

Enzymatische Minimierung von Chlorogensäuren in Getränken

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Mareike Siebert

2020

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

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Tuba Esatbeyoglu

Tag der Promotion: 05.06.2020

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger bedanken, der mir die Möglichkeit gab, meine Promotion am Institut für Lebensmittelchemie unter hervorragenden Bedingungen zu einem höchst interessanten und aktuellen Thema durchzuführen. Außerdem möchte ich Herrn Berger für die wissenschaftliche Betreuung, den großzügigen Freiraum zur Bearbeitung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen sowie die konstruktiven Diskussionen und hilfreichen Anregungen danken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die vielen zielführenden Anregungen und Ratschläge sowie die stets offene Tür.

Zudem bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Tuba Esatbeyoglu (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover) für die freundliche Übernahme des Korreferates und bei Herrn PD Dr. Jan Philipp Schuchardt (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover danke ich für die Projektförderung für Nachwuchswissenschaftler/-innen „Wege in die Forschung II“, in dessen Rahmen diese Doktorarbeit finanziert und angefertigt wurde. Frau Dr. Annabel Nieter danke ich für die Ermöglichung dieser Förderung.

Ein besonderer Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen für die angenehme, hilfsbereite und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, für anregende Diskussionen und die verbrachte gemeinsame Zeit.

Abschließend danke ich meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre stete Unterstützung.

Zusammenfassung

Kaffee und Fruchtsäfte gelten als Hauptaufnahmequelle von Chlorogensäuren. Insbesondere Kaffee weist hohe Konzentrationen des Isomers 5-*O*-Chlorogensäure (5-CQA) auf. Während die Rolle der 5-CQA als Vorstufe von Aroma-, Geschmacks- und Farbstoffen weitestgehend aufgeklärt ist, werden die Auswirkungen auf die Gesundheit kontrovers diskutiert. Unter anderem steht die 5-CQA im Verdacht, Sodbrennen und Magenbeschwerden nach Kaffeekonsum mitzuerzeugen. Ziel dieser Arbeit war es folglich, die 5-CQA ohne Veränderung der sensorischen Eigenschaften zu minimieren. Durch enzymatische Behandlung mit einer *p*-Cumarsäureesterase aus *Rhizoctonia solani* wurde der Gehalt in geröstetem Kaffeepulver um 98 % reduziert. Die Aromaextraktverdünnungsanalyse ergab, dass sich lediglich vier Aromastoffe in ihrem *flavour dilution factor* (FD-Faktor) zwischen behandeltem und unbehandeltem Kaffee unterschieden. Zudem wurden weder ein Fehlgeruch noch ein Fehlgeschmack wahrgenommen. Sensorische Tests bestätigten keinen signifikanten Unterschied. In einem weiteren Versuch wurde der enzymatische Behandlungsprozess auf das aufgebühte Kaffeetränk erfolgreich übertragen und optimiert. Verringerung der Inkubationszeit und –temperatur führten zu einem nahezu kompletten Abbau der 5-CQA nach 60 min und zu einer Abnahme um 89 % nach 30 min bei Raumtemperatur. Es wurden ebenfalls keine signifikanten sensorischen Unterschiede ermittelt. Um den Prozess weiter zu optimieren, wurde die RspCAE auf mesoporösem Silika und aktivierten Agaroseperlen immobilisiert. Letztgenannte Technik wies eine anfängliche Umsatzrate der 5-CQA von 98 % auf, die nach 30 h noch über 80 % betrug. Um die Anwendungsvielfalt der RspCAE zu erschließen, wurde ein weiteres Getränk enzymatisch behandelt. In Apfelsaft, welcher einen deutlich niedrigeren pH-Wert (pH 3) als Kaffee (pH 6) besitzt, wurde die 5-CQA Konzentration erfolgreich um 61 % verringert (Raumtemperatur, 30 min). Dieses Ergebnis zeigt, dass die RspCAE auch in stark sauren Lebensmitteln 5-CQA hydrolysiert. Die Behandlung führte zu keinen Veränderungen der sensorischen Eigenschaften ($p < 0,05$), was eine hohe Substratspezifität verdeutlicht. Die durch die vorliegende Arbeit aufgezeigte hohe Substratspezifität und Stabilität der RspCAE bilden einen vielversprechenden Ansatz für weitere Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, um die Qualität einzelner Lebensmittel zu verbessern.

Schlagworte: Chlorogensäure, *p*-Cumarsäureesterase, *Rhizoctonia solani*, Kaffee, Apfelsaft

Abstract

Coffee and fruit juices belong to the main sources for the intake of chlorogenic acids. Especially coffee contains high concentrations of the isomer 5-*O*-chlorogenic acid (5-CQA). Its contribution to the formation of aroma, taste and colour compounds is well understood, whereas its effect on human health is controversially discussed. For example, it is suggested that 5-CQA causes heartburn and stomach irritation after coffee consumption. Thus, the aim of the present work was to minimise the 5-CQA content without altering the sensory properties. The concentration decreased by 98 % in roasted coffee powder by enzymatic treatment with a *p*-coumaroyl esterase of *Rhizoctonia solani*. Aroma extract dilution analysis was performed to determine the effect on the volatile profile. Only four aroma compounds of the treated and untreated coffee differed in their flavour dilution factors. Additionally, neither an off-odour nor an off-taste were perceived. Sensory studies confirmed no significant difference.

In a further experiment, this method was successfully transferred to coffee brew and subsequently optimised. A decline in incubation time and temperature led to a nearly complete degradation of 5-CQA after 60 min and to a decrease by 89 % after 30 min at ambient temperature. No significant differences of the sensory properties were determined. For further optimisation, RspCAE was immobilised on mesoporous silica and activated agarose beads. The latter technique had an initial reaction rate of 98 % and still > 80 % after thirty hours.

To exploit further possible applications, another beverage was enzymatically treated. 5-CQA was successfully hydrolysed by 61 % (ambient temperature, 30 min) in apple juice, which had a much lower pH value (pH 3) than coffee (pH 6). The results showed that the RspCAE retained its enzymatic activity under strong acidic conditions. The treatment did not affect the sensory properties ($p < 0.05$). In addition to the high stability, a high substrate specificity was demonstrated.

Thus, the results of the present work indicate a technically feasible approach to improve the quality of a number of further foods and beverages.

Key words: Chlorogenic acid, *p*-coumaroyl esterase, *Rhizoctonia solani*, coffee, apple juice

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Danksagung..... | I |
| Zusammenfassung..... | II |
| Abstract | III |
| Inhaltsverzeichnis..... | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| Trivialnamen | IX |
| 1 Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur..... | 1 |
| 1.1 Entstehung der Kaffeekultur..... | 2 |
| 1.2 Die Kaffeepflanze | 3 |
| 1.3 Von der Bohne zum Getränk | 4 |
| 1.3.1 Rohkaffeeaufarbeitung | 4 |
| 1.3.2 Rösten | 5 |
| 1.3.3 Brühen..... | 6 |
| 1.4 Parameter für Kaffeequalität..... | 7 |
| 1.5 Kaffeearoma..... | 8 |
| 1.6 Kaffee – Segen oder Fluch?..... | 9 |
| 1.7 Verwendung von Enzymen während der Kaffeeverarbeitung | 11 |
| 1.8 Enzyme in der Lebensmittelindustrie | 12 |
| 1.8.1 Entwicklung bis zur Gegenwart | 12 |
| 1.8.2 Enzymimmobilisierung..... | 14 |
| 1.9 Hydroxyczimtsäureesterasen in der Lebensmittelindustrie | 15 |
| 2 Problemstellung und Zielsetzung..... | 18 |
| 3 Vorwort zur Publikation „Enzymatic mitigation of 5-O-chlorogenic acid for an improved digestibility of coffee” | 20 |
| 4 Enzymatic mitigation of 5-O-chlorogenic acid for an improved digestibility of coffee | 21 |
| 4.1 Introduction | 22 |
| 4.2 Material and methods | 23 |
| 4.2.1 Chemicals | 23 |
| 4.2.2 Coffee..... | 24 |
| 4.2.3 Enzyme..... | 24 |
| 4.2.4 Enzymatic treatment of roasted coffee powder | 24 |
| 4.2.5 HPLC analysis..... | 24 |
| 4.2.6 Isolation of volatiles | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.7 Gas Chromatography-FID/Olfactometry | 25 |
| 4.2.8 Gas chromatography–mass spectrometry | 26 |
| 4.2.9 Sensory analysis | 26 |
| 4.3 Results and discussion | 27 |
| 4.3.1 Enzymatic degradation of 5-CQA in coffee powder | 27 |
| 4.3.2 Comparison of enzymatically treated and untreated coffee volatiles | 28 |
| 4.3.3 Sensory comparison of enzymatically treated and untreated coffee | 29 |
| 4.4 Conclusion..... | 32 |
| 5 Vorwort zur Publikation „An immobilized fungal chlorogenase rapidly degrades chlorogenic acid in a coffee beverage without altering its sensory properties” | 33 |
| 6 An immobilized fungal chlorogenase rapidly degrades chlorogenic acid in a coffee beverage without altering its sensory properties | 34 |
| 6.1 Introduction | 35 |
| 6.2 Material and methods | 36 |
| 6.2.1 Chemicals | 36 |
| 6.2.2 Coffee brew preparation | 36 |
| 6.2.3 Enzymatic treatment of coffee brew | 36 |
| 6.2.4 Chlorogenic acid and caffeic acid analysis | 37 |
| 6.2.5 Analysis of volatiles..... | 37 |
| 6.2.6 Sensory analysis | 38 |
| 6.2.7 Enzyme immobilization..... | 38 |
| 6.3 Results and discussion | 40 |
| 6.3.1 Enzymatic degradation of 5-CQA in coffee brew..... | 40 |
| 6.3.2 Comparison of enzymatically treated and untreated coffee volatiles | 40 |
| 6.3.3 Sensory comparison of enzymatically treated and untreated coffee | 43 |
| 6.3.4 Chlorogenic acid mitigation using immobilized RspCAE..... | 44 |
| 6.4 Conclusion..... | 46 |
| 7 Vorwort zur Publikation „Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a <i>p</i>-coumaryl esterase of <i>Rhizoctonia solani</i>” | 47 |
| 8 Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a <i>p</i>-coumaryl esterase of <i>Rhizoctonia solani</i>..... | 48 |
| 8.1 Introduction | 49 |
| 8.2 Material and methods | 50 |
| 8.2.1 Chemicals | 50 |
| 8.2.2 Enzymatic treatment of apple juice..... | 50 |
| 8.2.3 Quantification of chlorogenic acid and caffeic acid..... | 50 |
| 8.2.4 Analysis of key aroma compounds | 50 |
| 8.2.5 Sensory analysis | 51 |
| 8.3 Results..... | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 8.3.1 Enzymatic mitigation of 5-CQA in apple juice..... | 52 |
| 8.3.2 Comparison of volatile compounds of enzymatically treated and control apple juice | 52 |
| 8.3.3 Sensory comparison of enzymatically treated and control apple juice | 54 |
| 8.4 Discussion | 55 |
| 8.5 Conclusion..... | 56 |
| 9 Ausblick..... | 57 |
| 10 Literaturverzeichnis | 58 |
| Anhang | 70 |
| Lebenslauf..... | 71 |
| Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen..... | 72 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| AEDA | Aromaextraktverdünnungsanalyse (<i>aroma extract dilution analysis</i>) |
| ADA | Aromaverdünnungsanalyse (<i>aroma dilution analysis</i>) |
| AL | <i>AminoLink Plus Coupling Resin</i> |
| ANOVA | <i>Analysis of Variance</i> |
| BisTris | Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan |
| CIS | Kaltaufgabesystem (<i>cold injection system</i>) |
| CQA | Chlorogensäure (Caffeoylchinasäure) |
| 3-CQA | 3- <i>O</i> -Chlorogensäure |
| 4-CQA | 4- <i>O</i> -Chlorogensäure |
| 5-CQA | 5- <i>O</i> -Chlorogensäure |
| diCQA | Dicaffeoylchinasäure |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| Exp. | experimentell bestimmt |
| FAE | Ferulasäureesterase (<i>ferulic acid esterase</i>) |
| FD-Faktor | Aromaverdünnungsfaktor (<i>flavour dilution factor</i>) |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| FQA | Feruloylchinasäure |
| GC | Gaschromatographie (<i>gas chromatography</i>) |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>) |
| kDa | Kilodalton (atomare Masseneinheit) |
| Lit. | Wert aus einer Referenzdatenbank/Literaturquelle |
| MS | Massenspektrometrie (<i>mass spectrometry</i>) |
| n.i. | nicht identifiziert (<i>not identified</i>) |
| NIST | <i>National Institute of Standards and Technology</i> |
| O/ODP | Olfaktometer (<i>olfactory detection port</i>) |
| PDMS | Polydimethylsiloxan |
| RI | Retentionsindex |
| RspCAE | <i>p</i> -Cumarsäureesterase aus <i>Rhizoctonia solani</i> |
| SBA-15 | <i>Santa Barbara Amorphus Type 15</i> |
| SBA-15 6 | <i>Santa Barbara Amorphus Type 15</i> mit einer Porengröße von 6 nm |
| SBA-15 8 | <i>Santa Barbara Amorphus Type 15</i> mit einer Porengröße von 8 nm |

| | |
|-------|--|
| SBSE | <i>Stir bar sorptive extraction</i> |
| TDS | Thermodesorptionssystem |
| TLHVD | Dünnschicht-Hochvakuum-Destillation (<i>thin layer high vacuum distillation</i>) |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$) |
| UV | Ultraviolett |
| Vis | sichtbar (<i>visible</i>) |
| v/v | <i>Volume by volume</i> |

Trivialnamen

| Trivialname | IUPAC Name (englisch) |
|---|---|
| Abhexon | 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5 <i>H</i>)-furanone |
| Acetaldehyd | Ethanal |
| <i>N</i> -Acetyl-5-hydroxytryptamid | <i>N</i> -[2-(5-Hydroxy-(1 <i>H</i>)-indol-3-yl)ethyl]acetamide |
| Catechol | Benzene-1,2-diol |
| 5-Chlorogensäure | (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-[(2 <i>E</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid |
| Chinasäure | (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexanecarboxylic acid |
| <i>p</i> -Cumarsäure | (2 <i>E</i>)-3-(4-Hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid |
| (<i>E</i>)- β -Damasconon | (<i>E</i>)-1-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexa-1,3-dienyl)but-2-en-1-one |
| β -Damascon | (<i>E</i>)-1-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexenyl)but-2-en-1-one |
| 4-Ethylguajakol | 4-Ethyl-2-methoxyphenol |
| Essigsäure (<i>acetic acid</i>) | Ethanoic acid |
| Ferulasäure | (2 <i>E</i>)-3-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid |
| 1-Furfurylpyrrol | 1-(Furan-2-ylmethyl)-(1 <i>H</i>)-pyrrole |
| 2-Furfurylthiol/ 2-Furanmethanethiol | (Furan-2-yl)methanethiol |
| Furneol | 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanone |
| Guajakol | 2-Methoxyphenol |
| Hydrochinon | Benzene-1,4-diol |
| 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin | 2-Methoxy-3-(2-methylpropyl)pyrazine |
| 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin | 2-Methoxy-3-(2-propyl)pyrazine |
| Kaffeesäure | (2 <i>E</i>)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid |
| Koffein | 1,3,7-Trimethylpurine-2,6-dione |
| Maltol | 3-Hydroxy-2-methyl-(4 <i>H</i>)-pyran-4-one |
| 3-Mercapto-3-methylbutylformiat | (3-Methyl-3-sulfanylbutyl) formate |
| Methional | 3-Methylsulfanylpropanal |
| Pyrogallol | Benzene-1,2,3-triol |
| Sotolon | 3-Hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5 <i>H</i>)-one |
| Trigonellin | 1-Methylpyridin-1-ium-3-carboxylate |

| | |
|-----------------|---|
| Vanillin | 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde |
| 4-Vinylguajakol | 4-Ethenyl-2-methoxyphenol |
| Vitispiran | 2,10,10-Trimethyl-6-methylen-1-oxaspiro[4.5]dec-7-ene |

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

Chlorogensäuren, welche seit Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben werden, bilden eine Familie an Mono- und Diesterverbindungen von Chinasäure mit verschiedenen *trans*-Zimtsäuren, wie Kaffeesäure, Cumarsäure und Ferulasäure (s. Abbildung 1-1). Insgesamt umfasst die Klasse der Chlorogensäuren über 70 verschiedene Verbindungen, bei denen die Chinasäure an Position 3, 4 und/oder 5, jedoch nicht an Position 1 verestert ist (Upadhyay & Mohan Rao, 2013).

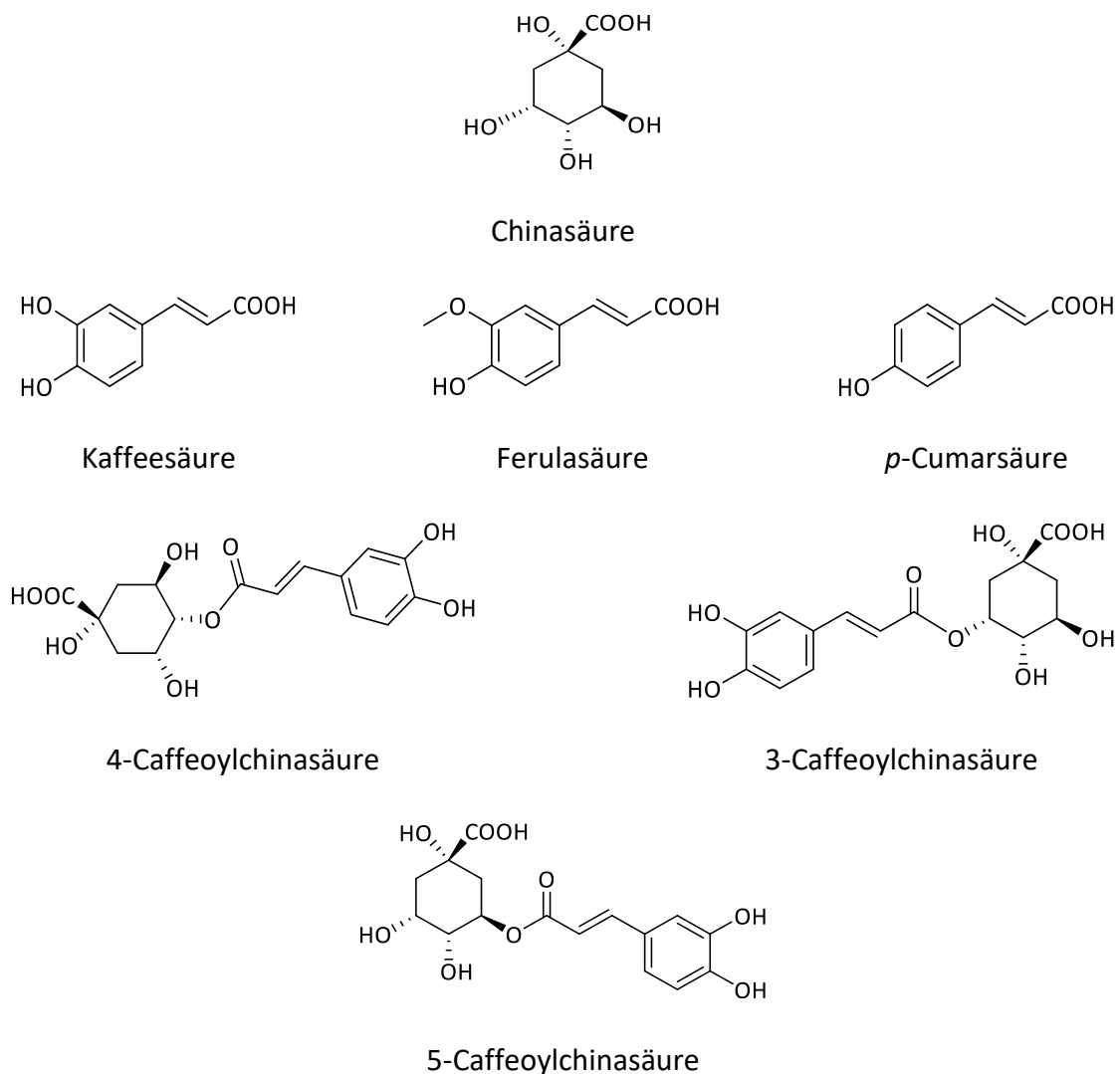


Abbildung 1-1: Strukturformeln wichtiger Monomere der Chlorogensäuren und drei wichtige Vertreter der Chlorogensäuren.

Zu den chlorogensäurereichen Lebensmitteln zählen Kaffee, Äpfel, Pfirsiche, Pflaumen, Kartoffeln und Tomaten, wobei sich diese in der Zusammensetzung der einzelnen Isomere unterscheiden. Während bei Kaffee und Äpfeln die 5-Caffeoylchinasäure (5-*O*-

Chlorogensäure, 5-CQA) das Hauptisomer ist, dominiert in Pflaumen die 3-Caffeoylchinasäure (3-CQA) (Upadhyay & Mohan Rao, 2013). Zusätzlich unterscheiden sich die Chlorogensäuregehalte zwischen den Sorten. Elstar-Äpfel enthalten 31 mg/kg Chlorogensäure, wohingegen die Konzentration bei Papierówka-Äpfeln 430 mg/kg beträgt (Podsedek et al., 2000). Dies führt dazu, dass auch der Chlorogensäuregehalt in Apfelsaft stark variiert (33 – 488 mg/L) (Kahle et al., 2005). Insbesondere Kaffee enthält hohe Konzentrationen an Chlorogensäuren. In diesem wurden 45 unterschiedliche Chlorogensäuren identifiziert (Jaiswal et al., 2010), welche in Caffeoylchinasäuren (CQAs), Feruloylchinasäuren (FQAs) und Dicaffeoylchinasäuren (diCQAs) unterteilt werden. Die Gesamtkonzentration an Chlorogensäuren im Rohkaffee beträgt 61 – 86 mg/g, wobei der Gehalt an 5-CQA zwischen 24 – 30 mg/g variiert. Während des Röstprozesses nimmt die Chlorogensäurekonzentration ab, sodass diese in kommerziell geröstetem Kaffee bei 5 – 7 mg/g liegt mit einem 5-CQA-Anteil von 25 – 30 %. Der Gehalt im gerösteten Kaffee ist abhängig von der Kaffeesorte, den Röstungsparametern und der Brühart (Moon et al., 2009; Moeenfarid et al., 2014). Da Kaffee zu den chlorogensäurereichsten und populärsten Getränken weltweit gehört, stellt dieser die Hauptaufnahmekategorie von Chlorogensäure dar. So kann bei Kaffeetrinkern die tägliche Aufnahme bis zu einem Gramm betragen (Upadhyay & Mohan Rao, 2013). Aus den genannten Gründen lag der Fokus dieser Arbeit auf dem Chlorogensäureabbau in Kaffee und dessen Auswirkung auf Aroma und Geschmack des Kaffeegetränkes.

1.1 Entstehung der Kaffeekultur

Über die Entdeckung des Kaffees ranken sich etliche Mythen. Die wohl bekannteste Legende erzählt wie ein arabischer Ziegenhirte bemerkte, dass seine Ziegen nach Verzehr der roten Kirschen des Kaffeestrauches ausgelassen herumtanzten. Als ein Abt dieses sah, brachte er die Bohnen in ein Kloster. Dort verzehrten die Mönche die Bohnen, um beim nächtlichen Beten wach zu bleiben (Smith, 1985).

