

**Molekulare Verkapselung von Aromastoffen mit Amylose
und Bestimmung ihrer Freisetzungskinetik**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Giannoula Avgenaki

aus Düsseldorf

2002

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. G. Wulff in der Zeit von März 1997 bis Dezember 2000 am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Wulff danke ich für die interessante und perspektivenreiche Aufgabenstellung und seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Für die gemeinsame und lehrreiche Zeit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Thomas Witte, Dirk Kasper, Stephan Rensing sowie Markus Arendt, die zu einer angenehmen und heiteren Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Einen ganz herzlichen Dank richte ich an meine Freundin Christine Fuchs, deren immerwährender Unterstützung insbesondere bei der Korrekturlesung dieser Arbeit, sicher sein konnte.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin Maria Lipani, die durch ihren steten Zuspruch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Abschließend möchte ich mich für die Förderung dieser Arbeit bei den Firmen Nestlé (Lausanne, CH) und Eridania Beghín-Say (Vilvoorde, B) bedanken.

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Wulff
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 9 Juli 2002

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Theoretischer Teil	
2.1 Aufgabenstellung.....	20
2.2 Bildung von Amylosekomplexen mit Aromastoffen als Einzelkomponenten und im Mehrstoffgemisch.....	23
2.3 Bestimmung der Freisetzungskinetik der Aromastoffe aus den Amylosekomplexen.....	45
2.4 Bestimmung der Assoziationskonstanten der Amylosekomplexe in Abhängigkeit von der Gastverbindung und von der Amylosequelle	68
3. Zusammenfassung.....	79
4. Experimenteller Teil	
4.1 Apparatives.....	83
4.2 Chemikalien.....	83
4.3 Isolierung der Amylosen aus diversen Stärken.....	84
4.4 Enzymatische Amylosesynthese.....	86
4.5 Hydroxypropylierung von Kartoffelamylose.....	87
4.6 Synthese von Aromastoff-Amylosekomplexen.....	88
4.7 Spektroskopische Untersuchungen.....	89
4.8 Chromatographische Analytik.....	94
5. Literatur.....	98

Häufig verwendete Abkürzungen

AHG	Anhydroglucoseeinheit
BV	Blauwert
CD	Circulardichroismus
DS	Substitutionsgrad (degree of polymerisation)
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HP-Amylose	Hydroxypropylamylose
HS-GC	Headspace-Gaschromatographie
ORD	Optische Rotationsdispersion
P _n	Polymerisationsgrad
WPS	Markerbsenamylose (wrinkled pea starch)

1 Einleitung

1.1 Aromastoffe

Lebensmittel stellen komplexe biologische Systeme dar. Bei deren Auswahl läßt sich der Konsument nicht allein von deren Nährwert und Bekömmlichkeit, sondern auch von deren Farbe, Textur, Erscheinung und Aromaeindruck leiten. Vor allem letzterer Qualitätsfaktor kann von ausschlaggebender Bedeutung sein, wie folgende Fälle verdeutlichen. Es ist bekannt, daß ernährungsphysiologisch vollwertige Produkte auf Grund eines schwachen Aromas oder Fehl aromas von den Verbrauchern abgelehnt werden, während Produkte von geringerem Nährwert aber beliebten Aromen stark verbreitet sind.¹

Diese Essensgewohnheiten sind weniger auf ein fehlendes Ernährungsbewußtsein zurückzuführen, vielmehr sollte ein Aroma in seiner ursprünglichen Funktion als Selektionsmittel zur Unterscheidung von genießbaren und ungenießbaren Nahrungsprodukten dienen. Bei zu langen Lagerungen können Verderbnisvorgänge zur Entstehung von unangenehm riechenden Stoffen führen (Fehl aromen), sodaß letztendlich eine negative Auswahl getroffen wird. Ein typisches Fehl aroma weist z.B. Orangensaft auf, wenn durch Einwirkung von Luftsauerstoff der Aromastoff (R)-Limonen zu sauerstoffhaltigen Terpenen oxidiert wird.²

Durch das Zusammenwirken von Geschmacks- und Geruchsstoffen (Aromastoffen) wird beim Verzehr von Lebensmitteln ein Gesamtsinneseindruck erzeugt, der im Englischen mit „**flavour**“ bezeichnet wird, wofür es keinen deutschen, gleichbedeutenden Ausdruck gibt.³

Bei den Geschmacksstoffen handelt es sich um bei Zimmertemperatur im allgemeinen nicht flüchtige Substanzen, die über die auf der Zunge befindlichen Geschmacksrezeptoren wahrgenommen werden und einen salzigen, süßen, sauren oder bitteren Geschmack erzeugen.

Unter dem Begriff „**Aromastoffe**“ werden die flüchtigen Bestandteile eines Lebensmittels unterschiedlicher Struktur zusammengefaßt, die auf direktem Wege mit der Atemluft durch die Nase oder auf indirektem Wege über die Mundhöhle-Rachen-Nasen-Passage einen typischen Aromaeindruck hervorrufen. Um in den Nasenraum zu gelangen, müssen diese Substanzen einen merklichen Dampfdruck bei Raumtemperatur besitzen. Außerdem müssen sie einerseits gewisse hydrophile

Eigenschaften aufweisen, um von der Wasserschicht der Nasenschleimhaut aufgenommen und zu den Riechzellen transportiert werden zu können; andererseits ist zur Passierung der Fettschicht der Nervenzellen eine bestimmte Lipophilie erforderlich.⁴ Sind diese Voraussetzungen erfüllt, so kann jeder Stoff aus allen möglichen Verbindungsklassen aromawirksam sein. Die wichtigsten, der in Lebensmitteln vorkommenden Aromastoffe lassen sich in folgenden Stoffklassen einteilen:

- Kohlenwasserstoffe
- Aldehyde
- Ketone
- Alkohole
- Phenole
- Ether
- Acetale
- Säuren
- Ester
- Furane
- Lactone
- N-haltige Verbindungen
- S-haltige Verbindungen

Zu den aromaintensivsten Stoffen zählen vor allem schwefelhaltige Verbindungen wie Mercaptane und Sulfide, gefolgt von Carbonylgruppen und Estern. Mengenmäßig überwiegen bei den meisten Lebensmitteln Ester, Carbonylverbindungen, Alkohole und Kohlenwasserstoffe, insbesondere Isoprene.⁵

Nicht alle in den Lebensmitteln identifizierten Aromastoffe sind bereits im Rohprodukt von vornherein enthalten (**primäre** bzw. originäre Aromastoffe), sondern viele entstehen sekundär durch zahlreiche Reaktionen. Die **sekundären** Geruchsstoffe können entweder das Ergebnis der Wirkung von Zellenzymen oder das Ergebnis nichtenzymatischer Bildungsmechanismen sein.⁶

In Obst und Gemüse zum Beispiel entstehen eine Reihe flüchtiger Aldehyde durch die enzymatisch eingeleitete Peroxidation ungesättigter Fettsäuren mittels Lipoxygenasen und den darauffolgenden Abbau der dabei entstandenen Hydroperoxide. Abb. 1 zeigt ausgehend von Linolensäure die Bildung von 3,6-(cis,cis)-Nonadienal und 3-cis-Hexenal in Gurke und Tomate auf. Weitere Isomere können in Anwesenheit von cis/trans-Isomerasen (wie sie in der Gurke enthalten sind) entstehen. Der gleiche Reaktionsweg führt im Falle der in beiden Früchten enthaltenen Linolsäure zu Hexanal sowie nach Isomerisierung zu 2-trans-Nonenal.⁷

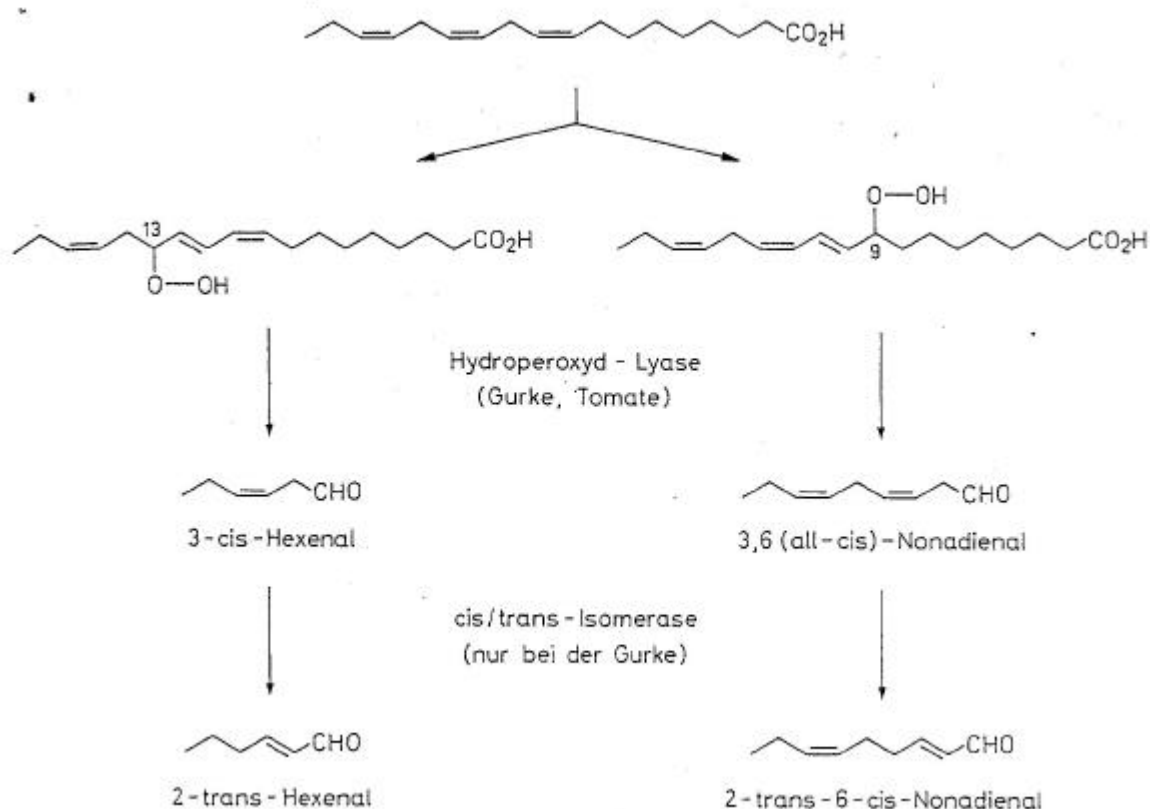


Abb. 1: Prinzip der Aromabildung in Gurke und Tomate⁷

Neue Aromastoffen werden auch bei physikalische Verfahren wie Trocknung, Erwärmung, Erhitzung in verschiedenen Medien (Luft, Wasser, Fett usw.) erzeugt. Bei hohen Temperaturen, wie sie bei Röstprozessen (Backen, Braten) vorherrschen, entstehen vermehrt Aromastoffe durch Pyrolyse von Kohlenhydraten, Proteinen, und Lipiden. Rohes Fleisch hat z.B. nur einen schwachen Geruch. Erst während des Erhitzens entsteht durch einen thermischen und oxidativen Abbau von Zucken, Aminosäuren, ungesättigten Fettsäuren und Thiamin das typische Fleischaroma.⁸

Im Laufe der Zeit sind mehrere Theorien sind zur Erklärung der Geruchswahrnehmung entwickelt worden, aber bis heute kann keine eine eindeutige Auskunft über die Beziehung der molekularen Struktur einer Substanz und deren Geruch liefern. Sichergestellt ist, daß Molekülgestalt und Molekülgröße, sowie funktionelle Gruppen und deren Stellungen für die Wirkung eines Aromastoffmoleküls auf einen sterisch komplementären Rezeptor von Bedeutung sind.⁹ Damit ist erklärbar, daß Stereoisomere unterschiedliche Geruchsqualitäten

und Geruchsintensitäten besitzen können. Ein schönes Beispiel stellt Menthol dar: ausschließlich das L-Isomer (mit 1R, 3R, 4S Konfiguration) ruft die frische minzige Note hervor, während D-Menthol (mit 1S, 3S, 4R Konfiguration) einen modrig, schimmeligen Eindruck erweckt.¹⁰

Vielen Aromastoffen kommt eine echte Wirkstofffunktion zu. Es ist bekannt, daß einzelne Aromastoffe die Sekretion der Verdauungssäfte, also die physiologischen Vorgänge der Verdauung, wie auch die Speichelbildung, anregen können. Seit einigen Jahren beschäftigt man sich außerdem noch mit den antioxidativen und antibiotischen Eigenschaften von Geruchsstoffen sowie mit ihrer Wirkung als Abwehrstoffe.¹¹

In Lebensmitteln liegen die Aromastoffe als Vielstoffgemische in weiten (sub-ppb bis ppm) Konzentrationsabstufungen vor. Um die Aromawirksamkeit jedes Bestandteils eines Gemisches zu vergleichen, wird der Geruchsschwellenwert, d.h. diejenige Konzentration einer Verbindung, die gerade noch zur Erkennung ihres Geruches ausreicht, ermittelt. Nur diejenigen flüchtigen Stoffe eines Lebensmittels sind auch Aromastoffe, deren Konzentration im Lebensmittel über der Geruchsschwelle liegt.

Die in der Literatur aufgeführten Schwellenwerte differieren häufig, da sie nicht nur vom Dampfdruck der flüchtigen Aromastoffe, der Temperatur und dem Medium sondern auch vom Bestimmungsverfahren und der Zusammensetzung der Prüfgruppe abhängen. Tab. 1 verdeutlicht die unterschiedliche Geruchswirksamkeit einiger Aromastoffe in Wasser.

Verbindung	Vorkommen (Beispiele)	Schwellenwert [mg/l]
Methional	Kartoffelchips	0,000 04
2-trans-Nonenal	Gurke, Tomate	0,000 08
Dimethylsulfid	Butter	0,001
Guajacol	Kaffee	0,003
Hexanal	Tomate, Apfel	0,02
Maltol	Kaffe, Brot	30,0

Tab. 1: Geruchsschwellenwerte einiger Aromastoffe in Wasser (20°C)¹²

Ziel der Aromaforschung ist es, vor allem diejenigen Aromastoffe herauszufinden, die das charakteristische Aroma eines Lebensmittels bestimmen, die sogenannten „character impact compounds“, die die Schlüsselverbindungen eines Aromas darstellen.

Nach Berlitz und Grosch² lassen sich Lebensmittel im Hinblick auf das Vorkommen solcher „**character impact compounds**“ in vier Gruppen einteilen:

- Gruppe 1: Das Aroma wird entscheidend von einer Verbindung geprägt. Die daneben noch in großer Zahl vorkommenden Aromastoffe tragen nur zur Abrundung des Aromas bei.
- Gruppe 2: Mehrere Verbindungen, von denen eine besonders wichtig sein kann, rufen das typische Aroma hervor.
- Gruppe 3: Das Aroma kann nur mit einer größeren Zahl von Verbindungen annähernd simuliert werden. Im allgemeinen fehlt eine „character impound compound“.
- Gruppe 4: Das Aroma kann auch mit einer großen Zahl von Verbindungen nicht befriedigend reproduziert werden.

Gruppe	Lebensmittel	Aromastoffe
1	Champignon	1-Octen-3-ol
	Kartoffel (roh)	2-Isopropyl-3-methoxypyrazin
	Zitronen	Citral
2	Apfel	Ethyl-methylbutyrat, Hexanal, E-2-Hexenal
	Butter	2,3-Butandion, Acetaldehyd, Dimethylsulfid
3	Pfirsich	γ -Lactone(C ₆ -C ₁₀), δ -Lactone(C ₁₀), Alkohole, verschiedene Ester, Säuren, Benzaldehyd
4	Kaffee, Bier	zwischen 200 und 400 Verbindungen

Tab. 2: Gruppeneinteilung der Lebensmittel (nach Berlitz/Grosch) ²

Besonders wichtig für ein naturgetreue, harmonische Nachbildung eines Lebensmittelaromas sind Kenntnisse über die quantitative Zusammensetzung des Aromaspektrums. Es ist bekannt, daß das Aromaprofil von Mischungen derselben Aromastoffe unterschiedlicher Mengen völlig verschieden sein kann. In einer Mischung, in der Aromastoffe vorliegen, die sich deutlich in der Note unterscheiden, setzt sich nur bei gleichwertigen Geruchsintensitäten das Geruchsprofil aus den Profilen der Komponenten additiv zusammen. Wenn dagegen das Konzentrationsverhältnis so beschaffen ist, daß die Geruchsintensität

einer Komponente überwiegt, dann bestimmt diese auch weitgehend bis vollständig das Geruchsprofil.

Auf Grund der heutigen analytischen Möglichkeiten und dem Einsatz modernster spektroskopischer Forschungsmethoden ist man heute in der Lage, die Konzentrationsverhältnisse komplex zusammengesetzter Stoffgemische aufzuschlüsseln.¹³

Die Methodik, die üblicherweise eingeschlagen wird, ist in Abb. 2 verdeutlicht. Der erste Schritt in der Aromastoffanalytik besteht in der Isolierung und Abtrennung der Aromastoffe aus den Nahrungsmitteln. Die Art der Probenaufbereitung spielt hierbei eine große Rolle, da sie die Ergebnisse der Analyse beeinflusst.¹⁴

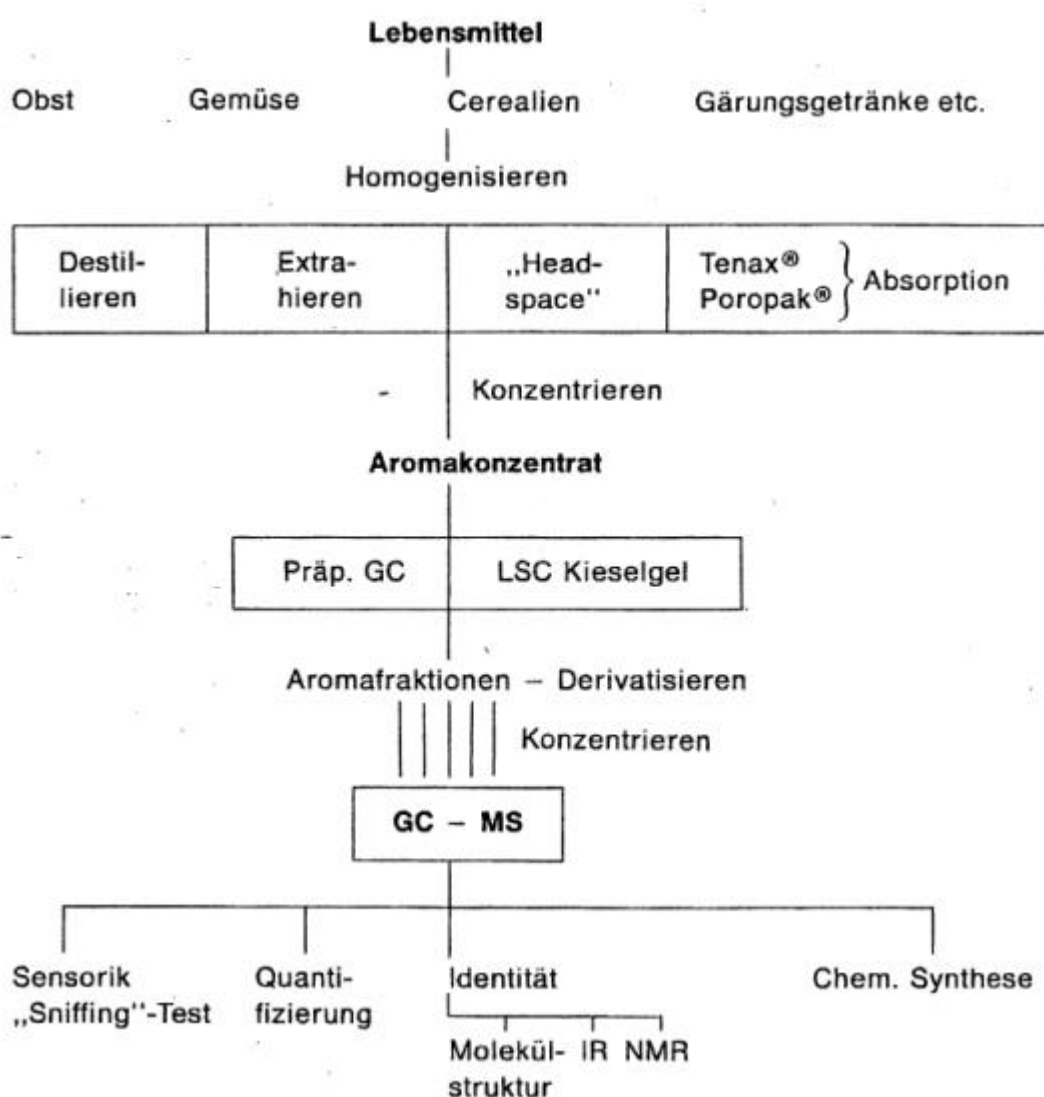


Abb. 2: Schematische Darstellung der Methoden zur Analyse von Lebensmittelaromen¹⁵

Um methodenabhängige Fehler, wie Änderungen der quantitativen Zusammensetzung einer Aromastoffmischung zu minimieren, sollten möglichst verschiedene Wege der Isolierung aus dem Lebensmittel herangezogen werden. Hierzu gehören zum einen die Destillation und die Extraktion, mit deren Hilfe sich Aromakonzentrate erhalten lassen, die anschließend säulenchromatographisch (LSC: Liquid-Solid-Chromatographie) oder gaschromatographisch (präparative GC) in die Einzelbestandteile trennen lassen. Abschließend folgt deren Identifizierung und Quantifizierung.¹⁶

Es gibt noch zwei weitere Isoliermöglichkeiten: die Headspace-Technik und die Adsorption an porösen Kunststoffgranulat (Tenax, Poropak) nach Extrahieren mittels eines inerten Gasstromes.¹⁷ Bei der Headspace-Technik handelt es sich um eine Probenahme flüchtiger Komponenten aus der Gasphase, d.h. dem Kopfraum über einem zu untersuchenden Substrat. Die anschließende gaschromatographische Analyse erlaubt eine direkte Auftrennung und Identifizierung der unbekanntesten Einzelbestandteile. Besonders bewährt hat sich hierbei die Kapillargaschromatographie und deren on-line Kopplung mit der Massenspektrometrie (GC-MS). Die Kombination dieser beiden spektroskopischen Verfahren zur Strukturaufklärung bei der Analyse komplexer Gemische flüchtiger Verbindungen erreicht heute einen hohen Standard und trug zur raschen Entwicklung der Aromaforschung bei.¹⁸ Da die menschliche Nase in der Lage ist noch Substanzen zu erkennen, die derzeit selbst mit den empfindlichsten Detektoren eines Gaschromatographen nicht mehr registriert wird, wird oft gleichzeitig der Trägergasstrom nach dem Verlassen der Trennsäule abgerochen („Sniffing“-Test).¹⁹

Die Grenzen der GC-MS-Kopplung sind bei der Identifizierung von geometrischen Isomeren erreicht. Seit dem möglichen Einsatz der Fourier-Transformationstechnik in der Infrarotspektroskopie läßt sich ein komplettes IR-Spektrum im Millisekundenbereich und einer IR-Empfindlichkeit von wenigen Nanogramm pro getrennter Komponente aufnehmen. Die Kombination der Kapillargaschromatographie mit der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie bietet eine sinnvolle ergänzende spektroskopische Methode.²⁰

Diese Vorarbeiten müssen geleistet werden, um die Aromakomposition eines Naturstoffgemisches aufzudecken. Nach Unterteilung in Aromakomponenten, die das charakteristische Aroma eines Lebensmittels prägen und solchen die nur zur Abrundung beitragen, kann die chemische Synthese der relevanten Aromastoffverbindungen vorgenommen werden. Aus wirtschaftlichen Aspekten versucht man, bei der Syntheseplanung von einem ausreichend und preiswert verfügbaren Naturstoff oder einer Grundchemikalie auszugehen.

Die **Lebensmitteltechnologie** beschäftigt sich im Hinblick auf das Aroma bei der Be- und Verarbeitung mit folgenden Problemen:

- Aromatisierung aromaarmer Lebensmittel (z.B. Margarine und Spirituosen)
- Aromaerhaltung (z.B. bei Obsterzeugnissen und Gewürzen)
- Optimale Aromabildung (z.B. bei Brot, Käse und Kaffee)
- Entfernung unerwünschter Aromastoffe (Beseitigung des Off-Flavour)
- Aromabindung (z.B. bei Pulverkaffee)

Aromatisierte Lebensmittel werden seit Jahrhunderten hergestellt und verzehrt, zB. Süßwaren, Gebäck, Tees, Getränke. Wegen des enormen Anstiegs der industriell produzierten Lebensmittel, nahm in den letzten Jahren die Zahl der aromatisierten Lebensmittel stark zu. In Deutschland liegt sie inzwischen bei etwa 15-20% des gesamten Lebensmittelverbrauchs.²¹

In der Zukunft werden die uns bekannten Nahrungsmittelquellen nicht ausreichen, um die zunehmend anwachsende Weltbevölkerung zu ernähren. Daher wird an der Erschließung neuer Proteinquellen in der Landwirtschaft gearbeitet. Die Entfernung von der natürlichen Basis ist für den Konsumenten gewöhnungsbedürftig. Daher muß man die neuen Rohstoffe altvertrauten Lebensmittel angleichen. Auch wenn diese Zukunftsnahrung vom ernährungsphysiologischen Standpunkt den Ansprüchen genügt, stellt sich das Problem der Aromatisierung, da die Aromastoffe oder ihre Vorstufen vom Rohmaterial nicht mehr mitgeliefert werden. Sie müssen für derartige Produkte synthetisch oder halbsynthetisch hergestellt und dann diesen zugesetzt werden.²²

Nach der Aromenverordnung des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) werden die eingesetzten Aromastoffe in drei Gruppen unterteilt ²³:

1. „**natürlich**“, wenn sie aus natürlichem Material ausschließlich durch physikalische oder fermentative Verfahren gewonnen werden,
2. „**naturidentisch**“, wenn sie chemisch synthetisiert und chemisch identisch mit den natürlichen Aromastoffen sind,
3. „**künstlich**“, wenn sie aromawirksam sind und nicht in der Natur als vorkommend nachgewiesen werden konnten

Die Notwendigkeit der zusätzlichen Aromatisierung von aromaarmen Lebensmitteln muß im Hinblick auf die Unschädlichkeit der Aromastoffe wohl überlegt werden. Außerdem ist darauf zu achten, daß die Änderung der Ernährungsgewohnheiten, die mit Hilfe der zugesetzten Aromastoffe induziert werden, nicht in eine vom gesundheitlichen Standpunkt unerwünschte Richtung gelenkt wird.

