitteln nachgewiesen wurden, konnte bereits Ende desselben Jahres der Ursprung des Acrylamids

bestimmt werden. Acrylamid entsteht als Reaktionsprodukt im Zuge der MAILLARD-Reaktion durch Asparagin und reduzierende Zucker unter Hitzeeinwirkung (Mottram *et al.*, 2002, Stadler *et al.*, 2002). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen nicht-enzymatischer Bräunung und der Bildung von Acrylamid (je brauner, desto mehr Acrylamid) (Mestdagh *et al.*, 2008a). Analysen verschiedener Erhitzungsmethoden zeigten, dass beim Kochen keine nachweisbaren Mengen von Acrylamid entstehen. Dies beruht auf dem Mechanismus, bei dem im Laufe der Reaktion Wasser abgespalten wird. Bedingt durch das chemische Gleichgewicht wird Acrylamid vorzugsweise während wasserarmer Erhitzungsmethoden wie dem Backen, Grillen und Frittieren gebildet (Ahn *et al.*, 2002).

### **1.3.1. Reaktionsmechanismus der Acrylamidbildung**

Der Mechanismus konnte mittels Isotopenmarkierung vollständig aufgeklärt werden (Abbildung 1.3-1). Das partiell positiv geladene Carbonyl (meist reduzierender Zucker) reagiert hierbei mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des Asparagins zu einem instabilen Aldosylamin, welches unter Dehydratisierung zur Schiff'schen Base (Imin) reagiert. Diese wiederum reagiert durch Abspaltung von Kohlenstoffdioxid zur decarboxylierten Schiff'schen Base. Hierbei handelt es sich um ein inneres Salz mit einem negativ geladenen Kohlenstoff (Ylid). Aufgrund der mesomeren Grenzstrukturen führen von dort zwei Wege zum Acrylamid. Der direkte Weg verläuft unter Abspaltung eines Imins, ein indirekter über das Zwischenprodukt unter Addition von Wasser zu 3-Aminopropanamid und einem Carbonyl. Das 3-Aminopropanamid kann schließlich unter Abspaltung von Ammoniak zum Acrylamid reagieren (Zyzak *et al.*, 2003). Der beschriebene Reaktionsweg bezieht sich auf den Hauptbildungsweg. Neben reduzierenden Zuckern können auch Intermediate der MAILLARD-Reaktion zur Acrylamidbildung führen. Es wurde gezeigt, dass bei der Reaktion von Asparagin und reduzierenden Zuckern das Dicarbonyl Glyoxal gebildet wird und ebenfalls in der Lage ist, mit Asparagin zu Acrylamid zu reagieren (Koutsidis *et al.*, 2008).

**Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**



**Abbildung 1.3-1:** Mechanismus der Acrylamidbildung am Beispiel der Reaktion des Carbonyls Glucose mit Asparagin (geändert nach (Zyzak *et al.*, 2003)).

## **Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

---

Die Acrylamidbildungskinetik ist derzeit Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Es wurden Kinetiken nullter, erster und zweiter Ordnung in Betracht gezogen. Ein Erklärungsversuch beschrieb die komplexe MAILLARD-Reaktion zunächst als Reaktion zweiter Ordnung, da sie abhängig von beiden Edukten, z.B. Glucose und Asparagin, ist. In einem Modellsystem aus äquimolaren Mengen an Asparagin und Glucose folgt die Bildung von Acrylamid hier ebenfalls einer Reaktion zweiter Ordnung. Andererseits liegt Asparagin in Lebensmitteln meistens im Überschuss gegenüber den reduzierenden Zuckern vor, weshalb eine Kinetik erster Ordnung abhängig von der Glucose beschrieben wurde. Damit entsprach die Kinetik des Asparagins einer nullten Ordnung. Für den Fall, dass in einem Lebensmittel die Zucker im Überschuss vorliegen sollten, wären die Kinetiken vertauscht und Asparagin würde einer Kinetik erster Ordnung folgen (De Vleeschouwer *et al.*, 2007, De Vleeschouwer *et al.*, 2009).

Ebenfalls können Intermediate jeweils aus den reduzierenden Zuckern und Asparagin als Teil der komplexen MAILLARD-Reaktion gebildet werden, welche zur Bildung von Acrylamid führen können. Somit ist die Reaktion abhängig von der Konzentration an Asparagin, reduzierenden Zuckern sowie im Zuge der MAILLARD-Reaktion geformten Intermediaten. Neben der Bildung von Acrylamid erfolgt ab längeren Erhitzungszeiten eine zunehmende Eliminierung des Acrylamids, deren Kinetik einer Reaktion erster Ordnung folgt (De Vleeschouwer *et al.*, 2007, Wedzicha *et al.*, 2005, De Vleeschouwer *et al.*, 2009).

Neben dem Acrylamidbildungsweg können beide Edukte auch als Teil der MAILLARD-Reaktion in einer komplexen Kaskade zu anderen Produkten reagieren, deren Kinetik aufgrund der Komplexität nicht eindeutig definiert werden kann (Martins, 2003). Bei Betrachtung der Asparaginkonzentration zu Beginn der Reaktion entspricht die Konzentration des gebildeten Acrylamids, als Nebenprodukt der MAILLARD-Reaktion, ca. einem Tausendstel der des Asparagins (Mottram *et al.*, 2002).

### **1.3.2. Einfluss der Wasseraktivität auf die Acrylamidbildung**

Aufgrund des Einflusses des Wassergehalts und der Wasseraktivität auf die Kinetik der MAILLARD-Reaktion müssen diese bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten berücksichtigt werden (De Vleeschouwer *et al.*, 2007). Im Modellsystem wurde ein Reaktionsminimum zwischen 15 und 45 % Feuchtigkeit bestimmt, während sehr geringe und sehr hohe Werte zu deutlich höheren Acrylamidwerten führten (Ciesarova *et al.*, 2006). Da in gekochten Lebensmitteln keine nachweisbaren Mengen Acrylamid bestimmt wurden, ist der Bereich mit niedrigeren Wasserkonzentrationen für die Acrylamidbildung in Lebensmitteln von Bedeutung (Ahn *et al.*, 2002). Der Anstieg der Acrylamidbildung ist bei durchschnittlichen Frittierzeiten zunächst annähernd linear, zeigt bei längeren Frittierzeiten jedoch eine exponentielle Steigung (Matthäus *et al.*, 2004). Dies lässt sich durch den sinkenden Wassergehalt erklären, da während des trockenen Erhitzungsprozesses die Wasserkonzentration immer weiter sinkt. In einer weiteren Modellstudie mit im Ofen erhitztem „Kartoffelkuchen“ wurde erst Acrylamid ab Wasserkonzentrationen < 5 % nachgewiesen. Und mit jedem Prozentpunkt weniger stieg die Acrylamidbildung um ein Vielfaches an (Elmore *et al.*, 2005).

### **1.3.3. Einfluss der Temperatur auf die Acrylamidbildung**

Die Frittiertemperatur hat einen exponentiellen Einfluss auf die Acrylamidbildung (Matthäus *et al.*, 2004), bis zu einem Maximum bei 190-210 °C. Bei höheren Temperaturen wird Acrylamid eliminiert und es kommt zu einer Abnahme der Acrylamidkonzentration (Bråthen and Knutsen, 2005).

Untersuchungen am Beispiel von Pommes frites zeigten, dass die Acrylamidbildung vor allem an der Oberfläche stattfindet, während im Kern nur geringe Mengen Acrylamid gebildet werden. Dies liegt darin begründet, dass beim Frittiervorgang die Wärme von außen nach innen dringt, wodurch die Temperatur auf der Oberfläche je nach Frittiertemperatur 10 bis 40 °C höher ist. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch den Vergleich von 8x8 mit 14x14 mm Pommes. Aufgrund des größeren Oberfläche-zu-Volumenverhältnisse wiesen die 8x8 mm Pommes höhere Acrylamidkonzentrationen auf (Matthäus *et al.*, 2004).

## **Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

---

Der in 1.3.2 beschriebene Einfluss des Wassergehalts ist direkt mit dem Einfluss der Temperatur auf die Acrylamidbildung verbunden. Es wurde gezeigt, dass je höher die Frittiertemperaturen (150 °C-190 °C) sind, desto schneller sinkt der Wassergehalt in den Pommes frites (Gökmen *et al.*, 2006).

Die häufigsten Zubereitungsformen von Kartoffelerzeugnissen sind das Backen und Frittieren. Tendenziell führte das Frittieren durch die bessere Wärmeübertragung zu höheren Acrylamidwerten, wenn die gleichen Wassergehalte am Ende des Erhitzungsvorgangs erreicht wurden (Palazoğlu *et al.*, 2010).

### **1.3.4. Acrylamid in verschiedenen Lebensmitteln**

Im Zuge der Aufklärung des Mechanismus wurden gezielt Produkte mit hohen Konzentrationen an Asparagin sowie reduzierenden Zucker untersucht. Hierzu gehören Pommes frites, Backwaren, Lebkuchen, Chips, Knäckebrötchen, diabetische Lebensmittel, Snacks, Popcorn und Salzcracker, Cerealien, Kaffeebohnen, Brot und Toast, Babynahrung, Kartoffelreibekekuchen, Kinderbiscuits und Kaffeeersatz. Die absoluten Konzentrationen schwankten zwischen den Lebensmitteln erheblich. Bei 1408 validen Messergebnissen für Pommes frites lag das Minimum bei 5 µg/kg, während das Maximum 4563 µg/kg betrug. Ähnliche Ergebnisse wurden für Chips mit einem Minimum von 5 µg/kg und einem Maximum von 4515 µg/kg bestimmt (Wenzl and Anklam, 2007). Neuere Untersuchungen zeigten, dass das Problem erkannt und Maßnahmen ergriffen wurden, welche zu deutlich niedrigeren Werten führten. Das niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) veröffentlichte Untersuchungsergebnisse für Pommes frites und Chips. Die Minima und Maxima lagen hierbei jeweils bei <10 und 728 bzw. <10 und 1279 µg/kg für Pommes frites bzw. Chips (LAVES, 2018, 2019). Anhand der Datenlage wurden Mittelwerte für die tägliche Aufnahme von Acrylamid über Lebensmittel bestimmt. Die gemittelte tägliche Aufnahme liegt zwischen 0,2 und 1,4 µg/kg pro kg Körpergewicht/Tag (Dybing *et al.*, 2005). Die Beurteilung dieser konsumierten Konzentrationen sind in 1.5 zu finden.

## **1.4. Kartoffelerzeugnisse**

Kartoffeln enthalten von Natur aus viel freies Asparagin mit sortenbedingten Schwankungen (Amrein *et al.*, 2003). Daher legen die Acrylamiduntersuchungen ein besonderes Augenmerk auf Kartoffelerzeugnisse wie Pommes frites, Kroketten und Reibekuchen. Die Konzentrationen der Zucker als zweite Komponente der Acrylamidbildung schwanken stark abhängig von Kultivar (kultivierte Varietät (Sorte)), Lagerungsbedingungen und -zeiten, während das freie Asparagin hiervon beinahe unbeeinflusst bleibt. So steigen die Konzentrationen an Glucose, Fructose und Saccharose signifikant ab einer Temperatur von unter 8 °C an. Speziell mit den bei der Lagerung entstehenden reduzierenden Zuckern Glucose und Fructose korreliert der Acrylamidgehalt, wenn die Knollen für die Zubereitung von erhitzten Kartoffelerzeugnissen genutzt werden (Matsuura-Endo *et al.*, 2006). Da bei zu hohen Temperaturen die Keimung der Kartoffeln beginnt und sie somit für die Verarbeitung nicht mehr geeignet sind, sollte die Temperatur für die Lagerung der Kartoffeln zur Produktion von Kartoffelerzeugnissen zwischen 8 und 10 °C liegen.

### **1.4.1. Pommes frites**

Das wohl bekannteste Kartoffelerzeugnis sind Pommes frites. Während das eigenständige Zubereiten von Pommes frites einfach erscheint, handelt es sich bei der industriellen Verarbeitung um einen komplexen Herstellungsprozess. Die für die Acrylamidbildung und -minimierung wichtigsten Schritte der industriellen Tiefkühl-Pommes frites (TK-Pommes frites) Produktion sind in

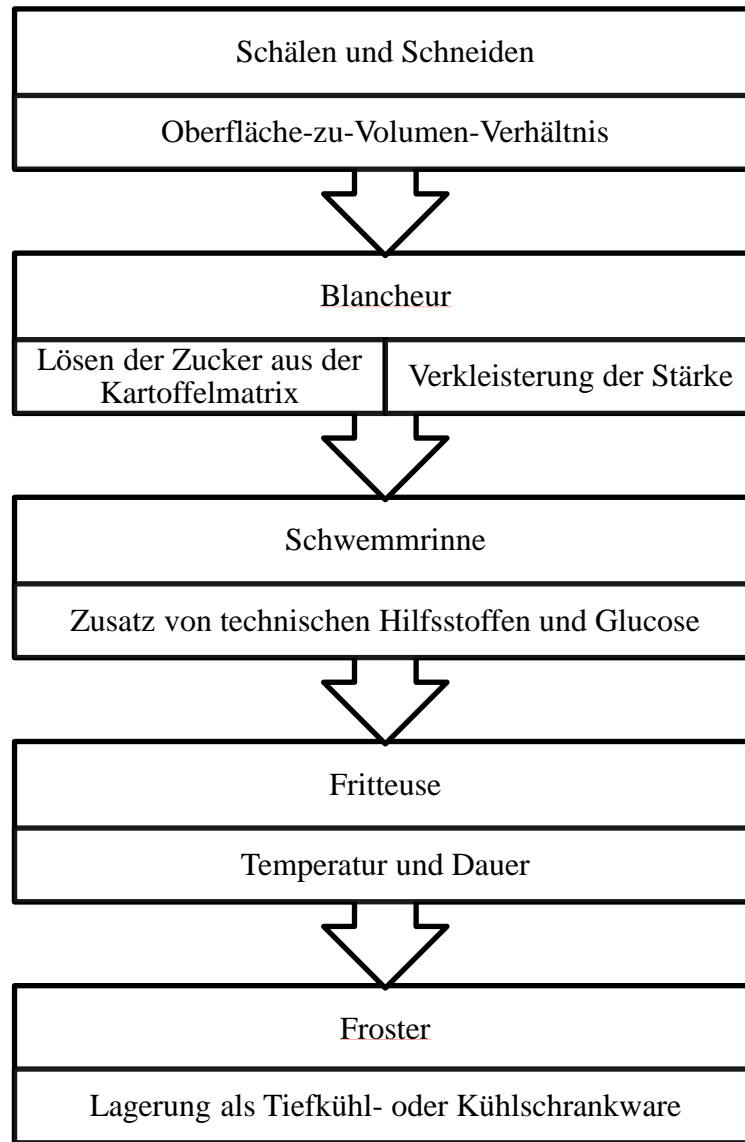
Abbildung 1.4-1 dargestellt. Die Kartoffeln werden zunächst grob von Verunreinigungen und Fremdkörpern getrennt und anschließend gewaschen. Mittels Dampfschäler erfolgt die Abtrennung der Schale. Danach werden die Kartoffeln mit Druck durch ein Schneidmesser gepresst und erhalten je nach Schnittmuster des Messers ihre typische Form. Bereits die Form hat einen signifikanten Einfluss auf die Acrylamidbildung, da die Geometrie bzw. das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis bei der typischen Angabe in µg/kg nicht berücksichtigt wird. So können Pommes frites mit einer größeren Kantenlänge zu geringeren Acrylamidwerten

## **Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

---

führen (siehe 1.3.3) (Gökmen and Palazoğlu, 2009). Die rohen Pommes frites Streifen werden anschließend in mehreren Blancheuren gewaschen. Dies wäscht periphere Zucker heraus und inaktiviert unerwünschte Enzymaktivitäten. Die hohen Temperaturen führen gleichzeitig zu einer Verkleisterung der Stärke auf der Oberfläche der Kartoffelstreifen. Die Verkleisterung stellt eine Barriere dar, wodurch Fett und Substanzen zur Minimierung des Acrylamids nur schwer in die Kernregion eindringen können. Des Weiteren verkürzen die hohen Temperaturen die Frittierzeit (Lamberg and Olsson, 1989). Dann werden die Pommes frites Streifen 60 Sekunden in der Schwemmrinne mit technischen Hilfsstoffen benetzt. Es erfolgt der Einsatz von Dinatriumdihydrogendiphosphat (*Sodium acid pyrophosphate* (SAPP)) zur Chelatkomplexbildung mit Eisen(II) gegen ein Vergrauen der Kartoffeln, da sich in frisch gekochten Kartoffeln ein farbloser Eisen(II)-Chlorogensäure-Komplex bilden kann, welcher an der Luft zu einem grauen Eisen(III)-Komplex reagiert (Mazza and Qi, 1991). Die Zugabe von Glucose soll für ein gleichmäßiges Bräunungsergebnis sorgen. Daraufhin werden die Pommes frites Streifen getrocknet und in die Fritteuse geleitet. Die vorfrittierten Pommes frites werden sofort auf die gewünschte Temperatur gekühlt und verpackt (Wernsing Feinkost GmbH, 2020).





**Abbildung 1.4-1:** Prozessdiagramm (gekürzt) für die industrielle Produktion von TK-Pommes frites mit den Prozessschritten, welche einen Einfluss auf die Acrylamidbildung sowie deren Minimierung haben können (geändert nach (Wernsing Feinkost GmbH, 2020)).

### **1.4.2. Prozesskontaminanten im Zuge der Zubereitung von Pommes frites**

Die Produktion von Pommes frites steigt seit Jahren an. Trotz jahresabhängiger Schwankungen stieg sie von 264.000 t in 2004 auf 420.010 t in 2019 (Destatis, 2021). Dadurch rücken die mit diesem erhöhten Verzehr einhergehenden Auswirkungen immer mehr in den Fokus. Die Verwendung eines geeigneten Öls spielt hier eine besondere Rolle. Die Verwendung von Ölen bei hohen Temperaturen, wie beim Frittieren, führt zu einer Vielzahl von Prozesskontaminanten. Der Einsatz von Fetten mit einem hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren erfolgt, um die positiven Nährwerteigenschaften von Pommes frites zu erhöhen (Wernsing Feinkost GmbH, 2020, Lunn and Theobald, 2006). Ungesättigte Fettsäuren durchlaufen beim Erhitzen jedoch eine Isomerisierung und formen *trans*-Fettsäuren, welche im Verdacht stehen, kardiovaskulären Erkrankungen zu fördern. Des Weiteren können bereits bei der Raffinierung von Ölen für den Einsatz als Frittieröl im Schritt der Desodorierung 3-Monochlorpropan-1,2-diole entstehen, welche als potentiell kanzerogen für die Nieren eingestuft wurden. Außerdem reagieren ungesättigte Fettsäuren bei Kontakt mit Sauerstoff zu Lipidhydroperoxiden, welche beim Frittieren aufgrund ihrer Hitzelabilität zu verschiedenen Aldehyden reagieren. Hierbei sei speziell 4-Hydroxynonenal (HNE) als Reaktionsprodukt von Linolensäure und anderen  $\omega$ -6 Fettsäuren genannt. Es wurde gezeigt, dass dieses  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyd toxische Eigenschaften besitzt, welche denen für Acrylamid in 1.5 beschriebenen entsprechen (Aladedunye, 2016).

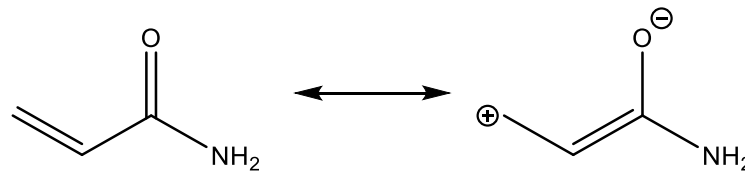
### **1.5. Toxikologische Daten**

Acrylamid wurde von der *International Agency of Research on Cancer* als „wahrscheinlich krebserregend“ eingestuft. Entsprechend der EU-Chemikalien-Verordnung 1272/2008 ist Acrylamid als kanzerogen - 1B, mutagen - 1B und reproduktionsschädigend (fruchtschädigend) R<sub>F</sub>-2 eingestuft. Eine Exposition tritt durch den Gebrauch als Arbeitsmaterial in Industrie und Labor auf. Die nicht mehr toxischen Polymere werden als Plastikprodukte, Lebensmittelverpackungen und in Kosmetika verwendet (IARC, 1994). Im Alltag finden sich die Monomere vor allem in Zigarettenrauch (Schumacher *et al.*, 1977) und Lebensmitteln (Törnqvist, 2002).

## Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur

---

Acrylamid ist ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Carbonylderivat mit drei Kohlenstoffatomen. Es zeichnet sich durch ein konjugiertes System einer elektronenziehenden Carbonylverbindung mit einer vinyliischen Gruppe aus. Die  $\pi$ -Elektronen in diesem System sind dadurch leicht polarisierbar. Dies führt zu einer partiell negativen Ladung am Sauerstoff und einer partiell positiven Ladung am  $\beta$ -Kohlenstoff; eine mesomere Grenzstruktur entsteht unter Ladungstrennung.



**Abbildung 1.5-1:** Mesomere Grenzstruktur des Acrylamids.

Der  $\beta$ -Kohlenstoff mit dem Elektronenmangel stellt ein MICHAEL-Elektrophil dar und erlaubt dem Acrylamid daher, mit nucleophilen Verbindungen zu reagieren. Hierzu zählen besonders Verbindungen mit funktionellen Gruppen wie Thiolen, Thioethern und Aminen. Alle drei Gruppen lassen sich unter den proteinogenen Aminosäuren und somit auch in Proteinen finden. Des Weiteren gelten die Aminogruppe der Purinbasen sowie die Sauerstoffe der Pyrimidin- und Purinbasen als nucleophil (Hinson and Roberts, 1992).

Da der Fokus dieser Arbeit auf dem Acrylamidgehalt in Lebensmitteln liegt, werden im Weiteren nur die orale Aufnahme über Lebensmittel, die Metabolisierung und Ausscheidung thematisiert. Oral aufgenommenes Acrylamid wird aufgrund seiner Größe und guten Wasserlöslichkeit schnell und vollständig im menschlichem gastrointestinal Trakt resorbiert (Dearfield *et al.*, 1988). Die Resorption erfolgt passiv über Diffusion. Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient wurde in Dickdarmkrebszellen auf  $2-4 \cdot 10^{-5}$  cm/s bestimmt. Die Diffusion erfolgt in beide Richtungen, von der apikalen zur basalen Seite sowie andersherum. Die Diffusionskinetik folgt in beiden Richtungen der 1. Ordnung. Die Aufnahme des Acrylamids von der apikalen oder basalen Seite in die Zellen wurde auf 0,5-1,0 % bestimmt und ein aktiver Transport in die Zellen wurde nicht nachgewiesen (Schabacker *et al.*, 2004, Zödl *et al.*, 2007).

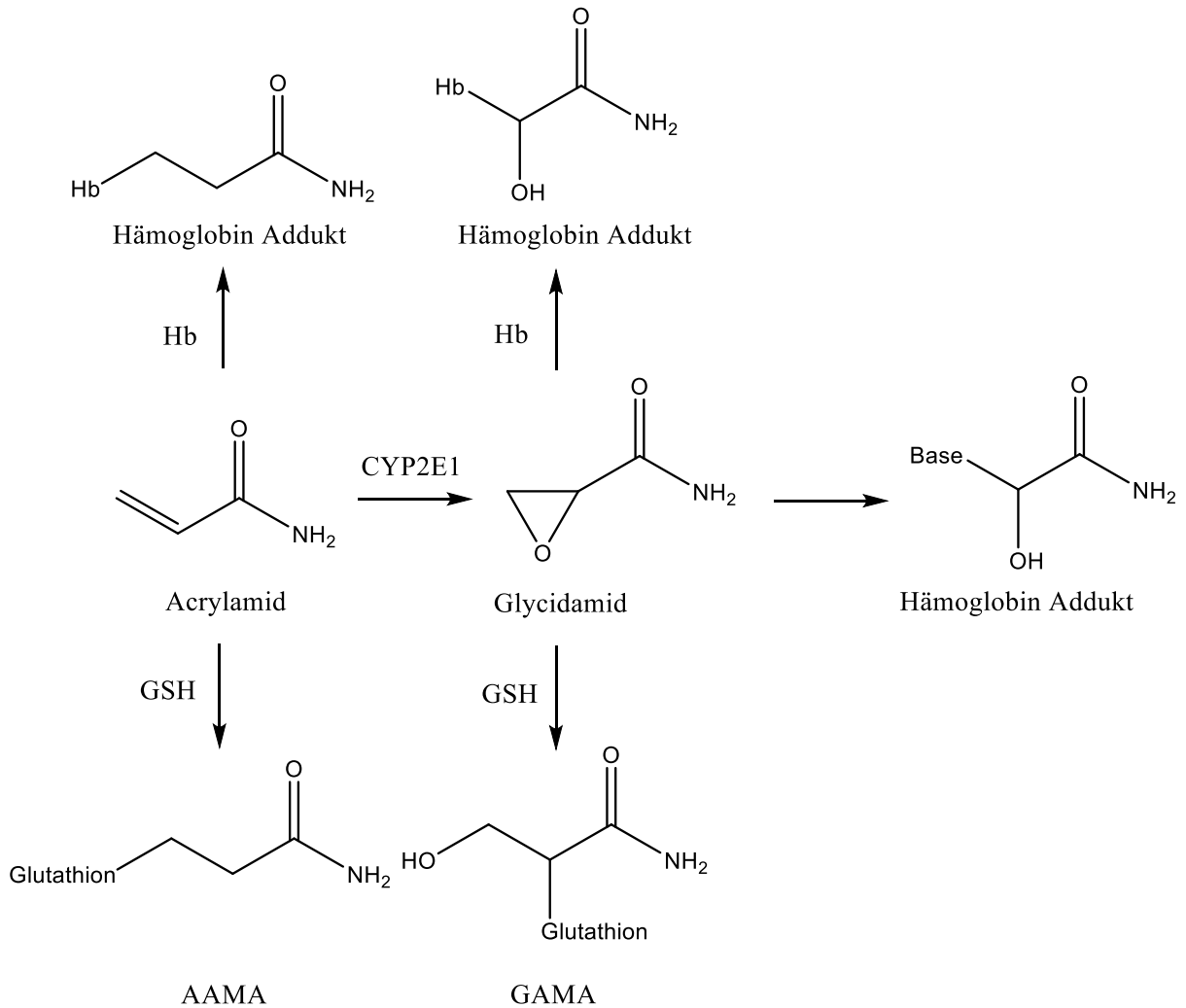
Das Enzym P450 2E1 katalysiert die Epoxygenierung von Acrylamid zu Glycidamid (Doroshenko *et al.*, 2009). Überwiegend erfolgt die Metabolisierung von Acrylamid und Glycidamid über Glutathion (Dearfield *et al.*, 1988). In einer Humanstudie mit acrylamidhaltigen Lebensmitteln wurden 60,3 % des aufgenommenen Acrylamids innerhalb von 72

## **Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

---

Stunden in Form von freiem Acrylamid sowie Glutathionaddukten im Urin wiedergefunden (Fuhr *et al.*, 2006). Hierbei handelte es sich um direkte Reaktionsprodukte zwischen Acrylamid bzw. Glycidamid und Glutathion. Die entstandenen Mercaptursäuren werden als AAMA (N-acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cysteine) und GAMA (N-(R/S)-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cysteine) bezeichnet. Die deutlich größere Menge wird hierbei als AAMA ausgeschieden. Das Verhältnis beider Mercaptursäuren beträgt ungefähr (10:1) (Boettcher *et al.*, 2006). Jedoch kann AAMA speziell im menschlichen Körper zu AAMA-sulfoxid oxidiert werden, welches als toxisch für Nieren und Blase beschrieben wurde (Capuano and Fogliano, 2011).

