

**Aromastoffprofile und Lagerstabilität technologisch
modifizierter Lebensmittel**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-LMChem. Sabrina Schindler

geboren am 26.11.1982 in Trier

2011

Referent: Prof. Dr. Dr. R. G. Berger

Korreferent: PD Dr. U. Krings

Tag der Promotion: 01.04.2011

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Unterlagen oder Arbeiten dem Sinn oder Wortlaut entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, den 01.04.2011

Sabrina Schindler

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des interessanten Arbeitsthemas, für die wissenschaftliche Betreuung, die hilfsbereite Unterstützung sowie die stete Diskussionsbereitschaft. Außerdem bedanke ich mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut und die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Desweiteren danke ich Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft während der gesamten Promotion. Seine geduldigen Erklärungen und wertvollen Tipps waren eine wesentliche Voraussetzung für das erfolgreiche Gelingen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem allen, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützten:

- dem FEI (Projekt AiF 15045 N) sowie dem BMBF (Projekt 0330796B) für die finanzielle Unterstützung meiner Projekte.
- den Mitarbeitern des Verbundprojektes Odour-Control für die gemeinsam durchgeführten Messkampagnen und die gute Zusammenarbeit
- Herrn Dr. Peter Eisner und Herrn Jürgen Bez für die Herstellung der Leguminosenproteinpräparate sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Werner Back und Herrn Dr. Björn Klotzbücher für die Planung und Durchführung der Fermentationen mit Milchsäurebakterien
- Prof. Dr. Vibeke Orlien für die Hochdruckbehandlung der Fleischproben sowie die gemeinsame Zusammenarbeit
- Dr. Kateryna Zelena und Carmen Theobald für die vielen vor dem GC-O verbrachten Stunden

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für das freundschaftliche Verhältnis, die hilfsbereite Zusammenarbeit und ihre stete Gesprächsbereitschaft. Insbesondere meinen beiden Mitstreitern Silke Schimanski und Max Wittig danke ich sehr herzlich für die vielen gemeinsam verbrachten langen Stunden im Labor und im Büro und ihre stets aufmunternden Worte.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Helga und Helmut Schindler sowie meinem Mann Alexander für ihr geduldiges Zuhören, ihr Vertrauen und die liebevolle Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juli 2007 bis Januar 2011 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens „Sensorisch verbesserte, technofunktionelle Proteinpräparate aus Leguminosenmehlen durch Fermentation mit Milchsäurebakterien“, gefördert vom Forschungskreis der Ernährungsindustrie (Projekt AiF 15045 N), durchgeführt.

Teile dieser Dissertation wurden in international anerkannten Zeitschriften publiziert, sowie in Form von Vorträgen und Postern veröffentlicht.

Veröffentlichungen

1. Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G., Orlin, V. (2010): Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated. *Meat Science*, 86(2), 317-323
2. Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G. (2010): Modified Adsorbents for Analytical and Industrial Applications. Eds. B. Niemeyer, R. G. Berger, K. Krüger, G. Matz, R. Otterpohl, R. Stegmann. *Stuttgart: Verlag Abfall aktuell, Hamburger Berichte 36*
3. Krings, U., Grimrath, A., Linke, D., Schindler, S., Berger, R. G. (2011): Volatiles Responsible for the Seasoning-like Flavour of Cell Cultures of *Laetiporus Sulphureus*. *Flavour and Fragrance Journal*, in press
4. Schindler, S., Wittig, M., Zelena, K., Krings, U., Bez, J., Eisner, P., Berger, R. G. (2011): Lactic fermentation to improve the aroma of protein isolates of sweet lupin (*Lupinus angustifolius*). *Food Chemistry*, in press

Poster

5. Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G. (2009): Trace analysis of odour-active compounds in gas samples containing high levels of water. *Achema, Frankfurt, Germany*
6. Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G. (2009): Spurenanalytik geruchsaktiver Substanzen aus wasserreichen Gasproben. *Statusseminar Odour-Control, Hamburg, Germany*
7. Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G. (2010): Beurteilung von Adsorbentien für analytische und technische Anwendungen. *Abschlussseminar Odour-Control, Hamburg, Germany*
8. Grimrath, A., Krings, U., Linke, D., Schindler, S., Berger, R. G. (2010): Formation of Sotolon – Enzyme Catalysis or Chemical Reaction?. *9th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, Eisenach, Germany*

Präsentationen

9. Schindler, S., Bez, J., Krings, U., Berger, R. G. (2008). Analytik technofunktioneller Proteinpräparate aus Leguminosenmehlen. *Lebensmittelchemie*, 62, 149.
10. Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G., Maurer, K.-H. (2009). Neue Aspekte der Spurenanalytik geruchsaktiver Substanzen aus wasserreichen Gasproben. *Statusseminar Odour-Control, Hamburg, Germany*
11. Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G. (2010): Beurteilung von Adsorbentien für analytische und technische Anwendungen. *Abschlussseminar Odour-Control, Hamburg, Germany*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Leguminosen als Proteinquelle	3
1.1.1	Lupinen (<i>Lupinus</i>) und Erbsen (<i>Pisum sativum</i>): Alternative zu Soja	4
1.1.2	Ernährungsphysiologische Eigenschaften von Leguminosenprotein-extrakten	6
1.1.3	Funktionelle Eigenschaften von Proteinen	9
1.2	Methoden der Haltbarmachung von Fleisch, Hochdruckbehandlung	10
1.2.1	Klassische Methoden der Haltbarmachung von Fleisch	10
1.2.2	Entwicklung der Hochdruckbehandlung	11
1.2.3	Aufbau und Prinzipien der Hochdruckbehandlung	13
1.2.4	Auswirkungen von hohem Druck auf biologische Matrices	14
1.2.5	Auswirkungen von hohem Druck auf Fleisch	16
1.3	Mögliche Wege des Lebensmittelverderbs	18
1.3.1	Verderb von Lebensmitteln	18
1.3.2	Oxidativer Fettsäureabbau und Bildung von Hexanal	21
1.4	Aromastoffprofile von Lebensmitteln	24
1.4.1	Methoden der Aromastoffanalytik	24
1.4.2	Aromastoffe in Leguminosen	25
1.4.3	Aromastoffe in rohem Hähnchen- und Rindfleisch	26
1.5	Zielsetzung	27
2	Lactic fermentation to improve the aroma of protein extracts of sweet lupin (<i>Lupinus angustifolius</i>)	29
2.1	Abstract	29
2.2	Introduction	29
2.3	Materials and methods	31
2.3.1	Preparation of lupin protein extracts	31
2.3.1.1	Process description	31
2.3.2	Storage stability of fermented lupin protein extracts	31
2.3.2.1	Strain selection	31
2.3.2.2	Comparison of storage stability of lupin protein extracts	32
2.3.3	Chemical characterization of lupin protein extracts	32

2.3.3.1	Dry matter and ash content	32
2.3.3.2	Lipid content and fatty acid composition	32
2.3.3.3	Protein content and amino acid composition	33
2.3.4	Sampling and analysis of volatile compounds	34
2.3.4.1	TDS-GC-O Flavor dilution analysis	35
2.3.4.2	Preparative gas chromatography	35
2.4	Results and discussion	36
2.5	Acknowledgement	46
3	Improvement of the Aroma of Pea (<i>Pisum sativum</i>) Protein Extracts by Lactic Acid Fermentation	47
3.1	Abstract	47
3.2	Introduction	48
3.3	Materials and methods	49
3.3.1	Preparation of pea protein extracts	49
3.3.2	Process description	49
3.3.3	Storage stability of fermented pea protein extracts	50
3.3.3.1	Strain selection	50
3.3.3.2	Comparison of storage stability of pea protein extracts	50
3.3.4	Chemical characterization of pea protein extracts	50
3.3.4.1	Dry matter and ash content	50
3.3.4.2	Lipid content and fatty acid composition	50
3.3.4.3	Protein content and amino acid composition	51
3.3.5	Sampling and analysis of volatile compounds	52
3.3.5.1	TDS-GC-O Flavor dilution analysis	53
3.4	Results and discussion	54
3.5	Acknowledgement	68
4	Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated.	69
4.1	Abstract	69
4.2	Introduction	70
4.3	Materials and methods	71
4.3.1	Preparation of meat samples	71
4.3.2	Characterisation of meat	71

4.3.3	High pressure and thermal processing	71
4.3.4	Storage of meat	72
4.3.5	Measurement of lipid oxidation	72
4.3.6	Measurement of aroma compounds	73
4.4	Results and Discussion	74
4.4.1	Lipid oxidation	75
4.4.2	Volatiles	77
4.5	Conclusion	83
5	Zusammenfassung	85
6	Summary	87
7	Literaturverzeichnis	88
8	Lebenslauf	114

Abkürzungsverzeichnis

AEDA	Aromaextraktverdünnungsanalyse <i>(abgeleitet von engl.: aroma extract dilution analysis)</i>
amu	atomare Masseneinheit <i>(abgeleitet von engl.: atomic mass unit)</i>
ATPase	Adenosintri-phosphatase
a _w -Wert	Wasseraktivität
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CIS	Kaltaufgabesystem <i>(abgeleitet von engl.: Cooled Injection System)</i>
EI	Elektronenstoß-Ionisation <i>(abgeleitet von engl.: Electron Impact)</i>
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
FAME	Fettsäuremethylester <i>(abgeleitet von engl.: Fatty acid methyl ester)</i>
FD	Aromaverdünnung <i>(abgeleitet von engl.: Flavor dilution)</i>
FDA	Aromaverdünnungsanalyse <i>(abgeleitet von engl.: Flavor dilution analysis)</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²

g	Gramm
GC	Gaschromatograph
GC-FID	Gaschromatograph gekoppelt mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
GC-O	Gaschromatographie mit olfaktometrischer Detektion
h	Stunde(n)
ha	Hektar
HELP	elektrische Hochspannungsimpulse <i>(abgeleitet von engl.: high intensity electric field pulses)</i>
k	Kilo
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
L	Liter
LOX	Lipoxygenase
LPE	Lupinenproteinextrakt
LPEF	Lupinenproteinextrakt, fermentiert
LPEP	Lupinenproteinextrakt, pasteurisiert
m	Meter
m	Milli
M	molar
μ	Mikro
min	Minute
MP	Milchprotein
MPa	Megapascal

MS	Massenspektrometer
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäure <i>(abgeleitet von engl.: monounsaturated fatty acid)</i>
n	Anzahl der Messwerte
n	Nano
N	normal
n. d.	nicht detektiert
NL	Normliter
O	Geruchseindruck <i>(abgeleitet von engl.: Odor impression)</i>
ODP	Olfactory Detection Port
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
ppb	Teile pro Milliarde <i>(abgeleitet von engl.: parts per billion)</i>
PPE	Erbsenproteinextrakt <i>(abgeleitet von engl.: pea protein extract)</i>
PPEF	Erbsenproteinextrakt, fermentiert
PPEP	Erbsenproteinextrakt, pasteurisiert
ppt	Teile pro Billion <i>(abgeleitet von engl.: parts per trillion)</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure <i>(abgeleitet von engl.: polyunsaturated fatty acid)</i>

R•	Alkylradikal
RI	Linearer Retentionsindex
RO•	Alkoxyradikal
ROO•	Peroxyradikal
ROOH	Hydroperoxid
rpm	Umdrehungen pro Minute <i>(abgeleitet von engl.: revolutions per minute)</i>
s	Sekunde
S	Standard
SPME	Festphasenmikroextraktion <i>(abgeleitet von engl.: solid phase mikro extraction)</i>
T	Temperatur
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen <i>(abgeleitet von engl.: Thiobarbituric acid reactive substances)</i>
TDS	Thermodesorptionssystem
% (w/w)	Massenprozent
WOF	warmed-over flavour

1 Einleitung

Das zunehmende Ernährungsbewusstsein der Verbraucher in den Industrienationen und der Wunsch nach „gesunden“ Lebensmitteln, das stetige Aufeinandertreffen verschiedener Kulturen und Religionen weltweit sowie begrenzte Ressourcen führen zu kontinuierlich steigenden Anforderungen an die Funktionen und die Qualität von Lebensmitteln. Sie sollen ernährungsphysiologisch wertvoll sein und in ihren Eigenschaften dem aktuellen Gesundheitstrend folgen. Auch eine hohe Lagerstabilität, ökologische und ökonomische Aspekte sowie die Naturbelassenheit der Lebensmittel müssen berücksichtigt werden.

Eine große Rolle spielt zudem der Genusswert, d. h. alle vom Verbraucher sensorisch wahrnehmbaren Eigenschaften. Neben einem optisch ansprechenden Äußeren tragen auch die Akustik eines Lebensmittels beim Verzehr, dessen haptische Wahrnehmung sowie Geschmack und Geruch zum Genusswert bei (von Koerber et al., 2004).

Global gesehen können sich die Bedürfnisse der Verbraucher abhängig von ihrer Region und Kultur sowie ihres sozialen Status stark voneinander unterscheiden. Auch religiöse Aspekte sind bei der Art und Zubereitung der Lebensmittel oft von Bedeutung. Mit Hilfe chemischer, biologischer, biotischer, physikalischer, biochemischer oder technischer Verfahrensschritte bei der Produktion und Verarbeitung der Lebensmittel können diese an den jeweiligen Bedarf der Konsumenten angepasst werden (Fleischer, 2004).

Neben der Herstellung von functional food, diätetischer oder mit Nährstoffen supplementierter Lebensmittel stehen Haltbarkeit, Qualitätsverbesserung und Kosteneffizienz im Vordergrund der Interessen von Industrie und Verbrauchern. Begrenzte Ressourcen und aufwendiger Anbau schränken beispielsweise die industrielle Verwendung verschiedener Früchte und Gewürze aus wirtschaftlichen Gründen stark ein. Die chemische oder biotechnologische Synthese von Aromastoffen, wie zum Beispiel die des Vanillins 1874 (Tiemann & Haarmann, 1874), stellt eine kostengünstige Alternative zu den durch Extraktion und Aufreinigung aus den jeweiligen Früchten und Gewürzen gewonnenen Aromastoffen dar und macht diese für alle verfügbar.

Durch entsprechende technologische Modifikationen der Lebensmittel erschließt sich zudem ein breites Spektrum an neuen Anwendungsmöglichkeiten. So kann zum

Beispiel Stärke physikalisch oder chemisch derart verändert werden, dass die Quellfähigkeit, Hitzestabilität, Viskosität oder die Fähigkeit zur Gelbildung beeinflusst wird. Auch Proteine können durch chemische Prozesse dahingehend modifiziert werden, dass ihre Löslichkeit erhöht oder verringert, Aminosäureverluste während der Verarbeitung vermindert, die biologische Wertigkeit erhöht oder unerwünschte Aminosäuren entfernt werden. So kann beispielsweise Phenylalanin, welches eine Rolle in verschiedenen Stoffwechselerkrankungen (Phenylketonurie, Alkaptonurie) spielt, durch Pepsin-Hydrolyse des Proteins und anschließender Freisetzung durch Pronase aus dem entsprechenden Peptid entfernt werden. Die nahezu phenylalaninfreien Peptidreste werden durch Gelchromatographie abgetrennt und ggf. zur Erhöhung der biologischen Wertigkeit einer Plasteinreaktion unterworfen (Belitz et al., 2007).

Durch geeignete chemische Modifikationen kann zudem das Aroma von Proteinpräparaten beeinflusst werden. Aromafehler durch Methioninbildung können beispielsweise durch eine kovalente Bindung von Methionin in Proteinen vermieden werden. Auch eine Entbitterung oder die Erzeugung fleischbrühartigen Geschmacks kann durch chemische Behandlung erfolgen, ebenso wie durch physikalische Prozesse eine Texturierung globulärer Proteine möglich ist (RÖMPP Online, 2010). Technologisch derartig modifizierte Biopolymere können vielfältig in Lebensmitteln eingesetzt werden, z. B. als Dickungs- und Bindemittel, als Schutzüberzüge oder zum Einkapseln von Aromen, zur Bildung und Stabilisierung von Schäumen oder als Emulgatoren (Belitz et al., 2007; Pour-El, 1981). Eine neue Methode zur Modifikation von Lebensmitteln ist die Behandlung mit Hochdruck, die durch Abtötung von Mikroorganismen zur Verlängerung der Haltbarkeit beiträgt.

Diese Arbeit befasst sich mit ausgewählten Lebensmitteln, die zur Verbesserung der Haltbarkeit sowie ihrer sensorischen Eigenschaften technologisch modifiziert wurden. Aromaveränderungen im behandelten Produkt sollten durch Vergleich der Aromaprofile der jeweiligen Rohstoffe dokumentiert werden. Des Weiteren sollte die Lagerstabilität der entsprechenden Lebensmittel anhand der Bildung von *n*-Hexanal, einem Marker für den Fettsäureabbau, überprüft werden.

1.1 Leguminosen als Proteinquelle

Die Familie der Leguminosen oder Hülsenfrüchtler (Fabaceae, alt: Leguminosae) umfasst weltweit ungefähr 730 Gattungen mit mehr als 19000 Spezies (Lewis, 2005). Auf Grund ihres hohen Proteingehalts (> 20%) sind die ballaststoffreichen Früchte und Samen der Leguminosen ein wichtiger Bestandteil der menschlichen und tierischen Ernährung. Insbesondere in Entwicklungsländern sind Hülsenfrüchte für eine ausreichende Versorgung der Bevölkerung mit Eiweiß eine unabdingbare Proteinquelle.

Einige Leguminosenarten, wie zum Beispiel Sojabohnen (*Glycine max* L. Merr.) oder Erdnüsse (*Arachis hypogaea* L.), zeichnen sich zudem auch durch hohe Fett- und Ölgehalte aus (RÖMPP Online, 2010).

Viele Fabaceaeen besitzen außerdem pharmakologisch aktive Substanzen und finden Verwendung als Heilpflanze. So wird zum Beispiel Kudzu (*Pueraria lobata*) seit Jahrhunderten in der traditionellen chinesischen Medizin unter anderem als Antipyretikum, Antiemetikum, Diaphoretikum oder zur Behandlung alkoholbedingter Erkrankungen angewendet (Keung & Vallee, 1998). Die pharmakologische

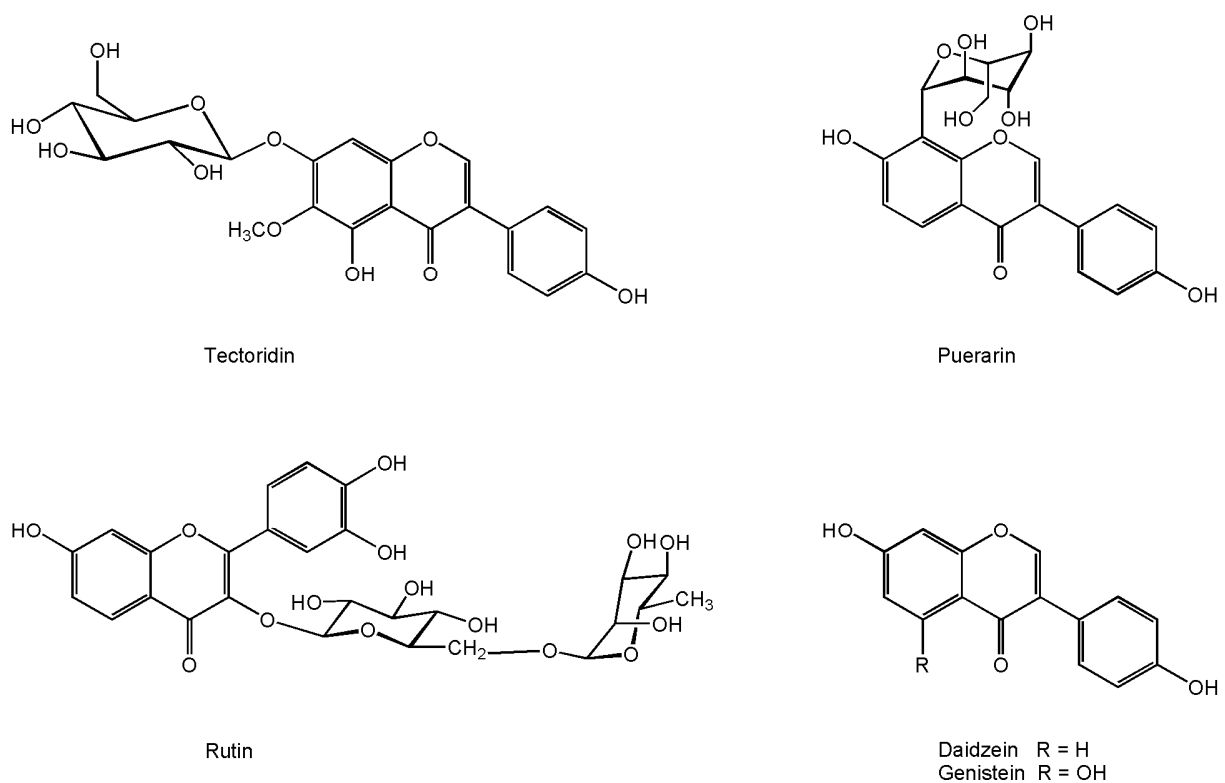


Abbildung 1: Strukturformeln einiger Flavonoide aus Leguminosen: Tectoridin, Puerarin, Rutin, Daidzein und Genistein

Wirksamkeit von *Pueraria lobata* kann möglicherweise auf verschiedene Flavone und Isoflavone zurückgeführt werden, darunter Tectoridin (Xiong et al.), Puerarin, Rutin oder Daidzein (Chen et al., 2001) (Abbildung 1). Soja oder Erdnüsse weisen ebenfalls pharmakologisch aktive Polyphenole auf. So enthalten Erdnüsse das Phytoalexin Resveratrol (Abbildung 2), dem eine kardioprotektive Wirkung nachgesagt wird. In Soja wurden große Mengen der Phytoestrogene Daidzein und Genistein (Abbildung 1) nachgewiesen. (RÖMPP Online, 2010).

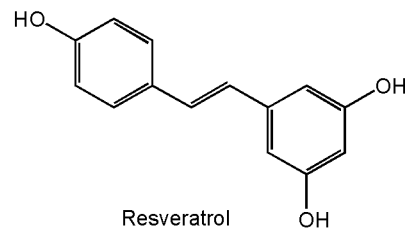


Abbildung 2: Strukturformel des Phytoalexins Resveratrol

Auf Grund der vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten der Hülsenfrüchtler als ballaststoff- und proteinreiche Lebensmittel, als Viehfutter oder als Heilpflanzen sowie ihrer globalen Verbreitung in gemäßigten Breiten und tropischen Regionen haben Leguminosen ein hohes ökonomisches Potenzial. Neben den Gräsern (Poaceae) gehören sie zu den wirtschaftlich wichtigsten Pflanzenfamilien weltweit (Wojciechowski et al., 2004). Mit einer Weltproduktion von mehr als 200 Megatonnen pro Jahr und einem Marktanteil von annähernd 80% kommt der Sojabohne innerhalb der Familie der Hülsenfrüchtler die größte wirtschaftliche Bedeutung zu, gefolgt von Bohnen, Erbsen und Kichererbsen (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009).

1.1.1 Lupinen (*Lupinus*) und Erbsen (*Pisum sativum*): Alternative zu Soja

Als wirtschaftlich bedeutendste Leguminose ist die Sojabohne mit einem Ölgehalt von 17-22% und einem Proteingehalt von über 40% eine der wichtigsten pflanzlichen Quellen für Öl und Eiweiß (Belitz et al., 2007; RÖMPP Online, 2010).

Sojaöl ist reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und zeichnet sich durch hohe Gehalte an Linol- (48-59%) und Linolensäure (4,5-11%) aus (Leitsätze für

Speisefette und Speiseöle, 2001). Neben Raps- und Palmöl hat es unter den Pflanzenölen weltweit die größte Relevanz und wird außer zu Ernährungszwecken auch in der Lackindustrie verwendet (Damude & Kinney, 2008; RÖMPP Online, 2010).

Das hochwertige Sojaprotein wird als wichtige Eiweißquelle in der menschlichen Ernährung und als Viehfutter genutzt. In Lebensmitteln kann es auf vielfältige Art und Weise eingesetzt werden, z. B. zur Verbesserung der Verarbeitungsqualität, zur Herstellung texturierter Proteine oder zur Erhöhung des Proteingehalts respektive der Anreicherung von Lebensmitteln mit bestimmten Aminosäuren. Zudem wird Sojaprotein industriell auch in Klebstoffen, Farben, Fasern oder als Schaumstabilisator eingesetzt (Friedman & Brandon, 2001; RÖMPP Online, 2010).

Im asiatischen Raum wird die Sojabohne schon seit mehreren tausend Jahren kultiviert und ist dort fester Bestandteil der Ernährung. Die asiatische Küche kennt eine Vielzahl von Sojaprodukten, die als solche oder auch fermentiert verwendet werden, wie zum Beispiel Sojasauce, Sojamilch, Tofu, Tempeh oder Miso. Auch in Europa steigt die Nachfrage auf Grund der vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten von Soja sowie eines steigenden Ernährungsbewusstseins der Verbraucher kontinuierlich an. So werden Sojaprodukte beispielsweise häufig als Milch- oder Fleischersatz in der veganen und vegetarischen Ernährung eingesetzt. Zudem werden Soja viele ernährungsphysiologisch positive Eigenschaften zugeschrieben, wie zum Beispiel die Absenkung des Plasma-Cholesterolspiegels, Schutz vor Darm- und Nierenerkrankungen sowie zur Vorbeugung gegen verschiedene Krebserkrankungen, koronare Herzkrankheiten, Diabetes und Fettleibigkeit (Friedman & Brandon, 2001; Hoogenkamp, 2005).

Obwohl Soja eine subtropische Pflanze ist, kann sie auch in anderen Klimazonen wachsen, so dass die Anbauggebiete von den tropischen Regionen bis zu 52° nördlicher Breite in die gemäßigten Zonen hineinreichen können (Acquaah, 2007). Hauptexporteure für Soja sind die USA, Brasilien und Argentinien, die über 80% der weltweit angebauten Soja produzieren. Deutschland gehört neben China, Japan und den Niederlanden zu den Hauptimporteuren von Sojabohnen (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009). Als zunehmend problematisch stellt sich der weltweite Anbau gentechnisch veränderter Sorten dar. Insbesondere in den Hauptexportländern machen die herbizidresistenten Sojabohnen inzwischen in großen Gebieten einen Anteil von mehr als 90% der dort kultivierten Sorten aus. Auf

Grund vorherrschender Gesetze ist der Import gentechnisch veränderter Organismen in die Europäische Union schwierig und erfordert lange Zulassungsverfahren. Zudem führt auch die Nulltoleranzgrenze für Produkte, die mit in der EU nicht zugelassenen Sorten verunreinigt sind, dazu, dass diese nicht eingeführt werden dürfen. Hierdurch kommt es unter anderem zu Engpässen und Verteuerungen in der Futter- und Lebensmittelindustrie, die auf die Importe angewiesen sind (RÖMPP Online, 2010).

Eine mögliche Alternative zu Soja als Proteinquelle stellen Lupinen (*Lupinus*) und Erbsen (*Pisum sativum*) dar, deren gentechnisch veränderte Sorten bisher noch nicht kommerziell verwendet werden. Der durchschnittliche Proteingehalt von Lupinen liegt zwischen 30 und 40%, der von Erbsen bei über 20%. Die Aminosäurezusammensetzung ist bei beiden Leguminosen vergleichbar mit der von Soja (Cerletti & Duranti, 1979; Fuhrmeister, 2001; Petterson, 1998). Ähnlich wie bei Sojaprotein konnten auch für Lupinen- und Erbsenprotein in Tierversuchen positive Eigenschaften festgestellt werden, wie zum Beispiel die Reduktion des Triglyceridgehaltes in der Leber und im Plasma, die Absenkung des Cholesterolspiegels sowie Schutz vor der Entwicklung von Atherosklerose (Marchesi et al., 2008; Spielmann et al., 2007). Zudem gedeihen Erbsen und Lupinen in Gebieten, in denen die Sojabohne auf Grund klimatischer Verhältnisse nicht oder nur begrenzt wachsen kann. Erbsen können beispielsweise wegen ihrer relativ kurzen Vegetationszeit auch in Skandinavien noch angebaut werden, so dass eine regionale Eigenversorgung möglich wäre (Cerletti & Duranti, 1979; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009). In den letzten Jahren wurden daher als Alternative zu Soja auch Lupinen- oder Erbsenproteine in der Lebensmittelindustrie verwendet.

1.1.2 Ernährungsphysiologische Eigenschaften von Leguminosenproteinextrakten

Aus ernährungsphysiologischer Sicht zeichnen sich Leguminosenproteine insbesondere durch einen hohen Lysingehalt aus, sind jedoch durch geringe Gehalte an Cystein und Methionin limitiert. Die Aminosäurezusammensetzung der Leguminosen (Tabelle 1) eignet sich im Besonderen zu einer Supplementierung von Getreideprodukten, da Getreide vergleichsweise niedrige Lysingehalte, jedoch etwas

höhere Gehalte schwefelhaltiger Aminosäuren aufweist (Friedman & Brandon, 2001; Swanson, 1990).

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung wichtiger Körnerleguminosen [g/100 g Protein]

Aminosäure	Sojabohne	Kichererbse	Augenbohne	Linse	Grüne Erbse
Alanin	4,7	5,0	4,2	4,2	5,2
Arginin	8,8	8,3	7,5	7,8	7,2
Asparaginsäure	12,7	11,0	10,8	11,8	11,0
Cystin + Methionin	0,8	1,7	2,7	1,7	2,9
Glutaminsäure	22,1	17,3	17,2	21,5	17,5
Glycin	3,7	3,7	3,8	3,6	4,5
Histidin	2,6	3,0	3,1	2,2	2,4
Isoleucin	4,6	4,8	4,5	4,1	4,5
Leucin	7,9	8,7	7,7	7,8	7,4
Lysin	6,0	7,2	7,5	7,0	8,1
Phenylalanin+ Tyrosin	9,3	8,3	10,5	8,2	8,9
Prolin	4,6	3,8	4,0	3,5	3,8
Serin	4,2	3,7	4,5	5,2	5,1
Threonin	3,5	3,1	3,8	3,5	3,8
Valin	4,4	4,6	5,0	5,0	5,0

(nach Iqbal et al., 2006; Vasconcelos et al., 2006)

Im Hinblick auf den ernährungsphysiologischen Wert von Leguminosenproteinen müssen auch die in Leguminosen enthaltenen so genannten antinutritiven Substanzen oder Antinutritiva, erwähnt werden. Diese Substanzen sind biogene Stoffe, die im Primärstoffwechsel der Pflanzen keine essentielle Funktion ausüben, jedoch von den Pflanzen beispielsweise zur Abwehr von Schädlingen und Krankheiten gebildet werden (Aganga & Tshwenyane, 2003; Elmadfa & Leitzmann, 2004). Beim Verzehr können sie nachteilige Auswirkungen auf die Gesundheit haben, jedoch verändert sich seit einigen Jahren die Sichtweise dergestalt, dass auch die positiven Effekte, wie z. B. antioxidative Eigenschaften, immer mehr in den Fokus von Industrie und Verbrauchern rücken. Für Leguminosenproteinextrakte bekannte antinutritive Faktoren sind beispielsweise Phytinsäure, Lectine, Proteaseinhibitoren, Saponine und Tannine (Belitz et al., 2007; Petterson, 1998).

Phytinsäure (Inosithexaphosphorsäure) gilt generell als primäre Speicherform für Phosphat und Inositol in Pflanzensamen. Auf Grund ihrer komplexbildenden Eigenschaften bedingt durch die sechs reaktiven Phosphatgruppen im Molekül kann Phytinsäure zweiwertige Ionen, wie zum Beispiel Calcium, Magnesium, Zink oder Eisen binden und so deren Verfügbarkeit herabsetzen (Hídvégi & Lásztity, 2002; Petterson, 1998; Urbano et al., 2000). Hídvégi und Lásztity (2002) haben Phytinsäuregehalte von durchschnittlich 1,02 g/100 g in Erbsen, 1,38 g/100 g in Lupinen sowie 1,43 g/100 g in Lupinenproteinisolat nachgewiesen. Eine Verringerung der Phytinsäuregehalte kann beispielsweise durch Keimung (Dagnia et al., 1992) oder Fermentation (Fudiyansyah et al., 1995) erfolgen.

Lectine sind meist Glycoproteine, die spezifisch an Zellen, wie zum Beispiel Erythrocyten oder Epithelzellen des Darmkanals, binden und diese agglutinieren können (Elmadfa & Leitzmann, 2004). Die Toxizität kann sich innerhalb einer Pflanzenfamilie stark unterscheiden. So sind beispielsweise Lectine aus Erbsen ungiftig, während jene aus Soja und Lupine toxische Effekte beim Verzehr aufweisen. Eine Inaktivierung der Lectine kann durch Erhitzen erfolgen (Belitz et al., 2007; Rahman, 2000).