Bis heute sind zahlreiche **Stabilisierungsverfahren für Aromen**^{24, 25, 26} entwickelt worden, und dienen zum

- Schutz vor Aromaverlusten, die während der Lagerung und Verarbeitung der Lebensmitteln auf Grund der Instabilität und Flüchtigkeit vieler Aromastoffe auftreten
- Schutz vor Aromaveränderungen, bedingt durch Zersetzung besonders bei hitze- sowie lichtempfindlichen Substanzen und Oxidation in Anwesenheit von Luftsauerstoff
- Schutz vor Auftreten von Fehlparomen, hervorgerufen durch unerwünschte Reaktionen von Aromastoffen untereinander oder von Aromastoffen mit anderen Lebensmittelbestandteilen (z.B. Bildung Schiff'scher Basen beim Nebeneinandervorliegen von Aldehyd- und Aminogruppen)

Im Prinzip werden dabei die Aromastoffe verkapselt, indem sie in eine Trägermatrix eingebracht werden. Eine Übersicht der häufig angewendeten Methoden^{27, 28, 29} bietet folgende Tabelle:

Verkapselungsverfahren	Form der Matrix
<u>I. Mikroverkapselung:</u>	
Sprühtrocknung	Hohle kugelförmige Partikel
Extrusion	Feste glasige Filme
Gefriertrocknung	Makro- sowie microporöse Strukturen
Co-Kristallisation	Kristalline Agglomerate
<u>II. Molekulare Verkapselung:</u>	
Einlagerungskomplexe	Cyclodextrine u. andere Wirtmoleküle

Tab. 3: Übersicht der kommerziell üblichen Stabilisierungsmethoden von Aromen



Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Verteilung der verkapselten Substanzen je nach Verkapselungsprozess

Die ersten 4 Verfahren, die zur Mikroverkapselung gehören, beruhen auf einem mikroskopischen Einschluß der Aromastoffe innerhalb eines Trägermaterials. Hiermit kann weitgehend die Qualitätsbeständigkeit des Aromas gesichert werden. Die Struktur der Matrix bestimmt dabei das Ausmaß des Schutzes vor Verflüchtigung. Die „molekulare Verkapselung“ dagegen gewährleistet einen vollständigen Schutz vor Verflüchtigung, Oxidation und thermischen Abbau.³⁰ Hierbei handelt es sich um einen individuellen räumlichen Einschluß eines einzelnen Aromastoffmoleküls (Gastmolekül) durch ein anderes Molekül (Wirtmolekül), dessen Hohlraum geeignete molekulare Dimensionen besitzt. Die dabei entstandenen Verbindungen bezeichnet man als Einlagerungs- bzw. Inklusionskomplexe. Große Ringmoleküle wie z.B. Cyclodextrine (siehe Seite 12) eignen sich als Wirt für manche Aromastoffe.

Bei der Wahl des Trägermaterials für eine Mikroverkapselung von Aromen spielt eine gute Filmbildung, Emulsionsstabilität, geringe Viskosität und Hygroskopie, das Fehlen eines eigenen Geschmackes oder Geruches, sowie die Möglichkeit der Freisetzung des Aromas bei Anfeuchtung mit Wasser eine wesentliche Rolle.³¹ Eine Reihe von Kohlenhydraten (wie modifizierte Stärken, Gummi-Arabicum, Maltodextrine) erfüllen diese Voraussetzungen.³² Aufgrund der niedrigen Kosten, der Verfügbarkeit sowie deren unbedenkliche Anwendung im Lebensmittelsektor werden sie bevorzugt eingesetzt. Aber auch Lipide und Proteine können als Sorbentien fungieren und zu einer befriedigenden Aromaretention führen.^{33,34}

Für den wachsenden Bereich der Fertigmischungen und Trockenprodukte im Lebensmittelsektor besteht eine große Nachfrage nach stabilen pulverförmigen Aromen, die meist aus öligen flüssigen Aromastoffkonzentraten hergestellt werden. Von großem Vorteil erweist sich hierbei insbesondere die einfache Handhabung des Pulvers und die Dosierung nach erforderlicher Menge. Um die Qualität der verkapselten Aromen zu bewerten, werden als Kriterien ihre Stabilität, deren Aromastoffgehalt, deren mittlere Partikeldurchmesser sowie die Aromastoffmenge, die an der Kapseloberfläche haftet, herangezogen.

Zur Mikroverkapselung durch Sprühtrocknung werden die Aromastoffe in einer Lösung oder Suspension des Polysaccharids emulgiert. Die zu trocknende Lösung wird von einer Pumpe zu einem Zerstäubungsaggregat geleitet. Dort wird die Flüssigkeit als ein feiner Nebel in der Trocknungskammer, durch die ständig heiße Luft strömt, zerstäubt. Hierbei verdunstet fast augenblicklich der größte Teil des Wassers aus den Flüssigkeitstropfen. Es entstehen trockene, rieselfähige

gebrauchsfertige Aromazubereitungen, die bis zu 25% flüchtige Anteile enthalten können. Beim Vermischen mit Wasser löst sich das Kapselmaterial, und die Aromastoffe werden freigesetzt. Die Partikelgröße beträgt 10-200 µm im Durchmesser.²³

Bei der Extrusion wird eine Mischung aus Polysacchariden, Aromastoffen, Emulgatoren in einem Extruder aufgeschmolzen und durch eine Düse in ein gekühltes Bad gepreßt. Es entstehen glasige Filme, die durch Vermahlen in ein fließfähiges Pulver mit Aromastoffgehalten zwischen 8 und 20% umgewandelt werden.³⁵

Die Gefriertrocknung ist eine Sublimationstrocknung mit deren Hilfe man grobe schwammige trockene Produkte erhalten kann, die oft ein gutes Auflösungsverhalten zeigen. In Gefriertrocknungsanlagen wird eine wäßrige Suspension oder Emulsion aus Kohlenhydraten (als Trägerstoff), Aromen und möglicherweise anderen Inhaltsstoffen auf eine für das jeweilige Gemisch spezifische Temperatur gekühlt. Durch diese Temperaturabsenkung gefriert das Wasser und die Eiskristalle verbleiben in der vorliegenden Mischung an ihrem Ort. Beim Anlegen eines Vakuums sublimiert das Eis direkt, und zwar ohne daß es durch die Kohlenhydratmatrix an die Oberfläche diffundieren muß. Somit können makro- und mikroporöse Strukturen entstehen, in denen die Aromen durch Adsorption in gewissem Maße zurückgehalten werden.³⁶ Allerdings müssen gewisse Aromaverluste im Verlauf der Gefriertrocknung in Kauf genommen werden, da bei der Entfernung des Wassers im Vakuum die wasserdampfgefährlichen Aromastoffe zum Teil mitentweichen. Auf der anderen Seite eignet sich dieses Trocknungsverfahren wegen seiner schonenden Bedingungen besonders für temperaturempfindliche Substanzen.³⁷

Bei der Co-Kristallisation bilden die Aromastoffe in Anwesenheit von kristallinen Zuckern Aggregate, in denen sie sich zwischen den Kristallen einordnen. Um eine geeignete kristalline Struktur zu erhalten, müssen die Substrate (z.B. Lactose oder Glucose) erhitzt und auf ein bestimmtes Feuchtigkeitsniveau gebracht werden. Als schwache Aromastoffträger bieten allerdings die kristallinen Zucker einen geringen Schutz vor Verflüchtigung und finden daher selten Anwendung.³⁸

1.2 Molekulare Verkapselung mit Polyssachariden

Die effektivste Konservierungsform wird durch die Bildung von Inklusionskomplexen mit Aromastoffen (auch Einschlußverbindungen genannt) erreicht. Im Gegensatz zu mikroskopischen Einschlüssen von Aromastoffen in einem stabilen Träger, findet hier eine „molekulare Verpackung“ durch die Aufnahme eines einzelnen Aromastoffmoleküls (Gastmolekül) in den Hohlraum einer Wirtverbindung (z.B. Cyclodextrine) statt. Die Bindung beruht auf nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen den Molekülen.

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die durch enzymatischen Abbau von Stärke hergestellt werden können.³⁹ Je nachdem, wieviele Glucose-Einheiten über α -1,4-Bindungen in der cyclischen Struktur enthalten sind, unterscheidet man α -Cyclodextrin mit 6, β -Cyclodextrin mit 7 und γ -Cyclodextrin mit 8 Bausteinen. Neben diesen kommerziell erhältlichen Molekülen sind auch höhere Homologe bis 13 Glucose-Einheiten bekannt. Die Cyclodextrine haben die Form eines konischen Bechers, dessen Hohlraumdurchmesser 470 - 520 pm beim α -, 600 - 650 pm beim β - und 790 - 850 pm beim γ -Cyclodextrin aufweist. Ihr Innenraum ist durch zwei Reihen von an Kohlenstoff gebundenen H-Atomen sowie durch die glykosidischen O-Brücken bestimmt. Die Hydroxylgruppen befinden sich dagegen außerhalb der Hohlräume, weswegen dieser, verglichen mit den in Lösung gerichteten Bereichen des Moleküls, relativ unpolar ist.

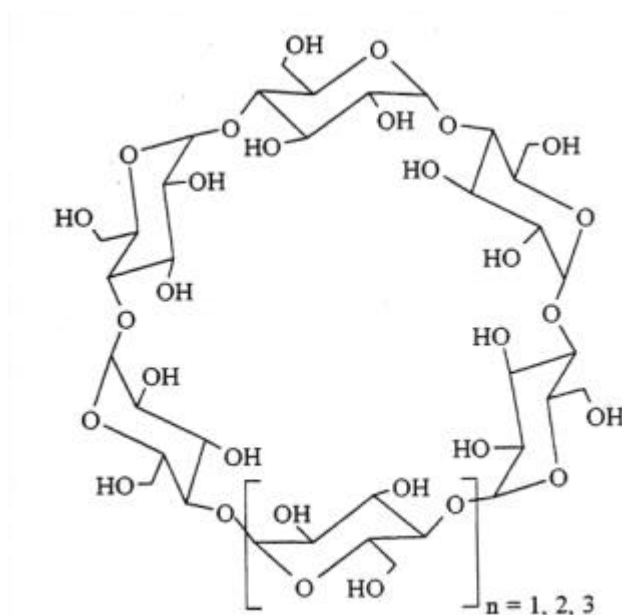


Abb. 4: Molekulare Struktur von α -, β -, γ -Cyclodextrin (für $n=1,2$ und 3)

Unpolare Moleküle können in Abhängigkeit von ihrer geometrischen Ausdehnung in diesen Hohlraum ganz oder nur teilweise eingelagert werden. Sowohl Größe als auch die Polarität des Komplexanden sind für die Stabilität des entstandenen Inklusionskomplexes von Bedeutung.⁴⁰

Für Cyclodextrinkomplexe gibt es zahlreiche industrielle Anwendungen. Eine Vielfalt von Wirkstoffen, nicht nur aus dem Lebensmittel- sondern auch aus dem Pharma- und Pflanzenschutzbereich, können durch die Komplexierung in eine besser wasserlösliche oder leichter dosierbare Form überführt werden. Außerdem ist bei diesen Komplexen auch die Möglichkeit gegeben, die Freisetzung des entsprechenden Wirkstoffes zu kontrollieren.^{41a,b,c}

Das Polysaccharid **Amylose**, welches ebenfalls aus α -1,4-glycosidisch verknüpften D-Glucoseeinheiten aufgebaut ist, stellt eine strukturverwandte Substanz der Cyclodextrine dar, weist aber keine geschlossene sondern lineare Form auf. Amylose kommt neben Amylopektin als Hauptbestandteil in Stärke, dem wichtigsten pflanzlichen Reservestoff, vor. Im Unterschied zur Amylose ist Amylopektin ein verzweigtes Biopolymer, da es zusätzliche Seitenketten besitzt, welche durch 1,6-Verknüpfung α -glycosidisch an die Hauptkette angebunden sind.

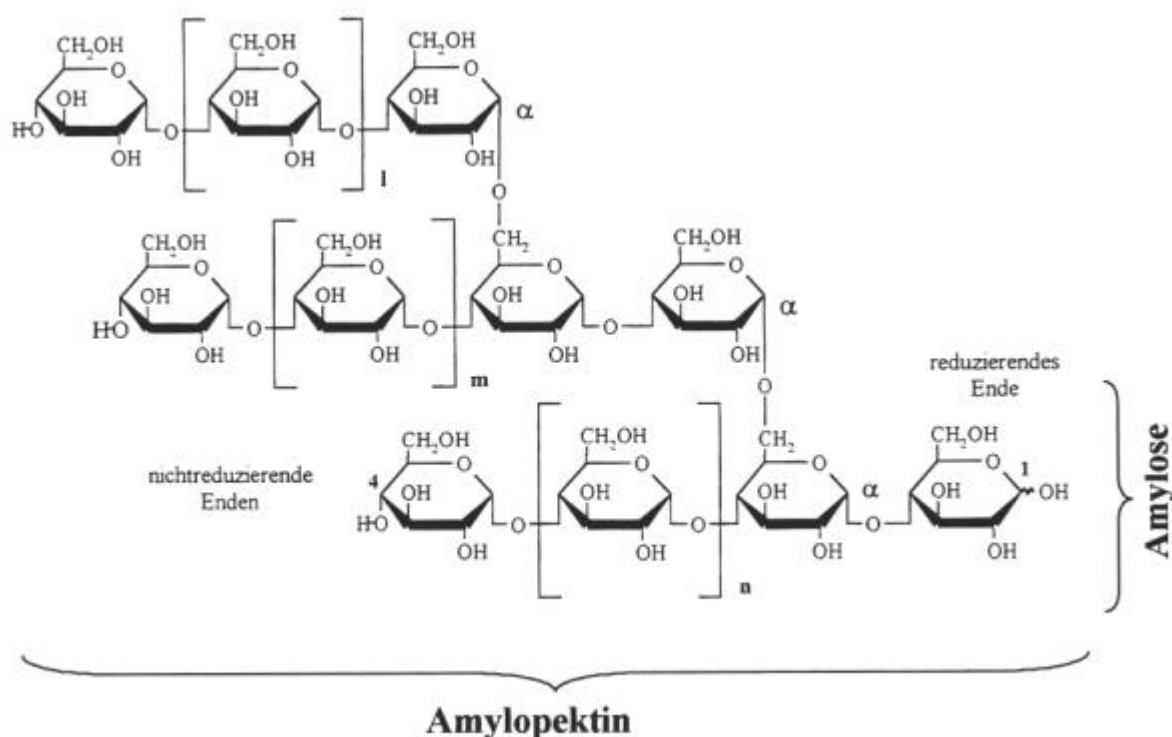


Abb. 5: Struktureller Aufbau der Amylose und des Amylopektins

Je nach pflanzlichem Ursprung der Stärke variieren die Anteile der beiden Biopolymere in unterschiedlichem Maße, wie aus Tab. 4 zu entnehmen ist. Das Amylose/Amylopektin-Verhältnis ist ausschlaggebend für die physikalischen und technologischen Eigenschaften nativer Stärken. Native Stärken enthalten neben den beiden Hauptkomponenten noch geringe Mengen an Lipiden, Proteinen und Mineralstoffen, deren Zusammensetzung sich je nach Herkunft unterscheidet. Dies kann bestimmte Materialeigenschaften der Stärken beeinflussen.

Stärkesorte	Amylosegehalt [%]	Stärkesorte	Amylosegehalt [%]
Wachsmais	<1	Mais	24-27
Reis	14-25	Palerbse	30-35
Kartoffel	20-24	Amylomais	50-85
Weizen	23-28	Markerbse	68-72

Tab. 4: Amylosegehalt verschiedener Stärken ⁴²

Auch physikalisch und chemisch modifizierte Stärken finden Verwendung in der Lebensmittelindustrie, wie Tab. 5 demonstriert. Physikalisch modifizierte Stärken nennt man Quellstärken. Bei den chemisch modifizierten Stärken unterscheidet man zwischen abgebauten und derivatisierten Stärken. Durch chemischen Abbau von Stärke (mittels Säure oder Enzyme) erhält man z.B. Maltodextrine, Dextrine

Stärkeprodukte	Erwünschter Effekt	Verwendung
Quellstärke	Kaltwasserlöslichkeit	Instant-Pudding, Cremes und Soßenpulver
säure-modifiziert	Herabgesetzte Viskosität	Gummibonbons auf Stärkebasis, Soßen
oxidiert	Erniedrigung der Retrogradationsneigung und der Viskosität	Dickungs- u. Bindemittel für Lebensmittel
phosphoryliert	Viskositätserhalt und Hydrolysestabilität beim Erhitzen	Dickungs- u. Bindemittel für saure Speisen u. stark geschlagene Produkte
Stärkeester und -ether	Kältestabilität	Tiefkühlkost

Tab. 5: Modifizierte Stärken und ihr Einsatz in der Lebensmittelindustrie

oder Produkte wie Glucosesirup und Dextrose. Bei derivatisierten Stärken erhält man durch Substitution zusätzliche funktionelle Gruppen wie Ester, Ether und durch Oxidation Carboxyl- und Aldehydgruppen.

Stärke ist in kaltem Wasser unlöslich. Während die Amylose beim Erhitzen auf 90°C kolloidal in Lösung gehen kann, quillt das Amylopektin lediglich auf.

Stellt man Lösungen der beiden Komponenten der Stärke her, so zeigen sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur ein abweichendes Verhalten. Tab. 6 faßt einige wichtige Eigenschaften zusammen.

Eigenschaft	Amylose	Amylopektin
Molekülstruktur	linear	verzweigt
DP* der Einzelketten (in AHG)	100 - 10 000	20-30
DP* des Gesamtmoleküls (in AHG)	100 - 10 000	10 000-100 000
Stabilität der wäßrigen Lösung	retrogradiert	stabil
Farbe mit Iod	dunkelblau	rotviolett
λ_{\max} des Iodkomplexes	≈ 650 nm	≈ 540 nm
Komplexierungsfähigkeit organ. Moleküle	gut	fast keine

*DP = Polymerisationsgrad

Tab. 6: Eigenschaften der Stärkekomponenten

Erste Versuche die Konformation von Amylose in wässriger Lösung aufzuklären, sind schon 1937 unternommen worden,⁴³ und seit dem sind teilweise gegensätzliche Modelle angenommen worden. Die Beobachtung des tiefblauen Amylose-Iod-Komplexes leistete dabei einen großen Beitrag zur Strukturauflklärung. Fest steht, daß die linear gebaute Amylose aufgrund der Vielzahl ihrer Hydroxylgruppen und der Verknüpfung der Glucoseeinheiten nicht jede beliebige Konformation in Lösung annehmen kann.

Heute werden drei Modelle diskutiert: neben der durchgängigen Helix⁴⁴ wird eine unterbrochene Helix,⁴⁵ in der sich ungeordnete und helikale Bereiche abwechseln und eine sogenannte „Random coil“-Konformation mit keinen oder sehr kurzen helikalen Bereichen vorgeschlagen.⁴⁶ (

Abb. 6).

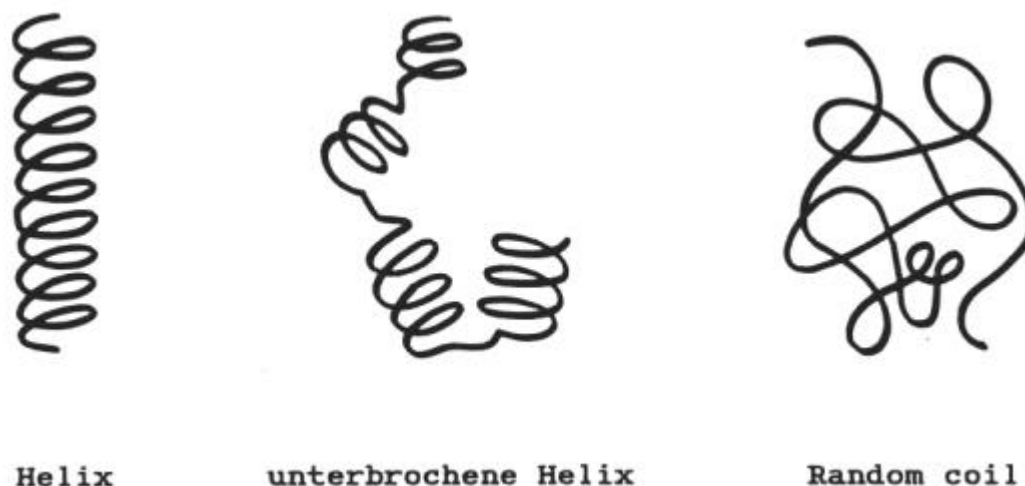


Abb. 6: Modelle zur Konformation von Amylose in Lösung

In Lösungsmitteln wie Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder wässriger KOH liegt die Amylose vollständig als statistisches Knäuel vor.⁴⁷ In neutralem wässrigen Medium dagegen wird das Modell der unterbrochenen Helix angenommen.⁴⁸ Dabei ist nicht die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Windungen⁴⁹ für die Entstehung dieser helikalen Abschnitte ausschlaggebend, sondern vielmehr sterische und energetische Gründe.⁵⁰ Belegt wird dies durch die theoretischen Berechnungen von Rao⁵¹ bezüglich der Energieinhalte der einzelnen Konformationen in Abhängigkeit von den Winkeln der glykosidischen Bindungen. Dabei wird die bevorzugte Bildung einer linksgängigen Helix gegenüber der ebenfalls möglichen rechtsgängigen Helix, wegen ihrer energetisch günstigeren Konformation angenommen. Die helikalen Abschnitte bestehen aus 10-15 Windungen, deren Innendurchmesser aber zu klein ist, um Gastmoleküle aufnehmen zu können. Durch geringe Energiezufuhr können die glykosidischen Bindungen aber so gedreht werden, daß eine Aufweitung der Helix die Komplexierung ermöglicht. Der notwendige Energieaufwand wird durch die darauffolgende Komplexbildung überkompensiert, deren treibende Kraft van-der-Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und die Ausbildung stabilisierender intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen darstellen.^{52, 53}

In Anwesenheit eines Komplexanden kristallisiert die Amylose aus verdünnter Lösung in der sogenannten V-Modifikation. Hierbei liegt eine einfache Helix vor, bei der alle Glucosemoleküle senkrecht zur Helixachse stehen. Da die Hydroxylgruppen der Glucosemoleküle sich allesamt nach außen orientieren, ist

die äußere Oberfläche der Helix hydrophil und zeigt polare Eigenschaften. Das Innere der Helix besitzt aufgrund der dorthin orientierten, an Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatome, wie bei den Cyclodextrinen weitgehend einen unpolaren Charakter. Daher können unpolare Gastmoleküle oder unpolare Teile von dipolaren Molekülen durch van-der-Waals Wechselwirkungen im Helixinneren festgehalten werden. Die dort befindlichen Bindungsstellen sind nicht für jedes eingelagerte Molekül individuell definiert, da sich die Gastmoleküle in einer äquivalenten sterischen und elektronischen Umgebung befinden.⁵⁴

Das bekannteste und am ausführlichsten untersuchte Beispiel für Amyloseeinschlußverbindungen ist der blaue Iodkomplex, dessen intensive Farbe durch die Ausbildung einer Polyiodidkette im inneren Hohlraum der Amylosehelix hervorgerufen wird.^{55,56} Es ist nachgewiesen, daß Amylosekomplexe ebenfalls mit mehreren organischen Molekülen (lineare und verzweigte Alkohole, Ketone, Terpene, Fettsäure und aromatische Verbindungen)^{57, 58, 59} gebildet werden.

Im Unterschied zu den Cyclodextrinen, bei denen der Durchmesser des Torus konstant ist, besitzt die Amylosehelix eine flexible Struktur, die ihr erlaubt ihren Innendurchmesser den Raumansprüchen des dargebotenen Komplexanden anzupassen (Tab. 7). Mittels Röntgenstrukturanalyse und Elektronenbeugung an Einkristallen verschiedener Amylosekomplexen konnten Helices mit 6, 7 und 8 AHG pro Helixwindung analog zu den Cyclodextrinen nachgewiesen werden.^{60,61} Die Ganghöhe aller drei Helixkonformationen beträgt 8 Å.

	Strukturmerkmale geeigneter Gastmoleküle	Komplexand	Helix-durchmesser [Å]	
			außen	innen
Anzahl AHG pro Helixwindung	6 offenkettige aliphatische Moleküle	Jod, Fettsäuren, Decanal, n-Butanol	13,2	9,0
	7 Verzweigte oder cyclische Aliphaten und Aromaten	tert.-Butanol, Limonen, Menthon	14,7	10,5
	8 Größere aromatische und bicycl. Moleküle	1-Naphtol, Anthracen, 8-Cyclohexa-decen-1-on	16,2	12,5

Tab. 7: Helixdurchmesser in Abhängigkeit von der Größe des angebotenen Gastes

Das **Amylopektinmolekül** mit seiner stark verzweigten Struktur ist im Gegensatz zur Amylose kaum zur Komplexierung organischer Moleküle geeignet. Zur Beschreibung seiner Struktur sind verschiedene Modelle entwickelt worden. Mit einem nach D. French⁶² vorgeschlagenen Clustermodell ist man in der Lage die gemessene Kettenverteilung von enzymatisch gespaltenem Amylopektin, seine Kristallinität sowie die hohe Viskosität von Amylopektinlösungen zu begründen. Das Amylopektin setzt sich dabei aus kompakten Clustern zusammen, in denen die Ketten nahezu parallel ausgerichtet sind. Diese Cluster sind durch lange Ketten miteinander verbunden.