Die Urheimat des Kaffees liegt in Äthiopien, wo dieser um 800 n.Chr. entdeckt wurde. Im 17. Jahrhundert kam der Kaffee schließlich über Venedig nach Europa (Smith, 1985). Heutzutage wird Kaffee hauptsächlich in Brasilien angebaut und zählt zu den wichtigsten Handelsgütern weltweit. Im Durchschnitt trinken die Deutschen (18 – 75 Jahre) 3,4 Tassen

pro Tag. Dabei unterscheiden sich die Arten des Kaffeetrinkens. Die bekanntesten und gebräuchlichsten Verzehrsgewohnheiten sind pur, mit Zugabe von Zucker und Milch, als Cappuccino, *Latte macchiato*, türkischer Kaffee, *Espresso*, Instantkaffee oder als sogenannter *cold brew coffee*. Neben Filterkaffee und dem Aufguss mittels Siebtempelkanne, ist die Verwendung von Vollautomaten und Pad- oder Kapselmaschinen immer häufiger gebräuchlich, wobei in Deutschland Filterkaffee mengenmäßig am häufigsten getrunken wird (Tchibo, 2018). Zusätzlich zu der anregenden Wirkung und der Konzentrations- und Leistungssteigerung sind der gute Geschmack und die Routine die Hauptursachen für den Konsum. Sowohl soziale Aspekte, wie der Kaffeeklatsch oder ein Treffen im Café, als auch emotionale Gründe, wie der Genuss oder die Entspannung, sind weitere Motive für den Verzehr (Peña et al., 2019).

1.2 Die Kaffeepflanze

Der Begriff Kaffee bezeichnet ungemahlene oder gemahlene geröstete Rohkaffee, wobei Letztgenannter der von der Frucht und Samenschale befreite ungeröstete Samen von Pflanzen der Gattung *Coffea* darstellt (KaffeeV, 2001). Die Gattung *Coffea* gehört zu der Familie der *Rubiaceae* und umfasst ungefähr 70 verschiedene Arten, von denen jedoch nur *Coffea arabica* (Arabica Kaffee) und *Coffea canephora* var. *robusta* (Robusta Kaffee) wirtschaftlich von Bedeutung sind. *C. liberica* und *C. excelsa* werden in geringfügigen Mengen angebaut. Die globale Produktion dieser Varietäten beträgt lediglich 1 – 2 %, wohingegen *C. arabica* ungefähr 70 % und *C. robusta* ungefähr 30 % der weltweiten Ernte darstellen. Der Ursprung von *C. arabica* liegt in den Hochebenen Äthiopiens in 1300 m bis 2000 m Höhe. Arabicapflanzen benötigen konstante Temperaturen von etwa 20 °C und eine hohe Luftfeuchtigkeit. *C. canephora* ist im tropischen Afrika in Höhen unterhalb 1000 m beheimatet und weniger anfällig für klimatische Schwankungen. Nach circa drei Jahren trägt die Kaffeepflanze die ersten Früchte, welche als Kaffeekirschen bezeichnet werden, und ist ungefähr 30 Jahre lang ertragreich. Die reife Kaffeekirsche, welche zu den Steinfrüchten gehört, zeichnet sich durch eine rötliche Haut (Epikarp) aus. Diese enthält zwei im gallertartigen Fruchtfleisch (Mesokarp, Pulpe) eingebettete Samen, die auch als Kaffeebohnen bezeichnet werden. Jeder Samen, bestehend aus einem harten Endosperm, enthält am unteren Ende einen Keimling und ist von zwei Schalen umschlossen: direkt unter

der äußeren Hülle, der schleimigen Pergamenthaut, befindet sich das dünne Silberhäutchen. Die Samen liegen mit ihrer abgeflachten Innenseite dicht aneinander im Fruchtfleisch, während ihre gewölbte Seite nach außen zeigt (s. Abbildung 1-2) (Wintgens, 2004).

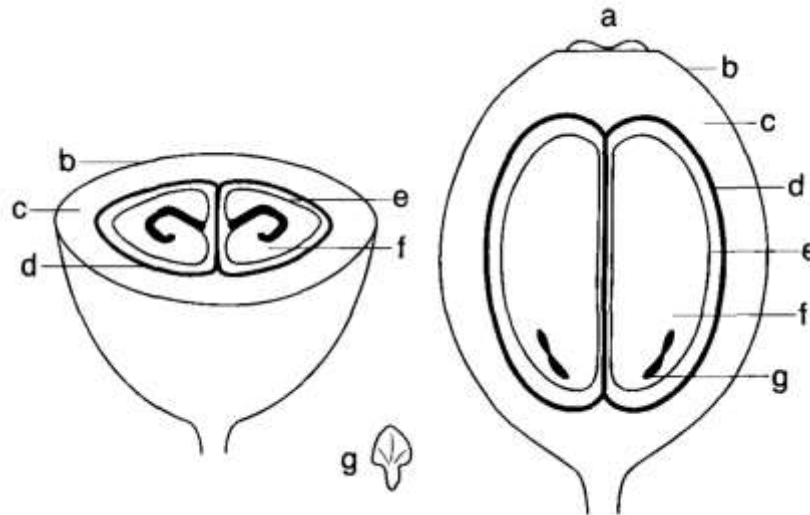


Abbildung 1-2: Querschnitt und Längsschnitt durch eine Kaffeeirsche. a: Diskus, b: Epikarp (Fruchthülle), c: Mesokarp (Pulpe/Fruchtfleisch), d: Endokarp (Pergamenthaut), e: Integument (Silberhäutchen), f: Endosperm (Bohne), g: Embryo (Keimling) (Wintgens, 2004).

1.3 Von der Bohne zum Getränk

1.3.1 Rohkaffeeaufarbeitung

Um aus den Früchten der Kaffeepflanze Kaffeegetränke zu erhalten, werden nach der Ernte der Kaffeeirschen aus diesen zunächst die Bohnen gewonnen. Dabei werden drei Aufarbeitungsmethoden unterschieden. Bei der traditionellen trockenen Aufarbeitung, welche vor allem in Brasilien angewendet wird, werden die Kirschen zunächst von unreifen beziehungsweise schadhaften Bohnen, Fremdkörpern und Schmutz befreit und nach Größe und Reife sortiert. Anschließend werden diese so lange auf großen Flächen in der Sonne ausgebreitet, bis die Samen in der trockenen Schale rascheln. Dabei wird die komplette Kirsche getrocknet. Währenddessen werden die Kirschen regelmäßig gewendet, um Fäulung zu vermeiden. Im Anschluss an das Trocknen wird die gesamte Hülle samt Pergamenthaut entfernt. Der so gewonnene Kaffee wird auch natürlicher oder ungewaschener Kaffee genannt (Clarke, 1985a; Brando, 2004).

Die nasse Aufarbeitung ist aufwendiger und teurer, führt jedoch in der Regel zu qualitativ höherwertigem Kaffee. Diese wird vor allem bei Arabica Kaffees durchgeführt (mit Ausnahme in Brasilien). Bei der nassen Aufarbeitung werden die reifen Kaffeekirschen zunächst in Schwemmkanälen abgetrennt. Im sogenannten Pulper wird die Bohne mechanisch durch Quetschen von Fruchtfleisch und Pergamenthaut befreit. Restliches Fruchtfleisch wird fermentativ entfernt, bevor die Bohnen getrocknet werden. Anschließend wird der sogenannte gewaschene Kaffee oder Pergamentkaffee geschält (Clarke, 1985a).

In jüngster Zeit wird zudem die halb-trockene Aufbereitung betrieben. Diese Methode ist ähnlich zu der trockenen Aufbereitung. Allerdings wird nicht die komplette Kaffeekirsche getrocknet, sondern nur der entpulpte Kern: Das Fruchtfleisch wird maschinell abgetrennt und die Kaffeebohnen nur mit anhaftenden Fruchtfleischresten zusammen getrocknet (Brando, 2004).

1.3.2 Rösten

Den wie in 1.3.1 beschrieben gewonnenen grünen Rohkaffeebohnen fehlt das typische und beliebte Kaffeearoma, der wohlbekannteste Kaffeegeschmack sowie die braune Farbe. Diese Charakteristika werden beim Rösten durch Maillard- und Streckerreaktionen gebildet. Rösten ist ein temperatur- und zeitabhängiger Prozess, bei dem viele chemische Reaktionen innerhalb der Kaffeebohne stattfinden. So beeinflussen die Röstdauer und die Rösttemperatur die Bildung von Aroma- und Farbstoffen. Dabei gilt, je höher die Temperatur und je länger die Zeit des Röstens, desto dunkler werden die Bohnen und desto höher ist der Röstgrad. Dieser wird in der Regel abhängig von der Farbe beurteilt und in eine helle, mittlere und dunkle Röstung gegliedert. Mit zunehmender Zeit und Temperatur wandelt sich das Aroma von angenehm zu verbrannt, die Farbe von braun nach schwarz, und das Kaffeeöl tritt an die Oberfläche der Kaffeebohnen (s. Abbildung 1-3). Während des Röstvorganges verringert sich der Feuchtegehalt von 10 – 12 % auf ungefähr 2 %, und es entweichen Gase, vor allem Wasserdampf und Kohlenstoffdioxid. Das Gewicht sinkt um 12 – 24 % (Einbrand), während das Volumen um 50 – 100 % zunimmt. Dies führt dazu, dass die Bohnen eine Längsfurche aufsprengen, was durch ein Knacken wahrgenommen werden kann. Neben der Bildung von Aroma- und Farbstoffen verändern sich zudem weitere Inhaltsstoffe während der Röstung. Unter anderem werden Chlorogensäuren, welche die

Hauptpolyphenole im Kaffee darstellen, und das in hohen Mengen vorkommende Alkaloid Trigonellin abgebaut. Nach dem Rösten werden die Bohnen sofort, meistens mit kaltem Wasser, abgekühlt, um den Röstprozess zu stoppen und somit ein Nachrösten und Verbrennen zu vermeiden (Clarke, 1985b; Eggers & Pietsch, 2001; Schormüller, 1961).



Abbildung 1-3: Farbe der Kaffeebohnen bei unterschiedlichen Röststufen. Je heißer und länger die Bohnen geröstet wurden, desto dunkler ist die Farbe. Die glänzende Oberfläche bei den stark gerösteten Kaffeebohnen (250 °C, 17 min) wird durch das austretende Kaffeeöl verursacht.

1.3.3 Brühen

Aus den gerösteten und gemahlene Bohnen werden durch Extraktion mit heißem Wasser oder Wasserdampf die Kaffeegetränke hergestellt. Für die Zubereitung gibt es zahlreiche Methoden, die überwiegend von der gewünschten Getränkeart (s. Kapitel 1.1) abhängen. Dabei lassen sich grundsätzlich fünf Typen voneinander unterscheiden: das Aufkochen von Kaffeepulver mit Wasser (Türkischer Kaffee), der Aufguss von Kaffeepulver mit heißem Wasser und späterem Abtrennen des Pulvers (Siebstampelkanne), Durchfluss durch das Kaffeepulver mit kontinuierlicher Rückführung des siedenden Wassers (Perkolator Kaffee), Filtermethoden, bei denen heißes Wasser durch Kaffeepulver in einem Filter fließt (Filterkaffee) und Methoden, bei denen mit Hilfe von Druck das Kaffeegetränk vom Pulver getrennt wird (*Espresso*). Einen Sonderfall stellt der *cold brew coffee* dar, bei dem die Extraktion durch Einweichen mit kaltem Wasser für lange Zeit erfolgt. Beim Brühvorgang werden Aroma und Geschmack des Getränkes außer von der Qualität des Kaffeepulvers, vom Mahlgrad, der verwendete Methode und der Wasserqualität beeinflusst (Tchibo, 2018; Peña et al., 2019).

1.4 Parameter für Kaffequalität

Zusätzlich zu der Beschaffenheit der gerösteten Kaffeebohnen, welche durch die Rohkaffeeaufarbeitung und das Rösten maßgeblich beeinflusst wird, hängt die Beurteilung des Kaffeegetränkes von den Erwartungen und Vorlieben der Konsumenten ab. Die Verbraucher bewerten ein röstiges und erdiges Aroma, eine dunkle Farbe sowie einen bitteren Geschmack als positiv, wohingegen ein mandelartiges Aroma und vor allem ein saurer Geschmack als negativ empfunden werden (Dzung et al., 2003). In der Industrie wird die Qualität vor allem anhand der Bohnen (Größe, Farbe, Form), der Aufarbeitungsmethode, des Erntejahres, des Aromas und des Auftretens von Fehlern beurteilt. Der Geschmack des fertigen Getränkes wird unter anderem nach dem Klassifizierungsschema in Tabelle 1-1 bewertet (Franca et al., 2005b).

Tabelle 1-1: Klassifizierungsschema zur Beurteilung der Kaffequalität. Die Qualität nimmt von oben nach unten ab.

| Klassifizierung | Merkmal |
|----------------------|---|
| <i>Strictly soft</i> | geringe Säure, milde Süße, angenehm leichtes Mundgefühl |
| <i>Soft</i> | wie <i>strictly soft</i> , nur etwas schwächer |
| <i>Softish</i> | wie <i>soft</i> , nur etwas schwächer |
| <i>Hard</i> | fehlende Süße, adstringierendes Aroma, rauher Geschmack |
| <i>Rioyish</i> | Nach Iod, medizinisch, verdorben |
| <i>Rio</i> | wie <i>rioish</i> , nur stärker |
| <i>Rio zona</i> | unerträglich in Geschmack und Aroma |

Ebenso ist das Vorhandensein schadhafter Samen für die Qualität von Bedeutung. Bei Fehlbohnen handelt es sich um unreife (*green defect*) beziehungsweise überreife, tote oder schadhafte Bohnen (*black defect*). Durch fehlerhafte Aufarbeitung, wie falsche Bewässerung, treten zum Teil unerwünschte Fermentationen ein, wodurch überfermentierte Bohnen entstehen (*sour defect*). Zudem mindern Fremdkörper wie Hülsen und Steine die Kaffequalität (Toledo et al., 2016; Farah et al., 2006; Franca et al., 2005b). Auch einzelne Substanzen der Kaffeebohnen beeinflussen die Qualität des Getränkes. Während Zanin et al. (2016) und Franca et al. (2005a) keinen Zusammenhang

zwischen einer verminderten Qualität und dem Gehalt an Chlorogensäure nachwiesen, schreiben Ky et al. (1999) und Farah et al. (2006) einem hohen Gehalt eine geringe Qualität zu.

1.5 Kaffeearoma

Ein wichtiges Kriterium bei der Wahl des Kaffees ist dessen Aroma. Neben der Sorte, Herkunft und Beschaffenheit der rohen Bohnen sowie der Extraktionstechnik der Herstellung des Kaffeegetränkes, tragen vor allem Temperatur und Dauer des Röstprozesses zur Entstehung des Gesamtaromas bei. Während des Röstens wird aus dem erbsenartigen, grünen Aroma der rohen Bohnen der beliebte und charakteristische Kaffeeduft.

Die flüchtigen Verbindungen im Röstkaffee gehören einer Vielzahl verschiedener Substanzklassen an, zu denen Aldehyde, Ketone, Alkohole, Ester, Pyrazine, Furane, Furanone, Säuren und Phenole gehören (Caporaso et al., 2018; Czerny et al., 1999; Czerny & Grosch, 2000). Über 1000 aromaaktive Substanzen wurden im Kaffee nachgewiesen, von denen jedoch nur eine geringe Anzahl zum charakteristischen Aroma beiträgt. Zu den sogenannten Schlüsselaromastoffen im gerösteten Kaffeepulver zählen Propanal, Acetaldehyd, 2,3-Butandion, 2,3-Pentandion, 2-Methyl-3-furanthiol, 2-Furfurylthiol, Methional, 3-Mercapto-3-methylbutylformiat, 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin, 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin, 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, 2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, Sotolon, 4-Ethylguajacol, 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanon, 4-Vinylguajacol, (*E*)- β -Damascenon und 3-Methyl-2-butenthiol. 3-Mercapto-3-methylbutylformiat hat zwar die niedrigste Geruchsschwelle, jedoch ist 2-Furfurylthiol hauptverantwortlich für die röstige Note (Blank et al., 1992; Czerny et al., 1999; Semmelroch & Grosch, 1995).

Die Schlüsselaromastoffe im aufgebrühten Kaffeegetränk unterscheiden sich von denen des gerösteten Pulvers. Die Unterschiede beruhen dabei nicht auf neuen Verbindungen, sondern sind konzentrationsbedingt. Thiole (wie 3-Mercapto-3-methylbutylformiat und 2-Furfurylthiol), Pyrazine und (*E*)- β -Damascenon sind in höheren Konzentration im Kaffeepulver vorhanden, wohingegen Aldehyde (wie Acetaldehyd, Propanal, Methylpropanal und 3-Methylbutanal), Methional, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon,

Sotolon und Vanillin im Kaffeegetränk dominieren (Mayer et al., 2000; Semmelroch & Grosch, 1995). 2,3-Butandion, 2,3-Pentandion, (*E*)- β -Damascenon, Methional, 3-Mercapto-3-methylbutylformiat, Abhexon, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, 4-Vinylguajacol, Guajacol, Sotolon, Vanillin und 2(5)-Ethyl-4-hydroxy-5(2)-methyl-3(2*H*)-furanon tragen zum typischen Aroma des aufgebrühten Kaffees maßgeblich bei (Sanz et al., 2002).

Nicht nur auf die Bildung flüchtiger Verbindungen, sondern auch auf die Entstehung von Geschmacksstoffen hat der Röstprozess einen entscheidenden Einfluss. Milde Röstungen führen zu dem typischen als angenehm empfundenen bitteren Geschmack, wohingegen höhere Temperaturen zu einer harschen, verbrannten, espressoartigen Bitterkeit führen. Aus den Chlorogensäuren bilden sich während der Röstung Mono- und Dilactone, welche für den angenehmen bitteren Geschmack verantwortlich sind. Für die espressoartige Bitterkeit sind vor allem 4-Vinylcatechololigomere, 1,3-Bis(3',4'-dihydroxyphenyl)butan, *trans*-1,3-Bis(3',4'-dihydroxyphenyl)-1-buten, sowie acht weitere mehrfach hydroxylierte Phenylindane verantwortlich, bei denen es sich um Abbauprodukte von Hydroxyzimtsäuren handelt (Blumberg et al., 2010; Frank et al., 2007).

1.6 Kaffee – Segen oder Fluch?

Ein Hauptgrund des Kaffeetrinkens ist die anregende Wirkung, für welche Koffein verantwortlich ist. Das komplexe Kaffeegetränk enthält eine Vielzahl weiterer biologisch aktiver Substanzen, zu denen vor allem polyphenolische Verbindungen und Terpene sowie die Mikronährstoffe Magnesium, Kalium, Niacin und Vitamin E zählen, weswegen Kaffee teilweise als *functional food* bezeichnet wird. Epidemiologische Forschungen der letzten Jahrzehnte zeigen, dass der Verzehr von Kaffee das Risiko verschiedener chronischer und degenerativer Krankheiten minimiert. Dazu gehören Typ II *Diabetes mellitus*, *Parkinson*, *Alzheimer* und weitere durch DNA-Schäden verursachte Krankheiten (Higdon & Frei, 2006; Baspinar et al., 2017; Pahlke et al., 2019; Dórea & da Costa, 2005). Insbesondere den Polyphenolen, mit den Chlorogensäuren als Hauptvertreter, wird die positive gesundheitliche Wirkung zugeschrieben. Die biologische Aktivität hängt jedoch von deren Absorption und Metabolismus im menschlichen Organismus ab. So wird Chlorogensäure, welche antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt, von der Darmflora in Kaffee- und Chinasäure gespalten. Das Spaltprodukt Kaffeesäure weist ein höheres

antioxidatives Potential als Chlorogensäure auf. Dies lässt vermuten, dass Kaffeesäure und nicht Chlorogensäure selbst für die positiven gesundheitlichen Effekte verantwortlich ist (Sato et al., 2011; Oboh et al., 2015; Gonthier et al., 2003). Die meisten Studien bezüglich der gesundheitsfördernden Wirkung des Kaffeekonsums beziehungsweise der Chlorogensäure beruhen auf *in vitro* Experimenten sowie Tierversuchen. Zudem wird die Ergänzung von Antioxidantien in der Ernährung und deren Auswirkung auf die menschliche Gesundheit kontrovers diskutiert. Zusätzliche Forschungsarbeiten zur gesundheitsfördernden Wirkung von Chlorogensäuren sind somit nötig (Tajik et al., 2017; Berger et al., 2012; Ristow, 2014).

Andererseits führt der Verzehr von Kaffee bei sensitiven Personen unter anderem zu Sodbrennen und Magenproblemen. Die genauen Ursachen für diese Beschwerden sind nicht bekannt. Koffein, Pyrogallol, Catechol, ⁶N-Alkanoyl-5-hydroxytryptamid, N-Methylpyridin und Chlorogensäuren stehen in Verdacht für diese Beschwerden verantwortlich zu sein. Vor allem eine hohe Konzentration von N-Methylpyridin zusammen mit niedrigen Konzentrationen an ⁶N-Alkanoyl-5-hydroxytryptamid und Chlorogensäure scheint die Sekretion von Magensäure zu mindern (Rubach et al., 2014; Rubach et al., 2012).

Die Herstellung eines bekömmlichen Kaffees ist seit langem von Interesse. Die Entfernung der Wachsschicht, das Lendrich-Verfahren (Behandlung der rohen Kaffeebohnen mit Wasserdampf bei niedrigen Temperaturen) und der Darboven-Prozess (Behandlung von rohen Kaffeebohnen mit Wasserdampf unter Druckeinwirkung) sind herkömmliche Beispiele für die Herstellung gut verdaulicher Kaffeegetränke. Da bei diesen Verfahren Rohkaffee behandelt wird, ist keine Aussage darüber möglich, ob die verbesserte Bekömmlichkeit auf dem Abbau der Chlorogensäuren oder einer Verminderung der Röstprodukte wie Catechol, Hydrochinon und Pyrogallol beruht. Zudem wird keine einzelne Substanzkonzentration verringert, sondern jeweils eine Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen minimiert (Ehrlich et al., 1999; Clarke, 1987). Es ist jedoch wichtig, gezielt und spezifisch die Konzentrationen einzelner unerwünschter Verbindungen wie Säuren und Bitterstoffe herabzusetzen ohne biologisch positiv wirkende Inhaltsstoffe zu verringern oder zu entfernen (Fujioka & Shibamoto, 2008).