Die Gehalte an Proteaseinhibitoren sind sowohl bei Erbsen als auch bei Lupinen relativ gering (Leterme et al., 1990; Petterson, 1998). Die Inhibitoren aus beiden Leguminosen hemmen Trypsin und Chymotrypsin, wodurch die Absorption von Nahrungsproteinen im Körper herabgesetzt wird (Elmadfa & Leitzmann, 2004). Proteaseinhibitoren können in der Regel durch Hitze inaktiviert werden. Eine Absenkung der Aktivität gegenüber Trypsin kann zudem durch eine Verarbeitung der Leguminosen zu Proteinisolaten erreicht werden (Belitz et al., 2007).

In Leguminosenproteinextrakten ernährungsphysiologisch wenig relevant sind Saponine und Tannine. Saponine können hämolytisch aktiv sein, werden jedoch nur schlecht absorbiert (Belitz et al., 2007). Tannine können mit Proteinen Komplexe bilden, wodurch beispielsweise Enzymaktivitäten sowie die Verfügbarkeit von Proteinen und Aminosäuren verringert werden können (Salunkhe et al., 1982). Da sich Saponine und Tannine hauptsächlich in der Samenschale konzentrieren, können sie größtenteils durch Schälen entfernt werden (Belitz et al., 2007; Petterson, 1998).

Schlecht verdauliche Oligosaccharide wie Stachyose, Raffinose oder Verbascose sind ebenfalls relevante antinutritive Faktoren in Leguminosen. Sie werden durch die intestinale Mikroflora fermentiert, wobei große Mengen Kohlenstoffdioxid und

Wasserstoff entstehen. Bei der Herstellung von Proteinextrakten und –isolaten können die Flatulenz erzeugenden Antinutritiva beispielsweise durch Heißwasserextraktion und Behandlung mit alkoholischer Lösung von den Proteinen abgetrennt werden. Zudem kann eine Fermentation mit Milchsäurebakterien die Oligosaccharide fermentativ degradieren und somit zu einer deutlichen Verringerung der Oligosaccharidgehalte im Lebensmittel führen (Duszkiewicz-Reinhard et al., 1994; Rackis, 1981).

1.1.3 Funktionelle Eigenschaften von Proteinen

Die Funktionalität eines Lebensmittels kann definiert werden als jegliche Eigenschaft eines Lebensmittels oder eines Lebensmittelinhaltsstoffes, der seine Nutzung beeinflusst, mit Ausnahme seiner nutritiven Eigenschaften (Pour-El, 1981).

Proteine können beispielsweise die Löslichkeit und Viskosität eines Lebensmittels verändern und werden außerdem industriell als Fett- oder Wasserbinder oder zur Bindung von Aromastoffen eingesetzt. Zudem werden sie als Emulgatoren, Gelbildner sowie zur Schaumbildung beziehungsweise -stabilisierung oder zur Beeinflussung des *Mouthfeelings* genutzt. So spielen beispielsweise in Ei- oder Milchersatzprodukten meist die gel- oder schaubildenden Eigenschaften der Proteine eine Rolle, während sie in Fleischprodukten häufig auf Grund ihrer wasserbindenden Eigenschaften oder zur Verbesserung des *Mouthfeelings* eingesetzt werden (Kinsella, 1979; Pour-El, 1981; Wang & Kinsella, 1976; Yu et al., 2007).

Viele der genannten Eigenschaften sind abhängig von der Löslichkeit des jeweiligen Proteins. Die Löslichkeit unterliegt der Aminosäurezusammensetzung und damit auch der Anzahl polarer sowie apolarer Gruppen im Protein sowie dessen Konformation. Durch pH-Wert-Änderungen oder Änderungen der Salzkonzentration oder der Temperatur kann die Löslichkeit beeinflusst werden, so dass Proteine inzwischen einer Vielzahl von Lebensmitteln zugesetzt werden. (Inyang & Iduh, 1996; Kinsella, 1979).

Leguminosenproteine, insbesondere Proteine aus Soja, werden seit den 1970er Jahren intensiv beforscht (Wolf, 1976) und spielen heute bei der Lebensmittelherstellung und/oder –verarbeitung auf Grund ihrer hervorragenden technofunktionellen Eigenschaften eine wichtige Rolle. Sie werden zur Verbesserung des

Aussehens, der Textur sowie des Geschmacks oder Geruchs verwendet und beispielsweise in Getränken, Back- und Teigwaren, Desserts, Milch-, Ei- oder Fleischprodukten unter anderem auf Grund ihrer emulgierenden, schaumbildenden, wasserbindenden oder gelbildenden Eigenschaften eingesetzt (Kinsella, 1979). So verbessert zum Beispiel eine 1-2%ige Zugabe von Lupinenproteinisolat zu Frankfurter Würstchen die Verarbeitungseigenschaften ohne die Sensorik, Farbe oder Textur negativ zu beeinflussen (Alamanou et al., 1996).

1.2 Methoden der Haltbarmachung von Fleisch, Hochdruckbehandlung

1.2.1 Klassische Methoden der Haltbarmachung von Fleisch

Da rohes Fleisch leicht verderben und somit für den menschlichen Verzehr ungenießbar werden kann, müssen geeignete Maßnahmen ergriffen werden, um den Verderb zu verhindern oder zu verzögern. Hierbei sollen sowohl der Nährwert als auch der Genusswert möglichst wenig vom ursprünglichen Produkt abweichen. Der Verderb von Fleisch erfolgt überwiegend durch mikrobielle Kontamination, weshalb zur Konservierung verschiedene Techniken eingesetzt werden, die zu einer Wachstumshemmung oder Inaktivierung der Mikroorganismen führen und die Haltbarkeit des Produkts auf diese Weise erhöhen.

Eine deutliche Verringerung des Oberflächenkeimgehalts auf Fleisch lässt sich bereits durch eine strikte Einhaltung hygienischer Maßnahmen während der Schlachtung sowie einer anschließenden Dekontamination der Tierkörper durch Dampf, heißes Wasser, organische Säuren etc. erreichen (Leistner, 1997).

Um die weitere Vermehrung der Mikroorganismen zu verhindern oder zu verzögern, werden verschiedene physikalische, chemische, mikrobiologische oder biochemische Verfahren eingesetzt, die einen Einfluss auf bestimmte, für das Wachstum von Mikroorganismen relevante Faktoren haben. Übliche Methoden zur Haltbarmachung im Falle von Fleisch sind die Verringerung der Lagertemperatur durch Kühlen oder Einfrieren (t -Wert) sowie die Verringerung des Sauerstoffgehalts durch Vakuum oder Schutzatmosphäre (E_h -Wert). Weitere Möglichkeiten zur Verlängerung der Haltbarkeit von Fleisch und Fleischprodukten gehen meist mit einer Veränderung des Aromas einher. Neben einer Verringerung des a_w -Werts durch

Trocknen oder Salzen kann auch der pH-Wert variiert werden, das Lebensmittel erhitzt werden (F-Wert) oder eine Haltbarmachung durch Aufbau einer Konkurrenzflora (beispielsweise Milchsäurebakterien oder Edelschimmel) erfolgen. Auch das Zufügen von Konservierungsmitteln wie zum Beispiel Rauch oder Nitrit ist üblich (Leistner, 1997).

In den meisten Fällen ist die Anwendung eines einzelnen Parameters nicht ausreichend, um eine längerfristige mikrobiologische Stabilität eines Lebensmittels zu gewährleisten. Daher wird in der Regel zur Konservierung das so genannte Hürdenkonzept angewendet, d. h. die Kombination mehrerer der oben genannten Parameter. Durch die kumulative Wirkung der einzelnen Maßnahmen kann das mikrobiologische Wachstum eingeschränkt oder verhindert werden und somit eine längere Haltbarkeit erreicht werden (Leistner, 1992; Leistner & Gorris, 1995).

1.2.2 Entwicklung der Hochdruckbehandlung

Techniken zur Konservierung von Lebensmitteln sowie die Tatsache, dass eine Kombination mehrerer Faktoren sich kumulativ auf die Haltbarkeit auswirkt, sind schon seit Jahrhunderten bekannt. Bei vielen der klassischen Verfahren werden Mikroorganismen allerdings nicht abgetötet, sondern lediglich in ihrem Wachstum gehemmt. Zudem kommt es häufig zu Veränderungen von Geschmack, Aussehen und Nährwert der behandelten Lebensmittel. Der aktuelle Trend der Verbraucher geht jedoch hin zu frisch schmeckenden Lebensmitteln ohne Zusatz von Konservierungsstoffen, die gleichzeitig über eine hohe mikrobielle Sicherheit sowie eine lange Haltbarkeit verfügen und in der Zubereitung keine Unterschiede zu unbehandelten Lebensmitteln aufweisen.

Während in früheren Zeiten die Entwicklung geeigneter Methoden zur Konservierung eines Lebensmittels auf Versuch und Irrtum beruhten, können heute auf Grund fundierter Kenntnisse im naturwissenschaftlichen Bereich sowie moderner technischer Möglichkeiten gezielt neue Methoden zur Haltbarmachung entwickelt werden, die den aktuellen Ansprüchen von Industrie und Verbrauchern gerecht werden. Physikalische Methoden beruhen in der Regel auf nichtthermalen Techniken oder Techniken, bei denen nur geringfügig erhitzt werden muss. Zudem werden dem Lebensmittel keine Additive zugegeben, die Produktqualität wird nicht oder nur

minimal beeinträchtigt und die Technik gilt als „natürlich“. Die Anwendung elektrischer Hochspannungsimpulse (HELP, high intensity electric field pulses) führt beispielsweise zu einer irreversiblen Zerstörung der Zellmembranen von Mikroorganismen, jedoch nicht zu einer Veränderung von Aussehen oder Geschmack des Lebensmittels (Angersbach & Knorr, 1997; Knorr, 1999).

Eine weitere effektive Möglichkeit, Mikroorganismen abzutöten sowie unter bestimmten Bedingungen auch deren Sporen zu inaktivieren ist die Anwendung von hohem Druck. Erste Experimente zur Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln wurden bereits vor über 100 Jahren durchgeführt. Ende des 19. Jahrhunderts wurde durch Hite (1899) nachgewiesen, dass die Ausübung hoher Drücke auf Milch zu einer Verlängerung der Haltbarkeit führt. Weitere Studien mit Säften, Obst und Gemüse zeigten deutliche Sterilitätsunterschiede bei längerer Lagerung. Während das Gemüse in der Regel durch mikrobielle Belastung verdorben war, waren Säfte und Obst, bedingt durch ihren niedrigen pH-Wert, auch nach langen Lagerzeiten steril. Systematische Studien mit unterschiedlichen Medien, Mikroorganismen, Drücken und Temperaturen konnten eine Inaktivierung der Bakterien bei Drücken zwischen 400 und 600 MPa und einer Anwendungszeit von 10 min nachweisen, wobei es jedoch deutliche Abweichungen gab (Hendrickx & Knorr, 2002; Hite et al., 1914). Larson et al. (1918) konnten zeigen, dass ein Druck von 300 MPa nicht ausreichend ist, um ausgewählte Bakterien zu inaktivieren, aber ein Druck von 600 MPa über einen Zeitraum von 14 Stunden alle nicht sporenbildenden Mikroorganismen vollständig abtöten konnte. Sporen von *Bacillus subtilis* wurden jedoch auch bei Drücken von 1200 MPa nicht zuverlässig inaktiviert. Erst einige Jahrzehnte später konnte gezeigt werden, dass viele Sporen durch Anlegen von moderatem Druck besser abgetötet werden, da sie zunächst zum Auskeimen angeregt und in ausgekeimtem Zustand durch Druck oder Hitze inaktiviert werden können (Clouston & Wills, 1969, 1970; Gould & Sale, 1970). Allerdings existieren zwischen den Sporen verschiedener Bakterienstämme große Unterschiede betreffend der Drücke, bei denen das Auskeimen angeregt und die gekeimten Sporen abgetötet werden können. Insbesondere viele Sporen pathogener Bakterien wie *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes* oder *Bacillus cereus* können auf Grund ihrer hohen Drucktoleranz nur sehr schwierig inaktiviert werden (Hendrickx & Knorr, 2002; Mills et al., 1998). Eine vollständige Inaktivierung ist meist nur durch kombinierte Druck-Temperatur-Anwendungen möglich (RÖMPP Online, 2010). Da jedoch durch eine

alleinige Hochdruckbehandlung die jeweiligen Bakterien abgetötet werden, kann der durch das Auskeimen der Sporen bedingte Verderb des Lebensmittels durch weitere geeignete Verfahren wie zum Beispiel Kühlung, Vakuumverpacken oder Ansäuern, verhindert beziehungsweise verzögert werden (Bull et al., 2004).

1.2.3 Aufbau und Prinzipien der Hochdruckbehandlung

Ein System zur Hochdruckbehandlung besteht im Allgemeinen aus einem Druckgefäß, einem druckübertragenden flüssigen Medium sowie einem hydraulischen System. Die zu behandelnden Lebensmittel werden abgepackt in das Druckgefäß gegeben, welches anschließend verschlossen wird. Durch Einpumpen des flüssigen Mediums wird der Druck kontinuierlich bis zu einem bestimmten Wert erhöht, bei dem dann die Ventile verschlossen werden. Der im System angelegte Druck kann so ohne weiteren Energieaufwand beibehalten werden (Patterson, 2005).

Generell kann der Druck über drei verschiedene Methoden erzeugt werden. Bei der direkten Kompression befinden sich das Übertragungsmedium und das Lebensmittel in einem Behälter, in dem ein hydraulischer Kolben direkt Druck auf die Flüssigkeit ausübt. Bei der indirekten Kompression befindet sich das hydraulische System in einer Seitenkammer. Durch Anlegen des Drucks wird Wasser in ein an die Seitenkammer angeschlossenes Reservoir gepresst, in welchem sich die Lebensmittel befinden. Als dritte Variante kann die in einem verschlossenen Druckgefäß befindliche Flüssigkeit erhitzt werden, so dass der Druck durch die durch Hitze verursachte Expansion des Mediums aufgebaut wird. Für industrielle Zwecke wird in der Regel die Methode der indirekten Kompression gewählt (Schmidl & Labuza, 2000; Stiles, 2010).

Die Effekte der Hochdruckbehandlung beruhen im Wesentlichen auf zwei Prinzipien: dem Prinzip von Le Châtelier-Braun und dem Pascal'schen Gesetz. Das Le Châtelier-Braunsche Prinzip, auch Prinzip des kleinsten Zwanges genannt, besagt, dass ein System, welches sich in einem Gleichgewicht befindet, auf eine Störung des Gleichgewichts so reagiert, dass die Wirkung der Störung möglichst gering ist. Im Falle der Ausübung eines hohen Drucks auf ein System bedeutet das, dass das System versucht, dem Druck auszuweichen und somit sein Volumen verringert (Chefftel, 1995). Dies führt beispielsweise auch zu Volumenänderungen in

der Doppelschicht der Zellmembranen der Mikroorganismen und somit zu einer Veränderung der Permeabilität, was zu Zellschäden oder zum Absterben der Bakterienzellen führt (Brennan, 2006).

Das Pascal'sche Gesetz besagt, dass der Anstieg des Drucks an einem Punkt einer in einem abgeschlossenen Behälter befindlichen Flüssigkeit zu einer Übertragung des Drucks auf das gesamte System führt (Koizumi & Nishihara, 1992). Im Gegensatz zu thermischen Prozessen, bei denen es zu einem Temperaturgradienten innerhalb des Produkts kommt, wird der Druck unmittelbar an alle Objekte weitergegeben, die sich in direktem Kontakt mit dem Medium befinden. Innerhalb des Lebensmittels kommt es daher nicht zu einem Gradienten, sondern zu einer gleichmäßigen Wirkung des Drucks, unabhängig von der Geometrie des Produkts (Cheftel, 1995).

1.2.4 Auswirkungen von hohem Druck auf biologische Matrices

Bei der Anwendung der Hochdruckbehandlung zur Erhöhung der Haltbarkeit von Lebensmitteln steht nicht nur das Inaktivieren von Mikroorganismen im Vordergrund, sondern auch mögliche Einflüsse des Drucks auf das jeweilige Lebensmittel und dessen Inhaltsstoffe. Während im Falle von Mikroorganismen durch Druck induzierte chemische und physikalische Veränderungen erwünscht sind, da sie zu einer Inaktivierung von Hefen, Bakterien und Pilzen führen, sind sie im Lebensmittel nur bedingt wünschenswert. Veränderungen in Textur, Geschmack, Aroma, Nährwert oder Farbe beeinflussen die Qualität eines Lebensmittels und können zu verringerter Akzeptanz beim Verbraucher führen. Der Einfluss des Hochdrucks auf die Qualität eines Produkts ist stark vom jeweiligen Produkt selbst abhängig (Matser et al., 2004).

Da der Einsatz von Hochdruck auf Lebensmittel gemäß dem Prinzip von Le Châtelier-Braun dazu führt, dass das System versucht, dem Druck auszuweichen, laufen insbesondere Phasenübergänge und solche chemische Reaktionen bevorzugt ab, die zu einer Verringerung des Volumens führen. Während kovalente Bindungen in der Regel durch Druck nicht beeinflusst werden, gibt es jedoch Auswirkungen auf schwache chemische Bindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und auf Reaktionen, die unter Ladungsbildung verlaufen. Hoher Druck hat daher beispielsweise einen großen Einfluss auf Proteine, jedoch verglichen mit der Wirkung thermischer

Prozesse nur einen geringen Einfluss auf niedermolekulare Verbindungen wie Vitamine, Pigmente oder Aromastoffe (Yordanov & Angelova, 2010).

Durch Anlegen von Hochdruck auf ein Lebensmittel kann es in den darin enthaltenen Proteinen zu reversiblen sowie irreversiblen Veränderungen kommen. Drücke von 100-200 MPa können die Dissoziation oligomerer Strukturen in ihre Untereinheiten bewirken, zu einer partiellen und häufig irreversiblen Entfaltung monomerer Strukturen führen sowie die Aggregation oder Gelierung der Proteine verursachen. Die Bildung neuer intermolekularer Wasserstoff- oder Disulfidbrücken führt zu einer Volumenverringerng und findet daher unter Hochdruck vermehrt statt. Dies kann ebenfalls zu Strukturänderungen innerhalb eines Proteins führen. Auch Änderungen des pH-Werts, bedingt durch eine erhöhte Dissoziation von Wasser und diverser im Lebensmittel enthaltener Säuren, können eine Denaturierung von Proteinen bewirken. Dies hat auch zur Folge, dass sich Enzymaktivitäten innerhalb eines Lebensmittels oder des Mikroorganismus verändern und die Enzyme, je nach Druck, Temperatur, Dauer der Hochdruckbehandlung und Art des Enzyms teilweise oder ganz inaktiviert werden können. Möglicherweise ist einer der Hauptgründe für das Absterben von Mikroorganismen unter Druckeinwirkung die Inaktivierung bakterieller ATPasen (Cheftel, 1995; Cheftel & Culioli, 1997; Norton & Sun, 2008).

Der Einfluss von Hochdruck auf Kohlenhydrate ist eher gering einzustufen, jedoch kann es bei Polysacchariden, wie zum Beispiel Stärke oder Pektin, zu Veränderungen der physikalischen Eigenschaften wie dem Wasserbindungsvermögen oder der Fähigkeit zur Gelbildung kommen (Balasubramaniam & Farkas, 2008; Wennberg & Nyman, 2004).

Fette werden durch Druck sowohl physikalisch als auch chemisch beeinflusst. Pro 100 MPa angelegtem Druck kommt es zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur der Lipide um mehr als 10°C. Dadurch kristallisieren Lipide, die normalerweise bei Raumtemperatur flüssig sind, aus. Dies betrifft beispielsweise auch Phospholipide aus den Zellwänden der Mikroorganismen. Unter anderem durch diese Struktur- und Permeabilitätsänderungen der Zellwände kommt es zu einer Inaktivierung der Mikroorganismen durch hohen Druck (Cheftel, 1995). Zudem finden unter Anwendung von Drücken ≥ 400 MPa verstärkt oxidative Reaktionen, wie zum Beispiel die Autoxidation von Lipiden statt. Dies kann zu einer Qualitätsminderung beziehungsweise dem Verderb des Lebensmittels durch Bildung aromaaktiver Sekundärprodukte führen (Ma et al., 2007; Wiggers et al., 2004).

Durch die Hochdruckbehandlung können jedoch bei geeigneter Prozessführung und Auswahl der Lebensmittel hochwertige und lange haltbare Produkte hergestellt werden. Insbesondere Säfte und Fruchtzubereitungen, aber auch Gemüseprodukte oder Fleisch eignen sich gut für eine Hochdruckbehandlung. Seit Beginn der 90er Jahre sind diverse hochdruckbehandelte Lebensmittel, wie zum Beispiel Smoothies, Guacamole, Säfte, Schinken oder Austern auf dem internationalen Markt erhältlich (Brennan, 2006; Cheftel, 1995). Auf Grund relativ hoher Herstellungskosten belegen sie allerdings momentan nur einen Nischenmarkt. In der EU unterliegen durch Hochdruck haltbar gemachte Lebensmittel dem Zulassungsverfahren der Novel-Food-Verordnung (RÖMPP Online, 2010).

1.2.5 Auswirkungen von hohem Druck auf Fleisch

Die Hochdruckbehandlung als Methode der Haltbarmachung kann bei Fleisch und Fleischprodukten eingesetzt werden. Bei moderaten Drücken und Temperaturen kommt es zu keiner Veränderung des Geruchs oder Geschmacks, jedoch können Farbe, Textur sowie die Struktur beeinflusst werden, was sowohl Vor- als auch Nachteile mit sich bringt (Cheftel & Culioli, 1997). Seit den 1970er Jahren haben sich eine Vielzahl von Studien mit dem Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die Qualität von Fleisch und Fleischprodukten beschäftigt.

Ein wichtiger Aspekt zur Beurteilung der Fleischqualität ist die Zartheit des Fleisches, die stark vom Zustand der Kontraktion des Muskels (Kälte, Rigor) beeinflusst wird (Marsh & Leet, 1966). Bei der Hochdruckbehandlung von schlachtfischem Fleisch vor Einsetzen des *Rigor mortis* kommt es zu einer Muskelverkürzung von 35 – 50% bei gleichzeitigem druckinduziertem Ausfasern oder Reißen strukturgebender Komponenten. Bei solcherart behandeltem Fleisch wurde eine erhöhte Zartheit beobachtet (Kennick et al., 1980; Macfarlane, 1973; Macfarlane & Morton, 1978). Studien, die an Fleisch durchgeführt wurden, welches *post-rigor* hochdruckbehandelt wurde, haben bei Einhaltung niedriger Temperaturen während der Hochdruckbehandlung keine positiven Effekte in Bezug auf die Zartheit des Fleisches gezeigt (Bouton et al., 1977). Jung et al. (2000) haben beobachtet, dass die Hochdruckbehandlung *post-rigor* zu einer erhöhten Fleischzähigkeit führen kann. Wird bei der Behandlung von Fleisch jedoch eine Kombination aus Hitze (60°C) und

Druck angewandt, bewirkt dies auch *post-rigor* einen erhöhten Grad an Zartheit (Bouton et al., 1977). Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten bei *post-rigor* hochdruckbehandeltem Fleisch unter anderem Veränderungen der I-Bande sowie das Fehlen von Material der M-Linie innerhalb der A-Bande feststellen. Auch die H-Zone war zum Teil nach der Hochdruckbehandlung im Fleisch nicht mehr sichtbar. Innerhalb der A-Bande wurden Unterbrechungen ausgemacht, zudem wurde eine Verdickung der Z-Linie festgestellt (Jung et al., 2000; Macfarlane & Morton, 1978; Suzuki et al., 1990). Keine signifikanten Einflüsse der Hochdruckbehandlung wurden auf das Bindegewebe beobachtet (Ma & Ledward, 2004; Suzuki et al., 1993). Effekte auf myofibrilläre Proteine, wie zum Beispiel eine Dimerisierung des Myosins (O'Shea et al., 1976) beziehungsweise dessen Gelierung in salzhaltigen Lösungen (Yamamoto et al., 1990) sowie eine Denaturierung von Actin und Myosin bei Drücken von 400 MPa (Cheah & Ledward, 1996) konnten in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Die Zusammenhänge zwischen den genannten ultrastrukturellen Veränderungen und der Zartheit des Fleisches konnten bisher jedoch nicht abschließend geklärt werden (Cheffel & Culioli, 1997). Eventuell kommt es bei der gleichzeitigen Anwendung von Hochdruck und Hitze *post-rigor* zu einem verstärkten aber spröden myofibrillaren Netzwerk, welches bei Anwendung deformierender Kraft auf Grund des Wachstums von Rissen zerbricht, so dass das Fleisch zart erscheint (Sikes et al., 2010). Eine weitere Theorie, die Zartheit von Fleisch unter Anwendung der Hochdruckbehandlung positiv zu beeinflussen, beruft sich auf die Veränderung enzymatischer Aktivitäten bedingt durch Hochdruck. So kommt es bei Drücken ab 100 MPa zu einer Inaktivierung von Calpastatin, während der Gehalt der Calpaine erst ab Drücken oberhalb von 200 MPa abnimmt. Bei geeigneter Prozessführung ist somit die Gesamtaktivität der Calpaine erhöht, was zu einer Zunahme der Fleischzartheit führen könnte (Homma et al., 1995). In Rindermuskel konnte zudem ein *post-rigor* durch die Hochdruckbehandlung hervorgerufener Anstieg lysosomaler Enzymaktivitäten (Cathepsin D und saure Phosphatasen) beobachtet werden, der allerdings keinen Einfluss auf die Zartheit des Fleisches hatte (Jung et al., 2000).

Als weiterer Effekt der Hochdruckbehandlung kann eine Beeinflussung des Wasserbindungsvermögens beobachtet werden, welches im Zusammenhang mit der Denaturierung von Proteinen steht. Da bei steigendem Druck die Proteindenaturierung zunimmt, kommt es bei hohen Drücken bei Fisch und Fleisch zu einem Anstieg des Tropfverlustes (Campus et al., 2010; Lakshmanan et al., 2007; Wiggers

et al., 2004). Auch der pH-Wert von Fleisch wird durch die Hochdruckbehandlung beeinflusst. So konnten Macfarlane et al. (1981) beim Vergleich eines *post-rigor* hochdruckbehandelten Fleisches mit einer Kontrolle einen leichten Anstieg des pH-Wertes beobachten, während im Gegensatz dazu bei *pre-rigor* hochdruckbehandeltem Fleisch der pH-Wert abnimmt (Horgan, 1981; Macfarlane, 1973). Zudem können bei steigenden Drücken auch Farbveränderungen in frischem Fleisch festgestellt werden. Da die Farbe von Fleisch hauptsächlich abhängig vom Gehalt an Myoglobin sowie einiger anderer Proteine wie Hämoglobin oder Cytochrom C ist, führt eine Denaturierung dieser Proteine zu einer Veränderung der Fleischfarbe (Campus, 2010). Cheah & Ledward (1996) konnten eine irreversible Denaturierung von Myoglobin bei Drücken oberhalb von 400 MPa nachweisen. Entfärbungen beziehungsweise Graufärbung von Fleisch bei Drücken oberhalb 325 MPa konnten auch durch Jung et al. (2003) für Rindfleisch sowie durch Wiggers et al. (2004) für Hähnchenfleisch beobachtet werden.

Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit der Hochdruckbehandlung betrachtet werden muss, ist die Lipidoxidation. Verschiedene Studien konnten eine erhöhte Anfälligkeit von hochdruckbehandeltem Fleisch für oxidative Veränderungen nachweisen (Cheah & Ledward, 1996; Orlie, Hansen et al., 2000; Tuboly et al., 2003; Wiggers et al., 2004). Ursache hierfür sind möglicherweise durch Druck induzierte Schäden der Membranen im Muskel (Orlie, Hansen et al., 2000).

Die Hochdruckbehandlung als Methode der Haltbarmachung von Fleisch bildet eine Möglichkeit, die mikrobielle Stabilität ohne Zugabe von Konservierungsstoffen zu gewährleisten. Obwohl es bei frischem Fleisch unter Anwendung von hohem Druck zu Veränderungen in Textur, Struktur, Farbe sowie zur Lipidoxidation des Fleisches kommen kann, können moderate Drücke sowie eine Kombination mehrerer Methoden der Haltbarmachung zu mikrobiell stabilen und vom Verbraucher akzeptierten Produkten führen.

1.3 Mögliche Wege des Lebensmittelverderbs

1.3.1 Verderb von Lebensmitteln

Lebensmittelverderb kann auf biologischem sowie physikalisch-chemischem Wege stattfinden und ist abhängig von diversen extrinsischen (Temperatur,

Luftfeuchtigkeit, Gasatmosphäre) und intrinsischen (a_w -Wert, pH-Wert, Zusammensetzung) Faktoren (RÖMPP Online, 2010). Beim Verderb kommt es zu Einbußen in der Qualität des Lebensmittels, die das Lebensmittel ungenießbar machen. So können zum Beispiel Veränderungen des Aussehens, des Geruchs oder des Geschmacks auftreten, jedoch kann auch die Lebensmittelsicherheit beeinträchtigt werden.

Beim biologischen Verderb erfolgt eine unerwünschte Veränderung des Lebensmittels durch Wachstum und Stoffwechselaktivitäten von Mikroorganismen wie Schimmelpilzen, Hefen oder Bakterien. Je nach Verursacher unterscheidet sich die Art des Verderbs. So können zum Beispiel Milchsäurebakterien durch Bildung von Peroxiden zu einer Verfärbung von Fleisch führen beziehungsweise durch die Bildung von Milchsäure eine Säuerung des Lebensmittels verursachen. Andere Mikroorganismen können Proteine und Triacylglycerole hydrolysieren, Schwefelwasserstoff oder Ammonium aus Aminosäuren bilden oder zu einem Abbau von Fettsäuren führen. Änderungen des Geruchs oder Geschmacks sowie der Farbe des Lebensmittels resultieren aus den genannten Reaktionen (RÖMPP Online, 2010). Neben optischen sowie sensorischen Veränderungen können Lebensmittel auch durch Kontamination mit pathogenen Mikroorganismen verderben. Der Verzehr solcherart befallener Lebensmittel kann verschiedene Krankheitssymptome auslösen. Hierbei wird unterschieden zwischen Infektionen, die durch Vermehrung des aufgenommenen Bakteriums (z.B. *Salmonella*) im Verdauungstrakt des Menschen ausgelöst werden oder Intoxikationen, d. h. Erkrankungen, die durch Aufnahme eines durch Bakterien produzierten Toxins (z. B. Aflatoxine aus *Aspergillus* oder Botulinumtoxin aus *Clostridium botulinum*) entstehen (Scott Smith & Hui, 2004). Fleisch ist beispielsweise ein idealer Nährboden für *Clostridium botulinum*, welches ubiquitär als Spore vorkommt und unter anaeroben Bedingungen auskeimt. Das von diesem Bakterium gebildete Nervengift Botulinumtoxin ist das stärkste bekannte Gift. Jährlich kommt es deutschlandweit zu 20-40 Vergiftungs- und 1-2 Todesfällen (RÖMPP Online, 2010).

Der physikalisch-chemische Verderb von Lebensmitteln wird durch atmosphärische Einflüsse wie Licht, Luft, Feuchtigkeit und Wärme sowie enzymatische Reaktionen verursacht. Zum Verderb kommt es unter anderem auf Grund von Oxidations- oder Hydrolysereaktionen der im Lebensmittel enthaltenen

chemischen Komponenten, die beispielsweise zu farblichen Abweichungen sowie zu Veränderungen des Aromas führen.

Die Farbe eines Lebensmittels kann entweder durch Reaktionen von bereits im Lebensmittel vorhandenen farbgebenden Komponenten oder durch die Neubildung farbiger Verbindungen beeinflusst werden. So kann es beispielsweise durch enzymatische Aktivitäten zu einer Ringöffnung des Chlorophylls kommen, wodurch eine farblose Verbindung entsteht (Yamauchi & Watada, 1991). Zudem können sich die farbigen Eigenschaften von Chlorophyll durch Photoabbau (Llewellyn et al., 1990) verändern. Auch Carotinoide sind anfällig für durch Licht induzierte Abbaureaktionen (Pesek & Warthesen, 1987) sowie für Oxidationsreaktionen (Rodriguez-Amaya, 1999). Im Falle von Anthocyanen als farbgebender Komponente können sich deutliche Farbveränderungen beispielsweise durch Variationen des pH-Werts oder der Bildung von Metallkomplexen ergeben (Jackman et al., 1987). Zu einer Farbneubildung im Lebensmittel, wie zum Beispiel einer Braunfärbung, kann es unter anderem nichtenzymatisch durch die *Maillard*-Reaktion, Karamellisierung oder Ascorbinsäureoxidation kommen, sowie enzymatisch durch Phenolasen (Fennema, 1996).