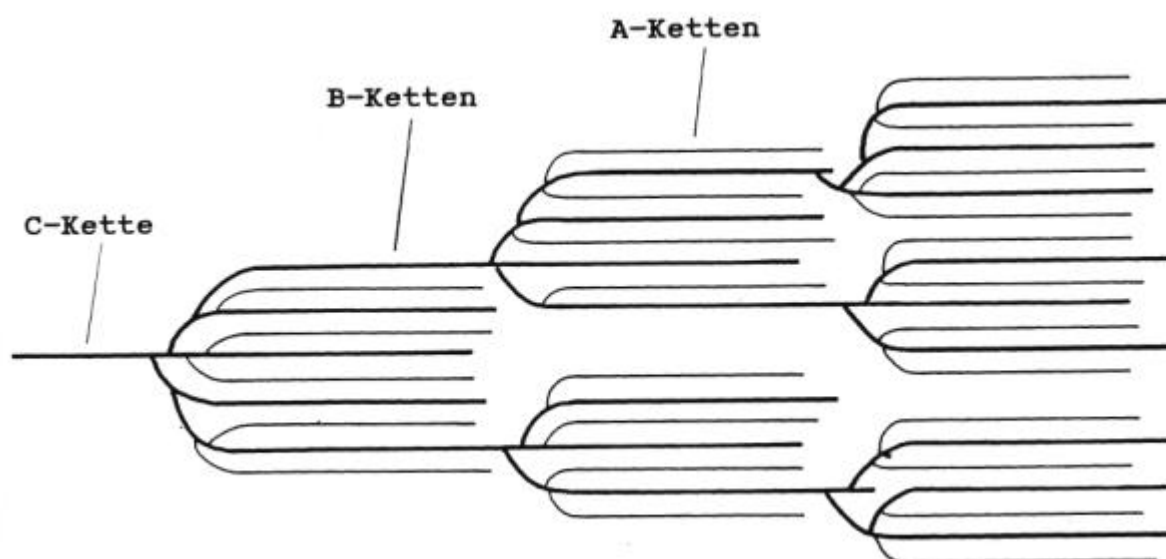


Abb. 7: Clustermodell des Amylopektins nach French

Die äußeren A-Ketten tragen im Gegensatz zu den B-Ketten keine Verzweigungsstellen und können in Abhängigkeit ihrer Länge nur bis zu 4 Helixwindungen (mit 15-25 AHG) ausbilden. Damit sind sie nur bis zu einem gewissen Grad zur Komplexbildung fähig. Die resultierenden Amylopektinkomplexe sind recht instabil. Eine Ausnahme ist der Natriumlaurylsulfat-Komplex.⁶³ Ein weiterer Beleg für die Ausbildung kurzketziger helikaler Bereiche im Amylopektin liefert die rotbräunliche Farbe des Iod-Amylopektin-Komplexes. Während infolge der Dipoleffekte und der Resonanz entlang der Helix zur

Blaufärbung des Amylose-Iod-Komplexes 7 bis 11 Iodatome benötigt werden, lagern sich im Amylopektin weitaus weniger Iodatome ein.

Die unterschiedlichen Komplexbildungseigenschaften der Amylose und des Amylopektins können zur Isolierung der Amylose aus nativer Stärke eingesetzt werden. Wegen der verzweigten Struktur des Amylopektins ist nur die Amylose zur Bildung von schwerlöslichen Komplexen mit einer Reihe von Komplexbildnern fähig, sodaß eine Fraktionierung von Stärke möglich ist. Das Amylopektin bleibt weitgehend in Lösung, und die Amylose kann nach Zentrifugation des Niederschlages und anschließender Extraktion des Komplexanden in reiner Form erhalten werden.⁶⁴

Durch die Fähigkeit von Amylose zur Komplexierung organischer Moleküle eröffnet sich die Möglichkeit, Amylose als molekulares Packmaterial für Aromastoffe einzusetzen. Da Aromastoffe im allgemeinen unterschiedliche Struktur und Funktionalität besitzen können, ist ein universeller Wirt von großem Vorteil. Die Amylose kann sich durch ihre im Durchmesser variable Helix vielen Gastmoleküle anpassen, sodaß es möglich sein sollte auch Aromastoffgemische zu komplexieren. Während sterisch anspruchsvolle Moleküle nur teilweise bei den Cyclodextrinen eingelagert werden, findet ein vollständiger Einschluß in die Amylosehelix statt, so daß auch eine vollkommene Stabilisierung erreicht werden kann.

Wegen der toxikologischen Unbedenklichkeit der Amylose darf sie im Gegensatz zu den Cyclodextrinen, die -zumindest in Deutschland- noch nicht zugelassen sind, eingesetzt werden. Außerdem ist sie unbegrenzt aus nachwachsenden, pflanzlichen Rohstoffen mit geringem Kostenaufwand verfügbar.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, eine kontrollierte Freisetzung der inkludierten Moleküle zu erzielen, so daß über eine längere Zeit das Aroma sich entfalten kann.

2 Theoretischer Teil

2.1 Aufgabenstellung

In den letzten Jahren ist der Bedarf an Lebensmitteln, die dem Verwender möglichst schnell in verarbeitungs- und verzehrfertigem Zustand zur Verfügung stehen (Convenience-Produkte), enorm gestiegen. Meist handelt es sich um Trockenprodukte, die infolge des industriellen Herstellungsprozesses Aromaverluste erleiden. Um solche Produkte (wie z.B. tischfertige Saucen/Suppen) sensorisch aufzuwerten, werden ihnen Aromen zugesetzt.

Häufig werden zur Simulation eines Aromaprofils mehrere Aromastoffe in bestimmten Konzentrationen als Gemisch zugesetzt. Diese Mischungen sind oft instabil, da sie einem oxidativen, thermischen Zerfall und anderen chemischen Veränderungen unterliegen. Um dies zu verhindern, sind in der Lebensmitteltechnologie bisher eine Reihe von Verkapselungsverfahren,^{27,28,29} bei denen zum Beispiel Zuckermoleküle als Trägermatrix eingesetzt werden, entwickelt worden. Die Rückhalteeffekte sind hauptsächlich auf Adsorptionserscheinungen, die durch einen mikroskopischen Einschluß hervorgerufen werden, zurückzuführen. Hierbei kann häufig ein Oxidationsschutz mit zufriedenstellendem Grad erreicht werden. Geschieht allerdings die Verkapselung der aromawirksamen Moleküle in Stärke oder verschiedenen Stärkefraktionen wie Amylose auf molekularer Ebene („molekulare Verkapselung“) resultiert eine besonders effektive Stabilisierung der Aromastoffkomponenten.

Man stellt sich dabei vor, daß durch den individuellen Einschluß jedes einzelnen Aromastoffmoleküls in den helikalen Hohlraum der Amylose ein vollkommener Schutz vor Oxidation, Verflüchtigung und anderen chemischen Veränderungen gewährleistet werden kann. Man spricht in diesem Falle von Inklusions- oder Einlagerungskomplexen. Osman-Ismael und Solms haben gezeigt, daß einige flüchtige Verbindungen wie höhere lineare Alkohole vom Hexanol bis Decanol, verschiedene Terpene wie Limonen, Menthon und der lineare Aldehyd Decanal zur Bildung von Inklusionskomplexen mit Stärkesorten und in Amylose befähigt sind.⁶⁵

Gegenstand dieser Arbeit ist es zu prüfen, inwieweit die Bildung von Inklusionskomplexen sich eignet, um in der Aromatisierung von Lebensmitteln eingesetzt zu werden.

Da Aromastoffe aus unterschiedlichen Verbindungsklassen stammen können, werden in der vorliegenden Arbeit modellhaft vier unterschiedliche Aromastoffe aus drei verschiedenen Substanzklassen ausgewählt:

- Hexanal und E-2-Nonenal (zwei strukturell ähnliche Moleküle mit gleicher funktioneller Gruppe),
- sowie 1-Octen-3-ol (ein linearer Alkohol)
- und Guajacol (ein sterisch anspruchsvolleres Molekül mit aromatischem Charakter).

Die flüssigen Aromaverbindungen sollen in eine möglichst einfach handzuhabende stabilisierte Form gebracht werden, die eine geeignete Dosierung ermöglicht. Das in der Diplomarbeit⁶⁶ ausgearbeitete Syntheseverfahren von schwerlöslichen Amylosekomplexen mit einzelnen Aromakomponenten kann hierbei zugrundegelegt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, in welchem Ausmaß Amylose als flexibles Wirtsmolekül in der Lage ist, mit den aufgeführten flüchtigen Verbindungen nicht nur als Einzelkomponenten (Bildung von Mono-Komplexen) sondern vor allem im Gemisch (Bildung von gemischten Komplexen) Inklusionskomplexe zu bilden. Bei der Mischkomplexierung interessiert vor allem inwieweit das zugegebene Mengenverhältnis der Gäste sich in den Amylosekomplexen wiederfindet. Dabei soll geklärt werden, ob bei gleichzeitiger Zugabe möglicherweise eine gegenseitige Beeinflussung der Gastmoleküle während der Einlagerung stattfindet.

Durch Variation der Gastzugabe bzw. der Mengenverhältnisse der Gäste soll ermittelt werden, unter welchen Bedingungen eine optimale Einlagerungsrate erzielt werden kann. Zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie dient die ¹H-NMR-Spektroskopie (geeignet für die Mono-Komplexe) und die Gaschromatographie (bei den Mischkomplexen). Über die Kenntnis der Komplexzusammensetzung lassen sich Aussagen darüber machen, in welchem Ausmaß der Innenraum der Amylosehelix von den Gastmolekülen ausgefüllt wird.

Außerdem soll untersucht werden, ob in Abhängigkeit von der Dauer der während der Synthese durchgeführten Gefriertrocknung, die erhaltenen Komplexstöchiometrien sowohl für Mono- wie auch Mischkomplexe sich verändern.

Anhand von längerfristigen Lagerstudien soll der Grad der Stabilisierung der gebildeten Inklusionskomplexe belegt werden.

Bei der Bewertung der Nahrung durch den Konsumenten spielt die zeitliche Entfaltung des Aromas eine große Rolle. Daher ist man in der Lebensmitteltechnologie besonders an einer kontrollierten Freisetzung interessiert.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich daher mit dem Freisetzungsverhalten der eingelagerten Aromastoffe aus den Komplexen. Bedingungen, die eine Rolle spielen können, sind Zeit, Temperatur, Wasseraktivität und Gastgehalt.

Zunächst soll für die quantitative Ermittlung der Freisetzung der flüchtigen Verbindungen ein gaschromatographisches Verfahren entwickelt werden, mit dessen Hilfe der Kopfraum über einer Probe analysiert werden kann (Headspace-GC). Wichtig ist es hierbei, möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Da aus früheren Untersuchungen⁶⁶ bekannt ist, daß das Injizieren einer gasförmigen Probe in den Gaschromatographen zu Peakverbreiterungen führt, soll eine Kryofokussierung am Säulenanfang verwendet werden. Dieses verspricht schmalere und damit quantifizierbare Peaks in den Chromatogrammen.

Unter analogen Bedingungen (Zeit, Temperatur, Wasseraktivität, Gastgehalt) wird das Freisetzungsverhalten der unterschiedlichen Aromastoffe, die einerseits als Einzelkomponente und andererseits im Gemisch in die Amylosehelix eingelagert sind, verglichen.

Der Rückhalteeffekt der flüchtigen Verbindungen, die in die Helix eingelagert sind, kann nicht nur mit der Struktur des Gast- sondern auch mit der Struktur des Wirtsmoleküls variieren. Daher soll das Entweichen eines Aromastoffes aus einem Amylose- und einem Stärkekomplex gaschromatographisch analysiert werden.

Anschließend soll untersucht werden, wie sich adsorbierte im Gegensatz zu den eingelagerten Aromastoffmolekülen bezüglich ihrer Freisetzung verhalten.

Die Zielsetzung des dritten Teils besteht darin, die Assoziationskonstanten der vier Aromastoff-Amylosekomplexe zu ermitteln, um Aussagen über die Art der Wechselwirkung zwischen den eingesetzten Aromaverbindungen und der Amylose treffen zu können. Hierfür können Headspace-gaschromatographische Messungen herangezogen werden. Voraussetzung hierfür ist die Kopplung des in der Lösung bestehenden Komplexierungsgleichgewichtes mit dem Verteilungsgleichgewicht des flüchtigen Gastes zu einem überstehenden Gasraum.

Von weiterem Interesse ist der Einfluß der Amylosesorte auf das Komplexierungsgleichgewicht, weswegen unter Verwendung des gleichen Gastmoleküls und bei Variation der Amylosequelle unterschiedliche Komplexe synthetisiert und deren Assoziationskonstanten ebenfalls bestimmt werden sollen.

2.2 Bildung von Amylosekomplexen mit Aromastoffen als Einzelkomponenten und im Mehrstoffgemisch

In zahlreichen Veröffentlichungen^{67,68,69} wurde gezeigt, daß Stärke ein geeignetes Trägermaterial darstellt, um flüchtige Aromastoffe zu binden. Dies ist einerseits auf den mikroskopischen Einschluß der Aromastoffe, und andererseits auf die Bildung von Einlagerungsverbindungen mit einigen Aromastoffen zurückzuführen. Dabei erweist sich, daß die Komplexbildung den effektivsten Schutz vor Aromaverlusten bietet, da hierbei die Aromastoffmoleküle im Inneren eines Wirtsmoleküls eingelagert werden. Somit kann ein vollkommener Schutz vor Oxidation, Verflüchtigung und anderen chemischen Veränderungen gewährleistet werden.⁶⁵

Die Fähigkeit zur Komplexbildung der Stärke ist speziell auf die Amylose als unverzweigte Fraktion der Stärke zurückzuführen. In Anwesenheit von Gastmolekülen in einer wässrigen Amyloselösung kann eine helikale Orientierung der Amylosekette über van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen dem eingeschlossenen Gastmolekül und dem unpolaren Inneren der Amylose stabilisiert werden. Oft sind diese supramolekularen Verbindungen schwerlöslich und können aus der Lösung abgetrennt werden.

Da Aromastoffe aus verschiedenen Verbindungsklassen stammen können, sollten als Modellsubstanzen Moleküle unterschiedlicher Größe und Funktionalität ausgewählt werden, um deren Komplexierungsfähigkeit als einzelne Aromastoffkomponente und im Gemisch von zwei oder mehreren Aromastoffen zu untersuchen.

Schon in der Diplomarbeit⁶⁶ wurde die Bildung von Amylosekomplexen verschiedener flüchtiger Aldehyde genauer untersucht, so daß hier als Komplexanden das kürzerkettige und leichtflüchtige Hexanal, sowie das längerkettige, ungesättigte und schwererflüchtige E-2-Nonenal sich für die ersten Untersuchungen anboten. Beide Aldehyde sind in der Lage aufgrund ihrer linearen Struktur eine 6er-Helix zu induzieren.

Im Folgenden sollte ein lineares Aromastoffmolekül mit anderer Funktionalität herangezogen werden. Dabei wurde der längerkettige und ungesättigte Alkohol 1-Octen-3-ol ausgewählt, der wie das E-2-Nonenal eine Helix mit sechs Anhydroglucoseeinheiten bilden sollte.

Dagegen führt der Einsatz sterisch anspruchsvollerer Moleküle z.B. solche mit aromatischem Charakter wie t-Butylphenol zur Ausbildung einer 7er-Helix.⁷⁰ Als

Modellsubstanz der aromatischen Substanzklasse wurde des weiteren der Aromastoff Guajacol eingesetzt und auf dessen Komplexfähigkeit hin getestet.

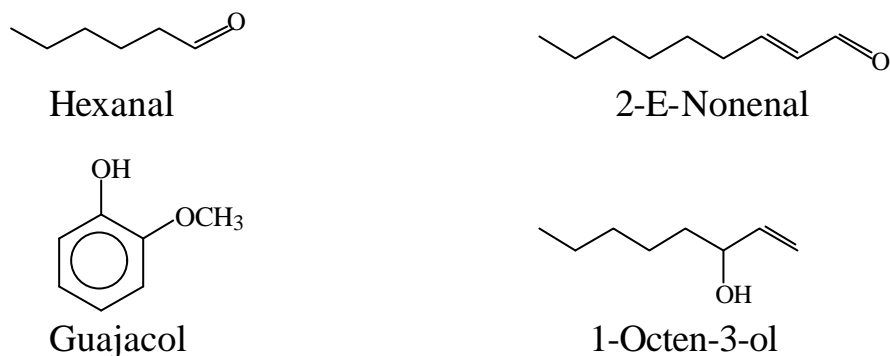


Abb. 8: Ausgewählte Aromastoffe

Zum Verfahren der Komplexsynthese:

Um hohe Komplexausbeuten bezogen auf die eingesetzte Amylose zu erzielen, wird in den folgenden Reihenuntersuchungen entfettete und fraktionierte Amylose eingesetzt. Dabei stellt die Fraktionierung der Amylose aus der High-Amylose-Maisstärke mit einem 70%-igen Amylose-Anteil eine ergiebige und wirtschaftlich vorteilhafte Amylosequelle dar. Nach Extraktion der Lipide mittels eines Propanol-Wasser-Gemisches aus dieser Maisstärke,⁷¹ die sonst einen Teil des Innenraums der Helix besetzen würden, kann durch Ausfällen mit Cyclohexanon die Maisamylose isoliert werden.

Zur Darstellung der Amylosekomplexe muß die Amylose in verdünnter homogener Lösung vorliegen, so daß sich helikale Bereiche ausbilden können. Zum Überführen der Amylose in eine wässrige Lösung wird ein in der Industrie gängiges Verfahren, bei dem die Amylose unter Druck gelöst wird, genutzt. Im Autoklaven wird dabei eine max. 4%-ige wäßrige Amyloselösung bei Temperaturen bis zu 140°C schonend aufgeschlossen. Nach anschließendem Verdünnen mit heißem Wasser auf eine 1%-ige Lösung können nun unter starkem Rühren bei 80°C die Aromastoffe zugesetzt werden. Beim langsamen Abkühlen der Reaktionslösung im Heizpilz fällt der gebildete schwerlösliche Inklusionskomplex aus. Dieser kann abzentrifugiert und gefriergetrocknet werden.

Zur Bestimmung des Gehaltes an inkludierten Aromastoffen

Die auf obige Weise hergestellten pulvrigen Aromastoff-Komplexe enthalten nach der Gefriertrocknung noch adsorbierte Anteile an Gastmolekülen, die durch zweimaliges zweistündiges Waschen mit wasserfreiem Dichlormethan vollständig entfernt werden können. Dichlormethan kann als polares Lösungsmittel nicht in das Helixinnere der Amylose eindringen, womit die Herauslösung von inkludierten Gastmolekülen weitgehend unterbleibt, allerdings können hierbei sämtliche an der Oberfläche adsorbierte Aromastoffmoleküle gelöst werden.

Zwei Methoden bieten sich für die Analyse der Komplexstöchiometrie an: $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und Gaschromatographie.

Die weniger zeit- sowie arbeitsaufwendige Methode stellt die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie dar, die bereits in der Diplomarbeit getestet wurde. Mit ihrer Hilfe läßt sich nach Auflösen der Komplexe in einem $\text{d}_6\text{-DMSO} : \text{DCI}$ -Gemisch (15:1) bei 60°C aus den resultierenden Integralen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die Stöchiometrie von Komplexen mit einer Aromastoffkomponente zuverlässig berechnen.⁷² Diese Analysenmethode läßt sich auf die ausgesuchten Aromastoffe unter der Voraussetzung anwenden, dass sich die betrachteten Signale der Wirt- und Gastprotonen nicht überlappen.

Die NMR-spektroskopische Gehaltsbestimmung mehrerer gleichzeitig inkludierter Aromastoffe ist nicht anwendbar, wenn sich die für die Berechnung zu berücksichtigenden Protonensignale der Gäste im Spektrum überlappen. Daher stellt besonders für Mischkomplexe die zeitaufwendigere, gaschromatographische Analyse der Aromastoffe nach deren Extraktion aus dem Komplex eine geeignete Alternative zur quantitativen Erfassung der Gastgehalte dar. In der Literatur erfolgt die Extraktion von Aromakomponenten mit n-Pentan im Kutscher-Streudel-Extraktor unter Zugabe von α -Amylase zum Abbau der Stärke.⁷³ Eine andere Variante die in unserem Arbeitskreis angewendet wurde, stellt die Extraktion von Lipiden aus der Amylosehelix mittels heißem absolutem Methanol dar. Diese Methode wurde auch zur Charakterisierung der Aromastoff-Komplexe getestet.

Hierbei wird zu einer definierten Menge an Aromastoff-Amylosekomplex [m_{Komplex}] der exakt eingewogene interne Standard Octansäureethylester [$m_{\text{int.Stand.}}$] zugesetzt und mit Methanol bei 100°C unter zehnminütigem Rühren die Aromastoffe extrahiert. Nach Abkühlen der Suspension und Zentrifugation wird die überstehende methanolische Phase direkt auf die Kapillarsäule aufgegeben und aus den resultierenden prozentualen Flächenintegralen $\%_{\text{Aromast.}}$ und $\%_{\text{int.Stand.}}$ der Aromastoffgehalt in mg Aromastoff pro g Komplex gemäß Gleichung (1) berechnet:⁷⁴

$$(1) \quad m_{\text{Aromast.}} = f_M \cdot \frac{m_{\text{int.Stand. (mg)}} \cdot \% \text{ Aromast.}}{\% \text{ int.Stand.} \cdot m_{\text{Komplex (g)}}} \quad \text{mit } f_M = \text{Methodenfaktor}$$

% = Prozentuale Peakfläche

In obiger Formel ist der Methodenfaktor f_M enthalten, der eine stoffspezifische Konstante darstellt, die im Falle der Benutzung des massenabhängigen FID-Detektors die Abhängigkeit zwischen Komponentenmenge und Peakfläche einer jeden Verbindung berücksichtigt. Zu seiner Bestimmung müssen zunächst verschiedene Kalibrierlösungen für jede Aromakomponente einzeln erstellt werden. Hierfür werden methanolische Mischungen von Aromastoff und internem Standard angesetzt und gaschromatographisch analysiert. Mit Hilfe der Formel (2) kann dann der Methodenfaktor für jede einzelne Aromastoffkomponente gesondert ermittelt werden:

$$(2) \quad f_M = \frac{m_{\text{Aromast.}} \cdot \% \text{ int.Stand.}}{m_{\text{int.Stand.}} \cdot \% \text{ Aromast.}} \quad \text{mit } m = \text{Einwaage in mg}$$

Der Vergleich der Gastgehalte der Amylose-Komplexe mit einzeln komplexierten Aromastoffen, die mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden, stimmt mit denen, die gaschromatographisch ausgewertet werden, gut überein. Der Einheitlichkeit halber wird die Komplexstöchiometrie aller Mischkomplexe gaschromatographisch analysiert, während die Monokomplexe NMR-spektroskopisch charakterisiert werden.

Ergebnisse der Darstellung und Charakterisierung verschiedener Aromastoff-Amylosekomplexe:

I. Hexanal-E-2-Nonenal-Amylosekomplexe:

Nach zahlreichen Optimierungsversuchen, die im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt wurden, zeigte sich, daß durch Zugabe eines hohen Überschusses an Aldehyd (Hexanal bzw. E-2-Nonenal) Komplexstöchiometrien von ca. 5% bis maximal 7% in der Maisamylosehelix erreicht werden. Gastgehalte um die 7% in Amylosekomplexen gewährleisten eine durchgängige Einlagerung der Gastmoleküle in das Helixinnere.

Beim kürzerkettigen Hexanal führt ein 10-facher Überschuß (ausgehend von einer vollgefüllten Amylosehelix) zu einem Einschluß von ca. 5%, während beim längerkettigen E-2-Nonenal schon ein 6-facher Überschuß Gastgehalte um 7% liefert. Die molare Einschlußrate der Gäste liegt dabei in der gleichen Größenordnung, da das Nonenalmolekül eine 1,4 mal höhere Molmasse als das Hexanal-Molekül besitzt.

Von Bedeutung ist bei Zusatz von zwei Aromastoffen als Gemisch zur Bildung vom „Bi-Komplexen“, wie sie im Weiteren genannt werden, neben der Frage, ob beide Komponenten eingebaut werden, auch das Verhältnis ihrer Komplexierung. Hierbei soll untersucht werden, wie sich die Zugabe beider Komponenten in unterschiedlichem Verhältnis auf die Gastgehalte im Komplex auswirkt.

Als erstes erfolgt der Zusatz im Rahmen von geringen Überschüssen d.h. in der Größenordnung von ca. 2 mmol pro g Amylose. Dies ist bei der Aromatisierung von Lebensmitteln einerseits aus wirtschaftlichen Aspekten von besonderem Interesse, wenn man auf weniger konzentrierte Aromastoffmischungen zurückgreifen muß. Andererseits sollte hierdurch ein bevorzugter Einbau einer Aromastoffkomponente in die Helix vermieden werden.

Abschließend soll getestet werden, wie sich das Komplexierungsverhalten der beiden Aromastoffe bei Zusatz eines enormen Überschusses von nur einer Komponente verändert.

In Tab. 8 sind die unterschiedlichen Synthesen der Mono- sowie Bi-Komplexe von Hexanal und E-2-Nonenal in Abhängigkeit von den zugegebenen Gastmengen und den Molverhältnissen der Gäste zusammengefaßt. Die aufgelistete Zugabe der Gäste bezieht sich übersichtshalber auf 1g Amylose (abgekürzt als g A).