1.7 Verwendung von Enzymen während der Kaffeeverarbeitung

Die Verringerung einzelner Substanzen kann durch die Verwendung von Enzymen erreicht werden. Enzymatische Prozesse spielen schon seit jeher eine entscheidende Rolle bei der Kaffeegewinnung. Während der Rohkaffeeaufarbeitung treten spontane Fermentationen auf. Für diesen komplexen mikrobiologischen Vorgang sind unter anderem Hefen, Bakterien, wie Enterobakterien und Milchsäurebakterien sowie filamentöse Pilze verantwortlich, welche durch ihre pektinolytische Aktivität die noch an den Bohnen anhaftende Schleimschicht und das Fruchtfleisch abbauen, das Wachstum Mykotoxinproduzierender Pilze verhindern und eine Vielzahl neuer Substanzen darunter Ethanol, organische Säuren sowie Aromastoffe bilden. Über 50 verschiedene beteiligte Spezies wurden bereits identifiziert. Die Verwendung ausgewählter Starterkulturen hat sich in den letzten Jahren etabliert, um nicht nur den Fermentationsprozess zu beschleunigen und zu kontrollieren, sondern auch um eine hohe und gleichbleibende Kaffeequalität zu erzielen, das Wachstum toxischer Pilze einzuschränken und weniger wirtschaftliche Ausfälle zu gewährleisten. Fehler während der Fermentation können zu einem Wachstum von Mikroorganismen führen, welche Aroma und Farbe negativ beeinflussen. Fehlfermentierte Bohnen sind auch als Stinkbohnen (engl.: *stinker beans*) bekannt. In der Literatur sind nur wenige Mikroorganismen und Enzyme beschrieben, welche als Starterkulturen eingesetzt werden. Zudem fehlen den meisten Studien Feldbedingungen. Ein Beispiel ist die Verwendung einer Mischung dreier *Saccharomyces* Spezies, um den Abbau des Fruchtfleisches zu beschleunigen. Besonders geeignet als Starterkulturen sind *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Pichia guilliermondii* und *Pichia fermentans* (Vinícius de Melo Pereira et al., 2017; Vinícius de Melo Pereira et al., 2016). Zusätzlich werden Pektinasen, Cellulasen, Hemicellulasen und Galactomannasen, vor allem mikrobiellen Ursprungs, eingesetzt (Patel et al., 2016).

Nicht nur zur Fermentationssteuerung werden Enzyme während der Kaffeeverarbeitung zugesetzt, sondern auch zur Verbesserung der Qualität und Verminderung gesundheitsgefährdender Substanzen. Das Zusammenwirken einer Polygalacturonase und Ferulasäureesterase aus *Aspergillus tubingensis* resultiert sowohl in einer kürzeren Fermentationsdauer des Rohkaffees als auch in einer verbesserten Qualität des Röstkaffees, da Chlorogensäuren und Chlorogensäurelactone vermindert und somit die Bitterkeit und

Säure des Getränkes verringert wurden (Tai et al., 2014). Die Behandlung mit Zellwandverdauenden Enzymen oder Phenoloxidasen führt ebenfalls zu einem verbesserten Aroma und einer reduzierten Bitterkeit (Molina et al., 2016; Martinez & Balaban, 2009), wohingegen mit einer Asparaginase die Acrylamidkonzentration vermindert wird (Xu et al., 2016). Nicht nur Rohkaffee, sondern auch Kaffeeextrakte werden enzymatisch behandelt. Die Verwendung verschiedener Esterasen resultiert unter anderem in verbesserten antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften (Bel-Rholid et al., 2009b) oder verringerter Bitterkeit (Kraehenbuehl et al., 2017).

1.8 Enzyme in der Lebensmittelindustrie

1.8.1 Entwicklung bis zur Gegenwart

Nicht nur bei der Kaffeeherstellung, sondern auch bei der allgemeinen Produktion von Nahrungsmitteln sind Enzyme seit Jahrhunderten von großer Bedeutung. Klassische Beispiele sind fermentierte Lebensmittel und Getränke auf Sojabasis, sowie die Käse-, Brot- und Bierproduktion. Bei der anfänglichen Herstellung dieser Lebensmittel waren das Vorhandensein, die Funktionsweise und die Wirkung von Enzymen noch nicht bekannt. Mit deren Entdeckung und dem Verständnis von Aufbau und Funktionsweise ab dem 19. Jahrhundert stieg der Gebrauch in der Lebensmittelindustrie. Insbesondere bei der Fruchtsaftherstellung verlief die Entwicklung von Enzym- und Fruchtsaftindustrie parallel, da durch die Verwendung von Enzymen die Qualität maßgeblich verbessert und die Produktionskosten reduziert wurden. Die hohe Spezifität, die Funktionsweise bei milden Bedingungen (pH, Temperatur, Druck), hohe Aktivitäten und Umsatzraten, kleine benötigte Mengen, eine sichere und umweltfreundliche Alternative zu chemischen Methoden machen unter weiteren Vorteilen den Einsatz von Enzymen attraktiv. Gleichzeitig wurden Prozesse entwickelt, um deren Eigenschaften anzupassen und zu optimieren, die Produktion zu steigern und damit die Wirtschaftlichkeit zu verbessern. Die stetig steigende Verwendung von Enzymen in der Lebensmittelindustrie, die mit den größten Einsatzbereich industrieller Enzyme darstellt, ist einhergehend mit der abneigenden Haltung der Verbraucher gegenüber mit chemischen Methoden hergestellten Lebensmitteln (Poulsen & Buchholz, 2003; Beckhorn et al., 1965; Zhang et al., 2018; Ramadan & Moersel, 2007).

Heutzutage werden Enzyme bei der Lebensmittelproduktion gezielt eingesetzt, um Textur, Aroma, Geschmack, Qualität, Nährwertdichte und Haltbarkeit zu verbessern. Ebenso werden diese zur Entfernung unerwünschter Bestandteile, wie zum Beispiel Bitterstoffe in Kaffee und Fruchtsäften oder biogene Amine in fermentierten Lebensmitteln, verwendet. Enzyme können tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs sein und werden als Lösung, getrocknet oder immobilisiert eingesetzt. Eine große Anwendung haben mikrobielle Enzyme aufgrund ihrer hohen Spezifität und Stabilität. Auch die Verwendung von Enzymen pilzlichen Ursprungs ist weit verbreitet, da Pilze eine Vielzahl an Enzymen sekretieren und einfach zu kultivieren sind. Bekannte Vertreter sind Amylasen und Pektinasen, welche bei der Brotherstellung, beim Bierbrauen und der Fruchtsaftproduktion Anwendung finden. Bei der Apfel- und Orangensaftproduktion werden Laccasen, Naringinasen und Limoninasen eingesetzt, um neben der Erhöhung der Saftausbeute eine bessere Farbstabilität zu erreichen, Trübstoffe zu entfernen und die Bitterkeit zu reduzieren. Häufig werden pflanzliche Peptidasen, darunter Papain, Bromelain und Ficin zum Zartmachen von Fleisch und zur Hydrolyse von tierischen, Milch- und Pflanzenproteinen verwendet. Bekannte tierische Peptidasen sind Chymosin, Trypsin, Pepsin und Lysozym. Neuere Beispiele für den Einsatz optimierter Enzyme sind Peptidasen bei der Herstellung von gut verdaulicher und weniger allergener HF-Milch (*hydrolyzed formula milk*) für Säuglinge, rekombinante Amylasen in der Backindustrie, Peptidasen zur Herstellung von glutenfreiem Brot, Pasta und Bier, sowie Asparaginasen zur Reduzierung der Bildung von Acrylamid in erhitzten Lebensmitteln (Subin & Bhat, 2016; Zhang et al., 2018; Ribeiro et al., 2010).

Techniken zur Optimierung sind Screening-Methoden, *Protein engineering*, rekombinante Techniken, sowie Immobilisierungen. So ermöglichen rekombinante DNA-Technologien die Produktion neuartiger Enzyme mit maßgeschneiderten Eigenschaften. Des Weiteren wurden mikrobielle und pilzliche Stämme mit erhöhter Enzymproduktion und/oder mit verringerter Bildung toxischer Metabolite entwickelt. Die Enzymimmobilisierung führt zu verbesserter Wirtschaftlichkeit, da neben weiteren Vorteilen eine Wiederverwendung mit nur geringen Aktivitätsverlusten ermöglicht wird (Patel et al., 2016).

1.8.2 Enzymimmobilisierung

Herausforderungen bei der Verwendung von Enzymlösungen sind deren Lagerfähigkeit, Aktivitätsverlust, Anfälligkeit bei höheren Temperaturen, Vorhandensein organischer Lösungsmittel, Rückgewinnung und Wiederverwendung. Eine in den letzten Jahrzehnten aufkommende Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, ist die Immobilisierung der Enzyme. Bei dieser Technik wird das Enzym auf oder in einem festen Trägermaterial angebracht. Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen Methoden, welche auf Adsorption, Einschluss, kovalente Bindung und Verkapselung beruhen. Trägermaterial-freie Techniken sind zum Beispiel *cross-linked enzyme crystals* und *cross-linked enzyme aggregates* (Homaei et al., 2013) (s. Abbildung 1-4).

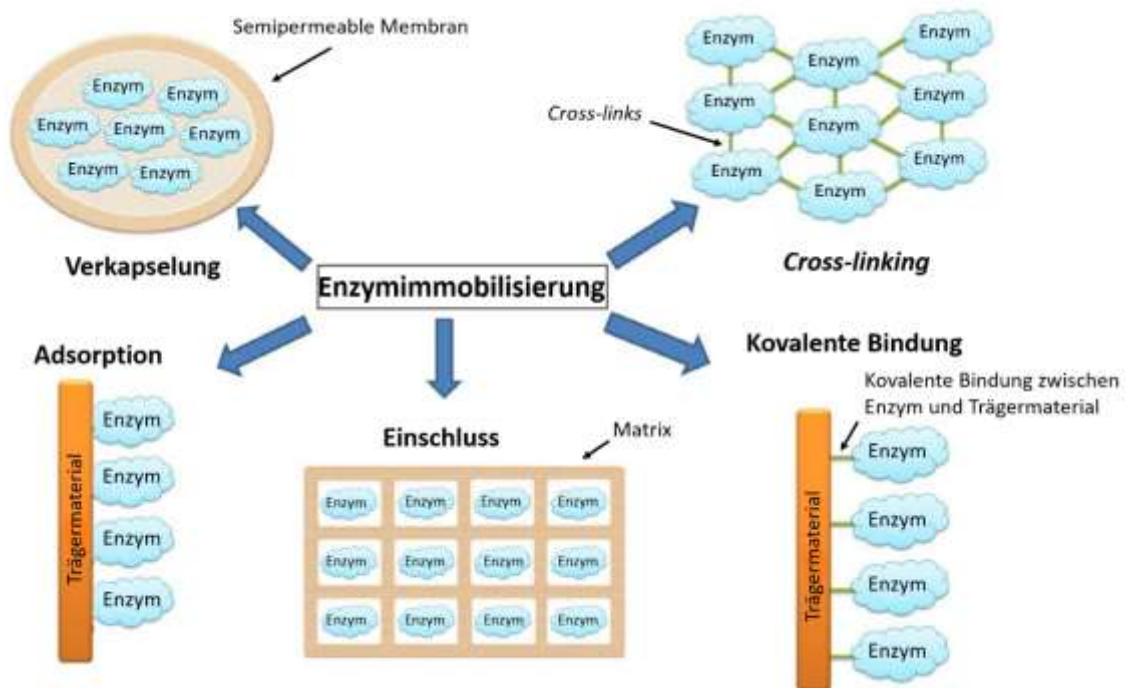


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung verschiedener Immobilisierungstechniken (nach Sirisha et al., 2016).

Die Verwendung von mesoporösem Silika als Trägermaterial stellte sich in den letzten Jahren als besonders geeignet heraus. Die Immobilisierung des Enzyms beruht dabei auf physikalischer Adsorption. Adsorptionsmethoden sind einfach und kostengünstig durchzuführen. Mesoporöses Silika weist einzigartige Eigenschaften auf wie eine große Oberfläche, enge Porengrößenverteilung und variable Porengrößen (2 – 50 nm), sodass große Proteine in den Poren adsorbiert oder aufgenommen werden. Mesoporöse Silikate sind zudem chemisch und mechanisch stabil. Ein vielfach bewährtes Trägermaterial ist

Santa Barbara Amorphus Type 15 (SBA-15). Dieses besteht aus einem regelmäßig angeordneten Netzwerk sechseckiger, stabförmiger Silikastrukturen mit runden, glatten Poren definierter Größe (Homaei et al., 2013; Bonzom et al., 2018; Hüttner et al., 2017). Eine stabilere Fixierung auf dem Trägermaterial wird durch kovalente Bindungen erreicht, die über funktionale Gruppen auf der Enzymoberfläche ausgebildet werden. So reagieren Aldehydgruppen des Trägermaterials insbesondere mit der freien Aminogruppe von Lysin auf der Oberfläche des Proteins. Eine nachfolgende Reduktion mittels Natriumcyanoborhydrid oder anderen Reagenzien führt zu einer stabilen sekundären Aminbindung (Homaei et al., 2013).

Die Immobilisierung ermöglicht viele Reaktionszyklen, präzise Prozesskontrolle sowie kontinuierliche und automatisierte Prozessführung. Zusätzlich liegt das Enzym stabilisiert vor und ist im Endprodukt nicht vorhanden. Die Glucose-Isomerase zur Herstellung von *High-Fructose Corn Sirup*, Lactasen zur Herstellung lactosefreier Milch und Pektinasen bei der Fruchtsaftherstellung werden bereits in immobilisierter Form industriell verwendet (Swaigood, 2003; Sukumaran et al., 2016; Sirisha et al., 2016). Vorteile immobilisierter Pektinasen bei der Fruchtsaftklärung sind unter anderem ein breiteres pH-Optimum, eine verbesserte Aktivität bei Raumtemperatur und die Wiederverwendbarkeit, wodurch die Klärung wirtschaftlich attraktiver wird (Rajdeo et al., 2016).

1.9 Hydroxymizimtsäureesterasen in der Lebensmittelindustrie

Auf Grund des breit gefächerten Anwendungsbereiches ist seit Anfang der letzten Jahrtausendwende die Verwendung von Ferulasäureesterasen in der chemischen, Öl-, Textil-, Papier-, pharmazeutischen, Futtermittel- und Lebensmittelindustrie rasant gestiegen. Ferulasäureesterasen (*ferulic acid esterases*, FAEs) (EC 3.1.1.73) bilden eine Untergruppe der Carboxylsäureesterasen, die Ferulasäure und weitere Hydroxymizimtsäuren durch Hydrolyse vor allem aus Pflanzenzellwänden freisetzen. In der Lebensmittelindustrie finden diese unter anderem Anwendung in der Back- und Fruchtsaftindustrie (Fazary & Ju, 2008; Dilokpimol et al., 2016). Zudem werden diese verwendet, um Aromavorstufen wie Ferulasäure für Vanillin und 4-Vinylguajacol zu gewinnen (Linke et al., 2017; Nieter et al., 2017; Bel-Rhlid et al., 2013). Weitere Hydroxymizimtsäureesterasen sind zur Freisetzung von Kaffeesäure, welche ein hohes antioxidatives Potential aufweist, aus Cichoriensäure,

Kaftarsäure (Bel-Rhlid et al., 2012), Rosmarinsäure (Bel-Rhlid et al., 2009a) und Chlorogensäure (Bel-Rhlid et al., 2013; Asther et al., 2005) bekannt. Auch ist die Verwendung einer Chlorogensäureesterase aus *Ustilago maydis* in der Backindustrie zur Teigerweichung (Nieter et al., 2016b) ebenso beschrieben wie die Behandlung von Kaffee mit Esterasen zur Entfernung der Chlorogensäurelactone, um die Bitterkeit des Getränkes zu reduzieren (Kraehenbuehl et al., 2017).

Eine Applikationsstudie zur Aufwertung von Nebenströmen ergab, dass eine *p*-Cumarsäureesterase aus dem Basidiomyceten *Rhizoctonia solani* (RspCAE) Chlorogensäure zu Kaffeesäure und Chinasäure spaltete (s. Abbildung 1-5) und zeigte damit eine Aktivität auf komplexen pflanzlichen Matrices.

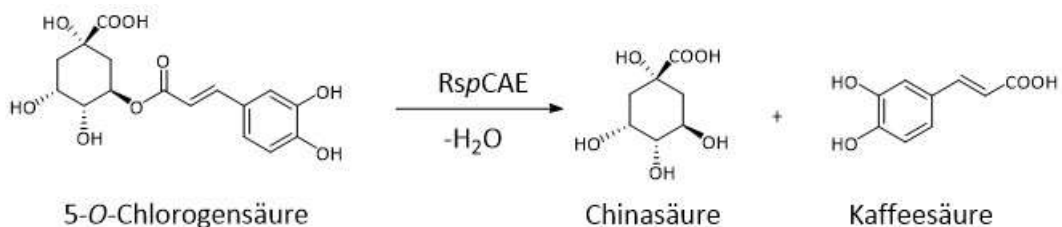


Abbildung 1-5: Der Reaktionsmechanismus der RspCAE zeigt die Hydrolyse von Chlorogensäure zu China- und Kaffeesäure.

Die RspCAE ist eine extrazelluläre FAE im Kulturüberstand von *Rhizoctonia solani* mit einem Temperaturoptimum von 30 °C und einem pH-Optimum von pH 6. Das Protein setzt sich aus 563 Aminosäuren zusammen und weist eine berechnete molare Masse (mit Signalpeptid) von 61 kDa auf (s. Abbildung 1-6).

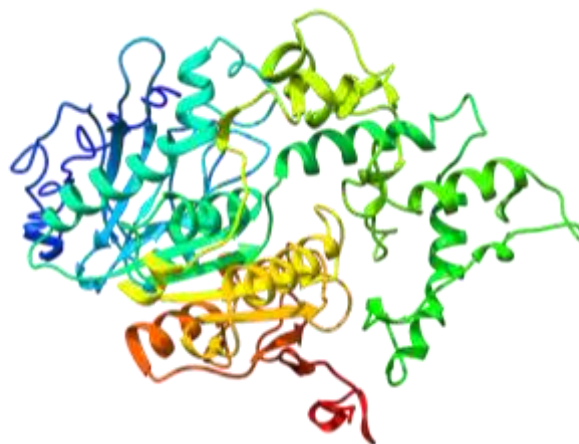


Abbildung 1-6: 3D-Struktur der *p*-Cumarsäureesterase aus *Rhizoctonia solani*.

Da die RspCAE vor allem *p*-Cumarsäuremethylester umsetzt, aber auch Chlorogensäure hydrolysiert, wird diese als *p*-Cumarsäureesterase (*p*CAE) mit guter Nebenaktivität für

Chlorogensäure eingestuft. Die rekombinante Produktion ermöglicht hohe Enzymaktivitäten und geringe Produktionskosten, womit die industrielle Anwendung ermöglicht wird (Nieter et al., 2017).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Kaffee wird täglich weltweit in großen Mengen getrunken. Gründe dafür sind neben der anregenden und leistungssteigernden Wirkung das beliebte Aroma und der gute Geschmack. Dennoch gibt es sensitive Personen, die nach Kaffeekonsum über Sodbrennen und Magenreizungen klagen. Die Auslöser für diese Beschwerden sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass neben weiteren Substanzen Chlorogensäuren für diesen Effekt verantwortlich sind. Durch langes Rösten und hohe Temperaturen können Chlorogensäuren, welche in großen Mengen im rohen Kaffee vorkommen, abgebaut werden. Durch Veränderungen der Röstparameter wird jedoch auch die Bildung von Aroma-, Geschmacks- und Farbstoffen beeinflusst. So nehmen mit fortlaufender Röstdauer und ansteigenden Temperaturen flüchtige Verbindungen mit verbranntem Geruchseindruck und bittere Geschmacksstoffe zu. Durch einen schonenden und langsamen Röstprozess kann ein chlorogensäurearmer Kaffee ohne negative Veränderung der sensorischen Eigenschaften erhalten werden. Jedoch wird in der Industrie in der Regel ein Schnellröstverfahren angewendet, bei dem in kurzer Zeit bei sehr hohen Temperaturen die Bohnen geröstet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, Chlorogensäuren im Kaffee abzubauen ohne den Röstprozess zu verändern. Dabei wurde der Fokus auf die im Kaffee dominierende Chlorogensäure, die 5-O-Chlorogensäure, gelegt. Der Chlorogensäuregehalt im Kaffee sollte enzymatisch vermindert werden. Da Enzyme seit jeher bei der Herstellung von Lebensmittel verwendet werden, sind deren Vorteile und Anwendbarkeit allgemein bekannt. Deren biotechnologische Herstellung und Verwendung ermöglicht den Verzicht auf Chemikalien und erfüllt die Erwartung der Konsumenten an natürliche Lebensmittel. Als Enzym der Wahl stellt die *RspCAE* einen vielversprechenden Kandidaten dar. Vorarbeiten zeigten, dass diese Esterase Chlorogensäure hydrolysiert. Des Weiteren ermöglicht eine rekombinante Produktion der *RspCAE* deren Herstellung im Großmaßstab. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit sollte folglich Kaffeepulver sowie ein Kaffeegetränk mit *RspCAE* behandelt werden, um selektiv und spezifisch 5-CQA abzubauen. Da Chlorogensäure ein Vorläufer von Aroma-, Geschmacks- und Farbstoffen ist, sollte anschließend durch analytische und sensorische Methoden der Einfluss der enzymatischen Behandlung auf Chlorogensäuregehalt, Aroma und Geschmack untersucht werden. Des Weiteren sollten die

entwickelten und optimierten Behandlungsprozesse auf andere chlorogensäurereiche Lebensmittel transferiert werden. Dafür wurde Apfelsaft ausgewählt, da dieser ebenfalls eine hohe Chlorogensäurekonzentration aufweist, sich dessen Matrix (pH-Wert, Vorhandensein vieler Fruchtester) jedoch grundlegend von Kaffee unterscheidet. Ziel dieses Versuches war, zusätzliche Informationen hinsichtlich eines potentiellen Einsatzes der RspCAE für weitere Anwendungen in der Lebensmittelindustrie zu erhalten.

3 Vorwort zur Publikation „Enzymatic mitigation of 5-O-chlorogenic acid for an improved digestibility of coffee”

5-CQA, welche in Rohkaffee in hohen Konzentrationen enthalten ist, wird für Beschwerden wie Sodbrennen und Magenprobleme nach Kaffeekonsum mitverantwortlich gemacht (vgl. Kapitel 1.6). Durch harsche Röstbedingungen wird ein chlorogensäurearmes Getränk erhalten, jedoch wird gleichzeitig die Bildung von Aroma-, Geschmacks- und Farbstoffen beeinflusst (vgl. Kapitel 1.3.2). Enzyme stellen effektive Werkzeuge dar, um spezifisch bestimmte Zielsubstanzen abzubauen und bieten somit eine Möglichkeit, den Chlorogensäureabbau von den optimierten und etablierten Parametern des Röstprozesses zu entkoppeln. Aus den Vorarbeiten von Nieter et al. (2017) ging die RspCAE als geeigneter Kandidat zur Hydrolyse von 5-CQA in Kaffee hervor (vgl. Kapitel 1.9). Obwohl bei der Kaffeeherstellung der Einsatz von Enzymen bereits praktiziert wird (vgl. Kapitel 1.7), lagen zu Beginn der Forschungsarbeiten keine Veröffentlichungen zum spezifischen Abbau von 5-CQA in Kaffee vor. Literaturquellen beschreiben den enzymatischen Abbau, jedoch nicht die sensorischen Effekte im Getränk (Bel-Rhliid et al., 2013) oder den Abbau von Chlorogensäurelactonen (Kraehenbuehl et al., 2017). Durch den Lendrich- oder Darboven-Prozess wird zwar ein magenfreundlicher Kaffee erhalten, allerdings werden bei diesen Verfahren mehrere Substanzen unspezifisch minimiert.

Die nachfolgende Arbeit sollte diese Kenntnislücke schließen und beschreibt die Behandlung von Kaffeepulver mit RspCAE zur selektiven Hydrolyse von 5-CQA. Diese Technik ermöglichte eine Verminderung um 98 % ohne Veränderung des Röstprozesses. Obwohl 5-CQA ein Vorläufer für Aroma- und Geschmacksstoffe ist, wurden keine signifikanten sensorischen Unterschiede zwischen dem enzymatisch behandelten und unbehandelten Kaffee erhalten.