Die verbleibenden 40 % des aufgenommenen Acrylamids können mit Hämoglobin und anderen Proteinen reagieren. Hierbei dienen einerseits die nucleophilen Seitenketten der Aminosäuren des Proteins, wie die des Cysteins, sowie andererseits N-terminale Aminosäuren als MICHAEL-Donator und die aktivierte Doppelbindung des Acrylamids als MICHAEL-Akzeptor. Das gebildete Glycidamid kann aufgrund seiner im Vergleich zu Acrylamid noch höheren Reaktivität über eine nucleophile Substitution ebenfalls mit Hämoglobin reagieren. (Bergmark *et al.*, 1993). Außerdem besitzt Glycidamid die Fähigkeit, direkt mit DNA-Basen zu reagieren (Gamboa da Costa *et al.*, 2003). Diese Mechanismen erklären die in Tierstudien nachgewiesenen erhöhten Tumor- und Letalitätsraten bei mit Acrylamid gefütterten Tieren (Johnson *et al.*, 1986, Friedman *et al.*, 1995).



**Abbildung 1.5-2:** Vorgeschlagener Metabolismus von Acrylamid. Direkte Reaktionsmöglichkeiten sowie die enzymatische Epoxygenierung zu Glycidamid und dessen Reaktionswege sind dargestellt (geändert nach (Capuano and Fogliano, 2011)).

Mit Hilfe mehrerer Studien bestimmte die *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) zusammen mit der *World Health Organisation* (WHO) die tägliche Aufnahme von Acrylamid auf 1 µg/kg Körpergewicht (KG) pro Tag sowie für das 95 % Perzentil auf 4 µg/kg KG pro Tag. Bereits bekannt waren die Konzentration von 0,2 mg/kg KG pro Tag, für den kein beobachteter Effekt (*No observed effect level* (NOEL)) bestimmt wurde (Burek *et al.*, 1980), und der Dosisrichtwert für die untere Vertrauensgrenze (10 %) (*Benchmark dose lower confidence limit* (BMDL<sub>10</sub>)) von 0,3 mg/kg KG pro Tag (Johnson *et al.*, 1986). Anhand dieser Studien wurde von der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) für Acrylamid eine Sicherheitsmarge der Exposition (*Margin of Exposure*

(MOE)) festgestellt. Diese beschreibt den Quotienten aus der Konzentration, bei welcher in Tierversuchen Tumore nachgewiesen wurden (NOEL und BMDL<sub>10</sub>), und der tatsächlichen, aufgrund von Studien angenommenen Konzentration, welcher der Mensch exponiert ist. Ein Wert von > 10.000 gilt als unbedenklich. Jedoch wurden für Acrylamid jeweils Werte von 200-50 (mit NOEL) für Erwachsene und 300-75 (mit BMDL<sub>10</sub>) für Erwachsene mit hohem Konsum (95 %-Perzentil) bestimmt. Aus diesem Grund ist es von besonderer Bedeutung für die öffentliche Gesundheit, die Acrylamidkonzentration in Lebensmitteln möglichst gering zu halten (EFSA, 2015).

### **1.6. Gesetzliche und andere Grenzwerte für den Acrylamidgehalt in Kartoffelprodukten**

Mit der Verordnung „VO (EG) 2017/2158 der europäischen Kommission vom 20. November 2017 zur Festlegung von Minimierungsmaßnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln“ sind Lebensmittelproduzenten gemäß Artikel 2 Absatz 1 dazu verpflichtet, die in Anhang I aufgeführten Minimierungsstrategien anzuwenden, wenn sie gemäß Artikel 1 Absatz 2 eines der genannten Produkte herstellen.

Für Acrylamid in Lebensmitteln gelten gemäß Artikel 1 Absatz 1 in Verbindung mit Anhang IV für Pommes frites (verzehrfertig) und für andere Kartoffel-/Erdapfelerzeugnisse aus Kartoffel-/Erdapfelteig die Richtwerte 500 und 750 µg/kg.

Sollten gemäß Artikel 4 Anhang III Nummer IV die Analysenergebnisse zeigen, dass der Richtwert überschritten wird, müssen die Lebensmittelunternehmer angewandte Minimierungsmaßnahmen überprüfen und zusätzlich verfügbare Maßnahmen ergreifen, sodass sichergestellt ist, dass der Acrylamidgehalt des Enderzeugnisses unter dem Richtwert liegt.

Die großen Supermarktketten stehen als direkter Vertreiber der Lebensmittel ebenfalls in der Verantwortung, für die Sicherheit ihrer Produkte zu sorgen. Aus diesem Grund hat eine große Lebensmittelhandelskette ein Positionspapier für bewusste Ernährung veröffentlicht. In die-

sem Papier werden noch deutlich niedrigere Zielwerte für die vertriebenen Produkte festgelegt. Für verzehrfertige Pommes frites und Kartoffelchips liegen die Zielwerte bei 71 bzw. 263 µg/kg.

### **1.7. Strategien zur Verminderung von Acrylamid**

Im Zuge von Veröffentlichungen ab 2002 wurden die industriellen Parameter (Abbildung 1.4-1) auf eine möglichst geringe Bildung von Acrylamid optimiert. Dies war jedoch nur in begrenztem Maße möglich. Physikalische Parameter wie das Herabsetzen der Frittierzeit und -temperatur waren nur in einem gewissen Rahmen modifizierbar, da die Leitsätze für Kartoffelerzeugnisse maximale Feuchtigkeitsgehalte sowie eine krosse Oberfläche im verzehrfertigen Zustand vorschreiben. Zudem würde dies das Problem nur verschieben, da final der Endverbraucher, evtl. entgegen der Zubereitungsvorschrift, entscheidet, wie lange die Pommes frites und Co. im Backofen/in der Fritteuse bleiben, bis die gewünschte Textur erzielt ist (Jackson and Al-Taher, 2005, Wernsing Feinkost GmbH, 2020, BMEL, 1997). Da kritische Konzentrationen an Acrylamid erst bei der Endzubereitung entstehen und es zu diesem Zeitpunkt keine praktikable Möglichkeit mehr gibt, das Acrylamid zu entfernen, liegt der Fokus der Minimierungsstrategien auf der Minimierung der Edukte (Wernsing Feinkost GmbH, 2020).

Ein Wechsel des Öls ist aufgrund des Geschmackseinflusses auf die Pommes frites und auch durch die Problematik der 3-Monochlorpropandiole (3-MCPD) ebenfalls nur schwer möglich (Weißhaar, 2011, Matthäus and Pudiel, 2013, Wernsing Feinkost GmbH, 2020). Sofern es das Lieferangebot erlaubt, werden asparaginarmer Sorten wie *Agria* und *Bintje* für die Pommes frites Produktion verwendet (Amrein *et al.*, 2003). Um zusätzlich zu diesen Grundvoraussetzungen den Acrylamidgehalt im Endprodukt zu senken, wurden chemische und enzymatische Verminderungsstrategien beschrieben.

### 1.7.1. Säuren

Eine Senkung des pH-Werts führte im wässrigen Modellsystem aus Asparagin und Glucose zu einer Verminderung des Acrylamidgehalts um 73,3 % (pH 6) und 99,1 % (pH 4). Das vorherige Eintauchen von Pommes frites in eine Citronensäurelösung senkte den Acrylamidgehalt ebenfalls um über 70 % (1 %: 73,1 %; 2 %: 79,7 %). Jedoch verursachte die 2 %ige Lösung einen sauren Geschmack der Pommes frites. Die Protonierung der Aminogruppe des Asparagins senkt deren Nucleophilie und wurde als wahrscheinlicher Grund der Minimierung beschrieben (Jung *et al.*, 2003). Die Behandlung verschiedener Kartoffelerzeugnisse mit unterschiedlichen Säuren erzielte im Allgemeinen eine signifikante Minimierung des Acrylamidgehalts, wobei gelegentlich negative Einflüsse auf Geschmack und Textur beschrieben wurden (Vinci *et al.*, 2012). In einem industriellen Versuch mit Essigsäure und Citronensäure wurden die behandelten Proben ebenfalls geschmacklich reklamiert (Medeiros Vinci *et al.*, 2011).

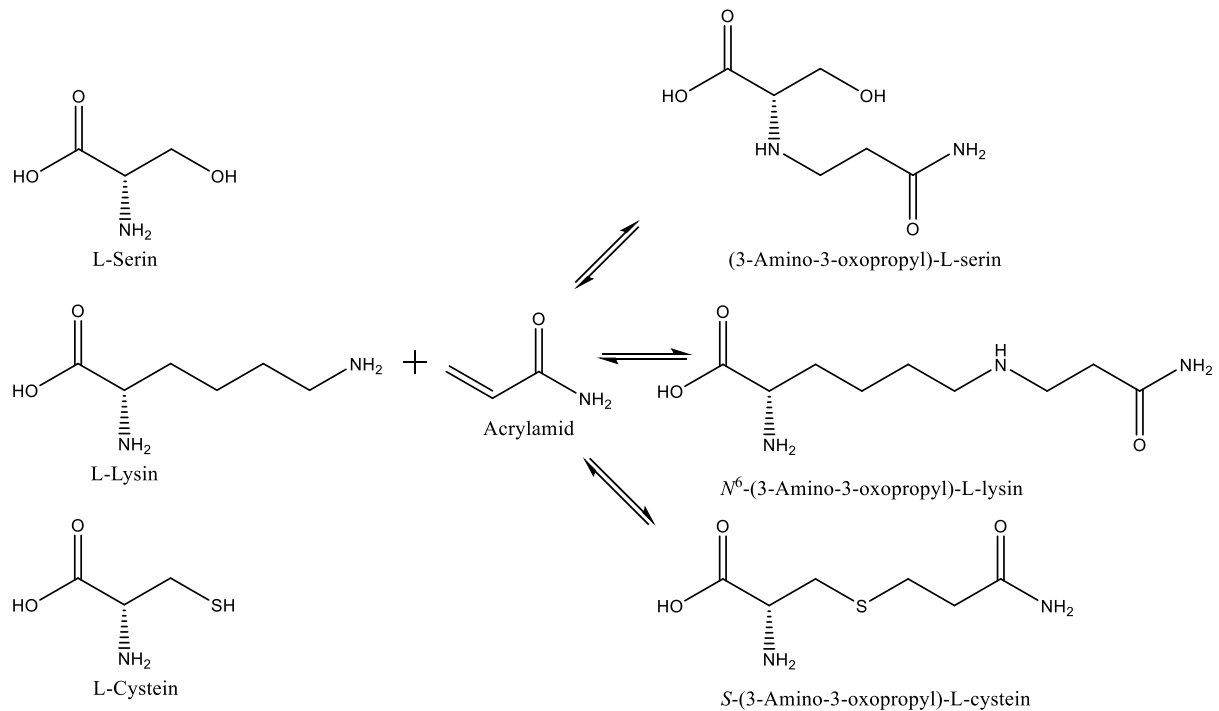
### 1.7.2. Salze

Neben den Säuren wurden auch Salze auf ihren Einfluss auf den Acrylamidgehalt untersucht. Die Behandlung mit mono- und divalenten Kationen wurde getestet. Während einwertige Ionen geringfügige Verminderungen bewirkten, senkten Calciumchloridlösungen sowohl im Modellsystem wie auch in Pommes frites den Acrylamidgehalt um über 90 % (Pedreschi *et al.*, 2010, Gökmen and Şenyuva, 2007). Jedoch führte der großtechnische Einsatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aufgrund des häufig eingesetzten SAPP zur Bildung schwerlöslicher Calciumsalze und einer helleren Farbe der Pommes frites (Medeiros Vinci *et al.*, 2011). Der genaue Mechanismus der Minimierung ist bisher ungeklärt; es wird eine Senkung des pH-Werts durch die Interaktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit dem in der Kartoffel enthaltenen Pektin in Betracht gezogen (Andersson *et al.*, 1994). Außerdem sollen die Ionen die Zersetzung der Glucose im Zuge der MAILLARD-Reaktion erhöhen, während das Asparagin unverändert bleibt (Gökmen and Şenyuva, 2007).



### **1.7.3. Aminosäuren**

Ein Großteil der 20 proteinogenen Aminosäuren wurde zur Minimierung des Acrylamidgehalts getestet (Koutsidis *et al.*, 2009). Die besten Effekte erzielten hierbei die Aminosäuren Glycin, Lysin und Cystein. Abhängig von der Behandlungszeit und Konzentration der Lösung wurde der Acrylamidgehalt in Kartoffelchips um mehr als 80 % verringert. Die Minimierung beruht wahrscheinlich darauf, dass die hinzugegebenen Aminosäuren und Asparagin um die reduzierenden Zucker konkurrieren und so weniger Acrylamidvorläufer gebildet werden. (Koutsidis *et al.*, 2009). Andererseits könnten die nucleophilen Gruppen der Aminosäuren kovalent an das Acrylamid binden (Kim *et al.*, 2005). Bei der direkten Reaktion zwischen Acrylamid und Serin, Lysin und Cystein senkten alle drei den Acrylamidgehalt signifikant um 38,5, 49,3 und 91,7 %. Die Aminogruppe der Aminosäure sowie nucleophile Gruppen der Seitenketten können hierbei reagieren (Abbildung 1.7-1). Aufgrund der relativ starken Nucleophilie der Thiolgruppe im Cystein zeigte diese Aminosäure die größte Minimierung. Bei Serin wurde die nucleophilere Amino- gegenüber der Alkoholgruppe bevorzugt. Ebenso reagierte zunächst die reaktivere  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins mit dem Acrylamid (Adams *et al.*, 2010).



**Abbildung 1.7-1:** MICHAEL-Typ Reaktion der relativ nucleophilsten funktionellen Gruppe der Aminosäuren L-Serin, L-Lysin und L-Cystein mit der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Vinylgruppe des Acrylamids bei pH 7 (Adams *et al.*, 2010).

Der Einfluss auf Geruch und Geschmack ist je nach Aminosäure stark unterschiedlich. Während eine Behandlung mit Cystein zu einem starken Fehl aroma führte, wurden bei der Behandlung mit Glycin erhöhte Alkylpyrazinkonzentrationen nachgewiesen, welche als Schlüsselaromakomponenten von gekochten Kartoffeln gelten. Hierbei kondensieren zwei beim Streckerabbau entstehende  $\alpha$ -Aminocarbonyle zu Dihydropyrazinen, welche als Zwischenprodukt dann zu den Alkylpyrazinen oxidieren (Morales *et al.*, 2008, Low *et al.*, 2007).

#### 1.7.4. Antioxidantien und phenolische Verbindungen

Der Begriff Antioxidans beschreibt die Eigenschaft, die Oxidation einer anderen Substanz zu verhindern oder zu verlangsamen, indem das Antioxidans selbst oxidiert wird. Entsprechend dieser Definition gelten auch konkurrierende Aminosäuren nach ihrer in 1.7.3 beschriebene

## **Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

---

Reaktivität als Antioxidantien. In diesem Kapitel soll der Fokus jedoch auf der antioxidativen Kapazität phenolischer Verbindungen liegen.

Eine statistische Analyse der natürlich vorkommenden phenolischen Verbindungen (u. a. Chlorogensäure, Kaffeesäure, Tyrosin und Phenylalanin) in Kartoffelpulver korrelierte reziprok mit der Acrylamidkonzentration (Zhu *et al.*, 2010). Die direkte Zugabe phenolischer Verbindungen führte jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einerseits wurden keine signifikanten Verminderungen nachgewiesen (Bassama *et al.*, 2010), andererseits wurde in einem Emulsionssystem (Glucose, Asparagin, Emulgator Polysorbat 40 und Öl) bei direkter Zugabe der phenolischen Substanzen in die Emulsion ein signifikanter Effekt bestimmt (Kotsiou *et al.*, 2011).

Um diese Ergebnisse einzuordnen, sollen zunächst mögliche Angriffspunkte während der Bildung von Acrylamid betrachtet werden: Die Spaltung von Saccharose zu den beiden reduzierenden Zuckern kann durch Antioxidantien gefördert werden (Kocadağlı *et al.*, 2012). Durch das erhöhte Angebot an reduzierenden Carbonylverbindungen kann die Acrylamidbildung steigen. Zwischenprodukte der MAILLARD-Reaktion wie das bereits in 1.3 erwähnte Glyoxal können durch Antioxidantien abgefangen werden und stehen somit für die Reaktion mit Asparagin nicht mehr zur Verfügung, wodurch weniger Acrylamid gebildet wird (Totlani and Peterson, 2006). Die Inhibierung der Oxidierung der Fette kann die Acrylamidbildung senken und eine mögliche Reaktion der oxidierten Fette mit Asparagin verhindern (Capuano *et al.*, 2010). Es wurde beschrieben, dass einige Antioxidantien Asparagin ausfällen können, wodurch ebenfalls die Acrylamidbildung unterbunden wird (Shahidi and Ho, 2005). Bereits gebildetes Acrylamid kann schließlich über eine MICHAEL-Typ Addition mit nucleophilen Antioxidantien reagieren (Jin *et al.*, 2013).

Durch die diversen Reaktionsmöglichkeiten muss jedes Antioxidans anhand seiner chemischen Struktur beurteilt werden. Die häufigsten phenolischen Substanzen in der Kartoffel sind Flavonoide, Phenolsäuren, Tannine, Stilbene, Cumarine und Lignane. Bei den Phenolsäuren überwiegen *p*-Cumar-, Kaffee-, und Ferulasäure (Akyol *et al.*, 2016). Eine ausführliche Beschreibung möglicher Reaktionsmechanismen der genannten Phenolsäuren wird in Kapitel 5 diskutiert.

### 1.7.5. Enzyme

Wie in 1.7 beschrieben, entstehen die kritischen Mengen Acrylamid erst bei der Endzubereitung. Da es zu diesem Zeitpunkt praktisch keine Möglichkeit mehr gibt, das Acrylamid zu entfernen, und bisher auch kein entsprechendes Enzym bekannt ist, liegt der Fokus der Minimierungsstrategien auf der Entfernung der Edukte. Im großtechnischen Maßstab wird Glucose zudosiert, um ein gleichmäßiges Bräunungsergebnis im Zuge der MAILLARD-REAKTION zu erhalten. Entsprechend ist die Zugabe einer Glucose-Oxidase (Abbildung 1.7-2) nicht sinnvoll (Wernsing Feinkost GmbH, 2020, Hodge, 1953). Es empfiehlt sich die Nutzung einer Asparaginase, welche die Hydrolyse von Asparagin zu Asparaginsäure katalysiert (Abbildung 1.7-3). Mit dem Einsatz von Asparaginase konnte der Acrylamidgehalt je nach Enzymdosierung gezielt gesenkt werden, und zwar ohne nachweisbaren Einfluss auf Geschmack und Farbe (Xu *et al.*, 2016). Asparaginase (PreventASe<sup>®</sup> und Acrylaway<sup>®</sup>) der Firmen DSM (Heerlen, Niederlande) und Novozyme (Bagsvaerd, Dänemark) sind kommerziell erhältlich. Da die Acrylamidkonzentration direkt mit dem Produkt aus Asparagin und reduzierendem Zuckern korreliert (Amrein *et al.*, 2003), bleibt die praktische Umsetzung zu klären. Enzyme sind pH- und temperaturabhängig und benötigen je nach Enzymaktivität eine gewisse Inkubationszeit. Die Implementierung in den industriellen Herstellungsprozess muss somit sorgfältig geplant und optimiert werden.

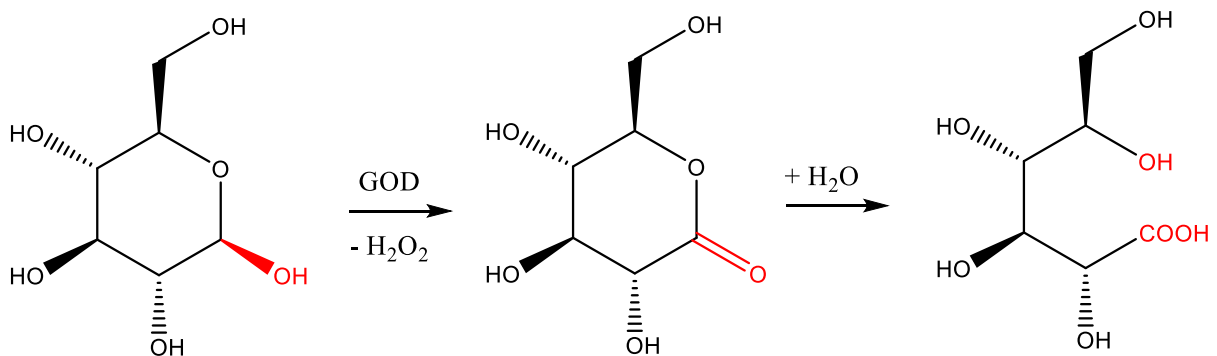
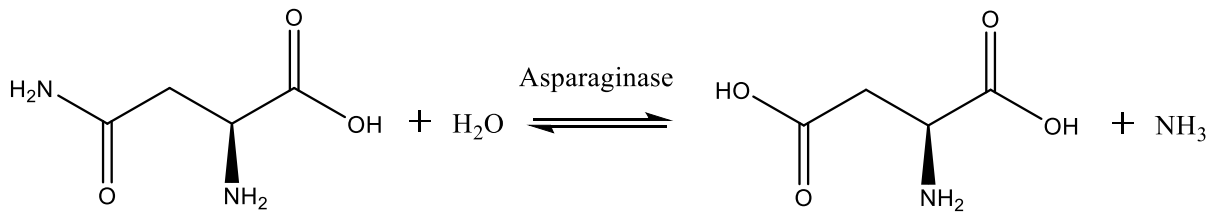


Abbildung 1.7-2: Katalytische Reaktion der Glucose-Oxidase (GOD).



**Abbildung 1.7-3:** Katalytische Reaktion der Asparaginase.

### 1.7.6. Gentechnisch veränderte Sorten

Die gentechnische Modifizierung von Kartoffelsorten erlaubt die Minimierung des Asparagingehalts in den Knollen. Die Kartoffelpflanze besitzt diverse Isoenzyme, welche den letzten Schritt der Asparaginsynthese, die Aminierung von Aspartat zu Asparagin mit Hilfe von Glutamin und ATP, katalysieren. Mit Hilfe eines gewebespezifischen Promotors wurde die Expression des Asparagin Synthase 1-Gens in den Sprossknollen der Kartoffelpflanze gemindert. Dies führte zu einer Minimierung des Asparagingehalts um ~80 % und des Acrylamidgehalts um ~70 % ohne einen nachweisbaren Einfluss auf Knollenform und Erntemenge (Chawla *et al.*, 2012). Der prinzipiellen Möglichkeit zur Nutzung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) zur Minimierung des Acrylamidgehalts steht die geringe Akzeptanz der EU-Bevölkerung gegenüber GVO entgegen (transGEN, 2019).