No	Zugegebener Gast [Molverhältnis]		Komplex- ausbeute	Gastgehalt im Komplex [Molverhältnis]	
	Hexanal	(E)-2-Nonenal		Hexanal	(E)-2-Nonenal
1	5,0 mmol/g A	----	75 %	5,5 %	----
2	----	5,0 mmol/g A	80 %	----	6,8 %
3	1,5 mmol/g A	-----	75 %	1,1 %	-----
4	----	1,5 mmol/g A	80 %	----	1,22 %
5	1,5 mmol/g A <i>1 :</i>	1,5 mmol/g A <i>1</i>	76%	0,82 % <i>1 :</i>	2,08 % <i>1,8</i>
6	0,5 mmol/g A <i>1 :</i>	1,5 mmol/g A <i>3</i>	79 %	0,32 % <i>1 :</i>	2,64 % <i>5,9</i>
7	1,5 mmol/g A <i>3 :</i>	0,5 mmol/g A <i>1</i>	80 %	0,76 % <i>1:</i>	1,27 % <i>1,2</i>
8	1,0 mmol/g A <i>1:</i>	1,0 mmol/g A <i>1</i>	80 %	0,37 % <i>1:</i>	1,04 % <i>2,0</i>
10	5,0 mmol/g A <i>10:</i>	0,5 mmol/g A <i>1</i>	82 %	2,7 % <i>6,3:</i>	0,6 % <i>1</i>
11	5,0 mmol/g A <i>5:</i>	1,0 mmol/g A <i>1</i>	83 %	2,6 % <i>4:</i>	0,9 % <i>1</i>
12	5,0 mmol/g A <i>10:</i>	1,5 mmol/g A <i>3</i>	80 %	2,2 % <i>2,8:</i>	1,1 % <i>1</i>
13	5,0 mmol/g A <i>1:</i>	5,0 mmol/g A <i>1</i>	85 %	2,0 % <i>1:</i>	2,9 % <i>1</i>

Tab. 8: Darstellung von Aromastoff-Amylosekomplexen mit Hexanal und E-2-Nonenal

Allgemein läßt sich die Komplexstöchiometrie sowohl bei Mono- als auch bei Bi-Komplexen je nach zugegebener Gastmenge variieren.

Die Komplexausbeuten, bezogen auf die eingesetzte Ausgangsmenge an Amylose, belaufen sich dabei um die 75% bis 85%. Dies läßt sich über einen partiellen Abbau der Amylose während des Autoklavierens erklären, der verhindert, daß sämtliche Amylose als schwerlöslicher Komplex ausfällt.

Erwartungsgemäß sinkt mit abnehmender Gastzugabe die Komplexstöchiometrie eines Mono-Komplexes. Durch Zugabe eines enormen Überschusses an Hexanal von 5,0 mmol/g Amylose können hohe Gastgehalte von 5,5% erzielt, während ein wesentlich geringerer Überschuß von 1,5 mmol/g Amylose zu einem Hexanal-Gehalt von 1,1% führt (Nr. 1/3). Eine ähnliche Abnahme des Einschlusses von 6,8% auf 1,22% beobachtet man beim analogen Zusatz vom längerkettigen E-2-Nonenal (wie Nr. 2/4 zeigt). Gibt man nun je 1,5 mmol/g Amylose von beiden Aldehyden in Form eines Gemisches hinzu, so könnte man durchaus erwarten, daß beide Gäste in gleichem Maße wie in den Mono-Komplexen nebeneinander inkludiert werden, so daß der Gesamtgehalt der Aldehyde sich auf 2,5 % beläuft. Es zeigt sich aber, daß er mit 2,9 % etwas höher liegt als im Mono-Komplex. Außerdem lagert sich doppelt soviel E-2-Nonenal im Vergleich zu Hexanal in den Hohlraum der Amylosehelix ein (Nr. 5). Damit zeichnet sich ein bevorzugter Einschluss des längerkettigen Nonenals ab. Bestätigt wird dies durch den Vergleich der Molverhältnisse der Ansätze Nr. 6 bis 8. Reduziert man z.B. die Hexanalzugabe auf ein Drittel (Nr. 6), so werden die Nonenalmoleküle 6-fach höher komplexiert und der Nonenalgehalt dieses Bi-Komplexes steigt auf 2,7 %, während der Mono-Komplex nur 1,22 % enthielt. Dagegen resultiert bei einem umgekehrtem zugegebenem Hexanal-Nonenal-Verhältnis von 3:1 ein annähernd gleichmäßiger Einschluß und ein Gesamteinschluß von 2 %.

E-2-Nonenal bildet aufgrund seiner längeren C-Kette stabilere Amylosekomplexe als Hexanal. Ein Hinweis hierfür gibt schon die Temperatur an, bei der die Komplexe aus der Lösung ausfallen. Im Falle von Nonenal setzt die Niederschlagsbildung schon unterhalb von 38°C ein, während der Hexanal-Komplex erst unterhalb von 30°C auszufallen beginnt. Die Zunahme der Komplexstabilität mit wachsender Kettenlänge des Gastes beobachtet man z.B. auch bei Fettsäuren.⁷² Eine Bestimmung der Assoziationskonstante der beiden Komplexe würde zusätzlich eine quantitative Aussage über die Komplexstabilität zulassen. In Kapitel 2.4 dieser Arbeit wird ein Verfahren beschrieben, mit dessen Hilfe die Assoziationskonstanten der Amylosekomplexe ermittelt werden können. Dort zeigt sich ganz deutlich, daß Hexanal-Amylosekomplexe eine

Assoziationskonstante in der Größenordnung von 40 l/mol besitzen, während E-2-Nonenal-Komplexe eine Assoziationskonstante von 240 l/mol aufweisen.

Treten nun beide Aldehyde bei der Komplexbildung in einer Mischung auf, so konkurrieren sie offenbar um die Bindungsstellen im Inneren der Amylosehelix. Das Nonenal mit der höheren Assoziationskonstante wird in Vergleich zum Hexanal bevorzugt eingelagert. Außerdem tritt bei einer mittleren Überschußzugabe beider Gäste ein synergistischer Effekt auf, denn die Anwesenheit von Hexanal führt zu einer höheren Einlagerungsrate von Nonenal als im Falle seiner Einzelkomplexbildung.

Bei der Bildung von Mischkomplexen stellt sich natürlich die Frage, ob innerhalb eines Helixstranges gleichzeitig beide Gastmoleküle vertreten sind, oder ob der Hohlraum der Helices immer nur von dem gleichen Gastmolekül okkupiert wird. Der auftretende synergistische Effekt bei der Mischkomplexbildung läßt auf eine gegenseitige Beeinflussung der Gastmoleküle während des Komplexbildungsvorganges schließen, womit die gleichzeitige Inklusion verschiedener Aromastoffmoleküle belegt wird. Für den Beweis der Art der Verteilung unterschiedlicher Gastmoleküle innerhalb des Helixhohlraumes können CD-spektroskopische Messungen herangezogen werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird auf diese Versuche näher eingegangen.

Als nächstes wird das Komplexbildungsverhalten der Aldehyde unter einer extrem hohen Zugabe von 5,0 mmol Hexanal pro g Amylose untersucht. Hierbei zeigt sich in Anwesenheit von geringen Mengen an Nonenal eine halbierte Hexanaleinschlussrate von ca. 2,7% verglichen mit dem entsprechenden Mono-Komplex (Nr. 10/11 und Nr. 1), was den antagonistischen Einfluß des längerkettigen E-2-Nonenals während des Mischkomplexbildungsvorganges verdeutlicht. Außerdem nähert sich das Nonenal-Hexanal-Molverhältnis in den Bi-Komplexen mit zunehmend angebotener Nonenalkonzentration dem ursprünglichen Molverhältnis (Vergleich mit Nr. 10/11/12). Bei einer 10-fach größeren Hexanalmenge ist dieser Aldehyd nur 6 mal höher in Bi-Komplex vertreten als Nonenal, während eine 5-fach größere Hexanalzugabe zu einer 4-fach höheren Verteilung des Hexanals im Bi-Komplex führt.

Werden extreme Überschüsse an beiden Aldehyden zugesetzt (siehe Nr. 13) liegt der Gesamtgastgehalt unter der quantitativen Zusammensetzung der Mono-Komplexe (Vergleich von Nr.1/2 und Nr. 13), und das Nonenal-Hexanal Molverhältnis von 1:1 bleibt bestehen.

Die verschiedenen Ansätze zur Mischkomplexierung von Hexanal und Nonenal zeigen, daß keine zuverlässigen Vorhersagen über die quantitative Zusammensetzung der Bi-Komplexe gemacht werden können. Dies ist zum einen auf die unterschiedliche Komplexierungsfähigkeit der Gäste zurückzuführen, die zu einer Anreicherung der Aromastoffkomponente mit höherer Komplexbildungskonstante (in diesem Falle Nonenal) führen kann; zum anderen auf die gegenseitige Beeinflussung der Gastkomponenten während des Inkludierungsvorganges. Ausmaß und Richtung der Beeinflussung hängt sowohl vom Konzentrationsbereich als auch vom Molverhältnis der zugesetzten Gäste ab. In Bereichen geringfügiger Überschußzugaben können im Falle von Hexanal und Nonenal synergistische Effekte beobachtet werden, in Bereichen extremer Überschüsse treten dagegen kompetitive Effekte in den Vordergrund.

II. Hexanal-1-Octen-3-ol-Amylosekomplexe:

Im folgenden soll das Einzel- sowie Mischkomplexierungsverhalten von 1-Octen-3-ol in Abhängigkeit von den zugesetzten Mengen untersucht werden. Tab. 9 zeigt

No	Zugegebener Gast [Molverhältnis]		Komplex- ausbeute	Gastgehalt im Komplex [Molverhältnis]	
	Hexanal	1-Octen-3-ol		Hexanal	1-Octen-3-ol
14	-----	5,0mmol/g A	73%	-----	6,3%
15	2,0 mmol/g A	-----	75%	1,2 %	-----
16	-----	2,0 mmol/g A	75 %	-----	2,8 %
17	2,0 mmol/g A <i>1 :</i>	2,0 mmol/g A <i>1</i>	68%	1,4 % <i>1 :</i>	2,9 % <i>1,6</i>
18	1,5 mmol/g A <i>3 :</i>	0,5 mmol/g A <i>1</i>	68%	2,2 % <i>1 :</i>	2,9 % <i>1,0</i>
19	0,5 mmol/g A <i>1 :</i>	1,5 mmol/g A <i>3</i>	73%	0,6 % <i>1 :</i>	4,9 % <i>6,4</i>

Tab. 9: Darstellung von Aromastoff-Amylosekomplexen mit Hexanal und 1-Octen-3-ol:

die Ergebnisse der Synthese der Mono- und Bi-Komplexe. Der Vergleich der Proben 14 und 16 bestätigt, daß eine hohe Alkohol-Zugabe von 5,0 mmol pro g Amylose eine maximale Einlagerung von 6,3% dieses langkettigen Alkohols bewirkt, während, wie erwartet, eine geringere Gastzugabe von 2,0 mmol pro g Amylose die Inklusionsrate auf 2,8% reduziert.

Gibt man ein Aromastoffgemisch von Hexanal und 1-Octen-3-ol im gleichen Verhältnis zu einer Amyloselösung hinzu, so findet eine leicht bevorzugte Einlagerung des Alkohols (Nr. 17) statt. Es zeigt sich also ein ähnliches Mischkomplexierungsverhalten wie im Falle des Nonenal-Hexanal-Gemisches: die längerkettige Komponente wird vermehrt in die Helix eingelagert. Dies wird besonders deutlich durch Probe 19, wo eine dreifach höhere Zugabe des Alkohols verglichen zum Aldehyd eine ungefähr 6fach höhere Komplexierung nach sich zieht. Vergleicht man hierbei den 1-Octen-3-ol-Gehalt im Mono-Komplex (Nr.16) mit dem im Bi-Komplex (Nr.19), so hat sich der Gesamtgastgehalt nahezu verdoppelt. Dies ist auf das Auftreten von synergistischen Effekten bei der Mischkomplexierung zurückzuführen.

III. Hexanal-Guajacol-Amylosekomplexe:

In den weiterführenden Untersuchungen soll das Einzel- sowie Mischkomplexierungsverhalten von Hexanal und Guajacol studiert werden.

Aus Tab. 10 kann man entnehmen, daß die Komplexausbeuten zwischen 68% und 78 % liegen. Ferner zeigt sich, daß auch hier Mischkomplexe in unterschiedlichen Stöchiometrien auftreten können. Bei der Bildung dieser Einschlußverbindungen sollte aufgrund der unterschiedlichen Struktur beider Moleküle eine 6er-Helix neben einer 7er-Helix vorliegen.

Im Bereichen geringerer Zugabe an einem Gast (2 mmol/g Amylose) wird 1,2 % an Hexanal und 1,5 % an Guajacol im Mono-Komplex eingeschlossen, während bei gleichzeitiger Zugabe die gleiche Menge zugesetzter Gäste zu etwas geringeren Einlagerungsraten dieser Aromastoffe führt (Nr. 22/23 verglichen mit Nr. 24). Das zugegebene Molverhältnis von 1:1 findet sich im Bi-Komplex wieder, was auf eine ähnlich gute Inkludierung dieser so unterschiedlichen Moleküle im Mischkomplex hinweist. Probe Nr. 29, bei der allerdings beide Gäste in sehr großem Überschuß von 5,0 mmol/g Amylose zugefügt werden, bestätigt dies ebenso durch das ermittelte Molverhältnis von 1,1 : 1.

Ähnlich wie im Falle der Mischkomplexierung der beiden Aldehyde sinkt ebenso im Hexanal-Guajacol-Komplex der Gesamtgehalt an Aromastoffen um mehr als

No	Zugegebener Gast [Molverhältnis]		Komplex- ausbeute	Gastgehalt im Komplex [Molverhältnis]	
	Hexanal	Guajacol		Hexanal	Guajacol
20	5,0 mmol/g A	-----	78 %	5,5 %	-----
21	-----	5,0 mmol/g A	73 %	-----	4,3 %
22	2,0 mmol/g A	-----	75 %	1,2 %	-----
23	-----	2,0 mmol/g A	70 %	-----	1,5 %
24	2,0 mmol/g A <i>1 :</i>	2,0 mmol/g A <i>1</i>	68 %	0,8 % <i>1 :</i>	1,0 % <i>1,0</i>
25	0,5 mmol/g A <i>1 :</i>	1,5 mmol/g A <i>3</i>	73 %	0,3 % <i>1 :</i>	1,7 % <i>4,6</i>
26	1,5 mmol/g A <i>3 :</i>	0,5 mmol/g A <i>1 :</i>	75 %	0,7 % <i>1,8 :</i>	0,5 % <i>1</i>
27	1,5 mmol/g A <i>3 :</i>	5,0 mmol/g A <i>10</i>	76 %	0,5 % <i>1 :</i>	2,0 % <i>3,2</i>
28	5,0 mmol/g A <i>10 :</i>	1,5 mmol/g A <i>3</i>	76 %	1,7 % <i>3,0 :</i>	0,8 % <i>1</i>
29	5,0 mmol/g A <i>1 :</i>	5,0 mmol/g A <i>1</i>	70 %	1,9 % <i>1,1 :</i>	2,1 % <i>1</i>

Tab. 10: Darstellung von Aromastoff-Amylosekomplexen mit Hexanal und Guajacol:

die Hälfte verglichen mit den entsprechenden Mono-Komplexen, wenn eine Komponente in enorm hohem Überschuss (5 mmol/g A) zugesetzt wird (Nr. 20 /21 verglichen mit Nr. 27-29). Geht man dabei von einem zugegebenen Molverhältnis von 3:10 aus, so spiegelt die Komplexstöchiometrie dieses annähernd wieder, unabhängig davon, ob die Hexanal oder Guajacolmenge überwiegt (siehe Nr. 27/28). Bewegt man sich dagegen im Bereich geringerer Zugaben (wie Nr. 25/26 zeigen), so resultiert eine leicht bevorzugte Komplexierung des Aromaten. Belegt wird dies einerseits durch eine 4,6 mal höhere Inklusion der Guajacolumoleküle nach einem 3-fach höherem Guajacolzusatz (Nr. 25) und andererseits durch einen

1,8-fach höheren Einschluß des Hexanals nach einer 3-fach höherer Hexanalzugabe (Nr. 26).

IV . Hexanal-Guajacol-Nonenal-Amylosekomplexe:

Abschließend wird durch gleichzeitigen Zusatz dreier Aromastoffe (Hexanal, Guajacol, E-2-Nonenal) ihre Verteilung in den entstehenden Amylosekomplexen untersucht. Wie man aus Tab. 11 entnehmen kann, können durch die Variation der Zugabe von 0,5 bis max. 2,0 mmol Gast pro g Amylose Aromastoffgehalte von 0,5% bis zu 1,1% erzielt werden. Der Gesamtgastgehalt beläuft sich dabei zwischen 2,4% und 3,3%, wobei knapp 80% der eingesetzten Amylose als Komplex ausfällt. Die 90%-ige Ausbeute der Probe 33 ist auf die Verwendung von entfetteter High-Amylose-Maisstärke ohne vorherige Fraktionierung zurückzuführen.

Unter Zugabe von je 1mmol Aromastoff pro g Amylose zeichnet sich eine leicht bevorzugte Einlagerung des Guajacols ab (Nr. 30). Verwendet man als Wirtsverbindung die entfettete High-Amylose-Maisstärke ohne vorherige Fraktionierung, so beobachtet man ein leicht abweichendes Komplexierungsverhalten (Nr. 33). In diesem Fall ist der bevorzugte Einschluß des linearen Nonenalmoleküls, auf die unterschiedlichen Fraktionen der Stärke

No	Zugegebener Gast[mmol/g A] [Molverhältnis]			Komplex- ausbeute	Gastgehalt im Komplex [Molverhältnis]		
	Hexanal	Guajacol	Nonenal		Hexanal	Guajacol	Nonenal
30	1 1:	1 1:	1 1	78 %	0,7 % 2,0:	1,1 % 2,5:	0,5 % 1
31	1 2:	1 2:	0,5 1	75 %	0,7 % 2,0:	1,1 % 2,5:	0,5 % 1
32	2 4:	2 2:	0,5 1	80 %	1,0 % 2,8:	0,9 % 2,0:	0,5 % 1
33	1 1:	1 1:	1 1	90 % * bzgl. Stärke	0,6 % 1,2:	1,1 % 1:	0,5 % 1,8

**als Wirtsverbindung wird entfettete High-Amylose-Maisstärke eingesetzt*

Tab. 11: Darstellung von Amylosekomplexen unter Verwendung eines Aromastoffgemisches aus Hexanal, Guajacol und E-2-Nonenal

zurückzuführen. Neben der Amylose beinhaltet die Amylomaïsstärke noch ca. 30% verzweigtes Amylopektin, welches die unterschiedliche Komplexierungseigenschaft der Stärke verglichen mit der isolierten Amylose bedingt. Es ist anzunehmen, daß mitausgefälltes Amylopektin bevorzugt lineare und langkettige Moleküle einschließt.⁶³

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß sich die getesteten Aromastoffe als Einzelkomponenten wie auch im Gemisch zur Inklusion befähigt sind. Begründet durch ihre unterschiedliche chemische Struktur, weisen die Gäste ein unterschiedliches Komplexierungsverhalten auf, so daß ihre Zusammensetzung im Komplex nur selten der quantitativen Zusammensetzung der zugegebenen Aromastoffmischung entspricht. Außerdem wird die Vorhersage der Gastgehalte in den Mischkomplexen durch das Auftreten synergistischer und antagonistischer Effekte noch zusätzlich erschwert. Die zahlreichen Darstellungen der Mischkomplexe demonstrieren, daß je nach vorgegebenen Konzentrationsverhältnissen das Mischkomplexierungsverhalten zweier Gastverbindungen sich verändern kann. Letztendlich können nur tendenzielle Aussagen getroffen werden. Um ein gewünschtes Aromaprofil im Komplex widerzuspiegeln, bietet sich an, die Aromastoffe erst einzeln zu komplexieren, und nach Erhalt der pulverförmigen Mono-Komplexe zusammenzumischen. Dies läßt sich allerdings nur für die Fälle realisieren, in denen einige wenige Aromastoffverbindungen das charakteristische Aroma eines Lebensmittels prägen. Andernfalls wäre dieser Verkapselungsprozess zu aufwendig und kostenintensiv.

Zu den CD-spektroskopischen Messungen

Weitere Informationen über das Komplexierungsverhalten von unterschiedlichen komplexierungsfähigen Aromamolekülen, die im Gemisch zu einer Amyloselösung zugegeben werden, könnte die Anwendung der CD-Spektroskopie liefern. Sie zählt zu den chiroptischen Methoden.⁷⁵ Diese zeichnen sich dadurch aus, daß für beide Enantiomere einer chiralen Verbindung Meßwerte entgegengesetzten Vorzeichens resultieren. So wird z.B. in der Polarimetrie die Tatsache ausgenutzt, daß zwei spiegelbildliche Konfigurationen die Drehung der Schwingungsebene eines linear polarisierten Lichtes um jeweils den gleichen Winkel aber in entgegengesetzter Richtung bewirken. Dieses Phänomen kann man verstehen, wenn man sich das linear polarisierte Licht in zwei circular polarisierte Lichtstrahlen entgegengesetzten Drehsinns, aber gleicher Frequenz und Geschwindigkeit zerlegt denkt. Aufgrund ihrer gegenläufigen Helizität verhalten sich die beiden Lichtstrahlen wie Bild und Spiegelbild, und wechselwirken daher mit demselben chiralen Molekül in unterschiedlichem Maße. Beim Durchgang einer optischen Substanz hat eine stärkere Wechselwirkung des einen Strahls eine Verlangsamung gegenüber dem anderen zur Folge, so daß rechts- und linkspolarisierter Lichtstrahl verschiedene Brechungsindices n haben. Die Differenz $\Delta n = n_L - n_R$ bedingt die Drehung der Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes.

Die Wellenlängenabhängigkeit von Δn bezeichnet man als optische Rotationsdispersion (ORD). Da häufig mit zunehmender Wellenlänge der Absolutbetrag von Δn gleichmäßig steigt, spricht man von normaler ORD. Eine anormale ORD tritt dagegen im Wellenlängenbereich von Absorptionsbanden chiraler Moleküle auf. Sie äußert sich darin, daß der ORD-Kurve ein charakteristischer S-förmiger Anteil überlagert wird. Da hierbei links- und rechtscircular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbiert wird, resultiert eine Differenz der molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$. Diese wird Circular dichroismus (CD) genannt. Der CD-Effekt und die damit verbundene anormale ORD werden als Cotton-Effekt bezeichnet. Die Kurve $\Delta \epsilon = f(\lambda)$, die eine ähnlich glockenförmige Gestalt wie die normalen Absorptionskurven aufweisen, können sowohl negative wie auch positive Amplituden besitzen.

Der CD-Effekt kann einerseits durch inhärent dissymmetrische Chromophore und andererseits durch inhärent symmetrische Chromophore, die sich allerdings in einer dissymmetrischen Umgebung befinden, erzeugt werden. Im ersten Fall handelt es sich um Chromophore, die an sich chiral sind, beispielsweise Helicene und atropisomere Biphenylverbindungen. Im letzten Fall wird dagegen die optische

Aktivität durch die chirale Umgebung, in welcher sich das Molekül mit dem Chromophoren befindet, induziert. Man spricht daher von induzierten Cotton-Effekten.

Amylose und Cyclodextrine gehören zu den dissymmetrischen Molekülen, welche erst unterhalb von 200 nm elektromagnetische Strahlung absorbieren. Für die Aufnahme von CD-Spektren ist eine Absorption im zugänglichen Wellenlängenbereich eine Grundvoraussetzung. Daher kann es erst durch Einlagerung von achiralen Molekülen, mit einem geeigneten Chromophor, ins Innere der Amylose bzw. des Cyclodextrins zu induzierten Cotton-Effekten kommen.^{76,77} Er dient als Nachweis für das Vorliegen eines Komplexes. Allerdings spielt die genaue Komplexgeometrie eine wesentliche Rolle, da sie den Kurvenverlauf des Cotton-Effektes bestimmt. Es kann also durchaus vorkommen, daß bedingt durch die Orientierung eines eingelagerten Chromophors der Cotton-Effekt verschwindet. Daher schließt sein Ausbleiben die Bildung eines Inklusionskomplexes nicht unbedingt aus.

Für die CD-spektroskopischen Untersuchungen müssen gelöste Amylosekomplexe vorliegen, weswegen hydroxypropylierte Kartoffelamylose eingesetzt wird. Mit einem Substitutionswert von 0,07 wird ihre Komplexierungsfähigkeit nur wenig beeinträchtigt.⁷⁸ Benutzt man diese zur Bildung von Hexanal-Komplexen, so wird in den aufgenommenen CD-Spektren ein negativer Cotton Effekt festgestellt. Er ist allerdings mit 0,4 mdeg nur schwach ausgeprägt.

Gibt man zu einer vorgelegten Hexanal-Komplexlösung einen zweiten strukturell unterschiedlichen Komplexanden, der mit Amylose Inklusionskomplexe unterschiedlichen Helixdurchmessers bildet, können Verdrängungsreaktionen erfolgen. Sie sollten zumindest teilweise zu Helixaufweitungen und damit Konformationsänderungen der Amylose führen. Diese Vorgänge sollen CD-spektroskopisch verfolgt werden.

Aufgrund ihrer aromatischen Struktur werden neben Hexanal als zweite Komplexanden zum einen Guajacol zum anderen 4-tert-Butylphenol eingesetzt.

Es ist bekannt, daß 4-tert-Butylphenol mit Amylose einen starken negativen CD-Effekt induziert.⁴⁰ Da dieser das gleiche Vorzeichen wie der entsprechende β -Cyclodextrinkomplex aufweist, folgert man die Bildung einer 7-er Helix. Im Falle des Guajacol-Komplexes, ist kein Cotton-Effekt erkennbar. Damit kann die Formierung einer 7-er Helix nicht direkt bewiesen werden. Bedenkt man, daß hier eine ähnliche Raumbeanspruchung wie beim 4-tert-Butylphenol vorliegt, so kann von der Bildung einer 7er- Helix ausgegangen werden.