An dieser Publikation waren Frau Dr. Nieter sowie Herr Prof. Berger beteiligt. Frau Nieter identifizierte, produzierte und charakterisierte in Vorarbeiten die RspCAE als eine Esterase mit der Fähigkeit 5-CQA zu hydrolysieren. Herr Berger stellte als Arbeitsgruppenleiter die erforderlichen Drittmittel zur Verfügung und war sowohl für die Projektidee als auch die Betreuung im Rahmen der Promotion verantwortlich.

Die nachfolgende Arbeit wurde in *Food Chemistry* veröffentlicht (Siebert et al., 2018) (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.061>).

4 Enzymatic mitigation of 5-O-chlorogenic acid for an improved digestibility of coffee

Mareike Siebert, Ralf G. Berger, Annabel Nieter

Highlights

- Distinct chlorogenic acid degradation in coffee powder using a *p*-coumaroyl esterase.
- Similar odour impressions and intensities of enzyme treated and control coffee.
- Similar taste of enzymatically treated and untreated coffee.
- Chlorogenic acid degradation decoupled from formation of aroma and taste compounds.

Abstract

A *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani* was used to decrease 5-O-chlorogenic acid (5-CQA) content in coffee powder. HPLC-UV showed a decline of up to 98% of 5-CQA after the enzyme treatment. Effects on aroma were determined by means of aroma extract dilution analysis. Flavour dilution factors of treated and control extract differed in four volatile compounds only. Effect on aroma and taste was evaluated by sensory tests. No significant differences were perceived, and no off-flavour nor off-taste was noted. As chlorogenic acids are suspected to cause stomach irritating effects in sensitive people, the enzyme treatment offers a technically feasible approach to improve the quality of coffee beverages by reducing 5-CQA concentration without significantly affecting the aroma and taste profile.

Keywords

Coffee; chlorogenic acid; esterase; digestibility; flavour

4.1 Introduction

Coffee is one of the most popular beverages and consumed in large amounts all over the world. However, sensitive people complain about heartburn and stomach irritation even after drinking a small cup of coffee (Boekema et al., 1999; Cohen, 1980; Pehl et al., 1997). The cause and mechanism of these symptoms are still unclear. Various substances are under suspicion. Among them are caffeine, pyrogallol, catechol, ⁶N-alkanoylhydroxytryptamide and N-methylpyridinium, but also chlorogenic acids. The latter refer to a related family of esters of hydroxycinnamic acids (caffeic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid) with quinic acid and plays an important role in gastric acid secretion. *Inter alia*, a high concentration of N-methylpyridinium and low concentrations of ⁶N-alkanoylhydroxytryptamide and chlorogenic acids led to lower gastric acid secretion after the ingestion of coffee (Rubach et al., 2012; Rubach et al., 2014). Moreover, some people complained about headache and urinary tract infection after consumption of chlorogenic acids rich green coffee extracts (Blum et al., 2007).

Coffee is consumed due to its stimulating effect, pleasant flavour and attractive taste. More than 900 compounds contribute to the complex volatile composition (Buffo & Cardelli-Freire, 2004). Among them are approximately 25 character impact components (Blank et al., 1992; Semmelroch et al., 1995). Besides the volatile aroma, bitterness and acidity are important factors of coffee quality (Drewnowski, 2001; Masi et al., 2015). Chlorogenic acids not only play a role as antioxidants of coffee, but also contribute to the aroma and taste profile (Moon & Shibamoto, 2010). A low cup quality was related to a high 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA) concentration (Farah et al., 2006).

There is a continuing high interest in producing a “healthy and mild” coffee beverage (Clarke, 1987). Dewaxing, the Lendrich (low-temperature steaming) and the Darboven process (high-pressure steam and vacuum procedure) are supposed to produce a better digestible coffee. Since beans are treated before roasting, it cannot be claimed with certainty whether chlorogenic acid itself or its roasting products are responsible for the beneficial effects (Ehrlich et al., 1999). A reliable procedure to reduce chlorogenic acids concentrations is prolonged roasting at high temperatures (Moon et al., 2009; Trugo & Macrae, 1984). However, roasting neither selectively removes chlorogenic acids, nor can

roasting conditions be decoupled from the formation of desired volatiles and undesired risk compounds, such as acrylamide and furans.

Enzymes are efficient tools to selectively convert a certain target compound. Since enzymes have always been a part of food processing, the benefits of their application in food industry are well-known (Dewdney, 1973). For that reason, enzymatic treatment of coffee presents a feasible approach to degrade chlorogenic acids without changing other coffee constituents. Ferulic acid esterases (FAE) are widespread enzymes which release phenolic acids *inter alia* by hydrolysis reactions in plant cell walls. This class of enzymes is already applied in the food, bioethanol and pharmaceutical industry. A great number of FAEs are of fungal origin, but also other sources are known (Ramos-de-la-Peña & Contreras-Esquivel, 2016). Bel-Rhliid, Thapa, Kraehenbuehl, Hansen and Fischer (2013) demonstrated the enzymatic hydrolysis of chlorogenic acids with a FAE from *Lactobacillus johnsonii*. Other esterases were used to hydrolyse chlorogenic acid lactones to reduce the bitterness in roasted coffee extracts (Kraehenbuehl et al., 2017). Nieter, Kelle, Linke and Berger (2017) identified, produced and characterized a *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani* (RspCAE) with a chlorogenic acid esterase side activity possessing the ability to hydrolyse the ester linkage between caffeic and quinic acid. In the present work, RspCAE was used to reduce 5-CQA content in coffee. The effect of an enzymatic degradation of chlorogenic acids on the aroma and taste profile of coffee was determined by combining analytical and sensory methods. It should be investigated if it was possible to decouple the mitigation of chlorogenic acids from the well-established and optimized conditions of the various roasting processes.

4.2 Material and methods

4.2.1 Chemicals

All chemicals were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany) except caffeic acid, which was from Fluka (Buchs, Switzerland). Ultrapure water was used for chemical analysis (TKA-GenPure, Labor- und Analysen-Technik GmbH, Garbsen, Germany). Solvents (GC grade) were rectified before usage.

4.2.2 Coffee

Green coffee beans (100% Arabica from Columbia) were purchased from a local coffee shop. Coffee beans were roasted at 240 °C for 14 min with a Gene Café Coffee bean roaster (CBR-101, Ansan, Korea) and ground to grinding degree three (according to operating manual for the use of filter coffee) with a WMF KÜCHENminis® handheld coffee grinder (WMF consumer electric GmbH, Jettingen-Scheppach, Germany).

4.2.3 Enzyme

The *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani* (RspCAE) was produced heterologously in *Komagataella phaffii* and purified as described elsewhere (Nieter et al., 2017). The activity of enzyme needed to release 1 µmol min⁻¹ of free ferulic acid at 37 °C was defined as one Unit (U). Enzyme activity was determined using methyl ferulate as substrate. The applied enzyme solution had an activity of 2480 U L⁻¹.

4.2.4 Enzymatic treatment of roasted coffee powder

Roasted coffee powder (1.5 g) was incubated with 400 µL RspCAE solution (660 mU g⁻¹ coffee powder) in 350 µL Tris buffer (500 mM, pH 6.0) and 2.75 mL water at 30 °C and 200 rpm for two hours (INFORS HT, Multitron Pro, Bottmingen, Switzerland). After the enzyme treatment, the coffee powder was freeze-dried (VaCo 2, Zirbus technology, Bad Grund, Germany). A control sample was prepared using 1.5 g roasted coffee powder, 3.15 mL water and 350 µL buffer solution.

4.2.5 HPLC analysis

5-CQA and caffeic acid concentrations were determined by means of HPLC. 100 mg treated and freeze-dried coffee powder was incubated with 2.5 mL water at 50 °C and 350 rpm for four hours (Eppendorf thermomixer comfort, Hamburg, Germany). 2.5 mL Methanol was added to improve the chlorogenic acid yield. The samples were mixed and stored for ten minutes at 20 °C. Then the samples were centrifuged (10 min, 7500 × g, Hettich, Rotina 460 R, Tuttlingen, Germany) and filtered (syringe filter Chromafil® RC-45/25, Macherey-Nagel, Düren, Germany). This experiment was done in triplicate. The HPLC was equipped with a RP-18e reverse phase column (Chromolith Performance RP-18e, 100 mm × 4.6 mm i. d.; Merck, Darmstadt, Germany) and a UV/vis detector (SPD-10A VP; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany). The following gradient was used at ambient

temperature: initial 90% solvent A (0.1% formic acid in water) and 10% solvent B (acetonitrile), 10–36% solvent B in 8 min, 36–50% solvent B in 1.5 min, 50–96% solvent B in 0.5 min, 96–99% solvent B in 2.5 min, 99–15% solvent B in 0.5 min, 15–10% solvent B in 1 min. Finally, the system was re-equilibrated with 10% solvent B for 1 min. 10 μL sample were injected and the flow rate was 1.5 mL min^{-1} . 5-CQA and caffeic acid were detected at 323 nm. External calibration curves of 5-CQA and caffeic acid were done for quantitation. Caffeic acid was dissolved in dimethyl sulfoxide, acetonitrile and water (1/4/5, v/v/v) (500 mg L^{-1}). A calibration curve was plotted with working solutions of 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 300, 500 mg L^{-1} . The solvent of the chlorogenic acid stock solution (1000 mg L^{-1}) was water. The calibration curve was generated using working solutions of 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 mg L^{-1} .

4.2.6 Isolation of volatiles

One gram of the freeze-dried coffee powder was extracted with 150 mL pentane/diethyl ether (1:1.12, v/v) by a Soxhlet extraction. The extract was reduced to a volume of approximately 40 mL by means of Vigreux distillation at $45 \text{ }^\circ\text{C}$. The volatiles were isolated using thin layer high vacuum distillation as described elsewhere (Krings et al., 2003). Finally, the extract was concentrated to a volume of approximately 0.5 mL with a Vigreux column ($45 \text{ }^\circ\text{C}$) and analysed by means of GC-FID/O and GC-MS.

4.2.7 Gas Chromatography-FID/Olfactometry

For aroma extract dilution analysis, the aroma extracts were diluted stepwise 1:10 (v/v) with pentane/diethyl ether (1:1.12, v/v). Flavour dilution factors (FD-factors) were determined by sniffing every dilution on an Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using capillaries DB-WAX (30 m, 0.32 mm ID, film thickness $0.25 \mu\text{m}$; Agilent J&W GC Columns, USA) and HP-5 (30 m, 0.32 mm ID, film thickness $0.25 \mu\text{m}$; Agilent J&W GC Columns, USA). The injection volume was $2 \mu\text{L}$, and the injection temperature of the cool on column injector was $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (held for 5 min). After heating at $8 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ the final temperature of $230 \text{ }^\circ\text{C}$ was held for 10 min. The flow of the hydrogen 5.0 carrier gas was 2 mL min^{-1} . At the end of the capillary, the effluent was split 1:1 between a flame ionisation detector (FID) and an olfactory detection port (ODP3, Gerstel, Mülheim, Germany). Temperatures of FID and ODP were $250 \text{ }^\circ\text{C}$ and $230 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. Aroma extract dilution analysis was performed in duplicates. Eight different panellists sniffed the aroma extracts.

Retention indices were calculated (van den Dool & Kratz, 1963). For this the homologous series of *n*-alkanes (C8–C30) was injected.

4.2.8 Gas chromatography–mass spectrometry

GC–MS was carried out using an Agilent 7890B gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a VF-WAXms capillary column (30 m, 0.25 mm ID, film thickness 0.25 μm ; Agilent J&W GC Columns, USA) and a mass selective detector 5977A MSD (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The injection technique was cool-on-column, and the injection volume was 0.5 μL . The initial temperature (40 $^{\circ}\text{C}$) was held for 3 min, then raised to 230 $^{\circ}\text{C}$ at 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and held for 10 min. The flow rate of the helium 5.0 carrier gas was 1 mL min^{-1} . Mass spectra were obtained with following conditions: electron impact mode (EI), ionization voltage 70 eV, continuous scan from m/z 33 to 300. Transfer line, source and quadrupole temperatures were 230 $^{\circ}\text{C}$, 230 $^{\circ}\text{C}$ und 150 $^{\circ}\text{C}$, respectively.

4.2.9 Sensory analysis

For sensory analysis, three grams of roasted and ground beans were enzyme treated. Potassium phosphate buffer (500 mM, pH 6.0) was used instead of Tris-buffer with regard to tasting the samples. After incubation, the wet coffee powder was brewed immediately with 100 mL hot water (80 $^{\circ}\text{C}$) through a coffee filter (Melitta Original, 1 \times 4, Melitta, Minden, Germany) and presented to the panellists for orthonasal und retronasal evaluation. The ten panellists (four male and six female) were all regular coffee drinkers and were trained in three sessions to differentiate between the sensory attributes. Attributes used for sensory evaluation were determined in preliminary tests. As the result, the intensity of six attributes describing the odour (roasty, toast-like, burnt, chocolate-like, nut-like and malty) and nine attributes describing the taste or mouth feeling (bitter, sour, toast-like, burnt, roasty, chocolate-like, nut-like, (not) watery, (not) coating) were ranked on a linear scale from zero to ten. High-ranking scores of the attributes (not) watery and (not) coating mean a not watery taste/coating mouth feeling and low ranking scores mean a watery taste/coating mouth feeling. Two untreated reference coffees were offered to define the endpoints of the linear scale. Additionally, a reference with the same amount as the samples was offered. For reference 1 one gram coffee powder, for reference 2 three gram coffee powder and for reference 3 six gram coffee powder were brewed with 100 mL

hot water (80 °C). Additionally, coffee preference was determined using a nine point hedonic scale. To obtain a broader data base for the elimination of outliers the sensory test was performed five times. For statistical evaluation, one-way ANOVA and Duncan test ($p < 0.05$) were performed using XLSTAT (version 19.03.45028, Addinsoft, New York, USA).

4.3 Results and discussion

4.3.1 Enzymatic degradation of 5-CQA in coffee powder

The aroma extract of the enzymatically treated coffee powder was compared to an aroma extract of a control sample. The treatment with *RspCAE* reduced the concentration of the main isomer 5-CQA by 98% from 5.88 mg g^{-1} (± 0.09) to 0.10 mg g^{-1} (± 0.02); 3-CQA and 4-CQA likewise decreased. Simultaneously, the enzymatic treatment resulted in an increase of the caffeic acid concentration from 0.05 mg g^{-1} (± 0.002) to 5.53 mg g^{-1} (± 0.06) (Fig. 4-1). A comparable degradation of 5-CQA can be obtained by a prolonged roasting process at higher temperatures. A French roasting (21 min, 250 °C) instead of a medium roasting (14 min, 240 °C) reduced the 5-CQA content by 98%, too (Moon et al., 2009). Varying the roasting parameters inevitably changes the aroma and taste profile. Higher concentrations of chlorogenic acid degradation products, such as phenols and lactones, and lower concentrations of furans occurred by a stronger roasting process (Lyman et al., 2003; Moon & Shibamoto, 2009; Moon et al., 2009).

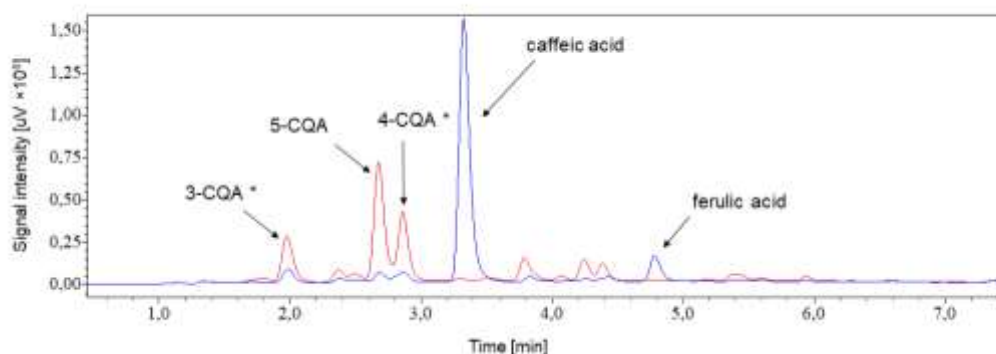


Fig. 4-1: HPLC-UV chromatogram (323 nm). The 5-CQA concentration decreased and simultaneous the caffeic acid concentration increased in enzymatically treated coffee powder (blue) compared to an untreated coffee powder (red). With an asterisk marked substances 3-caffeoylquinic acid (3-CQA) and 4-caffeoylquinic acid (4-CQA) were assigned according to Moon et al. (2009).

4.3.2 Comparison of enzymatically treated and untreated coffee volatiles

To verify that the enzymatic degradation of 5-CQA did not alter the volatile profile, aroma extract dilution analysis was carried out. Aroma active compounds of the coffee powders were identified by GC-FID/O and GC-MS analysis. Sixteen compounds with an FD-factor ≥ 100 were detected in both aroma extracts. Four compounds varied in their FD-factors between the samples. Substances 1 (ethyl pyrazine) and 12 (maltol) had a higher FD-factor in the enzymatically treated coffee extract, whereas compounds 9 (1-furfurylpyrrol) and 14 (2,5-dimethylphenol) had a higher FD-factor in the control extract. In each case, the difference was only one dilution step (Table 4-1). These results showed that the enzymatic treatment of roasted coffee powder had a marginal effect on the overall aroma profile.

Table 4-1: Aroma active compounds with FD-factors ≥ 100 of the enzymatically treated coffee (“treated”) and the untreated coffee (“control”).

| No. | Retention index ^a | | | | Odour ^d | FD-factor ^e | | Substance | Identification criteria ^f |
|-----|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------------|---------|---------------------------------|--------------------------------------|
| | DB-WAX | | HP-5 | | | treated | control | | |
| | Exp. ^b | Lit. ^c | Exp. ^b | Lit. ^c | | | | | |
| 1 | 1357 | 1357 | 965 | 936 | Musty | 100 | 10 | Ethyl pyrazine | A, C |
| 2 | 1413 | 1415 | - | - | Vinegar | 1000 | 1000 | Acetic acid | A, C |
| 3 | 1445 | 1446 | 1072 | 1079 | Grassy, earthy | 1000 | 1000 | 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine | A* |
| 4 | 1478 | 1494 | 1177 | 1170 | Earthy | 1000 | 1000 | 2,3-Diethyl-5-methylpyrazine | A* |
| 5 | 1507 | 1512 | 1182 | 1181 | Pea-like | 100 | 100 | 2-/3-Isobutyl-3-methoxypyrazine | A* |
| 6 | 1514 | 1514 | 1155 | 1150 | Grassy, flower stem | 100 | 100 | (Z)-2-Nonenal | A* |
| 7 | 1602 | 1602 | 814 | 818 | Cheesy | 100 | 100 | Butanoic acid | A, C |
| 8 | 164 | 1641 | 852 | 850 | Cheesy | 1000 | 1000 | 2-/3-Methylbutanoic acid | A, C |
| 9 | 1781 | 1820 | 1198 | 1199 | Roasty | 10 | 100 | 1-Furfurylpyrrol | A, C |
| 10 | 1803 | 1819 | 1388 | 1380 | Fruity | 1000 | 1000 | β -Damascenone | A, B |
| 11 | 1840 | 1840 | 1091 | 1091 | Spicy | 1000 | 1000 | Guaiacol | A, B, C |
| 12 | 1943 | 1943 | 1116 | 1133 | Caramel | 100 | 10 | Maltol | A, B, C |
| 13 | 2016 | 2015 | 1062 | 1062 | Caramel | 10000 | 10000 | Furaneol | A, B |
| 14 | 2081 | 2085 | 1177 | 1151 | Leather-like | 10 | 100 | 2,5-Dimethylphenol | A* |
| 15 | 2160 | 2160 | 1339 | 1334 | Burnt | 100 | 100 | 4-Vinylguaiacol | A, B, C |
| 16 | 2195 | 2196 | 1139 | 1127 | Spicy | 1000 | 1000 | Sotolon | A, B |

^a Retention indices determined on DB-WAX and HP-5 column according to van den Dool and Kratz (1963).

^b Experimentally determined retention indices.

^c Retention indices from reference library (National Institute of Standards and Technology, 2017).

^d Odour description perceived on DB-WAX column.

^e Flavour dilution factor determined on DB-WAX column.

^f All of the compounds have previously been identified in coffee. Besides odour quality following criteria were used for identification: A = comparison of retention indices on two different columns with reference library, B = reference substance, C = mass spectrum compared with commercial mass spectra database NIST 14.

* = Tentatively identified.

4.3.3 Sensory comparison of enzymatically treated and untreated coffee

The ten panellists evaluated the odour and taste of two filter coffees, one enzymatically treated and one control coffee, by ranking the perceived intensity of the given attributes. Regarding odour, no significant differences were determined (Fig. 4-2). The taste of the

treated coffee was described as more sour, bitter, toasty, burnt and chocolaty than the untreated coffee. In all the other attributes, the treated coffee gained smaller ranking-scores. These differences were not on a significant level (Fig. 4-3). Neither an off-taste nor an off-odour were noted by a panellist while drinking the enzymatically treated coffee. The hedonic evaluation showed no significant differences between the two beverages (data not shown).

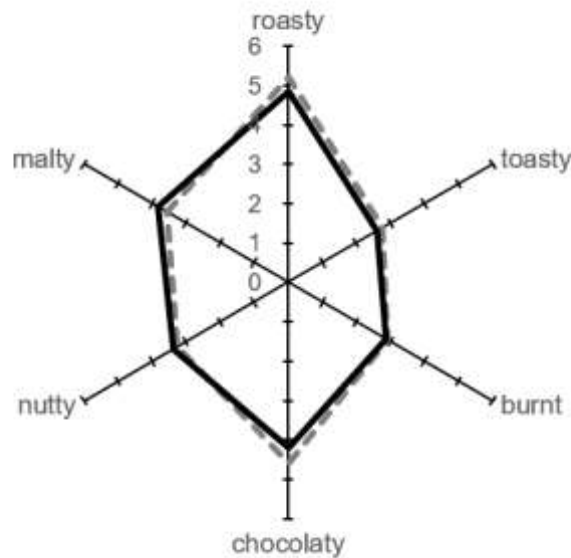


Fig. 4-2: Mean intensity of odour describing attributes of enzymatically treated (grey dashed line) and untreated (black solid line) coffee.

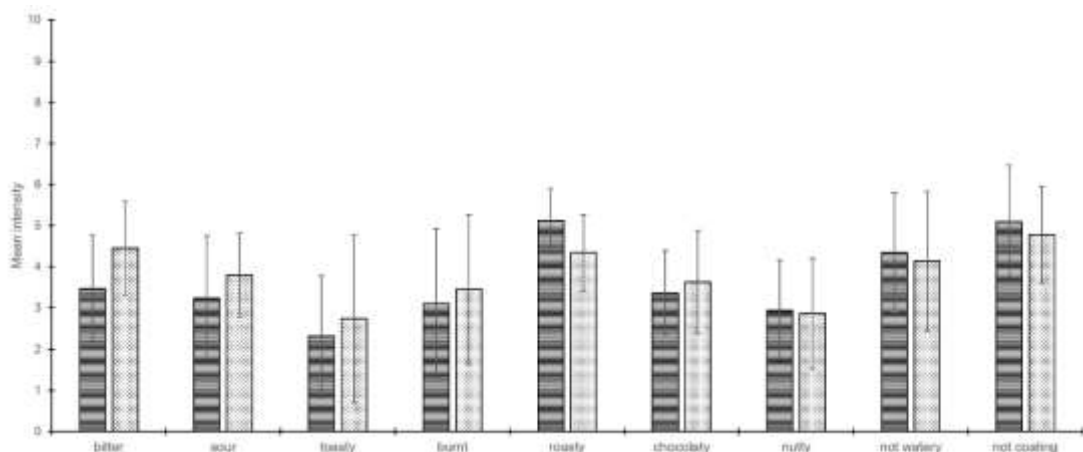


Fig. 4-3: Mean intensity of taste describing attributes of enzymatically treated (light) and untreated coffee (dark).