Die *Maillard*-Reaktion führt nicht nur zu einer zum Teil unerwünschten Braunfärbung von Lebensmitteln, sondern gehört zu den wichtigsten für die Aromabildung verantwortlichen Reaktionen in Lebensmitteln. Neben der gewünschten Bildung von Aromastoffen beispielsweise beim Backen oder Braten kann es auch zur Bildung von Fehlaromen bei thermischen Verarbeitungsschritten, wie der Herstellung von Trockenmilch kommen (Fox et al., 2009; Schwambach & Peterson, 2005). Fehlaromen können zudem durch Reaktionsprodukte des *Strecker*-Abbaus entstehen. Ein typisches Beispiel ist das aus Methionin gebildete Methional, welches für die Entstehung von *off-flavor* in Bier verantwortlich sein kann (Perpète & Collin, 1999; Soares da Costa et al., 2004). Auch Reaktionen der Lipide können zu unerwünschten Veränderungen des Geruchs und Geschmacks führen. So kommt es beispielsweise durch Hydrolysereaktionen der Lipide zur Freisetzung von Fettsäuren (Bengtsson & Bosund, 1966; Fritsch et al., 1971). Insbesondere kurzkettige Fettsäuren wie Butter- oder Capronsäure sind sehr geruchs- und geschmacksintensiv und können Fehlaromen in Lebensmitteln verursachen (Rychlik et al., 2006; Sessa & Rackis, 1977; Woo et al., 1984). Eine weitere sensorisch auffällige Reaktion ist der oxidative Fettverderb, bei dem es zu einer Reaktion von Sauerstoff mit ungesättigten Fettsäuren kommt. Hierbei wird eine Radikalkettenreaktion in Gang gesetzt, bei der

es letztlich zum Zerfall der Fettsäuren und zur Bildung flüchtiger und häufig aromaaktiver Substanzen kommt (Frankel, 1984).

1.3.2 Oxidativer Fettsäureabbau und Bildung von Hexanal

Leguminosen weisen, ebenso wie Rind- und Hähnchenfleisch, relativ große Mengen ungesättigter Fettsäuren auf. Je nach Genotyp liegen bei Erbsen beispielsweise die Gehalte an Ölsäure zwischen 10,7 und 47%, die der Linolsäure zwischen 32,1 und 60,8% und die Linolensäuregehalte zwischen 2,5 und 14,9% (Coxon & Wright, 1985). Ähnlich hohe Gehalte an Öl-, Linol- und Linolensäure finden sich auch in Lupinen (Hansen & Czochanska, 1974). In Rind- und Hähnchenfleisch kommen ebenfalls viele ungesättigte Fettsäuren vor, hauptsächlich jedoch Ölsäure. In Hähnchenfleisch sind zudem Linolsäuregehalte von ~ 20% enthalten. Mit Gehalten von jeweils weniger als 5% finden sich in beiden Fleischsorten desweiteren Palmitoleinsäure und Linolensäure sowie beim Rindfleisch Linolsäure (El-Din & Ibrahim, 1990; Enser et al., 1996).

Bedingt durch die hohen Gehalte ungesättigter Fettsäuren sind die genannten Lebensmittel anfällig für die Lipidperoxidation. Bei der Reaktion von Sauerstoff mit den allylischen Gruppen dieser Lipide entstehen Hydroperoxide, die zu einer großen Anzahl Sekundärprodukte weiter reagieren. Die Bildung der Hydroperoxide kann entweder radikalisch oder enzymatisch verlaufen (Abbildung 3).

Der Elementarschritt, der bei der Autoxidation von Lipiden ablaufen muss, ist die Bildung eines Alkylradikals ($R\cdot$). Diese Reaktion wird durch Hitze, Licht oder Spuren bestimmter Metalle begünstigt. Im Verlauf des radikalischen Kettenwachstums reagiert Sauerstoff mit dem Alkylradikal. Das so entstandene Peroxyradikal ($ROO\cdot$) kann mit ungesättigten Fettsäuren unter Wasserstoffabstraktion an allylischer Position reagieren. Als Primärprodukte der Autoxidation entstehen hierbei Hydroperoxide ($ROOH$) (Belitz et al., 2007; Frankel, 1984).

Enzymatisch wird die Bildung von Hydroperoxiden durch Lipoxygenasen katalysiert. Lipoxygenasen sind eine Klasse eisenhaltiger Dioxygenasen, die im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet sind. Sie peroxidieren ausschließlich mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die ein *cis,cis*-1,4-Pentadiensystem enthalten (Loiseau et al., 2001). Je nach Pflanze und Isoform der dort vorkommenden Lipoxygenasen

unterscheidet sich die Produktspezifität. So katalysiert die Erbsenlipoxygenase LOX-2 hauptsächlich die Reaktion von Linolsäure zur 13-Hydroperoxy-9,11-octadecadiensäure, während im Vergleich dazu die Bildung der 9-Hydroperoxy-10,12-octadecadiensäure aus Linolsäure bevorzugt bei der Peroxidation durch die Erbsenlipoxygenase LOX-3 abläuft (Hughes et al., 1998). Die Lupinenlipoxygenase L-1 katalysiert bei der Verwendung von Linolsäure als Substrat ausschließlich die Bildung der 13-Hydroperoxy-9,11-octadecadiensäure (Najid et al., 1988). Williams et al. (1986) konnten zeigen, dass durch das Vorhandensein von Lipoxygenasen in Erbsen und Bohnen ein Fehl aroma verursacht werden kann.

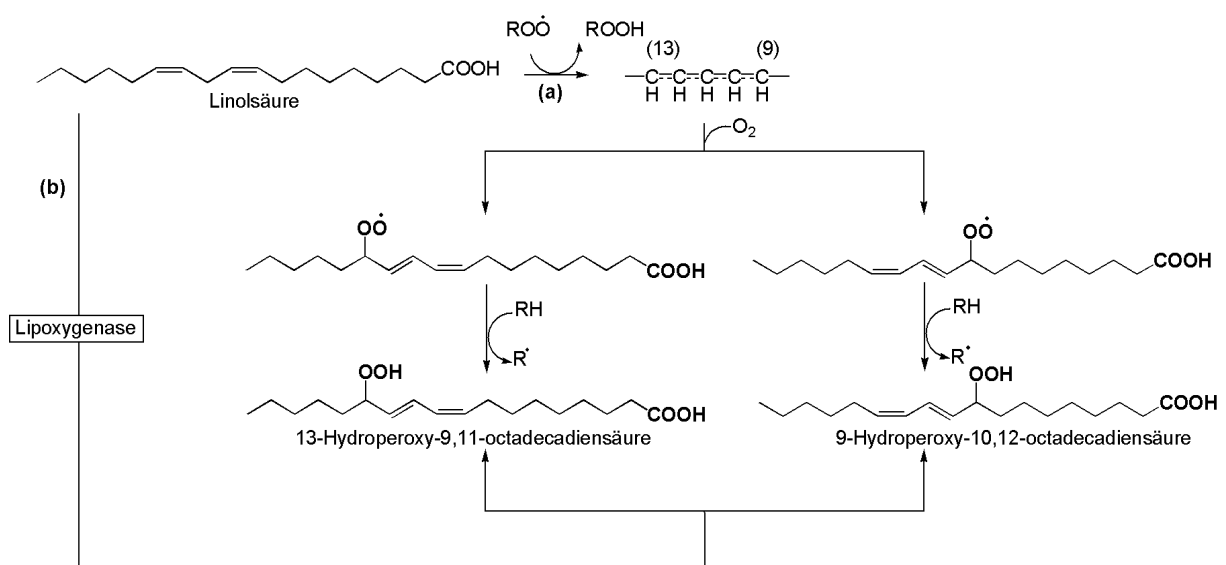


Abbildung 3: Peroxidation von Linolsäure, primäre Reaktionsprodukte nach (a) Autoxidation oder (b) Lipoxygenase-Katalyse. (Belitz et al., 2007; Delcarte et al., 2000; Galliard & Matthew, 1977; Loiseau et al., 2001)

Die Entwicklung von Fehl aromen beruht auf dem Abbau der radikalisch oder enzymatisch gebildeten, generell geruchs- und geschmackslosen Hydroperoxide. Der Abbau verläuft über unterschiedliche Prozesse und kann zu einer Vielzahl flüchtiger und nichtflüchtiger Zerfallsprodukte führen, die das Aroma eines Lebensmittels sowohl positiv als auch negativ beeinflussen sowie biologische Effekte haben können (Frankel, 1983; Matsushita, 1975). Ein möglicher Reaktionsweg ist der thermisch oder durch Metallionen verursachte homolytische Zerfall der Lipidhydroperoxide unter Ausbildung von Alkoxyradikalen ($RO\cdot$), die ihrerseits wieder mit Lipi-

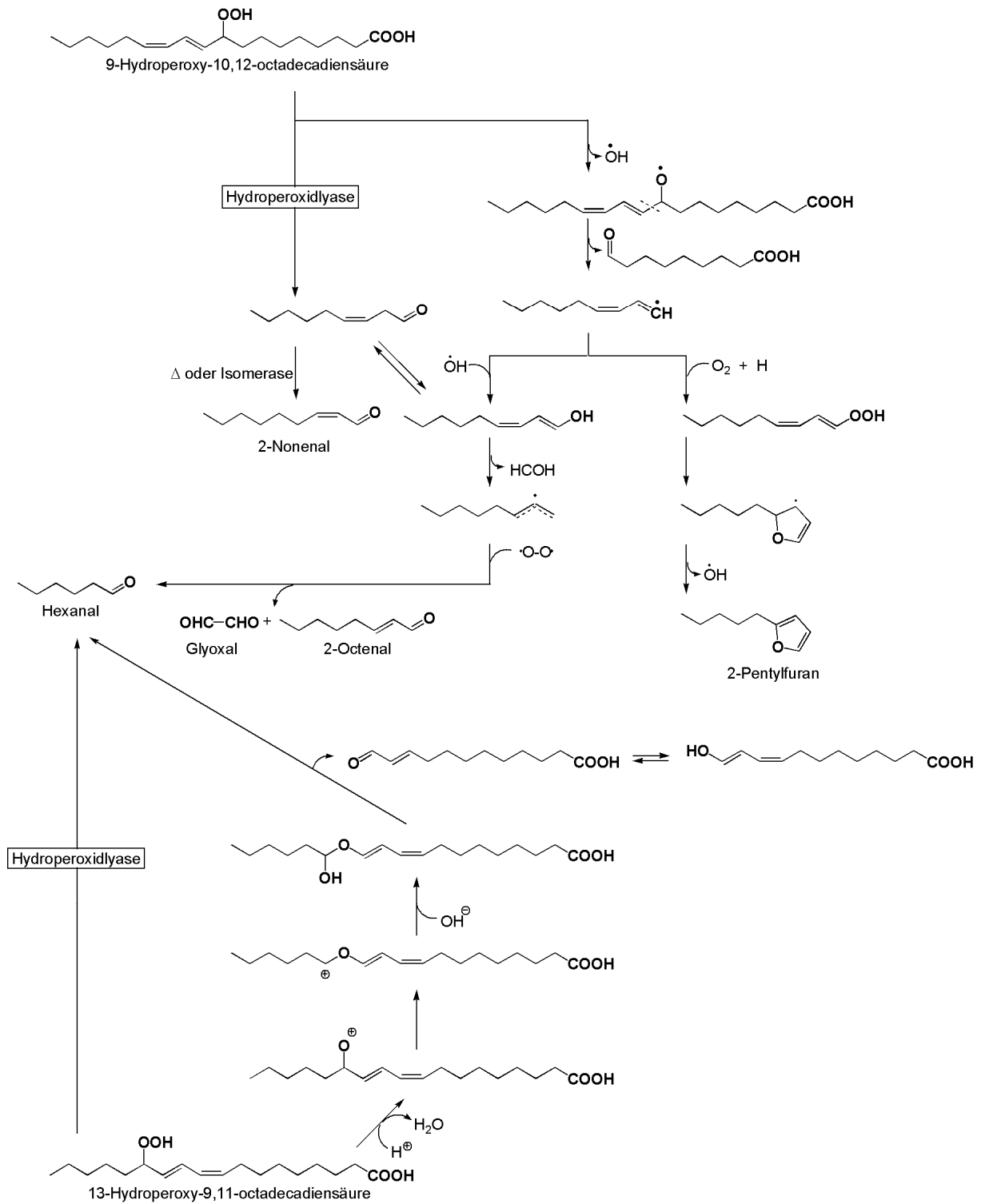


Abbildung 4: Mögliche Reaktionswege der Linolsäurehydroperoxide zur Bildung von Hexanal und anderer Sekundärprodukte (nach Belitz et al., 2007; Delcarte et al., 2000; E. Frankel, 1983; Galliard & Matthew, 1977; Hatanaka et al., 1983; Sekiya et al., 1982)

den oder anderen Radikalen reagieren können (Frankel, 1983). Kondensationsreaktionen unter Ausbildung von Di- oder Polymeren sowie Reaktionen der Lipidhydroperoxide mit Sauerstoff, bei denen beispielsweise Epoxyhydroperoxide, cyclische Peroxide, bicyclische Endoperoxide oder Dihydroperoxide entstehen

können, sind ebenfalls möglich (Frankel, 1984). Zudem können die Hydroperoxide auch enzymatisch über Hydroperoxidlyasen sowie Glutathionperoxidasen abgebaut werden (Gardner, 1975; Matoba et al., 1985).

Als Endprodukte des Lipidhydroperoxidabbaus entstehen u. a. Aldehyde, Ketone, Alkohole, Ester, Furane oder Lactone. Ein typisches Abbauprodukt ungesättigter Fettsäuren ist Hexanal (Abbildung 4), welches eine sehr niedrige Geruchsschwelle aufweist und daher das Aroma eines Lebensmittels stark beeinflussen kann. In Leguminosen wurde Hexanal als Schlüsselaromastoff identifiziert, der zum grünen Geruch beitragen und in Leguminosenprodukten zu einem grasigen Fehl aroma führen kann (Boatright & Lei, 1999; Rackis et al., 1979; Sessa & Rackis, 1977). Analytisch kann Hexanal als Indikatorsubstanz für den oxidativen Fettsäureabbau und somit für den fortschreitenden Lebensmittelverderb verwendet werden (Sanches-Silva et al., 2004; Shahidi & Pegg, 1994; Wiggers et al., 2004).

1.4 Aromastoffprofile von Lebensmitteln

1.4.1 Methoden der Aromastoffanalytik

Lebensmittel enthalten häufig eine Vielzahl von Stoffen verschiedenster Verbindungsklassen, die das Aroma beeinflussen können. Da die einzelnen Stoffe im Lebensmittel in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen und verschiedene Geruchsschwellenwerte aufweisen, ist eine Aussage, welchen Beitrag eine Substanz zum Aroma eines Lebensmittels leistet, nur durch Ermittlung der sensorischen Eigenschaften, zum Beispiel durch eine Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEDA), möglich. Die vollständige Charakterisierung erfolgt neben der sensorischen Analyse zudem über die Ermittlung der chemischen Struktur. Mit Hilfe der Aromastoffanalysen können beispielsweise Aussagen über die Lagerstabilität eines Lebensmittels getroffen sowie gezielte Maßnahmen zur geruchlichen oder geschmacklichen Verbesserung des untersuchten Produkts getroffen werden.

Zur Gewinnung der flüchtigen Verbindungen aus dem jeweiligen Lebensmittel können unterschiedliche Methoden angewandt werden. Primär müssen die meist nur in sehr geringen Konzentrationen enthaltenen flüchtigen Verbindungen möglichst vollständig isoliert und soweit konzentriert werden, dass eine analytische Erfassung der Substanzen möglich ist. Hierbei müssen die verwendeten Parameter so gewählt

werden, dass die Isolation der Aromastoffe unter möglichst milden Bedingungen durchgeführt wird, um die Bildung von Artefakten zu verhindern (Belitz et al., 2007). Häufig verwendete Methoden sind unter anderem die Extraktion und Destillation der flüchtigen Substanzen mit geeigneten Lösungsmitteln sowie absorptive oder adsorptive Methoden, die in der Lebensmittelmatrix durchgeführt werden können. Moderne Schnellmethoden stellen beispielsweise die Verwendung eines Twisters® oder die Durchführung einer Festphasenmikroextraktion (SPME) dar. Zudem können die zu untersuchenden zumeist leicht flüchtigen Verbindungen auch über statische oder dynamische Verfahren aus dem Dampfraum oberhalb eines Lebensmittels gewonnen werden.

Die Erfassung und Identifizierung der konzentrierten Substanzen erfolgt zumeist massenspektrometrisch nach vorheriger gaschromatographischer Trennung. Die Identifizierung kann über olfaktometrische Daten sowie über die spezifischen Retentionsindizes (van den Dool & Kratz, 1963) der einzelnen Stoffe verifiziert werden.

1.4.2 Aromastoffe in Leguminosen

Auf dem weltweiten Markt sind heute viele Lebensmittel erhältlich, die aus Leguminosen oder mit Hilfe von Leguminosenproteinen hergestellt werden. In den letzten Dekaden wurden insbesondere die Aromastoffprofile von Soja und Sojaprodukten wie Mehl, Flocken, texturiertes Protein, Extrakte oder Isolate erforscht. Hierbei konnten bisher etwa 200 flüchtige Verbindungen, darunter hauptsächlich Aldehyde wie *n*-Hexanal, *n*-Heptanal, (*E*)-Hex-2-enal oder (*Z*)-Hex-3-enal, Ketone (z. B. Octan-2-on, 1-Octen-3-on, Decan-2-on), Alkohole wie beispielsweise Hexan-1-ol oder 1-Octen-3-ol, Pyrazine (z. B. 2,5-Dimethylpyrazin, Ethylpyrazin) sowie Terpene (z. B. Limonen, Myrcen) identifiziert werden. Viele dieser Verbindungen sind Produkte der Lipidoxidation, Reaktionsprodukte von Aminosäuren oder Zuckern sowie Abbauprodukte von Carotinoiden (Ames & Macleod, 1984; Boatright & Lei, 1999; Kobayashi et al., 1995; Rackis et al., 1979). Inzwischen sind, mit ähnlichen Ergebnissen, auch die Aromastoffprofile von Erbsen sowie Lupinen analysiert worden (Bader et al., 2009; Jakobsen et al., 1998; Murray et al., 1976).

Für das typische Aroma von Leguminosen zeigen sich hauptsächlich verschiedene Aldehyde und Pyrazine verantwortlich (Bader et al., 2009). Die Verwendung von Leguminosenprodukten ist allerdings limitiert, da sie häufig ein als bohlig oder grasig beschriebenes Aroma aufweisen, welches für die meisten Verbraucher inakzeptabel ist. Als Indikator der Lipidoxidation und möglicher Schlüsselaromastoff für das Auftreten des grünen Fehleromas konnte Hexanal identifiziert werden (Boatright & Lei, 1999; Rackis et al., 1979; Sessa & Rackis, 1977).

Eine mögliche Methode zur Geschmacksverbesserung von Leguminosenprodukten ist die Fermentation. Sie wird schon seit langem angewandt, wie zum Beispiel bei der Herstellung von Sojasauce, Miso, Tempeh oder Sufu (Kanda et al., 1976). Wang et al. (1974) konnten zeigen, dass die Fermentation von Sojamilch mit Milchsäurebakterien zu einer geschmacklichen Verbesserung der Produkte führen kann, bei der das grasige oder bohnlige Fehleroma verringert wird. Welche Veränderungen die Fermentation im Aromaprofil von Leguminosenprodukten verursacht, konnte bisher jedoch nicht abschließend geklärt werden.

1.4.3 Aromastoffe in rohem Hähnchen- und Rindfleisch

Das Aroma von gekochtem oder gebratenem Fleisch setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Aromastoffe zusammen, die hauptsächlich durch Fettsäureabbau oder *Maillard*-Reaktion gebildet werden. Mittlerweile konnten mehr als 1000 flüchtige Stoffe identifiziert werden, von denen einige wenige Schlüsselsubstanzen entscheidend zum Aroma von thermisch behandeltem Fleisch beitragen, wie zum Beispiel Hexanal, 2-Methyl-3-furanthiol, 2-(Methylthio)propanal, 2-Furfurylthiol oder 2,4-Decadienal (Aliani & Farmer, 2005; Farkas et al., 1997; Kerler & Grosch, 1997; Mottram et al., 2003).

Im Gegensatz zu thermisch behandeltem Fleisch weist rohes Fleisch in der Regel ein sehr schwaches Aroma auf, wobei die Aromastoffe häufig Produkte des Fettsäureabbaus sind. In rohem Hähnchenfleisch konnten Rababah et al. (2006) beispielsweise Propanal, Butanal und die entsprechenden Alkohole nachweisen sowie Pentanol, Heptanol, 1-Octen-3-ol und Nonanal. Weitere in rohem Hähnchenfleisch nachgewiesene flüchtige Verbindungen sind Ethanol, Aceton, Butanon,

Ethylacetat, Schwefelwasserstoff, Dimethylsulfid oder Dimethyldisulfid (Eilamo et al., 1998; Senter et al., 2000).

Rohes Rindfleisch weist, verglichen mit Hähnchenfleisch, eine deutlich höhere Anzahl flüchtiger Verbindungen auf, darunter Aldehyde wie Hexanal, Heptanal oder Nonanal und die entsprechenden Alkohole sowie Ketone (z. B. Pentan-2-on, Heptan-2-on, Octan-2-on), Terpene (z. B. Limonen), Lactone (γ -Butyrolacton, γ -Hexalacton und γ -Decalacton), Furane, verschiedene Säuren und schwefelhaltige Verbindungen (Dimethylsulfid) (Insausti et al., 2002; King et al., 1993).

Da die Hochdruckbehandlung von Fleisch oxidative Veränderungen verursachen kann (Cheah & Ledward, 1996; Orlie, Hansen et al., 2000; Tuboly et al., 2003; Wiggers et al., 2004), kann es im Fleisch zu einem Anstieg von Produkten der Lipidperoxidation kommen, wodurch das Aroma negativ beeinträchtigt werden kann.

1.5 Zielsetzung

Die Lagerstabilität und die sensorische Qualität von Lebensmitteln werden in Zeiten eines globalisierten Handels immer wichtiger. Fehleraromen (*off-flavors*), die zum Beispiel durch den oxidativen Abbau von Fettsäuren und daraus resultierende aromaaktive Verbindungen (z. B. Alkenale) hervorgerufen werden können, dienen als Signalstoffe für einen möglichen Verderb des Lebensmittels und stoßen daher beim Verbraucher auf Ablehnung.

Neue technologische Methoden, wie beispielsweise die Hochdruckbehandlung von Fleisch, können den schnellen mikrobiellen Verderb verhindern und somit die Haltbarkeit des Lebensmittels erhöhen, ohne den Nährwert des Fleisches negativ zu beeinflussen. Durch die Hochdruckbehandlung können die Gehalte an Aromastoffen mikrobiellen Ursprungs gesenkt werden, jedoch können zu hohe Drücke zu oxidativen Schäden führen und somit unter Umständen die Bildung von aromaaktiven Fettsäureabbauprodukten, wie zum Beispiel des stark nach Gras riechenden *n*-Hexanals, fördern (Ma et al., 2007; Rivas-Cañedo et al., 2009).

Eine als bohlig oder grasig beschriebene Geruchsnote schränkt auch den industriellen Einsatz von Leguminosenproteinen stark ein (Rackis et al., 1979; Sessa & Rackis, 1977). Auf Grund ihrer ausgezeichneten technofunktionellen Eigenschaften können solche Proteine in verschiedenen industriell gefertigten Produkten

als Emulgatoren, Schaumbildner oder Wasserbinder zum Einsatz kommen. Bisher entwickelte Verfahren zur sensorischen Verbesserung der Proteinisolate sind technologisch sehr aufwendig und daher teuer. Eine kostengünstige Möglichkeit zu einer positiven Beeinflussung des Aromas der Leguminosenproteinpräparate könnte die fermentative Behandlung mit Milchsäurebakterien darstellen, die u. a. zu einer Verringerung aromaaktiver Aldehyde führen soll (Blagden & Gilliland, 2005).

Diese Arbeit befasst sich mit der analytischen Beurteilung technologisch modifizierter Lebensmittel. Hierzu sollten aromaaktive Verbindungen im jeweiligen Rohstoff und im behandelten Produkt analysiert werden. Aromaveränderungen, die durch die Hochdruckbehandlung von Fleisch bei verschiedenen Drücken beziehungsweise durch die Fermentation von Leguminosenproteinextrakten (Lupine, Erbse) entstehen, sollten durch Aromaprofile dokumentiert werden. Des Weiteren sollte die Lagerstabilität der jeweiligen Lebensmittel anhand der Bildung von *n*-Hexanal, einem Marker für den Fettsäureabbau, überprüft werden.

2 Lactic fermentation to improve the aroma of protein extracts of sweet lupin (*Lupinus angustifolius*)

Accepted in *Food Chemistry*, 2011. Reprinted with kind permission from Elsevier.

2.1 Abstract

Lupin protein extracts (LPE) are prone to emit a beany off-flavor during storage which confines its application in foods. Fermentation of LPE using several lactic acid bacteria was conducted to reduce off-flavor formation in stored samples. The aroma profile of untreated LPE was compared to those of fermented protein extracts (LPEF). Hexanal and *n*-hexanol were used as indicator substances of progressing lipid oxidation. The most powerful odorants were evaluated by GC-olfactometry-flavor dilution analysis and identified according to their mass spectra, odor descriptions, and retention indices. 22 volatile substances with dilution factors equal to or higher than 100 were determined in both LPE and LPEF, among them *n*-pentanal, *n*-hexanal, 1-pyrroline, dimethyl trisulfide, 1-octen-3-one, 3-octen-2-one, 1-octen-3-ol, and β -damascenone. The aroma profile was significantly modified by the fermentation process and off-flavors were reduced and/or masked by newly formed compounds.

Keywords: Lupin (*Lupinus angustifolius*), protein extracts, fermentation, olfactometry, aroma, off-flavor, *n*-hexanal

2.2 Introduction

Species of the genus *Lupinus* have been used for human nutrition for over 6000 years. Because of their bitter and toxic alkaloids, lupin seeds have to be soaked to make them palatable. At the beginning of the 20th century, alkaloid-extraction was industrialized and a non-toxic lupin mutant with low alkaloid content was discovered.

In the past decades, the production and consumption of so-called sweet lupins have increased continuously due to the capability of lupin plants to grow in climates soy plants cannot, their tolerance of poor soils and their high crop yields (1000-2000 kg/ha) (Cox, 1998; Linnemann & Dijkstra, 2002; Petterson, 1998).

The protein content of lupin seed ranges from 30-40% with an amino acid composition comparable to that of soy. Today, a large market for the use of lupin seed in food has developed and numerous products are available, such as pasta and bakery products containing lupin flour. Fermentation of lupins is more efficient than that of soy and has resulted in tempeh or miso-like products (Petterson, 1998). Furthermore, versatile applications of lupin proteins as emulsifiers, stabilizers or moisture retainers, especially in meat products, are established (Linnemann & Dijkstra, 2002). Beneficial effects of lupin proteins for health in animal models, such as reduction of triglyceride concentration in liver and plasma or a protective activity against the progression of atherosclerosis have been reported (Marchesi et al., 2008; Spielmann et al., 2007).

Nevertheless, the acceptance of lupin protein supplemented products suffers from persistent green and beany off-flavors, which are known for other legumes as well (Alamanou et al., 1996; Bader et al., 2009). For soy, enormous efforts have been made to identify and reduce the content of volatiles causing the off-odor. A masking or a modification of the off-flavor, at least on the short term, was achieved by either fermentation with *Lactobacillus* or *Streptococcus* strains, or by using soybean cultivars lacking lipoxygenase isozymes. *n*-Hexanal, a lipoxygenase derived degradation product of linoleic acid, was identified as a key off-flavor compound in legume products (Blagden & Gilliland, 2005; Boatright & Lei, 1999; Kobayashi et al., 1995; Rackis et al., 1979).

The aim of this study was to evaluate the potential of lactic acid fermentation to permanently reduce or mask off-flavors in spray-dried lupin protein extracts. Detailed analytical and sensorial analyses were carried out to evaluate changes in the profile of long term stored samples.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Preparation of lupin protein extracts

The lupin seed used as raw material for the protein extraction was obtained from Saatzeit Steinach GmbH (Steinach, Germany). Untreated, pasteurized and fermented protein extracts (liquid and spray-dried samples) of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* Vitabor) were obtained from the Fraunhofer-Institute for Process Engineering and Packaging (Freising, Germany).

Bacterial strains, *Lactobacillus plantarum* L1047 and *Pediococcus pentosaceus* P113 were received from Institute of Technology of Brewing (Technical University of Munich, Freising, Germany).

2.3.1.1 Process description

Prior to protein extraction the lupin seeds were dehulled in an underrunner disc sheller, the kernels and hulls separated in an air sifter and the kernels flaked using a roller mill. Subsequently, the lupin flakes were de-oiled in a percolator system using iso-hexane. For the protein extraction, the de-oiled flakes were suspended in cold water, adjusted to pH 7.0 with 1 M sodium hydroxide solution, and extracted at 30°C with a solid-liquid-ratio of 1:5. After 1 hour extraction, the protein extracts were separated from the insoluble fibers by centrifugation at 3,300 g. Subsequently, the clarified lupin protein extracts (LPE) containing the main storage protein fractions were pasteurized at 65°C for 30 minutes.

Fermentation of protein extracts was carried out as described elsewhere (Klotzbücher, 2009). Spray dried samples of untreated, pasteurized and fermented protein extracts were produced with a lab spray drier (Niro) by applying constant temperatures of hot-air ($T_{in} = 180^{\circ}\text{C}$) and exhausted air ($T_{out} = 75^{\circ}\text{C}$).

2.3.2 Storage stability of fermented lupin protein extracts

2.3.2.1 Strain selection

In a preliminary test protein extracts (see below) were either fermented with *Lactobacillus plantarum* or with *Pediococcus pentosaceus* and spray-dried. An aliquot of 10 ± 0.05 g was sealed in glass bottles (Schott AG, Mainz, Germany) in the

presence of air. One half of each of the samples was stored in the dark at room temperature (22°C), and the second half was stored in the dark at elevated temperature (37°C, stress storage conditions). Over a period of three months, samples were analyzed regularly as described below. Controls (liquid LPE and LPEF with a dry matter content of 9-10%) were stored in a freezer at -18°C until analysis.

2.3.2.2 Comparison of storage stability of lupin protein extracts

Two batches of spray-dried protein extracts (LPE, LPEP, LPEF) and a commercial milk protein (MP, Vogeley, Hameln, Germany) as reference were aliquoted (3.33 ± 0.01 g) and stored at 37°C. Over a period of three months, samples were analyzed weekly as described below. Controls (liquid LPE, LPEP and LPEF) were stored in a freezer at -18°C until analysis.

2.3.3 Chemical characterization of lupin protein extracts

2.3.3.1 Dry matter and ash content

The dry matter and ash content of protein extracts (liquid and spray dried) were analyzed in duplicate in accordance with the German Food Act (2006) using a thermogravimetric system (TGA 601, Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA). For dry matter determination the samples were dried to constancy of weight at 105°C. The ash content was measured by combustion of the sample at 950°C until constancy of weight.

2.3.3.2 Lipid content and fatty acid composition

The lipid content was measured in duplicate after extraction with *n*-butanol and subsequent saponification using potassium hydroxide pellets according to the method of Caviezel (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V., 2003). The respective lipid fractions were analyzed by means of gas chromatography as their fatty acid methyl esters (FAMES). 100 g of respective lupin samples were extracted with pentane/diethyl ether (1:1.12 azeotropic mixture) and concentrated *in vacuo* (Laborota 4000, Heidolph Group, Kelheim, Germany) to approximately 1.5 mL. An aliquot of 1 mL was reacted with 1 mL of a methanolic sodium methylate solution

(30%, w/w). After heating the samples for 30 min at 50°C, the pentane/diethyl ether phase was withdrawn, dried (Na_2SO_4) and used for GC-MS analysis. The fatty acid derivatives were analyzed using a Varian CP-3800 gas chromatograph (Varian, Palo Alto, CA, USA) coupled to a 1200 Quadrupole mass spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA). The GC was equipped with a 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm HP-5MS capillary column (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany); helium was the carrier gas. The mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) mode at 70 eV. Transfer line and ion source temperatures were 280°C and 230°C, respectively. One μL was injected with a split ratio of 1:5 (injector temperature 250°C) at a constant carrier gas flow rate of 1.5 mL min^{-1} and the following temperature ramp: 60°C (isothermal for 3 min), 5°C min^{-1} to 300°C (10 min) and finally to 325°C at a rate of 25°C min^{-1} .

2.3.3.3 Protein content and amino acid composition

The total nitrogen content (N) of the samples was determined in duplicate according to AOAC 968.06 (Dumas combustion method) (AOAC, 1996) using a Protein/Nitrogen Analyzer FP 528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA). The protein contents were calculated by multiplying the nitrogen content with a conversion factor of 6.25.