Nach dem Zusatz eines zweiten strukturell unterschiedlichen Gastes zu einer vorgelegten Komplexlösung, können aus der daraus resultierenden Änderungen der CD-Effekte möglicherweise Rückschlüsse zu den Konformationsänderungen der Amylose gemacht werden. Hierfür werden die nach folgendem Schema hergestellten Komplexlösungen nach einer Minute, einer Stunde sowie einem Tag CD-spektroskopisch vermessen:

I. Umwandlung: 6er-Helix \longrightarrow 7er-Helix:

Vorlage: HP-Amylose + Hexanal

Zugabe a) 4-tert-Butylphenol
b) Guajacol

II. Umwandlung: 7er-Helix \longrightarrow 6er-Helix:

Vorlage: a) HP-Amylose + 4-tert-Butylphenol

b) HP-Amylose + Guajacol

Zugabe: Hexanal

Die UV-Spektren von Hexanal weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und von t-Butylphenol bei 275 nm auf. Abb. 9 verdeutlicht, daß mit HP-Amylose beide Gastmoleküle einen negativen Cotton-Effekt liefern. Im Falle des Aromaten ist dieser stärker ausgeprägt.

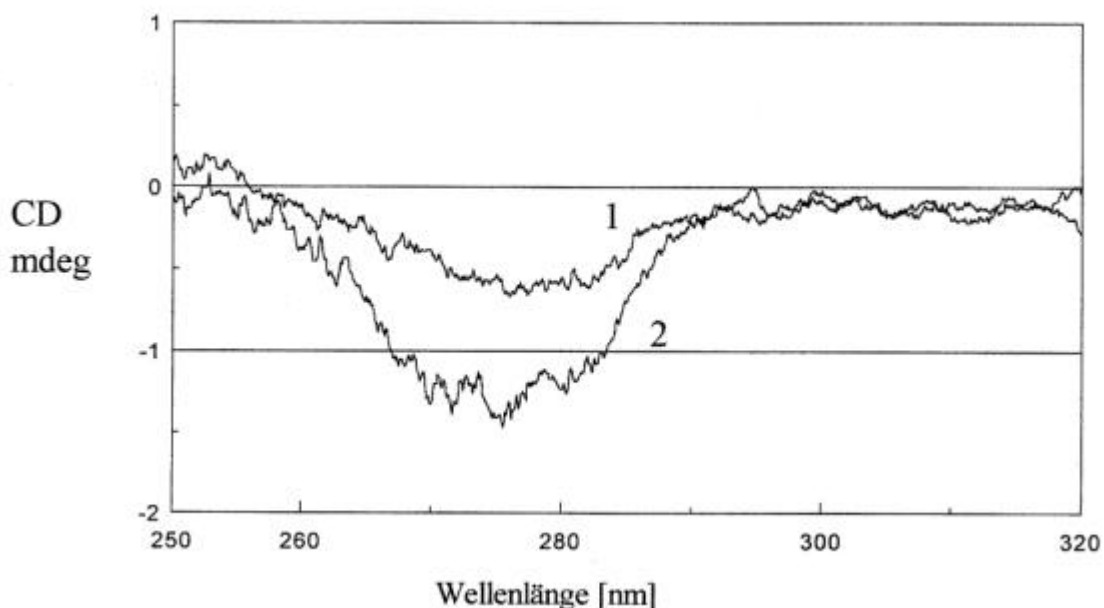


Abb. 9: CD-Spektren mit 1) Hexanal + HP-Amylose (DS=0,07)
2) t-Butylphenol + HP-Amylose (DS=0,07)

Nach Zusatz von *t*-Butylphenol zu einer Hexanal-Komplex-Lösung stellt man im Absorptionsmaximum lediglich eine zeitunabhängige Erhöhung der Amplitude des Cotton-Effektes fest. Sie stellt die Überlagerung der Spekten der Einzelkomplexe dar. Die Art der Umwandlung der Helixdurchmesser spielt keine Rolle

Die Hexanal-Guajacol-Komplexe liefern Spektren, die mit denen des Hexanal-Komplexes übereinstimmen. Dies ist auf das Fehlen des Cotton-Effektes beim Guajacol-Komplex zurückzuführen.

Mit Hilfe der Cd-spektroskopischen Messungen können keine Aussagen über das Ausmaß der Konformationsänderungen getroffen werden. Lediglich die schnelle Verdrängung des vorliegenden Komplexanden durch die Zugabe eines weiteren Gastes kann bewiesen werden.

Prüfung zur Auswirkung der Gefriertrocknung auf die Mischkomplexierung

Schon während des Darstellungsprozesses der Mono-Komplexe zeigt sich, daß infolge der Komplexbildung trotz Gefriertrocknung die flüchtigen Gastverbindungen in der Amylosehelix verbleiben. Damit führt die Inklusion zu einer Reduzierung des Dampfdruckes der Aromastoffe.

Bei Verwendung hoher Gastkonzentrationen einzelner Verbindungen kann eine maximale Einlagerung in die Amylosehelix bis zu knapp 8% erreicht werden, was einer vollständig gefüllten Amylosehelix entspricht. Allerdings weisen Mischkomplexe im Schnitt niedrigere Gastmengen auf. Um zu klären, ob im Falle der Mischkomplexierung eventuelle Aromastoffverluste während des Gefriertrocknungsprozesses auftreten, wurde die Gefriertrocknung über einen Zeitraum von 2 Wochen angewendet. Es stellt sich dabei die Frage, inwieweit eine unterschiedlich gute Bindung zweier Komponenten in der Helix zu möglichen Verlusten einer oder gar beider Gäste führen kann. Insbesondere bei der gleichzeitigen Bildung einer sechser neben einer siebener Helix (wie im Falle von Hexanal und Guajacol) wäre ein damit verbundenes Entweichen komplexierter flüchtiger Verbindungen aufgrund von vorhandenen Knicken und Übergangsstellen der helicalen Struktur eher denkbar als im Falle der Mono-Komplexierung.

Es werden insgesamt drei größere Komplexierungsansätze -jeweils zwei Mono-Komplexe mit Hexanal und Guajacol sowie ein Bi-Komplex- gemäß dem eingangs dargestellten Verfahren durchgeführt. (Auflistung erfolgt in Tab. 12)

No	Zugegebener Gast [Molverhältnis]		Komplex- ausbeute	Gastgehalt im Komplex [Molverhältnis]	
	Hexanal	Guajacol		Hexanal	Guajacol
34	2.0 mmol/g A	-----	78 %	0,9 %	-----
35	-----	2,0 mmol/g A	80 %	-----	1,9 %
36	2,0 mmol/g A <i>1 :</i>	2,0 mmol/g A <i>1</i>	68 %	1,1 % <i>1 :</i>	1,9 % <i>1,4</i>

(Gastgehalte nach Waschen mit CH_2Cl_2 ermittelt)

Tab. 12: Herstellung von Hexanal- und Guajacol-Amylosekomplexe zum Vergleich der Gefriertrocknungsstabilität

In allen drei Fällen können nach Zentrifugation der ausgefällten Niederschläge die Ansätze getrennt weiterbehandelt werden. Auf ein Drittel dieser Ansätze wird die herkömmliche Isoliermethode (16-stündige Gefriertrocknung und Waschen mit polarem Lösemittel, um anhaftende Aromastoffanteile zu entfernen, angewendet.

Das zweite Drittel wird über einen Zeitraum von zwei Wochen gefriergetrocknet, wobei die Aromastoffgehalte ohne vorheriges Waschen mit Methylenchlorid fortschreitend bestimmt werden. Hierbei ist zu erwarten, daß insbesondere zu Beginn der Gefriertrocknung neben den inkludierten noch geringe Anteile an adsorbierten Molekülen gefunden werden. Abb. 10 demonstriert die Hexanal- bzw. Guajacolabnahme mit der Zeit.

Der Zeitpunkt Null bezieht sich auf die Aromastoffmenge des letzten Drittels der Ansätze, die ohne Anwendung der Gefriertrocknung ermittelt wird, d.h. diese Proben enthalten die größte Aromastoffmengen, da neben den inkludierten noch sehr große Mengen an adsorbierten Aromastoffmolekülen vorhanden sind.

Der graphische Verlauf in Abb. 10 läßt eine drastische Abnahme der Aromastoffkomponenten innerhalb der ersten 2 Tage während der Gefriertrocknung erkennen, während für die restliche Zeit die Aromastoffgehalte sich nur geringfügig ändern. Dies spricht für ein anfängliches Entweichen der flüchtigen Verbindungen, die nur oberflächlich adsorbiert sind. Die inkludierten Anteile dagegen verbleiben während der Gefriertrocknung auch über einen längeren Zeitraum im Inneren der Helix gebunden.

In beiden Komplexierungsformen wird nach zweiwöchigem Gefrieretrocknen ein Guajacolgehalt von 2,1% erreicht. In diesem Zeitraum kann davon ausgegangen werden, daß ausschließlich oberflächlich adsorbierte Aromastoffmoleküle entfernt werden, da nach dem Waschen der gleichen Komplexe mit Methylenchlorid eine nur leicht niedrigere Guajacolgehalt von 1,9% resultiert (Vergleich Tab. 12). Offensichtlich beruht die Differenz von 0,2% auf den minimalen Verlusten an komplexierten Molekülen, die durch den Waschprozess verursacht werden.

Nach 14-tägiger Gefrieretrocknung reduziert sich die Hexanalmenge des Mono- wie auch des Mischkomplexes auf 1,3%. Der Vergleich mit der inkludierten Hexanalmenge nach dem Waschen mit Methylenchlorid von 0,9 bis 1,1% (Tab. 12) bestätigt, daß sowohl im Bi- als auch im Mono-Komplex maximal 1,3% Hexanal eingelagert werden. Die geringfügige Differenz von 0,2 bis 0,4% ist auch hier auf geringe Verluste an komplexierten Molekülen, aufgrund des Waschprozesses zurückzuführen.

Unabhängig von der Komplexbildungsform konnten keine Verluste an inkludierten Aromastoffmolekülen bedingt durch die Gefriertrocknung verzeichnet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine langfristige Anwendung der Gefriertrocknung Komplexe liefert, die frei von adsorbierten Aromastoffen sind.

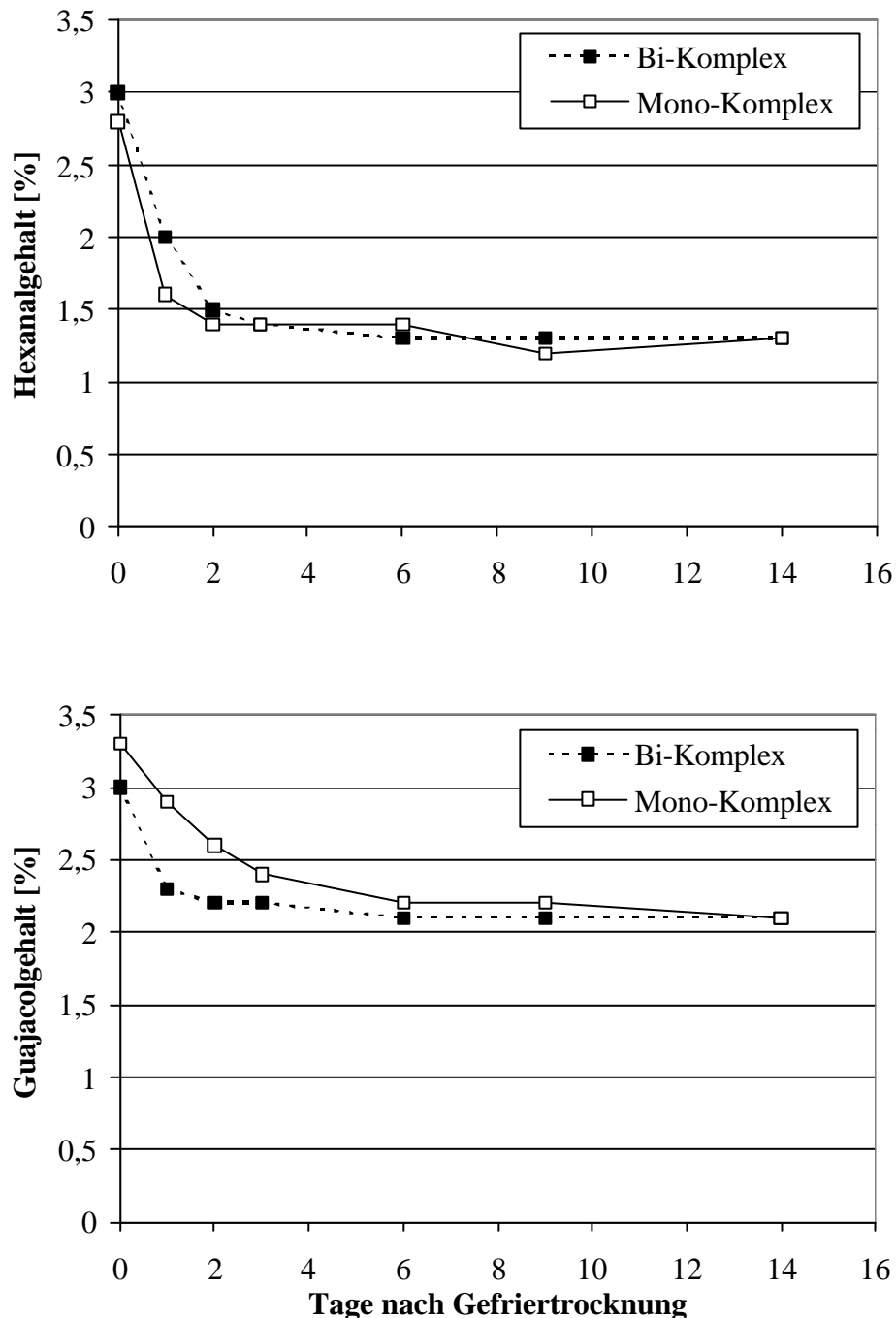


Abb. 10 : Hexanal- sowie Guajacolgehalte im Mono- und Bi-Komplex

Prüfungen zur Lagerungsstabilität der Aromastoff-Amylosekomplexe

Ein Hauptzweck der Inklusion von Aromastoffverbindungen besteht in dem Schutz vor Verflüchtigung und oxidativem, thermischem Zerfall sowie anderen chemischen Veränderungen. Bekannt ist zum Beispiel aus der Literatur, daß ein Decanal-Amylose-Komplex einen 100%-igen Oxidationsschutz der Aldehydgruppe gewährleistet, selbst wenn der Komplex bei 45°C in einer täglich erneuerten Sauerstoffatmosphäre gelagert wird.⁷⁹

Über einen Zeitraum von einem Jahr soll die Lagerungsstabilität einiger der hergestellten Mono- und Bi-Komplexe überprüft werden. Die Lagerung erfolgte in einem geschlossenen Glasgefäß mit Polyethylen-Deckel bei Raumtemperatur. Die Komplexstöchiometrie einiger Mono- und Bi-Komplexe wurde nach einem halben sowie einem ganzem Jahr nochmals überprüft. Abb. 11 verdeutlicht, daß unabhängig von den ausgewählten Aromastoffen sämtliche mit Methylenchlorid gewaschene Mono-Komplexe auch nach ganzjähriger Lagerung die gleiche Aromastoffkonzentration beinhalten. Die geringfügigen Abweichungen bewegen sich unterhalb von 1%. Dagegen verlieren, aufgrund des hohen Anteils

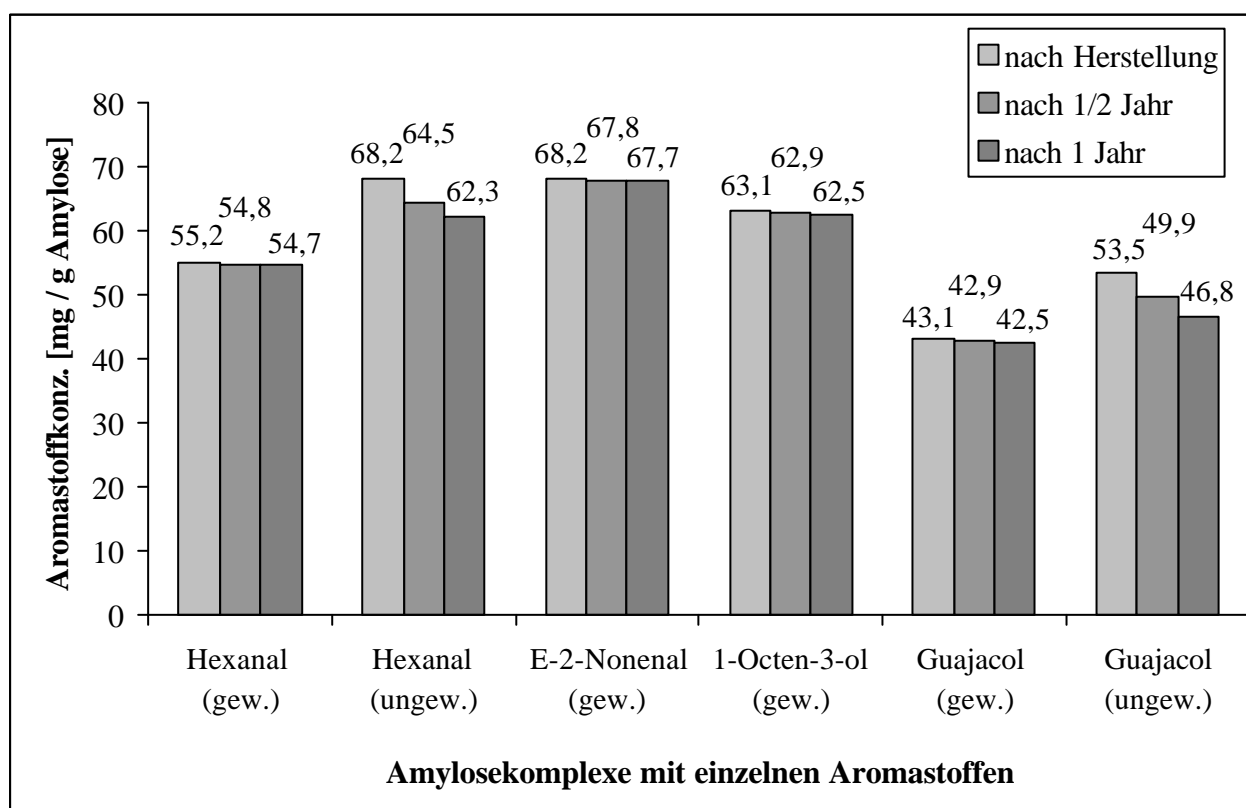


Abb. 11: Studien zur Lagerungsstabilität verschiedener Mono-Komplexe

an anhaftenden Aromastoffmolekülen, die ungewaschenen Amylosekomplexe bis zu 10% ihrer Aromastoffmenge. Dies ist auf die Desorption der Aromastoffe, die lediglich an der Helixoberfläche durch Adsorption nur schwach gebunden sind, zurückzuführen.

Auch die beiden untersuchten Bi-Komplexe weisen unveränderte Inklusionsraten der eingesetzten flüchtigen Gäste auf (siehe Abb. 12). Dies beweist, daß durch die Inkludierung ein vollkommener Schutz vor Verflüchtigung erreicht wird.

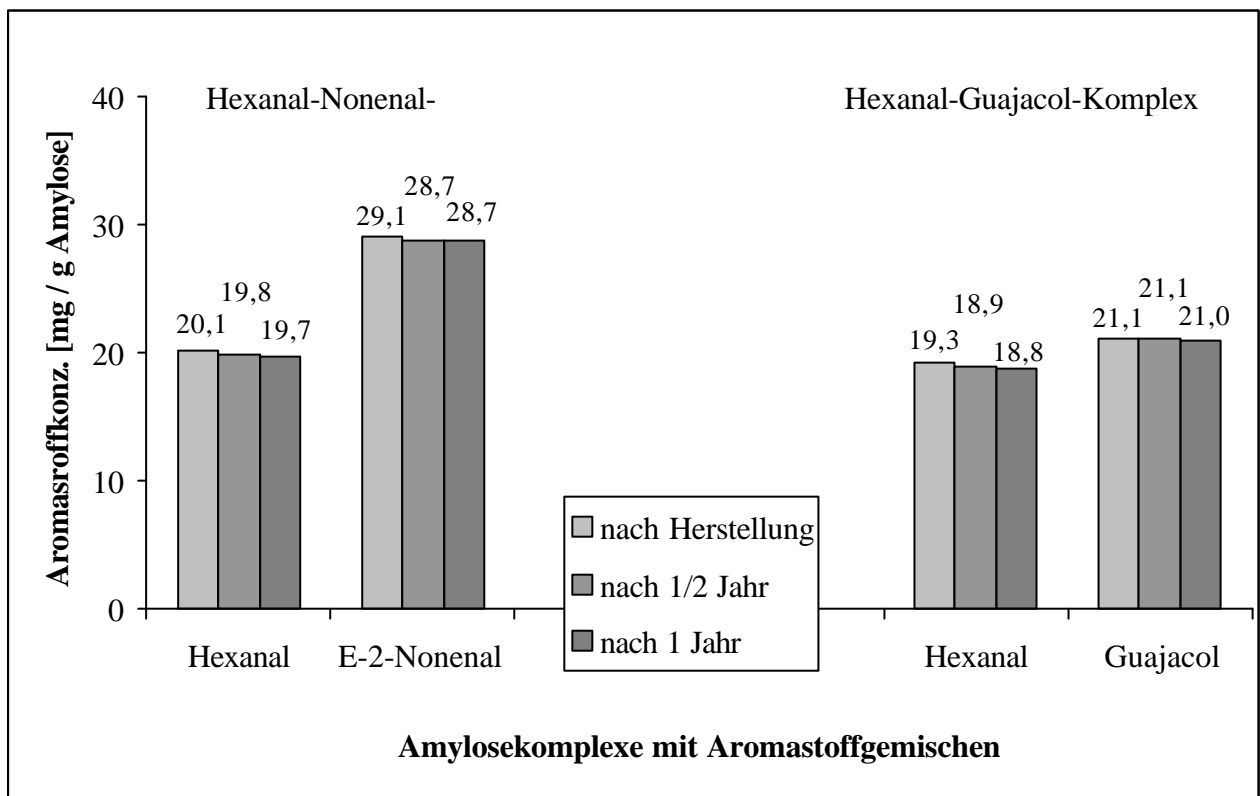


Abb. 12: Studien zur Lagerungsstabilität zweier unterschiedlicher Bi-Komplexe

2.3 Bestimmung der Freisetzungskinetik der Aromastoffe aus den Amylosekomplexen

In der Nahrungsmittelindustrie finden bei der Herstellung von stabilen Aromazubereitungen einige weit verbreitete und hochentwickelte Techniken der Mikroverkapselung wie z.B. die Sprühtrocknung, die Gefriertrocknung und in geringem Umfang die Extrusion Anwendung. Durch die Auswahl geeigneter Trägermaterialien findet dabei eine Verkapselung der flüchtigen Aromastoffe statt, sodaß über längere Zeiträume eine Aromaretention der anfallenden trockenen, rieselfähigen Aromapulver erzielt wird. Weiterhin ist bekannt, daß sich beim Vermischen mit Wasser das Kapselmaterial löst und die Aromastoffe freigesetzt werden. Das Eßverhalten des Verbrauchers wird maßgeblich durch die Wahrnehmung des Aromas einer Speise gesteuert. Insbesondere bei Instantprodukten, wie Fertigsuppen, zeigt sich eine höhere Akzeptanz, wenn sich das charakteristische Aroma schon während der Zubereitung entfaltet, und darüberhinaus über die gesamte Zeitspanne des Konsums andauert. Eine kontrollierte Freisetzung der Aromastoffe über einen längeren Zeitraum ist daher für die Bewertung der Nahrung von großer Bedeutung.

Die eingeschlossenen Aromastoffe sollen nun unter definierten Bedingungen (Temperatur und Wassergehalt) aus den hergestellten Aromastoff-Amylosekomplexen wieder freigesetzt werden. Dabei bietet sich zur Bestimmung der Freisetzungskinetik der Aromastoffe die **Headspace-Gaschromatographie (HS-GC)** an.

Bei der HS-GC handelt es sich um eine gaschromatographische Dampfraumanalyse, mit der die Zusammensetzung des Gasraumes über einer Probe analysiert wird, so daß prinzipiell nur flüchtige Komponenten erfaßt werden.⁸⁰

Besonders erfolgreich wird die HS-GC außer bei der Aromaanalyse von Lebensmitteln und Getränken noch zur Bestimmung von

- Restlösemitteln in Lebensmitteln, Pharmaka, Verpackungsmaterialien
- Monomeren in Polymeren
- flüchtigen Schadstoffen in Luft, Wasser und Böden
- Blutalkoholanalyse
- MAK-Werten bei der Arbeitsplatzüberwachung
- Physikochemischen Daten: Dampfdrücke, Verteilungskoeffizienten, Aktivitätskoeffizienten uvm. eingesetzt.

Die deutsche Bezeichnung **Dampfraumanalyse** bezeichnet ein Gleichgewichtssystem in einem geschlossenen Probenbehälter, bei dem sich die flüchtigen Stoffe zwischen einer festen oder flüssigen Probe und dem Gasraum in einem thermodynamisch kontrollierten Verteilungsgleichgewicht befinden. Im Englischen spricht man hierbei von einer **statischen Headspacemethode**. Neben ihr existiert noch die sog. **dynamische Headspacetechnik**, bei der die flüchtigen Stoffe kontinuierlich in einem Inertgasstrom ausgetrieben werden, der in der Regel über eine Adsorptionssäule oder eine Kühlfalle aufgefangen wird. Hierbei kann sich aufgrund der kontinuierlichen Gasextraktion kein Gleichgewicht zwischen Dampfraum und Probe einstellen. Die Adsorptionssäule (trap) muß mit einem geeigneten Adsorbentmaterial gefüllt sein. Es soll eine große aktive Oberfläche besitzen, die in der Lage sein muß, größere Mengen verschiedener organischer Substanzen zu binden.⁸¹

Zur Bestimmung der Freisetzungskinetik der inkludierten Aromastoffe eignet sich die statische Headspace-Analyse, weil mit ihrer Hilfe die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung ermittelt werden kann. Durch die Entnahme eines aliquoten Teils aus dem Gasraum einer thermostatisierten Probe in einem geschlossenen Probengefäß gelangen die flüchtigen Aromakomponenten ohne Verfälschung direkt auf die Kapillarsäule.