### 1.7.7. Einsatz von Vakuumfritteusen

Eine physikalische Alternative zu den genannten chemischen, biologischen und gentechnischen Minimierungsstrategien stellt der Einsatz von Vakuumfritteusen dar. Mit dem Einstellen eines Vakuums (1333 Pa) wird die Frittiertemperatur gesenkt, wodurch geringere Acrylamidkonzentrationen gebildet werden (Granda and Moreira, 2005). In einer Studie mit

Kartoffelchips wurden bei identischer Feuchtigkeit, Textur sowie angenehmerer Farbe im Endprodukt Minimierungen von bis zu 94 % nachgewiesen (Granda *et al.*, 2004). Eine weitere Studie (Minimierung 98 %) zeigte jedoch, dass die Mehrheit eines Sensorik-Panels die konventionell frittierten Chips bevorzugte, da neben Acrylamid auch weitere MAILLARD-Reaktionsprodukte minimiert wurden. Hier sind die Alkylpyrazine zu erwähnen, die den typischen Geschmack frittiertes und gebackener Kartoffelerzeugnisse ausmachen (Belkova *et al.*, 2018). Eine Optimierung im Zuge weiterer Forschungsarbeiten wäre jedoch vielversprechend.

Es muss in diesem Zusammenhang zwischen der Produktion von Chips und Pommes frites unterschieden werden, da Chips nach der industriellen Produktion verzehrfertig verpackt werden, während die Endzubereitung von TK-Pommes frites erst beim Verbraucher bzw. Gastronomen erfolgt. Wahrscheinlich würde das Vorfrittieren von TK-Pommes frites unter Vakuum die schon sehr geringen Acrylamidwerte vorfritierter Pommes frites weiter senken. Verbraucher und Gastronomen werden dennoch aus rein praktikablen Gründen weiter konventionell frittieren. Damit kann der Vorteil des Vakuumfrittierens beim kritischen Zubereitungsschritt von Pommes frites nicht effektiv genutzt werden (Wernsing Feinkost GmbH, 2020).

### **1.8. Transfer in einen industriellen Prozess**

Seit der Publikation des Acrylamidproblems im Jahr 2002 sind eine Vielzahl von Minimierungsstrategien wie in 1.7 beschrieben worden. Allerdings fehlt es an Publikationen, die die erfolgreichen Minimierungsstrategien aus dem Labor in einen industriellen Prozess überführen. Aufgrund der Produktabhängigkeit der Produktionsprozesse beziehen sich die folgenden Ausführungen ausschließlich auf die industrielle Produktion tiefgekühlter Pommes frites.

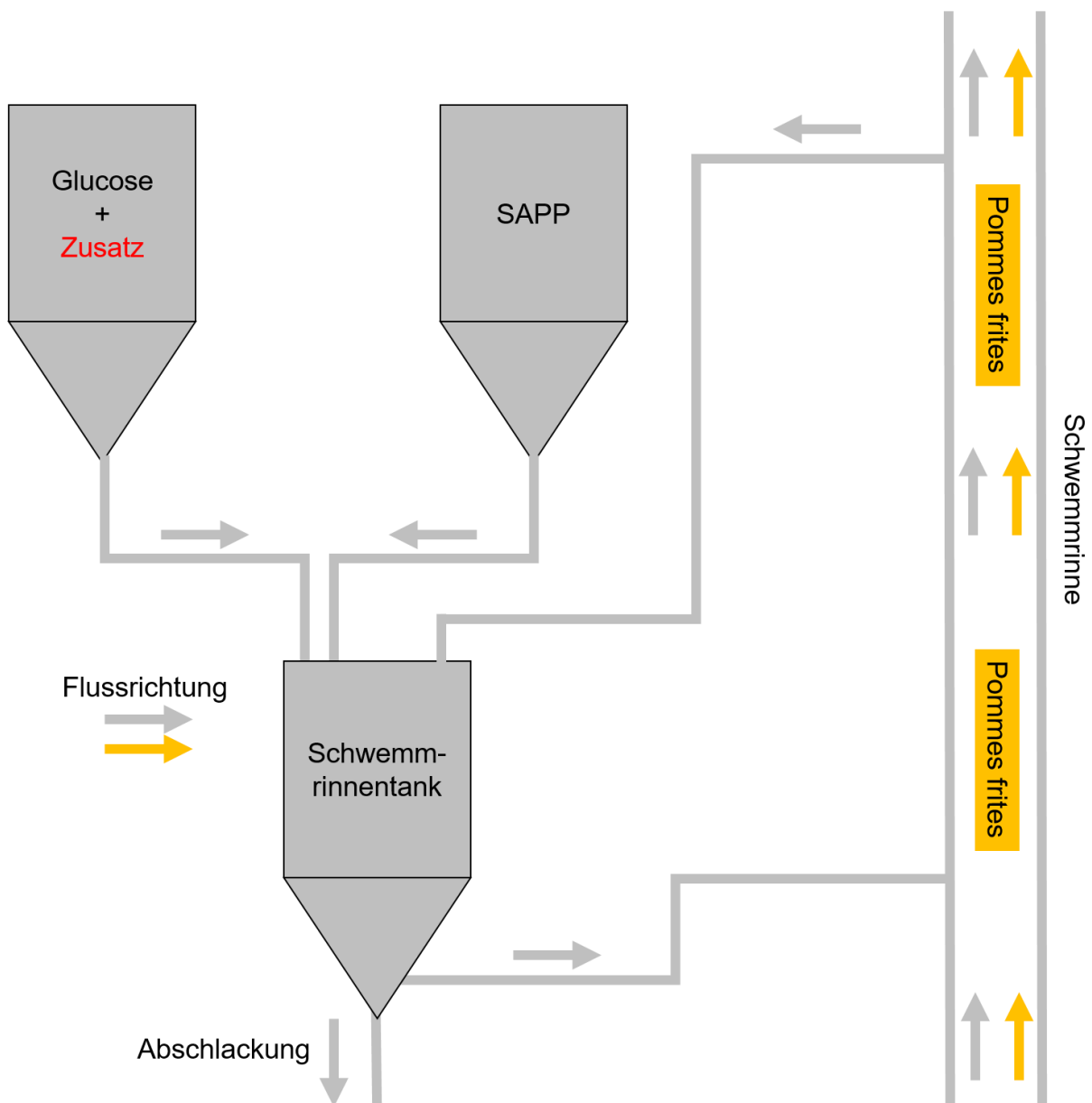
Wie in 1.4.1 beschrieben, gibt es mehrere Ansatzmöglichkeiten für die Verminderung von Acrylamid. Im industriellen Prozess sind die physikalischen Parameter wie Temperatur und Zeit bereits optimiert und müssen neben dem Acrylamidgehalt weiteren Anforderungen gerecht werden (3-MCPD, *trans*-Fettsäuren, Farbe, Geschmack, Aroma). Möglich sind chemische Minimierungsstrategien. Der Frittierschritt ist ebenfalls optimiert, weswegen Zusätze

## **Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

---

zum Frittierfett nicht in Betracht gezogen wurden. Die meisten Minimierungsstrategien sehen das Lösen der Substanz im Wässrigen vor. Dies ermöglicht die Minimierung während der beiden folgenden Produktionsschritte: 1. Das Blanchieren im Blancheur und 2. Die Behandlung mit Dinatriumdihydrogendiphosphat (SAPP) und Glucose in der Schwemmrinne. Aufgrund der deutlich geringeren Volumina gegenüber den Blancheuren und der konstanten Temperatur sowie des aufgrund der Zugabe von SAPP konstanten pH-Werts wurde die Schwemmrinne als wahrscheinlich am besten geeignete Möglichkeit für eine chemische oder enzymatische Behandlung gewählt.

Die schematische Skizze der Schwemmrinne ist in Abbildung 1.8-1 dargestellt. Temperatur, pH-Wert und Verweildauer sind abhängig von der Produktionslinie, deren Produktionsgeschwindigkeit sowie den Konzentrationen der Zusätze. Für diese Arbeit wurde sich an typischen Produktionsbedingungen orientiert. Die Prozessbedingungen entsprechen normalerweise: Temperatur 60 °C, pH-Wert 5,0 und Verweildauer der Pommes frites ca. 60 Sekunden. Die Verweildauer kann über die Produktionsgeschwindigkeit (t/h) gesteuert werden, während Temperatur und pH-Wert aufgrund der Konzentration des SAPPs und zur Inhibierung von Mikroorganismen unveränderlich sind (Wernsing Feinkost GmbH, 2020, Medeiros Vinci *et al.*, 2011). Salze, welche mit SAPP ausfallen, Säuren, die den pH-Wert verändern sowie Enzyme, die bei 60 °C und pH 5 nicht aktiv sind, sind für die Verminderung daher nicht geeignet. Zusammenfassend wurden Aminosäuren, Enzyme und Antioxidantien als die potentiell wirksamsten Substanzen für eine Acrylamidminimierung in der industriellen Produktion in Erwägung gezogen.



**Abbildung 1.8-1:** Schematische Darstellung der Schwemmrinne mit Zu- und Abflüssen.

Trotz intensiver Forschung an Minimierungsstrategien blieben entscheidende Durchbrüche bei der Umsetzung im industriellen Maßstab aus. Nach derzeitigem Kenntnisstand existiert nur eine Veröffentlichung, deren Autoren versuchten, den Acrylamidgehalt im industriellen Maßstab zu senken. In dieser Studie wurden Essigsäure, Citronensäure, Calciumlactat sowie eine Asparaginase getestet. Die beiden Säuren zeigten über drei Versuchsreihen keinen eindeutigen Trend und ein Einfluss auf den Geschmack, speziell den sauren Geschmack, wurde von einem großen Anteil der Panelisten bestimmt. Calciumlactat beeinflusste die Farbe und



## **Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

---

fiel mit dem SAPP aus (siehe 1.7.2). Der Einsatz von Asparaginasen bei der Produktion von TK-Pommes frites zeigte keinen signifikanten Effekt. Die behandelten Pommes frites wiesen teilweise sogar signifikant höhere Acrylamidwerte auf. Dies wurde dem erhöhten pH-Wert zugeschrieben, welcher dem Optimum des Enzyms angepasst wurde (siehe 1.7.1). Gekühlte Pommes frites ließen sich wiederum erfolgreich behandeln, da kein Frittierschritt das Enzym deaktiviert und somit das Enzym bis zur Zubereitung mehrere Tage wirksam war und das Asparagin vollständig umgesetzt wurde (Medeiros Vinci *et al.*, 2011).

Der Dachverband der Lebensmittelindustrien in der Europäischen Union *FoodDrinkEurope* veröffentlicht daher regelmäßig die *Acrylamide Toolbox* (FoodDrinkEurope, 2019). Es handelt sich hierbei um eine Zusammenfassung und Empfehlung der vielversprechendsten Strategien zur Minimierung der Acrylamidkonzentration. Diese soll den Produzenten als Grundlage für die Implementierung von Minimierungsstrategien im industriellen Maßstab dienen.

### **1.9. Zielsetzung**

Seit 2002 wurde eine Vielzahl an Publikationen zum Thema Acrylamid veröffentlicht, wodurch detaillierte Beschreibungen des Mechanismus, des toxikologischen Einflusses und der möglichen Minderungsstrategien vorliegen. Nicht alle Minimierungsstrategien sind gleich effektiv. Manche Strategien, wie der Einsatz von Phenolsäuren, führten sogar zu widersprüchlichen Ergebnissen. Um eine verlässliche Implementierung in den industriellen Prozess zu gewährleisten, müssen der Mechanismus verstanden und die Reaktionsbedingungen optimiert werden. Nur so kann ein gleichbleibendes und sicheres Produkt erzielt werden.

In einer Kooperation zwischen dem Institut für Lebensmittelchemie in Hannover (LCI) und dem Unternehmen Wernsing Feinkost GmbH sollte an dieser Implementierung geforscht werden.

Der erste Themenschwerpunkt war die Implementierung von Prozessen zur Senkung des Acrylamidgehalts in Kartoffelerzeugnissen, um den Anforderungen der EU und des Einzelhandels gerecht zu werden. Hierbei sollte neben den Minimierungsstrategien die Vereinbarkeit mit den europäischen Gesetzen sowie eine kosteneffiziente Implementierung überprüft werden. Hierfür sollten zunächst aus der Literatur bekannte Minimierungsstrategien an die industriellen Prozessbedingungen angepasst und im Labor untersucht werden. Anhand der Ergebnisse sollten die vielversprechendsten Strategien im industriellen Maßstab getestet werden. Während der industriellen Versuche sollte die Überwachung und Analyse möglichst vieler Prozessparameter erfolgen. Schlussendlich sollte bei jeder erfolgreichen Prozessimplementierung eine ausführliche sensorische Analyse erfolgen. Denn eine Minimierungsstrategie mit nicht tolerierbaren Einflüssen auf die Sensorik hätte keine praktische Relevanz.

Um effektive Verminderungsstrategien zu optimieren, sollte auch deren Mechanismus genauer analysiert werden. Da Strategien mit spezifischer Reaktion wie die der enzymatischen Umsetzung von Asparagin bereits ausreichend beschrieben wurden, sollte der Fokus hier auf noch unzureichend beschriebenen Reaktionsmechanismen, wie denen der Phenolsäuren, liegen. Zur Aufklärung von Intermediaten und Produkten sollten flüssigchromatographische Analyseverfahren gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie (UPLC-HR-MS-qToF) erfolgen. Des Weiteren sollte die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) zur Strukturaufklärung genutzt werden.

## **2. Vorwort zur Publikation „Enzymatic acrylamide mitigation in French fries - an industrial case study“**

Aufgrund der fortgeschrittenen Forschung zum Thema Acrylamid sind diverse Minimierungsstrategien und deren Effektivität für Kartoffelerzeugnisse beschrieben. Diese Publikation fokussierte sich auf Pommes frites, weswegen Strategien für Modellsysteme und Chips nur bedingt in die Methodenentwicklung einbezogen wurden. In eigenen Laborversuchen kristallisierte sich der Einsatz von Asparaginasen als eine der effektivsten Strategien heraus. In Versuchen mit Kroketten wiesen diese einen sauren Geschmack durch gebildete Asparaginsäure auf. In Pommes frites wurde dies, wie in der Literatur bereits beschrieben, nicht bestätigt (Vinci *et al.*, 2012).

Da die Wirksamkeit für Asparaginasen im Labormaßstab bereits bewiesen wurde, mussten die Prozessparameter evaluiert werden, um eine erfolgreiche Umsetzung des Asparagins zu gewährleisten. Da industrielle Prozesse auf Effizienz und ein gleichbleibendes Endprodukt eingestellt sind, würden Änderungen an diesen möglicherweise den Acrylamidgehalt im Endprodukt senken, aber dafür andere Produkteigenschaften verändern. Daher wurde die enzymatische Behandlung unter dem Aspekt der Erhaltung von Textur, Farbe, Geschmack und Geruch in den bestehenden Prozess implementiert (Wernsing Feinkost GmbH, 2020). Wie in Kapitel 1.7.5 beschrieben, sind kommerzielle Asparaginasen auf dem Markt erhältlich. Durch eine theoretische Evaluation der pH- und Temperatur-Optima der Enzyme und der industriellen Prozessschritte wurde das am besten geeignete Enzym zusammen mit dem passenden Prozessschritt ausgewählt. Die Entscheidung fiel auf die PreventASe L<sup>®</sup> von DSM mit den pH- und Temperaturoptima 5,0 und 55 °C. Damit lag diese Asparaginase mit ihren Optima sehr nah am pH-Wert und der Temperatur in der Schwemmrinne (5,0 und 60 °C). Durch diese Überschneidung fiel auch die Entscheidung für die Schwemmrinne als der geeignetste Prozessschritt für die Behandlung. Um Prozessschwankungen durch Kartoffelcharge, Zucker, Aminosäuren, pH-Wert, Temperatur etc. möglichst ausschließen zu können, wurden die Vergleichsprobe und die behandelten Proben auf derselben Produktionslinie innerhalb weniger Stunden verarbeitet.

Die Durchführung führte zum ersten Nachweis der erfolgreichen industriellen Implementierung einer Asparaginase zur Senkung von Acrylamid in TK-Pommes frites.

### **3. Enzymatic acrylamide mitigation in French fries - an industrial case study**

Eric Rottmann, Karen F. Hauke, Ulrich Krings, Ralf G. Berger

#### **3.1. Highlights**

Acrylamide monitoring during industrial-scale production of French Fries.

Asparaginase (PreventASe) as useful mitigation agent.

Correlation between asparagine mitigation and acrylamide concentration.

Up to 59% mitigation of acrylamide without adverse sensorial effects.

#### **3.2. Abstract**

An enzymatic acrylamide mitigation strategy for French fries was examined according to industrial conditions. The influence of substrates, the enzyme dosage as well as the properties of the final product including colour, sour off-taste, acrylamide concentration and process efficiency were investigated. The floatation channel as the probably most efficient step for an enzymatic treatment was simulated. 64 mm<sup>2</sup> (cut size 8 × 8 mm) blanched French fries were treated for 1 min in asparaginase (PreventASe L®) solutions (Blank, 0.1 (2500 ASPU\*L<sup>-1</sup>), 0.3 (7500 ASPU\*L<sup>-1</sup>), 0.5 (12,500 ASPU\*L<sup>-1</sup>) and 1.0% (25,000 ASPU\*L<sup>-1</sup>) (928, 2347, 3012 and 5983 μmol\*L<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>) combined with 0.045 mmol\*L<sup>-1</sup> sodium dihydrogen diphosphate (SAPP) at 60 °C. The use of a 1% asparaginase solution (5983 μmol\*L<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>) diminished the acrylamide concentration by 59% as measured by ESI-LC-MS/MS without any influence on colour or taste. A correlation between L-asparagine and acrylamide concentrations was observed, while under constant process parameters no other factor showed a significant impact. The study was carried out on a 15-ton batch of potatoes and

proved the concept. Further investigations throughout a storage season may lay the foundation for an industrial implementation.

### 3.3. Keywords

French fries, Acrylamide, Industrial-scale, Asparaginase, Mitigation

### 3.4. Introduction

Acrylamide has been classified by the International Agency of Research on Cancer as “probably carcinogenic”. As a working material, exposure to humans prevails mainly during industrial processing or in chemical laboratories. Acrylamide polymers are widely used as plastics, food packaging materials, cosmetics and for gel preparation in electrophoresis (IARC, 1994).

After a high concentration of acrylamide was found in heated starchy foods in 2002, the formation pathway in food was elucidated in the same year. Acrylamide was formed in the course of the *Maillard* reaction through the condensation of free L-asparagine with reducing sugars, mainly glucose, at elevated temperatures (Mottram *et al.*, 2002, Stadler *et al.*, 2002). Brown colour and the formation of acrylamide were closely correlated (Mestdagh *et al.*, 2008a). According to the proposed reaction mechanism, acrylamide was not detected upon cooking (Ahn *et al.*, 2002).

Attempts to control acrylamide formation focussed mainly on products with high concentrations of L-asparagine and reducing sugars. This included fries, baked goods, gingerbread, chips, crispbread, snacks, popcorn and salt crackers, cereals, coffee beans, bread and toast, baby food, potato fritters, children’s biscuits and coffee substitutes. The acrylamide concentration varied considerably among these foods and likewise within one food. Out of 40 and 105 valid measurements for French fries and chips, the minimum concentration found was  $<10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , while the maximum was  $728 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Similar results were reported for chips with a minimum of  $<10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and a maximum of  $1279 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (LAVES, 2018, 2019).

Average values for the daily intake of acrylamide *via* food were estimated on the basis of these data and ranged between 0.2 and 1.4  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  per body mass $\cdot\text{day}^{-1}$  (Dybing *et al.*, 2005). As a consequence of the publications from 2002 onwards, production parameters were adjusted to minimize the formation of acrylamide, however, with sometimes moderate success. Physical optimisation strategies such as reducing the frying time and temperature are limited, since fries ready for consumption should not exceed certain moisture levels and must show a crisp surface. Pre-fried products transfer the problem to the consumer who decides how long the fries will remain in the oven until the desired crispness is achieved (BMEL, 1997, Jackson and Al-Taher, 2005, Wernsing Feinkost GmbH, 2020).

Thus, strategies to reduce the concentration of acrylamide precursors, namely L-asparagine and reducing sugars, gained more attention. Potatoes naturally contain high concentrations of free L-asparagine between 15  $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  and 33  $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  with varietal and seasonal fluctuations (Amrein *et al.*, 2003). Self-measured varieties even had values up to 40  $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ . If the supply chain allows, varieties low in L-asparagine are preferred (Amrein *et al.*, 2003). Numerous chemical and enzymatic mitigation strategies were described on the laboratory scale, but a simple transfer to the industrial scale is often problematic. D-glucose, for example, is added during the industrial production to assure a uniform browning. As a result, D-glucose removal using glucose oxidase for instance, does not make sense (Wernsing Feinkost GmbH, 2020). The second targeted acrylamide precursor L-asparagine was successfully depleted by the use of asparaginases of different origins (Pedreschi *et al.*, 2008, Pedreschi *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2016). Depending on the enzyme dosage an acrylamide mitigation was achieved without any detectable influence on taste and colour (Xu *et al.*, 2016). This paper reports the transfer of the use of commercially available asparaginases from laboratory experiments to an industrial process and quantifies the enzyme activities required to achieve a significant mitigation of acrylamide in the final product.

### 3.5. Material & Methods

#### 3.5.1. Sample and chemicals

Potato tubers of the variety *Bintje* were used. All tubers were grown and harvested in Lower Saxony, Germany in September 2019 and stored at 8 °C in the dark at the farmers' warehouses until processed. The industrial trial production of French Fries was carried out in December. Therefore, storage time was between two and three months. Starch was determined *via* underwater weight determination to 13.5–17% (Wernsing Feinkost GmbH, 2020). Frying oils for industrial deep fryer (Par-fried: High oleic sunflower oil, C16:0, 2.5%; C18:0, 2%; C18:1, 77%; C18:2, 3.5%; C22:0, 0.5%) and customary deep fryer (Palm oil, C16:0, 39.5%; C18:0, 3.5%; C18:1, 36%; C18:2, 7.5%) were from Cargill, Schiphol, The Netherlands. Potato tubers were cut into 64 mm<sup>2</sup> (i. d., cut size 8 × 8 mm, length variable) stripes. Potato dough was prepared by smashing potatoes and adding of 5% rapeseed oil and typical spices and salt. Chemicals not specifically described were from Carl Roth, Karlsruhe, Germany in Ph.Eur. quality.

#### 3.5.2. Pre-treatments and frying

French fries were processed according to industrial standards (Medeiros Vinci *et al.*, 2011). The exact process parameters of this trial are shown in Table 3.5-1. After peeling, washing, cutting and blanching a single batch of 15 t x h<sup>-1</sup>, potato stripes were randomly sampled and treated for 1 min with an aqueous solution of 0.045 M disodium dihydrogen pyrophosphate (SAPP; creates an optimum pH-range for enzyme activity and prevents surface discoloration (Wang-Pruski and Nowak, 2004) at pH 5 and 60 °C with different asparaginase concentrations in the floatation channel. D-glucose was added at a concentration of 55.5 mmol\*L<sup>-1</sup> to ensure even surface browning. Afterwards stripes were dried (80 °C, hot air), par-fried, quick frozen and packed. All processing steps (pre-treatments) were carried out in a production plant, Wernsing Feinkost GmbH, Essen, Germany. After the trials, the enzyme with the whole liquid of the floatation channel was discarded. Final frying proceeded at 175 °C for 3 min in a customary deep fryer, (London II, MKN, Wolfenbüttel, Germany) according to supplier's instructions. 680 g of each sample were fried in 10 L of oil.

**Table 3.5-1:** Typical line for the industrial production of par-fried and frozen French fries (Medeiros Vinci *et al.*, 2011, Wernsing Feinkost GmbH, 2020) Highlighted in grey: Operational steps suitable for an enzymatic treatment; (-) = not determined; RT = room temperature.

No.	Step	Function	Temperature [°C]	Duration [min]	pH-Value
1	Potato size grading	Product property	(-)	(-)	(-)
2	Peeling/washing	Remove peel	>100	(-)	(-)
3	Cutting	Product property	RT	(-)	(-)
4	Optical sorting	Remove rotten stripes	RT	(-)	(-)
5	Blanching 1	Improve cell permeability	78-90	1.5	5-6
6	Blanching 2	Washing out sugars	64-75	15-25	5-6
7	Floatation channel	Addition of SAPP and sugars	60	1	5
8	Dryer	Water removal	80	10	(-)
9	Fryer	Par-frying	175	Product dependent	(-)
10	Freezer	Freezing	-18	20	(-)
11	Packing	Product property	RT	(-)	(-)

### 3.5.3. Asparaginase activity

Four commercially available asparaginases were compared: Acrylaway L and Acrylaway High T L (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), and PreventASe XR L and PreventASe L (DSM, Heerlen, Netherlands). Activities of Acrylaway L, Acrylaway High T, PreventASe XR L, and PreventASe L were given by the manufacturers as 3500 ASNU\* $g^{-1}$ , 6000 TASU\* $g^{-1}$ , 47,000 XRU\* $g^{-1}$ , and 2500 ASPU\* $g^{-1}$ , respectively (all measured as  $NH_3$ -released). Further analyses were only done with PreventASe L, due to best fitting temperature- and pH optima with processing conditions. Prior to use, enzyme activity was determined with 170  $\mu$ L aqueous substrate solution (5 mM L-asparagine dissolved in 0.1 mM potassium phosphate buffer at pH 5) pre-heated to 60 °C. The activity assay started with the addition of 10  $\mu$ L of enzyme solution (0.1, 0.3, 0.5, 1.0% (w/v)). After 10 min the reaction was stopped with



20  $\mu\text{L}$  of 3% trichloroacetic acid. Analysis of the conversion product L-aspartic acid was done as described below.