Amino acid analysis was carried out according to the method described by Miedel, Hulmes & Pan (1989) with slight modifications. An aliquot of about 5 mg of protein sample was exactly weighed (0.01 mg) in vacuum hydrolysis tubes (ReactiTherm 5 mL, Thermo Scientific) and dissolved in 6 M HCl to a final concentration of 1 mg of protein product per 1 mL of 6 N HCl. About 1% (w/w) of sodium sulfite was added to this solution as a scavenger and 500 nmol mL^{-1} norleucine was added as internal standard. Acid hydrolysis was carried out *in vacuo* for 24 h at 110°C. The hydrolyzed samples were dried and stored at -20°C, re-dissolved in 1.0 mL and further diluted (1:10) with bidest. water. Aliquots of 20 μL were subjected to an AAA-Direct™ Amino Acid Analyzer from Dionex (Dionex Corporation, California, USA) equipped with an Amino Pac® PA10 column and an electrochemical detector. Amino acids were quantified by calculating the concentration of the specific amino acid to external standards and normalized to the internal standard norleucine. The amounts of the

amino acids are mean values of two independent hydrolyses of the respective protein samples which were analyzed in triplicates.

2.3.4 Sampling and analysis of volatile compounds

Samples for the dynamic headspace analysis of aroma compounds were directly taken either from the liquid crude protein extracts (controls of untreated, pasteurized, fermented extract after neutralization) or spray dried samples after the respective storage time. A standard spray-dried milk protein sample was used as a reference.

Liquid protein extracts (controls) were thawed overnight (5°C) and spray-dried protein extracts were re-dissolved in deionized water immediately before sampling. A total volume of 50 mL protein extract or 25 mL protein extract replenished with 25 mL deionized water was poured into a 250 mL three-neck flask. The sample was stirred at 600 rpm using a glass stir bar (Bohlender GmbH, Grünsfeld, Germany) and a magnetic stirrer equipped with an electronic temperature controller (IKA, Staufen, Germany). After an equilibration time of 20 min in a tempered water bath (50°C), dynamic headspace sampling was carried out according to Schindler, Krings, Berger & Orlie (2010) with a constant volumetric flow rate of 0.2 L min⁻¹ to a total sampling volume of 10.0 NL using conditioned TenaxTM TA adsorption tubes (60/80 mesh, Gerstel, Mülheim, Germany). Glass connections were made with Swagelok tube fittings (Swagelok, Solon OH, USA) and PTFE ferrules (Gerstel, Mülheim, Germany). Loaded TenaxTM TA tubes were instantly analyzed or stored sealed at -20°C until GC analysis in a storage container (Gerstel, Mülheim, Germany).

Volatiles were thermodesorbed from TenaxTM TA tubes using a thermal desorption system (TDS 2 and CIS 4, Gerstel, Mülheim, Germany) coupled to a gas chromatograph (Agilent 6890, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) equipped with either a flame ionisation detector (FID, 250 C, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) and an olfactory detection port (ODP, 230°C, equipped with air moistening, voice recording and recognition software, Gerstel, Mülheim, Germany) or a mass spectrometer (AMD QuAS³AR, AMD Intectra GmbH, Harpstedt, Germany). The thermodesorption of volatiles started at 20°C with a rate of 60°C min⁻¹ to 230°C (hold for 3 min). Re-focussing of the thermodesorbed compounds was accomplished on a liner filled with TenaxTM in the CIS 4 at -10°C. After completed

thermodesorption, the CIS was heated in the splitless mode to a final temperature of 230°C at a rate of 12°C s⁻¹ and held for 3 min.

Separation and identification of volatiles was achieved on two columns of different polarity, a DB-Wax and a HP-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, USA) either with a hydrogen flow of 2.0 mL min⁻¹ (GC-O, GC-FID) or a helium flow of 1.2 mL min⁻¹ (GC-MS). The oven temperature was programmed from 40°C (DB-Wax) or 60°C (HP-5) (both isothermal for 3 min), raised at a rate of 3°C min⁻¹ at 100°C and from 100°C to 230°C with a rate of 5°C min⁻¹. For DB-Wax capillary column, the final temperature of 230°C was held for 10 min, for HP-5 capillary column, the temperature was raised from 230°C to a final temperature of 320°C at a rate of 20°C min⁻¹. Volatiles were identified according to their linear retention indices according to van den Dool and Kratz (van den Dool & Kratz, 1963), their odor description at the sniff-port (a least three trained panelists) and GC-MS-analysis (EI ionization at 70 eV, transfer line temperature 230°C, ion source temperature 200°C). Mass spectra were compared to digital libraries (Wiley 08 / NIST08, 2008) or spectra of reference standard compounds. Quantification of *n*-hexanal and *n*-hexanol in the storage experiments was achieved by the standard addition method applied to the respective protein extracts (untreated, fermented).

2.3.4.1 TDS-GC-O Flavor dilution analysis

Flavor dilution analysis (FDA) was performed by varying the split ratio of the CIS from splitless mode to split ratios of 1:10, 1:50, 1:100 and 1:200. For each volatile, the flavor dilution (FD) value was assigned as the highest dilution the substance still can be detected by GC-O. Analysis was done in duplicate by two trained panelists.

2.3.4.2 Preparative gas chromatography

About 400 g of spray-dried protein extract were exhaustively extracted with pentane/diethyl ether (1:1.12 azeotropic mixture) in a Soxhlet apparatus connected with a cooled reflux condenser. The aroma extract was concentrated to a volume of 50 mL using a Vigreux column and volatiles isolated using thin layer high vacuum distillation according to Krings, Banavara & Berger (2003).

Preparative GC was performed on a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) equipped with a CIS 3 cold injection system, a Multi Column Switching System II (both Gerstel, Mülheim, Germany) and a HP 7673 autosampler (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA). An Optima Wax pre-column (5 m x 0.53 mm x 2 μm) was connected to an Optima Wax preparative column (25 m x 0.53 mm x 2 μm) (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and hydrogen at a flow of 8.9 mL min^{-1} at 100°C was used as carrier gas. The following oven temperature ramp was programmed: 40°C (isothermal for 3 min), with a rate of 3°C min^{-1} to 100°C and from 100°C to 230°C with a rate of 5°C min^{-1} . The final temperature of 230°C was held for 5 min.

2.4 Results and discussion

Basic analytical data of de-oiled lupin (*Lupinus angustifolius* Vitabor) flakes and of the corresponding spray-dried lupin protein extracts were determined. De-oiled lupin flakes had a dry-matter of 89.71 g 100 g⁻¹ \pm 0.03. Milling and defatting of lupin kernels increased the relative protein (46.88% \pm 1.03) and ash (4.26% \pm 0.02) content in dry matter compared to untreated kernels (Fernández & Batterham, 1995; Hove, 1974). Spray-dried protein extracts (LPE) had a protein content of 67.95% \pm 1.57 in dry matter (93.90 g 100g⁻¹ \pm 0.52). High protein contents represent a quality marker of the extracts. The lipid content was found below 1.0% in both, de-oiled lupin flour and the spray-dried protein extract, but still represented a sufficient source for lipid oxidation and, hence, off-flavor formation.

The amino acid composition of defatted lupin flakes and protein extracts (Tabelle 2) is dominated by glutamate, arginine and aspartate, whereas sulfur-containing amino acids are limited as in other legumes (Pettersson, 1998). Slightly different values among lupin flakes and untreated and fermented protein extracts may be explained due to the ongoing treatments in manufacturing process, which could have an influence on the biological matrix.

The fatty acid composition (Tabelle 3) of defatted *Lupinus angustifolius* flakes differed from literature data for untreated lupin kernels (Hansen & Czochanska, 1974). Most likely, the de-oiling process (hexane extraction) changed the triacylglyceride ratio. Especially the content of polyunsaturated fatty acids was

reduced. De-oiled lupin flakes and spray-dried fermented protein extracts each contained twenty fatty acids of which 26.9% or 32.1% were saturated, respectively. Unsaturated fatty acids were divided in 42.2% or 40.1% monounsaturated and 30.9% or 27.9% polyunsaturated. Trace concentrations of odd-numbered fatty acids may have originated from contaminated lupin flour or from the fermentation bacteria, respectively.

The principal potential of lactic acid bacteria to reduce and/or mask off-flavor formation in stored lupin protein extracts was evaluated in a first screening using a

Table 2: Amino acid composition of de-oiled lupin flakes, spray-dried untreated and spray-dried fermented lupin protein extracts [g/100 g dry matter]

Amino acid	De-oiled lupin flakes	Spray-dried untreated protein extract	Spray-dried fermented protein extract
Alanine	0.98 ± 0.04	1.33 ± 0.01	1.52 ± 0.12
Arginine	7.27 ± 0.33	9.24 ± 0.16	7.02 ± 0.05
Aspartate	4.52 ± 0.07	6.23 ± 0.07	5.64 ± 0.21
Cysteine	0.13 ± 0.00	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.04
Glutamate	8.56 ± 0.06	12.16 ± 0.08	11.04 ± 0.59
Glycine	0.87 ± 0.10	1.23 ± 0.08	1.57 ± 0.17
Histidine	3.23 ± 0.06	4.03 ± 0.05	2.89 ± 0.14
Isoleucine	1.19 ± 0.06	1.77 ± 0.04	1.85 ± 0.18
Leucine	2.24 ± 0.09	3.12 ± 0.06	2.95 ± 0.24
Lysine	1.50 ± 0.06	2.09 ± 0.03	0.89 ± 0.05
Methionine	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.15 ± 0.01
Phenylalanine	1.94 ± 0.14	2.63 ± 0.05	2.14 ± 0.16
Proline	1.92 ± 0.14	2.89 ± 0.07	2.22 ± 0.12
Serine	3.05 ± 0.15	4.32 ± 0.10	3.56 ± 0.09
Threonine	1.27 ± 0.10	1.80 ± 0.01	1.43 ± 0.10
Tyrosine	2.03 ± 0.17	3.22 ± 0.09	2.66 ± 0.17
Valine	0.87 ± 0.11	1.25 ± 0.03	1.51 ± 0.15

mean value ± standard deviation, n =3

set of various lactic acid formers (Klotzbücher, 2009). Two strains showed the best results and were, thus, used for a first storage experiment to fix suitable experimental conditions. Due to the strong foaming properties of the protein extracts, solvent

extraction of aroma compounds was not practicable. For this reason, volatiles were trapped on Tenax using dynamic headspace sampling. *n*-Hexanal served as a lead compound, as it is well known as one of the main principles causing flavor deterioration in legume products (Boatright & Lei, 1999; Kobayashi et al., 1995; Rackis et al., 1979).

Table 3: Fatty acid composition of defatted lupin flakes and spray-dried fermented lupin protein extract [%]

Fatty acid	De-oiled lupin flakes	Spray-dried fermented protein extract
Saturated		
10:0	Trace	0.16 ± 0.03
12:0	0.08 ± 0.01	0.57 ± 0.17
13:0	Trace	0.32 ± 0.02
14:0	0.44 ± 0.04	1.14 ± 0.03
15:0	0.24 ± 0.01	0.65 ± 0.01
16:0	17.23 ± 0.74	19.15 ± 0.30
17:0	0.15 ± 0.00	0.31 ± 0.02
18:0	6.86 ± 0.19	7.83 ± 0.03
20:0	0.36 ± 0.01	0.42 ± 0.01
21:0	0.05 ± 0.00	0.12 ± 0.01
22:0	1.07 ± 0.20	0.68 ± 0.04
24:0	0.35 ± 0.02	0.55 ± 0.00
Monounsaturated		
14:1	Trace	0.19 ± 0.01
16:1	0.17 ± 0.09	0.23 ± 0.03
18:1	41.83 ± 0.21	39.19 ± 0.09
20:1	0.16 ± 0.00	0.29 ± 0.03
22:1	Trace	0.20 ± 0.02
Polyunsaturated		
18:2	28.62 ± 0.19	25.23 ± 0.16
18:3	2.25 ± 0.05	2.57 ± 0.30
20:2	Trace	0.12 ± 0.01

mean value ± range/2, n =2

Samples stored over a period of three months at room temperature showed a slight increase in *n*-hexanal concentration (Abbildung 5). As expected, the values increased in samples stored at 37°C. The comparison of protein extracts fermented with *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum* revealed no obvious differences in *n*-hexanal content, neither at 37°C, nor at ambient (room temperature) conditions. Fermentation products of the two bacterial strains were similar in both sensory characteristics and durability. *Lactobacillus plantarum* was used for a more detailed aroma analysis because of its comparably better technological properties (Klotzbücher, 2009). The concentration of *n*-hexanal and *n*-hexanol, both degradation products with green/beany odor attributes, were chosen to monitor the storage stability of *L. plantarum* fermented protein extracts under stress conditions. Samples were subjected to a comprehensive sensorial evaluation (GC-O and FDA) at the end of the storage period.

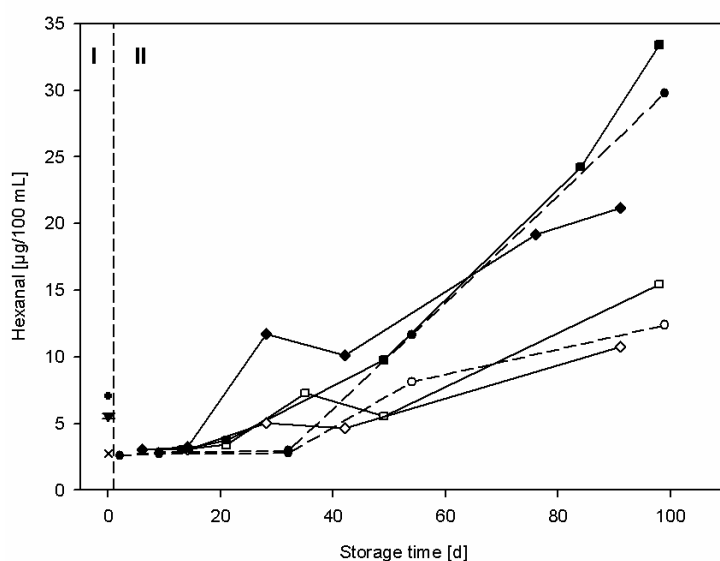


Abbildung 5: Comparison of strains:

I *n*-Hexanal content in liquid lupin protein extracts: untreated (▼), fermented with *Lactobacillus plantarum* (♣), fermented with *Pediococcus pentosaceus* (×)

II Kinetics of *n*-hexanal formation in spray-dried fermented lupin protein extracts stored at room temperature (*Lactobacillus plantarum* sample 1 (□) and 2 (◇) and *Pediococcus pentosaceus* (○)) and at 37°C (*Lactobacillus plantarum* sample 1 (■) and 2 (◆) and *Pediococcus pentosaceus* (●)).

In this experiment untreated LPE was compared to LPEP, LPEF and a commercial milk protein sample (MP) over a period of 3 months (Abbildung 6). The MP with its well-established sensory stability served as a reference. When stored at 37°C in the darkness MP showed the lowest susceptibility to lipid oxidation. *n*-Hexanal contents remained almost stable at 13.0 µg 100 mL⁻¹ at day 1 and 13.8 µg

100 mL⁻¹ at day 97. Similar results were observed by Ulberth and Roubicek (1995) for tempered and dark-stored whole milk powder over a period of twelve months. The *n*-hexanal content in LPE at the beginning of the storage experiments was comparable to that of the milk protein, and merely increased within the first 40 days. In pasteurized samples, however, the *n*-hexanal content distinctly increased from 14.2 µg 100 mL⁻¹ to 25.7 µg 100 mL⁻¹ (98 days). Obviously, the pasteurization process, which is mandatory prior to inoculation of LPE with *L. plantarum*, made the

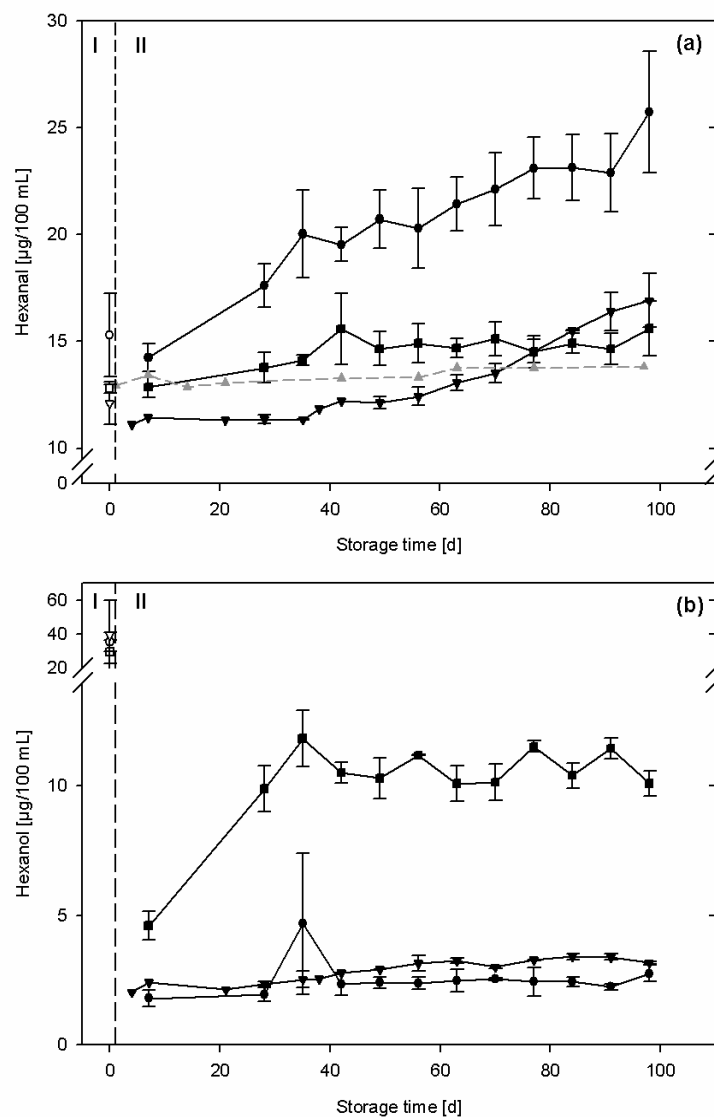


Abbildung 6: Comparison to a reference milk protein:

I *n*-Hexanal (a) and *n*-hexanol (b) content in liquid lupin protein extracts: untreated (□), pasteurized (○) and fermented with *Lactobacillus plantarum* (▼)

II Kinetics of *n*-hexanal (a) and *n*-hexanol (b) formation in milk protein (▲) stored 97 days at 37°C in the dark and in spray-dried lupin protein extracts: untreated (■), pasteurized (●) and fermented with *Lactobacillus plantarum* (▼)

samples more susceptible to lipid autoxidation. This may have been caused by protein denaturation and release of transient metal ions such as ferrous iron, which then initiated lipid peroxidation. Fermentation of the pasteurized protein extracts counterbalanced the adverse effect of pasteurization. Moreover, at the beginning of storage, *n*-hexanal contents of fermented samples were lower than those of milk protein, LPE or LPEP, and remained lowest until day 75.

In MP, *n*-hexanol was not present. The *n*-hexanol contents of LPEP and LPEF were similar, and only a slight increase over the 3-month storage period was observed. In LPE, a considerable increase was observed during the first weeks. At the end of the experiment, the *n*-hexanol contents in LPE were three to four times higher than those of LPEP and LPEF. Possibly, residual activities of alcohol dehydrogenases and/or of reduction equivalents were still present in spray-dried LPE, which are supposed to be destroyed completely in LPEP and LPEF during pasteurization. Even though possible matrix effects in LPE can influence the retention of aroma compounds and their odor thresholds as well, *n*-hexanol is certainly not involved in the formation of the green off-flavor of legume seed. Its maximum concentration of about $10 \mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ in LPE after a storage of three months was far from the odor threshold of 500 ppb in water (Buttery et al., 1999). In contrast, *n*-hexanal contents in stored protein extracts were found above the odor threshold of 4.5 ppb in water (Buttery et al., 1999) and may have impaired the sensorial acceptance of LPE. Nevertheless, the fermentation process reduced the *n*-hexanal concentration and prevented regeneration in lupin protein samples during storage.

The odor of lupin protein extracts was described as nutty, slightly musty and cereal-like. Comparing LPE with LPEF, the odor and sensorial properties of LPEF were clearly more pleasant, although fermentation did not prevent a slight increase of *n*-hexanal formation towards the end of the storage period. To gain insight in the change of the aroma profile of fermented protein extracts, comprehensive GC-O and GC-MS analyses of LPE and LPEF were performed. At the beginning of the storage, concentrations of volatiles were low in all samples, and only few odorants, such as *n*-hexanal, were detected (GC-FID/MS, data not shown). The low concentrations of aroma-active compounds are attributed to the spray-drying process with a peak temperature of 180°C. However, at the end of the storage experiment, 37 volatiles were identified *via* GC-MS, including many aroma-active aldehydes (9) and alcohols

(16) (Tabelle 4). Most of the compounds found in LPE occurred in LPEF as well, but the concentrations of some aroma-active volatiles differed. Differences in the lipid or amino acid content (Tabelle 2 and Tabelle 3) originating from the fermentation process, resulted in different concentrations of precursors of volatiles. In LPE higher concentrations of butan-2-one, 3-methylbutanal, 2-methylpentan-2-ol, 4-methylpentan-2-ol, 3-methylbutan-2-ol, hexan-2-ol, octan-2-one, hexan-1-ol and heptan-1-ol were found, while in LPEF the lipid degradation products *n*-pentanal, *n*-heptanal, 1-octen-3-ol and 2-pentylfuran showed slightly higher concentrations. Most

Tabelle 4: Volatile compounds of spray-dried untreated (LPE) and spray-dried fermented (LPEF) protein extracts of *Lupinus angustifolius* Vitabor

No.	Compound	Retention index		LPI	LPIF	Identification ^a
		CP-Wax	HP-5			
1	<i>n</i> -Butanal	< 1000	n. d.	+	+	MS,RI
2	Butan-2-one	< 1000	n. d.	++	+	MS,RI
3	3-Methylbutanal	< 1000	< 1000	+++	+	MS,RI
4	<i>n</i> -Pentanal	< 1000	< 1000	++	+++	MS,RI
5	1-Pyrroline	1011	n. d.	■	■	MS, O
6	<i>n</i> -Hexanal	1058	< 1000	+++	+++	MS, O, RI
7	2-Methylpentan-2-ol	1087	< 1000	+++	+	MS,RI
8	<i>n</i> -Butan-1-ol	1114	n. d.	+	+	MS,RI
9	1-Penten-3-ol	1154	n. d.	+	+	MS,RI
10	4-Methylpentan-2-ol	1158	n. d.	++	■	MS,RI
11	Heptan-2-one	1166	< 1000	++	++	MS,RI
12	<i>n</i> -Heptanal	1179	< 1000	-	++	MS,RI
13	Pentan-2-ol	1182	n. d.	+	+	MS,RI
14	3-Methylbutan-1-ol	1203	n. d.	++	-	MS,RI
15	Hexan-2-ol	1216	< 1000	+	■	MS,RI
16	2-Pentylfuran	1222	n. d.	■	+	MS,RI
17	<i>n</i> -Pentan-1-ol	1233	< 1000	++	++	MS,RI
18	Octan-2-one	1276	n. d.	++	+	MS,RI
19	<i>n</i> -Octanal	1279	1004	+	+	MS,RI
20	2,5-Dimethylpyrazine	1299	n. d.	■	■	MS,RI
21	Octane-2,3-dione	1321	n. d.	+	+	MS,RI

No.	Compound	Retention index		LPI	LPIF	Identification ^a
		CP-Wax	HP-5			
22	<i>n</i> -Hexan-1-ol	1332	< 1000	+++	+	MS,RI
23	Nonan-2-one	1358	1092	+	+	MS,RI
24	<i>n</i> -Nonanal	1382	1105	+	+	MS,RI
25	3-Octen-2-one	1388	n. d.	■	+	MS,RI
26	3-Butenyl isothiocyanate	1412	< 1000	+	+	MS, O, RI
27	1-Octen-3-ol	1447	< 1000	+	++	MS,RI
28	<i>n</i> -Heptan-1-ol	1453	< 1000	++	+	MS,RI
29	Decan-2-one	1457	1193	+	+	MS,RI
30	Benzaldehyde	1514	< 1000	++	++	MS,RI
31	<i>n</i> -Octan-1-ol	1521	1070	+	+	MS,RI
32	2-Butyl-2-octenal	1589	1374	+	+	MS,RI
33	<i>n</i> -Nonan-1-ol	1659	1172	+	+	MS,RI
34	<i>n</i> -Decan-1-ol	1693	n. d.	+	+	MS,RI
35	β -Damascenone	1809	n. d.	■	■	RI, O, S
36	<i>n</i> -Dodecan-1-ol	1968	n. d.	+	+	MS,RI
37	5-Pentylidihydro-2(3 <i>H</i>)-furanone	2007	n. d.	+	+	MS,RI

^aMS =, mass spectrometry; RI = linear retention index; O = odor impression; S = comparison with standard.

n.d. not detected, ■ Traces (< 0.25 μg 100 mL^{-1})^{*}, + small amounts (0.25 μg – 1.5 μg 100 mL^{-1})^{*}, ++ medium amounts (1.5 μg – 6.0 μg 100 mL^{-1})^{*}, +++ high amounts (6.0 μg – 17.0 μg 100 mL^{-1})^{*}

^{*}Quantified according to the response of the calibrated hexanal concentration

of the identified substances were lipid degradation products or derived from the Strecker degradation of amino acids. GC-MS analysis alone did not yield sufficient information to explain the superior sensorial properties of the fermented protein extracts. Flavor dilution analysis of LPE and LPEF was performed (Abbildung 7). Stepwise sample dilution was achieved by varying the outlet split of the GC-injector (see methods section). Compounds still perceived at the sniff-port at the highest dilution were supposed to have crucial impact on aroma properties of protein extracts. In undiluted samples more than 90 odor impressions were detected, most of them with sweet or musty impressions. Almost half of them was not perceived any longer after the first dilution step (dilution 1:10). For LPE, ten substances were still

perceived at highest dilution steps, six out of them at a dilution of 1:100 and four at a dilution of 1:200. For LPEF, nearly twice the number of odor impressions was perceived in the two highest dilution steps. A total of 22 odorants was detected in both samples, most of them below the actual detection limits of the GC-MS. The four most crucial off-flavor compounds of LPE and another three of the strongest odorants in LPEF were identified. The strongest odor impressions found in LPE were

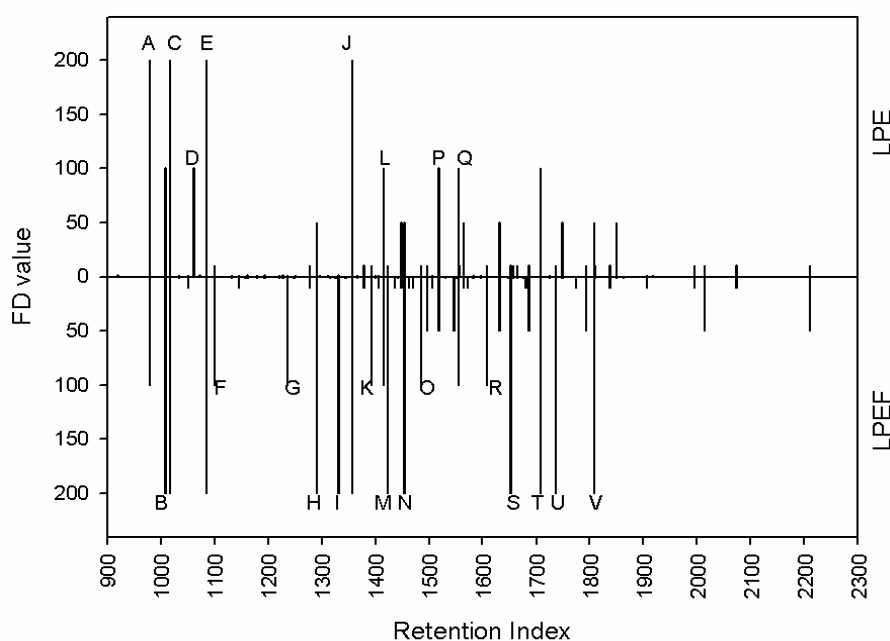


Abbildung 7: Aroma active compounds of spray-dried untreated (LPE) and spray-dried with *Lactobacillus plantarum* fermented (LPEF) protein extracts of *Lupinus angustifolius* Vitabor and odor impressions of substances with FD values ≥ 100 (97 d at 37°C in the dark): **A**, *n*-pentanal: milky, green; **B**, sweet, solvent-like; **C**, 1-pyrroline: sperm, milky; **D**, milky; **E**, *n*-hexanal: grass, green; **F**, sweet, solvent-like; **G**, methionine-like, cooked egg; **H**, 1-octen-3-one: fungi; **I**, musty, cereal-like, roasty; **J**, dimethyl trisulfide: fecal, sulfurous; **K**, 3-octen-2-one: fungi, earthy; **L**, musty, cereal-like; **M**, burnt, pea, earthy; **N**, 1-octen-3-ol: cooked potato, fungi, earthy; **O**, musty, burnt, cereal-like; **P**, burnt, pungent, green pepper; **Q**, musty, soapy, cereal-like; **R**, musty, bitter, soapy; **S**, savory, cereal-like, broth; **T**, sweet, rubber-like; **U**, burnt, earthy, nutty; **V**, β -damascenone: sweet, floral, rose

described as green/milky, sperm, grassy and sulfurous (A, C, E and J). Three of them were detected as the strongest odors of LPEF as well and the fourth was distinguishable up to a dilution of 1:100. Substances A and E were identified as *n*-pentanal and *n*-hexanal. Both aldehydes originate from lipid oxidation of linoleic acid and were previously described as compounds contributing to the beany off-flavor of soy products (Boatright & Lei, 1999; Rackis et al., 1979). They are characterized by low odor thresholds of 12 ppb (*n*-pentanal) (Buttery et al., 1988) and 4.5 ppb (*n*-hexanal) in water (Buttery et al., 1999), respectively. The odorant responsible for the

sperm-like odor of LPE and LPEF was identified as 1-pyrroline (substance C), which, to the best of our knowledge, was found for the first time in legumes. This Schiff base is known as a Strecker degradation product of proline. Also spermine, spermidine or putrescine, which were found to be the three dominating polyamines of soybeans (L. C. Wang, 1972), are discussed as possible precursors for the formation of 1-pyrroline (Amoore et al., 1975). Because of its low odor threshold of 22 ppb in water (Amoore et al., 1975), 1-pyrroline is perceived in very low concentrations and contributes to the aroma of lupin protein extracts. GC-O and GC-MS analysis confirmed dimethyl trisulfide (substance J) as another impact compound of protein extracts. With its low odor threshold of 0.008 ppb in water (Milo & Grosch, 1996), dimethyl trisulfide is suggested to play an important part as key aroma compound in lupin protein extracts. Boatright et al. (2000) found methanethiol as possible precursor of dimethyl trisulfide in the headspace of soy protein extracts.

In LPEF, several fungal odors were perceived up to dilutions of 1:100 or 1:200 (substances H, K and N). These substances were identified as 1-octen-3-one (H), 3-octen-2-one (K) and 1-octen-3-ol (N). 1-Octen-3-ol previously was described as one of the main degradation products of linoleic acid in green beans (de Lumen et al., 1978). With its low odor threshold of 1 ppb in water (Buttery et al., 1988), even small quantities of 1-octen-3-ol can be perceived in lupin protein extracts. Finally, after concentration and purification of lupin protein extracts by preparative gas chromatography, substance V was identified as β -damascenone which was present in ultra traces (ppt range). Because of its extremely low odor threshold of 0.002 ppb in water (Buttery, Teranishi, Ling et al., 1990) β -damascenone had a deep impact on the aroma of lupin protein extracts.

LPEF were characterized by additional flavor impressions, such as sweet, solvent, fungal, but also musty, earthy, burnt, dusty or cereal-like. Hence, the more pleasant odor of fermented protein extracts compared to unfermented protein extracts is explained by its different aroma profile. Although all of the key off-flavor compounds of LPE were present with equal or similar dilution factors in LPEF, the presence of additional perceptible volatiles in LPEF changed the aroma profile to a more acceptable product. Thus, fermentation has not only the potential to decrease the concentration of *n*-hexanal and prevent its re-formation, but also leads to changes of the aroma profile which may mask off-flavors in products containing lupin protein ingredients.

2.5 Acknowledgement

This research project was supported by the German Ministry of Economics and Technology (via AiF) and the FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn). Project AiF 15045 N. We thank W. Back and B. Klotzbücher for designing and performing the lactic fermentations.