Verfahren der Dampfraumdosierung:

Heutzutage sind verschiedene Techniken der Gasentnahme bekannt.

Die häufigste und allereinfachste stellt die Entnahme eines bestimmten Gasvolumens aus dem Gasraum eines Probengefäßes mittels einer gasdichten Spritze dar. Dabei muß beachtet werden, daß eine manuelle Handhabung mit verschiedenen Fehlerquellen behaftet sein kann, so daß der Reproduzierbarkeit Grenzen gesetzt sind.⁸²

Als erstes muß man darauf achten, daß keine Kondensation des Dampfes innerhalb des Spritzkolbens stattfindet. Daher sollte die Dosierspritze temperiert werden. Am sichersten vermeidet man die Kondensation am Spritzenkolben, wenn dieser mindestens auf die Temperatur der Probe gebracht wird. Dies wiederum schränkt die Variation der Temperatur bei solchen Messungen ein.

Außerdem treten oft Adsorptionserscheinungen am Spritzenkolben auf. Die Spritze sollte daher sorgfältig durch Ausdampfen bei höherer Temperatur oder unter Vakuum gereinigt werden, um Memoryeffekte bei der darauffolgenden Messung auszuschließen.

Eine weitere Fehlerquelle, die die Genauigkeit der Analyse beeinträchtigen kann, besteht in der Absorption von Probenkomponenten an den Verschlusskappen des Dampfraumgefäßes. Sie ist abhängig vom Molekulargewicht und der Struktur der zu untersuchenden Verbindung. Besonders im Spurenbereich kann deren Sorption z.B. an Gummistopfen zu einem beträchtlichen Verlust führen. Mit teflonbeschichteten Septen läßt sich die Sorption zwar nicht ganz, aber beträchtlich vermindern.⁸³

Zuletzt stellt die Gasspritze während der Überführung der Probe aus der Probenflasche ein offenes System dar. Der Druck im Probenglas erstreckt sich nämlich bis in den Spritzenzylinder und beim Herausziehen der Spritzennadel mit der abgefüllten Probe kann ein Teil der Gasprobe gegen die Atmosphäre entweichen. Die manuelle Handhabung dieser Art der Dosierung ist also nicht ganz unproblematisch und erfordert einige Erfahrung bis zufriedenstellende, reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden können.

In der Lebensmittel- sowie pharmazeutischen Industrie wird durch eine Automatisierung der Probenhandhabung durch einen Headspace-Probensampler der Probendurchsatz erhöht. Damit sind Serienanalysen durchführbar, mit deren Hilfe sich die Präzision und Richtigkeit eines Meßergebnisses durch Anwendung von statistischen Beurteilungskriterien gut abschätzen läßt.

Eine reproduzierbare Dosierung aus der Gasphase von geschlossenen Probengläsern gelingt besser, wenn nicht nur das Volumen sondern auch der Druck derselbe ist.

Nach dem Prinzip einer Gleichdruck-Dosierung⁸⁴ wird die Probenflasche mit einem Inertgas z.B. dem Trägergas auf einen höheren Druck aufgefüllt, als sich bei der Thermostatisierung der Proben von selbst eingestellt hätte. Es fließt solange Trägergas in die Flasche, bis dort der gleiche Druck wie am Säulenanfang herrscht. Nach erfolgtem Druckausgleich kann das komprimierte Gas in der Flasche, das sich mit den flüchtigen Stoffen vermischt hat, umgekehrt zur Trennsäule zurückfließen. Dadurch, daß alle Probenflaschen auf den gleichen Enddruck aufgefüllt werden, ist gewährleistet, daß unabhängig von der Art und Zusammensetzung der Probe immer das gleiche Probevolumen dosiert wird. Basierend auf diesem Prinzip sind bis heute eine Fülle automatischer Dampfraum-Dosiersysteme entwickelt worden. Der einzige Nachteil gegenüber der manuellen Einspritzmethode, besteht darin, daß für einige Sekunden das Gleichgewicht zwischen Probe und Dampfraum gestört wird.

Für das Analyseproblem der Bestimmung der Freisetzung der Aromastoffe aus den hergestellten Amylosekomplexen unter definierten Bedingungen sollte durch manuelles Einspritzen eines definierten Gasvolumens versucht werden,

reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Aus den vorher erwähnten Gründen, kann dies bis zu einem gewissen Grad zufriedenstellend erfüllt werden.

Zur Probenvorbereitung:

Um Adsorptionserscheinungen der Aromastoffe an den Glaswänden zu vermeiden, werden alle Probenfläschchen (Volumen: 11,3 ml) sowie der Glaszylinder der 500 μ l gasdichten Spritze silyliert. Unter Verwendung eines teflonbeschichteten Septums kann das Probengefäß mit einem Schraubdeckel dicht verschlossen werden. In einer temperierten Zelle wird das Probenglas bei konstanter Temperatur für eine definierte Zeit aufbewahrt, bevor 500 μ l Gasvolumen aus dem Headspace über der Probe entnommen wird. Die Injektionsspritze wurde immer auf 40°C vortemperiert, so daß Kondensationserscheinungen weitgehend vermieden werden können. Eine höhere Temperierung erscheint wenig sinnvoll, weil dann die Gasdichte der Spritze nicht mehr gewährleistet ist. Zwei weitere Punkte sind zu optimieren, um möglichst reproduzierbare Peakflächen von gleichen Proben zu erreichen: Die Anwendung einer Kryofokussierung und die Einspritztechnik.

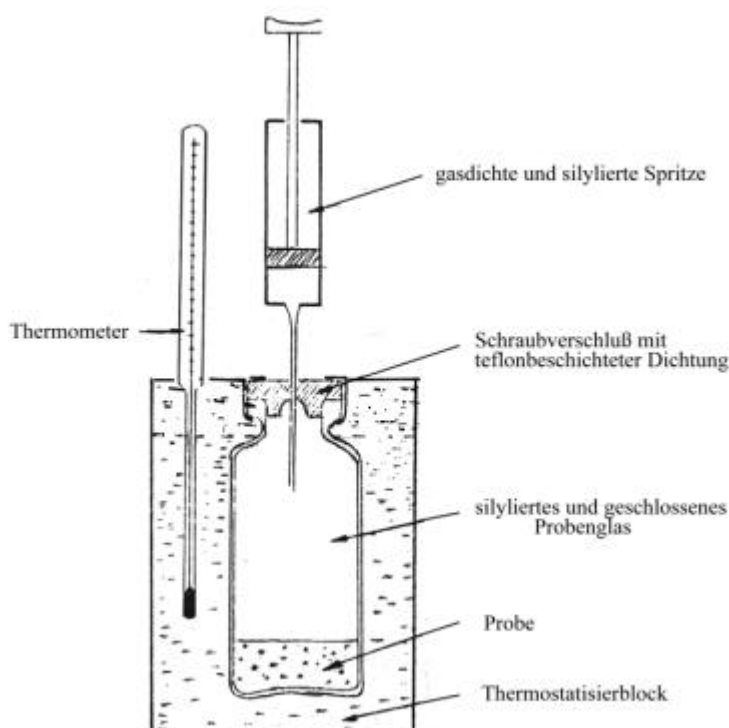


Abb. 13: Probenhandhabung bei der statischen Headspace-GC

Verwendung einer Kryofokussierung:

Um die in geringeren Konzentrationen vorhandenen flüchtigen Substanzen noch detektieren zu können, sind oft größere Gasvolumina zu entnehmen. Wird eine 500 μl Gasprobe direkt in den Injektor gegeben, so führt dies zu einer Peakverbreiterung bei der chromatographischen Trennung, die keine zuverlässige quantitative Auswertung zuläßt. Schmale Signale können jedoch durch die Installation einer Kryofokussierung am Kapillarsäulenanfang, wie in *Abb. 14* skizziert, erhalten werden.

Bei dieser Methode wird durch die Kühlung eines kurzen Abschnittes der Säule die Wanderungsgeschwindigkeit der Komponenten im Gasraum in diesem Bereich relativ zu der des Trägergases bzw. der Luft stark vermindert und somit die Eindringtiefe in den Säulenanfang verkleinert⁸⁵. Es resultiert ein schmales Startprofil der Probenkomponenten. Als Kühlmittel wird Stickstoff verwendet, der mit 2 bar durch eine Kupferspirale geleitet wird, die in einem Dewar mit flüssigem Stickstoff eintaucht. Über eine isolierte Leitung fließt dann der abgekühlte Stickstoffstrom zu einer Stelle der Kapillarsäule im auf 100°C geheizten GC-Ofen, welche sich 4 cm vom Säulenanfang entfernt befindet. Die Kühlungszone ist etwa 3 cm lang. Dort werden dann nach Einspritzen der Gasmenge, die zu untersuchenden Komponenten der gasförmigen Probe zurückgehalten. Nach Abstellen des Stickstoffstroms, wird der tiefgekühlte Säulenabschnitt im Ofen langsam aufgeheizt. Der komprimierte Substanztropfen wird nun durch das Trägergas weitergetragen, und das Probengemisch wird

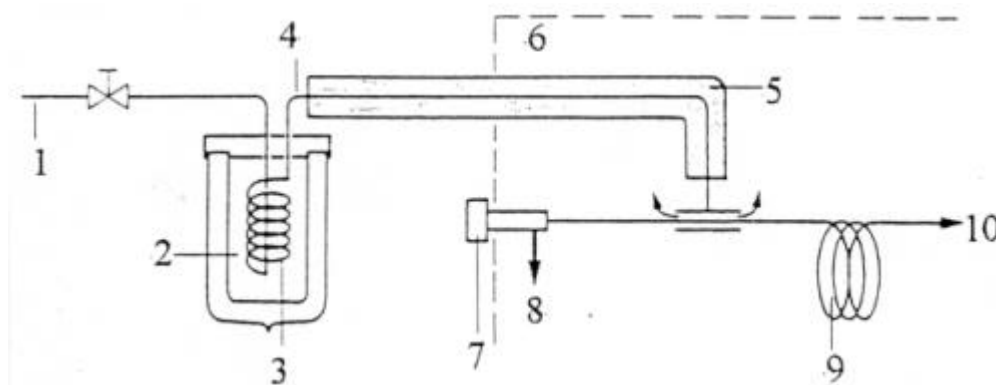


Abb. 14: Aufbau einer Kryofokussierung am Kapillarsäulenanfang (1 = Stickstoffstrom, 2 = flüssiger Stickstoff, 3 = Kupferspirale, 4 = Gaseinleitungsrohr, 5 = Isolierung, 6 = GC-Ofen, 7 = Injektor, 8 = Split, 9 = Kapillarsäule, 10 = Detektor)

getrennt. Nach einigen Tests zeigt sich, daß ein 6-minütiges Einströmen des gekühlten Stickstoffs vor dem Einspritzen und eine darauffolgende 4 minütige Anwendung der Kryofokussierung der Probenkomponenten nach deren Überführung in den Gaschromatographen ausreicht, um schmale Peaks zu detektieren.

Probenaufgabetechnik:

Als nächstes wird die Probenaufgabetechnik optimiert, um bei gleich präparierten Proben zufriedenstellend reproduzierbare Peakflächen zu erhalten.

Dafür werden die Dampfäume zweier Hexanal-Amylosekomplex-Proben (einmal eine definierte Menge des trockenen pulverförmigen Komplexes und zum anderen der gleiche Komplex unter Zugabe einer definierten Menge an Wasser) nach deren ein- sowie zweistündigen Temperierung auf 50°C mehrmals gaschromatographisch analysiert. Hierbei soll eine Einspritztechnik ausgearbeitet werden, mit der man in der Lage ist, reproduzierbare Peakflächen mit einer möglichst kleinen Abweichung zu erhalten. Nur dann ist eine Quantifizierung der Freisetzung der Aromastoffe sinnvoll.

Nach Austesten diverser Einspritzprozeduren können mit folgender Methode reproduzierbare Peakflächen mit einer maximalen Abweichung von bis zu $\pm 5\%$ detektiert werden:

Vor dem Einstechen der Injektionsnadel, die auf 40°C vortemperiert ist, wird der Spritzkolben ganz aufgezogen, sodaß nach dem gleichmäßigen Zugeben dieses Luftvolumens von 500 μl ein zweimaliges gleichmäßiges Aufziehen des Headspacevolumens folgt, bevor dann die Gasprobe dem Injektor zugeführt wird.

Beim Zugeben des Zusatzvolumens entsteht für kurze Zeit ein Überdruck und das Gleichgewicht zwischen Dampfraum und Probe wird beeinflusst. Allerdings wird durch das zweimalige Hintereinanderaufziehen von 500 μl aus dem Dampfraum der Probe auf der einen Seite die Durchmischung des zugesetzten Luftvolumens mit dem überstehenden Headspacevolumen gewährleistet. Auf der anderen Seite fällt der Anteil an eventuell kondensierten Aromastoffen kaum ins Gewicht, da durch das zweite Aufziehen ein gewisser Ausgleich stattfinden kann.

Um ein Verdampfen von flüchtigen Bestandteilen der Probe aus der Injektionsspritze möglichst gering zu halten, erfolgt innerhalb von 3 Sekunden ein rasches und gleichmäßiges Überführen in den Injektorblock. Außerdem beträgt das entnommene Gasvolumen durch die Verwendung einer Repetierhalterung für jede Analyse konstant 500 μl , sodaß die möglichen Fehlerquellen sich immer im gleichen Umfang auswirken.

Nach Benutzen der Spritzen werden diese mit Ethanol und Aceton gereinigt und im Vakuum ein Viertelstunde getrocknet, sodaß bei der nächsten Probenentnahme Fehlerquellen wie Probenverschleppung und Anwesenheit von Lösemittelspuren ausgeschlossen werden können.

Vor der chromatographischen Analyse werden alle Meßparameter wie z.B. Flow, Split, Strömung des Wasserstoffgases sowie des Make-up Gases am FID überprüft und immer auf den gleichen Wert eingestellt, somit stimmen die resultierenden Peakflächen zweier Proben mit einer maximalen Abweichung von bis zu 5% auch an aufeinanderfolgenden Meßtagen überein.

Quantitative Analyse der Gasproben

Die quantitative Auswertung eines Chromatogramms erfolgt wie üblich über die Integration der Fläche jedes einzelnen Peaks. Bei der HS-GC hängen die Peakflächen von folgenden Faktoren ab:

- Substanzmenge,
- apparative Parameter (dosiertes Probevolumen, Verstärkereinstellung usw.),
- stoffspezifische Detektorempfindlichkeit,
- Verteilungskoeffizient (er ergibt sich aus den stoffspezifischen Eigenschaften, wie dem Dampfdruck bei der vorliegenden Temperatur sowie der chemischen Wechselwirkung zwischen der Probematrix und dem flüchtigen Stoff, die im Aktivitätskoeffizienten zusammengefaßt wird).

Wegen der Vielfalt der Parameter ist eine Eichung notwendig, die unter den gleichen apparativen Bedingungen wie die Analyse vorgenommen wird. Dabei werden je nach Problemstellung verschiedene Eichverfahren angewendet. Sie unterscheiden sich von den üblichen quantitativen Verfahren der Gaschromatographie dadurch, daß der Verteilungskoeffizient im Eichfaktor miteinfaßt werden muß.⁸⁶

Die Notwendigkeit, kleine Konzentrationen von flüchtigen Anteilen in festen Proben zu analysieren, ist insofern schwierig, weil es hier unmöglich ist, eine definierte Menge von einem leicht flüchtigen Stoff in einer festen Matrix zuzumischen.

Da allerdings die Konzentration der flüchtigen Aromastoffe im Amylosepulver von vornherein bekannt ist, reicht es vollkommen aus, eine Eichung durch Verwendung von Kalibrierstandards in Hexan vorzunehmen: Es wird angenommen, daß 2 µl verschiedener Kalibrierstandards aus der Aromastoffkomponente in Hexan unter gleichen apparativen Bedingungen, mit der Menge an

Aromastoffkomponente in 500 μl Headspace-Volumen korrelieren. Dies ist zulässig, da beim Injizieren die Hexan-Lösung sofort verdampft und angenähert ein Volumen von 500 μl einnimmt. Somit kann unter Verwendung des resultierenden Eichfaktors auf die Konzentration des Aromastoffes im Gasraum des Probenglases zurückgeschlossen werden. Des weiteren läßt sich die Freisetzung der Aromaverbindung bezogen auf den Gesamtgehalt im trockenen Komplexpulver prozentual angeben.

Ergebnisse der Headspace-Messungen:

I. Vergleich der Freisetzung der einzeln inkludierten Aromastoffe unter verschiedenen Bedingungen

Zuerst wird die Freisetzung des Hexanals aus 20 mg eines trocknen, pulverförmigen Hexanal-Amylosekomplexes in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Hierbei wird so vorgegangen, daß zu bestimmten Zeiten innerhalb der ersten 21 Stunden 500 μl aus einem Gasvolumen von 11,3 ml entnommen werden. In Abb. 15 kann man erkennen, daß allein eine höhere Temperatur ausreicht, um Hexanal aus dem Inneren der Helix entweichen zu lassen.

Der ausgewählte Hexanal-Amylosekomplex besitzt eine hohe Komplex-

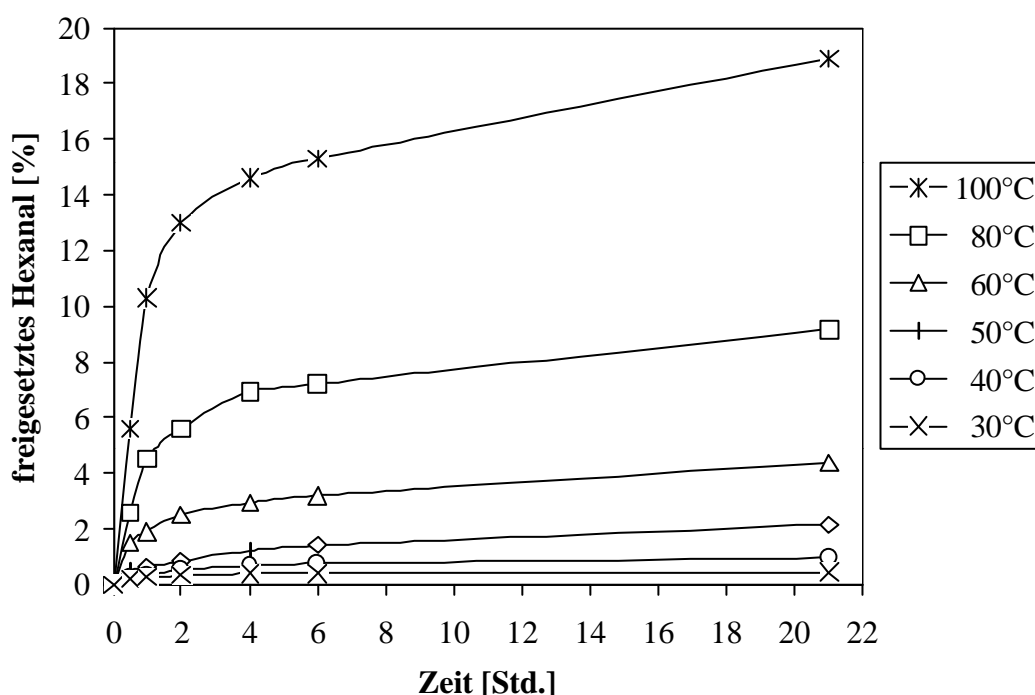


Abb. 15: Freisetzungskarakteristik von Hexanal aus einem pulverförmigen Hexanal-Amylosekomplex in Abhängigkeit von der Temperatur (Gastgehalt: 75 mg/g Amylose nach Waschen mit CH_2Cl_2)

stöchiometrie mit einem Gastanteil von 7,5% und ist frei von adsorbierten Aromastoffmolekülen, da er vor Beginn der Untersuchungen zweimal mit Methylenchlorid gewaschen wird. Bei Temperaturen unterhalb von 40°C verliert der Komplex kaum an Gastgehalt. Dies stimmt mit den vorherigen Ergebnissen der Lagerstabilität der Amylosekomplexe bei Raumtemperatur überein. Wird die Temperatur über die Komplexbildungstemperatur angehoben, so wird eine vermehrte Freigabe der inkludierten Moleküle registriert, die innerhalb der ersten 21 Stunden bei 50°C noch bei 2%, bei 60°C bei 4%, bei 80°C über 8% und bei 100°C um die 20% liegt. In den ersten 2 Stunden findet dabei der Großteil der Überführung des Hexanals in die Gasphase statt. Bemerkenswert ist auch, daß das System nach 21 Stunden noch nicht das Gleichgewicht erreicht hat, d.h. es handelt sich um eine recht langsame Gleichgewichtseinstellung, wie sie bei Systemen in fester Matrix oft vorgefunden wird.

Anschließend soll unter Zusatz einer definierten Menge an Wasser zu dem gleichen Hexanal-Amylosekomplex ermittelt werden, wie die Freigabe des Aromastoffes in den Gasraum bei unterschiedlichen Temperaturen beeinflusst wird. Um homogene Gemische zu erzeugen, wird dabei ein Metallzylinder in das Probengefäß gegeben, mit dessen Hilfe eine Durchmischung ermöglicht wird (siehe Abb. 16). Das Headspace-Volumen des Probengefäßes reduziert sich dabei auf 9,8 ml. Außerdem können aufgrund des steigenden Wasserdampfdruckes die resultierenden Peakflächen nur bis zu max. 80°C verlässlich quantifiziert werden.

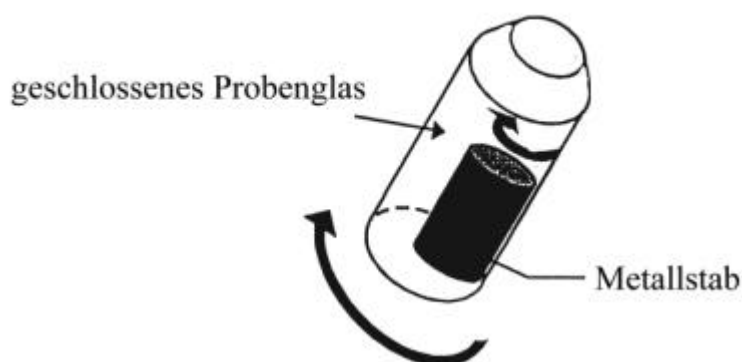


Abb. 16: Verfahren zur Homogenisierung⁹³

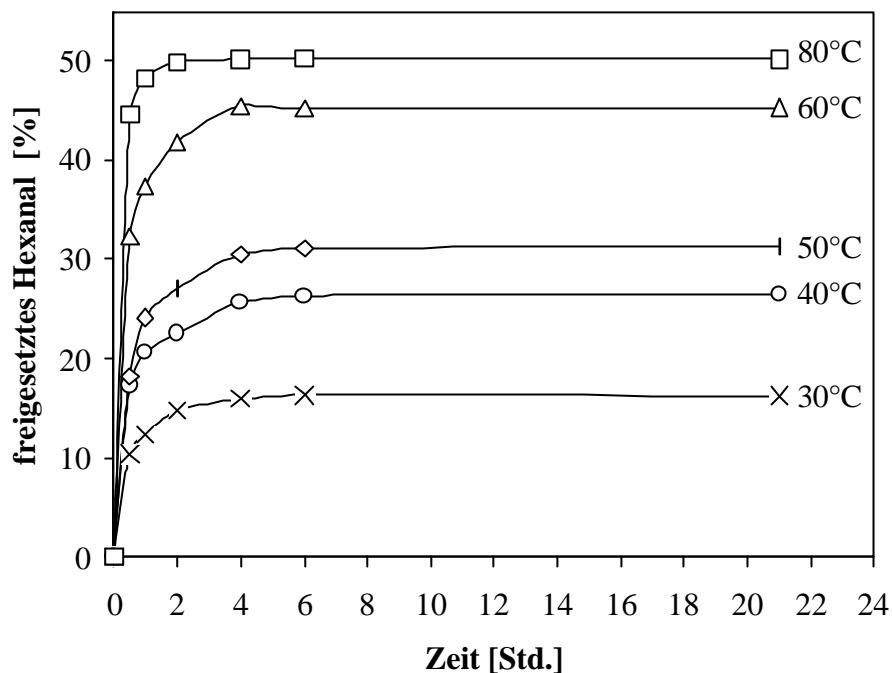


Abb. 17: Freisetzungskarakteristik von Hexanal aus einer 9%-igen wäßrigen Suspension eines Hexanal-Amylosekomplexes
(Gastgehalt: 75 mg/g Amylose nach Waschen mit Methylenchlorid)

Durch Herstellen einer 9%-igen Suspension (2 ml Wasser werden zu 20 mg Komplex hinzugefügt) liegt das Amylosepulver in einem vollständig gequollenem Zustand vor. Seine Freisetzungskinetik demonstriert Abb. 17.

Im wäßrigen Milieu findet schon bei niedrigen Temperaturen eine schlagartige Freisetzung des flüchtigen Hexanals aus dem Komplex statt. Verglichen mit den Freisetzungsraten aus dem gleichen trockenen Komplexpulver passiert dies in erheblich höherem Umfang. Innerhalb der ersten halben Stunde werden im Gasraum bei 30°C 10%, bei 50°C 30% und bei 80°C sogar 44% des inkludierten Aromastoffs detektiert. Die Zeitspanne, die benötigt wird, um ein Gleichgewicht im geschlossenen System zu erreichen, variiert in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Menge des Aldehyds im Headspace ändert sich bei 50°C erst nach sechs, bei 60°C nach vier und bei 80°C nach zwei Stunden nicht mehr. Dies deutet darauf hin, daß erwartungsgemäß mit zunehmender Temperatur der Komplex in Wasser schneller dissoziiert und den Aromastoff freisetzt.

Eine Überführung des geschlossenen Systems in ein offenes könnte weiterhin das bestehende Gleichgewicht zur vollständigen Dissoziation hin verschieben, sodaß letztendlich alle Aromastoffmoleküle aus der Helix entweichen können. Um dies zu belegen wird eine sukzessiven Entnahme der Headspace-Volumina aus ein und derselben Probe bei 50°C durchgeführt. Nach sechsmaliger aufeinanderfolgender stündlicher Entnahme von 500 µl aus dem Headspace-Volumen tritt verglichen mit

der einmaligen Entnahme nach sechs Stunden 5% mehr Hexanal in den Gasraum über, wenn die vorherig entnommenen Hexanalmengen in der Berechnung mitberücksichtigt werden.