### 3.5.4. Amino acids and monosaccharide measurement

French fries were homogenized in a lab-mixer (Pulverisette 11, Fritsch, Germany) to a particle size smaller than 1 mm. Free L-aspartic acid and L-asparagine content (samples, activity assays) was determined *via* pre-column derivatisation with *ortho*-phthaldialdehyde (OPA) and subsequent HPLC-FD analysis according to the method Lee and Drescher (1978). In brief, about 1 g sample was weighed in into a polypropylene tube and extracted with 20 mL of ethanol (66% v/v, in deionised water) and 10 mL hexane (HPLC grade, Carl Roth, Karlsruhe, Germany). After 5 min at 2000 rpm on a vortexer (Multi Vortex Mixer, Heathrow Scientific, USA) the samples were centrifuged at  $4667\times g$  for 7 min. Finally, 5  $\mu\text{L}$  of the ethanolic phase were mixed with 110  $\mu\text{L}$  potassium borate buffer 0.5 mM (pH 9) and 5  $\mu\text{L}$  of 0.20 mM  $\beta$ -alanine was added as internal standard. External calibration was carried out using a commercial amino acid standard (analytical standard dissolved in  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl, Merck, Darmstadt, Germany). Calibration standards were diluted with deionised water. Online derivatisation was performed as following: 20  $\mu\text{L}$  reaction agent (100 mg OPA, 1 mL potassium borate buffer, 0.1 mL 3-mercapto propionic acid (99% Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, USA) 9 mL methanol (HPLC grade, Carl Roth, Karlsruhe, Germany)) were added to samples, mixed and incubated for 2 min. The reaction was stopped with 50  $\mu\text{L}$  1 M acetic acid. 20  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture were injected into HPLC system which consisted of an auto-sampler AS 6.1L, pump 6.1L (incl. pumps, gradient former and degasser), and column oven (all Knauer, Germany), fluorescence detector RF-20A (Shimadzu, Japan) and RP column (Gemini 5  $\mu\text{m}$  C18, LC Column  $150 \times 4.6 \text{ mm}$ , Phenomenex, USA). Oven temperature was  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  and gradient elution with (A) 0.1 M sodium acetate buffer pH 6.5, and (B) methanol (HPLC grade, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) as follows: 0 min: 90% A, 5 min: 90% A, 40 min: 40% A, 45 min: 0% A, 50 min: 0% A, 55 min: 90% A, 60 min: 90% A.

D-Glucose and D-fructose were determined enzymatically (NADPH is produced upon D-glucose oxidation with glucose-6-phosphate dehydrogenase) using the assay from Megazyme (K-SURFG) (Ireland) as described in the instructions. A 1 g of homogenized sample was extracted with 5 mL water and 1 mL hexane. After 5 min at 2000 rpm on a vortexer the

samples were centrifuged at  $4667\times g$  for 7 min. Finally, 100  $\mu\text{L}$  of aqueous phase was used for analysis. Photometric measurements were done at 340 nm using an Eppendorf Biospectrometer (Hamburg, Germany).

### 3.5.5. Acrylamide measurement

Acrylamide was measured using a Varian LC-MS/MS system (Pump 212, autosampler 460 and MS 325 with vESI housing; Varian). For the analysis of acrylamide, about 5 g of sample were exactly weighed into a 50 mL reaction tube. Next, 100  $\mu\text{L}$  of the internal standard ( $920.28 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamide in acetonitrile, analytical standard, Merck, Darmstadt, Germany) and some glass beads were added. After addition of 10 mL acetonitrile, the mixture was shaken vigorously for 1 min. Next, 10 mL ultrapure water and 10 mL hexane were added. The samples were then extracted at 2000 RPM for 5 min. Immediately after addition of 5 g QuEChERS mix ( $\text{MgSO}_4$ , NaCl (4:1), Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, Safe) (Anastassiades *et al.*, 2003) and vigorous shaking for 1 min the mixture was centrifuged for 7 min ( $4667\times g$ ). 1.7 mL of the middle acetonitrile phase was transferred to a vial and analysed by LC-MS/MS according to Mastovska and Lehotay (2006) with minor modifications. Separation and good peak performance were achieved using a RP-column and a HILIC column in series (Nucleodur Pyramid 250/4 mm, 5  $\mu\text{m}$  and Nucleodur HILIC 150/2 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Macherey-Nagel, Düren, Germany). The column temperature was set to 40  $^\circ\text{C}$  and isocratic elution (50:50) was carried out with aqueous 0.1% formic acid (solvent A, LC-MS grade, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and acetonitril with 0.1% formic acid (solvent B, LC-MS grade, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) at a flow rate of  $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  for 20 min. Detection parameters were as following: vESI housing 50  $^\circ\text{C}$ , drying gas 300  $^\circ\text{C}$ , Capillary 68 V, collision gas pressure 200 mPa, detector 1500 V. Detection was performed by Multiple reactions monitoring (MRM) with  $72 > 72/55$  for the analysis of acrylamide and  $75 > 75/58$  for the analysis of  $^{13}\text{C}_3$ -acrylamide. All analyses were done in duplicate.

### 3.5.6. Colour measurement

Fresh fried products were analysed using an Agtron E30FP-II Spectrophotometer. The colour scale represents pigmentation saturation: 0 is pure black and 100 pure white.

### 3.5.7. Sensory analysis and statistical evaluation

Samples were given to the panellists without any other information than three-digit random numbers. A comparative assessment of colour, crispness, sweetness, sourness, saltiness, bitterness and stickiness was carried out. A data sheet with 100 columns from 0.0 to 10.0 for each attribute was given. For all attributes the definition was zero for no detection at all and 10 for the highest impression. As L-aspartic acid is the reaction product of the enzymatic treatment, the panel was trained for sour taste using L-aspartic acid solutions (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mmol\*L<sup>-1</sup>). 0 mmol\*L<sup>-1</sup> and 30 mmol\*L<sup>-1</sup> were defined as 0.0 and 10.0, respectively. All other concentrations were inserted at regular intervals. Statistical analyses of normal distribution and significance (Analysis of variance (ANOVA) and two sample *t*-test) were done *via* DataLab 4.0 (Epina Software Labs, Retz, Austria).

## 3.6. Results and discussion

### 3.6.1. Implementation of enzymatic acrylamide mitigation into an industrial production line of French fries (Table 3.5-1)

The successful mitigation of acrylamide through the enzymatic removal of the precursor molecule L-asparagine was proven on the lab-scale (Vinci *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2016). Only once, a trial to implement an incubation step within an ongoing production line of French fries was described for the application of Acrylaway, but surprisingly no mitigation was found (Medeiros Vinci *et al.*, 2011). To revise these observations, the general steps of a typical production line of French fries (Table 3.5-1) were evaluated to identify suitable locations for an enzymatic treatment. In principle, steps 5, 6, and 7 were considered for the application

of an asparaginase. Beside the dosage form, time, temperature, and pH are crucial parameters for a successful application of an enzyme. Hence, some commercially available asparaginases were compared and pre-selected on the base of their biochemical data. According to suppliers' information, temperature- and pH-optima were: Acrylaway L (58 °C, 6.5), Acrylaway High T L (90 °C, 9.0), PreventASe XR L (55 °C, 5.8), and PreventASe L (55 °C, 5.0). Because of the elevated temperature of 78–90 °C at step 5 (Table 3.5-1), the use of Acrylaway High T L seemed obvious, but the local pH-value of 5–6 is far below the pH optimum of 9.0 of the enzyme. At step 6 the temperature is not optimal for any of the enzymes, while the pH value and duration would have been suitable. At step 7 (floatation channel), temperature and pH-value are perfectly suitable for PreventASe L. Although step 7 has the shortest residence time, it was chosen for a 1 min incubation at pH 5.0 and 60 °C using PreventASe L. Reasons were: i) lowest ratio of water to product volume in comparison to the two blancheurs in step 6 and step 7, ii) easy monitoring, iii) conditions closest to the optima of PreventASe L, iv) preceding blanching steps 6 and 7 led to microstructural changes in texture, which were supposed to improve the diffusion of asparaginase into the raw potatoes and of free L-asparagine towards the enzyme (Pedreschi *et al.*, 2008).

### 3.6.2. Enzyme activity

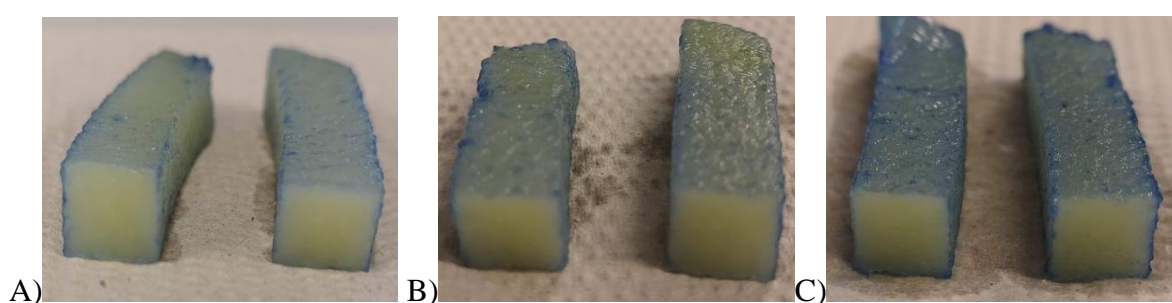
This theoretical evaluation was the decision to use process step 7 for the reduction of free L-asparagine in raw fries, the enzyme activity was evaluated under these conditions. Table 3.6-1 shows a comparison of theoretical and measured activity in the process. The hydrolytic activity under real conditions was only one-third (low enzyme supplementation) to less than one-fourth (high enzyme supplementation) of the theoretical activity calculated according to the supplier's information. To determine the extent to which the enzyme solution migrates into the fries within 1 min, the penetration depth was visualized using a water stain with soluble ink (Lamy, Heidelberg, Germany) (Fig. 3.6-1). For this, potato stripes were blanched according to Table 3.5-1 and dipped into the ink solution for 10, 30, and 60 s at 60 °C. It has been shown that the blanching process formed a gelatinized layer, which decreased the permeability into the core (Mestdagh *et al.*, 2008b). The stain accumulated at the surface, with only a slight inhomogeneous penetration into the core. Most of the acrylamide is formed on the surface (Gökmen *et al.*, 2006). Still, 1 min is a quite short period even for an enzymatic

## Enzymatic acrylamide mitigation in French fries - an industrial case study

action, but can be compensated by sufficiently high levels of enzyme activity added. This will increase production costs and calls for an enzyme recovery, which in turn will result in high investment costs.

**Table 3.6-1:** Chemical and optical properties of the French Fries examined. Measured enzyme activity *versus* theoretical activity. Different enzyme solutions (% v/v) prepared in 0.045 mmol\*L<sup>-1</sup> SAPP, pH 5, 60 °C. Theoretical activities calculated according to manufacturer information. Effect of different concentrations of enzyme solutions [% v/v] in 0.045 mmol\*L<sup>-1</sup> SAPP of PreventASe L on the concentrations of L-aspartic acid and L-asparagine. Effect of different concentrations of PreventASe L on the concentrations of free acrylamide in French fries and the colour expressed as Agtron values. All analyses were done in duplicate except Agtron values.

	Theoretical enzyme activity [ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Measured enzyme activity [ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ]		Free asparagine [mmol*kg <sup>-1</sup> ]		Free aspartic acid [mmol*kg <sup>-1</sup> ]		Acrylamide [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]		Agtron
<b>Blank</b>	0	-	-	21.54	18.95	2.58	2.30	332	359	56.1
<b>0.1 %</b>	2500	866	989	11.91	17.75	3.57	5.26	240	252	54.1
<b>0.3 %</b>	7500	2638	2055	15.63	15.45	6.26	6.16	177	202	54.3
<b>0.5 %</b>	12500	2828	3197	14.82	11.40	6.67	5.14	137	162	58.1
<b>1.0 %</b>	25000	5347	6619	9.63	10.99	5.15	5.97	137	147	55



**Figure 3.6-1:** Penetration depth of water soluble ink (Lamy, Heidelberg, Germany) in raw 64 mm<sup>2</sup> French fries at different incubation times. A) 10 s, B) 30 s, C) 60 s.

### 3.6.3. Effects on amino acid conversion and acrylamide mitigation

Depending on the potato variety and the conditions of the blanching process the residual concentration of L-asparagine in the tubers was typically between 10 and 30 mmol\*kg (data not shown). In this study the L-asparagine concentration of the blanched potato stripes was 20.25 mmol\*kg<sup>-1</sup>(Blank). A comparison of enzyme activity (Table 3.6-1) and concentration of free amino acids (Table 3.6-1) showed a balance gap between theoretical conversion, as calculated from the enzyme activity, and the actual substrate conversion. A 1% enzyme solution, for example, resulted in a decrease of free L-asparagine of ~50% from 20.25 mmol\*kg<sup>-1</sup> to 10.31 mmol\*kg<sup>-1</sup>. This difference of 9.94 mmol\*kg<sup>-1</sup> was higher than the value to be expected from the measured enzyme activity of 5983 μmol\*L<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> (5.98 mmol\*L<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>). It was concluded that the enzyme was still active while the French fries were dried on their way from the floatation channel to the fryer. In contrast, the increase of L-aspartic acid from 2.44 mmol\*kg<sup>-1</sup> to 5.56 mmol\*kg<sup>-1</sup> ( $\Delta = 3.12$  mmol\*kg<sup>-1</sup>) was lower than expected. This was explained by the good water solubility of L-aspartic acid (IEP (L-asparagine) = 5,4; IEP (L-aspartic acid) = 2,9) resulting in a wash-out effect. During the first 60 s the enzyme converted a high portion of L-asparagine, which can be leached, while the fries are still in the floatation channel. The gaps between L-asparagine and formed L-aspartic acid increased from 0.1 to 1.0%, because a higher conversion took place in the floatation channel. Therefore, a higher amount was leached. In the end, the L -aspartic acid concentration of treated samples were still higher than of the blank, due to further conversion during the drying process.

The acrylamide concentration in the untreated sample was determined as 345 μg\*kg<sup>-1</sup> (Table 3.6-1). While there was a linear correlation between added enzyme concentration and determined enzyme activity, the mitigation of acrylamide was more a decay curve. Doubling the enzyme concentration from 0.5 to 1.0% showed almost no further improvement. As mentioned in 3.6.2 the access of the enzyme to its substrate was limited, so that a better mitigation will only possible with extended incubation times. It can be presumed that a (nearly) complete conversion on the surface was obtained for 0.5 and 1.0%. Residual acrylamide may be formed in deeper layers without access to the enzyme or by other precursors on the surface, which were not analysed. For example, 3-aminopropionamide is a known acrylamide precursor, which is already found in raw potato tubers (Bagdonaite *et al.*, 2006). Still, the treatment with PreventASe L led to a mitigation of acrylamide of 59% (142 μg\*kg<sup>-1</sup>) for an enzyme concentration of 1%. While a 1% addition showed the best result in absolute numbers, 0.1% addition showed the best efficiency. A decrease of 5.42 mmol\*kg<sup>-1</sup> of L-asparagine led to a

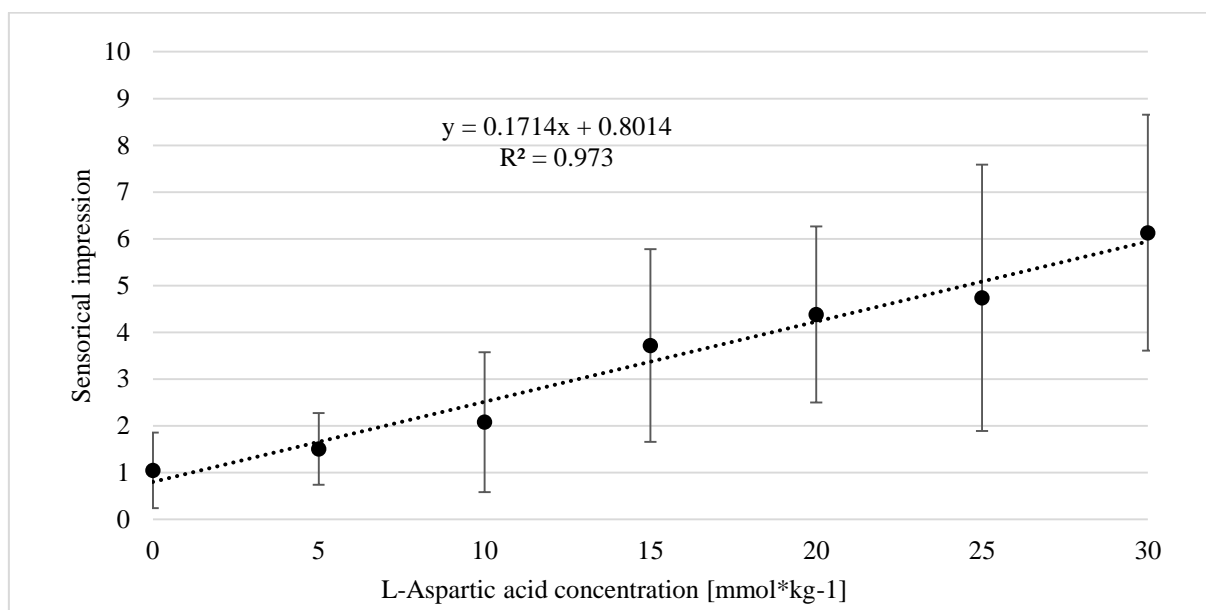
mitigation of 27% of acrylamide ( $246 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). 0.3% enzyme solution decreased L-asparagine by  $4.71 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  and led to 45% less acrylamide ( $190 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). 0.5% enzyme solution decreased the L-asparagine concentration by  $7.14 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  and mitigated acrylamide by 57% ( $150 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Thus, the use of a 0.5% enzyme solution resulted in a reasonable cost/effect-ratio. However, the enzyme treatment is costly. Depending on the activities used, additional cost of 5 (for 0.1% enzyme) to 50 Cent $\cdot\text{kg}^{-1}$  (for 1.0% enzyme) of French fries were estimated.

The measurement of the D-glucose concentration in the French fries showed an increase from  $5.54 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  in the blank up to  $10.34 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , whereas D-fructose was not detected ( $<\text{LOD}$  of the enzymatic measurement of  $138 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  or  $3.8 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in any sample. In this trial, both blanchers were operating in a steady state mode. The interval desludging in the floatation channel was paused during the whole trial for a more controlled enzyme dosage. Under standard process parameters, the potatoes carry more water into the floatation channel and the D-glucose concentration is kept constant by the addition of a highly concentrated aqueous glucose solution. This steady state was empirically elaborated. Furthermore, the production speed was less than normal (cost reduction), which led to less water intake. Due to this adapted experimental process parameters, an accumulation of glucose took place over the test period. The trial order was blank, 0.1, 0.3, 0.5, and 1.0%. But the Agtron values were almost identical for all samples (Table 3.6-1). Hence, no correction factors were applied to the data. In contrast to earlier findings with untreated samples, the application of an asparaginase allowed the decoupling of the non-enzymatic browning reaction and acrylamide formation.

### 3.6.4. Sensorial analysis

In addition to the chemical analyses a sensorial study was carried out, but no differences were perceived. Due to the fact that pure solutions of L-aspartic acid taste quite acidic the threshold concentration, at which a sour off-taste occurred, was determined. Different concentrations of L-aspartic acid were added to a potato dough. The dough was formed to equally sized croquette balls (each 20 g) and fried for 8 min at  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ten panellist tasted the still warm samples. The results of all seven samples were normally distributed. ANOVA indicated significant differences. A direct comparison of treated samples in comparison to the blank

showed that the addition of 5–10 mmol\*kg<sup>-1</sup> led to slightly stronger sour taste, but the data were not significant ( $\alpha = 0.05$ ) (Fig. 3.6-2). A dosage of 15 mmol\*kg<sup>-1</sup> gave a significant increase in the sour taste and a significant decrease of the sweet taste (data not shown). This explained that the treated samples were devoid of an acid taste. With a maximum increase in the L-aspartic acid concentration of  $\Delta = 3.12$  mmol\*kg<sup>-1</sup> (from 2.44 mmol\*kg<sup>-1</sup> to 5.56 mmol\*kg<sup>-1</sup>), significant sensorial differences are avoided.



**Figure 3.6-2:** Sensorial evaluation of sour-taste in potato dough with added L-aspartic acid. Sensorial analysis was performed by ten panelists. Samples were tasted blindly and randomly. Assessment scale was from 0 (no sour taste at all) to 10 (maximally acidic). Standard deviation is shown as error bars. Linear correlation of L-aspartic acid concentration and sour taste was determined as  $0.1714x + 0.8014$ ;  $R^2 = 0.973$ . The untreated sample was excluded.

### 3.7. Conclusion

The mitigation of acrylamide, an unwanted but inevitable contaminant in many heated foods, is of utmost concern for public health. The European Commission responded to the problem by putting a regulation in place (EU 2017/2158), which urges potato processors to take measures to mitigate acrylamide levels in their products. For ready-to-eat French fries a guideline value of 500  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  was set.

This study showed for the first time that laboratory data of acrylamide mitigation using the principle of asparaginase-catalysed hydrolysis of the precursor L-asparagine can be successfully scaled-up and implemented into a running industrial production line. The intention was



not to establish a perfectly validated industrial process. Batch to batch variation of the raw potatoes are inevitable and impede the prediction of the actual acrylamide concentrations. Sampling and analytical measurements in duplicate showed that a certain range of variation must be attributed to the processed material and to never perfectly constant process conditions. The present industrial-scale study showed that common mitigation strategies adopted by potato processors result in products well below the critical level (Table 3.6-2). The use of the Asparaginase PreventASe decreased the acrylamide level by a further 59% without any influence on colour or taste. However, sufficient L-asparagine hydrolysis required a high dosage because of a short residence time of the active enzyme. This in turn will result in extra production cost of up to 50 cent\*kg<sup>-1</sup>. Time will show, if the consumers are willing to pay more for the additional health benefit of lowered acrylamide levels in French fries. Enzyme recovery as well as enzyme immobilisation may be suitable tools to lower production costs in the future. Another obvious obstacle comes from the marketing side: How to advertise a lower actual concentration of a potential carcinogen on a food packaging?

### 3.8. CRediT authorship contribution statement

**Eric Rottmann:** Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft.

**Karen F. Hauke:** Formal analysis, Validation.

**Ulrich Krings:** Writing - original draft, Writing - review & editing.

**Ralf G. Berger:** Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing.

### **3.9. Acknowledgments**

The authors acknowledge the permanent support of Wernsing Feinkost GmbH (Addrup-Essen, Germany). We also appreciated the collaboration with DSM supplying us generously with PreventASe.

#### **4. Vorwort zur Publikation „Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.“**

Der Einsatz von chemisch diversen Stoffgruppen innerhalb der Antioxidantien zur Verminderung der Acrylamidbildung wurde in einer Vielzahl an Studien untersucht (Jin *et al.*, 2013). Der Fokus dieser Arbeit lag auf Phenolsäuren. Wissenschaftliche Publikationen über den direkten Einsatz (Pulver gemischt oder Lebensmittel eingetaucht in Lösungen) reiner Phenolsäuren sind rar. Für diese Studie wurden *p*-Cumar, Kaffee- und Ferulasäure als die am häufigsten vorkommenden Phenolsäuren der Kartoffel ausgewählt. Die nicht-phenolische Phenylacrylsäure Zimtsäure sollte in dieser Reihe als Kontrolle gegenüber den Phenolsäuren dienen (Akyol *et al.*, 2016). Da bekannt ist, dass die Konzentration an phenolischen Substanzen in der Kartoffel einen reziproken Einfluss auf die Acrylamidkonzentration hat (Zhu *et al.*, 2010), sollte der Reaktionsmechanismus der Phenolsäuren genauer untersucht werden.

Aufgrund der Struktur der Phenolsäuren wurde die Hydroxygruppe am Phenylring als die wahrscheinlich reaktivste Gruppe identifiziert. Auf dieser Basis wurden nucleophile Reaktionsmöglichkeiten der Phenolsäuren mit Edukten, Intermediaten und Produkten der MAILLARD-Reaktion bzw. der Acrylamidbildungsreaktion betrachtet. Zu Beginn wäre eine Reaktion mit dem partiell positiv geladenen Carbonyl denkbar. Nebenprodukte der Reaktionskaskade, wie das 3-Oxopropanamid, besitzen ebenfalls eine partiell positiv geladene Carbonylfunktion und wurden als elektrophile Reaktionspartner in Erwägung gezogen. Zusätzlich wurde Acrylamid aufgrund seiner mesomeren Grenzstruktur als MICHAEL-Elektrophil betrachtet (Channell *et al.*, 2008).