3 Improvement of the Aroma of Pea (*Pisum sativum*) Protein Extracts by Lactic Acid Fermentation

This is a preprint of an article submitted for consideration in the Food Biotechnology © 2012, Volume 26, Taylor & Francis. Food Biotechnology is available online at <http://www.tandf.co.uk/journals/titles/08905436.asp>

3.1 Abstract

The formation of a green or beany off-flavor during storage of legume protein extracts is limiting their application in foods. Pea protein extracts were submitted to lactic fermentations to improve the flavor by either reducing off-flavor formation or by masking undesirable green notes. The aroma profiles of untreated pea protein extract (PPE) and fermented pea protein extract (PPEF) were compared to each other and to a commercial milk protein as a bench mark. Kinetic measurements of *n*-hexanal and *n*-hexanol formation were used as an indicator for progressing lipid oxidation and storage stability. The non-fermented and fermented pea protein extracts showed a shelf-life comparable to the commercial milk protein reference. Volatiles were identified according to their mass spectra, odor impressions, linear retention indices and standard substances. 18 odorants with dilution factors equal to or higher than 100 were determined in PPE and 17 in PPEF using GC-olfactometry and flavor dilution analysis. Altogether, 23 highly odor-active compounds were found in PPE and PPEF, among them *n*-hexanal, 1-pyrroline, dimethyl trisulfide, 1-octen-3-one, 2,5-dimethyl pyrazine, 3-octen-2-one, β -damascenone and guaiacol. The fermentation significantly amended the aroma profile of pea protein preparations resulting in a reduction or a masking of undesirable flavors.

Keywords: pea (*Pisum sativum*) protein extract; fermentation; olfactometry; aroma; off-flavor; *n*-hexanal

3.2 Introduction

Species of the genus *Pisum* are one of the oldest domesticated plants in the world. Findings of carbonized pea seed in neolithic settlements in Iraq, Turkey and Greece (7000 to 6000 B.C.) showed attributes of domesticated peas, which signifies that the cultivation of peas is approximately as old as the cultivation of barley and wheat (Helbaek, 1959; Zohary & Hopf, 1973). Beside soy, peanut and bean, pea belongs to the most important legumes with a production of about 10 million metric tons per year worldwide (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010; Uebersax & Ruengsakulrath, 1989).

The protein content of pea seed ranges from 20.7 to 22.9% (Reichert & MacKenzie, 1982; Souci et al., 2008) making them increasingly important in human nutrition. Health benefits of vegetable proteins, such as lowering of plasma cholesterol and plasma triglyceride levels or protecting against atherosclerosis were reported (Lasekan et al., 1995; Marchesi et al., 2008; Weisse et al.). Most common among the legumes is soy, which is either processed to food products, or fractionated and used as emulsifier, stabilizer or moisture retainer (Hui & Sherkat, 2006). Other legumes, such as peas, gain importance as alternative protein sources with a lower allergenicity compared to soy (Sampson, 1998).

The application of legume proteins in food is currently limited owing to persistent green and beany off-flavors. Numerous studies have attempted to identify and reduce the most potent odor-active volatiles in soy preparations. One of the key off-flavors is *n*-hexanal, a lipoxygenase derived degradation product of linoleic acid. To solve the issue, the fermentation with *Lactobacillus* or *Streptococci* strains, or the use of cultivars lacking lipoxygenase isozymes was suggested (Blagden & Gilliland, 2005; Boatright & Lei, 1999; Kanda et al., 1976; Kobayashi et al., 1995; Rackis et al., 1979).

The aim of this study was to evaluate the potential of lactic acid fermentation to permanently reduce or mask off-flavors in spray-dried pea protein extracts. Detailed analytical and sensorial analyses were carried out to evaluate changes in the profile of long term stored samples. *n*-Hexanal and *n*-hexanol served as marker compounds for lipid degradation and progressing spoilage of pea protein extracts.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Preparation of pea protein extracts

The pea seed used as raw material for the protein extraction was obtained from KWS Lochow GmbH, Germany. Liquid and spray-dried protein extracts (untreated, pasteurized and fermented samples) were processed at the Fraunhofer-Institute for Process Engineering and Packaging (Freising, Germany). Bacterial strains, *Lactobacillus plantarum* L1047 and *Pediococcus pentosaceus* P113 were obtained from Institute of Technology of Brewing (Technical University of Munich, Freising, Germany).

3.3.2 Process description

Prior to protein extraction the pea seeds were dehulled in an underrunner disc sheller, and the kernels and hulls were separated in an air sifter. The kernels were ground using a toothed-disk mill resulting in pea kernel flour, which was used for the following protein extraction. The pea flour was suspended into pH-adjusted cold water (pH 8.5) and extracted at a temperature of 30°C with a solid-liquid-ratio of 1:6. After an extraction time of one hour, the resulting protein extracts were separated from the insoluble fibers by centrifugation at 3,300 g. Thereafter, the clarified protein extracts (PPE) were pasteurized at 65°C for 30 minutes. Fermentation was accomplished as described by Klotzbücher (2009). In brief, after adjusting the pasteurized protein extracts (PPEP) to a pH of 4.5 with 1 M hydrochloric acid, samples were inoculated with *L. plantarum* L1047 or *P. pentosaceus* P113, respectively. After 48 h fermentation at a temperature of 37°C, the fermented extracts (PPEF) were neutralized (pH 7.0) with 1 M sodium hydroxide solution. Pea protein extracts (PPE, PPEP, PPEF) were spray-dried with a lab spray drier (Niro) by applying constant temperatures of hot-air ($T_{in} = 180^{\circ}\text{C}$) and exhausted air ($T_{out} = 75^{\circ}\text{C}$).

3.3.3 Storage stability of fermented pea protein extracts

3.3.3.1 Strain selection

In a preliminary test liquid protein extracts (see below) were either fermented with *L. plantarum* or with *P. pentosaceus*. Afterwards, samples were spray-dried and aliquots of 10 ± 0.05 g were sealed in glass bottles (Schott AG, Mainz, Germany) in the presence of air. The samples were stored in the dark at room temperature (22°C) and over a period of three months, samples were analyzed regularly as described below. Controls (liquid PPE and PPEF) were stored in a freezer at -18°C until analysis.

3.3.3.2 Comparison of storage stability of pea protein extracts

Two batches (S1, S2) of spray-dried protein extracts (PPE, PPEP, PPEF) fermented with *L. plantarum* and a commercial milk protein (MP, Vogeley, Hameln, Germany) as a reference were aliquoted (3.33 ± 0.01 g) and stored under stress storage conditions (37°C). Over a period of three months, samples were analyzed weekly as described below. Controls (liquid PPE, PPEP and PPEF) were stored in a freezer at -18°C until analysis.

3.3.4 Chemical characterization of pea protein extracts

3.3.4.1 Dry matter and ash content

The dry matter and ash content of protein extracts were analyzed in duplicate in accordance with the German Food Act (2006) using a thermogravimetric system (TGA 601, Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA). For dry matter determination the samples were dried to constancy of weight at 105°C. The ash content was measured by combustion of the sample at 950°C until constancy of weight.

3.3.4.2 Lipid content and fatty acid composition

Sample preparation.

The lipid content was measured in duplicate after extraction with *n*-butanol and subsequent saponification using potassium hydroxide pellets according to the method of Caviezel (2003). The respective lipid fractions were analyzed by means of

gas chromatography as their fatty acid methyl esters (FAMES). 100 g of pea flour or pea protein extract were extracted with pentane/diethyl ether (1:1.12 azeotropic mixture) and concentrated *in vacuo* (Laborota 4000, Heidolph Group, Kelheim, Germany) to approximately 1.5 mL. An aliquot of 1 mL was reacted with 1 mL of a methanolic sodium methylate solution (30%, w/w). After heating the samples for 30 min at 50°C, the pentane/diethyl ether phase was withdrawn, dried (Na₂SO₄) and used for GC-MS analysis. The fatty acid derivatives were analyzed using a Varian CP-3800 gas chromatograph (Varian, Palo Alto, CA, USA) coupled to a 1200 Quadrupole mass spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA). The GC was equipped with a 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm HP-5MS capillary column (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany); helium was the carrier gas. The mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) mode at 70 eV. Transfer line and ion source temperatures were 280°C and 230°C, respectively. One µL was injected with a split ratio of 1:5 (injector temperature 250°C) at a constant carrier gas flow rate of 1.5 mL min⁻¹ and the following temperature ramp: 60°C (isothermal for 3 min), 5°C min⁻¹ to 300°C (10 min) and finally to 325°C at a rate of 25°C min⁻¹.

3.3.4.3 Protein content and amino acid composition

The total nitrogen content (N) of the samples was determined in duplicate according to AOAC 968.06 (Dumas combustion method) (Cunniff & AOAC International, 1995) using a Protein/Nitrogen Analyzer FP 528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA). The protein contents were calculated multiplying the nitrogen content with a conversion factor of 6.25.

Amino acid analysis was carried out according to the method described by Miedel *et al.* (1989) with slight modifications. An aliquot of about 5 mg of protein sample was exactly weighed (0.01 mg) in vacuum hydrolysis tubes (ReactiTherm 5 mL, Thermo Scientific) and dissolved in 6 M HCl to a final concentration of 1 mg of protein product per 1 mL of 6 N HCl. About 1% (w/w) of sodium sulfite was added to this solution as a scavenger and 500 nmol mL⁻¹ norleucine was added as internal standard. Acid hydrolysis was carried out *in vacuo* for 24 h at 110°C. The hydrolyzed samples were dried and stored at -20°C, re-dissolved in 1.0 mL and further diluted (1:10) with bidest. water. Aliquots of 20 µL were subjected to an AAA-Direct™ Amino Acid Analyzer from Dionex (Dionex Corporation, California, USA) equipped with an Amino

Pac[®] PA10 column and an electrochemical detector. Amino acids were quantified by calculating the concentration of the specific amino acid to external standards and normalized to the internal standard norleucine. The amounts of the amino acids are mean values of two independent hydrolyses of the respective protein samples which were analyzed in triplicates.

3.3.5 Sampling and analysis of volatile compounds

Samples for the dynamic headspace analysis of aroma compounds were directly taken either from the liquid crude protein extracts (controls of untreated, pasteurized, fermented extract after neutralization) or the respective spray-dried samples after the appropriate storage time. A standard spray-dried milk protein sample was used as a reference.

Conditioning of Tenax[™] TA adsorption tubes and sampling was done according to the method of Schindler *et al.* (2010) with minor modifications. Liquid protein extracts (controls) were thawed overnight (5°C) and spray-dried protein extracts were re-dissolved in deionized water immediately before sampling. A total volume of 50 mL protein extract or 25 mL protein extract replenished with 25 mL deionized water was poured into a 250 mL three-neck flask. After an equilibration time of 20 min in a tempered water bath (50°C), dynamic headspace sampling was started with a constant volumetric flow rate of 0.2 L min⁻¹ to a total sampling volume of 10.0 L at ambient temperature and pressure (McNaught *et al.*, 1997) using a portable automatic gas sampling device (GS 312, Desaga, Wiesloch, Germany). Volatiles were trapped on pre-conditioned Tenax[™] TA adsorption tubes which were instantly analyzed or stored sealed at -20°C until GC analysis in a storage container (Gerstel, Mülheim, Germany). A control with deionized water was measured under the same conditions. Glass connections were made with Swagelok tube fittings (Swagelok, Solon OH, USA) and PTFE ferrules (Gerstel, Mülheim, Germany).

Volatiles were thermodesorbed from Tenax[™] TA tubes using a thermal desorption system (TDS 2 and CIS 4, Gerstel, Mülheim, Germany) coupled to a gas chromatograph (Agilent 6890, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) equipped with either a flame ionisation detector (FID, 250°C, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) and an olfactory detection port (ODP, 230°C, equipped

with air moistening, voice recording and recognition software, Gerstel, Mülheim, Germany) or a mass spectrometer (AMD QuAS³AR, AMD Intectra GmbH, Harpstedt, Germany). The thermodesorption of volatiles started at 20°C with a rate of 60°C min⁻¹ to 230°C (hold for 3 min). Re-focussing of the thermodesorbed compounds was accomplished on a liner filled with TenaxTM in the CIS 4 at -10°C. After completed thermodesorption, the CIS was heated in the splitless mode to a final temperature of 230°C at a rate of 12°C s⁻¹ and held for 3 min.

Separation and identification of volatiles was achieved on two columns of different polarity, a DB-Wax and a HP-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, USA) either with a hydrogen flow of 2.0 mL min⁻¹ (GC-O, GC-FID) or a helium flow of 1.2 mL min⁻¹ (GC-MS). The oven temperature was programmed from 40°C (DB-Wax) or 60°C (HP-5) (both isothermal for 3 min), raised at a rate of 3°C min⁻¹ at 100°C and from 100°C to 230°C with a rate of 5°C min⁻¹. For DB-Wax capillary column, the final temperature of 230°C was held for 10 min, for HP-5 capillary column, the temperature was raised from 230°C to a final temperature of 320°C at a rate of 20°C min⁻¹. Volatiles were identified according to their linear retention indices according to van den Dool and Kratz (1963), their odor impression at the sniff-port (at least three trained panelists) and GC-MS-analysis (EI ionization at 70 eV, transfer line temperature 230°C, ion source temperature 200°C). Mass spectra were compared to digital libraries (Wiley 08 / NIST08, 2008) or spectra of authentic standard compounds. Quantification of *n*-hexanal and *n*-hexanol in the storage experiments was achieved according to external calibration curves based on spiked samples of the respective protein extracts (untreated, fermented).

3.3.5.1 TDS-GC-O Flavor dilution analysis

Flavor dilution analysis (FDA) was performed by varying the split ratio of the CIS from splitless mode to split ratios of 1:10, 1:50, 1:100 and 1:200. For each volatile, the flavor dilution (FD) value was assigned as the highest dilution the substance still can be detected by GC-O. Analysis was done in duplicate by trained panelists.

3.4 Results and discussion

The chemical composition of pea flour (*Pisum sativum* Santana) and the corresponding spray-dried pea protein extract were investigated (Tabelle 5). Results obtained for pea flour agreed with data of previous studies. Castell *et al.* (1996) reported for dehulled pea seed a protein content of approximately 25 g/100 g dry matter, Reichert and MacKenzie (1982) published pea protein contents ranging between 14.5 to 28.5 g/100 g showing a Gaussian distribution with a mean value of 20.7 g/100 g. Other research groups have published values between 20.7 to 25.8 g protein per 100 g pea seed (Souci *et al.*, 2008; Stanek *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2007). Ash content varied from 2.8 to 4.2 g/100 g (Castell *et al.*, 1996) and lipid content from 1.0 to 2.1 g/100 g (Souci *et al.*, 2008) or 2.3 to 3.5 g/100 g, respectively (Yoshida *et al.*, 2007).

Tabelle 5: Chemical composition of pea products [g/100 g dry matter]

	Pea flour	Spray-dried protein extract
Dry matter (g/100 g)	88.01 ± 0.05	92.25 ± 1.08
Protein content	25.02 ± 0.16	56.69 ± 1.17
Crude ash content	3.29 ± 0.01	6.02 ± 3.04
Lipid content	2.42 ± 0.09	0.23 ± 0.05

mean value ± standard deviation, n ≥ 2

Protein extracts of pea flour were obtained using aqueous extraction at pH 8.5. A considerably lower protein content of 56.7 g/100 g (dry matter) was found compared to protein preparations gained through stronger alkaline extraction processes (protein content ≥ 80%) (Fernández-Quintela *et al.*, 1997; Swanson, 1990). The aqueous extraction resulted in a low lipid content of 0.2 g per 100 g dry matter, which still represented a source of lipid oxidation and formation of odor-active degradation products.

The main fatty acids (Tabelle 6) of *Pisum sativum* flour and protein extracts were palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acid with a high portion of unsaturated fatty acids. A total of 12.8% or 15.3% of saturated, 14.9% or 18.0% of monounsaturated and 72.2% or 66.6% of polyunsaturated fatty acids was found in

pea flour or pea protein extract, respectively. The main fatty acids accounted for

Tabelle 6: Fatty acid composition of pea flour and spray-dried fermented pea protein extract [%]

Fatty acid	Pea flour	Spray-dried fermented pea protein extract (PPEF)
Saturated		
6:0	Trace	Trace
8:0	Trace	Trace
10:0	n. d.	Trace
11:0	Trace	Trace
12:0	0.53 ± 0.14	Trace
13:0	Trace	Trace
14:0	0.18 ± 0.00	0.20 ± 0.02
15:0	0.17 ± 0.00	0.20 ± 0.01
16:0	8.06 ± 0.18	8.94 ± 0.02
17:0	0.11 ± 0.00	0.13 ± 0.01
18:0	2.9 ± 0.03	4.39 ± 0.51
20:0	0.51 ± 0.01	1.01 ± 0.40
21:0	Trace	0.06 ± 0.00
22:0	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.01
24:0	0.16 ± 0.00	0.17 ± 0.01
Monounsaturated		
14:1	n. d.	Trace
16:1	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00
17:1	Trace	Trace
18:1	14.18 ± 0.01	17.14 ± 0.31
20:1	0.57 ± 0.01	0.76 ± 0.18
22:1	Trace	Trace
Polyunsaturated		
18:2	56.26 ± 0.01	53.01 ± 0.78
18:3	15.81 ± 0.02	13.48 ± 0.06
20:2	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01

mean value ± range/2, n =2 , n. d. not detected

almost 100% of the total lipids, which agreed with data of Coxon and Wright (1985), who analyzed 166 pea genotypes in respect of their fatty acid composition. They reported a high variance in the relative content of the five major fatty acids. Other fatty acids, such as myristic or arachidonic acid, occurred in trace amounts, only. A low occurrence of odd-numbered fatty acids may have originated from incidental microbial contamination of the pea flour or from the intended fermentation flora, respectively.

Tabelle 7: Amino acid composition of pea flour, spray-dried and spray-dried fermented pea protein extracts [g/100 g dry matter]

Amino acid	Pea flour	Spray-dried pea protein extract (PPE)	Spray-dried fermented pea protein extract (PPEF)
Non-essential			
Alanine	0.65 ± 0.06	1.87 ± 0.13	1.79 ± 0.08
Aspartate	2.08 ± 0.19	5.65 ± 0.43	5.54 ± 0.12
Cysteine	0.04 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.00
Glutamate	3.33 ± 0.27	8.55 ± 0.63	8.47 ± 0.11
Glycine	0.56 ± 0.07	1.58 ± 0.10	1.45 ± 0.14
Proline	0.74 ± 0.07	2.40 ± 0.29	2.29 ± 0.15
Serine	1.21 ± 0.11	3.96 ± 0.35	3.83 ± 0.25
Tyrosine	0.65 ± 0.05	2.33 ± 0.26	2.44 ± 0.20
Semi-essential			
Arginine	4.94 ± 0.33	10.32 ± 0.79	9.98 ± 0.18
Histidine	1.07 ± 0.13	2.69 ± 0.24	2.76 ± 0.04
Essential			
Isoleucine	0.54 ± 0.05	1.74 ± 0.15	1.69 ± 0.10
Leucine	0.87 ± 0.08	2.84 ± 0.25	2.77 ± 0.15
Lysine	1.05 ± 0.11	2.84 ± 0.18	2.68 ± 0.11
Methionine	0.08 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.02
Phenylalanine	1.07 ± 0.05	3.28 ± 0.33	3.03 ± 0.25
Threonine	0.52 ± 0.04	1.82 ± 0.20	1.76 ± 0.15
Valine	0.66 ± 0.06	2.01 ± 0.14	1.88 ± 0.14

mean value ± standard deviation, n =3

The amino acid composition of pea flour, spray-dried protein extract and spray-dried fermented protein extract is shown in Tabelle 7. As in other legumes, the content of sulphur-containing amino acids, L-cysteine and L-methionine, was limiting, whereas L-glutamate, L-arginine and L-aspartate were dominating (Daveby et al., 1993; Evans & Donald, 1980; Petterson, 1998). Referring to wheat or barley, the lysine content of legume protein is comparatively high, whereas in cereal proteins sulphur-containing amino acids show relatively high levels (Gatel, 1994; Souci et al., 2008). Complementation of cereal products, such as bread or noodles with pea protein will, thus, results in nutritionally improved food.

As previously reported, fermentation of soy products can lead to sensory appealing products with a reduced risk of off-flavor formation (Blagden & Gilliland, 2005; Kanda et al., 1976). Various strains of lactic acid bacteria were investigated with regard to their potential to reduce and/or mask off-flavor formation in pea protein extracts. From a preceding screening (data not shown), the two most promising strains, *L. plantarum* und *P. pentosaceus*, were selected for pre-storage fermentation of spray-dried pea protein extracts (PPE). To monitor the storage stability, *n*-hexanal/*n*-hexanol formation, both known as basic principles of off-flavor formation in legumes, were chosen as indicators of ongoing fatty acid degradation and spoilage in stored pea protein extracts (Kobayashi et al., 1995; Rackis et al., 1979). GC-analysis of volatiles was carried out using dynamic headspace sampling on Tenax™ TA. Solvent extraction of aroma compounds was not practicable due to the strong foaming properties of the pea protein extracts.

The comparison of liquid and fermented liquid pea protein extracts showed marginal differences in the initial *n*-hexanal content (Abbildung 8). During a storage period of three months at room temperature, a slight increase in the *n*-hexanal concentration was detected in spray-dried pea protein extracts fermented with *P. pentosaceus* as well as in protein extracts fermented with *L. plantarum*, whereupon the increase in the latter was more pronounced. The *n*-hexanol concentrations of the fermented protein extracts showed a slight increase with time, which was stronger in samples treated with *P. pentosaceus*. *L. plantarum* was selected for the following fermentations of pea protein extracts (PPE), because the fermented products of the two strains were found similar in both sensory characteristics and shelf life, and because of its comparably better technological properties (Klotzbücher, 2009).

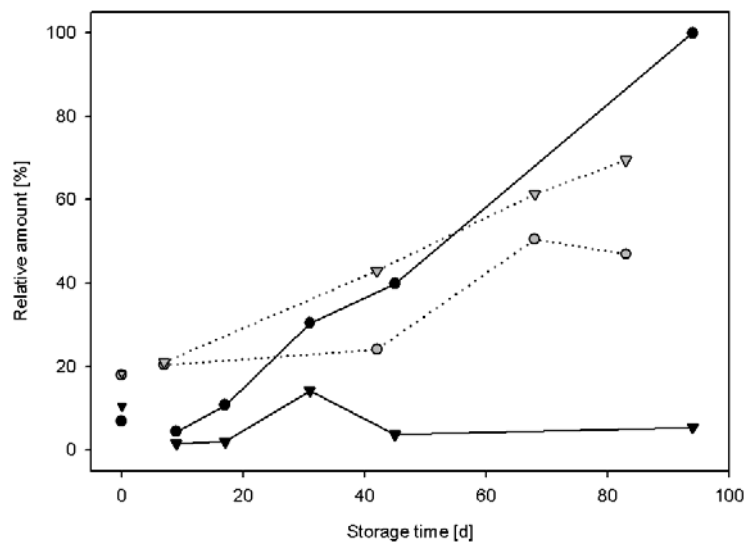


Abbildung 8: Comparison of strains: *n*-Hexanal (*Lactobacillus plantarum* (●), *Pediococcus pentosaceus* (●)) and *n*-hexanol (*Lactobacillus plantarum* (▼), *Pediococcus pentosaceus* (▼)) contents of fermented pea protein extracts (liquid samples (day 0) and kinetics of spray-dried samples (> day 0)) stored under stress storage conditions

A storage experiment under accelerated storage conditions (37°C) compared untreated, pasteurized and fermented (*L. plantarum*) PPE, and a commercial milk protein sample (MP) which was used as a benchmark. The protein extracts were evaluated (GC-O and FDA) at the end of the storage period.

The stored milk protein showed sensory stability and no susceptibility to lipid oxidation under the applied conditions. The *n*-hexanal concentration remained stable over time with 13.0 µg / 100 mL at day 1 and 13.8 µg /100 mL at day 97 (Abbildung 9). Ulberth and Roubicek (1995) obtained similar results for tempered and dark-stored whole milk powder over a four-month period. In untreated pea protein extracts, the *n*-hexanal concentration at the beginning of the storage experiments was comparable to that of the milk protein. In the course of the storage experiment, a slight increase of the *n*-hexanal concentration in the two untreated protein extracts S1 and S2 was observed. S1 started on a higher initial level and had a larger slope than S2 with a maximum *n*-hexanal value of 26.1 µg /100 mL at day 87. Preliminary tests (data not shown) indicated that the pasteurization process led to a noticeable increase of *n*-hexanal in protein extracts which was partly compensated by the spray-drying process prior to the storage experiments. An exemplarily course of *n*-hexanal formation in a pasteurized protein extract stored over a three-month period under the same conditions showed a high initial *n*-hexanal concentration (50.7 µg /100 mL) but, similar to untreated samples, only a slight increase to 67.4 µg hexanal per 100 mL at

day 87. Apparently, the heat treatment of the extracts during pasteurization, which is necessary prior to inoculation of PPE with lactic acid bacteria, induced lipid oxidation.

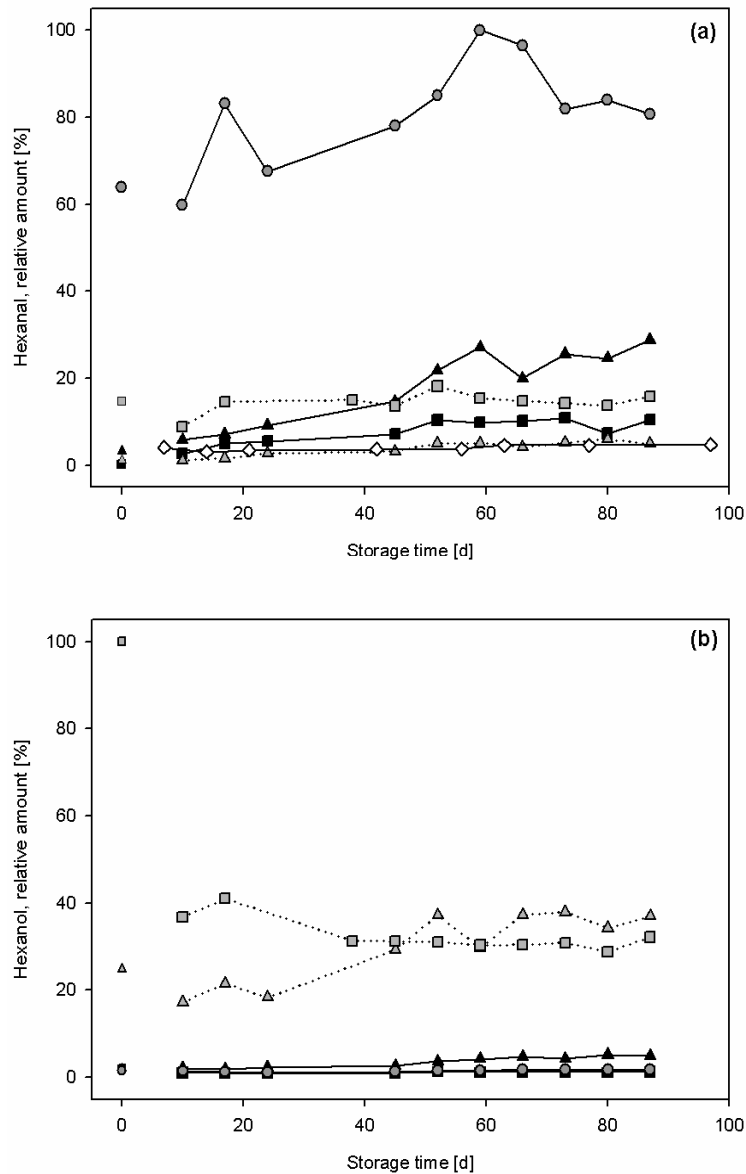


Abbildung 9: Comparison to a reference milk protein: *n*-Hexanal (a) and *n*-hexanol (b) contents in untreated (S1 (▲), S2 (△)), pasteurized (●) and fermented (*L. plantarum*) (S1 (■), S2 (□)) pea protein extracts (liquid samples (day 0) and kinetics of spray-dried samples (> day 0)); milk protein (◇), 3 months at 37°C in the dark.

A possible reason for the initiation of lipid oxidation might be the release of transient metal ions such as ferrous iron upon protein denaturation. Strongly fluctuating basal *n*-hexanal/hexanol-concentrations in pasteurized samples indicated that the pasteurization process was not reproducible with respect to the initial formation of *n*-hexanal/hexanol. Nevertheless, fermentation of the pasteurized protein extracts

counterbalanced the disadvantageous effect of pasteurization. Initial values of fermented samples at day 10 were comparable to those of untreated samples. Fermented samples were characterized by sufficient storage stability and a negligible regeneration of *n*-hexanal until day 87.

In MP, *n*-hexanol was not present. Over the three-month storage period, no obvious changes were observed in PPEP and PPEF, and the level of *n*-hexanol remained almost constant. The second storage experiment S2 showed generally higher initial values than the first (S1), but generation of *n*-hexanol was comparable in both samples. In PPE, a slight increase was observed over time. The increase of *n*-hexanol concentration in untreated spray-dried samples compared to pasteurized or fermented could possibly be explained by residual activities of alcohol dehydrogenases and/or of reduction equivalents, which are supposed to be destroyed completely in PPEP and PPEF during pasteurization.

A maximum *n*-hexanol concentration of about 15 µg / 100 mL (S2, PPE) after a storage time of three months indicated that *n*-hexanol was not involved in the formation of a green and beany off-flavour in spray-dried pea protein extracts. Its odor threshold of 500 ppb in water (Buttery et al., 1999) was not reached during the storage experiments. In contrast, the detected *n*-hexanal concentration of 26 µg /100 mL (S1, PPE) in untreated and fermented spray-dried protein extracts were above the odor threshold of 4.5 ppb in water (Buttery et al., 1999). Hence, *n*-hexanal was a key aroma compound which may have impaired the sensorial acceptance of PPE. The *n*-hexanal concentration was reduced during the fermentation process, and no negative effects on storage stability were observed.

Unfermented and fermented pea protein extracts were characterized by a nutty, green, and cereal-like odor. Comparing PPE and PPEF, the odor of PPEF was described as more pleasant with weak milky attributes. With regard to its odor threshold and the concentrations analyzed during storage, changes in *n*-hexanal concentration obviously did not adversely affect the pleasant smell of fermented protein extracts. Changes of the smell of fermented pea protein extracts might have originated from slight alterations of the concentration of volatiles masking the green off-flavor expected from the *n*-hexanal present. To identify additional key odor compounds and to gain insight into the change of the aroma profile of fermented protein extracts, comprehensive GC-O and GC-MS analyses of PPE and PPEF were

performed. In general, concentrations of aroma compounds were lower at the

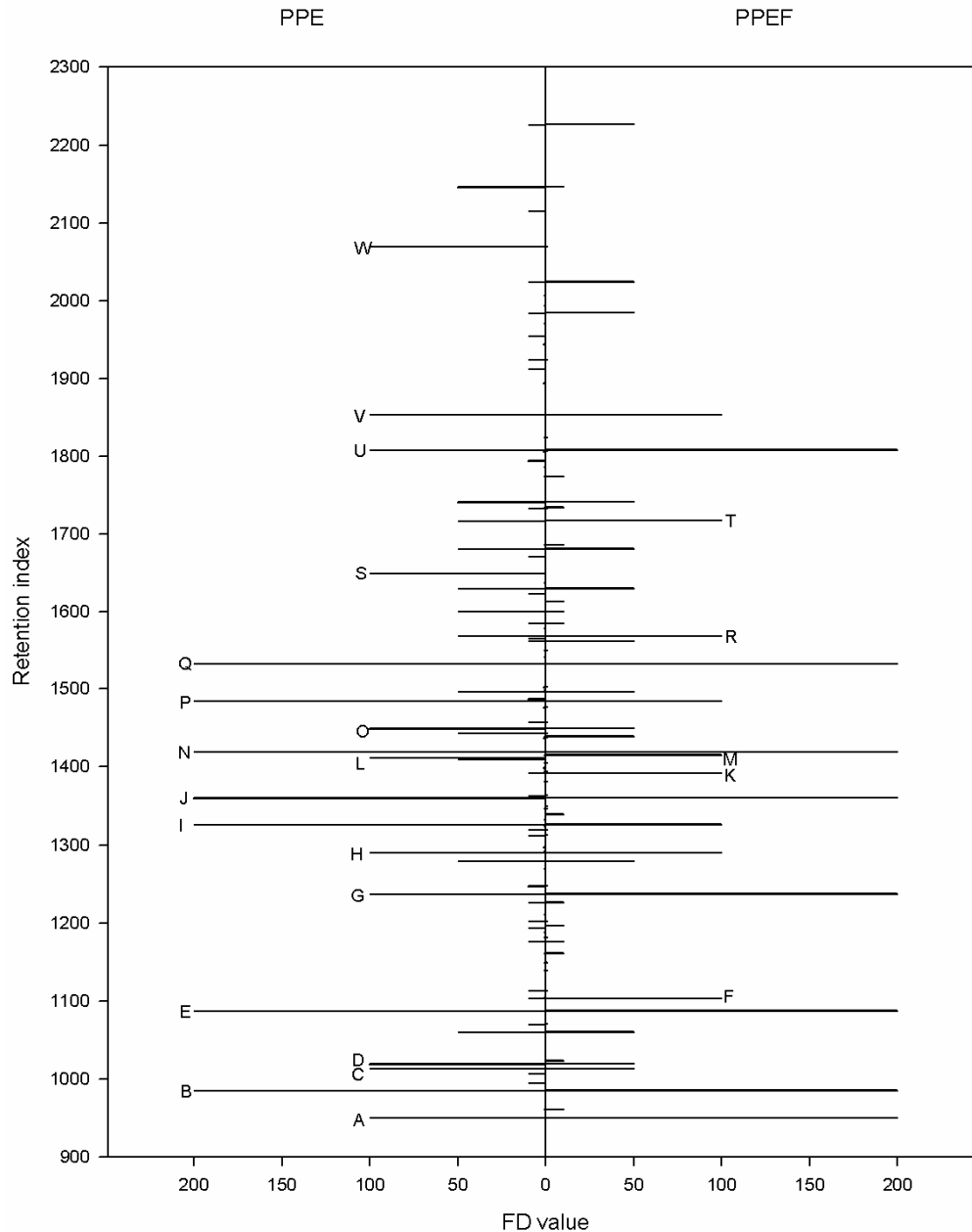


Abbildung 10: Aroma active compounds of spray-dried untreated (PPE) and spray-dried and with *L. plantarum* fermented (PPEF) protein extracts of *Pisum sativum* Santana and odor impressions of substances with FD values ≥ 100 : **A**, tentatively butan-2-one: pungent, cheese; **B**, *n*-pentanal: green, milky, sweet; **C**, sweet, solvent-like; **D**, 1-pyrroline: sperm; **E**, *n*-hexanal: grass, green; **F**, solvent-like; **G**, methionine-like; **H**, 1-octen-3-one: mushroom; **I**, 2,5-dimethylpyrazin: nutty, moldy, cereal-like; **J**, dimethyl trisulfide: fecal, sulfurous; **K**, 3-octen-2-one: mushroom, moldy, burnt; **L**, dusty, cereal-like; **M**, 2,5-dimethyl-3-ethylpyrazine: burnt, pungent; **N**, burnt, dusty, leather-like; **O**, oct-1-en-3-ol: mushroom, earthy, burnt; **P**, burnt, cereal-like, dusty; **Q**, burnt, pungent; **R**, burnt, pungent; moldy **S**, savory, cereal-like, broth; **T**, sweet, rubber-like, soapy; **U**, β -damascenone: sweet, floral, rose; **V**, guaiacol: smoky, sweet, hay; **W**, soapy, leather-like

beginning of the storage experiments than at the end, because the spray-drying process with a peak temperature of 180°C vaporized almost completely the genuine

content of volatiles. However, at the end of the storage experiment, approximately seventy aroma-active substances were identified (Tabelle 8). Most of the compounds were found in both, PPE as well as in PPEF, but in different concentrations. As amino acids and fatty acids are progenitors of volatiles, variations of lipid or amino acid concentration originating from the fermentation process are likely to result in different aroma profiles. Most of the volatiles identified *via* GC-MS were products of lipid degradation or derived from the Strecker degradation of amino acids.