The enzymatic treatment had no significant effect on the perceived bitterness (Fig. 4.-3). This is important because bitterness is a decisive factor of cup quality (Drewnowski, 2001; Masi et al., 2015). During roasting, bitter-tasting compounds are formed from the non-bitter 5-CQA. Especially chlorogenic acid lactones occur as bitter-tasting degradation products, but also caffeic acid is a bitter compound. Thus, 5-CQA possesses a precursor function for the attractive bitter coffee taste (Blumberg et al., 2010; Frank et al., 2006; Kraehenbuehl et al., 2017; Variyar et al., 2003). However, 5-CQA concentration was negatively correlated to coffee cup quality, and Arabica coffee which had a lower 5-CQA content than Robusta coffee, showed a better acceptance because of its more attractive aroma and taste (Farah et al., 2006; Ky et al., 2001).

As the lactones, pyrocatechol, hydroquinone and pyrogallol are roasting products of chlorogenic acid. It was suggested, that the latter compounds are responsible for the uncomfortable feeling after coffee consumption. Reducing chlorogenic acid in green coffee beans and therefore reducing its roasting products led to less mucosal irritation in the stomach (Ehrlich et al., 1999). However, Ehrlich et al. (1999) did not examine the total chlorogenic acid content of their treated coffee. With the enzymatic treatment in the present research, 5-CQA was removed to trace amounts. Tajik, Tajik, Mack and Enck (2017) stressed in their review that most studies about potential health benefits and risks of chlorogenic acid were still insufficient, and they emphasized that more studies were necessary to evaluate its physiological effects. By conducting a double-blinded, placebo-controlled human intervention study using the enzyme treated coffee, the effect of chlorogenic acid on stomach irritation after consumption could be unambiguously assessed.

An additional benefit of the coffee treatment with *RspCAE* may be seen in the distinct increase of the antioxidative potential (Asther et al., 2005). Caffeic acid increased after enzymatic treatment and has higher antioxidative properties than 5-CQA. Therefore, the addition of chlorogenic acids hydrolysing enzymes enhanced the antioxidant and anti-inflammatory properties of coffee (Bel-Rhaid et al., 2009b). However, scientific research on this topic lacks *in vivo* experiments (Oboh et al., 2015; Sato et al., 2011). The recent discussion of the effects of antioxidants on human physiology has become controversial and revealed not only positive facets of the consumption of large concentrations of antioxidative compounds (Berger et al., 2012; Ristow, 2014).

4.4 Conclusion

The data obtained demonstrate that the treatment of roasted and ground coffee with RspCAE is a simple method to decouple the reduction of 5-CQA from the formation of aroma and taste compounds. The enzymatic treatment did not significantly affect the aroma and taste profile of filter coffee. In a follow-up study the effect of 5-CQA on stomach irritation after coffee consumption by comparing coffee brewed from treated and untreated powders should be clinically investigated.

Acknowledgements

The authors are grateful to Takayuki Shibamoto for scientific advice and to all members of the sensory panel.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

5 Vorwort zur Publikation „An immobilized fungal chlorogenase rapidly degrades chlorogenic acid in a coffee beverage without altering its sensory properties”

Wie in Kapitel 4 dargestellt, wurde durch die Behandlung mit RspCAE ein nahezu chlorogensäurefreies Kaffeepulver erhalten. Das daraus aufgebrühte Getränk unterschied sich sensorisch nicht vom unbehandelten Kaffee. Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob auch das aufgebrühte Getränk enzymatisch behandelt werden kann. Da das heterogene Kaffeepulver eine große Oberfläche aufweist, könnte so die benötigte Enzymmenge reduziert werden. Zusätzlich vereinfacht das homogene Getränk das Erzielen konstanter Resultate. Kaffeepulver muss nach der Behandlung wieder getrocknet werden. Dieser zusätzliche Schritt entfällt bei der Behandlung des aufgebrühten Kaffees. Berechtigt ist die Fragestellung zudem deshalb, weil das komplexe Kaffeegetränk womöglich Inhibitoren enthält. Des Weiteren wurde nach Möglichkeiten gesucht, um die industrielle Anwendbarkeit des Prozesses zu verbessern. So wurden die Reaktionen bei verringerter Temperatur und verkürzter Inkubationszeit durchgeführt. Dies macht das Verfahren nicht nur wirtschaftlich attraktiver, sondern auch schonender für das Aroma. Zusätzlich wurde auf die Zugabe von Pufferlösung verzichtet, da der pH-Wert des Kaffeegetränkes nahezu dem pH-Optimum der RspCAE (pH 6) entspricht. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit ist die Enzymimmobilisierung (vgl. Kapitel 1.8.2). Es wurden unterschiedliche Methoden getestet. Die erste Technik basierte auf der Adsorption des Proteins auf mesoporösem Silika. In einem weiteren Versuch wurde die RspCAE kovalent auf aktivierten Agaroseperlen fixiert. Diese Technik ermöglichte eine stabilere Bindung des Enzyms an dem Trägermaterial, was zu höheren und länger anhaltenden Umsatzraten führte. Die nachfolgende Publikation zeigt die erfolgreiche Verminderung der 5-CQA Konzentration in einem Kaffeegetränk ohne Auswirkung auf die sensorischen Eigenschaften und bietet somit eine wirtschaftlich interessante Alternative für die Herstellung eines chlorogensäurearmen Kaffees.

An der nachfolgenden Veröffentlichung waren Herr Detering und Herr Prof. Berger beteiligt. Herr Detering führte die Arbeiten zur Immobilisierung der RspCAE durch. Herr Berger entwarf die Abbildung 6-4. Die nachfolgende Publikation wurde in dem Journal *LWT – Food Science and Technology* (<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108426>) veröffentlicht (Siebert et al., 2019c).

6 An immobilized fungal chlorogenase rapidly degrades chlorogenic acid in a coffee beverage without altering its sensory properties

Mareike Siebert, Thorben Detering, Ralf G. Berger

Highlights

- Enzymatic chlorogenic acid mitigation decoupled from the preceding roasting process.
- High activity of the enzyme at ambient temperature.
- No enzyme inhibition of the complex beverage matrix on the enzyme noticeable.
- Stable activity (> 80%) of the covalently immobilized enzyme over thirty hours.
- No significant alteration of the flavor profile by the enzyme treatment ($p < 0.05$).

Abstract

Chlorogenic acids are among other compounds suggested to cause stomach discomfort after coffee consumption. Following up a study on coffee powder treated with buffered solution of the *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani*, freshly brewed coffee was treated to explore, if this enzyme would likewise work well in the complex beverage containing possible inhibitors. Using 40 mU of esterase/mL regular coffee brew, an 89% decrease of the 5-*O*-chlorogenic acid concentration (30 min, ambient temperature) with a concurrent increase of caffeic acid concentration was observed. Aroma dilution analysis and sensory studies showed that the treatment did not alter the aroma and taste profiles significantly ($p < 0.05$). Immobilization experiments using spin columns filled with mesoporous silica or aldehyde-activated agarose as carrier materials showed that the latter degraded chlorogenic acid at an initial reaction rate of 98% and still > 80% after thirty hours. After this time, 500 mL of coffee beverage, equivalent to around 5000 bed volumes, had passed through the column. The high activity of the enzyme, which allowed processing at ambient temperature, and the high specificity, which together resulted in an unchanged flavor profile of the beverage, provide a promising basis for applying the enzyme immobilisate on larger scales.

Keywords

Coffee beverage; chlorogenic acids; hydrolysis; enzyme immobilization; flavor profile

6.1 Introduction

The attractive aroma, taste and energizing effect of coffee are the main reasons for its worldwide popularity. Furthermore, regular coffee drinking has been related to risk mitigation of diseases such as Parkinson, Alzheimer, type 2 diabetes and diseases caused by DNA damages (Baspinar et al., 2017; Pahlke et al., 2019; Taram et al., 2016). Especially coffee polyphenols have received attention because of their assumed beneficial health effects. The major phenolic compounds are chlorogenic acids, the esters of caffeic and quinic acid, with 5-*O*-chlorogenic acid (5-CQA) as the most abundant isomer (Fujioka & Shibamoto, 2008). Chlorogenic and caffeic acid are known inhibitors of α -amylase and α -glucosidase and thus reduce hyperglycaemia-induced oxidative stress in type 2 diabetic patients. Caffeic acid with its higher antioxidative potential and stronger inhibitory effect had a larger antidiabetic potential than chlorogenic acid (Oboh et al., 2015).

Bioactivities inevitably depend on absorption and metabolism of the presumed bioactives. Since chlorogenic acid is hydrolyzed by intestinal microflora into caffeic and quinic acid, caffeic acid and not chlorogenic acid itself is probably responsible for the observed physiological effects (Dupas et al., 2006; Gonthier et al., 2003; Sato et al., 2011; Tsuda et al., 2012). Furthermore, chlorogenic acid was suspected to cause gastric discomfort after coffee consumption (Rubach et al., 2012). Higher roasting temperatures and extended roasting times led to a decrease of chlorogenic acid (Moon et al., 2009). However, beside changes in color and flavor, it was suggested that the antioxidative properties decrease simultaneously (Duarte, Stelle Maris da Silveira et al., 2005; Richelle et al., 2001). Thus, a process for the controlled degradation of chlorogenic acid without diminishing the concentration of biologically beneficial substances would be desirable (Fujioka & Shibamoto, 2008). Enzymatic cleavage of the ester linkage selectively reduced the chlorogenic acid content with a simultaneous increase in caffeic acid concentration. Patented procedures described the hydrolysis prior to consumption, using either microorganisms or enzymes, to obtain a beverage with improved nutritional properties (Bel-Rhlid et al., 2009b; Nieter et al., 2016c). Chlorogenic and caffeic acid also contribute to the aroma and taste profile of coffee (Moon & Shibamoto, 2010). Consequently, it is necessary to ensure that the hydrolysis does not alter aroma and taste. A previous study presented an approach to cleave chlorogenic acid enzymatically in coffee powder with unchanged sensory properties of the resulting

beverage (Siebert et al., 2018). A *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani* (RspCAE) was used to hydrolyze the ester linkage. However, ground coffee has a large surface and is a heterogeneous material, requiring larger volumes of enzyme solution. Another disadvantage would be that the treated powder needs to be dried again before proceeding, while treatment of the brewed beverage shortens the entire process.

This study investigated the hydrolysis of chlorogenic acid in brewed coffee to reveal the presence of possible inhibitors and to examine the technical applicability of enzyme including its possible effect on the aroma and taste profile. To this end, various immobilized enzymes were prepared.

6.2 Material and methods

6.2.1 Chemicals

Chemicals were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), except caffeic acid (Fluka, Buchs, Switzerland), sodium cyanoborohydride, formic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), AminoLink Plus Coupling resin, phosphate-buffered saline (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany), and mesoporous silica (SBA-15) (Glantreo, Cork, Ireland). For chemical analysis, ultra-pure water was used (TKAGenPure, Labor-und Analysen-Technik GmbH, Garbsen, Germany). Solvents (GC grade) were rectified before usage. Green coffee beans (100% Arabica from Colombia) were purchased from a local coffee shop.

6.2.2 Coffee brew preparation

Green coffee beans were roasted (240 °C, 14 min) with a Gene Café Coffee bean roaster (CBR-101, Ansan, Korea) and ground to grinding degree eight with a WMF KÜCHENminis® handheld coffee grinder (WMF consumer electric GmbH, Jettingen-Scheppach, Germany). 27 g coffee powder were brewed with 550 mL hot water (80 °C) through a coffee filter (Melitta Original, 1 × 4, Melitta, Minden, Germany) and immediately cooled to room temperature.

6.2.3 Enzymatic treatment of coffee brew

Enzymatic activity of the heterologously produced and purified *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani* (RspCAE) (Nieter et al., 2017) was determined at 37 °C using methyl

ferulate as substrate. One unit of enzyme activity was defined as the amount of esterase needed to release ferulic acid at a rate of $1 \mu\text{mol min}^{-1}$. Coffee brew was filtered (syringe filter Chromafil® RC-45/25, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and incubated with RspCAE solution (40 mU per mL coffee brew) at room temperature for 30 and 60 min. Enzymatic conversion was terminated by doubling the reaction volume with acetonitrile. A control sample was prepared using water instead of enzyme solution. Enzymatic treatment was performed in triplicate.

6.2.4 Chlorogenic acid and caffeic acid analysis

5-*O*-Chlorogenic acid (5-CQA) and caffeic acid concentrations were quantified *via* HPLC-UV/Vis. External calibration curves with concentrations of 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (5-CQA) and 4, 10, 20, 40, 60, 100, 175, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (caffeic acid) were prepared. The filtered samples were injected (10 μL) into a HPLC at room temperature (Chromolith Performance RP-18e, 100 mm \times 4.6 mm i.d.; Merck, Darmstadt, Germany). The solvent system and gradient program was as described by Siebert et al. (2018). Both compounds were detected at 323 nm (UV/vis detector, SPD-10A VP; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany).

6.2.5 Analysis of volatiles

The isolation of the coffee volatiles was done by stir bar sportive extraction (SBSE). 40 mU enzyme solution per mL coffee brew were added to 5 mL coffee brew in a headspace vial. Control sample was prepared with water instead of enzyme solution. One stir bar, coated with polydimethylsiloxane (10 mm \times 0.5 mm PDMS; Gerstel, Mülheim, Germany), was added to each sample. The samples were stirred at room temperature at 120 rpm (Telemodul 40S, H + P Variomag, Daytona Beach, USA). After 1 h, the stir bar was removed, rinsed with deionized water, dried and stored in a closed vial at 4 °C. Sodium chloride (100 g L^{-1}) and a new (second) stir bar were added to the samples and extracted as described above. Both stir bars were analyzed immediately in a glass tube for the Thermo Desorption System (TDS3, Gerstel, Mülheim, Germany) (Ochiai, 2012). Aroma analysis was carried out using a gas chromatograph coupled with mass spectrometry and olfactometry. Injection technique was thermodesorption coupled with a cold injection system (CIS4, Gerstel, Mülheim, Germany). Flavor dilution factors (FD-factors) were determined *via* aroma dilution analyses. The samples were diluted after thermodesorption within the gas

chromatography system. The split ratio of the carrier gas flow (helium, 44.4 mL min⁻¹) in the injection system was increased stepwise (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) (Trapp et al., 2018). Every adjusted split was sniffed on an Agilent 6890N gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using capillaries VF-5ms (30 m, 0.25 mm ID, film thickness 0.25 μm; Agilent J &W GC Columns, USA) and VF-WAXms (30 m, 0.25 mm ID, film thickness 0.25 μm; Agilent J&W GC Columns, USA). Injection temperature of the thermodesorption system was 20 °C. After heating at a ratio of 60 °C min⁻¹ to 150 °C, the temperature was held for 2 min in the split less mode for desorption. After desorption, the volatiles were refocused in the cold injection system (CIS) at -10 °C. For transfer to the column, the CIS was heated with 12 °C s⁻¹ to 230 °C and held for 2 min in the solvent vent mode. The injection temperature was 40 °C (held for 5 min). After heating with 8 °C min⁻¹ the final temperature of 230 °C was held for 10 min. The flow of the helium carrier gas was 1.3 mL min⁻¹. At the end of the capillary, the effluent was split 1:2 between a mass spectrometer (MS) and an olfactory detection port (ODP3, Gerstel, Mülheim, Germany). Temperatures of MS and ODP were 250 °C and 230 °C, respectively. A homologous series of *n*-alkanes (C8 - C25) was injected to calculate retention indices according to van den Dool and Kratz (1963). Retention indices and mass spectra were compared to an external data base (National Institute of Standards and Technology, 2018b).

6.2.6 Sensory analysis

For sensory analysis, coffee brew was prepared as described in 6.2.2 and treated with RspCAE solution (40 mU per mL coffee brew) for 30 min at room temperature. For heat inactivation, samples were boiled for 1 min. The eleven panelists (five male and six female) were familiar with the performance of sensory tests. Attributes used for sensory evaluation were determined in preliminary tests. As the result, the intensity of six attributes describing the taste (bitter, sour, burnt, roasty, chocolaty, nutty) were ranked on a linear scale from zero (not perceived) to ten (strongly perceived). One reference coffee sample was offered to define the center of the linear scale. For statistical evaluation, two-tailed Student's *t*-test ($p < 0.05$) was performed using XLSTAT (2018.6, Addinsoft, Boston, USA).

6.2.7 Enzyme immobilization

Two different enzyme immobilization techniques were examined. Both methods were performed in spin columns modified with a polyethylene filter (30 μm) at the bottom. These

columns were originally designed for the rapid and efficient separation of smaller molecules from larger ones in a micro-centrifuge according to the gel filtration (FastGene GP column, Nippon Genetics, Düren, Germany). In each approach, the same dry matter content of carrier material was used. The obtained bed volume was 100 μL .

The first technique was an immobilization on mesoporous silica (SBA-15) with pore sizes of 6 (SBA-15 6) and 8 nm (SBA-15 8). SBA-15 (4.7 mg) was incubated with 200 μL BisTris buffer (50 mmol L^{-1} , pH 6) for 30 min in an ultrasonic bath. The carrier material suspension was transferred into the column and the buffer drained. After adding 200 μL BisTris and 200 μL RspCAE (0.90 mg mL^{-1}), the mixture was incubated under agitation over night at 4 °C.

Immobilization with AminoLink Plus Coupling Resin (AL) was performed as described in the vendor's protocol. Columns were loaded with 600 μL coupling buffer (0.1 mol L^{-1} sodium phosphate, 0.15 mol L^{-1} sodium chloride, pH 7.2) and 200 μL AL, which was equal to a dry matter of 4.7 mg activated agarose. After centrifugation (15,000 $\times g$, 2 min, Micro Star 17R, VWR, Darmstadt, Germany), the samples were drained and the column was loaded with 200 μL RspCAE (0.90 mg mL^{-1}) and coupling buffer. 4 μL cyanoborohydride solution (5 mol L^{-1} NaCNBH_3 in 1 mol L^{-1} NaOH) were added and the mixture incubated under agitation over night at 4 °C. After quenching with 600 μL Tris \cdot HCl solution (1 mol L^{-1} , pH 7.4) and 4 μL NaCNBH_3 , the beads were washed twice with each 600 μL NaCl solution (1 mol L^{-1}) and BisTris-buffer (50 mmol L^{-1} , pH 6.0).

The concentration of immobilized enzyme was determined as the difference of initial and flow-through protein concentration with the protein assay described by Bradford (1976). Immobilization on SBA-15 was performed twice for each pore size, immobilization on AL four times.

For the treatment of coffee brew with immobilized RspCAE, the beverage was filtered and pumped (IPC high precision multichannel dispenser, Ismatec, Wertheim, Germany) with a flow rate of 0.28 mL min^{-1} through the column loaded with immobilized enzyme. For sampling, 100 μL flow through were mixed with 100 μL acetonitrile to inactivate washed out enzyme. The first sample was taken immediately, the second after 30 min. Then, sample collection followed once an hour.

6.3 Results and discussion

6.3.1 Enzymatic degradation of 5-CQA in coffee brew

After incubation with RspCAE solution, the concentration of the main chlorogenic acid 5-CQA was reduced by 89% from $176.84 \text{ mg L}^{-1} (\pm 3.44)$ to $18.71 \text{ mg L}^{-1} (\pm 3.36)$ within 30 min and nearly completely depleted ($0.80 \text{ mg L}^{-1} \pm 0.61$) within 60 min. The isomer 4-CQA decreased similarly. As expected, the enzymatic treatment resulted in a simultaneous increase of the caffeic acid concentration from $2.04 \text{ mg L}^{-1} (\pm 0.10)$ to $149.75 \text{ mg L}^{-1} (\pm 2.34)$ and $187.86 \text{ mg L}^{-1} (\pm 2.31)$ after 30 and 60 min, respectively (Fig. 6-1).

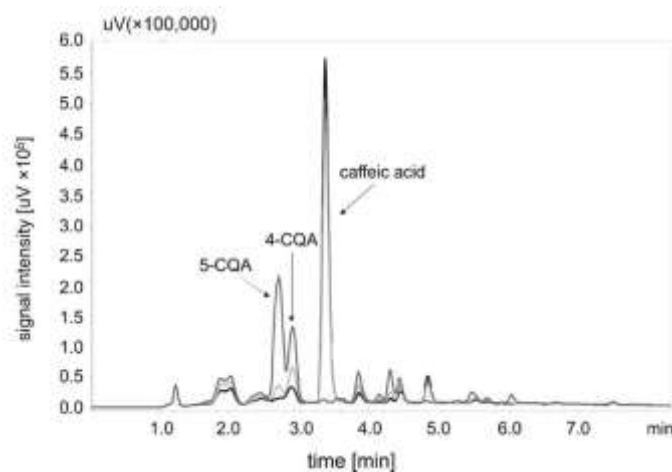


Fig. 6-1: HPLC-UV chromatogram (323 nm). Decline of 5-CQA concentration and simultaneous increase of caffeic acid concentration in enzymatically treated coffee beverage for 30 min (light gray) and 60 min (black) compared to an untreated coffee (dark gray). 4-caffeoylquinic acid (4-CQA) was allocated according to Moon et al. (2009).

Siebert et al. (2018) demonstrated the RspCAE mediated degradation of 5-CQA by 98% in coffee powder by incubating with the same enzyme but additional buffer solution for two hours at increased temperature ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$). This study shows the mitigation of 5-CQA at milder conditions, shorter incubation time and with less working steps.

6.3.2 Comparison of enzymatically treated and untreated coffee volatiles

To examine, whether the 5-CQA degradation affects the aroma profile, aroma dilution analysis was performed by means of TDS-GC-MS/O. In both samples, fifteen aroma active substances with a FD-factor ≥ 32 were detected (Table 6-1). Three compounds differed in their FD-factors between the extracts. Substance 8 (3-mercapto-3-methylbutylformate), substance 14 (5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanone), and substance 15 (4-ethyl-2-methoxyphenol) had a one-step higher FD-factor in the enzymatically treated coffee

extract. Hence, the enzymatic treatment affected the overall aroma profile only slightly. Differences in the profile of volatiles between both extracts might also had natural causes as the aroma of single coffee beans within the same batch and from the same roasting varied (Caporaso et al., 2018).