Für die Untersuchungen wurden Kartoffeln und Süßkartoffeln erhitzt und analysiert. Einige Ionenspuren wiesen auf eine direkte Addition von Acrylamid an die Phenolsäuren hin. Zur Bestätigung wurde Acrylamid mit den genannten Phenylacrylsäuren erhitzt. Die Fragmentationen deuteten, entgegen der initialen Hypothese, auf eine Reaktion an der Carboxylgruppe hin. Die Synthese und Strukturaufklärung der vermeintlichen Addukte mittels NMR Spektroskopie bestätigte dies. Die zu Beginn analysierten Ionenspuren in den Kartoffeln und Süßkartoffeln wurden nicht als Phenylacrylsäure-Acrylamidaddukte identifiziert. Exakte Massen, Peakflächen und Retentionszeiten in dotierten Proben schlossen eine Reaktion dieser

**Vorwort zur Publikation „Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.“**

---

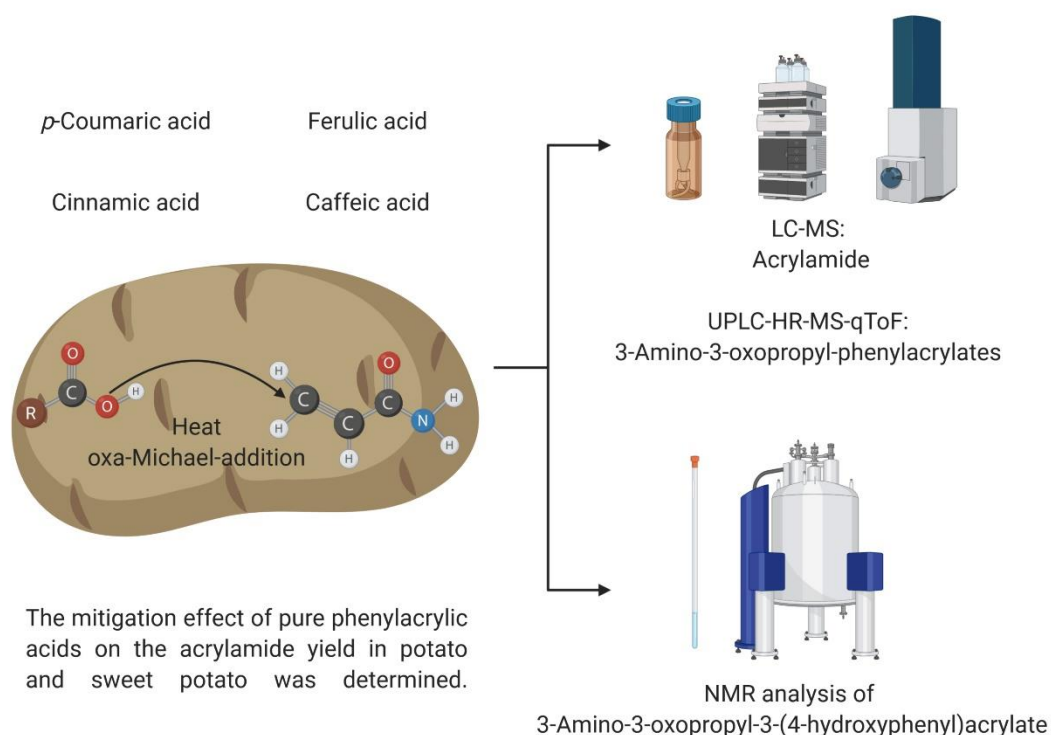
nicht identifizierten Addukte mit den Phenylacrylsäuren aus. Dennoch beschreibt diese Publikation den ersten Nachweis der möglichen Bildung von 3-Amino-2-oxopropyl-phenylacrylaten unter Standardzubereitungsbedingungen von Pommes frites.

**Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

## **5. Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

Eric Rottmann, Kristina Volkmann, Jörg Fohrer, Ulrich Krings, Ralf G. Berger

### **5.1. Graphical Abstract**



### **5.2. Highlights**

Reaction pathways of phenylacrylic acids with acrylamide elucidated

Esterification of *p*-coumaric acid with 3-chloropropanamide

## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

Identification of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate

Explanation of the low mitigation impact of phenylacrylic acids

### **5.3. Abstract**

Three phenolic acids, *p*-coumaric, ferulic and caffeic acid as well as cinnamic acid were added to raw potatoes and sweet potatoes before frying. A distinct mitigation of acrylamide was not detected. Fried samples were analysed for postulated adducts of a direct reaction between acrylamide and these phenolic acids using LC-MS. In a model system with pure compounds (phenylacrylic acid and acrylamide) heated on 10 % hydrated silica gel one specific adduct (respective  $m/z$  for  $M+H^+$ ) was formed in each reaction. MS/MS-data suggested an oxa-Michael formation of 3-amino-3-oxopropyl-phenylacrylates, which was confirmed by *de novo* syntheses along an  $S_N2$  substitution of 3-chloropropanamide. Exemplarily, the structure of the ester was confirmed for *p*-coumaric acid by NMR-data. Standard addition revealed that 3-amino-(3-oxopropyl-phenyl)-acrylates occurred neither in fried potato nor in sweet potato, while a formation was shown in phenylacrylic acid plus acrylamide supplemented potatoes and sweet potatoes.

### **5.4. Keywords**

Potato, Sweet potato, Acrylamide mitigation, Phenylacrylic acids, oxa-Michael-addition, 3-Amino-3-oxopropyl-phenylacrylates

## **5.5. Introduction**

In 2002, acrylamide was identified as a product of the Maillard reaction of free L-asparagine and a carbonyl source in heated carbohydrate-rich food (Mottram *et al.*, 2002, Tareke *et al.*, 2002). Acrylamide was classified as potentially carcinogenic by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 1994). Due to the omnipresence of acrylamide in heated foods, a complete prevention of acrylamide intake is nearly impossible. The World Health Organisation (WHO) estimated the average daily intake of dietary acrylamide from 0.3 to 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body mass for the general population (Besaratina and Pfeifer, 2007). Nevertheless, the margin of exposure is considered to be low for a genotoxic and carcinogenic substance (JEFCA, 2005, Matoso *et al.*, 2019).

Since the first publication in 2002, the reaction mechanism of acrylamide formation in food was thoroughly examined (Zyzak *et al.*, 2003), and much research was devoted to a deeper understanding the impact factors of its formation (Rydberg *et al.*, 2003). Online monitoring of heated model systems using APCI-MS showed a constant acrylamide increase over 15 minutes and confirmed the established chemical pathways leading to acrylamide (Channell *et al.*, 2008). A first review on mitigation strategies appeared in 2007 (Zhang and Zhang, 2007). Besides changing the process conditions towards shorter frying and baking times or lower frying and baking temperatures, the lowest acrylamide concentrations were obtained by adding competing amino acids (Koutsidis *et al.*, 2009, Vinci *et al.*, 2012), or by the enzymatic conversion of the precursor L-asparagine using suitable asparaginases (Xu *et al.*, 2016, Rottmann *et al.*, 2020).

While for these minimization measures the chemical mechanisms are evident, the use of antioxidants led to contradictory results, and a plausible reaction mechanism for a mitigation has not yet been established so far. One reason for this might be the high structural inhomogeneity of antioxidants (Jin *et al.*, 2013).

Phenolic compounds, typically derivatives of cinnamic acid, are among the most common natural antioxidants (Bassama *et al.*, 2010) and are widely distributed in fruits and vegetables (Lafay and Gil-Izquierdo, 2008). A statistical analysis correlated naturally occurring phenolic compounds (e.g. chlorogenic acid, caffeic acid, tyrosine) in potato powder inversely with the acrylamide concentration in the fried products (more phenolics, less acrylamide) (Zhu *et al.*, 2010). A study on potatoes with different flesh colour suggested a mitigating effect of chloro-

## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

genic acid and total phenolic acids on the acrylamide yield (Kalita *et al.*, 2013). Direct addition of phenolic compounds showed no significant reduction of acrylamide (Bassama *et al.*, 2010), but the opposite was found in an emulsion system with a direct addition of a mixture of phenolics to the frying oil (Kotsiou *et al.*, 2011). Natural and synthetic antioxidants slowed the deterioration of sunflower oil, which indirectly decreased acrylamide formation (Urbančič *et al.*, 2014). A similar study added lipophilic grape seed proanthocyanidins to the frying oil and attributed the mitigation to an interception effect on acrolein (Yu *et al.*, 2020).

Rosemary extracts decreased acrylamide in a non-dose-dependent manner in wheat buns, dittany (*Origanum dictamnus*) increased the acrylamide concentration (Hedegaard *et al.*, 2008).

Many studies attempted an explanation of the described effects, but only a few enlightened the actual reaction mechanism. In two exemplary studies, one using *p*-coumaric acid and another one using rosmarinic acid, possible mitigation mechanisms were identified. The addition of *p*-coumaric acid led to significantly lower acrylamide level in both model reaction systems and potato crisps. Reaction of 3-oxopropanamide, a presumed side product of the acrylamide pathway, with *p*-coumaric acid in a low-moisture model system was supposed to yield a 2-(propenamido)coumaric acid adduct (Xu and An, 2016). Rosmarinic acid was demonstrated to reduce the acrylamide content significantly. A direct reaction of the vinyl group of acrylamide with one or more hydroxy groups of rosmarinic acid *via* Michael-addition was observed (Yuan *et al.*, 2019). This was in agreement with earlier experiments in model systems, in which various nucleophiles with amino-, thiol-, and hydroxyl groups added onto acrylamide in a Michael-type reaction (Adams *et al.*, 2010).

While some publications reported a mitigation, others did not find a significant effect, and a dose-dependency indicating a true correlation was not always described (Hedegaard *et al.*, 2008, Bassama *et al.*, 2010). These conflicting results, many of them deduced from model systems (Jin *et al.*, 2013), call for a clarification, if phenylacrylic acids are capable of mitigating acrylamide formation in foods. This study investigated possible adduct formation reactions of acrylamide in fried potato and sweet potato using hydroxyphenylacrylic acids (*p*-coumaric, caffeic, ferulic acid), and cinnamic acid, a non-phenolic phenylacrylic acid as control. Basically, two different reactions were supposed, either a nucleophilic attack of a phenolic hydroxy group of the 3 hydroxyphenylacrylic acids directly at the  $\alpha,\beta$ -unsaturated (Michael-)system of acrylamide (Yuan *et al.*, 2019), or an electrophilic substitution at the phenolic ring of all 4 phenylacrylic acids by 3-oxopropanamide, a side product of acrylamide



## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

formation during the Maillard reaction (Xu and An, 2016). To prove the two hypothesis, the pure chemicals were reacted, the products analysed *via* UPLC-QToF-MS/MS, and the structures confirmed by spectral data. The reaction was then repeated in food to assess its relevance under realistic conditions.

### **5.6. Material & Methods**

#### **5.6.1. Sample, chemicals, and materials**

Potato tubers (variety *Linda*) and sweet potato roots were purchased from a local supermarket (Rewe, Hannover, Germany) and directly processed. Tubers and roots were peeled and cut into 512 mm<sup>3</sup> (8x8x8 mm) cubes (French fries cutter, Küchenprofi, Solingen, Germany). Frying palm oil was purchased from Cargill (Schiphol, The Netherlands). The fatty acid composition of the frying oil was C16:0, 39.5 %; C18:0, 3.5 %; C18:1, 36 %; C18:2, 7.5 %. Purity grades and distributors of chemicals used were: Acetonitrile (ROTISOLV<sup>®</sup> LC-MS grade), water with 0.1 % formic acid (ROTISOLV<sup>®</sup> LC-MS grade), methanol (ROTISOLV<sup>®</sup> LC-MS grade), hexane, ethanol (ROTISOLV<sup>®</sup> HPLC gradient grade (high UV transmission), *p*-coumaric acid, caffeic acid (≥98 %), ferulic acid (≥98 %), magnesium sulfate (≥99 %, per analysis (p.a.), water free), sodium chloride (99.8 %), acrylamide (99.9 %, p.a.), hydrogen chloride (37 %, European Pharmacopoeia quality (Ph.Eur. quality), potassium hydroxide (≥85 %, Ph.Eur. quality), and potassium iodide (≥99 %, Ph.Eur. quality) purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Cinnamic acid (97%), 3-chloropropanamide (98 %), <sup>13</sup>C<sub>3</sub>- acrylamide (99 atom % <sup>13</sup>C, 98 %), Silica gel (diameter: 1-3 mm, technical grade), and glass beads (diameter 5 mm, soda-lime glass) purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA). Filter paper (frit filter, 0.45 μm, cellulose acetate) purchased from Sartorius (Göttingen, Germany). MeOD (99.96 atom % D) was purchased from MSD isotopes (Merck Frosst, Montreal, Canada).

## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

### **5.6.2. Adduct synthesis with acrylamide in a model system**

Equal portions of 0.7 mmol of the respective phenylacrylic acid and acrylamide were mixed with 9 g silica gel and dispersed in 1 mL water, simulating the water activity of the frying process. The mixture was heated in an oven for 20 min at 180 °C (H2661-1B, Miele, Gütersloh, Germany). The experiment was carried out once for each phenylacrylic acid.

### **5.6.3. Adduct synthesis with 3-chloropropanamide**

Firstly, 6.1 mmol of the respective hydroxycinnamic acid or cinnamic acid (summarized as phenylacrylic acids) were mixed with 6.7 µmol potassium iodide in 2.437 mL ethanol in a 100 mL three-necked round bottom flask with dropping funnel (Labor- und Analysen-Technik (LAT), Garbsen, Germany). Under nitrogen atmosphere 12.7 mmol potassium hydroxide in 2.437 mL water were added within ten minutes (0.25 mL/min). The solution was heated to 40 °C and 6.7 mmol 3-chloropropanamide was added within ten minutes (72 mg/min). Under reflux (reflux condenser, (LAT), Garbsen, Germany), the solution was mixed at 76 °C overnight to complete precipitation. Water and concentrated hydrochloric acid (12 mol/L), each 2.843 mL were added sequentially under ice cooling and the suspension was filtered with a frit under vacuum. The filter cake was washed twice with 10 mL water and re-suspended in 10 mL acetone. The product was evaporated at 50 °C to dryness (rotary evaporator, Laborota 4000, Heidolph, Schwabach, Germany) ((Liu *et al.*, 2011, Kondo *et al.*, 2012) with modifications). The four reaction products were analysed by means of LC-MS/MS and UPLC-QToF-MS/MS and used as references. The experiment was carried out once for each phenylacrylic acid.

### **5.6.4. Adduct synthesis of *p*-coumaric acid with 3-chloropropanamide for NMR analysis**

To a solution of 5 g of *p*-coumaric acid in 60 mL of ethanol in a 250 mL three-necked round bottom flask 60 mg of potassium iodide were added. A solution of 3.5 g potassium hydroxide

## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

in 12.5 mL H<sub>2</sub>O was filled into a 50 mL dropping funnel with ventilation and the entire apparatus (LAT, Garbsen, Germany) was pre-flushed with N<sub>2</sub> for 2 minutes. After that, the dropping funnel was connected with the three necked round bottom flask and the KOH solution was added dropwise to the synthesis reaction mixture. The reaction mixture was heated to 45 °C until a clear solution was obtained. Then 6.5 g of 3-chloropropanamide were added and the approach was heated for 24 h at 76 °C. After cooling to room temperature (RT) white crystals precipitated and 30 mL H<sub>2</sub>O were added. The suspension was extracted three times with diethyl ether and combined organic phases were evaporated with a rotary evaporator (Laborota 4000, Heidolph, Schwabach, Germany) and the solid was re-suspended in 30 ml H<sub>2</sub>O. Concentrated HCl (1 mL) was added. The resulting precipitate was filtered and washed with ice cold water. Hot water (100 mL, 100 °C) were added so that the white crystals were dissolved. A few brown substances remained undissolved. The solution was kept hot (100 °C) and was filtered. The filter cake was washed twice with 20 mL ice-cooled water. After cooling to RT white crystals precipitated again. The solid was filtered and re-suspended in 50 mL H<sub>2</sub>O. The pH was adjusted to 11.0 with KOH until a clear yellow solution was formed. Finally, the pH was adjusted to 6.0 with 2 mol/L HCl, which resulted in the precipitation of the product. After cooling at 6 °C in the fridge (Liebherr Profi Line FKU 1800, Liebherr, Bulle, Switzerland) over night the product was filtered and dried. The purified adduct of 3-chloropropanamide and *p*-coumaric acid was used for NMR. The experiment was carried out once.

### **5.6.5. Pre-treatments and frying**

To clarify the presumed mitigating effect of phenylacrylic acids, potato and sweet potato cubes (each sample 10 g) were dipped into water or in 0.1 mol/L each of *p*-coumaric, caffeic, ferulic, and cinnamic acid (each solution 50 mL).

To examine whether generation of acrylamide adducts with phenylacrylic acids during frying is feasible at all under the specific conditions in a potato or sweet potato matrix, cubes were supplemented additionally with acrylamide or 3-chloropropanamide and shaken for ten minutes. Afterwards, the potato and sweet potato cubes were fried for 6 minutes at 180 °C (Deep fryer, F28.311.W1, DeLonghi, Treviso, Italy). Raw potato and sweet potato cubes were used for comparison. The samples were homogenized with a lab-mixer (Pulverisette 11,

## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

Fritsch, Idar-Oberstein, Germany) and stored at -20 °C in a freezer (Liebherr Premium 1213, Liebherr, Bulle, Switzerland) until analysed. All experiments were performed in duplicate for each test series. For the determination of the mitigation effect four test series (Potato 1, Potato 2, Potato 3, and Sweet potato) were carried out.

### **5.6.6. Extraction of acrylamide and acrylamide adducts – Potato and sweet potato samples**

The homogenized sample (1 g) was weighed into a 50 mL tube and 5 glass beads were added. For extraction 5 mL of acetonitrile was added and the mixture was shaken vigorously for one minute. Afterwards, 5 mL of ultra-pure water and 5 mL hexane were added and mixed at 2000 rpm for 5 minutes (Multi Vortex Mixer, Heathrow Scientific, IL, USA). After the addition of 2.5 g QuEChERS mix (MgSO<sub>4</sub>, NaCl (4:1) (Anastassiades *et al.*, 2003) tubes were shaken vigorously for another one minute. After centrifugation at 4667 x *g* for 7 min, 1.7 mL of acetonitrile layer (supernatant) was transferred without filtration to a screw neck vial (N9, VWR, Radnor, PA, USA).

### **5.6.7. Extraction of acrylamide and acrylamide adducts - Model system and syntheses**

The synthesis products (10 mg) were mixed with 1 mL methanol and extracted at 2000 rpm for 5 minutes (Multi Vortex Mixer, Heathrow Scientific, IL, USA). The extract was centrifuged at 4667 x *g* for 6 minutes. The clear supernatant was used for the analyses. For that reason it was transferred without filtration to a screw neck vial (N9, VWR, Radnor, PA, USA).

#### **5.6.8. Determination of the acrylamide concentration *via* tandem mass spectrometry**

Acrylamide concentrations in the fried potato and sweet potato cubes were determined as described previously (Rottmann *et al.*, 2020).

#### **5.6.9. Enzymatically determination of the reducing sugar D-glucose and D-fructose**

Reducing sugars were converted enzymatically and measured photometrically according to manufacturer instructions (K-SUFRG, Megazyme, Bray, Ireland).

#### **5.6.10. Analysis of extracts via tandem mass spectrometry**

Extracts were analysed by means of LC-MS and extracted ion chromatograms were explicitly checked for the expected  $m/z$  values of acrylamide adducts of the four phenylacrylic acids according to Yuan *et al.* (2019) and Xu and An (2016). Adduct analyses were performed on a Varian LC-MS/MS system (Pump 212 and MS 320 with vESI housing; Varian) and a HILIC-Column (Nucleodur HILIC 125/4 mm, 5  $\mu$ m, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Sample injection volume was 20  $\mu$ L. Flow rate was 200  $\mu$ L/min and isocratic elution (20:80) with water 0.1 % formic acid and acetonitrile 0.1 % formic acid was performed at a flow rate of 300  $\mu$ L/min. Mass spectrometry parameters in the positive mode were as follows: ESI housing 50 °C, drying gas 200 °C, capillary 30 V, collision gas pressure 200 mPa, collision energy 10 V, detector 1500 V. Multiple reactions monitoring (MRM) was carried out: 234>50-234; 236>50-236 for *p*-coumaric acid adducts, 264>50-264; 266>50-266 for ferulic acid adducts, 250>50-250; 252>50-252; 322>50-322 for caffeic acid, and 218>50-218; 220>50-220 for cinnamic acid adducts.

## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

### **5.6.11. Determination of the exact mass *via* UPLC-QToF-MS/MS**

Determinations of exact mass were performed on a UPLC system (1290 Infinity II, Agilent, Santa Clara, CA, USA) connected to qToF mass spectrometer (MaXis Impact, Bruker, Billerica, MA, USA). Separation was done with RP-column (Zorbax RRHD SB-C18, 1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1x100mm, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Flow rate was 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  and the gradient elution of the UPLC with (A) ultra-pure water 0.1% formic acid (B) and acetonitrile was as follows: 0 min: 95% A; 5 min: 95% A; 11 min: 85% A; 22 min: 50% A; 25 min: 20% A; 30 min: 20% A; 35 min: 95% A; 40 min: 95% A. Mass spectrometry parameters in the positive mode were as follows: housing 25  $^{\circ}\text{C}$ , nebulising gas 180 $^{\circ}\text{C}$ , capillary 4500 V. Single ion monitoring (SIM) scanned from 50 to 700  $m/z$ . MS/MS collision energy was 10 eV. Online calibration was done using sodium formate clusters injected at the beginning of each run for 30 s.

### **5.6.12. Determination of molecule structure *via* NMR**

The adduct P-3CPA-*p*CA (20.3 mg) was dissolved in 0.8 mL MeOD Spectra were recorded on a 600 MHz spectrometer equipped with Avance Neo console, DCH cryo probe and SampleCase sample changer from Bruker Biospin (Billerica, MA, USA).

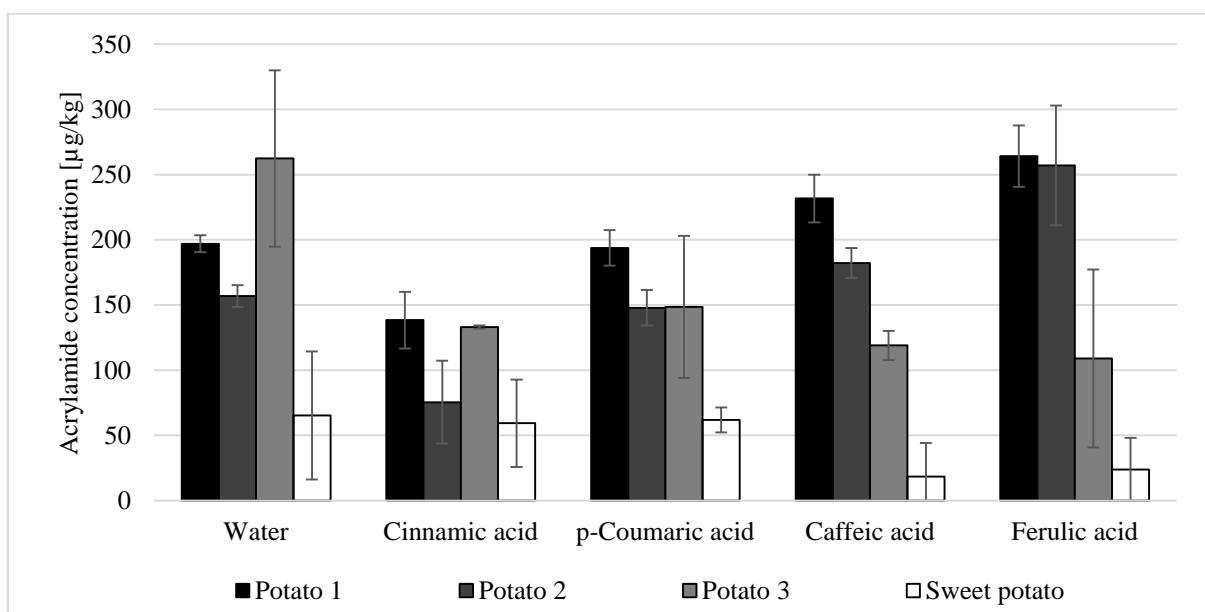
### **5.6.13. Statistical evaluation**

Statistical evaluations were done *via* DataLab 4.0 (Epina Software Labs, Retz, Austria). For test series, which yielded a sufficient number of data points, a full statistical evaluation was conducted. Analysis of significant differences were done *via* the Welch-Test. Furthermore, the three potato series were pooled and analysed for normal distribution (Shapiro-Wilk-test) and significance (Analysis of variance (ANOVA) and two sample-*t*-test).

## Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.

### 5.7. Theory

If phenylacrylic acids were able to mitigate the acrylamide yield, indicative reaction products should be formed accordingly. Therefore, this study searched for hypothetical acrylamide adducts. Raw potato and sweet potato cubes were treated with a selection of phenylacrylic acids and deep-fried. Acrylamide concentrations were quantified (Figure 5.7-1), but the data set obtained was inconclusive, as were previous publications. The treated samples were analysed *via* liquid chromatography coupled to mass spectrometry to substantiate the adduct formation as described in earlier literature. To confirm the theoretical reaction pathways, supposed educts were mixed and reacted in a model system. Product identification was derived from molecular formulae, fragment ions, and retention times and further complemented by structure confirmation using advanced NMR methods.



**Figure 5.7-1:** Acrylamide concentrations [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] of potato and sweet potato cubes, which were dipped for 10 minutes in different 0.1 mol/L solutions (water = blank, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, and ferulic acid) and deep-fried for 6 minutes at 180°C. Data are mean ( $n = 2$ )  $\pm$  standard deviation.