To explain the superior sensorial properties of the fermented pea protein extracts compared to the untreated protein extracts, a flavor dilution analysis of PPE and PPEF was performed (Abbildung 10). In undiluted samples, a multitude of odors was perceived, predominant with musty, sweet or cereal-like odor impressions. After a first dilution step (1:10), around half of the odorants was not sensed any longer. Flavor compounds still perceived at the two highest dilution levels were supposed to be key aroma compounds. As the detector signal was insufficient for many of the sniffed volatiles, the identification efforts were focused on the strongest odorants. In total, 23 strong odor substances were found in both untreated (PPE) and fermented (PPEF) protein extracts at dilutions of 1:100 and 1:200, but considerable differences in the dilution profile were detected. Eighteen substances were detected in PPE, and seventeen were found in PPEF as key aroma compounds. Only two of the volatiles (L, S) were exclusively detected in PPE and not in PPEF. Twelve of the 23 most important volatiles (A, B, D, E, H, I, J, K, M, O, U, V in Figure 3) were identified *via* GC-MS, linear retention index and/or standard addition. Odor impressions perceived at a dilution of 1:200 in PPE were characterized as green/milky (B), grassy (E), nutty/moldy/cereal-like (I), fecal/sulfurous (J), burnt/leather-like (N), burnt/cereal-like (P) and burnt/pungent (Q). Five of these compounds (B, E, J, N and Q) were also established as the strongest odors of PPEF, the other two compounds (P and I) were found in PPEF up to a dilution of 1:100. Two more substances, A (pungent/cheese-like) and U (floral/rose-like), were perceived at a dilution of 1:200 in PPEF and at a dilution of 1:100 in PPE. They were identified as β -damascenone (substance U) and as butan-2-one (substance A). Substances B, E, I and J were identified as *n*-pentanal, *n*-hexanal, 2,5-dimethylpyrazine and dimethyl trisulfide.

Table 8: Volatile compounds of spray-dried untreated (PPE) and spray-dried fermented (PPEF) protein extracts of *Pisum sativum* Santana

No.	Compound	Measured RI		PPE	PPEF	Odor in region of peak	Identification ^a
		CP-Wax	HP-5				
1	Butanal	< 1000	n. d.	+	++	pungent	MS, O, RI
2	Butan-2-one	< 1000	n. d.	++	++	pungent, cheese	MS, O, RI
3	3-Methylbutanal	< 1000	< 1000	+++	++	pungent, cheese	MS, O, RI
4	Pentanal	< 1000	< 1000	+++	+++	green, milky, sweet	MS, O, RI
5	Butane-2,3-dione	1006	< 1000	■	n. d.	milky, sweet	MS, O, RI
6	1-Pyrroline	1011	n. d.	+	n. d.	sperm	MS, O
7	Pentane-2,3-dione	1058	n. d.	+	+	milky, sweet	MS, O, RI
8	Dimethyl disulfide	1064	n. d.	■	■	putrid, moldy	MS, O, RI
9	Hexanal	1094	< 1000	+++	+++	green, grass	MS, O, RI, S
10	Pent-2-enal	1126	n. d.	++	++	fruity, banana	MS, O, RI
11	Butan-1-ol	1142	n. d.	+	n. d.	-	MS, RI
12	Pent-1-en-3-ol	1161	< 1000	+++	+++	bread-like	MS, O, RI
13	Heptan-2-one	1181	< 1000	+++	+++	-	MS, RI
14	Heptanal	1184	< 1000	+	+++	sweet, floral, citrus-like	MS, O, RI
15	3-Methylbutan-1-ol	1209	< 1000	++	+	-	MS, RI
16	Hex-2-enal	1214	< 1000	++	++	sweet, tea-like	MS, O, RI
17	2-Pentylfuran	1230	< 1000	+	+++	-	MS, RI
18	Pentan-1-ol	1255	< 1000	+++	+++	-	MS, RI

No.	Compound	Measured RI		PPE	PPEF	Odor in region of peak	Identification ^a
		CP-Wax	HP-5				
19	Octan-2-one	1279	< 1000	++	++	sweet, soapy, fruity	MS, O, RI
20	Octanal	1284	1005	+	++	soapy, sweet, citrus-like	MS, O, RI
21	1-Octen-3-one	1290	n. d.	n. d.	n. d.	mushroom	O, RI, S
22	2,5-Dimethylpyrazine	1311	< 1000	+	+	Nutty, moldy, cereal-like	MS, O, RI
23	Hept-2-enal	1316	< 1000	+	++	-	MS, RI
24	Pent-2-en-1-ol	1323	n. d.	++	++	-	MS, RI
25	Octane-2,3-dione	1328	< 1000	n. d.	++	-	MS, RI
26	6-Methylhept-5-en-2-one	1333	< 1000	+	++	nutty, moldy, cereal-like	MS, O, RI
27	Hexan-1-ol	1360	< 1000	+++	+++	green	MS, O, RI, S
28	Dimethyl trisulfide	1360	< 1000	■	■	sulfur, fecal, pungent	MS, O, RI
29	2-Ethyl-6-methylpyrazine	1378	n. d.	+	+	-	MS, RI
30	Hex-3-en-1-ol	1383	< 1000	++	n. d.	-	MS, RI
31	Nonan-2-one	1384	1046	n. d.	+	-	MS, RI
32	Nonanal	1389	1106	+	++	floral, sweet, soapy	MS, O, RI
33	3,5-Octadien-2-ol	1398	1038	+	n. d.	-	MS
34	3-Octen-2-one	1401	n. d.	n. d.	++	mushroom, moldy, burnt	MS, O, S
35	Oct-2-enal	1419	1056	+	++	-	MS, RI
36	Octan-2-ol	1422	n. d.	+	n. d.	-	MS, RI
37	2,5-Dimethyl-3-ethylpyrazine	1432	1082	■	■	burnt, pungent	MS, O, RI

No.	Compound	Measured RI		PPE	PPEF	Odor in region of peak	Identification ^a
		CP-Wax	HP-5				
38	Oct-1-en-3-ol	1454	< 1000	++	++	mushroom, earthy, burnt	MS, O, RI, S
39	Heptan-1-ol	1458	< 1000	++	++	-	MS, RI
40	Decan-2-one	1485	1194	■	n. d.	-	MS, RI
41	Hepta-2,4-dienal	1486	1012	n. d.	++	-	MS, RI
42	2-Ethylhexan-1-ol	1493	1029	+	++	-	MS, RI
43	Benzaldehyde	1506	< 1000	++	+++	Almond, marzipan	MS, O, RI
44	3,5-Octadien-2-one	1512	1098	+	+++	-	MS, RI
45	Non-2-enal	1522	1159	■	+	-	MS, RI
46	Octan-1-ol	n. d.	1072	n. d.	■	-	MS, RI
47	Undecan-2-one	1590	1295	■	+	-	MS, RI
48	Dec-2-enal	n. d.	1262	n. d.	■	-	MS, RI
49	Oct-2-en-1-ol	1616	n. d.	■	+	-	MS, RI
50	2-Butyloct-2-enal	1657	1374	+	++	-	MS, RI
51	Nonan-1-ol	1664	1173	+	++	-	MS, RI
52	Nona-2,4-dienal	1687	1213	■	+	-	MS, RI
53	Undec-2-enal	1738	1364	■	■	-	MS, RI
54	Decan-1-ol	1765	1275	■	+	-	MS, RI
55	Deca-2,4-dienal	1793	1316	■	n. d.	-	MS, RI
56	Geraniol	n. d.	1256	n. d.	■	-	MS, RI

No.	Compound	Measured RI		PPE	PPEF	Odor in region of peak	Identification ^a
		CP-Wax	HP-5				
57	Tridecan-2-one	1799	1496	■	n. d.	-	MS, RI
58	β -Damascenone	1808	1382	■	■	sweet, floral, fruity	MS, O, RI, S
59	Tridecanal	1808	1510	+	n. d.	-	MS, RI
60	Undecan-1-ol	n. d.	1393	n. d.		-	MS, RI
61	Geranyl acetone	1846	1453	■	+	sweet, floral	MS, O, RI
62	Hexanoic acid	1852	n. d.	■	+	-	MS, RI
63	Guaiacol	1853	n. d.	■	n. d.	smokey, sweet, green, moldy	O, RI, S
64	Tetradecanal	1916	1612	++	n. d.	floral	MS, O, RI
65	Dodecan-1-ol	1969	n. d.	■	■	-	MS, RI
66	Deca-2,4-dien-1-ol	1992	1325	n. d.	+	-	MS, RI
67	5-Pentylidihydro-2(3H)-furanone	2007	1361	■	+	peach, coconut	MS, O, RI
68	Pentadecanal	2022	1716	+++	+	-	MS, RI
69	4-Vinylguaiacol	2226	n. d.	n. d.	n. d.	smokey, curry, spicy	O, RI, S

^aMS =,mass spectrometry; O = odor impression; RI = linear retention index; S = comparison with standard.

n.d. not detected, ■ Traces, + small amounts, ++ medium amounts, +++ high amounts

In previous studies *n*-alkanals were detected in the headspace of linoleic acid substrates during autoxidation or after addition of pea or soybean lipoxygenases as well as in soy protein isolates (Boatright & Lei, 1999; Sessa & Rackis, 1977; Ullrich & Grosch, 1987). Rackis et al. (1979) described *n*-hexanal as the compound contributing most to the green and beany off-flavor of pea and soybean. *n*-Pentanal and *n*-hexanal feature low odor thresholds of 12 ppb (*n*-pentanal) (Buttery et al., 1988) and 4.5 ppb (*n*-hexanal) in water (Buttery et al., 1999), respectively.

Many different pathways can be involved in the formation of pyrazines (Shu, 1999; P.-S. Wang & Odell, 1973). 2,5-Dimethylpyrazine can be formed from all amino acids (Adams et al., 2008). Its odor is described as nutty, musty, meaty roast or green. Due to its low odor threshold of 80 ppb in water, 2,5-dimethylpyrazine is perceived in low concentrations and contributes to the aroma of pea protein extracts (Maga, 1992; Mihara & Masuda, 1988). The odorant responsible for the sulfurous, fecal odor was identified as dimethyl trisulfide, which was also found in soy protein isolates (Boatright & Lei, 1999). Methanethiol was identified as a possible biogenetic precursor in soy protein isolates (Boatright & Lei, 2000). Dimethyl trisulfide was either formed in the presence of methanethiol, Fe (III) or Cu (II) and ascorbate, or in presence of methanethiol, Cu (II) and H₂S (Chin & Lindsay, 1994; Nedjma & Hoffmann, 1996). Due to its very low odor threshold of 0.008 ppb in water, dimethyl trisulfide probably plays a major role in the flavor of pea protein extracts (Milo & Grosch, 1996). Likewise, β -damascenone, which was identified in the two highest dilution steps of untreated (1:100) and fermented (1:200) pea protein extracts, has a very low odor threshold of 0.002 ppb in water (Buttery, Teranishi, Ling et al., 1990). A possible explanation for its occurrence might be the degradation of carotenoid precursors (Sachihiko et al., 1973).

Moreover the following odor active compounds were detected in both untreated and fermented extracts: 1-Pyrroline (substance D) at dilutions of 1:100 in PPE and 1:50 in PPEF, oct-1-en-3-one (substance H) in both PPE and PPEF at a dilution of 1:100, oct-1-en-3-ol (substance O) at dilutions of 1:100 in PPE and 1:50 in PPEF and guaiacol (substance V) at a dilution of 1:100 in both PPE and PPEF. 3-Octen-2-one (substance K) and 2,5-dimethyl-3-ethylpyrazine (substance M) were found only in PPEF in noteworthy concentrations. 1-Pyrroline is characterized by a sperm-like odor and a low odor threshold of 22 ppb in water (Amoore et al., 1975). Several formation pathways for 1-pyrroline are conceivable, *inter alia* the Strecker degradation of

proline or the oxidation of the possible precursors spermine, spermidine or putrescine, which were dominating polyamines of soybean (Amoore et al., 1975; L. C. Wang, 1972; Yoshikawa et al., 1965). The C8-compounds are known to possess low odor thresholds (oct-1-en-3-one, 0.005 ppb (Buttery, Teranishi, Flath et al., 1990), and oct-1-en-3-ol, 1 ppb (Buttery et al., 1988) in water). 3-Octen-2-one and 1-octen-3-one were found to contribute to the aroma of soy protein isolates (Lei & Boatright, 2001). De Lumen et al. showed that 1-octen-3-ol was one of the main degradation products of linoleic acid in green beans (de Lumen et al., 1978). GC-O and GC-MS analysis confirmed guaiacol as another impact compound in fermented pea protein extracts, which probably originated from ferulic acid, a ubiquitous component of plant cell walls (Dorfner et al., 2003; Iiyama et al., 1994). With its odor threshold of 3 ppb in water, small amounts of guaiacol can contribute decisively to the over-all aroma (Buttery et al., 1988). Extracts of PPE and PPEF were characterized by additional odor impressions, such as solvent, methionine-like, burnt or cereal-like odors. As no visible peaks were detected *via* GC-MS, identification was not feasible.

In summary, most of the volatiles identified were degradation products of amino acids or fatty acids. Accordingly, they were common to PPE and PPEF. The more pleasant odor of PPEF compared to PPE can only be explained by its altered aroma profile. Fermentation has the potential to decrease the *n*-hexanal content and to reduce or mask off-flavors in pea protein extracts.

3.5 Acknowledgement

This research project was supported by the German Ministry of Economics and Technology (via AiF) and the FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn). Project AiF 15045 N. We thank W. Back and B. Klotzbücher for designing and performing the lactic fermentations.

4 Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated.

Published in Meat Science, 2010, 86 (2), 317-323. Reprinted with kind permission from Elsevier.

4.1 Abstract

Chicken breast and beef muscle were treated at 400 and 600 MPa for 15 min at 5°C and compared to raw meat and a heated sample (100°C for 15 min). Vacuum-packed beef meat with a smaller fraction of unsaturated fatty acids showed better oxidative stability during 14 days of cold storage, as shown by a low steady-state level of hydroperoxide values, than vacuum-packed chicken meat. Accordingly, the critical pressures of 400 MPa and 600 MPa for chicken breast and beef sirloin, respectively, were established. Volatiles released after opening of the meat bags or during storage of open meat bags, simulating consumer behaviour, were measured under conditions mimicking eating. Quantitative and olfactory analysis of pressurised meat gave a total of 46 flavour volatiles, mainly alcohols (11), aldehydes (15), and ketones (11), but all in low abundance after 14 days of storage. Overall, beef meat contained less volatiles and in lower abundance (factor of 5) compared to chicken meat. The most important odour active volatiles (GC-O) were well below the detection thresholds necessary to impart a perceivable off-flavour. Lipid oxidation was significantly accelerated during 24 hours of cold storage in both cooked chicken and beef when exposed to oxygen, while the pressurised and oxygen-exposed chicken and beef meat remained stable. Pressure treatment of beef and chicken did not induce severe changes of their raw aroma profiles.

Keywords: High pressure, beef, chicken, lipid oxidation, aroma

4.2 Introduction

High hydrostatic pressure is forecasted to be a technology able to provide convenient, high quality, and chemical free preserved meat products with fresh, natural flavours and tastes, as requested by consumers. Generally, it is assumed that the fresh flavour is retained in pressurised food products, since small flavour molecules are not affected by high pressure. However, high pressure may affect chemical and enzymatic reactions resulting in changes of the fresh flavour profile. Regarding meat products, the major chemical deteriorative reaction is lipid oxidation, and several investigations have dealt with the effect of pressure on lipid oxidation in various raw meats, muscles, and meat products (Beltran et al., 2003, 2004; Bragagnolo et al., 2005; Campus et al., 2008; Cava et al., 2009; Cheah & Ledward, 1995; 1996, 1997; Dissing et al., 1997; Ma et al., 2007; Mariutti et al., 2008; Orlie, Hansen et al., 2000; Tume et al., 2010; Wiggers et al., 2004). Although different meats and products show different effects of high pressure on their oxidative stability, depending on temperature, pressure level and duration, treatment between 400 and 600 MPa seems to be critical for oxidative damage in chicken breast (Ma et al., 2007; Orlie, Hansen et al., 2000), minced chicken meat (Beltran et al., 2003; Mariutti et al., 2008), turkey thigh (Dissing et al., 1997), and whole beef muscle (Ma et al., 2007). It is well known that heat treatment of meat initiates lipid oxidation and enhances the development of off-flavours during long-term storage (Igene et al., 1979; Igene et al., 1985; Kerler & Grosch, 1996). At the same time, upon heating the flavour profile of meat is changed and new compounds are produced, primarily by lipid oxidation and Maillard browning reactions, which together are responsible for the desired cooked flavour of meat. To our knowledge, only one study has assessed the changes in the volatile profile of heated meat following pressurisation (400 MPa) of beef and chicken breast. This study concluded that pressure treatment affected the levels of some volatile compounds produced by microbial activity (Rivas-Cañedo et al., 2009). Even though raw meat has little aroma, it is of importance to investigate if high pressure processing maintains the aroma profile of raw meat, since the released volatile compounds on opening the package must be acceptable to the consumers and should remain stable for some additional time in the refrigerator.

The aim of the present study was to investigate changes in the aroma profiles in chicken breast and beef sirloin (*m. longissimus dorsi*) high pressure treated at 400

and 600 MPa, which is in the vicinity of the critical pressure for lipid oxidation, compared to raw and heat treated meat and thus demonstrate the potential of high pressure processing to produce new meat products, like cold cuts or ready-to-eat meals.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Preparation of meat samples

Frozen chicken breast was obtained from ECB Kød A/S (Copenhagen, Denmark), thawed overnight at 5°C. Fresh, vacuum packed beef muscle (sirloin) was obtained from ECB Kød A/S (Copenhagen, Denmark). Samples (approximately 30 g) of both types of meat were packed in separate polyethylene bags (90MY, PA/PY 20/70, SFK, Hvidovre, Denmark) on a packaging machine (KOMET Vakuum-Verpacken, KOMET Maschinenfabrik GmbH, Plochingen) operating at 99% vacuum.

4.3.2 Characterisation of meat

The fatty acid compositions of raw chicken and beef meat were determined according to Jart (1997) with the following modification. Prior to analysis, the fatty acids were methylated directly from 50 mg of freeze-dried meat. Analysis of α -tocopherol content in chicken and beef meat was performed as previously described (Jensen et al., 1997), and expressed as mg of α -tocopherol per kg of meat using an external standard curve (concentration range from 0.25 to 10 mg/L) for α -tocopherol (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany).

4.3.3 High pressure and thermal processing

The vacuum-packed meat samples were submerged in the pressurizing chamber of a QUINTUS Food Processing Cold Isostatic Press QFP-6 (ABB Pressure Systems, Västerås, Sweden) with water thermostated at 5°C as the pressure transmission fluid. The meat samples were exposed to hydrostatic pressure at 400 or

600 MPa for 15 min. The pressures were reached within 1 and 2 min, respectively, and depressurisation was achieved within 30 s. The processing conditions used for pressure treatment were chosen from what is realistic for high pressure processing in the meat industry to obtain microbial stable products. Samples for heat treatment were cooked by immersion of the bags in water at 100°C for 15 min and cooled on ice-bath.

4.3.4 Storage of meat

Two storage experiments were carried out. Following high pressure and heat treatment the bags together with bags of the raw (control) meat were transferred to a room at 5°C for storage up to 14 days, with sampling on days 0, 7, and 14. Day 0 refers to treatment day, thus immediately after pressure- or heat treatment, or after vacuum-packaging of the raw meat. Upon sampling the meat samples were frozen at -40°C until analysis (not longer than 3 weeks). Before measurements, the meat samples were thawed at room temperature under controlled conditions. Experiment 1 simulated retail conditions in which the measurements were conducted immediately after thawing and opening of the bags. Experiment 2 was appended to storage experiment 1 and simulated consumer's behaviour in which the bags were opened after thawing and subsequently stored aerobically at 8°C for up to 24 hours before analysis.

4.3.5 Measurement of lipid oxidation

In experiment 1, oxidation was monitored by analysis of primary oxidation products. The fat from 5 g of meat was extracted by homogenising with 15 mL of chloroform/methanol (2:1), then transferring the chloroform/methanol phase to a reagent glass, evaporating the chloroform phase followed by the determination of peroxide value. The peroxide values were obtained using a method based on IDF standard (1991) entailing reaction of peroxides with iron(II) chloride and ammonium thiocyanate, followed by absorbance measurement at 500 nm after a reaction time of 2 min, of the red iron(III) thiocyanate complex using a standard curve based on H₂O₂.

The peroxide value is reported as milli-equivalents peroxide/kg fat. The results are the means of measurements on two different samples exposed to the same treatment.

4.3.6 Measurement of aroma compounds

The changes in aroma profile of the meat were monitored by analysis of volatile compounds for the two storage experiments. In experiment 1, the volatiles were measured immediately after opening of the bags. The tempered (37°C, to mimic mouth temperature) meat samples were minced for 10 s (did not change temperature) using a customary blender (Krups Speedy Pro) and a portion of 15 g was weighed into a 100 mL three-neck flask. After addition of 19 mL of pre-tempered (37°C) artificial saliva (according to Jenkins (1978), but without enzymes and cAMP) the 100 mL three-neck flask was placed into a water bath (37°C) and the sample was stirred at 700 rpm using a magnetic stirrer equipped with an electronic temperature controller (IKA, Staufen, Germany). Dynamic headspace sampling was started immediately by purging pre-cleaned air (activated carbon adsorption cartridge) through the three-neck flask. For sufficient concentrations of volatiles their release was accumulated during 10 min at a constant flow rate of 0.2 L min⁻¹ to a total sampling volume of 2.0 L under the control of an automatic gas sampling device (GS 312, Desaga, Wiesloch, Germany). After passing a Liebig condenser at 10°C in order to retain excessive water, the volatiles released were finally trapped on adsorption tubes filled with TenaxTM TA 60/80. The condensed water was found to be free of detectable amounts of any volatiles. The adsorption tubes were pre-cleaned and pre-conditioned (Tube Conditioner TC 2, Gerstel, Mülheim, Germany) prior to use with clean, dry nitrogen at 230°C for 30 min and stored sealed prior to use. A second serial adsorption tube showed that a breakthrough of volatiles did not occur during analysis. A control without any meat was measured under the same conditions.

Volatiles trapped on TenaxTM TA were analysed using an Agilent 6890 gas chromatograph equipped with a thermal desorption system (TDS 2 and CIS 4, Gerstel, Mülheim, Germany) and the following parameters: TDS 2: 20°C (tube assembly) to 230°C hold for 2 min (60°C min⁻¹, tube desorption), CIS at -10°C (re-focussing of volatiles) afterwards the CIS was heated to 230°C (12°C min⁻¹, 2 min) in

the splitless mode. Separation of volatiles was achieved on a 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm capillary column (DB-Wax, J&W Scientific, Folsom, USA or HP-5, J&W Scientific, Folsom, USA) with 2 mL min^{-1} hydrogen (GC-FID) or 1 mL min^{-1} helium (GC-MS) as carrier gas using the following temperature program: 35°C (hold for 3 min) with a rate of 2°C min^{-1} to 50°C, with a rate of 6°C min^{-1} to 100°C and with a rate of 15°C min^{-1} to 230°C, hold for 5 min. The effluent of the column was split (1:1) and volatiles were detected either using flame ionisation detection (FID, at 250°C), or an odour detection port (ODP, at 230°C, equipped with air moistening, voice recording and recognition software, Gerstel, Mülheim, Germany). Identification of volatiles was achieved according to linear retention indices, odour impression (at least three trained panellists) and GC-MS-analysis (QUASAR, AMD, Harpsted, Germany; 70 eV EI ionisation, mass range 33-350 amu) conducted under the same chromatographic conditions. Mass spectra were compared to those of authentic standard compounds or those retrieved from digital libraries (Wiley 08 / NIST08). The sensory analyses by the panellists were for informative description of the odour impression, while the comparison of the treatments was based on the quantitative analytical results.

In experiment 2, the bags were opened (meat exposed to atmospheric air) and stored at 8°C with monitoring of *n*-hexanal formation over a period of 24 h (0, 4, 10, and 24 h). The content of *n*-hexanal in the meat samples was calculated according to an external calibration curve (concentration range from 0 to 24.5 $\mu\text{g}/15\text{ g}$ meat) compiled using the respective meat matrix. Aliquots of *n*-hexanal stock (245 $\mu\text{g mL}^{-1}$) solution were added on to the meat sample immediately analysed.

4.4 Results and Discussion

The treatment of meat, the storage conditions, and subsequent analysis were carried out to mimic industrial processes, retail distribution, and finally to evaluate the sensorial acceptance of the meat. Numerous factors affect lipid oxidation and aroma development, the fat content, the degree of unsaturation of the fatty acids, the presence of pro- and antioxidants, and the oxygen availability are the most important. Hence, the fatty acid composition, vitamin E content, peroxide value, and release of volatile compounds were chosen to evaluate the meat.

4.4.1 Lipid oxidation

For each type of meat the fatty acid compositions and vitamin E contents, will affect the oxidative stability. The total fat content of the chicken meat was 1.23 ± 0.3 with an unsaturated fatty acid composition of 3.2% palmitoleic acid, 35.4% oleic acid, 27.7% linoleic acid, and 0.6% linolenic acid (38.6% MUFA and 28.3% PUFA). The total fat content of the beef was $4.76 \pm 1.2\%$ with an unsaturated fatty composition of 4.7% palmitoleic acid, 45.2% oleic acid, 3.2% linoleic acid, and 0.4% linolenic acid acids (49.9% MUFA and 3.6% PUFA). There were no differences in the fatty acid compositions of both types of meat as a function of processing or storage.

α -Tocopherol, being the most important antioxidant present in meat, was measured prior to storage and on the last day of storage. The chicken meat and beef meat were found to have 4.13 ± 1.6 mg α -tocopherol/kg meat and 1.76 ± 0.7 mg α -tocopherol/kg meat, respectively, independent of processing and storage.

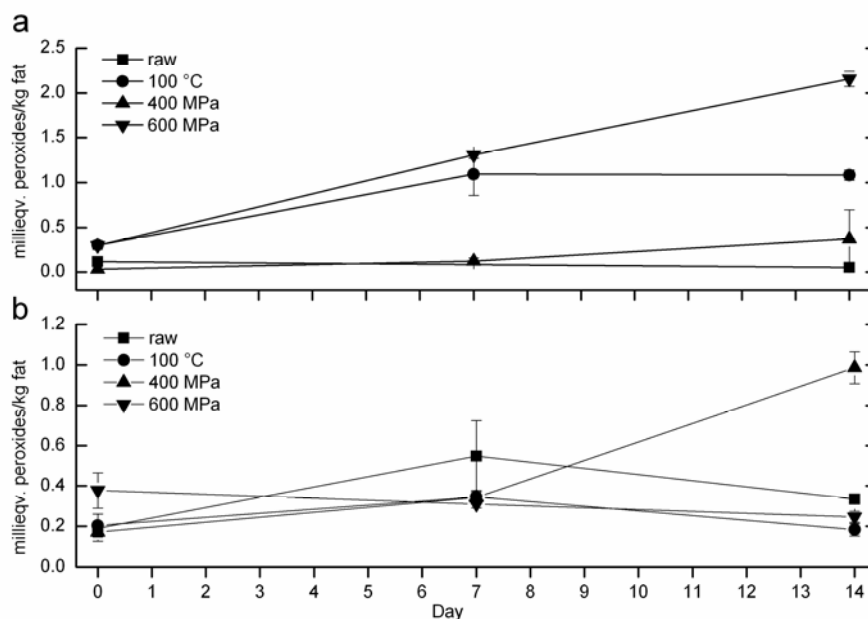


Abbildung 11: Peroxide value of raw, heat treated (100°C, 15 min), or pressure treated (400 or 600 MPa, 15 min, 5°C) chicken breast (a) and beef sirloin (b) during subsequent storage at 5°C in the dark. Bar is standard deviation.

The effect of the different processing methods on the oxidative stability of chicken and beef meat during subsequent chill storage (experiment 1) is shown in Abbildung 11. Lipid hydroperoxides are the primary oxidation products and, thus, a precursor for further decomposition into the volatile secondary oxidation products causing off-flavours in meat. Heat treatment at 100°C for 15 min and high pressure treatment at

600 MPa for 15 min induced some lipid oxidation in chicken meat, seen as a small increase in the peroxide value in Abbildung 11 (a). In contrast, the steady-state level of lipid hydroperoxides in raw chicken meat and chicken meat pressure-treated at 400 MPa for 15 min indicates that lipid oxidation was not initiated (Abbildung 11 (a)). This is in agreement with previous findings that high pressure treatment of chicken breast meat above 600 MPa increases lipid oxidation as measured by TBARS (Ma et al., 2007; Mariutti et al., 2008; Orlien, Hansen et al., 2000). The beef meat was more resistant to pressure and heat, therefore more stable than chicken meat, as seen from the low steady-state level of peroxide values in Abbildung 11 (b). The apparent high oxidation level in beef pressurised at 400 MPa at day 14 was unexpected, and no obvious explanation can be given. The better oxidative stability was expected, since beef contains a smaller fraction of unsaturated fatty acids compared to chicken meat and vitamin E was not consumed. However, Ma et al. (2007) found that pressure treatment ≥ 400 MPa markedly increased lipid oxidation in beef, and that it was more prone to lipid oxidation than chicken meat. The post-slaughter history and small variations in the quality of the raw material may have different effects on the development of lipid oxidation at pressures in the vicinity of the critical pressure. In addition, the formation and accumulation of lipid hydroperoxides, following degradation into secondary lipid oxidation products, as measured by TBARS, in different types of meat and different experiments are not directly comparable. The extent of oxidation of lipids in meat is usually not quantified by measurement of peroxide values due to the complicated extraction of the fat phase prior to analysis. However, the peroxide value serves as a useful indicator for the initial process of lipid oxidation, and has proved suitable for monitoring oxidation in vegetable oils (Orlien, Andersen et al., 2000; Shantha & Decker, 1994), semi-hard cheese (Mortensen et al., 2002), walnut (Jensen et al., 2001), butter, fish oil, chicken fat, and cooked beef fat (Shantha & Decker, 1994). The two types of meat used in this study, differ not only in fatty acid compositions, but also in the content of pro- and antioxidants. The higher content of myoglobin, which is a potential pro-oxidant and source of free iron, is likely to contribute to an increased initiation of lipid oxidation in beef. Conclusions on the effectiveness of heme iron and free iron in the catalysis of lipid oxidation in meat subjected to high pressure are not clear (e.g. Ma et al., 2007 and Orlien, Hansen et al., 2000). However, no increased catalytic activity from myoglobin was observed, as both pressurised beef and chicken meat had an induction period of 14

days (Abbildung 11). The higher content of α -tocopherol, which is a chain-breaking antioxidant, is likely to contribute to a reduced formation of lipid hydroperoxides in chicken meat. However, there was no consumption of α -tocopherol irrespective of treatment and storage. It may be concluded that chicken meat pressurised at 400 MPa and beef pressurised up 600 MPa has a shelf-life of 14 days.