Table 6-1: Aroma active compounds with FD-factors ≥ 32 of the enzymatically treated coffee (“treated”) and untreated coffee (“control”).

| No. | Retention index ^a | | | | Odor ^d | FD-factor ^e | | Substance | Identification criteria ^f |
|-----|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------------|---------|---|--------------------------------------|
| | VF-5ms | | VF-WAXms | | | control | treated | | |
| | Exp. ^b | Lit. ^c | Exp. ^b | Lit. ^c | | | | | |
| 1 | - | 661 | 909 | 908 | cheesy, buttery | 32 | 32 | 2/3-Methylbutanal | A, C |
| 2 | 833 | 839 | 1452 | 1460 | coffee | 32 | 32 | 2-Furancarboxaldehyde | A, C |
| 3 | 863 | - | - | - | fruity | 32 | 32 | unknown | - |
| 4 | 881 | 875 | 1633 | 1635 | bready, caramellic | 64 | 64 | 2-Furanmethanol | A, C |
| 5 | 923 | 915 | 1423 | 1427 | coffee, broth | 128 | 128 | 2-Furanmethanethiol | A, B, C |
| 6 | 925 | 925 | 1320 | 1333 | earthy | 32 | 32 | Ethylpyrazine | A, C |
| 7 | 985 | 988 | 1288 | 1289 | mushroom | 32 | 32 | 1-Octen-3-one | A |
| 8 | 1041 | 1020 | 1510 | 1523 | broth | 64 | 128 | 3-Mercapto-3-methylbutylformate | A, B |
| 9 | 1085 | 1079 | 1446 | 1455 | earthy | 32 | 32 | 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine | A, C |
| 10 | 1102 | 1096 | 1844 | 1860 | earthy | 128 | 128 | 2-Methoxyphenol | A, B, C |
| 11 | 1109 | 1105 | - | 2190 | spicy | 128 | 128 | 3-Hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one | ^g |
| 12 | 1179 | 1148 | 1509 | 1513 | green | 32 | 32 | (Z)-2-Nonenal | A |
| 13 | 1195 | 1181 | 1521 | 1520 | pea like | 256 | 256 | 2-/3-Isobutyl-3-methoxypyrazine | A |
| 14 | 1219 | 1217 | - | 2244 | smoky, spicy | 64 | 128 | 5-Ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanone | ^g |
| 15 | 1277 | 1282 | 2030 | 2033 | leather | 64 | 128 | 4-Ethyl-2-methoxyphenol | A, B, C |

^a Retention indices determined on VF-5ms and VF-WAXms column according to van den Dool and Kratz (1963).

^b Experimentally determined retention indices.

^c Retention indices from reference library (National Institute of Standards and Technology, 2018b).

^d Odor description perceived on VF-5ms column.

^e Flavor dilution factor determined on VF-5ms column.

^f All of the compounds have previously been identified in coffee. Besides odor quality and retention index on VF-5ms column, following criteria were used for identification: A = comparison of retention indices on two different columns with reference library, B = reference substance, C = mass spectrum compared with commercial mass spectra database NIST 14 (National Institute of Standards and Technology, 2018b).

^g = Tentatively identified.

6.3.3 Sensory comparison of enzymatically treated and untreated coffee

The panelists estimated the taste of one enzymatically treated and one untreated coffee. The taste of the enzyme-treated beverage was described as slightly more bitter, sour, and burnt. Similar intensities occurred regarding roasty and chocolaty attributes, whereas the enzyme-treated coffee was noted as marginally less nutty (Fig. 6-2). None of the differences was significant. Neither an off-taste nor an off-odour were perceived.

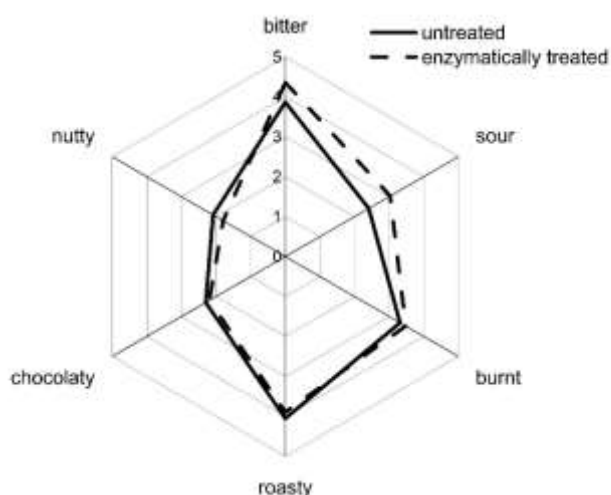


Fig. 6-2: Mean intensity of taste describing attributes of an untreated (solid line) and an enzymatically treated (dashed line) coffee brew.

The obtained data show that the application of the *p*-coumaroyl esterase of *R. solani* enabled a decoupling of 5-CQA mitigation and the formation of desired volatiles and taste compounds. Since a high 5-CQA concentration is related to a low coffee quality (Farah et al., 2006) enzymatic hydrolysis offers a feasible approach to optimize the quality of the beverage.

5-CQA hydrolysis resulted in a large increase of caffeic acid concentration. The latter is a superior antioxidant and has further favorable properties as it is, *inter alia*, antiviral, anti-inflammatory and anticarcinogenic (Chen & Ho, 1997; Jayanthi & Subash, 2010; Sato et al., 2011). As coffee presents a daily life food, the development of coffee products with hydrolyzed 5-CQA would offer an approach to increase the daily intake of substances regarded as physiologically beneficial (Bel-Rhlid et al., 2009b; Svilaas et al., 2004).

However, most studies about biologically active compounds lack *in vivo* experiments. Researches on health benefits and risks of chlorogenic acids are still incomplete, and more studies are needed to investigate the physiological effects (Tajik et al., 2017). Performing a

double-blinded, placebo-controlled human intervention study, offering the enzymatically treated and untreated coffee, could elucidate the health benefits of a coffee poor in chlorogenic acid and rich in caffeic acid.

6.3.4 Chlorogenic acid mitigation using immobilized RspCAE

As a next process-improving step, 5-CQA was hydrolyzed using immobilized enzyme. Immobilization *via* adsorption on mesoporous silica and *via* covalent linkage on aldehyde-activated agarose were compared. Best conversion from 5-CQA to caffeic acid was obtained using enzyme immobilized on AL (Fig. 6-3). Within the first hour, nearly the complete 5-CQA was degraded (98% conversion). After 1 h, the conversion rate declined and stabilized at 80%. For immobilization on SBA-15, the maximal conversion rates were 49% (SBA-15 8) and 41% (SBA-15 6). The conversion rates flattened and then remained on a constant level of 13% (SBA-15 8) or 18% (SBA-15 6), respectively. Immobilization using AL was repeated with prolonged reaction time to examine the maximal time period of active enzyme. Experiment was stopped after 30 h, since no decline of the conversion rate (80%) was observed. After this time, 500 mL of coffee beverage, equivalent to approximately 5000 bed volumes, had passed through the column.

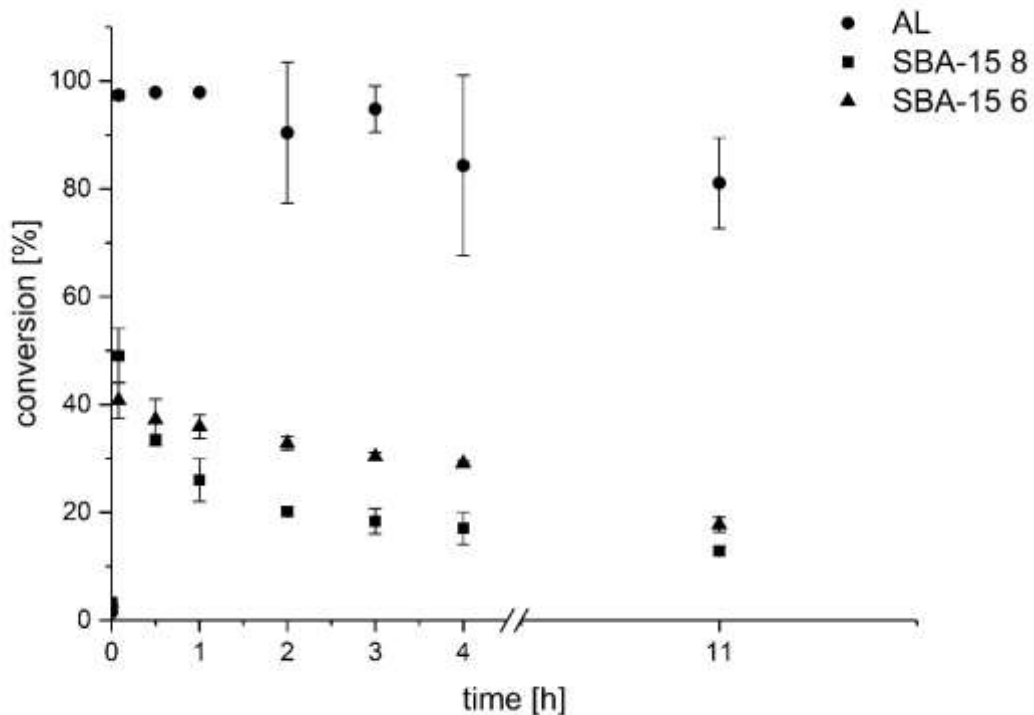


Fig. 6-3: Conversion rate of 5-CQA using different immobilization techniques: immobilization on AminoLink Coupling Resin (AL, dots) (n = 4) and on mesoporous silica with a pore size of 6 (SBA-15 6, triangles) (n = 2) and 8 nm (SBA-15 8, squares) (n = 2). Error bars show the standard deviation from the mean.

The pore size of SBA-15 influenced the enzyme retention (Gustafsson et al., 2011). At its maximum, RspCAE is 9.1 nm long and 5.0 nm wide (sizes determined *via* 3D modelling, UCSF Chimera, version 1.11.2, San Francisco, USA) and may thus enter into of block the pore openings (Fig. 6-4). Using SBA-15 6 with 6 nm pores as the absorbent, 39.6 μg protein was retained, whereas using SBA-15 8 with a pore size of 8 nm, 127.4 μg were fixed. The enzyme was probably bound only weakly to the carrier matrix, and a majority of protein may have dissociated within the first hour. Enzyme leakage can explain the low conversion of 5-CQA even in the beginning. When the protein was covalently bound on the activated surface of agarose beads, neither the enzyme nor the substrate needed to enter pores. Furthermore, no protein was measured in the flow-through. The stably bound enzyme (192.9 μg) resulted in a more efficient 5-CQA hydrolysis. The most important advantage of immobilization is that the enzyme does not occur in the beverage. Furthermore, a continuous processing becomes possible. Immobilization stabilizes the enzyme activity, ensures its recovery, and

allows the continuous removal of caffeic acid which may otherwise inhibit the enzyme above a certain threshold concentration.

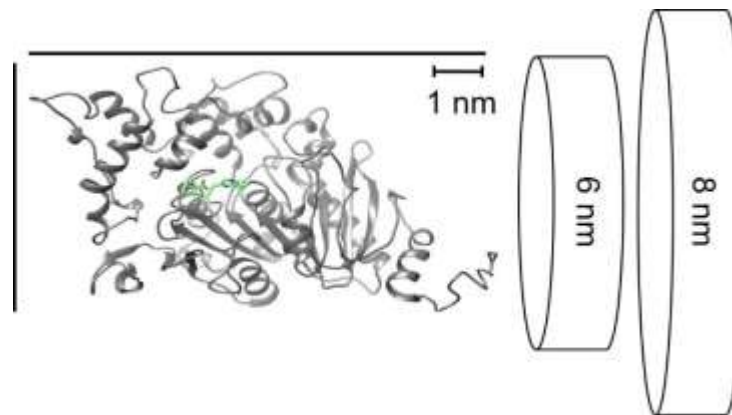


Fig. 6-4: True to scale 3D-model of the chlorogenase of *R. solani* compared to the pore size of SBA-15 6 (6 nm) and SBA-15 8 (8 nm).

6.4 Conclusion

The treatment of brewed coffee with RspCAE at ambient temperature is a simple and effective technique to improve health beneficial properties of the beverage without noticeably changing the aroma and taste profile. Increase of caffeic acid enhances the antioxidant properties, whereas the decrease of 5-CQA may lead to an improved digestibility. The potential health effects of 5-CQA hydrolysis to caffeic acid could be examined using enzymatically treated and untreated coffee in a clinical intervention study.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dzenana Mesanovic for performing the sensory studies. The authors thank the panelist for their participation in sensory tests. M.S. is grateful to Gottfried Wilhelm Leibniz University of Hannover for granting a stipendium for researching enzymatic ways to food quality improvement.

7 Vorwort zur Publikation „Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a p-coumaryl esterase of *Rhizoctonia solani*“

Die erfolgreiche Minimierung der 5-CQA Konzentration in Kaffee (vgl. Kapitel 4 und 6) führte zu der Überlegung, ob sich die verwendete Methode auch auf andere Lebensmittel übertragen lässt, um in diesen einen ähnlichen gesundheitsfördernden Effekt zu erreichen. Dazu wurde Apfelsaft ausgewählt, da dieser ebenfalls eine hohe 5-CQA Konzentration enthält, sich die Matrix aber grundsätzlich von der von Kaffee unterscheidet. Während Kaffee einen pH-Wert nahe dem des pH-Optimums der RspCAE (pH 6) aufweist, liegt der pH-Wert von Apfelsaft im sauren Bereich (pH 3,3). Dies könnte eine Denaturierung und Inaktivierung des Enzyms zur Folge haben. Des Weiteren lagen keine Kenntnisse darüber vor, ob Apfelsaft mögliche Enzyminhibitoren enthält. Überraschenderweise wurde trotz saurem Milieu durch Behandlung mit RspCAE der Gehalt innerhalb 30 min um 61 % reduziert.

Im Gegensatz zu Kaffee ist das Aromaprofil von Apfelsaft durch eine Vielzahl an fruchtigen Noten gekennzeichnet, welche durch das Vorhandensein kurz- und mittelkettiger Carbonsäureester zustande kommen. Zu Beginn der Arbeiten für die nachfolgende Publikation war nicht bekannt, ob die RspCAE, welche zu der Enzymklasse der Esterasen gehört, ausreichend spezifisch ist, um die Fülle an der im Apfelsaft bekannten Fruchtester intakt zulassen. Es ist umso bemerkenswerter, dass Aroma- und Geschmacksprofil durch die enzymatische Behandlung unverändert blieben. Die erhaltenen Ergebnisse beweisen eine hohe Enzymstabilität und Substratspezifität. Diese Erkenntnisse bilden eine vielversprechende Basis für weitere industrielle Anwendungen der RspCAE.

An der nachfolgenden Publikation wirkten anteilig Frau Pfeiffer und Herr Prof. Berger mit. Frau Pfeiffer trug durch Verbesserungsvorschläge zu der erfolgreichen Veröffentlichung bei, während Herr Berger als Arbeitsgruppenleiter für die finanzielle Förderung sorgte sowie für Projektidee und Betreuung verantwortlich war.

Die nachfolgende Publikation wurde in dem *Journal of the Science of Food and Agriculture* (<https://doi.org/10.1002/jsfa.9940>) veröffentlicht (Siebert et al., 2019b).

8 Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a *p*-coumaryl esterase of *Rhizoctonia solani*

Mareike Siebert, Ralf Günter Berger and Franziska Pfeiffer

Abstract

BACKGROUND: Apple juice is rich in polyphenolic compounds, especially in chlorogenic acid. A sour and bitter taste has been attributed to the compound. Chlorogenic acid in coffee powder was quickly hydrolysed by a *p*-coumaryl esterase of *Rhizoctonia solani* (*RspCAE*) at its optimal pH of 6.0. It was unknown, however, if *RspCAE* would also degrade chlorogenic acid under the strongly acidic conditions (pH 3.3) present in apple juice.

RESULTS: Treatment of apple juice with *RspCAE* led to a chlorogenic acid degradation from $53.38 \pm 0.94 \text{ mg L}^{-1}$ to $21.02 \pm 1.47 \text{ mg L}^{-1}$. Simultaneously, the caffeic acid content increased from $6.72 \pm 0.69 \text{ mg L}^{-1}$ to $19.33 \pm 1.86 \text{ mg/L}^{-1}$. The aroma profile of the enzymatically treated sample and a control sample differed in only one volatile. Vitispirane had a higher flavour dilution factor in the treated juice. Sensory analysis showed no significant difference in the taste profile ($p < 0.05$).

CONCLUSION: These results demonstrated a high stability and substrate specificity of *RspCAE*. An increase in caffeic acid and a concurrent decrease in chlorogenic acid concentration may exert a beneficial effect on human health.

Keywords

chlorogenic acid; apple juice; *Rhizoctonia solani*; *p*-coumaryl esterase

8.1 Introduction

Apple juice belongs to the most popular fruit juices with a *per capita* consumption of 7.6 L in Germany in 2017 (Wirtschaftvereinigung Alkoholfreie Getränke e.V., 2019). It is rich in polyphenolic compounds, mainly chlorogenic acids, which are isomer esters of caffeic and quinic acids (Kahle et al., 2005). Chlorogenic acids are also present in high amounts in coffee, where their effect on human health is controversially discussed. Though chlorogenic acids contribute to the antioxidative potential of coffee and are related to risk mitigation of several diseases (Moon & Shibamoto, 2009; Fujioka & Shibamoto, 2006), they are also supposed to trigger stomach irritation for sensitive people after consumption (Rubach et al., 2012; Rubach et al., 2014). Furthermore, a sour and bitter taste has been attributed to chlorogenic acid (Ordynsky, 1965; Dadic & Belleau, 1973). In a previous study, 5-*O*-chlorogenic acid (5-CQA), the most abundant isomer in coffee, was enzymatically hydrolysed to improve the digestibility without altering the aroma and taste profile of the resultant beverage. At the same time, an increase in caffeic acid concentration was obtained (Siebert et al., 2018). It is suggested that caffeic acid contributes more than chlorogenic acid to the beneficial health effects (Schaefer et al., 2006; Oboh et al., 2015). For chlorogenic acid hydrolysis, a *p*-coumaryl esterase of the basidiomycete *Rhizoctonia solani* (*RspCAE*) with an optimum of pH 6.0, which matches the natural pH of a coffee brew, was used at the temperature optimum of the enzyme (30 °C) (Siebert et al., 2018; Nieter et al., 2017).

This study aimed at transferring the method to the mitigation of 5-CQA in apple juice, to potentially achieve similar beneficial health effects. Since the pH optimum of *RspCAE* is 6.0, the enzyme stability at the comparatively low pH value of apple juice (pH 3.3) was of particular interest. In addition, the enzymatic treatment was performed at room temperature, and the reaction time was minimized to facilitate the technical application. The specificity of the esterase used was highly relevant due to the presence of a variety of fruit esters in apple juice, which are known to contribute to its characteristic aroma profile. To determine whether the treatment of apple juice with *RspCAE* altered its aroma and taste, aroma dilution analyses and sensory studies were performed. The increased insight into the stability and specificity of *RspCAE* provided by this study will be relevant with respect to further applications of *RspCAE* in the food industry.

8.2 Material and methods

8.2.1 Chemicals

All chemicals were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), except caffeic acid (Fluka, Buchs, Switzerland) and formic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). For chemical analysis, ultra-pure water (TKA-GenPure, Labor- und Analysen-Technik GmbH, Garbsen, Germany) and rectified solvents (GC grade) were used. Commercial clear apple juice (Schlossmarke; Kelterei Wilkening GmbH, Bad Münden, Germany) was obtained from a local supermarket.

8.2.2 Enzymatic treatment of apple juice

For enzymatic treatment of the apple juice, a heterologously produced and purified *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani* (*RspCAE*) was used (Nieter et al., 2017). The enzyme activity was determined as described by Siebert *et al.* (2018). The filtered apple juice (syringe filter Chromafil®RC-45/25; Macherey-Nagel, Düren, Germany) was incubated with an *RspCAE* solution (40 mU per millilitre juice, room temperature, 30 min). Afterwards, the enzymatic reaction was stopped by doubling the volume with acetonitrile. Control samples were prepared with water instead of enzyme solution. Determination of chlorogenic acid concentration was performed in triplicate.

8.2.3 Quantification of chlorogenic acid and caffeic acid

Quantification of 5-CQA and caffeic acid was performed using high-performance liquid chromatography (HPLC) equipped with an ultraviolet–visible light detector. The HPLC method was as described by Siebert et al. (2018). Standards solutions of 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (5-CQA) and 4, 10, 20, 40, 60, 100, 175, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (caffeic acid) were used for quantification *via* linear regression.

8.2.4 Analysis of key aroma compounds

Stir bar sorptive extraction was applied to isolate the volatile compounds. A stir bar, coated with polydimethylsiloxane (10 mm \times 0.5 mm; Gerstel, Mülheim, Germany), was combined with the sample in a headspace vial. Enzymatically treated samples were prepared by adding 40 mU enzyme solution per millilitre juice to 5 mL apple juice. For the control samples, water was used instead of enzyme solution. After incubation (room temperature, 1 h, 120 rpm, Telemodul 40S; H + P Variomag, Daytona Beach, FL, USA), the stir bar was

rinsed with deionized water, dried, and stored in a closed vial at 4 °C. Sodium chloride (100 g L⁻¹) and a new stir bar were added to the samples. The second extraction was performed as just described. The stir bars of the first and second extractions were analysed together in a glass tube of the TDS3 thermal desorption system (Gerstel) (Ochiai, 2012). An Agilent 6890 N gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with mass spectrometry–olfactometry and thermodesorption as injection technique was used to identify the key aroma compounds. Flavour dilution (FD)-factors were determined by means of aroma dilution analyses. The samples were diluted after thermodesorption within the gas chromatography system by increasing the carrier gas flow (helium, 44.4 mL min⁻¹) in the injection system (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) (Trapp et al., 2018). Two capillaries with different polarity were used: VF-5ms (30 m, 0.25 mm ID, film thickness 0.25 µm; Agilent J&W GC Columns, Santa Clara, CA, USA) and HP-INNOWax (30 m, 0.25 mm ID, film thickness 0.25 µm; Agilent J&W GC Columns). Initial temperature of the thermodesorption system was 20 °C. The temperature, after raising at a rate of 60 °C min⁻¹ to 150 °C, was held for 2 min in the splitless mode for desorption. Subsequently, the volatiles were refocused in the cold injection system (CIS4; Gerstel) at -10 °C. The cold injection system was heated at 12 °C s⁻¹ to 230 °C and held for 2 min in the solvent vent mode to transfer the volatiles onto the column. The oven program was as follows: injection at 40 °C (held for 5 min) and heating at 8 °C min⁻¹ to the final temperature of 230 °C (held for 10 min). The flow of the helium carrier gas was 1.3 mL min⁻¹. The effluent was split 1:2 between a mass spectrometer and an olfactory detection port (ODP3; Gerstel) at the end of the column. The temperatures of the mass spectrometer and olfactory detection port were 250 °C and 230 °C respectively. To determine the retention indices, a homologous series of *n*-alkanes (C8–C25) was injected (van den Dool & Kratz, 1963).

8.2.5 Sensory analysis

For sensory analysis, the apple juice was treated with RspCAE solution (40 mU mL⁻¹ juice) for 30 min at room temperature. Samples were boiled for 1 min to terminate the reaction. All of the judges (five male and six female) were experienced panellists. The intensity of eight attributes describing the taste (bitter, sour, sweet, fruity, apple-like, peach-like, metallic, musty) were ranked on a linear scale from 0 (not perceived) to 10 (strongly perceived). Untreated apple juice was offered as a reference sample to define the centre of

the linear scale. Tasting was performed in triplicate. Two-tailed Student's *t*-tests ($p < 0.05$) were calculated to highlight differences between the samples.