## **5.8. Results and discussion**

### **5.8.1. Acrylamide mitigation effect of phenylacrylic acids**

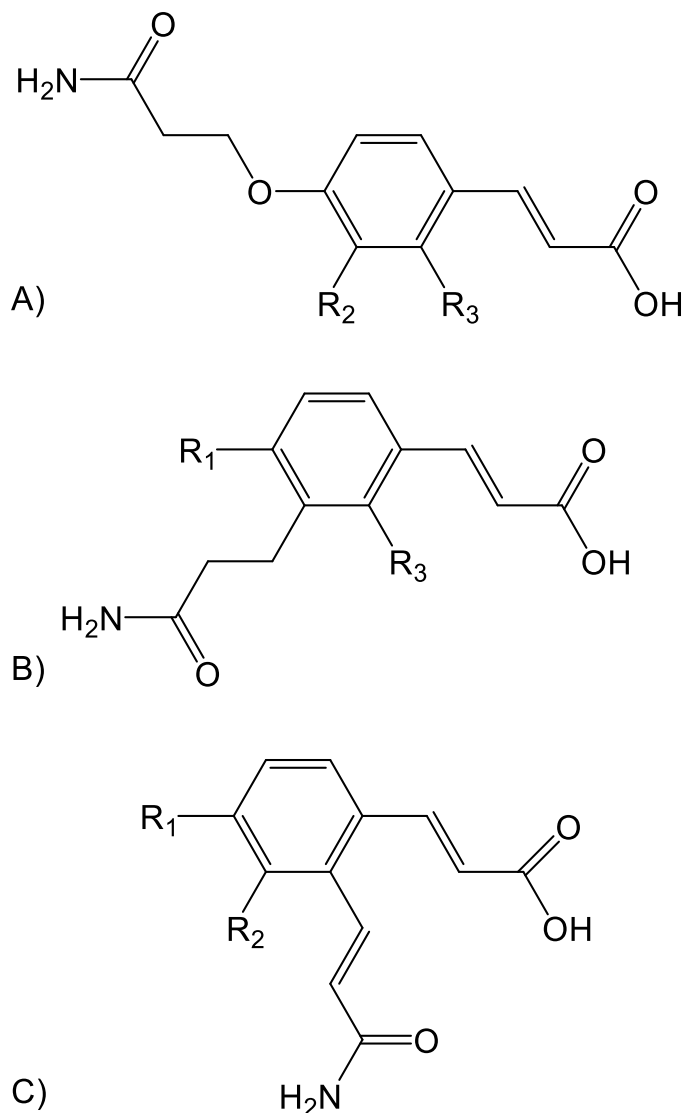
Acrylamide concentrations in the extracts are shown in Fig. 5.7-1. Four subsequent test series were carried out in duplicate with batches of potatoes and sweet potato, respectively. The corresponding glucose and fructose values were 0.22, 0.28; 0.38, 0.44; 0.36, 0.58; and 1.16, 1.67 g/kg for Potato 1, Potato 2, Potato 3, and Sweet potato, respectively. A clear acrylamide mitigation was not detected. According to common statistical benchmarks ( $\alpha = 0.05$ ) the Welch-test indicated no significant differences between the treatments in each of the series. The analysis of the three pooled potato series indicated normal distribution. ANOVA determined no significant difference between the treatments (p-value > 0.05). This was in contradiction to the results published previously (Xu and An, 2016, Yuan *et al.*, 2019).

In the next step, extracts were analysed for adducts. Small signals with the respective m/z value (nominal mass) of protonated molecular ions were detected for adducts of phenolic hydroxyl groups with acrylamide for *p*-coumaric and ferulic acid, but not for cinnamic and caffeic acid (Fig. 5.8-1 and Table 5.8-1). There was also no signal for a possible double addition product of caffeic acid. Furthermore, not even trace signals were found for postulated adducts with 3-oxopropanamide. Therefore, the examination of a pathway with a putative participation of 3-oxopropanamide was no longer pursued.



**Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---



**Figure 5.8-1:** Structure of postulated Michael-adducts of acrylamide/3-oxopropenamide with phenylacrylic acids (R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> according to (Yuan *et al.* (2019) R<sub>3</sub> according to Xu and An (2016). A) shows the postulated adduct in *para*-position for *p*-coumaric-, caffeic-, and ferulic acid. B) shows the postulated adduct in *meta*-position for cinnamic-, *p*-coumaric-, caffeic-, and ferulic acid. C) shows the postulated adduct in *ortho*-position for cinnamic-, *p*-coumaric-, caffeic-, and ferulic acid. The substituents of the different phenylacrylic acids, which are not a part of the adduct formation reactions are shown as R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, and R<sub>3</sub>. All substituents are described in more detail in Table 5.8-1.

## Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.

**Table 5.8-1:** Postulated adducts of phenylacrylic acids with acrylamide in fried potato and sweet potato (measured according to 2.7).

	Cinnamic acid	<i>p</i> -Coumaric acid	Caffeic acid	Ferulic acid
	-	a) -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	a) -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	a) -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
R <sub>1</sub>	-H	CONH <sub>2</sub> b) -OH	CONH <sub>2</sub> b) -OH	CONH <sub>2</sub> b) -OH
R <sub>2</sub>	-H	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>
	-	a) H	a) -H	a) -H
R <sub>3</sub>	CH=CH-CONH <sub>2</sub>	b) -CH=CH- CONH <sub>2</sub>	b) -CH=CH- CONH <sub>2</sub>	b) -CH=CH- CONH <sub>2</sub>
m/z [MH <sup>+</sup> ]	218	a) 236 b) 234	a) 252 b) 250	a) 266 b) 264
Potato	-	a) + b) -	a) - b) -	a) + b) -
Sweet Potato	-	a) + b) -	a) - b) -	a) + b) -

Putative structure based on a) Yuan, Qi, Liu, & Yan, 2019, b) X. Xu & An, 2016; (+) ion detected, (-) not detected

### 5.8.2. Reaction of acrylamide with phenylacrylic acids in a model system

To confirm the formation of acrylamide adducts with phenylacrylic acids in fried potatoes and sweet potatoes the reaction was simulated using pure phenylacrylic acid and acrylamide in a model system on 10 % hydrated silica gel (Schieberle *et al.*, 2005). The surface of French fries is the area of major acrylamide formation (Gökmen *et al.*, 2006). According to literature, frying decreased the water content in French fries from 68.09 % to 18.41 % (Romani *et al.*, 2009), while the surface concentration decreased to 2 % or less (MacMillan *et al.*, 2008). Therefore, the water content on the surface of French fries during the frying process should pass through the water concentration chosen for the model. LC-MS analysis of the respective reaction mixture showed intense [M+H<sup>+</sup>] signals for Michael-addition derived adducts at 236 m/z for *p*-coumaric acid, 266 m/z for ferulic acid, 252 m/z for caffeic acid, and, surprisingly, also at 220 m/z for cinnamic acid. Supposed nucleophilic centres of phenylacrylic acids are the phenolic hydroxy groups, and therefore no reaction was expected for cinnamic acid due to the missing hydroxyl group. Furthermore, because of the +M-effect of hydroxy groups, electron-rich carbon atoms in *ortho* position may react as nucleophiles with acryla-

## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

mide. At elevated temperatures and a low water activity the carboxylate group of phenylacrylic acids may react as a nucleophile in an oxa-Michael addition (Xingyu *et al.*, 2019, Jha *et al.*, 2017).

If phenolic hydroxyl groups were favoured nucleophiles in this reaction, the addition of two acrylamide molecules would be expected for caffeic acid, as it was reported for all four hydroxy-groups of rosmarinic acid (Yuan *et al.*, 2019). However, the extracted ion chromatogram did not show any hint for a participation of both phenolic hydroxy groups in acrylamide interception.

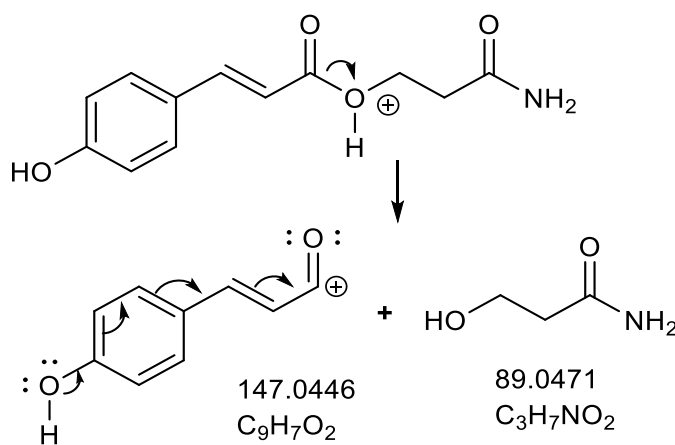
Each reaction mixture was then analysed by UPLC-QToF-MS/MS (Table 5.8-2). The accurate mass determination of the reaction products confirmed the elemental composition (molecular formula) of each postulated Michael product. Analytical standards for structure confirmation were not available. Hence, the position of the acrylamide addition remained unknown and required additional MS/MS data. Parameters (collision energy: 10 eV) for collision induced dissociation (CID) were tuned to cleave mainly the weakest bonds within the product molecules. Beside less abundant nonspecific neutral losses of water and ammonia, MS/MS conditions resulted in base ions, of which the accurate masses and elemental compositions are shown in Table 5.8-2. More indicative was the difference of protonated molecular ions and the respective base ion, which was 89 amu for each of the acrylamide adducts of the four phenylacrylic acids used in the model system. In each case the accurate mass of this neutral loss corresponded to C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, which must be attributed to 3-hydroxypropanamide. Such a cleavage can be explained only for oxa-Michael-addition products resulting from the reaction of the carboxylate group of the respective phenylacrylic acid with acrylamide. The fragmentation of the ester and the resonance stabilisation of the resulting base ion are shown exemplarily for *p*-coumaric acid in Fig. 5.8-2. The delocalisation of the positive charge over the entire molecule strongly favours this fragmentation reaction in CID. For respective Michael-adducts of acrylamide with phenolic hydroxy groups or with nucleophilic carbon atoms of the aromatic ring a fission of 89 amu is unlikely. The latter, upon cleavage of a supposed ether bridge, would not contain a 3-hydroxypropanamide moiety, as for phenol ethers a fission of a phenol moiety (cleavage of the bond between oxygen and the carbon side chain) is preferred. Furthermore, the formation of a propanamide ester explains, why the reaction of cinnamic acid generated a Michael-product.

**Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

**Table 5.8-2:** Measured accurate mass of the protonated molecule ions, elemental composition and most abundant fragment ions of reaction products of phenylacrylic acids and acrylamide in a model system. Accurate mass is described as mass-to-charge-ratio [m/z]. The errors in atomic mass units (amu) between measured and calculated mass are shown in parenthesis.

Adduct of (Retention time)	[M+H <sup>+</sup> ]	[BFI]*	[M+H <sup>+</sup> ] - [BFI]
<i>p</i> -Coumaric acid (15.2 min)	236.0912 (-0.0010) C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> +H <sup>+</sup>	147.0438 (-0.0008) C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	89.0484 (+0.0007) C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>
Ferulic acid (15.7 min)	266.1026 (-0.0002) C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub> +H <sup>+</sup>	177.0545 (-0.0006) C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	89.0481 (+0.0004) C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>
Caffeic acid (12.5 min)	252.0858 (-0.0014) C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> +H <sup>+</sup>	163.0388 (-0.0007) C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	89.0470 (-0.0007) C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>
[ <i>Z,E</i> ] Cinnamic acid (17.1 min) (18.6 min)	220.0974 (0.0000) C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> +H <sup>+</sup>	131.0495 (-0.0002) C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O	89.0479 (+0.0002) C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>

\*BFI = base peak fragment ion

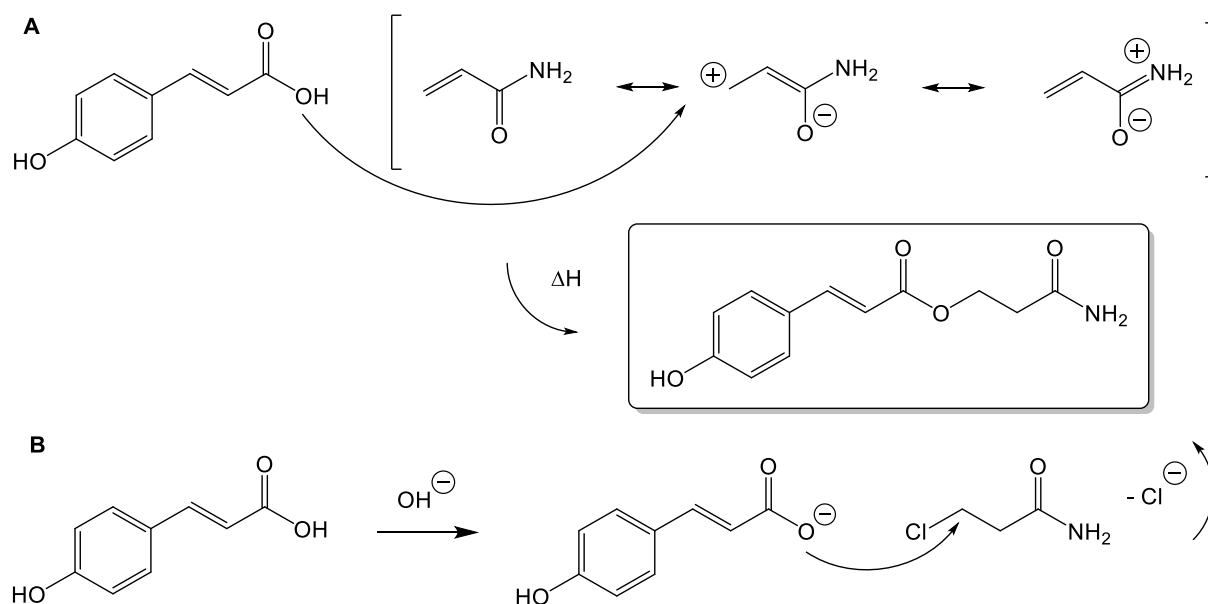


**Figure 5.8-2:** *p*-Coumaric acid acrylamide ester adduct: Ionisation, base ion formation and resonance stabilisation. Calculated exact mass and elemental composition are shown under each structure.

## Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.

### 5.8.3. Synthesis of phenylacrylic acid esters with 3-chloropropanamide

To reinforce the hypothesis of an ester rather than phenol ether formation, the postulated adducts were synthesized along a nucleophilic substitution reaction instead of the presumed oxa-Michael-type addition in the model system. Both reaction mechanisms are compared in Fig. 5.8-3. 3-Chloropropanamide was reacted with the respective phenylacrylic acid according to an  $S_N2$  mechanism to give the presumed esters (Fig. 5.8-3B). Indeed, this reaction resulted in the same phenylacrylic acid adducts (retention time, accurate mass, and fragment ions) as the one with acrylamide in the model system (Fig. 5.8-3A). Standing for all propanamide esters, the *p*-coumaric acid derivative was purified and submitted to NMR analysis.



**Figure 5.8-3:** Reaction mechanism of *p*-coumaric acid with acrylamide (A) and 3-chloropropanamide (B). Reaction A follows an oxa-Michael-mechanism, reaction B follows  $S_N2$ .

### 5.8.4. Structure elucidation via NMR

Besides  $^1H$ - und  $^{13}C$ -1d spectra two-dimensional spectra as DQF-COSY and heteronuclear  $^{13}C$ -edited HSQC and HMBC were measured. All signals of the  $^1H$ - and  $^{13}C$ -1d spectra were assigned as follows:  **$^1H$ -NMR** (600 MHz, 298 K, MeOD, MeOH = 3.32 ppm):  $\delta$  7.64 (d, 1H,  $J = 15.9$  Hz, 5-H), 7.46 (m, 2H, 3-H), 6.82 (m, 2H, 2-H), 6.33 (d, 2H,  $J = 15.9$  Hz, 6-H), 4.44 (t, 2H,  $J = 6.3$ , 8-H), 2.63 (t, 2H,  $J = 6.3$  Hz, 9-H) ppm.  **$^{13}C$ -NMR** (151 MHz, 298 K, MeOD,

## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

MeOD = 48.0 ppm):  $\delta$  174.4 (s, C-10), 167.7 (s, C-7), 160.0 (s, C-1), 145.4 (s, C-5), 129.8 (s, C-3), 125.8 (s, C-4), 115.4 (s, C-2), 113.5 (s, C-6), 60.3 (s, C-8), 34.5 (s, C-9) ppm. All spectra (5 figures) and the atom assignment (1 figure) are shown in the supplementary material. Long range correlations in the HMBC spectrum showed a  $^3J_{CH}$ -coupling of the saturated protons (4.44 ppm, 8-H) with the carboxylic carbon (167.7 ppm, C-7). Therefore, the esterification took place between the carboxylate function of *p*-coumaric acid and the chloride of the 3-chloropropanamide. The structure of the *p*-coumaric acid adduct was hereby confirmed to be 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate. As the other phenylacrylic acid adducts were synthesized along the same reaction pathway and products showed identical MS/MS-fragmentation patterns, they were most likely the corresponding propanamide esters.

### **5.8.5. Phenylacrylic acid ester formation in fried potato and sweet potato**

When treated with 0.1 mol/L of *p*-coumaric- or ferulic acid, fried potatoes and sweet potatoes showed signals at the nominal masses indicative for Michael-addition products with acrylamide (Table 5.8-1). The  $[M+H^+]$ -signals were too small to obtain good MS/MS-spectra. The signal-to-noise ratio was too low to identify any fragments. Therefore, the synthesized standards were added to prove the identity of the presumed phenylacrylic acid propanamides. However, UPLC-QToF-MS/MS chromatograms showed clearly that the retention times of the assumed acrylamide adducts in the fried samples did not match with the retention times of the respective standards, and the accurate mass of the presumed ferulic acid adduct did not fit to the postulated adduct.

In a follow-up experiment, potato and sweet potato cubes treated with phenylacrylic acids, acrylamide, and 3-chloropropanamide were analysed *via* UPLC-QToF-MS/MS. Retention time, accurate mass, and elemental composition are shown in Table 5.8-3.

Raw samples of both, potato and sweet potato cubes, contained no free phenylacrylic acids and no acrylamide adducts. However, fried samples without addition of phenylacrylic acids showed peaks at  $m/z$  of assumed adducts with acrylamide for *p*-coumaric and cinnamic acid, which were not identical with the ester adducts synthesized. These compounds were detected in any fried sample irrespectively of any supplementation and the peak areas did not increase or decrease. However, propanamide esters of phenylacrylic acids were not detected (Table

### **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

5.8-3). The accurate mass of the unknown compounds matched well with the respective elemental composition of the acrylamide adducts of *p*-coumaric and cinnamic acid, but other meaningful suggestions for the elemental compositions are possible. For instance,  $m/z$  258.0733 matches with  $C_{12}H_{13}NO_4Na^+$ , the sodium adduct of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate, as well as with  $C_{10}H_8N_7O_2^+$ . Because not even traces of the protonated adduct were measured, it was considered to be more likely  $C_{10}H_8N_7O_2^+$ , possibly an advanced glycation end product (AGE) formed along the Maillard-reaction. High amino group and reducing sugar concentrations combined with the frying process provide suitable conditions for the formation of AGE (Van Nguyen, 2006). The same suggestion was made for 242.0783  $m/z$ , which matched with the sodium adduct of 3-amino-3-oxopropyl cinnamate. No protonated adduct was measured, and  $C_{10}H_8N_7O^+$  would also fit.

In all samples, the respective adducts were detected beside non-reacted phenylacrylic acids (Table 5.8-3). Identical sample masses were weighted in to enable a comparison of the peak areas. The fivefold concentration (Area) of adducts was found with 3-chloropropanamide compared to the obviously less reactive acrylamide (Fig. 5.8-4). These results evidenced that a formation of ester adducts of phenylacrylic acids with acrylamide was basically possible, but irrelevant under real-life conditions.

**Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

**Table 5.8-3:** Evaluation of phenylacrylic acid adduct formation in potato and sweet potato.

Retention time [min]	Ø Accurate mass [m/z]	Calculated molecular formula	Found in	Identified substance
12.5	181.05	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	C1, C2, C3	caffeic acid
13.5	252.09	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> <sup>+</sup>	C2, C3	3-amino-3-oxopropyl-3-(4-dihydroxyphenyl)acrylate
14.3	258.07	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> Na <sup>+</sup> C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	UP, USP, A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, D1, D2, D3	not identified
14.8	165.05	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	A1, A2, A3	<i>p</i> -coumaric acid
15.2	236.09	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub>	A2, A3	3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate
15.6	195.07	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	B1, B2, B3	ferulic acid
15.7	288.09	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub> Na <sup>+</sup>	B2, B3	3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate
18.3	242.08	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup> C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>7</sub> O <sup>+</sup>	UP, USP, A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, D1, D2, D3	not identified
18.6*	242.08	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	D2, D3	3-amino-3-oxopropyl-3-acrylate
19.6	149.06	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	D1, D2, D3	cinnamic acid

UP = Untreated fried potato

USP = Untreated fried sweet potato

A1 = Fried (sweet) potato + *p*-coumaric acid

A2 = Fried (sweet) potato + *p*-coumaric acid + acrylamide

A3 = Fried (sweet) potato + *p*-coumaric acid + 3-chloropropanamide

B1 = Fried (sweet) potato + ferulic acid

B2 = Fried (sweet) potato + ferulic acid + acrylamide

B3 = Fried (sweet) potato + ferulic acid + 3-chloropropanamide

C1 = Fried (sweet) potato + caffeic acid

C2 = Fried (sweet) potato + caffeic acid + acrylamide

C3 = Fried (sweet) potato + caffeic acid + 3-chloropropanamide

D1 = Fried (sweet) potato + cinnamic acid

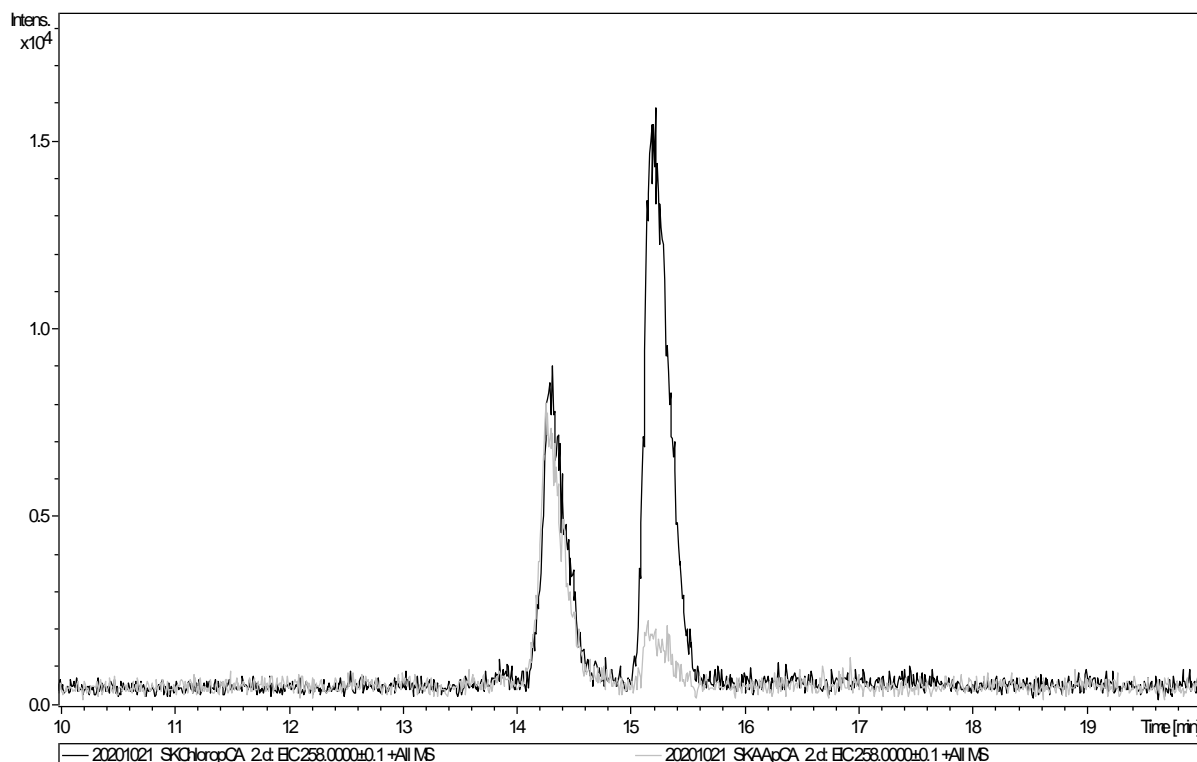
D2 = Fried (sweet) potato + cinnamic acid + acrylamide

D3 = Fried (sweet) potato + cinnamic acid + 3-chloropropanamide

\* Traces of the respective *Z*- isomer were detected as well.



## Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.



**Figure 5.8-4:** UPLC-HR-MS-qToF extracted ion chromatogram (EIC) at  $258 \pm 0.1$  m/z of two samples (overlaid). Grey: Sweet potato cubes dipped in 0.1 mol/L *p*-coumaric acid and acrylamide, which were fried for 6 minutes at 180 °C. Black: Sweet potato cubes dipped in 0.1 mol/L *p*-coumaric acid and acrylamide, which were fried for 6 minutes at 180 °C. The peak at 14.3 has not been identified. It was presumed to be an AGE. The peak at 15.2 min is the sodium adduct of 3-amino-3-oxopropyl cinnamate.

### 5.9. Conclusion

Natural phenolic antioxidants were recurrently supposed to mitigate acrylamide formation in food. Contradictory to some data in literature, the present study showed that hydroxylphenyl acrylic acids, namely *p*-coumaric, ferulic, and caffeic acid, and cinnamic acid were not suitable additives for the lowering of acrylamide concentration in fried potato and sweet potato. Previously postulated Michael-adducts of phenols and acrylamide were neither found in fried products nor in a model system. The reaction products of phenylacrylic acids with acrylamide in a model system were unambiguously identified as 3-amino-3-oxopropyl-phenylacrylates by *de novo* synthesis, MS/MS and NMR. Their possible formation in fried potato and sweet potato was confirmed, provided that both, acrylamide and the respective phenylacrylic acid were supplemented in high concentration (0.1 mol/L, over solubility limit) before frying (Xu

## **Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---

and An, 2016). In non-supplemented samples no adduct formation was detected, which was in line with the absence of detectable amounts of free phenylacrylic acids in raw potato and sweet potato and relatively low acrylamide concentrations in fried products (17 to 264  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) compared to the high supplementation of 0.1 mol/L acrylamide, which led to barely detectable amounts of 3-amino-3-oxopropyl-phenylacrylates. This study concludes that the recurrently reported acrylamide mitigating effect of herbal and fruit extracts containing phenols cannot be attributed to the abundant phenylacrylic acids, but must result from other, perhaps more suitable constituents. Generally, effective mitigation appears more effective with the prevention of acrylamide formation early in the processes (production parameters, asparaginases) or during the frying (addition of competing nucleophiles, for example amines or thiols) and less practical by intercepting acrylamide formed in the course of the production process. However, this generalization needs to be verified for other foods.