Erhöht man nun die Wassermenge der Probe, sodaß eine 2%-ige Suspension vorliegt, so beobachtet man eine qualitativ ähnliche Freisetzungskarakteristik (siehe Abb. 18) wie im Falle der 9%-igen Suspension. Allerdings führt die erhöhte Wassermenge zu einer Reduktion der detektierten Headspace-Konzentration des Hexanals. Unter Gleichgewichtsbedingungen gehen z.B. bei 40°C statt 26% nur 8% Hexanal in die Gasphase über, d.h. die 5-fache Erhöhung der Wassermenge reduziert die Freigabe in die Gasphase auf ein Drittel. Bei 60°C verringert sich die freigesetzte Hexanalmenge um circa die Hälfte von 45% auf 25%. Auch bei 80°C macht sich eine Reduktion um ein Viertel von 50% auf 36% bemerkbar.

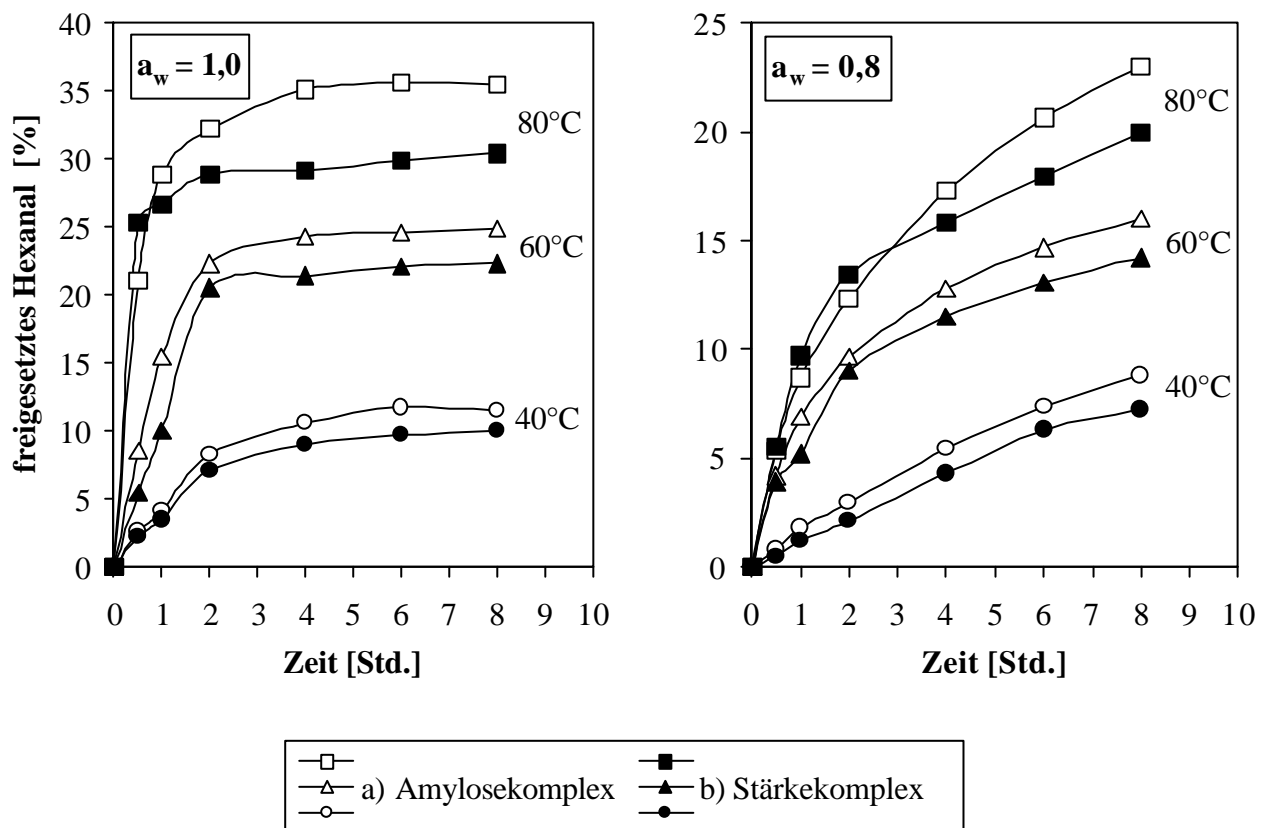


Abb. 18: Freisetzungskarakteristik von Hexanal aus einer 2%-igen wäßrigen Suspension eines Hexanal-Amylosekomplexes mit einer Wasseraktivität $a_w=1,0$ und $a_w = 0,8$ (Gastgehalt: Komplex a) 75 mg/g Amylose nach Waschen mit CH_2Cl_2 Komplex b) 58 mg/g Stärke nach Waschen mit CH_2Cl_2)

Ursächlich für die etwas unterschiedliche Abschwächung der freigesetzten Hexanalmengen in Abhängigkeit von der Temperatur sind sowohl die temperaturabhängige Dissoziation des Komplexes als auch die temperaturabhängige Löslichkeit des Gastes in Wasser. Bedenkt man, daß die Wasserlöslichkeit von Hexanal bei 80°C 3,4 mg Hexanal pro g Wasser beträgt, so liegt die Hexanalmenge in der 2%-igen wäßrigen Suspension mit nur 1,5 mg/g Wasser erheblich unter der maximalen Löslichkeit, wogegen bei der 9%-igen Suspension die Gesamtmenge an Hexanal (1,5 mg pro 200 mg Wasser) über der maximalen Löslichkeit einzuordnen ist. Damit können die höheren Freisetzungsraten im letzteren Fall begründet werden.

Für die Qualität von Lebensmitteln spielt die sogenannte Wasseraktivität a_w eine große Rolle, da sie den Ablauf verschiedener Prozesse in der Lebensmitteltechnologie steuert. Sie beschreibt das Verhältnis von Wasserdampfpartialdruck des Lebensmittels zu dem Sättigungsdampfdruck des Wassers. Reines Wasser entspricht dabei einer Wasseraktivität von Eins, wasserfreie Produkte weisen eine Wasseraktivität von Null auf.

Unter Verwendung von Glucose bzw. Maltose und Zusatz einer definierten Wassermenge kann ein Medium mit einer bestimmten Wasseraktivität zwischen 1 und 0 erstellt werden. Um eine Wasseraktivität von $a_w = 0,8$ zu erreichen, wird 71,25% wasserfreie Glucose mit 28,75% Wasser zu einem Glucose-Sirup vermischt. Gibt man nun 20 mg des Hexanal-Amylosekomplexes in 1 g dieses Mediums, so findet man eine abweichende Freisetzungseigenschaft als im Falle von $a_w = 1$, wie man in Abb. 18 erkennen kann. In dem zugesetzten Glucosesirup diffundieren aufgrund seiner höheren Viskosität die dissoziierten Gastmoleküle viel langsamer als im reinen Wasser in den Gasraum, daher wird sogar bei Temperaturen von 80°C selbst nach 8 Stunden kein Gleichgewicht erreicht. Eine 20%-ige Hexanalabgabe in den Headspace bei 80°C wird bei $a_w = 1,0$ in einer halben Stunde erreicht, während bei $a_w = 0,8$ dafür sechs Stunden benötigt werden. Die Auswirkungen des zähflüssigen Mediums auf die Freisetzungsgeschwindigkeiten bei tieferen Temperaturen sind ähnlich. Von 40°C bis 80°C wird bei Zusatz von reinem Wasser z.B. nach zwei Stunden ca. die dreifache Aromastoffkonzentration im Headspace im Vergleich zu $a_w = 0,8$ gefunden.

Neben der Komplexbildung von Hexanal mit der entfetteten und fraktionierten Amylose wird die entfettete Amylomais-70-Stärke als ein alternativer Wirt eingesetzt. Der Gastgehalt dieses Stärke-Komplexes, dessen Freisetzungseigenschaft verglichen zum Amylosekomplex in Abb. 18 skizziert ist, ist mit

5,8% etwas geringer. Beide Komplexe weisen die gleiche Freisetzungskinetik auf, mit dem einzigen Unterschied, daß beim Stärkekomplex unter gleichen Bedingungen bis zu 5% niedrigere Freisetzungsraten detektiert werden. Dies läßt darauf schließen, daß die Dissoziation des Hexanals in Abhängigkeit von der Wirtsquelle in unterschiedlichem Maße stattfindet. Aufgrund dessen wird im Kapitel 2.4 dieser Aspekt genauer untersucht, indem die Assoziationskonstanten mehrerer Hexanal-Komplexe mit verschiedenen Amylosequellen bestimmt werden.

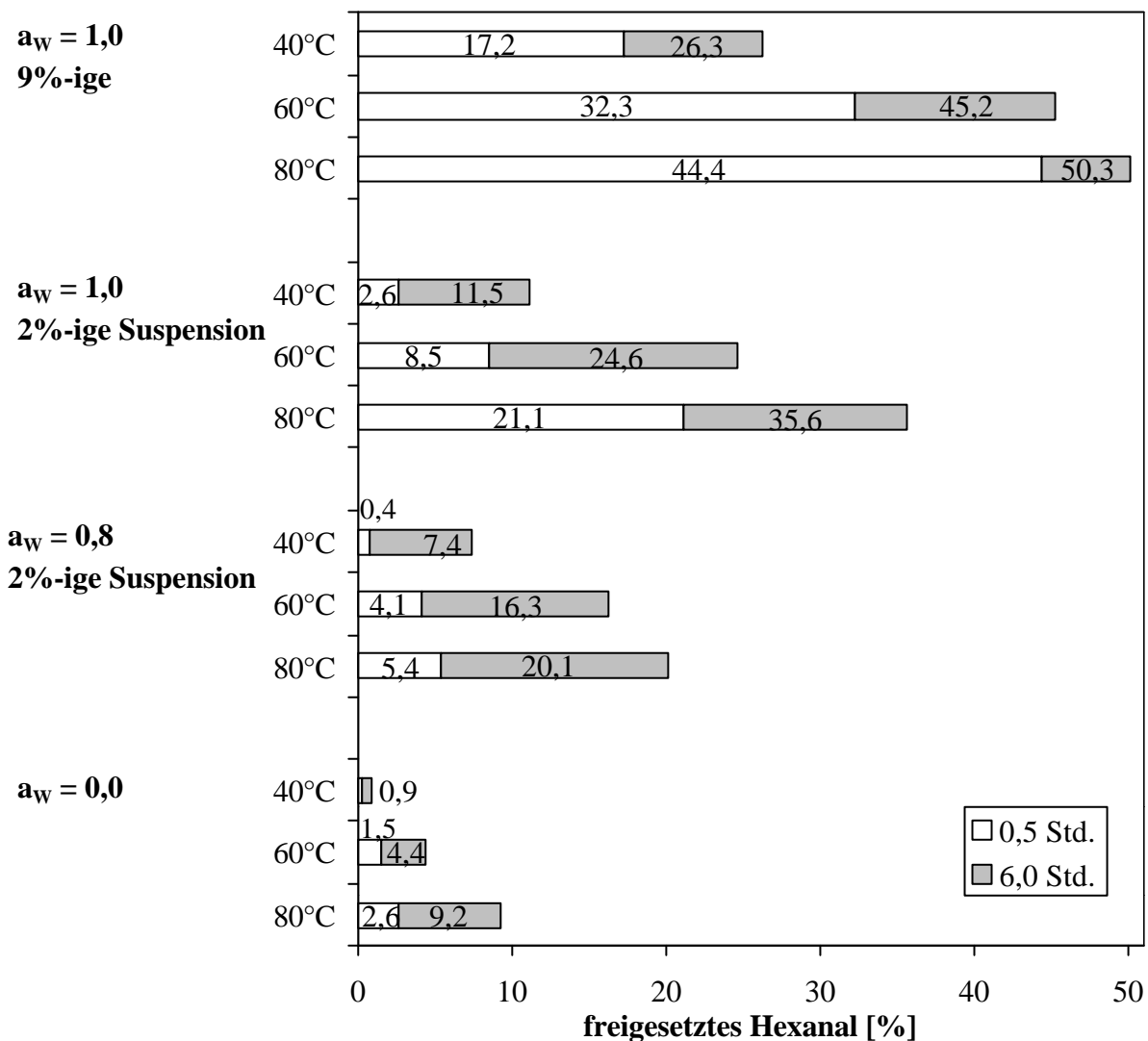


Abb. 19: Schematische Auflistung der Freisetzungsraten des Hexanals aus einem Hexanal-Amylosekomplex (Gastgehalt: 75 mg/g Amylose) in Abhängigkeit von Medium, Temperatur und Zeit

Zusammenfassend läßt sich für den Hexanal-Amylosekomplex festhalten, daß durch Anfeuchten mit Wasser ($a_w = 1,0$) ein schlagartiges Entweichen des Aromastoffes bewirkt wird, das mit zunehmender Temperatur deutlicher ausgeprägt ist. Im geschlossenen System wird nach wenigen Stunden abhängig von der Temperatur eine Sättigungskonzentration des Aromastoffes im Gasraum erreicht. Aus der graphischen Gegenüberstellung der Werte in Abb. 19 erkennt man beispielsweise, daß im Falle der 9%-igen Suspension in der ersten halben Stunde bei 40°C 65%, bei 60°C 71% und bei 80°C 89% der maximalen Freisetzungsrates im Headspace des geschlossenen System ermittelt werden. Das gleiche Phänomen findet sich ebenso bei der 2%-igen Suspension in Wasser wieder, wobei die prozentualen Verhältnisse sich von 22% (40°C) bis hin zu 59% (80°C) erhöhen. Bei niedrigerer Wasseraktivität von ($a_w = 0,8$) wird eine langsamere Freisetzung registriert, sodaß nach 6 Stunden kein Gleichgewichtszustand erreicht wird. Hier wird eher eine stetige Zunahme der Aromastoffkonzentration im Headspace mit der Zeit detektiert, wobei bei 60°C und 80°C die Freisetzungsrates der ersten halben Stunde verglichen mit der nach 6 Stunden nur 4% ausmacht. Im Falle des trockenen Komplexpulvers ($a_w = 0,0$) können nur bei erhöhten Temperaturen die innerhalb der Helix eingeschlossenen Aromastoffe recht langsam freigegeben werden.

Durch die Erfüllung folgender Voraussetzungen wird der Einsatz der einzelnen komplexierten Aromastoffe mittels Amylose in der Aromatisierung der Instant-Trockenprodukte ermöglicht:

1. die Stabilisierung der Aromastoffe in trockenem Zustand bei niedrigen Temperaturen
2. die einfache Dosierung der pulverförmigen Komplexe
3. die anfänglich spontane aber auch über einen längeren Zeitraum andauernde Freisetzung (besonders bei Wasseraktivitäten um $a_w = 1,0$, wie sie bei den meisten Speisen angetroffen werden).

II. Vergleich des Freisetungsverhaltens von adsorbierten und inkludierten Aromastoffmolekülen

Des weiteren ist von besonderem Interesse die Frage, inwieweit die Freisetzung der adsorbierten flüchtigen Moleküle sich von der Entfernung der inkludierten Aromastoffe aus dem Helixinneren unterscheidet. Hierfür wird eine größere Menge eines Hexanal-Amylosekomplexes hergestellt, der nach dem Gefrier-trocknungsschritt in zwei Portionen unterteilt wird. Die erste Hälfte (ungewaschener Komplex) enthält neben den inkludierten noch oberflächlich adsorbierte Aldehydmoleküle, während die zweite Hälfte (gewaschener Komplex) nach darauffolgendem Waschen mit Methylchlorid vollständig vom oberflächlich adsorbierten Aromastoffanteil befreit ist. Geht man davon aus, daß während des Waschprozesses keine komplexierten Gastmoleküle verloren gehen, weist der ungewaschene Komplex mit einem Gesamtgastgehalt von 8,4% verglichen mit dem gewaschenen Komplex noch zusätzlich 0,9% an adsorbiertem Hexanal auf.

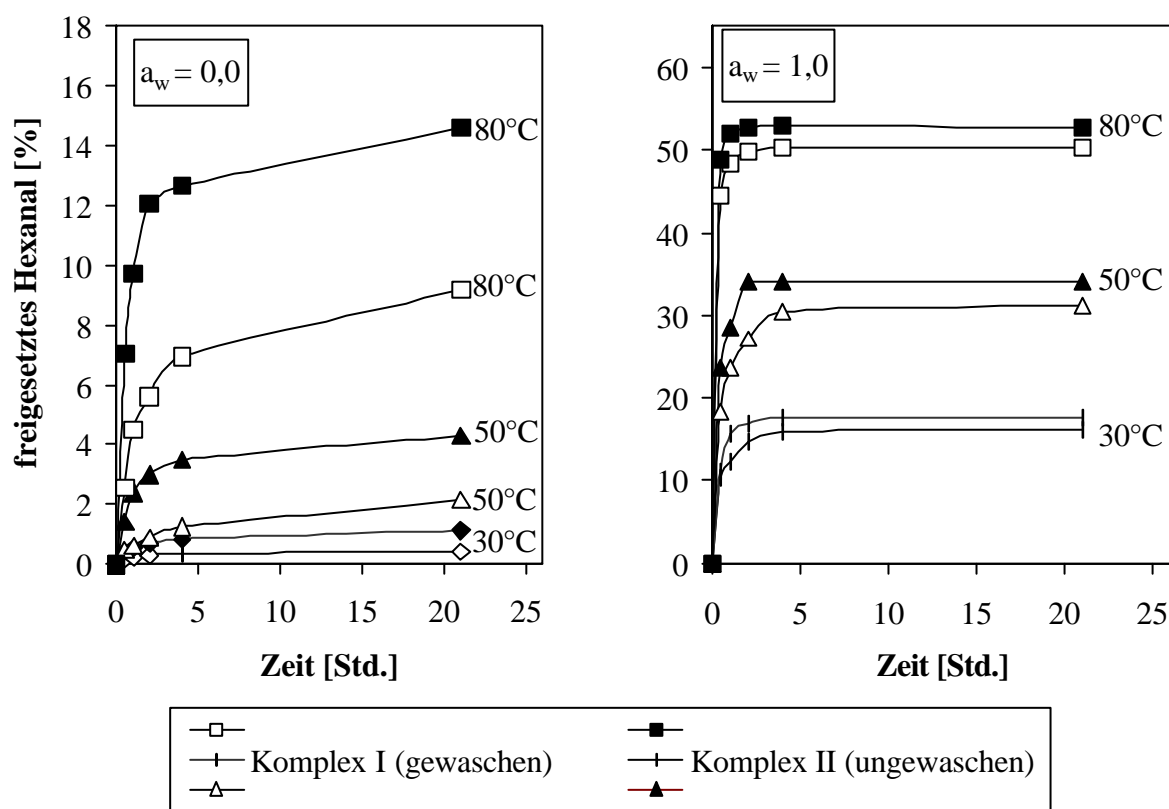


Abb. 20: Freisetzungskarakteristik bei den Wasseraktivitäten $a_w = 0,0$ und $1,0$ zweier unterschiedlicher Hexanal-Amylosekomplexe :
 Komplex I : 7,5 % inkludiertes Hexanal nach Waschen mit CH_2Cl_2
 Komplex II : 8,4% inkludiertes + adsorbiertes Hexanal

Vergleicht man die Freisetzungsraten der beiden Komplexe bei $a_w=0$ und $a_w=1$, so zeigt der ungewaschene Komplex von 30°C bis 80°C eine erhöhte Konzentration des Aromastoffes im Headspace, die offensichtlich auf die leichte Desorption der schwach gebundenen adsorbierten Aromastoffmoleküle beruht. Betrachtet man die Freisetzungsgeschwindigkeit des Hexanals, so fällt auf, daß in den ersten beiden Stunden beim ungewaschenen Komplex eine verstärkte Freigabe in den Gasraum erfolgt. Besonders deutlich fällt dieses Verhalten bei 80°C auf, womit gezeigt wird, daß das Ablösen des Aromastoffes von der Helixoberfläche recht rasch vonstatten geht. Die Freisetzungsgraphen für beide Komplexarten sind nach zwei Stunden parallel verschoben, was das Beenden der Desorption des flüchtigen Hexanals von der Helixoberfläche indiziert.

Die folgende tabellarische Übersicht gibt Auskunft über den Anteil der desorbierten Moleküle, der im Headspace nach 21 Stunden registriert wird. Der Berechnung wird zugrundegelegt, daß in 20 mg jeder Probe 0,18 mg adsorbiertes Hexanal enthalten sind.

Temperatur	$a_w = 0,0$	$a_w = 1,0$
30°C	7%	28%
50°C	22%	39%
80°C	59%	49%

Tab. 13: Prozentuale Verteilung der adsorbierten Hexanalmoleküle im Gasraum bei unterschiedlichen Bedingungen

Erwartungsgemäß gehen mit steigender Temperatur aus dem trockenen Komplexpulver zunehmend mehr adsorbierte Aromastoffmoleküle direkt in den Gasraum über, sodaß bei 80°C eine 59%-ige Desorption ermittelt wird. Normalerweise dürften bei solch hohen Temperaturen nach 21 Stunden keine flüchtigen Hexanalmoleküle mehr an der Helixoberfläche haften bleiben. Deswegen kann angenommen werden, daß der rechnerisch festgesetzte Gesamtanteil an adsorbierten Aromastoffmolekülen in Wirklichkeit etwas geringer ausfällt. Dies läßt wiederum auf ein während des Waschprozesses geringfügiges Mitentfernen der komplexierten Hexanalmoleküle folgern.

Waschversuche zeigten mit zunehmender Dauer und Häufigkeit des Waschvorganges einen Anstieg des Verlustes an ursprünglich inkludierten

Molekülen. Bei der späteren Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten (Kap.2.4) wird dies ausgenutzt, um ausgehend von einer definierten Komplexstöchiometrie Aromastoff-Komplexe mit unterschiedlichen Gastgehalten zu erzeugen.

Im wäßrigen Medium registriert man ebenfalls eine Erhöhung der desorbierten Verbindungen im Headspace von 28% bei 30°C bis zu 49% bei 80°C. Bemerkenswert ist hierbei, daß bis zu 50°C bei $a_w=1$ eine größere freigesetzte Hexanalkonzentration als bei $a_w=0$ festgestellt wird, während bei 80°C die Verhältnisse sich umkehren. Das wäßrige Medium führt auf der einen Seite zur spontanen Freigabe des Aromastoffes, aber auf der anderen Seite bleibt ein Teil der flüchtigen Verbindungen in Wasser gelöst, so daß hier bei 80°C weniger desorbiertes Hexanal als im Falle des trockenen Komplexpulvers im Headspace angetroffen wird.

III. Vergleich der Freisetzungskarakteristik von Aromastoffen, die einerseits als Einzelkomponenten und andererseits im Gemisch komplexiert werden

Im Folgenden soll das Freisetzungsverhalten eines Misch-Komplexes untersucht und mit dem der entsprechenden beiden Mono-Komplexe verglichen werden. Hierfür wird ein Hexanal-Nonenal-Amylosekomplex ausgewählt, dessen Molverhältnis von Hexanal zu Nonenal 1 : 4,2 entspricht. Das Freisetzungsverhalten beider Aldehyde unter Zusatz von 400 mg Wasser zu 40 mg Komplexpulver wird in Abb. 21 dargestellt.

Man erkennt unabhängig von der Temperatur einen rapiden Anstieg der freigesetzten Aldehydmengen innerhalb der ersten Stunde und nach einiger Zeit das Erreichen einer Sättigungskonzentration im Headspace (zumindest für das Hexanal, ähnlich wie bei seiner vorherigen Freisetzung aus dem Mono-Komplex). Der Kurvenverlauf dieser Freisetzungskinetik weicht vom bisherig festgestellten idealen Verlauf der Freisetzungskinetik der Mono-Komplexe insbesondere für das Nonenal etwas ab.

Der Grund hierfür liegt einerseits in den resultierenden kleinen Peakflächen des Nonenals, deren Auswertung mit einer größeren Ungenauigkeit behaftet ist. Andererseits können kleinere Schwankungen der Komplexstöchiometrien der untersuchten Mischkomplex-Proben nicht ausgeschlossen werden. Die damit fehlerbehaftete Berechnung der Freisetzungsmengen trägt zu den obig erwähnten Abweichungen vom idealen Kurvenverlauf bei. Der längerkettige Aldehyd besitzt einen niedrigeren Dampfdruck als Hexanal und wird daher selbst bei 80°C nur bis zu maximal 7% im Gasraum angetroffen. Außerdem weist die sechsfach

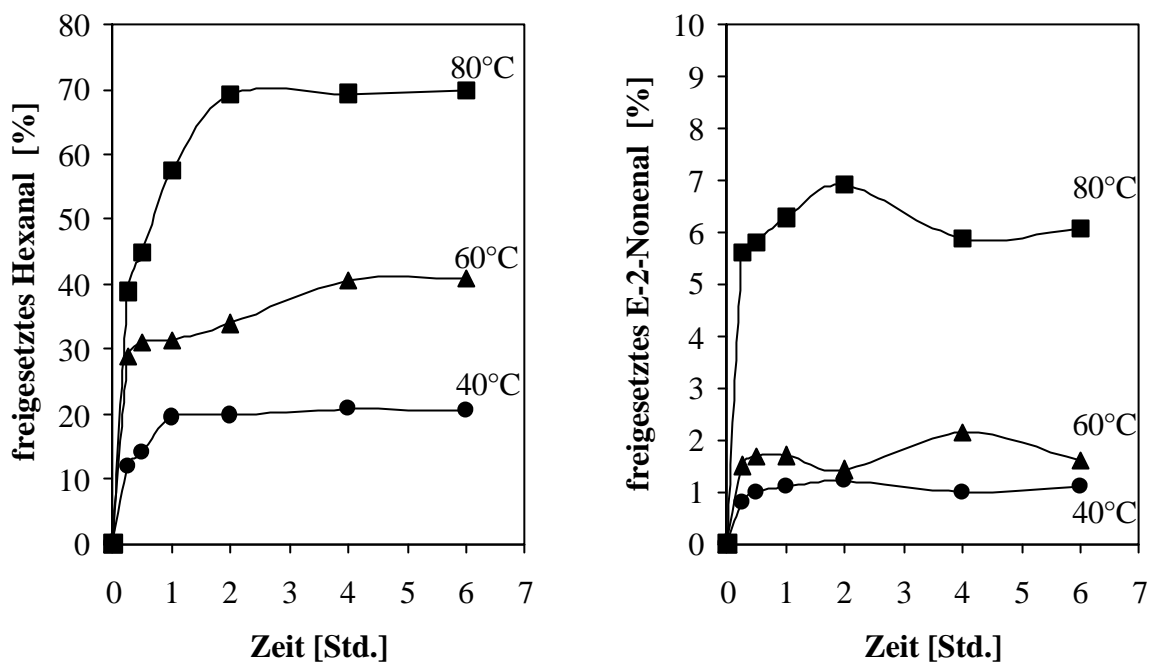


Abb. 21: Freisetzungskarakteristik von Hexanal und Nonenal aus einer 9%-igen wäßrigen Suspension eines Hexanal-E-2-Nonenal-Amylosekomplexes (Hexanal-Gastgehalt: 0,4% und Nonenal-Gastgehalt : 1,1%)

höhere Assoziationskonstante des Nonenals-Amylosekomplexes (mit $K = 240 \text{ l/mol}$ siehe Kap. 2.4) auf einen deutlich niedrige Dissoziation und damit auf eine geringere Freigabe in Lösung hin. Offensichtlich spielt die geringere Wasserlöslichkeit des Nonenals bei seiner Freisetzung aus dem Komplex eine untergeordnete Rolle, denn diese würde eher eine Zunahme des Aromastoffes in den Gasraum bewirken.