8.3 Results

8.3.1 Enzymatic mitigation of 5-CQA in apple juice

The enzymatic treatment of apple juice decreased the 5-CQA concentration by 61% from $53.38 \pm 0.94 \text{ mg L}^{-1}$ to $21.02 \pm 1.47 \text{ mg L}^{-1}$ under the conditions mentioned earlier. At the same time, the caffeic acid concentration increased from $6.72 \pm 0.69 \text{ mg L}^{-1}$ to $19.33 \pm 1.86 \text{ mg L}^{-1}$ (Fig. 8-1).

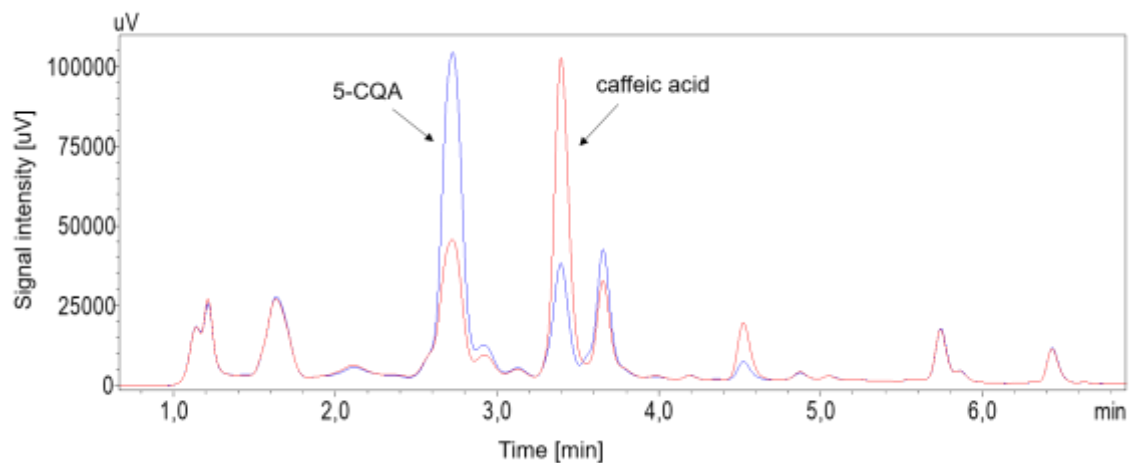


Fig. 8-1: HPLC chromatograms of control (blue) and enzymatically treated (red) apple juice ($\lambda = 323 \text{ nm}$). Decrease of 5-CQA went along with an increase of caffeic acid.

8.3.2 Comparison of volatile compounds of enzymatically treated and control apple juice

By means of aroma dilution analysis, 17 aroma active compounds with an FD-factor of ≥ 16 in at least one sample were determined (Table 8-1). Gas chromatography-olfactometry analysis resulted in only one compound with a different FD-factor. Substance 13 (vitispirane) showed a higher FD-factor in the enzymatically treated sample than in the control sample. However, overlaying the gas chromatographic total ion chromatograms of the enzymatically treated and control samples showed that both had a nearly identical profile (Fig. 8-2). Thus, the discrepancy is most likely due to the inherent fuzziness of sensory judgments.

Table 8-1: Aroma compounds with flavour dilution (FD)-factors ≥ 16 of the enzymatically treated (“treated”) and control apple juice (“control”)

| No. | Retention index ^a | | | | FD-factor ^d | | Odour ^e | Substance | Identification criteria ^f |
|-----|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|---------|---------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | VF-5ms | | HP-INnowax | | Control | Treated | | | |
| | Exp. ^b | Lit. ^c | Exp. ^b | Lit. ^c | | | | | |
| 1 | <800 | 764 | - | 1244 | 16 | 16 | Glue like | 1-Pentanol | B ^g |
| 2 | <800 | 780 | - | 1008 | 16 | 16 | Glue like | Methyl 2-methylbutanoate | B ^g |
| 3 | 804 | 802 | 1033 | 1028 | 32 | 32 | Flowery, glue like | Ethyl butanoate | A, B |
| 4 | 851 | 842 | 1048 | 1056 | 128 | 128 | Fruity, candy like | Ethyl 2-methylbutanoate | A, B |
| 5 | 874 | 865 | 1367 | 1360 | 16 | 16 | Grass, woody | 1-Hexanol | A, B |
| 6 | 983 | 975 | 1298 | 1317 | 64 | 64 | Mushroom | 1-Octen-3-one | A, B |
| 7 | 989 | 988 | 1263 | 1261 | 32 | 32 | Mushroom, musty | 3-Octanone | A, B |
| 8 | 1097 | 1096 | 1862 | 1862 | 64 | 64 | Spicy, leather like | <i>o</i> -Guaiacol | A, B |
| 11 | 1172 | - | - | - | 32 | 32 | Woody | n.i. ^h | |
| 13 | 1294 | 1272 | 1529 | 1515 | 4 | 16 | Fresh mint like | Vitispirane | A, B |
| 15 | 1381 | 1385 | - | 1596 | 16 | 16 | Woody | Hexyl hexanoate | B ^g |
| 16 | 1390 | 1390 | 1822 | 1819 | 512 | 512 | Juicy, fruity | (<i>E</i>)- β -Damascenone | A, B |
| 17 | 1428 | 1415 | - | 1805 | 64 | 64 | fruity | β -Damascone | - ⁷ |

^a Retention indices determined on VF-5ms and HP-INNOWax column (van den Dool & Kratz, 1963).

^b Experimentally determined retention indices.

^c Retention indices from reference library (National Institute of Standards and Technology, 2018a).

^d Determined on VF-5ms column.

^e Odour description perceived on VF-5ms column.

^f All of the compounds have previously been identified in apple juice. Besides odour quality and retention index on VF-5ms column, the following criteria were used for identification: A, comparison of retention index on HP-INNOWax column with reference library; B, mass spectrum compared with commercial mass spectra database NIST 14 (National Institute of Standards and Technology, 2018a).

^g Tentatively identified.

^h n.i. = not identified.

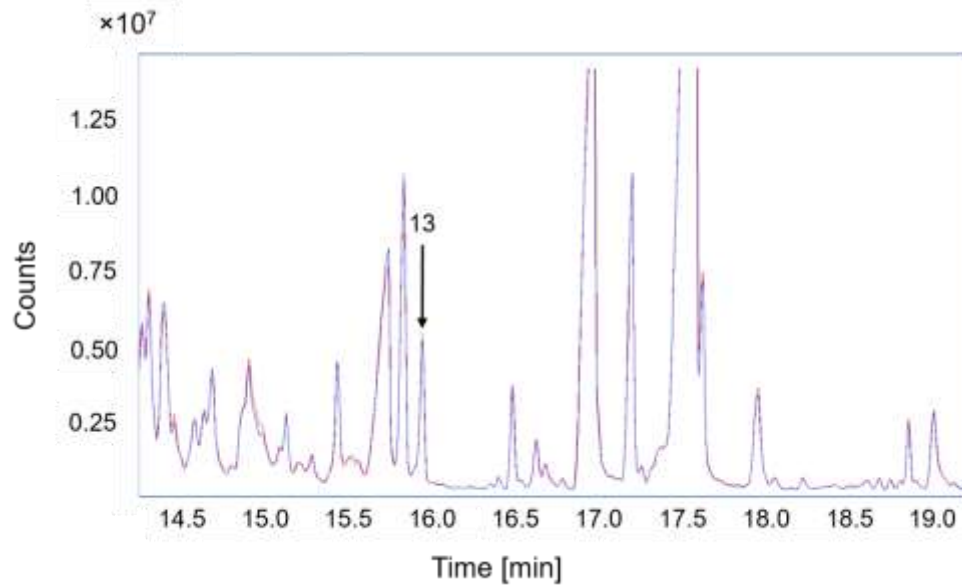


Fig. 8-2: Total ion chromatogram of control (blue) and enzymatically treated (red) apple juice. Both samples showed the same profile of volatiles. There is no visible difference for substance 13 (vitispirane).

8.3.3 Sensory comparison of enzymatically treated and control apple juice

Sensory evaluation was performed to evaluate the effect of enzymatic treatment on the taste profile. Enzymatically treated and control apple juice shared the same intensities for the attributes sour, peach-like, metallic, and musty. The enzymatically treated apple juice was perceived as slightly more bitter, sweet, fruity, and apple-like. None of the differences were statistically significant (Fig. 8-3). In addition, the panellists noticed neither an off-taste nor an off-odour.

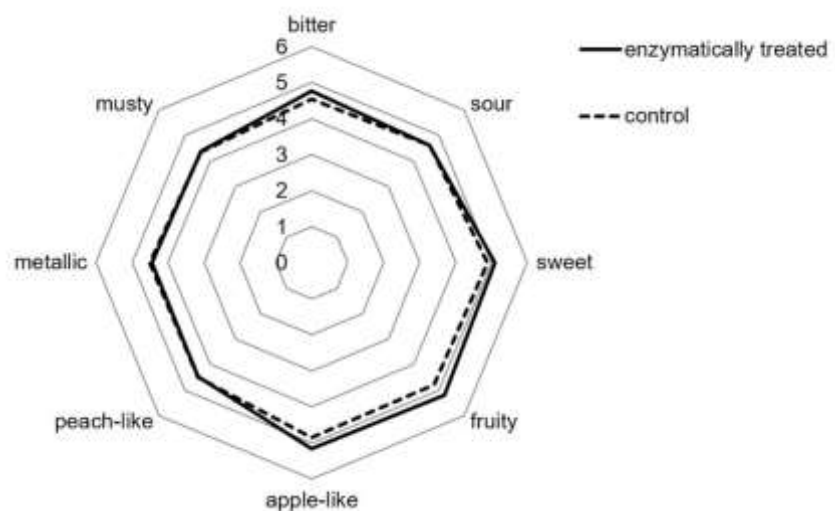


Fig. 8-3: Perceived mean intensities of taste describing attributes of a control (dashed line) and an enzymatically treated (solid line) apple juice.

8.4 Discussion

With a pH optimum of 6.0, the activity of *RspCAE* decreases by lowering the pH value. In a range from pH 4.0 to 7.0, more than 50% activity is retained. However, the enzyme is unstable below pH 4.0 (Nieter et al., 2017). The results in the present study showed that 5-CQA was successfully hydrolysed by *RspCAE* in apple juice, which had a pH of 3.3. Surprisingly, an incubation time of 30 min was enough to mitigate chlorogenic acid concentration by 61% but not long enough to inactivate the enzyme completely. *RspCAE* has a temperature optimum of 30 °C but possesses about 80% residual activity at 20 °C. Furthermore, it shows the highest stability at 20 °C (Nieter et al., 2017). Incubation at room temperature may compensate the stability loss caused by the low pH value and may be the main reason for the fast degradation even in an acidic beverage like apple juice. In addition, hydrolysis of 5-CQA led to a distinct increase in caffeic acid concentration. This is connected to enhanced antioxidative properties, and therefore related to a beneficial effect on human health (Bel-Rhliid et al., 2009b; Chen & Ho, 1997).

RspCAE is a *p*-coumaryl esterase, which hydrolyses ester linkages of hydroxycinnamic acids such as methyl caffeate or chlorogenic acid. To our knowledge, it has not been examined yet whether this enzyme will also hydrolyse other ester compounds common in food. Since apple juice is rich in short and medium-chain carboxylic acid esters, which contribute strongly to the popular aroma characteristics, it was investigated whether the treatment affected the aroma and taste profile. Seventeen key aroma compounds were determined in both samples. All aroma compounds identified have been described before as apple juice volatiles in the literature. No differences were seen between the volatile profiles of the samples in the total ion chromatogram of gas chromatography-mass spectrometry analysis (Fig. 8-2). An increase in caffeic acid has been described to enhance bitter and sour taste (Vitzthum, 1999). Contrary to expectations, the mitigation of 5-CQA did not result in a significant change of the taste profile. It is concluded that 5-CQA possesses acidic and bitter properties similar to its cleavage products, caffeic and quinic acids, and thus the decrease compensated the increase in caffeic acid. Since the perceived acidity is a decisive factor for consumer liking of apple juice, an unchanged sour taste is of great importance (Okayasuand & Naito, 2001).

Carboxylic ester hydrolases, such as *RspCAE*, can be used to valorize agro-industrial side streams (Asther et al., 2005; Nieter et al., 2016a). In the food sector, the application of esterases of this class was described for the treatment of coffee (Bel-Rhlid et al., 2009b; Kraehenbuehl et al., 2017) and in baking (Nieter et al., 2016b) to improve taste and texture properties. The high stability and substrate specificity of *RspCAE* demonstrated in this study are promising for applying this enzyme in other fields in the food industry.

8.5 Conclusion

Hydrolysis of 5-CQA at a low pH value (3.3) and mild reaction conditions (short incubation time, room temperature) without the cleavage of other ester compounds showed the high stability and substrate specificity of *RspCAE*. The enzymatic treatment did not alter the taste profile substantially. These results are a promising basis for further application in the food industry. In addition, an increase in caffeic acid and a decrease in chlorogenic acid concentration may have a beneficial effect on human health. This will have to be proven by performing intervention studies.

Acknowledgements

We thank the panellists for their participation in sensory tests. M.S. is grateful to Gottfried Wilhelm Leibniz University of Hannover for granting a scholarship for researching enzymatic ways to food quality improvement.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

9 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten wissenschaftlichen Erkenntnisse zeigen eine einfache und kostengünstige Methode zur selektiven Verminderung der Chlorogensäurekonzentration in Getränken ohne Veränderung der sensorischen Eigenschaften. Die dargestellten Ergebnisse bilden eine Basis für eine Vielzahl von Anschlussarbeiten. Durch doppelt verblindete, placebokontrollierte sowie randomisierte humane Interventionsstudien könnte die Rolle der 5-CQA bei Sodbrennen und Magenreizungen wie auch die Auswirkung der Anreicherung von Kaffeesäure auf die menschliche Gesundheit untersucht werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der erörtert werden sollte, ist die Verminderung von 5-CQA in Rohkaffee. Hierbei würde es sich anbieten, das Enzym zu dem Fermentationsprozess während der Rohkaffeeaufarbeitung hinzuzugeben, um zusätzliche Prozessschritte zu vermeiden. Voraussetzung für die erfolgreiche Hydrolyse in rohen Kaffeebohnen ist, dass die Porengröße des Rohkaffees groß genug ist, um die *RspCAE* aufzunehmen sowie das Fehlen von Inhibitoren. Da während des Röstens Chlorogensäure teilweise zu Aroma-, Farb- und Geschmacksstoffen abgebaut wird, sind nachfolgende sensorische Untersuchungen unabdingbar. Zudem entstehen durch die 5-CQA Hydrolyse hohe Konzentrationen an Kaffee- und Chinasäure. Die chemischen Veränderungen dieser Substanzen während des Röstprozesses sollten ebenfalls untersucht werden.

Die *RspCAE* hydrolysierte Chlorogensäure sowohl in Kaffee als auch in Apfelsaft, welche sich grundlegend in ihren Matrices unterscheiden, weswegen ein umfangreiches Screening von weiteren chlorogensäurereichen Getränken durchgeführt werden könnte. Weiterführend sollte die enzymatische Behandlung auch auf andere Lebensmittel übertragen werden. Dabei könnte es sich um aus chlorogensäurereichen Früchten und Gemüse hergestellten Produkte, wie Soßen oder Mus, handeln. Die Ergebnisse aus diesen potentiellen Arbeiten würden den Horizont über industrielle Anwendungsmöglichkeiten erweitern.

Zudem könnten sich Anschlussarbeiten mit einem Substratscreening weiterer bekannter Bitterstoffe in Lebensmitteln befassen. Dabei sollten diese in ihrem Grundgerüst mindestens eine veresterte Hydroxyzimtsäure enthalten, da diese zur bekannten Substratklasse der *RspCAE* gehören.

10 Literaturverzeichnis

- Asther, M., Estrada Alvarado, M. I., Haon, M., Navarro, D., Asther, M., Lesage-Meessen, L., & Record, E. (2005). Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid. *Journal of Biotechnology*, *115*, 47–56.
- Baspinar, B., Eskici, G., & Ozcelik, A. O. (2017). How coffee affects metabolic syndrome and its components. *Food & Function*, *8*, 2089–2101.
- Beckhorn, E. J., Labbee, M. D., & Underkofler, L. A. (1965). Food additives, production and use of microbial enzymes for food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *13*, 30–34.
- Bel-Rhlid, R., Crespy, V., Pagé-Zoerkler, N., Nagy, K., Raab, T., & Hansen, C.-E. (2009a). Hydrolysis of rosmarinic acid from rosemary extract with esterases and *Lactobacillus johnsonii* in vitro and in a gastrointestinal model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 7700–7705.
- Bel-Rhlid, R., Kraehenbuehl, K., Cavin, C., Raab, T. W., & Page, N. (2009b). *Compositions for preparing a coffee beverage comprising hydrolysed chlorogenic acid: Patent WO 2009/132887 A1*.
- Bel-Rhlid, R., Pagé-Zoerkler, N., Fumeaux, R., Ho-Dac, T., Chuat, J.-Y., Sauvageat, J. L., & Raab, T. (2012). Hydrolysis of chicoric and caftaric acids with esterases and *Lactobacillus johnsonii* in vitro and in a gastrointestinal model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 9236–9241.
- Bel-Rhlid, R., Thapa, D., Kraehenbuehl, K., Hansen, C. E., & Fischer, L. (2013). Biotransformation of caffeoyl quinic acids from green coffee extracts by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *AMB Express*, *3*, 28.
- Berger, R. G., Lunkenbein, S., Ströhle, A., & Hahn, A. (2012). Antioxidants in food: Mere myth or magic medicine? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*, 162–171.
- Blank, I., Sen, A., & Grosch, W. (1992). Potent odorants of the roasted powder and brew of Arabica coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, *195*, 239–245.
- Blum, J., Lemaire, B., & Lafay, S. (2007). Effect of a green decaffeinated coffee extract on glycaemia: a pilot prospective clinical study. *Nutrafoods*, *6*, 13–17.

- Blumberg, S., Frank, O., & Hofmann, T. (2010). Quantitative studies on the influence of the bean roasting parameters and hot water percolation on the concentrations of bitter compounds in coffee brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 3720–3728.
- Boekema, P. J., Samsom, M., van Berge Henegouwen, G. P., & Smout, A. J. P. M. (1999). Coffee and gastrointestinal function: facts and fiction: a review. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *34*, 35–39.
- Bonzom, C., Schild, L., Gustafsson, H., & Olsson, L. (2018). Feruloyl esterase immobilization in mesoporous silica particles and characterization in hydrolysis and transesterification. *BMC Biochemistry*, *19*, 1.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.
- Brando, C. H. J. (2004). Harvesting and green coffee processing. In J. N. Wintgens (Ed.), *Coffee: growing, processing, sustainable production: A guidebook for growers, processors, traders, and researchers* (pp. 604–715). Weinheim: WILEY-VCH.
- Buffo, R. A., & Cardelli-Freire, C. (2004). Coffee flavour: an overview. *Flavour and Fragrance Journal*, *19*, 99–104.
- Caporaso, N., Whitworth, M. B., Cui, C., & Fisk, I. D. (2018). Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. *Food Research International*, *108*, 628–640.
- Chen, J. H., & Ho, C.-T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2374–2378.
- Clarke, R. J. (1985a). Green coffee processing. In M. N. Clifford, & K. C. Willson (Eds.), *Coffee: Botany, biochemistry and production of beans and beverage* (pp. 230–250). Boston, MA: Springer US.
- Clarke, R. J. (1985b). The technology of converting green coffee into the beverage. In M. N. Clifford, & K. C. Willson (Eds.), *Coffee: Botany, biochemistry and production of beans and beverage* (pp. 375–393). Boston, MA: Springer US.
- Clarke, R. J. (1987). Grading, storage, pre-treatments and blending. In R. J. Clarke, & R. Macrae (Eds.), *Coffee: Volume 2: Technology* (pp. 35–58). Dordrecht: Springer Netherlands.

- Cohen, S. (1980). Pathogenesis of coffee-induced gastrointestinal symptoms. *New England Journal of Medicine*, 303, 122–124.
- Czerny, M., & Grosch, W. (2000). Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 868–872.
- Czerny, M., Mayer, F., & Grosch, W. (1999). Sensory study on the character impact odorants of roasted Arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 695–699.
- Dadic, M., & Belleau, G. (1973). Polyphenols and beer flavor. *Proceedings. Annual meeting - American Society of Brewing Chemists*, 31, 107–114.
- Dewdney, P. A. (1973). Enzymes in food processing. *Nutrition & Food Science*, 73, 20–22.
- Dilokpimol, A., Mäkelä, M. R., Aguilar-Pontes, M. V., Benoit-Gelber, I., Hildén, K. S., & Vries, R. P. de (2016). Diversity of fungal feruloyl esterases: Updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 231.
- Dórea, J. G., & da Costa, T. H. M. (2005). Is coffee a functional food? *British Journal of Nutrition*, 93, 773–782.
- Drewnowski, A. (2001). The science and complexity of bitter taste. *Nutrition Reviews*, 59, 163–169.
- Duarte, Stelle Maris da Silveira, Abreu, Celeste Maria Patto de, Menezes, H. C. d., Santos, M. H. d., & Gouvea, Cibele Marli Cacao Paiva (2005). Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 387–393.
- Dupas, C., Marsset Baglieri, A., Ordonaud, C., Tomé, D., & Maillard, M.-N. (2006). Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 1053–1060.
- Dzung, N. H., Dzuan, L., & Tu, H. D. (2003). The role of sensory evaluation in food quality control, food research and development: a case of coffee study. *Proceedings of the 8th Asean food conference, Hanoi*, 862–866.
- Eggers, R., & Pietsch, A. (2001). Technology I: Roasting. In O. G. Vitzthum, & R. J. Clarke (Eds.), *Coffee: Recent developments* (pp. 90–107). Oxford, Malden, MA: Blackwell Science.
- Ehrlich, A., Lücker, P. W., & Schaefer, A. (1999). Effect of processed and non-processed coffee samples on gastric potential difference. Study with healthy male Helicobacter

- pylori-positive and Helicobacter pylori-negative volunteers. *Arzneimittel-Forschung*, *49*, 626–630.
- Farah, A., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S., & Trugo, L. C. (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, *98*, 373–380.
- Fazary, A. E., & Ju, Y.-H. (2008). The large-scale use of feruloyl esterases in industry. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, *3*, 95–110.
- Franca, A. S., Mendonça, J. C.F., & Oliveira, S. D. (2005a). Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT - Food Science and Technology*, *38*, 709–715.
- Franca, A. S., Oliveira, L. S., Mendonça, J. C.F., & Silva, X. A. (2005b). Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Food Chemistry*, *90*, 89–94.
- Frank, O., Blumberg, S., Kunert, C., Zehentbauer, G., & Hofmann, T. (2007). Structure determination and sensory analysis of bitter-tasting 4-Vinylcatechol oligomers and their identification in roasted coffee by means of LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1945–1954.
- Frank, O., Zehentbauer, G., & Hofmann, T. (2006). Bioresponse-guided decomposition of roast coffee beverage and identification of key bitter taste compounds. *European Food Research and Technology*, *222*, 492–508.
- Fujioka, K., & Shibamoto, T. (2006). Quantitation of volatiles and nonvolatile acids in an extract from coffee beverages: Correlation with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 6054–6058.
- Fujioka, K., & Shibamoto, T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*, *106*, 217–221.
- Gonthier, M.-P., Verny, M.-A., Besson, C., Rémésy, C., & Scalbert, A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *The Journal of Nutrition*, *133*, 1853–1859.
- Gustafsson, H., Thörn, C., & Holmberg, K. (2011). A comparison of lipase and trypsin encapsulated in mesoporous materials with varying pore sizes and pH conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *87*, 464–471.
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2006). Coffee and health: A review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *46*, 101–123.

- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, *6*, 185–205.
- Hüttner, S., Zezzi Do Valle Gomes, M., Iancu, L., Palmqvist, A., & Olsson, L. (2017). Immobilisation on mesoporous silica and solvent rinsing improve the transesterification abilities of feruloyl esterases from *Myceliophthora thermophila*. *Bioresource Technology*, *239*, 57–65.
- Jaiswal, R., Patras, M. A., Eravuchira, P. J., & Kuhnert, N. (2010). Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MSⁿ: Identification of seven new classes of compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 8722–8737.
- Jayanthi, R., & Subash, P. (2010). Antioxidant effect of caffeic acid on oxytetracycline induced lipid peroxidation in albino rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *25*, 371–375.
- KaffeeV (2001). *Verordnung über Kaffee, Kaffee- und Zichorien-Extrakte*: https://www.gesetze-im-internet.de/kaffeev_2001/BJNR310700001.html. Assessed 13.11.2019.
- Kahle, K., Kraus, M., & Richling, E. (2005). Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research*, *49*, 797–806.
- Kraehenbuehl, K., Page-Zoerkler, N., Mauroux, O., Gartenmann, K., Blank, I., & Bel-Rhliid, R. (2017). Selective enzymatic hydrolysis of chlorogenic acid lactones in a model system and in a coffee extract. Application to reduction of coffee bitterness. *Food Chemistry*, *218*, 9–14.
- Krings, U., Berger, R. G., & Banavara, D. S. (2003). Thin layer high vacuum distillation to isolate the flavor of high-fat food. *European Food Research and Technology*, *217*, 70–73.
- Ky, C.-L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., & Noiro, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, *75*, 223–230.
- Ky, C.-L., Louarn, J., Guyot, B., Charrier, A., Hamon, S., & Noiro, M. (1999). Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var 'dewevrei'. *Theoretical and Applied Genetics*, *98*, 628–637.

- Linke, D., Riemer, S. J.L., Schimanski, S., Nieter, A., Krings, U., & Berger, R. G. (2017). Cold generation of smoke flavour by the first phenolic acid decarboxylase from a filamentous ascomycete – *Isaria farinosa*. *Fungal Biology*, *121*, 763–774.
- Lyman, D. J., Benck, R., Dell, S., Merle, S., & Murray-Wijelath, J. (2003). FTIR-ATR Analysis of brewed coffee: effect of roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3268–3272.
- Martinez, L. F., & Balaban, M. O. (2009). *Quality enhancement of coffee beans by acid and enzyme treatment: United States patent application publication US 2009/0220645 A1*.
- Masi, C., Dinnella, C., Monteleone, E., & Prescott, J. (2015). The impact of individual variations in taste sensitivity on coffee perceptions and preferences. *Physiology & Behavior*, *138*, 219–226.
- Mayer, F., Czerny, M., & Grosch, W. (2000). Sensory study of the character impact aroma compounds of a coffee beverage. *European Food Research and Technology*, *211*, 272–276.
- Moenfard, M., Rocha, L., & Alves, A. (2014). Quantification of caffeoylquinic acids in coffee brews by HPLC-DAD. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, *2014*, 965353.
- Molina, G., Contesini, F. J., Sato, H. H., & Pastore, G. M. (2016). Enzymes in beverage processing. In M. Chandrasekaran (Ed.), *Enzymes in food and beverage processing* (pp. 281–303). Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009). Role of roasting conditions in the profile of volatile flavor chemicals formed from coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 5823–5831.
- Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2010). Formation of volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components: quinic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 5465–5470.
- Moon, J.-K., Yoo, H. S., & Shibamoto, T. (2009). Role of roasting conditions in the level of chlorogenic acid content in coffee beans: Correlation with coffee acidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 5365–5369.
- National Institute of Standards and Technology (2017). NIST chemistry WebBook. <http://webbook.nist.gov/chemistry>. Accessed 20.02.18.
- National Institute of Standards and Technology (2018a). NIST chemistry WebBook. <https://webbook.nist.gov/chemistry>. Accessed 13.05.2019.

- National Institute of Standards and Technology (2018b). NIST chemistry WebBook. <https://webbook.nist.gov/chemistry>. Accessed 30.01.2019.
- Nieter, A., Kelle, S., Linke, D., & Berger, R. G. (2016a). Feruloyl esterases from *Schizophyllum commune* to treat food industry side-streams. *Bioresource Technology*, *220*, 38–46.
- Nieter, A., Kelle, S., Linke, D., & Berger, R. G. (2017). A *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani* with a pronounced chlorogenic acid esterase activity. *New Biotechnology*, *37*, 153–161.
- Nieter, A., Kelle, S., Takenberg, M., Linke, D., Bunzel, M., Popper, L., & Berger, R. G. (2016b). Heterologous production and characterization of a chlorogenic acid esterase from *Ustilago maydis* with a potential use in baking. *Food Chemistry*, *209*, 1–9.
- Nieter, A., Linke, D., Berger, R. G., Thiesing, D., & Popper, L. (2016c). *An enzyme with chlorogenic acid esterase activity and feruloyl esterase activity: European patent application EP 2 987 802 A1*.
- Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J., & Ademiluyi, A. O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): A comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, *26*, 165–170.
- Ochiai, N. (2012). Sequential stir bar sorptive extraction. In R. Marsili (Ed.), *Flavor, fragrance and odor analysis* (pp. 1–19). New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Okayasuand, H., & Naito, S. (2001). Sensory characteristics of apple juice evaluated by consumer and trained panels. *Journal of Food Science*, *66*, 1025–1029.
- Ordynsky, G. (1965). Über den Geschmack der Chlorogensäure. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, *5*, 203–206.
- Pahlke, G., Attakpah, E., Aichinger, G., Ahlberg, K., Hochkogler, C. M., Schweiger, K., Schipp, D., Somoza, V., & Marko, D. (2019). Dark coffee consumption protects human blood cells from spontaneous DNA damage. *Journal of Functional Foods*, *55*, 285–295.
- Patel, A. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2016). Novel enzymatic processes applied to the food industry. *Current Opinion in Food Science*, *7*, 64–72.
- Pehl, C., Pfeiffer, A., Wendl, B., & Kaess, H. (1997). The effect of decaffeination of coffee on gastro-oesophageal reflux in patients with reflux disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *11*, 483–486.

- Peña, M. P. de, Ludwig, I. A., & Cid, C. (2019). Beverage Preparation. In A. Farah (Ed.), *Coffee: production, quality and chemistry* (pp. 272–291). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Podsędek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B., & Markowski, J. (2000). Compositional characterisation of some apple varieties. *European Food Research and Technology*, *210*, 268–272.
- Poulsen, P. B., & Buchholz, K. (2003). History of enzymology with emphasis on food production. In J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen, & D. W.S. Wong (Eds.), *Handbook of food enzymology* (pp. 11–20). New York, NY: Dekker.
- Rajdeo, K., Harini, T., Lavanya, K., & Fadnavis, N. W. (2016). Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. *Food and Bioprocess Processing*, *99*, 12–19.
- Ramadan, M. F., & Moersel, J. T. (2007). Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *87*, 452–460.
- Ramos-de-la-Peña, A. M., & Contreras-Esquivel, J. C. (2016). Methods and substrates for feruloyl esterase activity detection, a review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *130*, 74–87.
- Ribeiro, D. S., Henrique, S. M. B., Oliveira, L. S., Macedo, G. A., & Fleuri, L. F. (2010). Enzymes in juice processing: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, *45*, 635–641.
- Richelle, M., Tavazzi, I., & Offord, E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 3438–3442.
- Ristow, M. (2014). Unraveling the truth about antioxidants: Mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nature Medicine*, *20*, 709–711.
- Rubach, M., Lang, R., Bytof, G., Stiebitz, H., Lantz, I., Hofmann, T., & Somoza, V. (2014). A dark brown roast coffee blend is less effective at stimulating gastric acid secretion in healthy volunteers compared to a medium roast market blend. *Molecular Nutrition & Food Research*, *58*, 1370–1373.
- Rubach, M., Lang, R., Seebach, E., Somoza, M. M., Hofmann, T., & Somoza, V. (2012). Multi-parametric approach to identify coffee components that regulate mechanisms of gastric acid secretion. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*, 325–335.

- Sanz, C., Czerny, M., Cid, C., & Schieberle, P. (2002). Comparison of potent odorants in a filtered coffee brew and in an instant coffee beverage by aroma extract dilution analysis (AEDA). *European Food Research and Technology*, *214*, 299–302.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., & Iseki, K. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, *403*, 136–138.
- Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., & Janzowski, C. (2006). Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Molecular Nutrition & Food Research*, *50*, 24–33.
- Schormüller, J. (1961). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Semmelroch, P., & Grosch, W. (1995). Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *LWT - Food Science and Technology*, *28*, 310–313.
- Semmelroch, P., Laskawy, G., Blank, I., & Grosch, W. (1995). Determination of potent odourants in roasted coffee by stable isotope dilution assays. *Flavour and Fragrance Journal*, *10*, 1–7.
- Siebert, M., Berger, R. G., & Nieter, A. (2018). Enzymatic mitigation of 5-*O*-chlorogenic acid for an improved digestibility of coffee. *Food Chemistry*, *258*, 124–128.
- Siebert, M., Berger, R. G., & Pfeiffer, F. (2019a). Cover Image, Volume 99, Issue 14. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*.
- Siebert, M., Berger, R. G., & Pfeiffer, F. (2019b). Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a *p*-coumaryl esterase of *Rhizoctonia solani*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*, 6644–6648.
- Siebert, M., Detering, T., & Berger, R. G. (2019c). An immobilized fungal chlorogenase rapidly degrades chlorogenic acid in a coffee beverage without altering its sensory properties. *LWT - Food Science and Technology*, *115*, 108426.
- Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. In S.-K. Kim, & F. Toldrá (Eds.), *Advances in food and nutrition research: Marine enzymes biotechnology: Production and industrial applications, Part II - Marine organisms producing enzymes* (pp. 179–211): Academic Press.

- Smith, R. F. (1985). A History of Coffee. In M. N. Clifford, & K. C. Willson (Eds.), *Coffee: Botany, biochemistry and production of beans and beverage* (pp. 1–12). Boston, MA: Springer US.
- Subin, S. R., & Bhat, S. G. (2016). Enzymes: concepts, nomenclature, mechanism of action and kinetics, characteristics and sources of food-grade enzymes. In M. Chandrasekaran (Ed.), *Enzymes in food and beverage processing* (pp. 3–38). Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Sukumaran, R. K., Sankar, V., Madhavan, A., Sankar, M., Satheesh, V., Idris, A.S.O., & Beevi, U. S. (2016). Enzyme technologies: Current and emerging technologies for development of novel enzyme catalysts. In M. Chandrasekaran (Ed.), *Enzymes in food and beverage processing* (pp. 39–66). Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Svilaas, A., Sakhi, A. K., Andersen, L. F., Svilaas, T., Ström, E. C., Jacobs, D. R., Ose, L., & Blomhoff, R. (2004). Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *The Journal of Nutrition*, *134*, 562–567.
- Swaigood, H. E. (2003). Use of immobilized enzymes in the food industry. In J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen, & D. W.S. Wong (Eds.), *Handbook of food enzymology* (pp. 359–366). New York, NY: Dekker.
- Tai, E.-S., Hsieh, P.-C., & Sheu, S.-C. (2014). Effect of polygalacturonase and feruloyl esterase from *Aspergillus tubingensis* on demucilage and quality of coffee beans. *Process Biochemistry*, *49*, 1274–1280.
- Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., & Enck, P. (2017). The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: A comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*, *56*, 2215–2244.
- Taram, F., Winter, A. N., & Linseman, D. A. (2016). Neuroprotection comparison of chlorogenic acid and its metabolites against mechanistically distinct cell death-inducing agents in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research*, *1648*, 69–80.
- Tchibo (2018). Kaffee in Zahlen 2018. <https://de.statista.com/statistik/studie/id/55272/dokument/kaffee-in-zahlen-2018/>. Accessed 13.09.2019.

- Toledo, P. R.A.B., Pezza, L., Pezza, H. R., & Toci, A. T. (2016). Relationship between the different aspects related to coffee quality and their volatile compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*, 705–719.
- Trapp, T., Jäger, D. A., Fraatz, M. A., & Zorn, H. (2018). Development and validation of a novel method for aroma dilution analysis by means of stir bar sorptive extraction. *European Food Research and Technology*, *244*, 949–957.
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, *15*, 219–227.
- Tsuda, S., Egawa, T., Ma, X., Oshima, R., Kurogi, E., & Hayashi, T. (2012). Coffee polyphenol caffeic acid but not chlorogenic acid increases 5'AMP-activated protein kinase and insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *23*, 1403–1409.
- Upadhyay, R., & Mohan Rao, L. J. (2013). An outlook on chlorogenic acids-occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*, 968–984.
- 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.
- Variyar, P. S., Ahmad, R., Bhat, R., Niyas, Z., & Sharma, A. (2003). Flavoring components of raw monsooned Arabica coffee and their changes during radiation processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 7945–7950.
- Vinícius de Melo Pereira, G., Soccol, V. T., Brar, S. K., Neto, E., & Soccol, C. R. (2017). Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*, 2775–2788.
- Vinícius de Melo Pereira, G., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current Opinion in Food Science*, *7*, 50–57.
- Vitzthum, O. G. (1999). Thirty years of coffee chemistry research. In R. Teranishi, E. L. Wick, & I. Hornstein (Eds.), *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress* (pp. 117–133). Boston, MA: Springer US.
- Wintgens, J. N. (2004). The coffee plant. In J. N. Wintgens (Ed.), *Coffee: growing, processing, sustainable production: A guidebook for growers, processors, traders, and researchers* (pp. 1–24). Weinheim: WILEY-VCH.

- Wirtschaftvereinigung Alkoholfreie Getränke e.V. (2019). Entwicklung des Pro-Kopf-Verbrauchs von alkoholfreien Getränken nach Getränkearten 2012-2018. <https://www.wafg.de/fileadmin/dokumente/pro-kopf-verbrauch.pdf>. Accessed 12.06.2019.
- Xu, F., Oruna-Concha, M.-J., & Elmore, J. S. (2016). The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry*, *210*, 163–171.
- Zanin, R. C., Corso, M. P., Kitzberger, C. S. G., Scholz, M. B. d. S., & Benassi, M. d. T. (2016). Good cup quality roasted coffees show wide variation in chlorogenic acids content. *LWT - Food Science and Technology*, *74*, 480–483.
- Zhang, Y., He, S., & Simpson, B. K. (2018). Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current Opinion in Food Science*, *19*, 30–35.

Anhang

Die Publikation „Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a *p*-coumaryl esterase of *Rhizoctonia solani*“ (vgl. Kapitel 8) wurde mit dem Titelbild der Novemberausgabe 2019 des *Journals of the Science of Food and Agriculture* gewürdigt (s. Abbildung 7) (Siebert et al., 2019a).

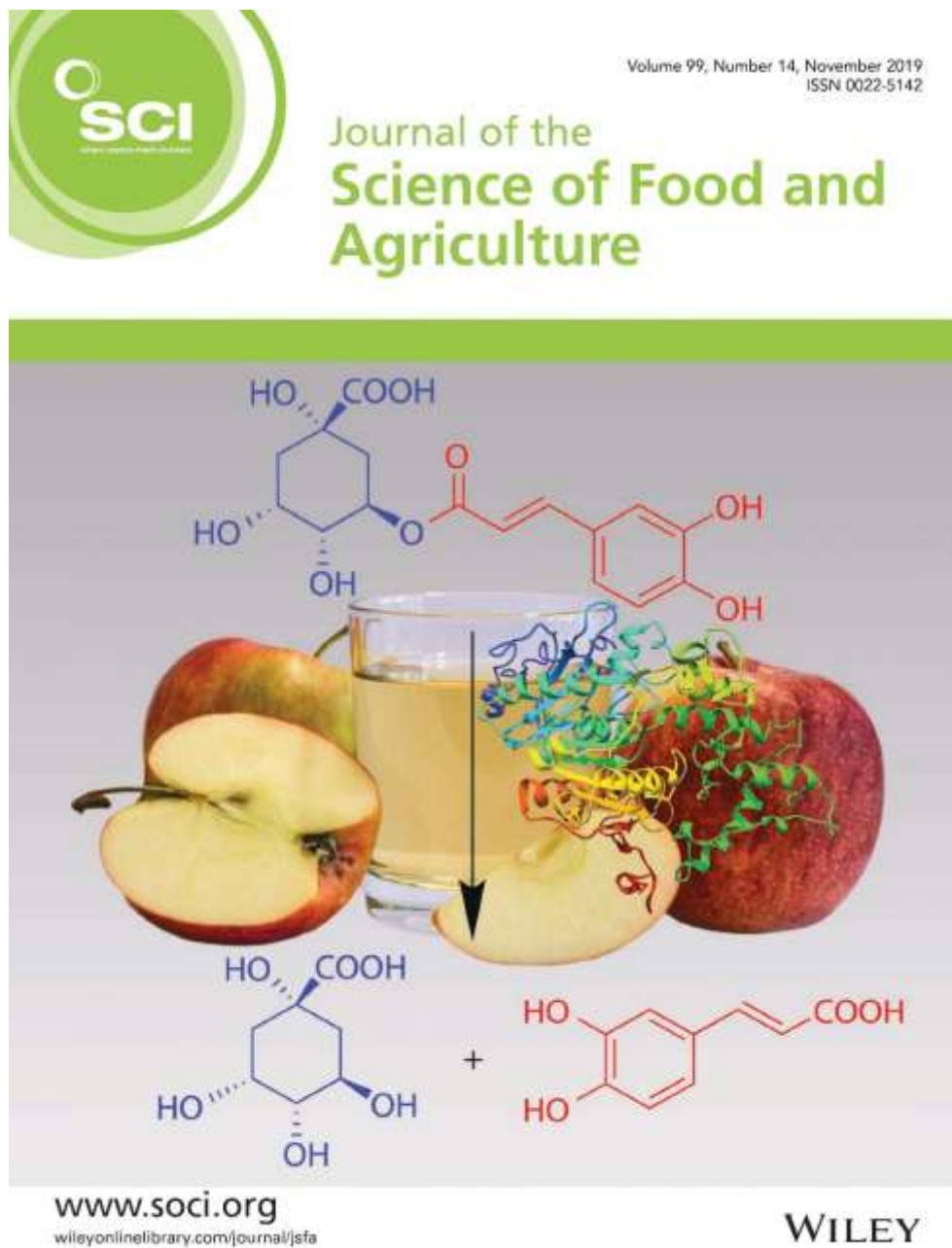


Abbildung 7: Titelbild zur Publikation über den enzymatischen Chlorogensäureabbau in Apfelsaft (Siebert et al., 2019a).

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Mareike Siebert

31.12.1991 in Berlin

SCHULBILDUNG

| | |
|-------------|--|
| 1998 – 2001 | Maria-Montessori-Grundschule Tempelhof-Schöneberg, Berlin |
| 2001 - 2002 | Grundschule Hohenkammer, Hohenkammer |
| 2002 – 2011 | Camerloher Gymnasium, Freising |
| 04/2011 | Abitur; Prüfungsfächer: Biologie, Mathematik, Englisch, Geschichte |

WEITERER WERDEGANG

| | |
|-------------------|---|
| 10/2011 – 04/2016 | Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität München; 1. Staatsexamen |
| 10/2015 – 04/2016 | Wissenschaftliche Abschlussarbeit „Identifizierung von <i>key aroma compounds</i> in Salzersatzstoffen für Wurstwaren“ Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung, Freising Abteilung: Analytische Sensorik |
| Seit 08/2016 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover |

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Diese Dissertationsschrift basiert auf Arbeiten, die in folgenden *peer reviewed* Publikationen veröffentlicht wurden:

Siebert, M., Berger, R.G., Nieter, A. (2018). Enzymatic mitigation of 5-*O*-chlorogenic acid for an improved digestibility of coffee. *Food chemistry*, 258, 124 – 128; <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.061>

Siebert, M., Detering, T., Berger, R.G. (2019). An immobilized fungal chlorogenase rapidly degrades chlorogenic acid in a coffee beverage without altering its sensory properties. *LWT – Food Science and Technology*, 115, 108426; <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108426>

Siebert, M., Berger, R.G., Pfeiffer, F. (2019). Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a *p*-coumaryl esterase of *Rhizoctonia solani*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 6644-6648; <https://doi.org/10.1002/jsfa.9940>

Die letztgenannte Publikation wurde zudem als Titelbild des Journals abgedruckt:

Siebert, M., Berger, R.G., Pfeiffer, F. (2019), Cover Image, Volume 99, Issue 14. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99; <https://doi.org/10.1002/jsfa.10078>

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit folgende Poster präsentiert:

Siebert, M., Nieter, A., Berger, R.G. Reduzierung des Chlorogensäuregehaltes in Kaffee mittels einer *p*-Cumarsäureesterase aus *Rhizoctinia solani*. 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Würzburg, 25. – 27. September 2017

Siebert, M., Nieter, A., Berger, R.G. Enzymatic mitigation of 5-*O*-chlorogenic acid for an improved digestibility of coffee. CDZ Symposium, Universität Hohenheim, 12. – 14. September 2018

Siebert, M., Detering, T., Berger, R.G. Verwendung einer immobilisierten *p*-Cumar-säureesterase zur Chlorogensäurenminderung in aufgebühtem Kaffee. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 16. – 18. September 2019

Siebert, M., Berger, R.G. Enzymatic mitigation of chlorogenic acid in apple juice without altering its sensory properties. DECHEMA Summer School, Universität Hohenheim, 23. – 25. September 2019

Siebert, M., Berger, R.G. Enzymatic mitigation of chlorogenic acids in coffee and apple juice without altering their sensory properties. Infotag Neue techno- und biofunktionelle Eigenschaften in Lebensmitteln, Frankfurt am Main, 29. November 2019

Teilergebnisse dieser Dissertationsschrift wurden auf folgenden Konferenzen vorgetragen:

Siebert, M., Nieter, A., Berger, R.G. Reduzierung des Chlorogensäuregehaltes in Kaffee mittels einer *p*-Cumarsäureesterase aus *Rhizoctonia solani*. Arbeitstagung 2018 des Regionalverband Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Leibniz Universität Hannover, 07. – 08. März 2018

Siebert, M., Berger, R.G. Enzymatic mitigation of chlorogenic acids in coffee and apple juice without altering their sensory properties. DECHEMA Summer School 2019, Universität Hohenheim, 23. – 25. September 2019

Zusätzlich wurden folgende Abstracts von Postern und Vorträgen in der Fachzeitschrift der Lebensmittelchemischen Gesellschaft veröffentlicht:

Siebert, M., Nieter, A., Berger, R.G. Reduzierung des Chlorogensäuregehaltes in Kaffee mittels einer *p*-Cumarsäureesterase aus *Rhizoctinia solani*. Lebensmittelchemie 72 (2018) 135; ISSN 0937-1478

Siebert, M., Nieter, A., Berger, R.G. Reduzierung des Chlorogensäuregehaltes in Kaffeepulver mittels einer *p*-Cumarsäureesterase aus *Rhizoctinia solani*. Lebensmittelchemie 73 (2019) 135; ISSN 0937-1478