### **5.10. Declaration of Competing interests**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### **5.11. Acknowledgements**

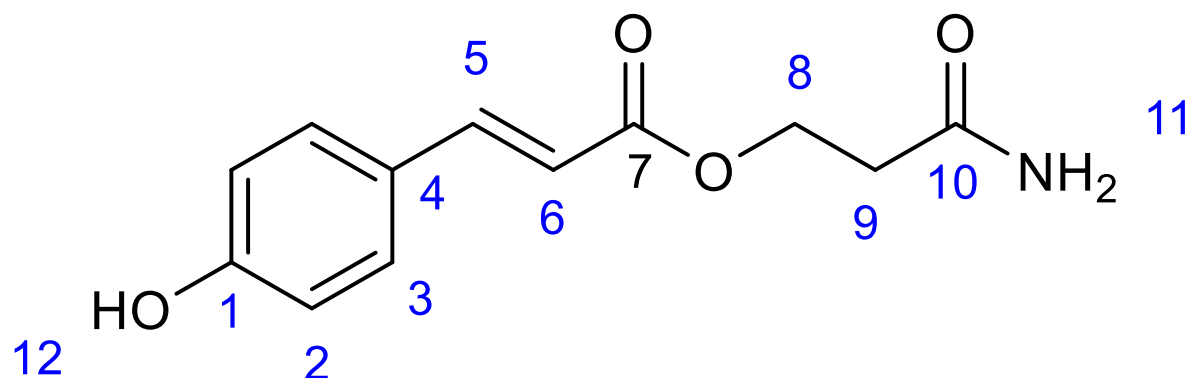
The authors acknowledge the skilful assistance of C. Theobald and the interest of Wernsing Feinkost GmbH (Addrup-Essen, Germany).

Graphical abstract was created with BioRender.com

Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.

---

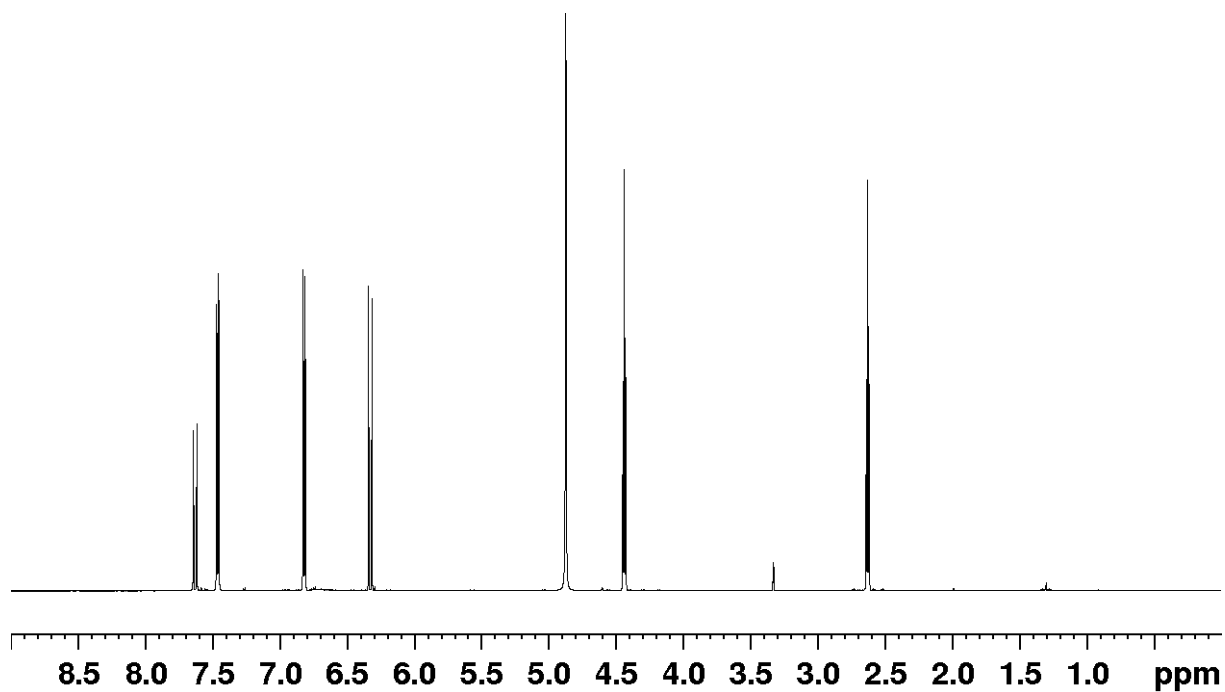
### 5.12. Supplementary material



**Figure 5.12-1:** Assignment of the atoms of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.

**Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

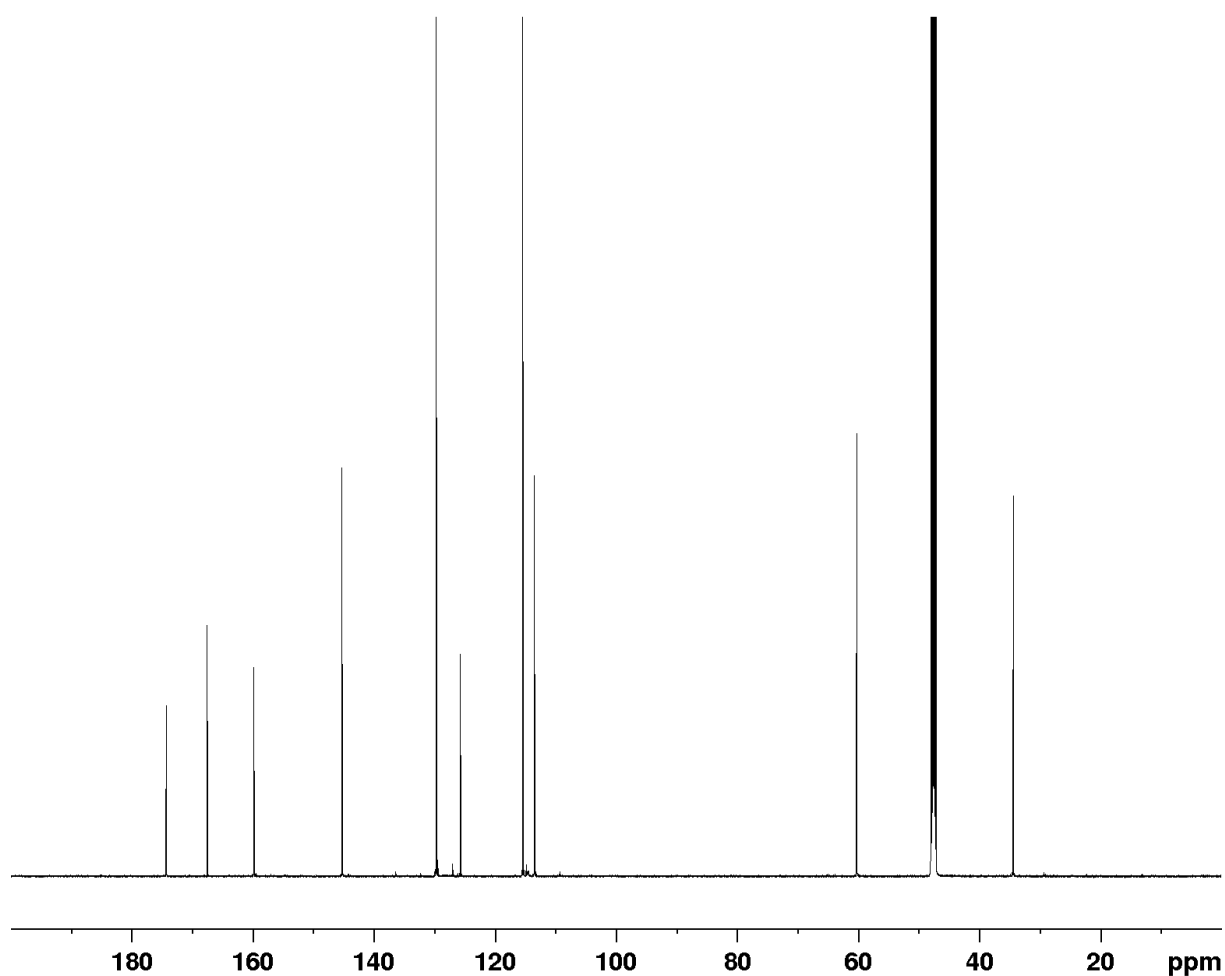
---



**Figure 5.12-2:** 600 MHz 1D-<sup>1</sup>H-spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.

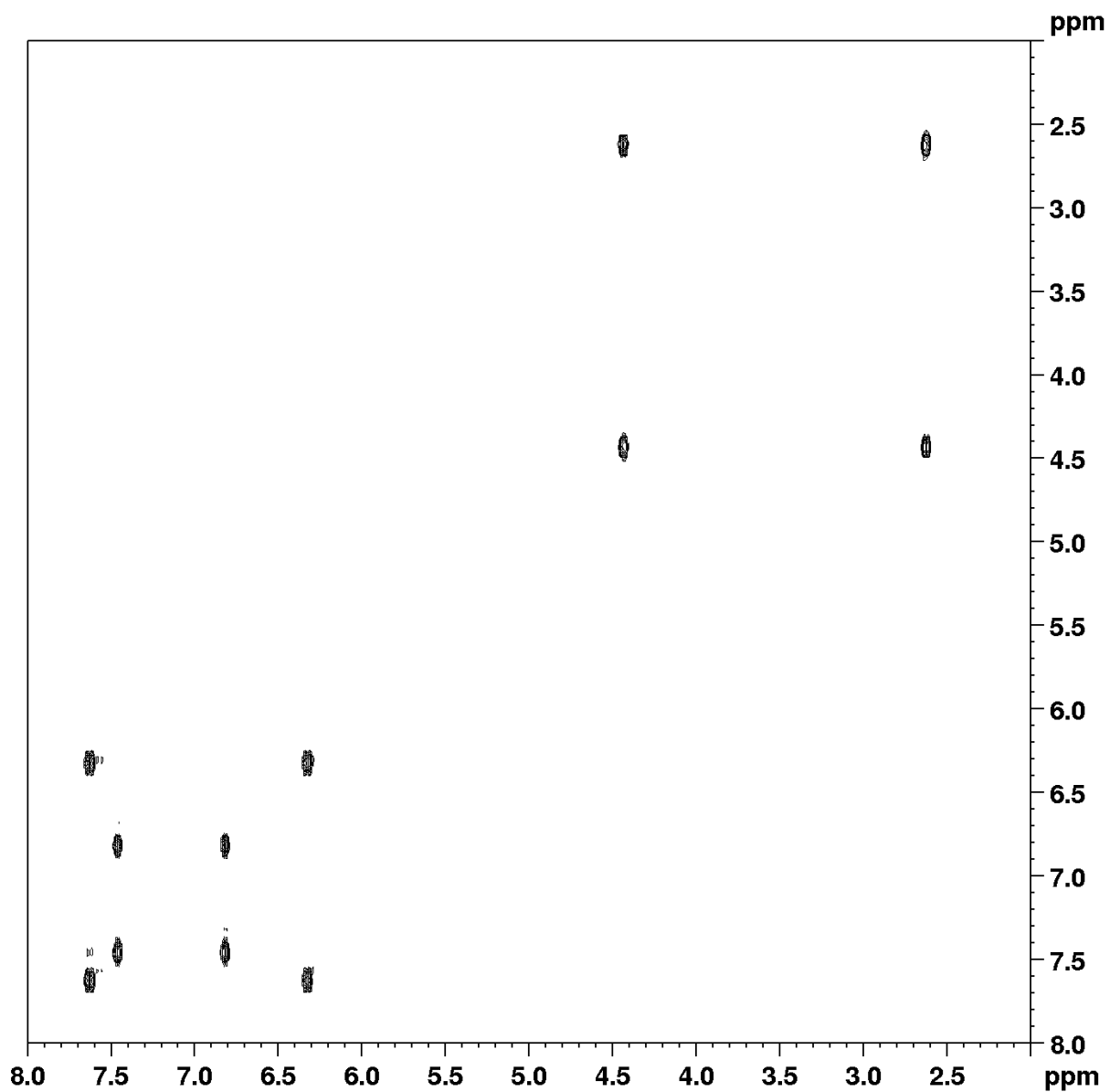
**Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.**

---



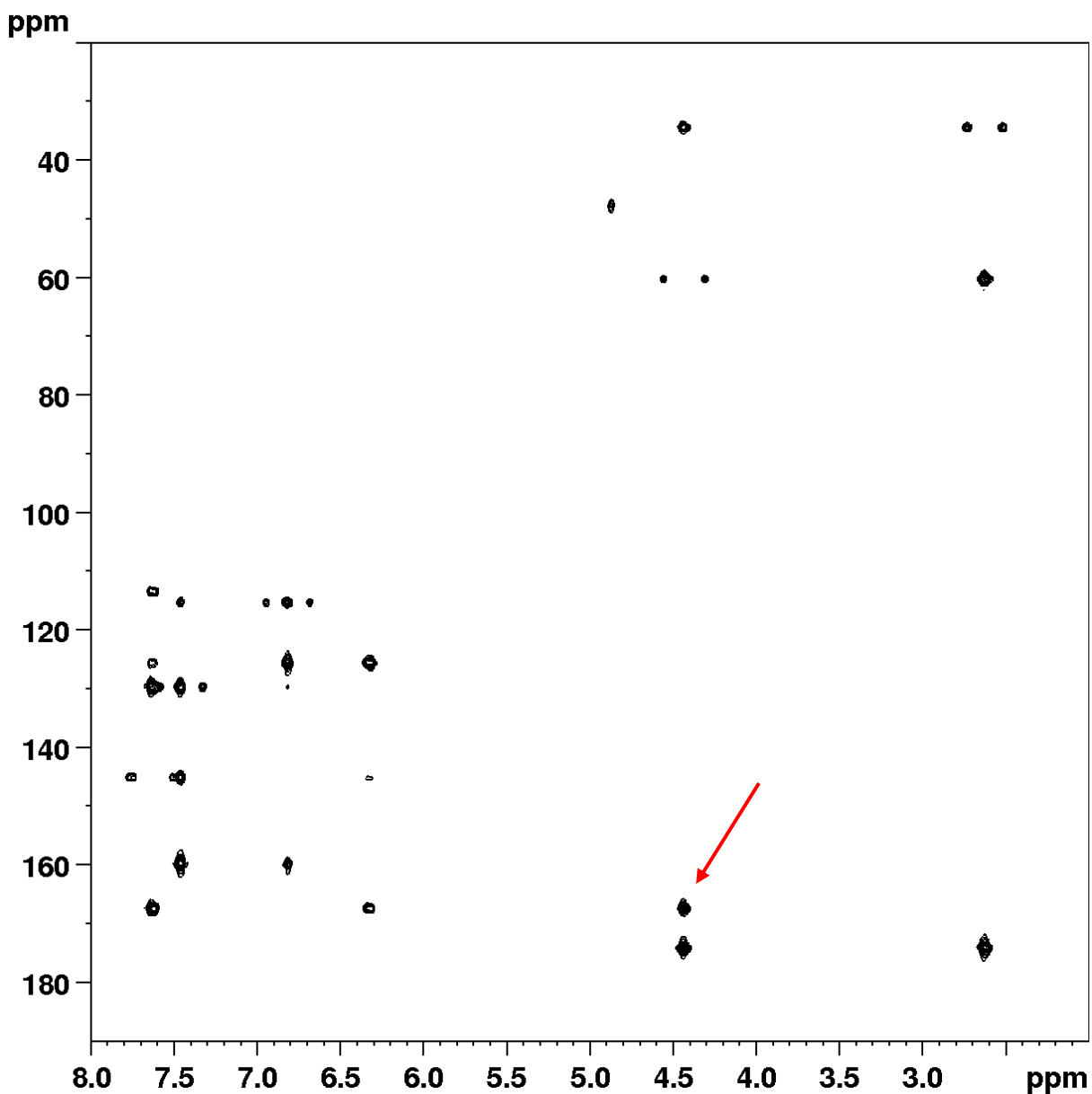
**Figure 5.12-3:** 600 MHz  $^{13}\text{C}$ -spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.

Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.



**Figure 5.12-4:** 600 MHz 2D-DQF-COSY-spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.

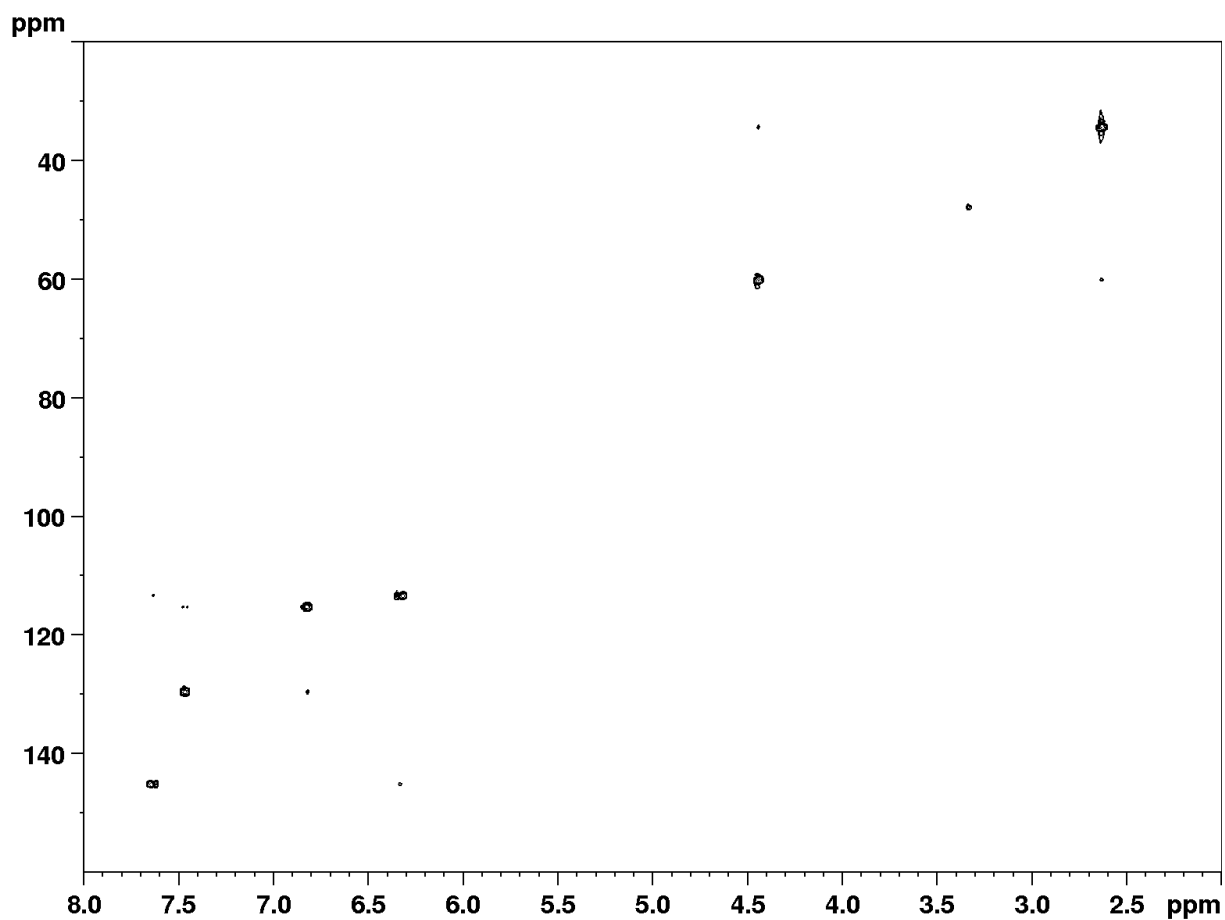
Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.



**Figure 5.12-5:** 600 MHz heteronuclear 2D-HMBC-spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.  $^3J_{CH}$ -coupling of the saturated protons (4.44 ppm, 8-H) with the carboxylic carbon (167.7 ppm, C-7) is marked (red arrow).

Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying.

---



**Figure 5.12-6:** 600 MHz heteronuclear 2D-HSQC-spectrum of 3-amino-3-oxopropyl-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate.



### 6. Zusammenfassung und Ausblick

#### 6.1. Zusammenfassung

Acrylamid als Prozesskontaminante in trocken erhitzten Lebensmitteln stellt auch nach fast 20 Jahren Forschung noch eine ernstzunehmende Bedrohung für die öffentliche Gesundheit dar. Kartoffelerzeugnisse stellen aufgrund ihres hohen Asparagingehalts hierbei ein besonderes Problem dar. In den oben im Rahmen dieser Dissertation publizierten Studien wurde ein Beitrag zur Verminderung von Acrylamid geleistet.

Es mangelte an Daten über den Einsatz von Asparaginasen im industriellen Maßstab, während eine Fülle an Daten über Laborversuche zur Verfügung stand. Daher war der Transfer vom Labor in einen industriellen Prozess der Ausgangspunkt dieser Studie. Zusammen mit der Wernsing Feinkost GmbH wurden Einsatzmöglichkeiten in den Prozesslinien besprochen. Die Schwemmrinne als etablierter Behandlungsschritt mit Glucose und Dinatriumdihydrogendiphosphat wurde als am besten geeignet identifiziert. Der Einsatz kommerzieller Asparaginasen stellt ein einfaches Werkzeug zur Verminderung von Acrylamid durch die Umsetzung von Asparagin zu Asparaginsäure dar. In der beschriebenen Studie wurde die Asparaginase PreventASe L von DSM<sup>®</sup> erfolgreich in der industriellen Produktion von Tiefkühl-Pommes frites eingesetzt. Dabei ließ sich die Umsetzung von Asparagin anhand der Enzymkonzentration bis zu einer Enzymkonzentration von 1 % skalieren. Der Acrylamidgehalt wurde durch die Behandlung um bis zu 59 % gesenkt. Die behandelten Pommes frites wiesen keine sensorischen Auffälligkeiten auf. Damit beschreibt die Publikation den ersten Nachweis der Wirksamkeit von Asparaginasen in TK-Pommes frites.

Der Einsatz von Phenolsäuren zur Verminderung von Acrylamid führte in verschiedenen Studien nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Das Eintauchen von Kartoffel- und Süßkartoffelwürfeln in Phenolsäuredispersionen zeigte keinen signifikanten Effekt. Massenspektrometrische Untersuchungen wiesen jedoch auf Phenolsäure-Acrylamidaddukte hin. Strukturanalysen von Molekülen in Modellsystemversuchen wiesen die bisher nicht beschriebenen 3-Amino-2-oxopropyl-phenylacrylate nach. In realen Proben gelang kein Nachweis von Addukten. Zwar konnte die Möglichkeit der Bildung unter Standardzubereitungsbedingungen von Pommes frites bewiesen werden, jedoch nur in Acrylamid dotierten Proben. Aufgrund der

widersprüchlichen Auswirkungen und der nicht nachweisbaren Adduktbildung in realen Proben stellt der Einsatz von Phenolsäuren in der in dieser Studie beschriebenen Form keine zuverlässige Option für die Verminderung von Acrylamid dar.

### 6.2. Ausblick

Die im Rahmen dieser Dissertation publizierten Studien zeigten, dass es weiteren Forschungsbedarf zur Verminderung von Acrylamid in Kartoffelerzeugnissen gibt. Hierbei sollte der Fokus auf der Implementierung in den industriellen Maßstab liegen. Die Bedingungen bei Laborversuchen sollten den industriellen Prozessparametern soweit wie möglich angeglichen werden. Vielversprechende Verminderungsstrategien sind der Einsatz von Asparinasen, Aminosäuren und neuartigen Kartoffelsorten.

Speziell der Einsatz von Asparinasen sollte weiterverfolgt werden. Es sind mehrere kommerzielle Asparinasen erhältlich. Der erste Nachweis der Wirksamkeit im industriellen Prozess war erfolgreich, weitere Versuche sollten Prozessschwankungen untersuchen. Hierbei gilt es, die Wirksamkeit des Enzyms bei unterschiedlichen Kartoffelsorten und damit variablen Asparinkonzentrationen zu überprüfen und den daraus resultierenden Einfluss auf die Acrylamid-bildung zu messen. Im Anschluss können kombinierte Behandlungsverfahren aus Asparinasen und z. B. Aminosäuren getestet werden. Neben den getesteten 8x8 mm Feinschnitt TK-Pommes frites sollten weitere Produkte untersucht werden. Speziell das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis sollte in die Analysen mit einbezogen werden. Eine Vielzahl an Analysen ermöglicht die Entwicklung eines Modells, um den Acrylamidgehalt anhand der Behandlungsmethode und weiteren Parametern, wie z. B. der Farbe, vorherzusagen. Sobald Methoden etabliert und validiert wurden, sollte der Aspekt der Nachhaltigkeit und Kostenreduzierung im Fokus stehen. Die Enzymkosten sind verhältnismäßig hoch, solange die Flüssigkeit nach der Produktion abgelassen wird. Eine Rückgewinnung des Enzyms oder Prozessbedingungen für eine möglichst lange Nutzungsdauer sollten entwickelt werden.