4.4.2 Volatiles

In order to verify this in detail, the volatiles released from meat in experiment 1 were determined using dynamic headspace sampling under conditions close to those occurring in the mouth during eating (Rabe et al., 2002) and compared. The flavour analysis of the non-stored (day 0) meat gave no meat and lipid oxidation-derived volatiles irrespective of type of meat or treatment. This is explained by the vacuum-packaging, which removed almost completely the flavour compounds present in meat. It is noted, though, that traces of *n*-hexanal and some hydrocarbons such as pentane, hexane, branched-chained alkanes, and alkylated benzene derivatives were found, presumably released from the packaging material (data not shown). Moreover, it established the starting point of the aroma profile and any changes will, thus, be a result of the combined treatment and storage. This is in accordance with results of Rivas-Cañedo, Fernández-García and Nuñez (2009) who investigated the effect of the packaging material on the volatile composition of pressurised meat samples. The general assumption that flavour is retained in pressurised food is addressed upon comparing with the stored (day 14) meat. Firstly, upon opening the bags after 14 days of storage the panel sensed an unpleasant off-flavour of microbial spoilage of the untreated (raw) beef and chicken, whereas for the heat and pressure treated chicken and beef a weak, but typical of the respective meat type, odour emerged during orthonasal flavour perception (panel of 5 individuals). Secondly, quantitative and olfactory data of pressurised meat flavour are presented, and after 14 days of storage a total of 46 volatiles were identified in chicken and beef meat (Tabelle 9). The volatile profiles composed mainly alcohols (11), aldehydes (15), and ketones (11), all in low abundance. This is in agreement with the low peroxide values of all samples (Abbildung 11) verifying that lipid oxidation in vacuum packaged meat was not accelerated during storage. Overall, the beef samples had less volatiles and,

especially, indicators of lipid oxidation such as *n*-hexanal, pentanal, and C8 compounds were lower by a factor of approximately 5, compared to the chicken samples (Tabelle 9). Clearly, the higher PUFA fraction of the chicken meat (28.3% compared to 3.6% in beef), and not the total fat content, causes the dominance of volatile compounds in chicken meat.

Tabelle 9: Volatiles identified in control (raw), cooked (100°C) and pressurized (400 or 600 MPa) chicken (C) and beef (B) after 14 d storage at 5°C (experiment 1). Numbers indicate the relative amount of each volatile corresponding to 50 µg 100g⁻¹ hexanal (index 5) in descending order, and the notation – indicates that the volatile was not detected.

Compound	RI	RI	C ₁₀₀	C _{raw}	C ₄₀₀	C ₆₀₀	B ₁₀₀	B _{raw}	B ₄₀₀	B ₆₀₀
	CW20M	HP-5								
Methyl acetate	827	530	-	-	-	-	-	4	-	-
Butanal	880	n.d.	1	-	1	-	-	1	-	-
Ethanol	885	509	-	-	-	-	4	-	4	3
Methyl propionate	913	891	-	-	-	-	-	4	-	-
Butan-2-one	920	576	3	2	2	3	2	5	2	3
3-Methyl butanal	925	640	2	-	-	1	-	-	-	-
2,5-Dimethylfuran	951	698	1	-	-	-	-	-	-	-
Butan-2,3-dione	965	573	-	-	-	-	-	3	-	-
Methyl butanoate	977	703	-	-	-	-	-	5	-	-
Pentan-2-one	984	n.d.	-	-	-	-	-	4	-	-
Pentanal	990	n.d.	4	1	4	2	1	1	1	1
4-Methyl-pentan-2-one	1003	n.d.	1	-	-	-	-	-	-	-
Butan-2-ol	1008	594	-	-	-	-	-	4	-	-
Toluene	1025	765	1	-	1	2	1	5	1	1
2-Methyl-pentan-3-one	1053	n.d.	1	-	1	-	-	-	-	-
Dimethyl disulfide	1056	738	1	-	-	-	-	-	-	-
Hexanal	1071	881	5	4	5	5	1	1	1	2
3-Methyl butan-1-ol acetate	1111	1087	-	-	-	-	-	-	1	1
4-Methyl pent-3-en-2-one	1118	n.d.	1	-	-	-	-	-	-	-
Heptan-3-one	1134	881	1	1	1	1	-	-	-	-
Pent-1-en-3-ol	1159	680	1	-	1	1	-	-	-	-
Heptanal	1165	889	1	1	1	2	1	-	1	1
1-Octen-3-one	1240	n.d.	1	1	1	1	-	-	-	1

Compound	RI	RI	C ₁₀₀	C _{raw}	C ₄₀₀	C ₆₀₀	B ₁₀₀	B _{raw}	B ₄₀₀	B ₆₀₀
	CW20M	HP-5								
Pentan-1-ol	1253	780	3	3	2	3	-	-	-	1
3-Hydroxy butan-2-one	1272	721	-	-	-	-	-	1	-	1
Octanal	1274	1063	1	1	2	2	1	1	1	1
Cyclopentanol	1298	802	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS
Hept-2-enal	1308	n.d.	1	1	1	1	-	-	-	-
Octan-2,3-dione	1314	982	2	1	2	2	-	-	-	-
Nonan-3-one	1337	1091	1	1	1	1	1	1	1	1
Hexan-1-ol	1345	862	1	1	1	1	-	1	1	1
Nonanal	1373	1108	2	1	2	3	1	1	2	2
Methyl octanoate	1375	1254	-	-	-	-	-	3	-	-
Oct-2-enal	1402	1063	1	-	1	1	-	-	-	-
Oct-1-en-3-ol	1437	964	3	3	4	4	-	-	-	-
Acetic acid	1449	n.d.	1	1	-	1	-	-	1	1
Decanal	1475	1211	1	-	1	1	1	-	-	1
2-Ethyl hexanol	1476	1043					-	1	-	-
Benzaldehyde	1490	950	1	1	1	1	2	-	1	1
Non-2-enal	1524	1148	1	-	1	-	-	-	-	-
Octan-1-ol	1538	1077	1	1	1	1	-	1	-	1
Methyl decanoate	1569	1398	-	-	-	-	-	1	-	-
Oct-2-en-1-ol	1587	1073	1	2	2	2	-	-	-	-
Phenylethanal	1606	1200	-	-	-	-	-	1	-	-
Deca-2,4-dienal	1763	1321	1	-	1	-	-	1	-	-
Benzylalcohol	1830	1195	-	-	-	-	1	1	-	-

IS = internal standard; n.d. = not determined

Interestingly, independent of fat content and fat type, the raw beef was more spoiled than the raw chicken meat, as products of enzymatic and microbial activity, like short chained aldehydes, ketones, and methyl ester, were found in larger amounts in beef. Comparing the treatments within meat types, it was found that volatile lipid oxidation-derived compounds in beef and chicken were of the same order of magnitude in raw, cooked, and pressurised meat, respectively. Apparently,

Table 10: Flavour notes of clearly distinguishable odours detected by GC-O-analysis in chicken and beef.

Flavour note	RI	Compound	Chicken	Beef	Odour-threshold [ppm]
	CW20M				
Solvent, sweet, pungent	920	Butan-2-one	++	++	50.0 ^{°a}
Caramel, sweet, milky, cheesy	965	Butan-2,3-dione	++	++	0.015 ^{°b}
Fruity, sweet, glue, pungent	1008	Butan-2-ol	+	++	28.1 ^{°c}
Grass, green	1071	Hexanal	+++	+++	5.87 ^{*d}
Banana	1111	3-Methyl butyl acetate	~	+	0.003 ^{°e}
Fishy	1165	Heptanal	+	+++	0.23 ^{*d}
Soapy, citrus-like, floral	1274	Octanal	++	++	0.0007 ^{°e}
Mushroom, fungi	1314	Octan-2,3-dione	+++	+++	0.11 ^{°f}
Soapy, citrus-like, cereal-like	1375	Methyl octanoate	+	++	0.2 ^{°g}
Fungi, potato-like	1437	Oct-1-en-3-ol	+	++	0.001 ^{°h}
Bread-like, roasted, green,	1475	Decanal	~	+	0.005 ^{°e}
Green, fruity, burnt, soapy	1538	Octan-1-ol	+	+++	0.065 ^{°c}
Oily, moldy, green, cucumber-like	1587	Oct-2-en-1-ol	+	-	0.04 ^{°i}
Honey, sweet, fruity, floral	1606	Phenylethanal	+	++	0.004 ^{°e}

- not detected, ~ found in few samples, + weak, ++ medium, +++ strong;

° determined in water, *determined in lean ground beef

^a Wick

^b Blank et al.

^c Schnabel et al.

^d Brewer & Vega

^e Belitz et al.

^f Sigrist et al.

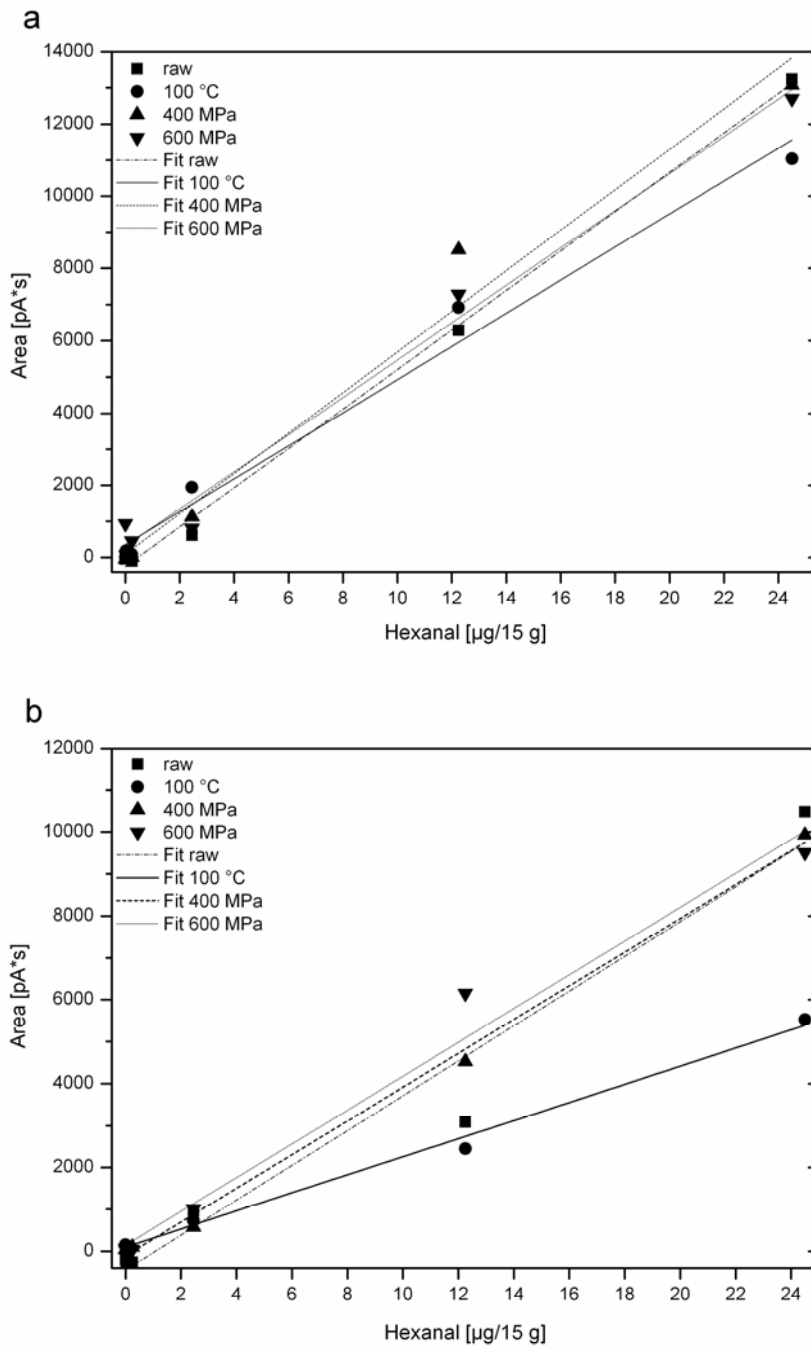
^g Takeoka et al.

^h Buttery et al.

ⁱ Pyysalo & Suihko

pressure treatment of beef and chicken does not induce severe changes of the raw aroma profile of either meat type. The composition of volatiles released are in good accord with the work of Rivas-Cañedo et al. (2009) on pressurised chicken and beef

meat in terms of lipid oxidation products. The most important odour active volatiles



were revealed by GC-O analysis to be *n*-hexanal (green), heptanal (fishy), octan-2,3-dione (mushroom-like), and oct-1-en-3-ol (moldy, mushroom-like) (Tabelle 10). The odour threshold value of each compound (Tabelle 10) explains why the meat samples did not exhibit a perceivable off-flavour. Most odour-threshold values were determined in pure water or in air and not in meat which would be necessary for an accurate evaluation. *n*-Hexanal, for instance, has been reported to exhibit a threshold

value of 0.05 mg kg^{-1} in tap water (Larsen & Poll, 1992) and 5.87 mg kg^{-1} in a meat/water model system (Brewer & Vega, 1995), showing an increase in the threshold value of two orders of magnitude from water to meat. Presuming a similar tendency, all volatiles, even the most odour-active compounds, remained below their threshold values in meat. Among these volatiles *n*-hexanal, as an indicator of warmed-over flavour (WOF, St. Angelo et al., 1987), was selected for monitoring the progression of lipid oxidation during storage of the open bags (experiment 2).

Storage experiment 2 was conducted to mimic consumer's behaviour; meat is consumed or cooked instantly or, if it is not consumed at once, further stored in the refrigerator. Accurate quantification of *n*-hexanal during the dynamic headspace sampling was obtained by an external calibration curve recorded in the respective *n*-hexanal-spiked meat matrix (Abbildung 12). The cooking of beef meat resulted in a significantly lower slope of the *n*-hexanal calibration curve whereas a similar curve was obtained for all other meat matrices. During cooking the beef became more dry and firm, protein denaturation and formation of carbonyl reactive compounds occurred which together resulted in increased *n*-hexanal adsorption and/or binding and, consistently, in a decreased release. This finding confirms that flavour release and odour-threshold values depend crucially on the respective food matrix (Brewer & Vega, 1995; Rabe et al., 2002; Rabe et al., 2004), accordingly, calibration curves were recorded in the respective matrix. During the 24 h of storage in the refrigerator, when meat was exposed to oxygen, lipid oxidation was significantly accelerated in the cooked meat samples (Abbildung 13). A moderate increase in *n*-hexanal formation in the first 10 h was followed by accelerated *n*-hexanal formation in both cooked chicken and beef due to the progression phase of lipid oxidation. The maximum *n*-hexanal content of about $200 \mu\text{g}$ before and $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ after a 24 h exposure to oxygen is in accord with results of Kerler and Grosch who reported maximum *n*-hexanal concentrations of $269 \mu\text{g}$ in cooked beef meat patties before and $2329 \mu\text{g kg}^{-1}$ after refrigeration (Kerler & Grosch, 1996). Cooked meat is prone to lipid oxidation most likely due to the catalytic effect of heme iron and/or free iron ions released from heme pigments. This explains the increased *n*-hexanal formation during aerated storage of cooked meat (Abbildung 13). Contrary to the cooked meat, the pressurised, oxygen-exposed and raw, oxygen-exposed chicken and beef meat remained stable during 24 h of cold storage (Abbildung 13). Only beef pressurised at 600 MPa showed increased *n*-hexanal formation, but to a much lower extent

compared than the cocked meat. For beef and chicken meat one can conclude that high pressure treatment below 600 MPa provides sensorially stable products during chill storage, with or without exposure to air, up to 24 hours or 14 days, respectively.

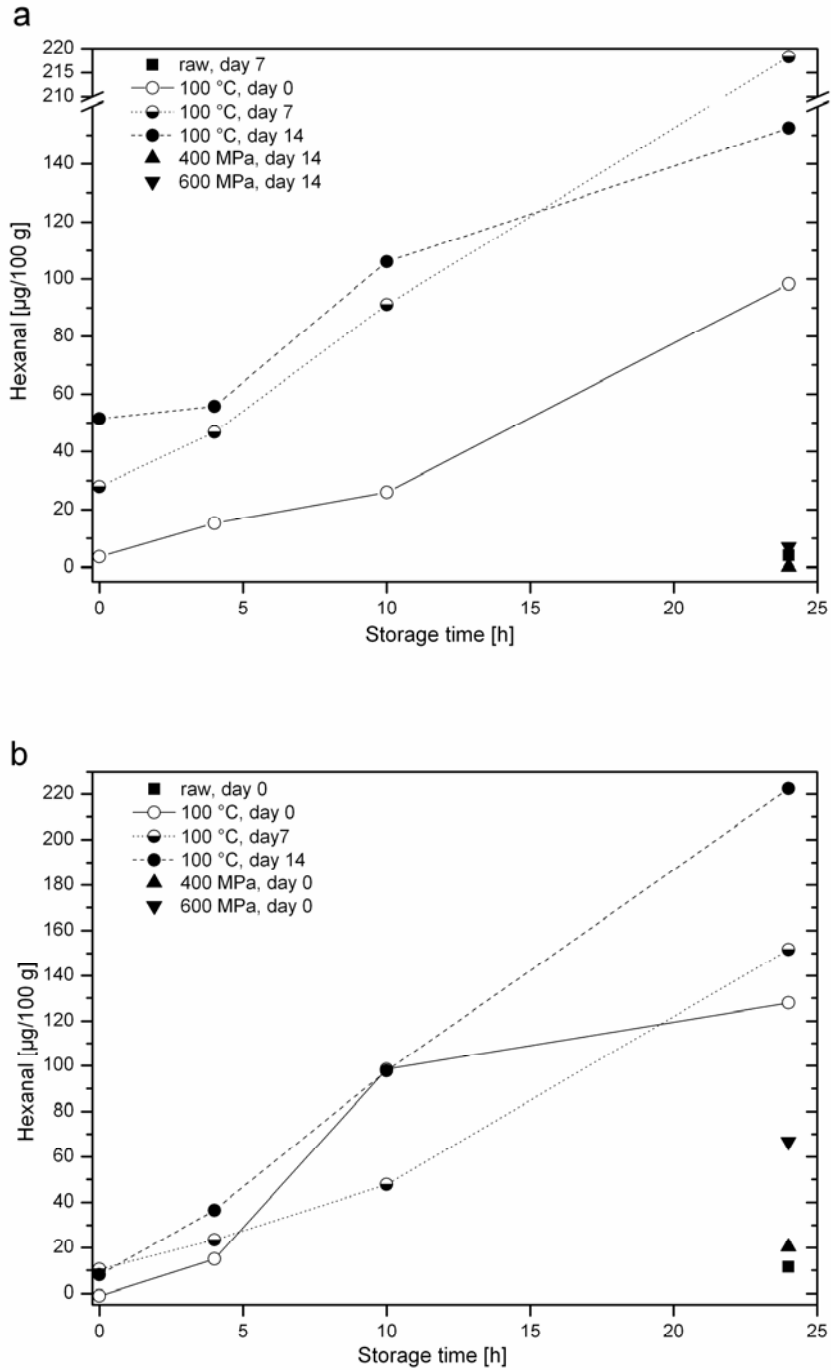


Abbildung 13: Kinetics of *n*-hexanal formation in chicken breast (a) and beef sirloin (b) of different treatments after re-exposure to oxygen. For clarity only the data points of measurements of heat treated meat at 0, 4, and 10 h are shown and connected with lines for visual improvement.

Sophisticated sampling (dynamic headspace) and detection (GC-MS) facilities confirmed that pressurisation does not result in severe changes of the aroma profiles. Lipid oxidation followed by off-flavour formation gains importance for cooked and high pressure (600 MPa) treated meat only when vacuum packaged meat is re-exposed to oxygen. In contrast to cooked meat high pressure treated samples showed no (400 MPa) or a considerably delayed (600 MPa) lipid autoxidation when the meat was re-exposed to oxygen. For practical implementation of the high pressure technology to produce high quality sensorially stable meat products is promising.

5 Zusammenfassung

Fehlaromen in Lebensmitteln werden häufig durch flüchtige Abbauprodukte der Lipidperoxidation verursacht. Die Fermentation von Leguminosenproteinextrakten sollte zu einer Verringerung des häufig während der Lagerung entstehenden grünen Fehlaromas führen. Im Falle von rohem Fleisch kann eine zur Haltbarmachung durchgeführte Hochdruckbehandlung Lipidperoxidation verursachen und somit ein Fehlaroma hervorrufen. Der Einfluss der technologischen Prozesse der Fermentation und der Hochdruckbehandlung auf die Lagerstabilität und die Aromastoffprofile der entsprechenden Lebensmittel wurde untersucht. Die Bildung von *n*-Hexanal als Indikator für die fortschreitende Lipidoxidation und somit den Verderb des jeweiligen Lebensmittels wurde analytisch bestimmt. Zudem wurden Aromastoffprofile von unbehandelten und behandelten Produkten miteinander verglichen und die aromabestimmenden Substanzen unfermentierter und fermentierter Leguminosenproteinextrakte mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse ermittelt.

Fermentierte Leguminosenproteinextrakte wiesen eine gute Lagerstabilität auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Fermentation den Hexanalgehalt der Proteinextrakte verringert. Sowohl in unbehandelten als auch in fermentierten Leguminosenproteinextrakten konnten mehr als 20 flüchtige Substanzen mit Verdünnungsfaktoren gleich oder größer als 100 bestimmt werden, unter ihnen *n*-Hexanal, 1-Pyrrolin, Dimethyltrisulfid, 1-Octen-3-on, 3-Octen-2-on und β -Damascenon. Durch die Fermentation wurde das Aromaprofil der Leguminosenproteinpräparate signifikant verändert, was zu einer Reduzierung und Maskierung unerwünschter Aromastoffe führte.

Durch quantitative und olfaktometrische Analysen von hochdruckbehandeltem Fleisch konnten insgesamt 46 flüchtige Substanzen, darunter hauptsächlich Alkohole, Aldehyde und Ketone, nachgewiesen werden, die jedoch auch nach 14tägiger Lagerung nur in Spurenkonzentrationen vorkamen. Im Allgemeinen enthielt Rindfleisch, verglichen mit Hähnchenfleisch, eine geringere Anzahl flüchtiger Substanzen, die zudem auch niedrigere Gehalte (Faktor 5) aufwiesen. Die wichtigsten geruchsaktiven Verbindungen (GC-O) lagen deutlich unterhalb der Detektionsschwelle, die für die Wahrnehmung eines Fehlaromas nötig gewesen wäre. Während der Lagerung unter Sauerstoffexposition blieben sowohl das Hochdruck behandelte Hähnchenfleisch als auch das Rindfleisch stabil.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Fermentation von Leguminosenproteinextrakten eine geeignete Methode zur Verringerung eines durch Lipidperoxidation verursachten Fehlromas ist. Die sachgerechte Hochdruckbehandlung zur Haltbarmachung von rohem Fleisch führte nicht zu sensorisch wahrnehmbaren Veränderungen der Aromaprofile .

Schlagwörter: Lipidperoxidation, *n*-Hexanal, Fermentation, Leguminosenproteinextrakte, Hochdruckbehandlung, Fleisch

6 Summary

Off-flavors in foods are often induced by volatile degradation products of lipid peroxidation. Fermentation of legume protein extracts was examined as a means to decrease the green off-flavor frequently developed during storage. In the case of raw meat preservation, high pressure processing is suspected to cause lipid oxidation and to generate off-flavors. The influence of the technological processes of fermentation and high pressure treatment on storage stability and aroma profiles of the corresponding foods was analyzed. *n*-Hexanal formation was monitored as an indicator of progressing lipid oxidation and, thus, spoilage of the respective food. Furthermore, aroma profiles of untreated and treated products were compared, and the important aroma substances of unfermented and fermented legume protein extracts were identified via aroma extract dilution analysis.

Fermented legume protein extracts possessed an improved storage stability. Fermentation reduced the *n*-hexanal concentration of respective protein extracts. In both untreated and fermented legume protein extracts more than 20 volatile substances with dilution factors equal to or higher than 100 were determined, among them *n*-hexanal, 1-pyrroline, dimethyl trisulfide, 1-octen-3-one, 3-octen-2-one and β -damascenone. Fermentation amended the aroma profile of legume protein preparations significantly by reduction or masking of undesirable flavors.

Quantitative and olfactory analysis of pressurized meat gave a total of 46 volatiles, mainly alcohols, aldehydes and ketones, but all in low concentration after 14 days of storage. Overall, beef meat contained less volatiles and in lower abundance (factor of 5) compared to chicken meat. The most important odour active volatiles (GC-O) were found below the respective detection thresholds necessary to impart a perceivable off-flavour. During storage both pressurized chicken and beef meat remained stable.

In summary it was demonstrated that fermentation of legume protein extracts is a suitable method for the reduction of off-flavors caused by lipid peroxidation. Appropriate pressure treatment as a preservation method for raw meat did not result in sensorially perceivable changes of the aroma profiles.

Keywords: Lipid peroxidation, *n*-hexanal, fermentation, legume protein extracts, high pressure processing, meat

7 Literaturverzeichnis

- Acquaah, G. (2007). *Principles of Plant Genetics and Breeding*. Malden: Blackwell Publishing
- Adams, A., Polizzi, V., van Boekel, M., & De Kimpe, N. (2008). Formation of Pyrazines and a Novel Pyrrole in Maillard Model Systems of 1,3-Dihydroxyacetone and 2-Oxopropanal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 2147-2153.
- Aganga, A. A., & Tshwenyane, S. O. (2003). Feeding Values and Anti-Nutritive Factors of Forage Tree Legumes. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(3), 170-177.
- Alamanou, S., Bloukas, J. G., Paneras, E. D., & Doxastakis, G. (1996). Influence of protein isolate from lupin seeds (*Lupinus albus* ssp. *Graecus*) on processing and quality characteristics of frankfurters. *Meat Science*, 42(1), 79-93.
- Aliani, M., & Farmer, L. J. (2005). Precursors of Chicken Flavor. II. Identification of Key Flavor Precursors Using Sensory Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6455-6462.
- Ames, J. M., & Macleod, G. (1984). Volatile Components of an Unflavored Textured Soy Protein. *Journal of Food Science*, 49(6), 1552-1565.
- Amoore, J. E., Forrester, L. J., & Buttery, R. G. (1975). Specific anosmia to 1-pyrroline: The spermous primary odor. *Journal of Chemical Ecology*, 1(3), 299-310.
- Angersbach, A., & Knorr, D. (1997). Anwendung elektrischer Hochspannungsimpulse als Vorbehandlungsverfahren zur Beeinflussung der Trocknungscharakteristika und Rehydratationseigenschaften von Kartoffelwürfeln. *Food / Nahrung*, 41(4), 194-200.
- AOAC (1995). *Official methods of analysis of AOAC International* (16th ed.). Arlington, Virginia, USA: Assoc. Off. Anal. Chem.

- AOAC (1996). *Official methods of analysis of AOAC International* (16th ed.). Arlington, Virginia, USA: Assoc. Off. Anal. Chem.
- Bader, S., Czerny, M., Eisner, P., & Buettner, A. (2009). Characterisation of odour-active compounds in lupin flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(14), 2421-2427.
- Balasubramaniam, V. M., & Farkas, D. (2008). High-pressure Food Processing. *Food Science and Technology International*, 14(5), 413-418.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4th rev. and exp. ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2007). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (6 ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Beltran, E., Pla, R., Yuste, J., & Mor-Mur, M. (2003). Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science*, 64(1), 19-25.
- Beltran, E., Pla, R., Yuste, J., & Mor-Mur, M. (2004). Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. *Meat Science*, 66(3), 719-725.
- Bengtsson, B., & Bosund, I. (1966). Lipid Hydrolysis in Unblanched Frozen Peas (*Pisum sativum*). *Journal of Food Science*, 31(4), 474-481.
- Blagden, T. D., & Gilliland, S. E. (2005). Reduction of Levels of Volatile Components Associated with the "Beany" Flavor in Soymilk by Lactobacilli and Streptococci. *Journal of Food Science*, 70(3), 186-189.
- Blank, I., Sen, A., & Grosch, W. (1991). Aroma impact compounds of Arabica and Robusta coffee. Qualitative and quantitative data. *Fourteenth International Conference on Coffee Science, San Francisco, 1991ASIC*, 91, 117-129

- Boatright, W. L., & Lei, Q. (1999). Compounds Contributing to the "Beany" Odor of Aqueous Solutions of Soy Protein Isolates. *Journal of Food Science*, 64(4), 667-670.
- Boatright, W. L., & Lei, Q. (2000). Headspace Evaluation of Methanethiol and Dimethyl Trisulfide in Aqueous Solutions of Soy-protein Isolates. *Journal of Food Science*, 65(5), 819-821.
- Bouton, P. E., Ford, A. L., Harris, P. V., Macfarlane, J. J., & O'Shea, J. M. (1977). Pressure-Heat Treatment of Postrigor Muscle: Effects on Tenderness. *Journal of Food Science*, 42(1), 132-135.
- Bragagnolo, N., Danielsen, B., & Skibsted, L. (2005). Effect of rosemary on lipid oxidation in pressure-processed, minced chicken breast during refrigerated storage and subsequent heat treatment. *European Food Research and Technology*, 221(5), 610-615.
- Brennan, J. G. (Ed.). (2006). *Food processing handbook*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Brewer, M. S., & Vega, J. D. (1995). Detectable Odor Thresholds of Selected Lipid Oxidation Compounds in a Meat Model System. *Journal of Food Science*, 60(3), 592-595.
- Bull, M. K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R., et al. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(2), 135-149.
- Buttery, R. G., Orts, W. J., Takeoka, G. R., & Nam, Y. (1999). Volatile Flavor Components of Rice Cakes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4353-4356.

- Buttery, R. G., Teranishi, R., Flath, R. A., & Ling, L. C. (1990). Identification of additional tomato paste volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 792-795.
- Buttery, R. G., Teranishi, R., Ling, L. C., & Turnbaugh, J. G. (1990). Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1), 336-340.
- Buttery, R. G., Turnbaugh, J. G., & Ling, L. C. (1988). Contribution of volatiles to rice aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5), 1006-1009.
- Campus, M. (2010). High Pressure Processing of Meat, Meat Products and Seafood. *Food Engineering Reviews*, 2(4), 256-273.
- Campus, M., Addis, M. F., Cappuccinelli, R., Porcu, M. C., Pretti, L., Tedde, V., et al. (2010). Stress relaxation behaviour and structural changes of muscle tissues from Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) following high pressure treatment. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 192-198.
- Campus, M., Flores, M., Martinez, A., & Toldrá, F. (2008). Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin. *Meat Science*, 80(4), 1174-1181.
- Castell, A. G., Guenter, W., & Igbasan, F. A. (1996). Nutritive value of peas for nonruminant diets. *Animal Feed Science and Technology*, 60(3-4), 209-227.
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., & Ramírez, M. R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(1), 76-81.
- Cerletti, P., & Duranti, M. (1979). Development of lupine proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 460-463.
- Cheah, P. B., & Ledward, D. A. (1995). High-pressure effects on lipid oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(9), 1059-1063.

- Cheah, P. B., & Ledward, D. A. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43(2), 123-134.
- Cheah, P. B., & Ledward, D. A. (1997). Catalytic Mechanism of Lipid Oxidation following High Pressure Treatment in Pork Fat and Meat. *Journal of Food Science*, 62(6), 1135-1139.
- Cheftel, J. C. (1995). Review : High-pressure, microbial inactivation and food preservation / Revisión: Alta-presión, inactivación microbiológica y conservación de alimentos. *Food Science and Technology International*, 1(2-3), 75-90.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46(3), 211-236.
- Chen, G., Zhang, J., & Ye, J. (2001). Determination of puerarin, daidzein and rutin in *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 923(1-2), 255-262.
- Chin, H.-W., & Lindsay, R. C. (1994). Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide. *Food Chemistry*, 49(4), 387-392.
- Clouston, J. G., & Wills, P. A. (1969). Initiation of Germination and Inactivation of *Bacillus pumilus* Spores by Hydrostatic Pressure. *Journal of Bacteriology*, 97(2), 684-690.
- Clouston, J. G., & Wills, P. A. (1970). Kinetics of Initiation of Germination of *Bacillus pumilus* Spores by Hydrostatic Pressure. *Journal of Bacteriology*, 103(1), 140-143.
- Cox, B. (1998). Marketing and Trade. In J. S. Gladstones, C. Atkins & J. Hamblin (Eds.), *Lupin as crop plants: biology, production and utilisation* (pp. 437-454). Wallingford, Oxon: CAB International.