Weitere Untersuchungen über die direkte Zugabe von reinen Phenolsäuren zu Kartoffeln oder Süßkartoffeln sind bei Betrachtung der Daten aus dieser Studie nicht zu empfehlen, da andere Behandlungsmethoden, wie der Einsatz von Aminosäuren, Acrylamid effektiver vermindern. Die Behandlung mit komplexen Matrices, welche u. a. phenolische Substanzen enthalten, bedarf weiterer Forschung zur Aufklärung der Mechanismen. Hier könnte über den Einsatz in Panaden nachgedacht werden. Da die Panade als komplexe Matrix zugegeben wird, könnten phenolreiche Formulierungen möglicherweise den gewünschten Erfolg erzielen.

Der Einsatz von gentechnisch veränderten Sorten sollte forciert werden. Durch den Einsatz gentechnisch veränderter, asparinarmer Kartoffelsorten wird die Bildung von Acrylamid

in Kartoffelerzeugnissen deutlich gesenkt, da das Problem bereits vor der Entstehung gelöst würde. Es wäre nicht mehr notwendig, Substanzen zur Verminderung zuzusetzen. Außerdem könnten durch die Verminderung einer realen gesundheitlichen Gefahr für den Konsumenten die Vorbehalte in der europäischen Bevölkerung gegenüber dem Einsatz von GVO abgebaut werden. Durch neuere molekularbiologische Techniken wie CRISPR/Cas und deren gezielte Anwendungsmöglichkeit sowie die immer größere Verbreitung von transgenen Pflanzen in der restlichen Welt sollten GVO in der Lebensmittelindustrie immer in Betracht gezogen werden.

### 7. Literaturverzeichnis

- Adams, A., Hamdani, S., Van Lancker, F., Mějri, S. & De Kimpe, N. (2010). Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles. *Food Research International*, **43**, 1517-1522.
- Ahn, J., Castle, L., Clarke, D., Lloyd, A., Philo, M. & Speck, D. (2002). Verification of the findings of acrylamide in heated foods. *Food Additives & Contaminants*, **19**, 1116-1124.
- Akyol, H., Riciputi, Y., Capanoglu, E., Caboni, M. F. & Verardo, V. (2016). Phenolic compounds in the potato and its byproducts: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, 835.
- Aladedunye, F. (2016). Toxic contaminants of thermo-oxidatively processed edible oils/fats. *Lipid Technology*, **28**, 117-121.
- Amrein, T. M., Bachmann, S., Noti, A., Biedermann, M., Barbosa, M. F., Biedermann-Brem, S., Grob, K., Keiser, A., Realini, P. & Escher, F. (2003). Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, **51**, 5556-5560.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, **86**, 412-431.
- Andersson, A., Gekas, V., Lind, I., Oliveira, F., Öste, R. & Aguilera, J. M. (1994). Effect of preheating on potato texture. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **34**, 229-251.
- Bagdonaite, K., Viklund, G., Skog, K. & Murkovic, M. (2006). Analysis of 3-aminopropionamide: A potential precursor of acrylamide. *Journal of biochemical and biophysical methods*, **69**, 215-221.
- Bassama, J., Brat, P., Bohuon, P., Boulanger, R. & Günata, Z. (2010). Study of acrylamide mitigation in model system: Effect of pure phenolic compounds. *Food chemistry*, **123**, 558-562.
- Belkova, B., Hradecky, J., Hurkova, K., Forstova, V., Vaclavik, L. & Hajslova, J. (2018). Impact of vacuum frying on quality of potato crisps and frying oil. *Food chemistry*, **241**, 51-59.
- Bergmark, E. (1997). Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chemical research in toxicology*, **10**, 78-84.
- Bergmark, E., Callemann, C., He, F. & Costa, L. (1993). Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicology and applied pharmacology*, **120**, 45-54.
- Besaratinia, A. & Pfeifer, G. P. (2007). A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis*, **28**, 519-528.
- BMEL, B. f. E. u. L. (1997). Leitsätze für Kartoffelerzeugnisse. [www.bmel.de](http://www.bmel.de).
- Boettcher, M. I., Bolt, H. M., Drexler, H. & Angerer, J. (2006). Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Archives of toxicology*, **80**, 55-61.
- Bråthen, E. & Knutsen, S. H. (2005). Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food chemistry*, **92**, 693-700.
- Budavari, S., O’Neil, M. J., Smith, A. & Heckelman, P. E. (1989). The merck index. Merck Rahway, NJ.

- Burek, J., Albee, R., Beyer, J., Bell, T., Carreon, R., Morden, D., Wade, C., Hermann, E. & Gorzinski, S. (1980). Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery. *Journal of environmental pathology and toxicology*, **4**, 157-182.
- Capuano, E. & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-food science and technology*, **44**, 793-810.
- Capuano, E., Oliviero, T., Açar, Ö. Ç., Gökmen, V. & Fogliano, V. (2010). Lipid oxidation promotes acrylamide formation in fat-rich model systems. *Food Research International*, **43**, 1021-1026.
- Channell, G. A., Wulfert, F. & Taylor, A. J. (2008). Identification and monitoring of intermediates and products in the acrylamide pathway using online analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, **56**, 6097-6104.
- Chawla, R., Shakya, R. & Rommens, C. M. (2012). Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. *Plant biotechnology journal*, **10**, 913-924.
- Ciesarova, Z., Kiss, E. & Kolek, E. (2006). Study of factors affecting acrylamide levels in model systems. *Czech journal of food sciences*, **24**, 133.
- De Vleeschouwer, K., Plancken, I. V. d., Van Loey, A. & Hendrickx, M. E. (2007). Kinetics of acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity. *Biotechnology progress*, **23**, 722-728.
- De Vleeschouwer, K., Van der Plancken, I., Van Loey, A. & Hendrickx, M. E. (2009). Modelling acrylamide changes in foods: from single-response empirical to multiresponse mechanistic approaches. *Trends in food science & technology*, **20**, 155-167.
- Dearfield, K. L., Abernathy, C. O., Ottley, M. S., Brantner, J. H. & Hayes, P. F. (1988). Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutation research/reviews in genetic toxicology*, **195**, 45-77.
- Destatis, S. B. D. (2021). Produktionsmenge von Pommes Frites in Deutschland in den Jahren 2004 bis 2019 *Statista - www.destatis.de*.
- Doroshenko, O., Fuhr, U., Kunz, D., Frank, D., Kinzig, M., Jetter, A., Reith, Y., Lazar, A., Taubert, D. & Kirchheiner, J. (2009). In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, **18**, 433-443.
- Dybing, E., Farmer, P., Andersen, M., Fennell, T., Lalljie, S., Müller, D., Olin, S., Petersen, B., Schlatter, J. & Scholz, G. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology*, **43**, 365-410.
- EFSA, E. F. S. A. (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, **13**, 4104.
- Elmore, J. S., Koutsidis, G., Dodson, A. T., Mottram, D. S. & Wedzicha, B. L. (2005). The effect of cooking on acrylamide and its precursors in potato, wheat and rye. In: *Chemistry and safety of acrylamide in food*. Pp. 255-269. Springer.
- FoodDrinkEurope (2019). Acrylamide Toolbox 2019. [www.fooddrinkeurope.eu](http://www.fooddrinkeurope.eu).
- Friedman, M. A., Dulak, L. H. & Stedham, M. A. (1995). A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Toxicological sciences*, **27**, 95-105.
- Fuhr, U., Boettcher, M. I., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., Taubert, D., Tomalik-Scharte, D., Pournara, P. & Jakob, V. (2006). Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, **15**, 266-271.
- Gamboa da Costa, G., Churchwell, M. I., Hamilton, L. P., Von Tungeln, L. S., Beland, F. A., Marques, M. M. & Doerge, D. R. (2003). DNA adduct formation from acrylamide

- via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chemical research in toxicology*, **16**, 1328-1337.
- Gökmen, V. & Palazoğlu, T. K. (2009). Measurement of evaporated acrylamide during frying of potatoes: Effect of frying conditions and surface area-to-volume ratio. *Journal of Food Engineering*, **93**, 172-176.
- Gökmen, V., Palazoğlu, T. K. & Şenyuva, H. Z. (2006). Relation between the acrylamide formation and time-temperature history of surface and core regions of French fries. *Journal of Food Engineering*, **77**, 972-976.
- Gökmen, V. & Şenyuva, H. Z. (2007). Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food chemistry*, **103**, 196-203.
- Granda, C., Moreira, R. & Tichy, S. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato chips by low-temperature vacuum frying. *Journal of Food Science*, **69**, E405-E411.
- Granda, C. & Moreira, R. G. (2005). Kinetics of acrylamide formation during traditional and vacuum frying of potato chips. *Journal of Food Process Engineering*, **28**, 478-493.
- Haberman, C., Kroschwitz, H.-G. & Kirk-Othmer, J. (1991). Acrylamid. *Encyclopedia of Chemical Technology: A to alkaloids*, **1**, 266.
- Hagmar, L., Törnqvist, M., Nordander, C., Rosén, I., Bruze, M., Kautiainen, A., Magnusson, A.-L., Malmberg, B., Aprea, P. & Granath, F. (2001). Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 219-226.
- Hedegaard, R. V., Granby, K., Frandsen, H., Thygesen, J. & Skibsted, L. H. (2008). Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants. *European Food Research and Technology*, **227**, 519-525.
- Hinson, J. A. & Roberts, D. W. (1992). Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **32**, 471-510.
- Hodge, J. E. (1953). Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, **1**, 928-943.
- IARC (1994). IARC.(1994). Acrylamide. *International Agency for Research on Cancer–IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals*, **60**, 389-433.
- Jackson, L. S. & Al-Taher, F. (2005). Effects of consumer food preparation on acrylamide formation. In: *Chemistry and safety of acrylamide in food*. Pp. 447-465. Springer.
- JEFCFA (2005). Summary report of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JECFA). Rome, Italy. The ILSI Press International Life Sciences Institute, Washington DC.
- Jha, A. K., Inani, H. & Easwar, S. (2017). A Nucleophilic Activation of Carboxylic Acids by Proline: Oxa-Michael Addition to Methyl Vinyl Ketone under Solvent-Free Conditions. *Synlett*, **28**, 1473-1477.
- Jin, C., Wu, X. & Zhang, Y. (2013). Relationship between antioxidants and acrylamide formation: A review. *Food Research International*, **51**, 611-620.
- Johnson, K. A., Gorzinski, S. J., Bodner, K. M., Campbell, R. A., Wolf, C. H., Friedman, M. A. & Mast, R. W. (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicology and applied pharmacology*, **85**, 154-168.
- Jung, M., Choi, D. & Ju, J. (2003). A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in French fries. *Journal of Food Science*, **68**, 1287-1290.
- Kalita, D., Holm, D. G. & Jayanty, S. S. (2013). Role of polyphenols in acrylamide formation in the fried products of potato tubers with colored flesh. *Food Research International*, **54**, 753-759.

- Kim, C. T., Hwang, E. S. & Lee, H. J. (2005). Reducing acrylamide in fried snack products by adding amino acids. *Journal of Food Science*, **70**, C354-C358.
- Kjuus, H., Brudal, S., Heier, M., Skaug, V., Øvrebø, S., Ryberg, D., Goffeng, L., Notø, H. & Hansteen, I. (1998). Nervous system effects related to acrylamide and N-methylol acrylamide exposure in tunnel work-a project description. In: Abstract. Pp. 62-63.
- Kocadağlı, T., Göncüoğlu, N., Hamzalıoğlu, A. & Gökmen, V. (2012). In depth study of acrylamide formation in coffee during roasting: role of sucrose decomposition and lipid oxidation. *Food & function*, **3**, 970-975.
- Kondo, M., Dozono, Y., Goto, K. & Kawatsuki, N. (2012). Synthesis of Side-Chain Liquid-Crystalline Cinnamide Polymers Based on Post Polymer Reaction. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, **563**, 121-130.
- Kotsiou, K., Tasioula-Margari, M., Capuano, E. & Fogliano, V. (2011). Effect of standard phenolic compounds and olive oil phenolic extracts on acrylamide formation in an emulsion system. *Food chemistry*, **124**, 242-247.
- Koutsidis, G., De la Fuente, A., Dimitriou, C., Kakoulli, A., Wedzicha, B. L. & Mottram, D. S. (2008). Acrylamide and pyrazine formation in model systems containing asparagine. *Journal of agricultural and food chemistry*, **56**, 6105-6112.
- Koutsidis, G., Simons, S. P., Thong, Y. H., Haldoupis, Y., Mojica-Lazaro, J., Wedzicha, B. L. & Mottram, D. S. (2009). Investigations on the effect of amino acids on acrylamide, pyrazines, and Michael addition products in model systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, **57**, 9011-9015.
- Lafay, S. & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, **7**, 301.
- Lamberg, I. & Olsson, H. (1989). Starch gelatinization temperatures within potato during blanching. *International Journal of Food Science & Technology*, **24**, 487-494.
- LAVES, N. L. f. V. u. L. (2018, 2019). Acrylamide - Investigation results. [www.laves.niedersachsen.de](http://www.laves.niedersachsen.de).
- Lee, K. S. & Drescher, D. G. (1978). Fluorometric amino-acid analysis with o-phthaldialdehyde (OPA). *International Journal of Biochemistry*, **9**, 457-467.
- Lide, D. R. (1991). CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1991-1992. *Chemical Rubber Pub. Co., Boston*, 4-50.
- Liu, J. H., Chou, Y. L., Balamurugan, R., Tien, K. H., Chuang, W. T. & Wu, M. Z. (2011). Optical properties of chiral nematic side-chain copolymers bearing cholesteryl and azobenzene building blocks. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **49**, 770-780.
- Low, M. Y., Parker, J. K. & Mottram, D. S. (2007). Mechanisms of alkylpyrazine formation in a potato model system containing added glycine. *Journal of agricultural and food chemistry*, **55**, 4087-4094.
- Lunn, J. & Theobald, H. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin*, **31**, 178-224.
- MacMillan, B., Hickey, H., Newling, B., Ramesh, M. & Balcom, B. (2008). Magnetic resonance measurements of French fries to determine spatially resolved oil and water content. *Food Research International*, **41**, 676-681.
- Madle, S., Broschinski, L., Mosbach-Schulz, O., Schöning, G. & Schulte, A. (2003). Zur aktuellen Risikobewertung von Acrylamid in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, **46**, 405-415.
- Martins, S. I. d. F. S. (2003). Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modelling. Wageningen University.
- Mastovska, K. & Lehotay, S. J. (2006). Rapid sample preparation method for LC- MS/MS or GC- MS analysis of acrylamide in various food matrices. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**, 7001-7008.



- Matoso, V., Bargi-Souza, P., Ivanski, F., Romano, M. A. & Romano, R. M. (2019). Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food chemistry*, **283**, 422-430.
- Matsuura-Endo, C., Ohara-Takada, A., Chuda, Y., Ono, H., Yada, H., Yoshida, M., Kobayashi, A., Tsuda, S., Takigawa, S. & Noda, T. (2006). Effects of storage temperature on the contents of sugars and free amino acids in tubers from different potato cultivars and acrylamide in chips. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **70**, 1173-1180.
- Matthäus, B., Haase, N. U. & Vosmann, K. (2004). Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 793-801.
- Matthäus, B. & Pudel, F. (2013). Mitigation of 3-MCPD and glycidyl esters within the production chain of vegetable oils especially palm oil. *Lipid Technology*, **25**, 151-155.
- Mazza, G. & Qi, H. (1991). Control of after-cooking darkening in potatoes with edible film-forming products and calcium chloride. *Journal of agricultural and food chemistry*, **39**, 2163-2166.
- Medeiros Vinci, R., Mestdagh, F., Van Poucke, C., Kerkaert, B., De Muer, N., Denon, Q., Van Peteghem, C. & De Meulenaer, B. (2011). Implementation of acrylamide mitigation strategies on industrial production of French fries: challenges and pitfalls. *Journal of agricultural and food chemistry*, **59**, 898-906.
- Mestdagh, F., De Wilde, T., Castelein, P., Németh, O., Van Peteghem, C. & De Meulenaer, B. (2008a). Impact of the reducing sugars on the relationship between acrylamide and Maillard browning in French fries. *European Food Research and Technology*, **227**, 69-76.
- Mestdagh, F., De Wilde, T., Fraselle, S., Govaert, Y., Ooghe, W., Degroodt, J.-M., Verhé, R., Van Peteghem, C. & De Meulenaer, B. (2008b). Optimization of the blanching process to reduce acrylamide in fried potatoes. *LWT-food science and technology*, **41**, 1648-1654.
- Morales, F., Capuano, E. & Fogliano, V. (2008). Mitigation strategies to reduce acrylamide formation in fried potato products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1126**, 89-100.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L. & Dodson, A. T. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, **419**, 448-449.
- Palazoğlu, T. K., Savran, D. & Gökmen, V. (2010). Effect of cooking method (baking compared with frying) on acrylamide level of potato chips. *Journal of Food Science*, **75**, E25-E29.
- Pedreschi, F., Granby, K. & Risum, J. (2010). Acrylamide mitigation in potato chips by using NaCl. *Food and Bioprocess Technology*, **3**, 917-921.
- Pedreschi, F., Kaack, K. & Granby, K. (2008). The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food chemistry*, **109**, 386-392.
- Pedreschi, F., Mariotti, S., Granby, K. & Risum, J. (2011). Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *LWT-food science and technology*, **44**, 1473-1476.
- Romani, S., Bacchiocca, M., Rocculi, P. & Dalla Rosa, M. (2009). Influence of frying conditions on acrylamide content and other quality characteristics of French fries. *Journal of Food Composition and Analysis*, **22**, 582-588.
- Rottmann, E., Hauke, K. F., Krings, U. & Berger, R. G. (2020). Enzymatic acrylamide mitigation in French fries—An industrial-scale case study. *Food Control*, 107739.

- Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L. & Törnqvist, M. (2003). Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of agricultural and food chemistry*, **51**, 7012-7018.
- Sangster, J. (1989). Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **18**, 1111-1229.
- Schabacker, J., Schwend, T. & Wink, M. (2004). Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a Caco-2 gut model. *Journal of agricultural and food chemistry*, **52**, 4021-4025.
- Schieberle, P., Köhler, P. & Granvogl, M. (2005). New aspects on the formation and analysis of acrylamide. In: Chemistry and safety of acrylamide in food. Pp. 205-222. Springer.
- Schumacher, J. N., Green, C. R., Best, F. W. & Newell, M. P. (1977). Smoke composition. An extensive investigation of the water-soluble portion of cigarette smoke. *Journal of agricultural and food chemistry*, **25**, 310-320.
- Shahidi, F. & Ho, C. (2005). Phenolic compounds in foods and natural health products. American Chemical Society.
- Spencer, P. S. & Schaumburg, H. H. (1974). A review of acrylamide neurotoxicity Part I. Properties, uses and human exposure. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, **1**, 143-150.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M.-C. & Riediker, S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, **419**, 449-450.
- Stofftdatenbank, G. (2020). [www.dguv.de](http://www.dguv.de).
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Törnqvist, M. (2000). Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chemical research in toxicology*, **13**, 517-522.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of agricultural and food chemistry*, **50**, 4998-5006.
- Törnqvist, M. (2002). Information on acrylamide in food.
- Törnqvist, M. & Landin, H. H. (1995). Hemoglobin adducts for in vivo dose monitoring and cancer risk estimation. *Journal of occupational and environmental medicine*, **37**, 1077-1085.
- Totlani, V. M. & Peterson, D. G. (2006). Epicatechin carbonyl-trapping reactions in aqueous Maillard systems: identification and structural elucidation. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**, 7311-7318.
- transGEN (2019). Doppeltes Spiel bei Gentechnik-Pflanzen: Jede Menge Import-Zulassungen, aber Anbau bleibt tabu. [www.transgen.de](http://www.transgen.de).
- Urbančič, S., Kolar, M. H., Dimitrijević, D., Demšar, L. & Vidrih, R. (2014). Stabilisation of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato with rosemary extract during deep-fat frying. *LWT-food science and technology*, **57**, 671-678.
- Van Nguyen, C. (2006). Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Molecular nutrition & food research*, **50**, 1140-1149.
- Vinci, R. M., Mestdagh, F. & De Meulenaer, B. (2012). Acrylamide formation in fried potato products—Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food chemistry*, **133**, 1138-1154.
- Wang-Pruski, G. & Nowak, J. (2004). Potato after-cooking darkening. *American Journal of Potato Research*, **81**, 7-16.
- Wedzicha, B. L., Mottram, D. S., Elmore, J. S., Koutsidis, G. & Dodson, A. T. (2005). Kinetic models as a route to control acrylamide formation in food. In: Chemistry and safety of acrylamide in food. Pp. 235-253. Springer.
- Weideborg, M., Vik, E. & Kallqvist, T. (1998). Practical Results and Monitoring Data. Acrylamide and Methylolacrylamide Used in a Chemical Grouting Agent in one

- Norwegian Tunnel Construction Project (Romeriksporten). Report to SFT (May, 1998). Aquateam, Oslo, Norway.
- Weißhaar, R. (2011). Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **113**, 304-308.
- Wenzl, T. & Anklam, E. (2007). European Union database of acrylamide levels in food: update and critical review of data collection. *Food additives and contaminants*, **24**, 5-12.
- Wernsing Feinkost GmbH (2020). Process parameters for French fries.
- Xingyu, W., Xueqing, Z., Wei, J. & Yaru, G. (2019). Synthesis of Esters via Sodium Carbonate Promoted Oxa-Michael Addition of Acids to alpha, beta-Unsaturated Ketones. *CHINESE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY*, **39**, 1383-1395.
- Xu, F., Oruna-Concha, M.-J. & Elmore, J. S. (2016). The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food chemistry*, **210**, 163-171.
- Xu, X. & An, X. (2016). Study on acrylamide inhibitory mechanism in Maillard model reaction: Effect of p-coumaric acid. *Food Research International*, **84**, 9-17.
- Yu, S., Chen, Z., Meng, H. & Chen, M. (2020). Addition of lipophilic grape seed proanthocyanidin effectively reduces acrylamide formation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **100**, 1213-1219.
- Yuan, Y., Qi, M., Liu, H. & Yan, H. (2019). Study of acrylamide mitigation in model systems and potato crisps: effect of rosmarinic acid. *International Journal of Food Science & Technology*, **54**, 2700-2710.
- Zhang, Y. & Zhang, Y. (2007). Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge. *Critical reviews in food science and nutrition*, **47**, 521-542.
- Zhu, F., Cai, Y. Z., Ke, J. & Corke, H. (2010). Compositions of phenolic compounds, amino acids and reducing sugars in commercial potato varieties and their effects on acrylamide formation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 2254-2262.
- Zödl, B., Schmid, D., Wassler, G., Gundacker, C., Leibetseder, V., Thalhammer, T. & Ekmekcioglu, C. (2007). Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicology*, **232**, 99-108.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A. & Rizzi, G. P. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, **51**, 4782-4787.

### 8. Lebenslauf

#### PERSÖNLICHE DATEN

---

Eric Rottmann

17.02.1993 in Nienburg (Weser)

#### SCHULBILDUNG

---

08/1999 – 07/2003	Grundschule:	Bücken
08/2003 – 07/2004	Orientierungsstufe:	Hoya
08/2004 – 06/2011	Gymnasium:	Johann-Beckmann-Gymnasium, Hoya Abschluss: Abitur Prüfungsfächer: Chemie, Biologie, Mathematik, Deutsch, Geschichte

#### WEITERER WERDEGANG

---

07/2011 – 09/2012	Freiwilliges Soziales Jahr:	Rettungssanitäter, Deutsches Rotes Kreuz Region Hannover, Burgwedel
10/2012 – 04/2017	Studium:	1. Staatsexamen in Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, Hamburg Diplomarbeit: "Spargel-Monitoring: Untersuchungen zur Authentizitätsprüfung von Spargel mittels NMR-Spektroskopie"
05/2017 – 02/2021	Promotionsstudium:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover, Hannover
11/2017 – heute		Promotionsvorhaben
03/2021 – heute	Arbeitsverhältnis:	Technologist Symrise AG Holzminden

### 9. Publikationsliste

#### Peer-reviewed Paper:

- Klare, J., Rurik, M., Rottmann, E., Bollen, A., Kohlbacher, O., Fischer, M., & Hackl, T. (2020). Determination of the Geographical Origin of *Asparagus officinalis* L. by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(49), 14353-14363
- Rottmann, E., Hauke, K. F., Krings, U., & Berger, R. G. (2020). Enzymatic acrylamide mitigation in French fries – An industrial-scale case study. *Food Control*, 123, 107739.
- Rottmann, E., Volkmann, K., Fohrer, J., Krings, U., & Berger, R. G. (2021). Phenylacrylic acids addition to potato and sweet potato showed no impact on acrylamide concentration via oxa-Michael-addition during frying. *Current Research in Food Science*, accepted 08.04.2021.

#### Poster:

- Rottmann, E., Berger, R. G, Agro-industrielle Nebenströme als Substrate zur Gewinnung lebensmitteltechnologischer nutzbarer Enzyme, 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, Deutschland.
- Große, M., Krahe, N.-K., Rottmann, E., Berger, R. G, Cultivation of Enzyme Secreting Higher Fungi on Side Streams of the Food Processing Industries, 2018, 9th International Congress on Biocatalysis, Biocat, Hamburg, Deutschland.

Patente:

- Mussmann, N., Wieland, S., Prueser, I., Van Lier, M., Degering, C., Berger, R.G., Rottmann, E., 2020, Laccase-containing detergent having improved cleaning power WO/2020/002187, DE102018210570, PCT/EP2019/066589