- Coxon, D. T., & Wright, D., J. . (1985). Analysis of pea lipid content by gas chromatographic and microgravimetric methods. genotype variation in lipid content and fatty acid composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9), 847-856.
- Dagnia, S. G., Petterson, D. S., Bell, R. R., & Flanagan, F. V. (1992). Germination alters the chemical composition and protein quality of lupin seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(4), 419-423.
- Damude, H. G., & Kinney, A. J. (2008). Enhancing Plant Seed Oils for Human Nutrition. *Plant Physiology*, 147(3), 962-968.
- Daveby, Y. D., Abrahamsson, M., & Åman, P. (1993). Changes in chemical composition during development of three different types of peas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63(1), 21-28.
- de Lumen, B. O., Stone, E. J., Kazeniak, S. J., & Forsythe, R. H. (1978). Formation of volatile flavor compounds in green beans from linoleic and linolenic acids. *Journal of Food Science*, 43(3), 698-702.
- Delcarte, J., Fauconnier, M.-L., Hoyaux, P., Jacques, P., Thonart, P., & Marlier, M. (2000). Revue bibliographique : l'hydroperoxyde lyase. *Biotechnology. Agronomy. Society and Environment*, 4(3), 157-167.
- Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. (2003). *DGF-Einheitsmethoden : Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen* (2., Aufl., Stand: Mai 2002. ed.). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Dissing, J., Bruun-Jensen, L., & Skibsted, L. H. (1997). Effect of high-pressure treatment on lipid oxidation in turkey thigh muscle during chill storage. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 205(1), 11-13.
- Dorfner, R., Ferge, T., Kettrup, A., Zimmermann, R., & Yeretjian, C. (2003). Real-Time Monitoring of 4-Vinylguaiacol, Guaiacol, and Phenol during Coffee

- Roasting by Resonant Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5768-5773.
- Duszkiewicz-Reinhard, W., Gujska, E., & Khan, K. (1994). Reduction of Stachyose in Legume Flours by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Science*, 59(1), 115-117.
- Eilamo, M., Kinnunen, A., Latva-Kala, K., & Ahvenainen, R. (1998). Effects of packaging and storage conditions on volatile compounds in gas-packed poultry meat. *Food Additives and Contaminants*, 15(2), 217-228.
- El-Din, M. H. A. S., & Ibrahim, H. M. (1990). Cooking effects on fat and fatty acids composition of chicken muscles. *Food / Nahrung*, 34(3), 207-212.
- Elmadfa, I., & Leitzmann, C. (2004). *Ernährung des Menschen* (Vol. 4). Stuttgart: Uni-Taschenbücher GmbH Stuttgart.
- Enser, M., Hallett, K., Hewitt, B., Fursey, G. A. J., & Wood, J. D. (1996). Fatty acid content and composition of english beef, lamb and pork at retail. *Meat Science*, 42(4), 443-456.
- Evans, I. M., & Donald, B. (1980). Crude protein and sulphur amino acid contents of some commercial varieties of peas and beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(3), 238-242.
- Farkas, P., Sádecká, J., Kovác, M., Siegmund, B., Leitner, E., & Pfannhauser, W. (1997). Key odourants of pressure-cooked hen meat. *Food Chemistry*, 60(4), 617-621.
- Fennema, O. R. (Ed.). (1996). *Food Chemistry* (3 ed.). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Fernández-Quintela, A., Macarulla, M. T., del Barrio, A. S., & Martínez, J. A. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 51(4), 331-341.

- Fernández, J. A., & Batterham, E. S. (1995). The nutritive value of lupin-seed and dehulled lupin-seed meals as protein sources for growing pigs as evaluated by different techniques. *Animal Feed Science and Technology*, 53(3-4), 279-296.
- Fleischer, L.-G. (2004). Evolutorische Lebensmitteltechnologie und ihre Implikationen mit der Allgemeinen Technologie. *Sitzungsberichte der Leibniz-Sozietät*, 75, 49-67.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010).
- Fox, P. F., McSweeney, P., Cadwallader, K. R., & Singh, T. K. (2009). Flavours and Off-Flavours in Milk and Dairy Products. In *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 1-60): Springer New York.
- Frankel, E. (1983). Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, 22(1), 1-33.
- Frankel, E. (1984). Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(12), 1908-1917.
- Friedman, M., & Brandon, D. L. (2001). Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1069-1086.
- Fritsch, C., Weiss, V., & Anderson, R. (1971). Stability of coconut oil in food products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(8), 392-393.
- Fudiyansyah, N., Petterson, D. S., Bell, R. R., & Fairbrother, A. H. (1995). A nutritional, chemical and sensory evaluation of lupin (*L. angustifolius*) tempe. *International Journal of Food Science & Technology*, 30(3), 297-305.
- Fuhrmeister, H. (2001). *Herstellung von Proteinprodukten auf der Grundlage eines Verfahrens zur Särkegewinnung aus Markerbsen*. Berlin: Technische Universität Berlin.

- Galliard, T., & Matthew, J. A. (1977). Lipoxygenase-mediated cleavage of fatty acids to carbonyl fragments in tomato fruits. *Phytochemistry*, 16(3), 339-343.
- Gardner, H. W. (1975). Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(2), 129-136.
- Gatel, F. (1994). Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. *Animal Feed Science and Technology*, 45(3-4), 317-348.
- German Food Act (2006). *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 35 Vorläufiges Tabakgesetz, § 28b GenTG*. Berlin: Beuth Verlag GmbH.
- Gould, G. W., & Sale, A. J. H. (1970). Initiation of Germination of Bacterial Spores by Hydrostatic Pressure. *Journal of General Microbiology*, 60(3), 335-346.
- Hansen, R. P., & Czochanska, Z. (1974). Composition of the lipids of lupin seed (*Lupinus angustifolius* L. var. "uniwhite"). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(4), 409-415.
- Hatanaka, A., Sekiya, J., & Kajiwara, T. (1983). Linolenic acid and its 13-hydroperoxide inhibit hexanal formation from linoleic acid in plant tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(1), 176-178.
- Helbaek, H. (1959). Domestication of Food Plants in the Old World: Joint efforts by botanists and archeologists illuminate the obscure history of plant domestication. *Science*, 130(3372), 365-372.
- Hendrickx, M. E. G., & Knorr, D. (Eds.). (2002). *Ultra High Pressure Treatments of Foods*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- Hídvégi, M., & Lásztity, R. (2002). *Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins* (Vol. 46). Budapest: Akadémiai Kiadó.

- Hite, B. H. (1899). The Effect of Pressure in the Preservation of Milk. *Virginia Agricultural Experiment Station Bull*, 58, 13-36.
- Hite, B. H., Giddings, N. J., & Weakley, C. E. J. (1914). The effect of pressure on certain micro-organisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *Virginia Agricultural Experiment Station Bull*, 146, 1-67.
- Homma, N., Ikeuchi, Y., & Suzuki, A. (1995). Levels of calpain and calpastatin in meat subjected to high pressure. *Meat Science*, 41(3), 251-260.
- Hoogenkamp, H. W. (2005). *Soy Protein and Formulated Meat Products*. Oxfordshire: CABI Publishing.
- Horgan, D. J. (1981). Effect of pressure treatment on the sarcoplasmic reticulum of red and white muscles. *Meat Science*, 5(4), 297-305.
- Hove, E. L. (1974). Composition and protein quality of sweet lupin seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(7), 851-859.
- Hughes, R. K., Wu, Z., Robinson, D. S., Hardy, D., West, S. I., Fairhurst, S. A., et al. (1998). Characterization of authentic recombinant pea-seed lipoxygenases with distinct properties and reaction mechanisms. *Biochemical Journal*, 333(1), 33-43.
- Hui, Y. H., & Sherkat, F. (2006). *Handbook of Food Science, Technology, And Engineering* (Vol. 2): CRC Press.
- International Dairy Federation (IDF) (1991). *International IDF standard 74A 1991*: Brussels
- Igene, J. O., King, J. A., Pearson, A. M., & Gray, J. I. (1979). Influence of heme pigments, nitrite, and nonheme iron on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(4), 838-842.

- Igene, J. O., Yamauchi, K., Pearson, A. M., Gray, J. I., & Aust, S. D. (1985). Evaluation of 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBRS) in relation to warmed-over flavor (WOF) development in cooked chicken. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(3), 364-367.
- Iiyama, K., Lam, T. B. T., & Stone, B. A. (1994). Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiology*, 104(2), 315-320.
- Insausti, K., Beriain, M. J., Gorraiz, C., & Purroy, A. (2002). Volatile Compounds of Raw Beef from 5 Local Spanish Cattle Breeds Stored Under Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*, 67(4), 1580-1589.
- Inyang, U., & Iduh, A. (1996). Influence of pH and salt concentration on protein solubility, emulsifying and foaming properties of sesame protein concentrate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(12), 1663-1667.
- Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., & Sayyar Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331-335.
- Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A., & Speers, R. A. (1987). Anthocyanins as Food Colorants - A Review. *Journal of Food Biochemistry*, 11(3), 201-247.
- Jakobsen, H. B., Hansen, M., Christensen, M. R., Brockhoff, P. B., & Olsen, C. E. (1998). Aroma Volatiles of Blanched Green Peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3727-3734.
- Jart, A. (1997). The magnetic field as an additional selectivity parameter in fat hydrogenation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(5), 615-617.
- Jenkins, G. N. (1978). *The physiology and biochemistry of the mouth* / G. Neil Jenkins. Oxford : Philadelphia Blackwell Scientific Publications; distributed by J. B. Lippincott.
- Jensen, C., Guider, J., Skovgaard, I. M., Staun, H., Skibsted, L. H., Jensen, S. K., et al. (1997). Effects of dietary α -tocopheryl acetate supplementation on α -

- tocopherol deposition in porcine *m. psoas major* and *m. longissimus dorsi* and on drip loss, colour stability and oxidative stability of pork meat. *Meat Science*, 45(4), 491-500.
- Jensen, P. N., Sørensen, G., Engelsen, S. B., & Bertelsen, G. (2001). Evaluation of Quality Changes in Walnut Kernels (*Juglans regia* L.) by Vis/NIR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5790-5796.
- Jung, S., de Lamballerie-Anton, M., & Ghoul, M. (2000). Modifications of Ultrastructure and Myofibrillar Proteins of Post-rigor Beef Treated by High Pressure. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 33(4), 313-319.
- Jung, S., Ghoul, M., & de Lamballerie-Anton, M. (2000). Changes in lysosomal enzyme activities and shear values of high pressure treated meat during ageing. *Meat Science*, 56(3), 239-246.
- Jung, S., Ghoul, M., & de Lamballerie-Anton, M. (2003). Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36(6), 625-631.
- Kanda, H., Wang, H. L., Hesseltine, C. W., & Warner, K. (1976). Yoghurt Production by Lactobacillus Fermentation of Soybean Milk. *Process biochemistry*, 11(4), 23-25, 46.
- Kennick, W. H., Elgasim, E. A., Holmes, Z. A., & Meyer, P. F. (1980). The effect of pressurisation of pre-rigor muscle on post-rigor meat characteristics. *Meat Science*, 4(1), 33-40.
- Kerler, J., & Grosch, W. (1996). Odorants Contributing to Warmed-Over Flavor (WOF) of Refrigerated Cooked Beef. *Journal of Food Science*, 61(6), 1271-1275.
- Kerler, J., & Grosch, W. (1997). Character impact odorants of boiled chicken: changes during refrigerated storage and reheating. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 205(3), 232-238.

- Keung, W. M., & Vallee, B. L. (1998). Kudzu root: An ancient chinese source of modern antidipsotropic agents. *Phytochemistry*, 47(4), 499-506.
- King, M. F., Hamilton, B. L., Matthews, M. A., Rule, D. C., & Field, R. A. (1993). Isolation and identification of volatiles and condensable material in raw beef with supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 1974-1981.
- Kinsella, J. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 242-258.
- Klotzbücher, B. C. (2009). *Milchsaure Fermentation von Leguminosenproteinextrakten mit dem Ziel geschmacklicher Verbesserung*. PhD Thesis TU München.
- Knorr, D. (1999). Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 485-491.
- Kobayashi, A., Tsuda, Y., Hirata, N., Kubota, K., & Kitamura, K. (1995). Aroma Constituents of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Milk Lacking Lipoxygenase Isoenzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), 2449-2452.
- Koizumi, M., & Nishihara, M. (Eds.). (1992). *Isostatic Pressing. Technology and Applications*. Barking: Elsevier Science Publishers LTD.
- Krings, U., Banavara, D. S., & Berger, R. G. (2003). Thin layer high vacuum distillation to isolate the flavor of high-fat food. *European Food Research and Technology*, 217(1), 70-73.
- Lakshmanan, R., Parkinson, J. A., & Piggott, J. R. (2007). High-pressure processing and water-holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*). *LWT - Food Science and Technology*, 40(3), 544-551.

- Larsen, M., & Poll, L. (1992). Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 195(2), 120-123.
- Larson, W. P., Hartzell, T. B., & Diehl, H. S. (1918). The Effect of High Pressures on Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 22(3), 271-279.
- Lasekan, J. B., Gueth, L., & Khan, S. (1995). Influence of dietary golden pea proteins versus casein on plasma and hepatic lipids in rats. *Nutrition Research*, 15(1), 71-84.
- Lei, Q., & Boatright, W. L. (2001). Compounds Contributing to the Odor of Aqueous Slurries of Soy Protein Concentrate. *Journal of Food Science*, 66(9), 1306-1310.
- Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25(2), 151-158.
- Leistner, L. (1997). *Handbuch Fleisch und Fleischwaren*. Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG.
- Leistner, L., & Gorris, L. G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 41-46.
- Leitsätze für Speisefette und Speiseöle. (2001). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.
- Leterme, P., Beckers, Y., & Thewis, A. (1990). Trypsin inhibitors in peas: Varietal effect and influence on digestibility of crude protein by growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 29(1-2), 45-55.
- Lewis, G. (2005). *Legumes of the World*. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Linnemann, A. R., & Dijkstra, D. S. (2002). Toward sustainable production of protein-rich foods: Appraisal of eight crops for Western Europe. PART I. Analysis of

- the primary links of the production chain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(4), 377-401.
- Llewellyn, C. A., Mantoura, R. F. C., & Brereton, R. G. (1990). Products of Chlorophyll Photodegradation - 1. Detection and Separation. *Photochemistry and Photobiology*, 52(5), 1037-1041.
- Loiseau, J., Ly Vu, B., Macherel, M.-H., & Deunff, Y. L. (2001). Seed lipoxygenases: occurrence and functions. *Seed Science Research*, 11(03), 199-211.
- Ma, H. J., & Ledward, D. A. (2004). High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. *Meat Science*, 68(3), 347-355.
- Ma, H. J., Ledward, D. A., Zamri, A. I., Frazier, R. A., & Zhou, G. H. (2007). Effects of high pressure/thermal treatment on lipid oxidation in beef and chicken muscle. *Food Chemistry*, 104(4), 1575-1579.
- Macfarlane, J. J. (1973). Pre-Rigor Pressurization of Muscle: Effects on pH, Shear Value and Taste Panel Assessment. *Journal of Food Science*, 38(2), 294-298.
- Macfarlane, J. J., McKenzie, I. J., Turner, R. H., & Jones, P. N. (1981). Pressure treatment of meat: Effects on thermal transitions and shear values. *Meat Science*, 5(4), 307-317.
- Macfarlane, J. J., & Morton, D. J. (1978). Effects of pressure treatment on the ultrastructure of striated muscle. *Meat Science*, 2(4), 281-288.
- Maga, J. A. (1992). Pyrazine update. *Food Reviews International*, 8(4), 479 - 558.
- Marchesi, M., Parolini, C., Diani, E., Rigamonti, E., Cornelli, L., Arnoldi, A., et al. (2008). Hypolipidaemic and anti-atherosclerotic effects of lupin proteins in a rabbit model. *British Journal of Nutrition*, 100(04), 707-710.
- Mariutti, L., Orlien, V., Bragagnolo, N., & Skibsted, L. (2008). Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. *European Food Research and Technology*, 227(2), 337-344.

- Marsh, B. B., & Leet, N. G. (1966). Studies in Meat Tenderness. III. The Effects of Cold Shortening on Tenderness. *Journal of Food Science*, 31(3), 450-459.
- Matoba, T., Hidaka, H., Kitamura, K., Kaizuma, N., & Kito, M. (1985). Contribution of hydroperoxide lyase activity to *n*-hexanal formation in soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(5), 856-858.
- Matser, A. M., Krebbers, B., van den Berg, R. W., & Bartels, P. V. (2004). Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 79-85.
- Matsushita, S. (1975). Specific interactions of linoleic acid hydroperoxides and their secondary degraded products with enzyme proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(2), 150-154.
- McNaught, A. D., Wilkinson, A., & International Union of Pure and Applied Chemistry. (1997). *Compendium of chemical terminology : IUPAC recommendations* (2. ed.). Oxford u.a.: Blackwell Science.
- Miedel, M. C., Hulmes, J. D., & Pan, Y.-C. E. (1989). The use of fluorescamine as a detection reagent in protein microcharacterization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 18(1), 37-52.
- Mihara, S., & Masuda, H. (1988). Structure-odor relationships for disubstituted pyrazines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(6), 1242-1247.
- Mills, G., Earnshaw, R., & Patterson, M. F. (1998). Effects of high hydrostatic pressure on *Clostridium sporogenes* spores. *Letters in Applied Microbiology*, 26(3), 227-230.
- Milo, C., & Grosch, W. (1996). Changes in the Odorants of Boiled Salmon and Cod As Affected by the Storage of the Raw Material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2366-2371.

- Mortensen, G., Sørensen, J., & Stapelfeldt, H. (2002). Comparison of Peroxide Value Methods Used for Semihard Cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5007-5011.
- Mottram, D., Koutsidis, G., Oruna-Concha, M.-J., Ntova, M., & Stephen Elmore, J. (2003). Analysis of Important Flavor Precursors in Meat. In *Handbook of Flavor Characterization*: CRC Press.
- Murray, K. E., Shipton, J., Whitfield, F. B., & Last, J. H. (1976). The volatiles of off-flavoured unblanched green peas (*Pisum sativum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27(12), 1093-1107.
- Najid, A., Beneytout, J.-L., Leblanc, J.-P., Tixier, M., & Rigaud, M. (1988). Evidence for an arachidonic acid 5-, 8- and 15-lipoxygenase in *Lupinus albus* seeds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 960(1), 26-34.
- Nedjma, M., & Hoffmann, N. (1996). Hydrogen Sulfide Reactivity with Thiols in the Presence of Copper(II) in Hydroalcoholic Solutions or Cognac Brandies: Formation of Symmetrical and Unsymmetrical Dialkyl Trisulfides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3935-3938.
- Norton, T., & Sun, D.-W. (2008). Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 2-34.
- O'Shea, J. M., Horgan, D. J., & Macfarlane, J. J. (1976). Some effects of pressure treatment on actomyosin systems. *Australian journal of biological sciences*, 29(3), 197-207.
- Orlien, V., Andersen, A. B., Sinkko, T., & Skibsted, L. H. (2000). Hydroperoxide formation in rapeseed oil encapsulated in a glassy food model as influenced by hydrophilic and lipophilic radicals. *Food Chemistry*, 68(2), 191-199.

- Orlien, V., Hansen, E., & Skibsted, L. H. (2000). Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Food Research and Technology*, 211(2), 99-104.
- Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1400-1409.
- Perpète, P., & Collin, S. (1999). Contribution of 3-Methylthiopropionaldehyde to the Warty Flavor of Alcohol-Free Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2374-2378.
- Pesek, C. A., & Warthesen, J. J. (1987). Photodegradation of Carotenoids in a Vegetable Juice System. *Journal of Food Science*, 52(3), 744-746.
- Petterson, D. S. (1998). Composition and food uses of lupins. In J. S. Gladstones, C. Atkins & J. Hamblin (Eds.), *Lupin as crop plants: biology, production and utilisation* (pp. 353-384). Wallingford, Oxon: CAB International.
- Pour-Ei, A. (1981). Protein Functionality: Classification, Definition, and Methodology. In *Protein Functionality in Foods* (Vol. 147, pp. 1-19): American Chemical Society.
- Pyysalo, H., & Suihko, M. (1976). Odor characterization and threshold values of some edible compounds in fresh mushrooms. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 9, 371-373.
- Rababah, T., Hettiarachchy, N. S., Horax, R., Cho, M. J., Davis, B., & Dickson, J. (2006). Thiobarbituric acid reactive substances and volatile compounds in chicken breast meat infused with plant extracts and subjected to electron beam irradiation. *Poultry Science*, 85(6), 1107-1113.
- Rabe, S., Krings, U., Banavara, D. S., & Berger, R. G. (2002). Computerized apparatus for measuring dynamic flavor release from liquid food matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6440-6447.

- Rabe, S., Krings, U., & Berger, R. G. (2004). Dynamic flavour release from Miglyol/water emulsions: modelling and validation. *Food Chemistry*, 84(1), 117-125.
- Rackis, J. (1981). Flatulence caused by soya and its control through processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(3), 503-509.
- Rackis, J., Sessa, D., & Honig, D. (1979). Flavor problems of vegetable food proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 262-271.
- Rahman, M. H. (2000). The nutritional toxicity of sweet lupin (*Lupinus angustifolius*) seed proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 72-78.
- Reichert, R. D., & MacKenzie, S. L. (1982). Composition of peas (*Pisum sativum*) varying widely in protein content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 312-317.
- Rivas-Cañedo, A., Fernández-García, E., & Nuñez, M. (2009). Volatile compounds in fresh meats subjected to high pressure processing: Effect of the packaging material. *Meat Science*, 81(2), 321-328.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1999). Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*, 49(3), 38S-47S.
- RÖMPP Online (2010). Georg Thieme Verlag.
- Rychlik, M., Sax, M., & Schieberle, P. (2006). On the role of short-chain free fatty acids for the development of a cheese-like off-note in pasteurized yoghurt. *LWT - Food Science and Technology*, 39(5), 521-527.
- Sachihiko, I., Shigeo, K., & Takeo, S. (1973). The Synthesis of Damascenone and beta-Damascone and the possible mechanism of their formation from carotenoids. *Helvetica Chimica Acta*, 56(5), 1514-1516.
- Salunkhe, D. K., Jadhav, S. J., Kadam, S. S., Chavan, J. K., & Luh, B. S. (1982). Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals

- and legumes. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 17(3), 277 - 305.
- Sampson, H. A. (1998). Legumes, eggs, and milk. *Allergy*, 53, 38-43.
- Sanches-Silva, A., Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., López-Hernández, J., & Paseiro-Losada, P. (2004). Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1046(1-2), 75-81.
- Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G., & Orlie, V. (2010). Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated. *Meat Science*, 86(2), 317-323.
- Schmidl, M. K., & Labuza, T. P. (2000). *Essentials of Functional Foods*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- Schnabel, K.-O., Belitz, H.-D., & von Ranson, C. (1988). Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung bei Geruchsstoffen. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 187, 21-223
- Schwambach, S. L., & Peterson, D. G. (2005). Reduction of Stale Flavor Development in Low-Heat Skim Milk Powder via Epicatechin Addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 502-508.
- Scott Smith, J., & Hui, Y. H. (Eds.). (2004). *Food Processing: Principles and Applications*. Ames: Blackwell Publishing.
- Sekiya, J., Kamiuchi, H., & Hatanaka, A. (1982). Lipxygenase, Hydroperoxide Lyase and Volatile C₆-Aldehyde Formation from C₁₈-Fatty Acids during Development of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Cell Physiology*, 23(4), 631-638.
- Senter, S. D., Arnold, J. W., & Chew, V. (2000). APC values and volatile compounds formed in commercially processed, raw chicken parts during storage at 4 and

- 13 °C and under simulated temperature abuse conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(10), 1559-1564.
- Sessa, D., & Rackis, J. (1977). Lipid-Derived flavors of legume protein products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54(10), 468-473.
- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an Indicator of Meat Flavor Deterioration. *Journal of Food Lipids*, 1(3), 177-186.
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, Sensitive, Iron-Based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids. *Journal of Aoac International*, 77(2), 421-424.
- Shu, C.-K. (1999). Pyrazine Formation from Serine and Threonine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4332-4335.
- Sigrist, I., Wunderli, B., Pompizzi, R., Manzardo, G. G. G., & Amadò, R. (2000). Influence of dimethyl furan fatty acid photooxidative degradation products on the flavor of green tea. In P. Schieberle & K. H. Engel (Eds.), *Frontiers of flavour science* (pp. 554-556). Garching, Germany: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie
- Sikes, A., Tornberg, E., & Tume, R. (2010). A proposed mechanism of tenderising post-rigor beef using high pressure-heat treatment. *Meat Science*, 84(3), 390-399.
- Soares da Costa, M., Gonçalves, C., Ferreira, A., Ibsen, C., Guedes de Pinho, P., & Silva Ferreira, A. C. (2004). Further Insights into the Role of Methional and Phenylacetaldehyde in Lager Beer Flavor Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7911-7917.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2008). *Food Composition and Nutrition Tables: Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen La composition des aliments Tableaux des valeurs nutritives* (Vol. 7). Garching: Dtsch. Forschungsanstalt f. Lebensmittelchemie.

- Spielmann, J., Shukla, A., Brandsch, C., Hirche, F., Stangl, G. I., & Eder, K. (2007). Dietary Lupin Protein Lowers Triglyceride Concentrations in Liver and Plasma in Rats by Reducing Hepatic Gene Expression of Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(4), 387-392.
- St. Angelo, A. J., Vercellotti, J. R., Legendre, M. G., VinnelT, C. H., Kuan, J. W., James, C., et al. (1987). Chemical and Instrumental Analyses of Warmed-Over Flavor in Beef. *Journal of Food Science*, 52(5), 1163-1168.
- Stanek, M., Zduńczyk, Z., Purwin, C., & Florek, S. (2004). Chemical composition and nutritive value of seeds of selected pea varieties. *VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA*, 50(28), 71-74.
- Stiles, T. K. (2010). *The Effects of High Pressure Processing on Peanut Sauce Inoculated with Salmonella*. University of Nebraska-Lincoln, Lincoln.
- Suzuki, A., Watanabe, M., Ikeuchi, Y., Saito, M., & Takahashi, K. (1993). Effects of high-pressure treatment on the ultrastructure and thermal behaviour of beef intramuscular collagen. *Meat Science*, 35(1), 17-25.
- Suzuki, A., Watanabe, M., Iwamura, K., Ikeuchi, Y., & Saito, M. (1990). Effect of High-Pressure Treatment on the Ultrastructure and Myofibrillar Protein of Beef Skeletal-Muscle. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(12), 3085-3091.
- Swanson, B. (1990). Pea and lentil protein extraction and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(5), 276-280.
- Takeoka, G., Buttery, R. G., Flath, R. A., Teranishi, R., Wheeler, E. L., Wieczorek, R. L., & Guentert, M. (1989). Volatiles constituents of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). *ACS Symposium Series*, 388, 223-237
- Tiemann, F., & Haarmann, W. (1874). Ueber das Coniferin und seine Umwandlung in das aromatische Princip der Vanille. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 7(1), 608-623.

- Tuboly, E., Lebovics, V. K., Gaál, Ö., Mészáros, L., & Farkas, J. (2003). Microbiological and lipid oxidation studies on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3), 241-244.
- Tume, R. K., Sikes, A. L., & Smith, S. B. (2010). Enriching *M. sternomandibularis* with α -tocopherol by dietary means does not protect against the lipid oxidation caused by high-pressure processing. *Meat Science*, 84(1), 66-70.
- Uebersax, M. A., & Ruengsakulrath, S. (1989). *Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*. Champaign: American Oil Chemical Society.
- Ulberth, F., & Roubicek, D. (1995). Monitoring of oxidative deterioration of milk powder by headspace gas chromatography. *International Dairy Journal*, 5(6), 523-531.
- Ullrich, F., & Grosch, W. (1987). Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 184(4), 277-282.
- Urbano, G., López-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E., & Porres, J. (2000). The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56(3), 283-294.
- van den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471.
- Vasconcelos, I. M., Campello, C. C., Oliveira, J. T. A., Carvalho, A. F. U., Souza, D. O. B. d., & Maia, F. M. M. (2006). Brazilian soybean *Glycine max* (L.) Merr. cultivars adapted to low latitude regions: seed composition and content of bioactive proteins. *Revista Brasileira de Botânica*, 29(4), 617-625.

- von Koerber, K., Männle, T., & Leitzmann, C. (2004). *Vollwert-Ernährung: Konzeption einer zeitgemäßen Ernährungsweise* (10 ed.). Stuttgart: Karl F. Haug Verlag.
- Wang, H. L., Kraidej, L., & Hesseltine, C. W. (1974). Lactic Acid Fermentation of Soybean Milk. *Journal of Milk and Food Technology*, 37(2), 71-73.
- Wang, J. C., & Kinsella, J. E. (1976). Functional Properties of Novel Proteins: Alfalfa Leaf Protein. *Journal of Food Science*, 41(2), 286-292.
- Wang, L. C. (1972). Polyamines in Soybeans. *Plant Physiology*, 50(1), 152-156.
- Wang, P.-S., & Odell, G. V. (1973). Formation of pyrazines from thermal treatment of some amino-hydroxy compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(5), 868-870.
- Weisse, K., Brandsch, C., Hirche, F., Eder, K., & Stangl, G. I. (2009). Lupin protein isolate and cysteine-supplemented casein reduce calcification of atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *British Journal of Nutrition*, 103(02), 180-188.
- Wennberg, M., & Nyman, M. (2004). On the possibility of using high pressure treatment to modify physico-chemical properties of dietary fibre in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(2), 171-177.
- Wick, E. L. (1966). Flavor update: One opinion. *Food Technology*, 20, 1549-1554.
- Wiggers, S. B., Kröger-Ohlsen, M. V., & Skibsted, L. H. (2004). Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast during chill storage and subsequent heat treatment: effect of working pressure, packaging atmosphere and storage time. *European Food Research and Technology*, 219(2), 167-170.
- Williams, D. C., Lim, M. H., Chen, A. O., Pangborn, R. M., & Whitaker, J. R. (1986). Blanching of Vegetables for Freezing - Which Indicator Enzyme to Choose. *Food Technology*, 40(6), 130-140.

- Wojciechowski, M. F., Lavin, M., & Sanderson, M. J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 91(11), 1846-1862.
- Wolf, W. J. (1976). Chemistry and Technology of Soybeans. In Y. Pomeranz (Ed.), *Advances in Cereal Science and Technology* (Vol. 1, pp. 325-377). St. Paul: American Association of Cereal Chemists.
- Woo, A. H., Kollodge, S., & Lindsay, R. C. (1984). Quantification of Major Free Fatty Acids in Several Cheese Varieties. *Journal of Dairy Science*, 67(4), 874-878.
- Xiong, Y., Yang, Y., Yang, J., Chai, H., Li, Y., Yang, J., et al. Tectoridin, an isoflavone glycoside from the flower of *Pueraria lobata*, prevents acute ethanol-induced liver steatosis in mice. *Toxicology*, 276(1), 64-72.
- Yamamoto, K., Miura, T., & Yasui, T. (1990). Gelation of Myosin Filament under High Hydrostatic-Pressure. *Food Structure*, 9(4), 269-277.
- Yamauchi, N., & Watada, A. E. (1991). Regulated Chlorophyll Degradation in Spinach Leaves During Storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(1), 58-62.
- Yordanov, D., & Angelova, G. (2010). High Pressure Processing for Foods Preserving. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(3), 1940-1945.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Tanaka, M., & Mizushima, Y. (2007). Distribution of fatty acids in triacylglycerols and phospholipids from peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14), 2709-2714.
- Yoshikawa, K., Libbey, L. M., Cobb, W. Y., & Day, E. A. (1965). 1-Pyrroline: The Odor Component of Strecker-Degraded Proline and Ornithine. *Journal of Food Science*, 30(6), 991-994.

-
- Yu, J., Ahmedna, M., & Goktepe, I. (2007). Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*, 103(1), 121-129.
- Zohary, D., & Hopf, M. (1973). Domestication of Pulses in the Old World: Legumes were companions of wheat and barley when agriculture began in the Near East. *Science*, 182(4115), 887-894.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname Schindler, Sabrina
Geburtsdatum, -ort 26.11.1982, Trier

Schulbildung

1993 – 2002 Hindenburg-Gymnasium Trier
Abitur und Baccalauréat français

Studium

2002-2007 Studium der Lebensmittelchemie mit Schwerpunkt Umwelt-
toxikologie an der Technischen Universität Kaiserslautern
Diplom-Lebensmittelchemikerin

Thema der Diplomarbeit: Induktion des Fremdstoff-
metabolismus durch polyhalogenierte Umweltschadstoffe

Promotion

2007-2011 Wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Lebensmittel-
chemie der Leibniz Universität Hannover

Praktika

2002 Praktikum im Wasserlabor des Landesuntersuchungsamts
– Institut für Lebensmittelchemie Trier