Um die Freisetzungskarakteristiken verschiedener Komplexierungsformen miteinander zu vergleichen, werden auf der einen Seite ein Bi-Komplex und auf der anderen Seite die Mischung zweier Mono-Komplexe der beiden Aldehyde, mit jeweils den gleichen Mengen an inkludierten Gästen nach Zusatz von 400 mg Wasser gaschromatographisch analysiert. Die genauen Angaben sind in in Abb. 22 aufgelistet. In allen Proben befinden sich 0,16 mg Hexanal und 0,44 mg E-2-Nonenal. Der Amylosegehalt ist annähernd gleich. Die Freisetzungsraten beider Aldehyde weisen auf ein verstärktes Entweichen beider Aromastoffkomponenten im Falle der Mischkomplexierung hin. Nach sechs

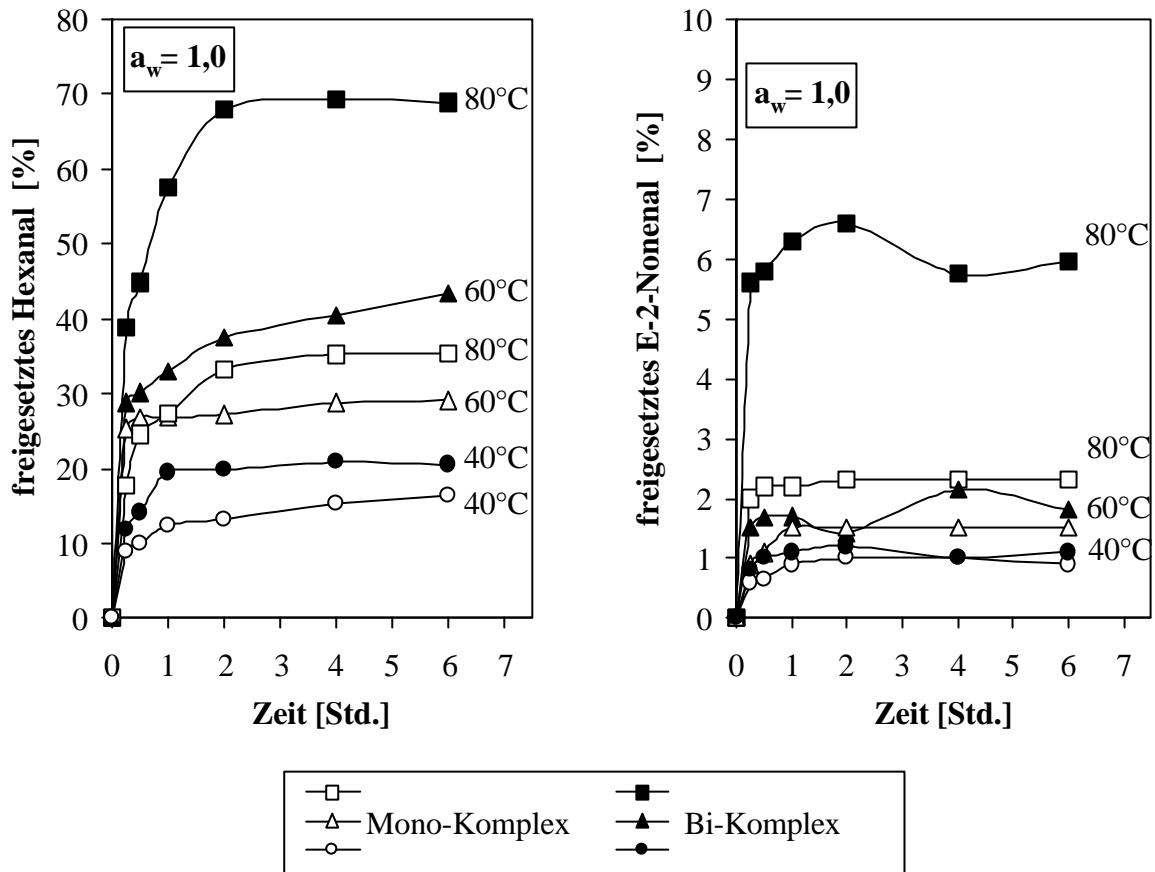


Abb. 22: Vergleich der Freisetzungskinetik obiger Komplexsysteme in Abhängigkeit von der Komplexierungsform:

2 Mono-Amylosekomplexe [Gastgehalte in %]	Bi-Amylosekomplex [Gastgehalte in %]
2,2 mg Hexanal-Komplex [7,5 %] + 36,0 mg Nonenal-Komplex [1,12%]	40 mg Hexanal-Nonenal-Komplex [0,4% Hexanal & 1,1% Nonenal]

Stunden belüftet sich die Freisetzung des Hexanals zwischen 20% (bei 40°C) und 70% (bei 80°C), wogegen der Mono-Komplex zwischen 16% (bei 40°C) und 35% (bei 80°C) seines Hexanals freisetzt. Nach sechs Stunden variieren die verflüchtigten Nonenalmengen im Mono-Komplex zwischen 0,9% und 2,3% und im Bi-Komplex zwischen 1,2% und 6,3%. Bei 80°C wird nach 6 Stunden im Bi-Komplex doppelt soviel Hexanal im Headspace registriert als im Falle Einzelkomplexierung. Bei niedrigeren Temperaturen ist dieser Effekt

abgeschwächt, da bei 60°C etwa die Hälfte und bei 40°C etwa ein Viertel mehr an Hexanal im Gasraum vorliegt.

Diese Resultate implizieren, daß bei der Inklusion mehrerer Aromastoffkomponenten ein statistischer Einschluß beider Gäste innerhalb einer Amylosehelix stattgefunden haben muß. Beim Anfeuchten des erhaltenen Komplexpulvers bedingt das Nebeneinandervorliegen zweier unterschiedlicher Gäste die leichtere Ablösung aus dem Helixinneren.

Des weiteren stellt sich die Frage, ob eine Mischung zweier Gastmoleküle, die aufgrund ihrer Struktur unterschiedliche Helixdiameter induzieren können (Bsp.: Hexanal und Guajacol), einen ebenso großen Einfluß auf das Freisetzungverhalten ausüben. Zusätzlich soll getestet werden, ob unterschiedliche Komplexstöchiometrien sich hinsichtlich der Freisetzungsraten unterschiedlich auswirken können. Daher werden Headspace-Messungen mit den folgenden beiden Systemen, in denen Einschlußverbindungen mit Hexanal und Guajacol vertreten sind, ausgewählt.

Aufgetragen wird nur die Freisetzung des leichtflüchtigeren Hexanals, da die detektierten Guajacolumengen im Headspace selbst bei 80°C unterhalb von 1% liegen, sodaß auf die Erstellung der Freisetzungskarakteristiken des Aromaten verzichtet wird. Ausgewählt werden die oben aufgeführten Systeme, deren Hexanal-Konzentration im Gasraum nach Zugabe von 400 mg Wasser in bestimmten Zeitabständen quantifiziert wird.

Vergleichbar mit den Ergebnissen des Hexanal-Nonenal-Amylosekomplexes findet auch hier im Falle der Mischkomplexierung eine verstärkte Freisetzung des leichtflüchtigeren Hexanals statt (Abb. 23). Allerdings verhalten sich je nach Gastkombination die prozentualen Zuwächse der verflüchtigten Hexanalmengen in Abhängigkeit von der Temperatur etwas anders: Schon bei niedrigen Temperaturen wie 40°C und 60°C verdoppelt sich nach 6 Stunden im Hexanal-Gujacol-Komplex die Hexanal-Konzentration in der Gasphase, während im Hexanal-Nonenal-Komplex die Hexanalmenge um ein Viertel (bei 40°C) bzw. um die Hälfte (bei 60°C) steigt. Bei 80°C kehren sich die Verhältnisse etwas um, da im letzteren Komplex eine Verdoppelung der verflüchtigten Hexanalmenge von 35% auf 70% detektiert wird, aber der Bi-Komplex mit den strukturell unterschiedlichen Gästen weist eine Zunahme um 70% bezogen auf den entsprechenden Mono-Komplex auf.

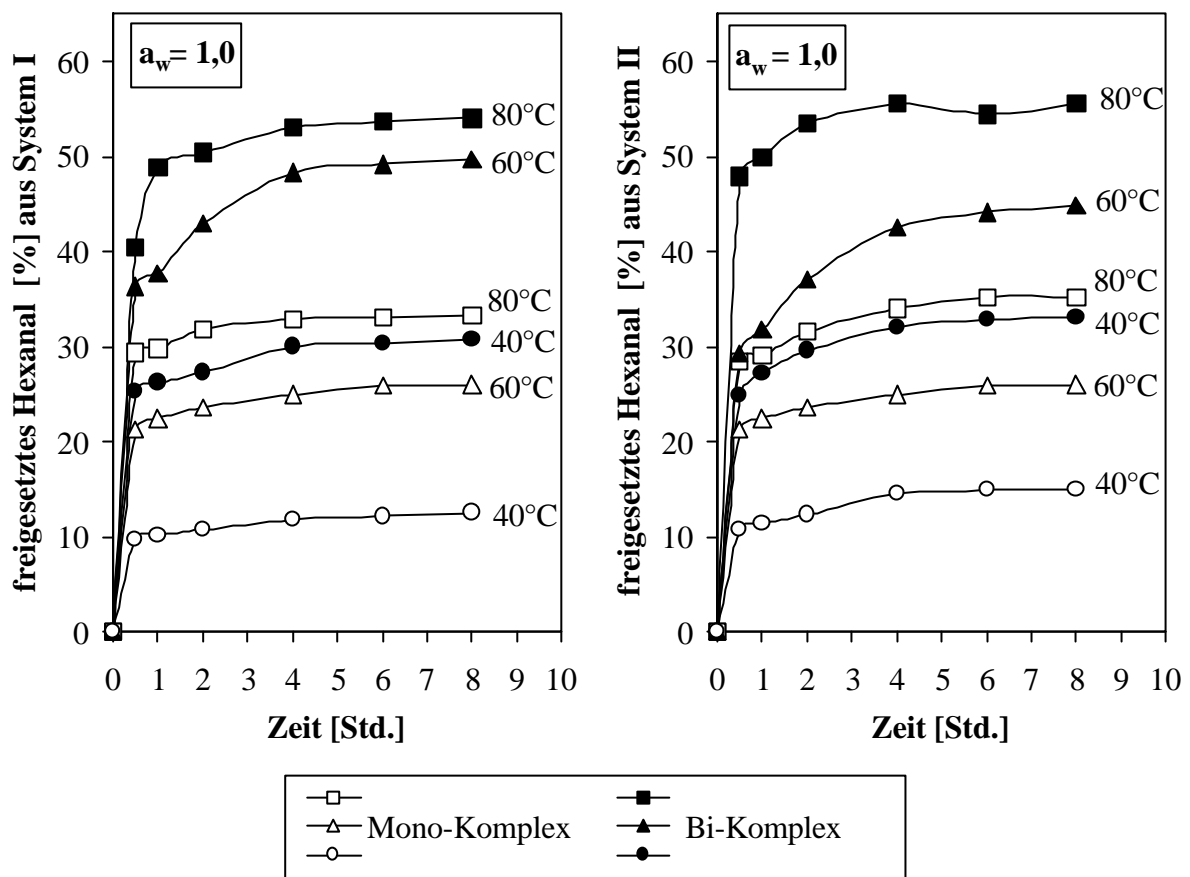


Abb. 23: Vergleich der Freisetzungskinetik des Hexanals aus zwei unterschiedlichen Komplexsystemen in Abhängigkeit von der Komplexstöchiometrie

	2 Mono-Amylosekomplexe [Gastgehalte in %]	Bi-Amylosekomplex [Gastgehalte in %]
System I	4,8 mg Hexanal-Komplex [7,5 %] + 8,2 mg Guajacol-Komplex [4,4%]	40 mg Hexanal-Guajacol-Komplex [0,9% Hexanal + 0,9%Guajacol]
System II	1,6 mg Hexanal-Komplex [7,5 %] + 15,5 mg Guajacol-Komplex [4,4%]	40 mg Hexanal-Guajacol-Komplex [0,3% Hexanal + 1,7%Guajacol]

Betrachtet man die Systeme I und II des Hexanal-Guajacol-Komplexes, so übt der unterschiedliche Gastgehalt keinen wesentlichen Einfluß auf die Freisetzungsraten aus.

Am Schluß wird das Freisetzungsverhalten des im folgenden beschriebenen Trikomplexes in 400 mg Wasser ermittelt, wenn Hexanal, Nonenal und Guajacol als Gastkomponenten eingesetzt werden. Aus Abb. 24 wird ersichtlich, daß ein Freisetzungsverhalten analog zum vorherigen Bi-Komplex resultiert.

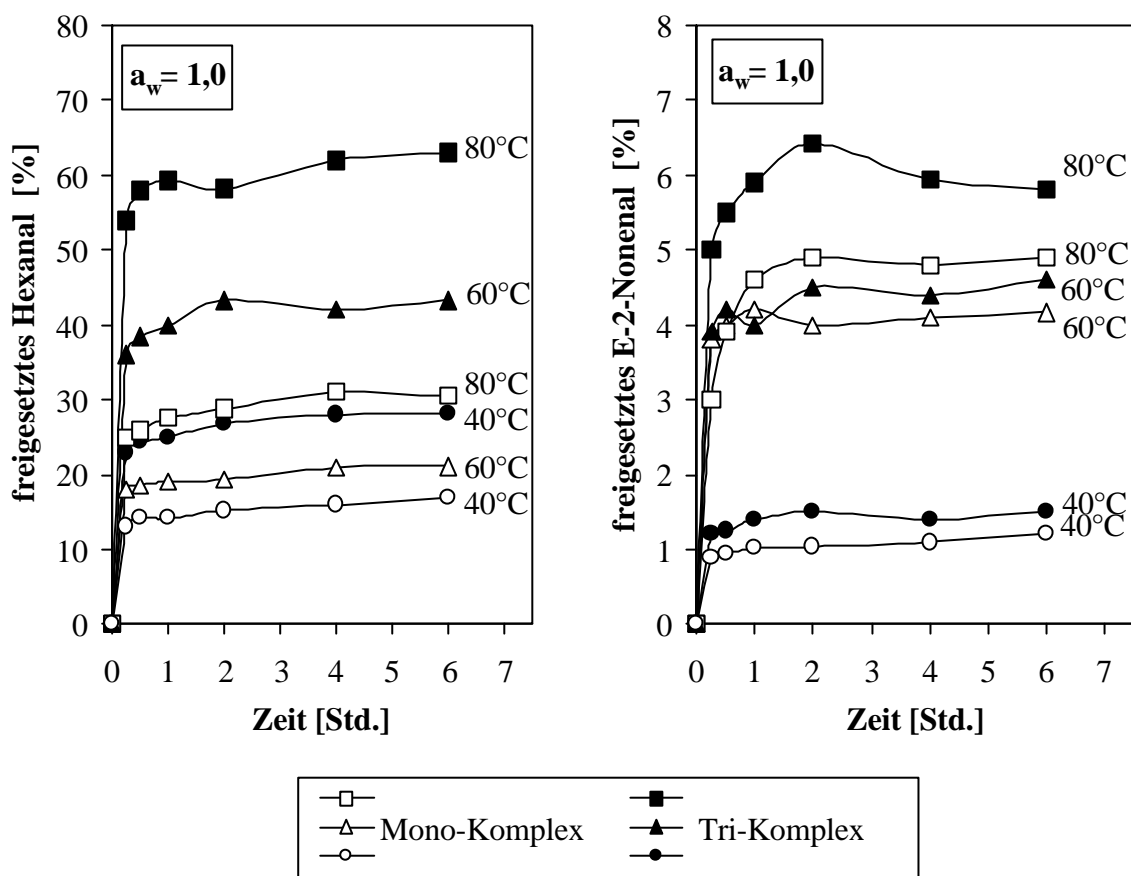


Abb. 24: Vergleich der Freisetzungskinetik folgender Komplexsysteme in Abhängigkeit von der Komplexierungsform:

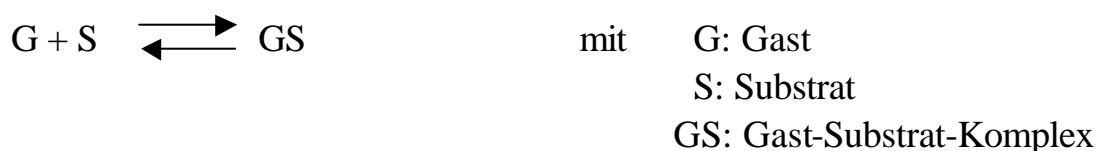
3 Mono-Amylosekomplexe <i>[Gastgehalte in %]</i>	Tri-Amylosekomplex <i>[Gastgehalte in %]</i>
4,3 mg Hexanal-Komplex [7,5%] + 8,3 mg Nonenal-Komplex [2,9%] + 13,6 mg Guajacol-Komplex [4,4%]	40 mg Hexanal-Nonenal-Guajacol-Komplex [0,8% Hexanal + 0,6% Nonenal + 1,5% Guajacol]

Letztendlich läßt sich zusammenfassen, daß verglichen mit dem Mono-Komplex von 40°C bis 80°C die Zugabe von Wasser zu einem Mischkomplex mit einer Erhöhung der Freisetzung der flüchtigen Verbindungen verbunden ist. Dabei tritt unabhängig von der zugrundegelegten Komplexstöchiometrie eine gleich hohe Freisetzungszunahme auf. Sie ist bei niedrigen Temperaturen signifikanter, wenn die Gastmoleküle unterschiedliche Helixdiameter induzieren. Der Einfluß der Komplexierungsform auf das Freisetzungsverhalten kann so interpretiert werden, daß beim Komplexieren im Gemisch die beiden Gäste innerhalb einer gleichen Helix statistisch verteilt sind. Denn nur dadurch wird eine helikale Umgebung erzeugt, die für einige Gastmoleküle anders als im Mono-Komplex ausgeprägt ist, welche die bessere Ablösung des Gastes von dem Helixinnenraum bei der Zugabe von Wasser zur Folge hat.

2.4 Bestimmung der Assoziationskonstanten der Amylosekomplexe in Abhängigkeit von der Gastverbindung und der Amylosequelle

Um Aussagen über die Wechselwirkungen zwischen Gast- und Wirtmolekül machen zu können, werden die Stabilitätskonstanten der entstehenden Komplexe herangezogen. Zu ihrer Bestimmung wurden eine Reihe spektroskopischer Methoden wie UV-, NMR- und Fluoreszenzspektroskopie^{87,88} und analytischer Verfahren wie Gaschromatographie und amperometrische Titration, die untenstehend näher erläutert wird, entwickelt.⁸⁹

Bei der Iodtitration wird die Fähigkeit des Iods, sich quantitativ in helikale Bereiche der Amylose (bzw. Stärke) einzulagern, ausgenutzt. Dabei wird durch Zugabe eines Komplexbildners erreicht, daß das Iod aus dem Stärkekomplex teilweise durch den neuen Komplexbildner verdrängt wird, sodaß auf diese Weise eine Konkurrenzreaktion zwischen Iod und dem zugesetzten Gast um die Stärkekomplexierungsplätze stattfindet. In diesem Zusammenhang ist es möglich, über den in dieser Methode erfassten Iodbindungsgrad das Komplexierungsvermögen der Stärke in Abhängigkeit von der zugesetzten Gastmenge amperometrisch zu bestimmen. Bei einem Komplexierungsgrad von 50 % gilt in erster Näherung nach dem Massenwirkungsgesetz für die Assoziationskonstante K:



$$(4) \quad K = \frac{1}{[G]} \quad \text{wenn } [GS] = [S]$$

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Assoziationskonstanten stellt das von M. A. Rutschmann und J. Solms^{90,91} entwickelte quantitative Verfahren zur Bestimmung der Komplexpartner im Gleichgewichtszustand dar. Hierbei wird ein Bindungsmodell zugrunde gelegt, bei dem ein Makromolekül mehrere voneinander abhängige und gleichwertige Bindungsstellen besitzt. Zur Auswertung der Methode werden die Bindungsisothermen herangezogen: Unter isothermen Bedingungen wird dabei das Verhältnis der Konzentration an gebundenem Gast zu der Gesamtkonzentration an Stärke gegen die Konzentration an freiem Gast bei unverändert bleibender Stärkekonzentration aufgetragen. Um diese zur Erstellung der Isothermen benötigten Daten zu erhalten, werden die im

Gleichgewichtszustand befindlichen Komplexlösungen mit unterschiedlichen Wirt/Gast-Konzentrationsverhältnissen rasch eingefroren. Eine selektive Verflüchtigung adsorbierter Gastmoleküle kann durch eine längere Gefriertrocknung der eingefrorenen Lösungen gewährleistet werden. Zur Bestimmung der Konzentration der inkludierten Gastmoleküle werden diese aus den Komplexen extrahiert und gaschromatographisch quantifiziert.

Die erhaltenen Bindungsisothermen zeigen einen sigmoidalen Verlauf, der den Einfluß der Ligandenkonzentration auf den Bindungsvorgang darstellt. Aufgrund der Interaktionen zwischen den Bindungsstellen werden die Bindungsisothermen mittels der empirisch ermittelten Hill-Gleichung ausgewertet. Es resultiert ein Datensatz, der den Hill-Koeffizienten, die maximale Anzahl an Bindungsstellen sowie die Assoziationskonstante K enthält. Auf diese Weise wurde für den langkettigen Aldehyd Decanal eine Assoziationskonstante von $K = 2618 \text{ l/mol}$ ermittelt, wobei eine Komplexstöchiometrie von 72 AHG pro Decanalmolekül angesetzt wird.⁹¹ Bei näherer Betrachtung der erhaltenen Werte der Komplexstöchiometrien, sollte die Methode allerdings nur als eine Abschätzung betrachtet werden, da nach den molekularen Dimensionen ca. 10 AHG zu erwarten wären. Die Praxis bestätigt diese Daten, da bei untersuchten Decalkomplexen der Gastgehalt von 7,4 % 12 AHG entspricht.

Bei flüchtigen Gästen können zur Bestimmung von Assoziationskonstanten Headspace-Messungen herangezogen werden, die nach einem von Saito⁹² auf Cyclodextrin-Komplexe angewandtes und später von Guzmán⁹³ auf Amylosekomplexe erweitertes Verfahren durchgeführt wurden.

Die Grundlage bildet dabei die Kopplung des Komplexierungsgleichgewicht mit dem Verteilungsgleichgewicht.

In einem geschlossenen System existieren bei der Bildung eines Aromastoff-Amylosekomplexes nach Erreichen des Gleichgewichtes 3 Arten von Aromastoffmolekülen nebeneinander:

- innerhalb der Helix komplexierte Gastmoleküle,
- in Lösung unkomplexierte d. h. freie Aromaverbindungen und
- im Headspace befindliche Aromastoffmoleküle.

Durch die Komplexierung ändern sich die physikalischen Eigenschaften der Gastmoleküle, so daß die Vereinfachung, daß die komplexierten Moleküle keinen Dampfdruck aufweisen, zulässig ist. Geht man davon aus, daß allein die unkomplexierten Aromastoffmoleküle über einen Dampfdruck verfügen, so kann das Komplexierungsgleichgewicht mit dem Verteilungsgleichgewicht gekoppelt

werden. Dabei wird zwischen den komplexierten und den freien gelösten Gastmolekülen aufgrund des dynamischen Gleichgewichtes nicht unterschieden. Für das Verteilungsgleichgewicht gilt, daß sich der Dampfdruck einer gelösten Substanz gemäß dem Raoult'schen Gesetz proportional zu ihrem Molenbruch verhält. Quantitativ läßt sich dieser Sachverhalt mit dem Verteilungskoeffizienten D beschreiben:

$$(5) \quad D = \frac{[G_{HS}]}{[G_L]} \quad \begin{array}{l} [G_{HS}] = \text{Konzentration des Gastes im Headspace} \\ [G_L] = \text{Konzentration des Gastes im Wasser} \end{array}$$

Zur Ermittlung von D werden Kalibrierlösungen des Gastes in reinem Wasser angesetzt, und nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes die Headspace-Konzentration wie in der untenstehenden Abbildung ermittelt.

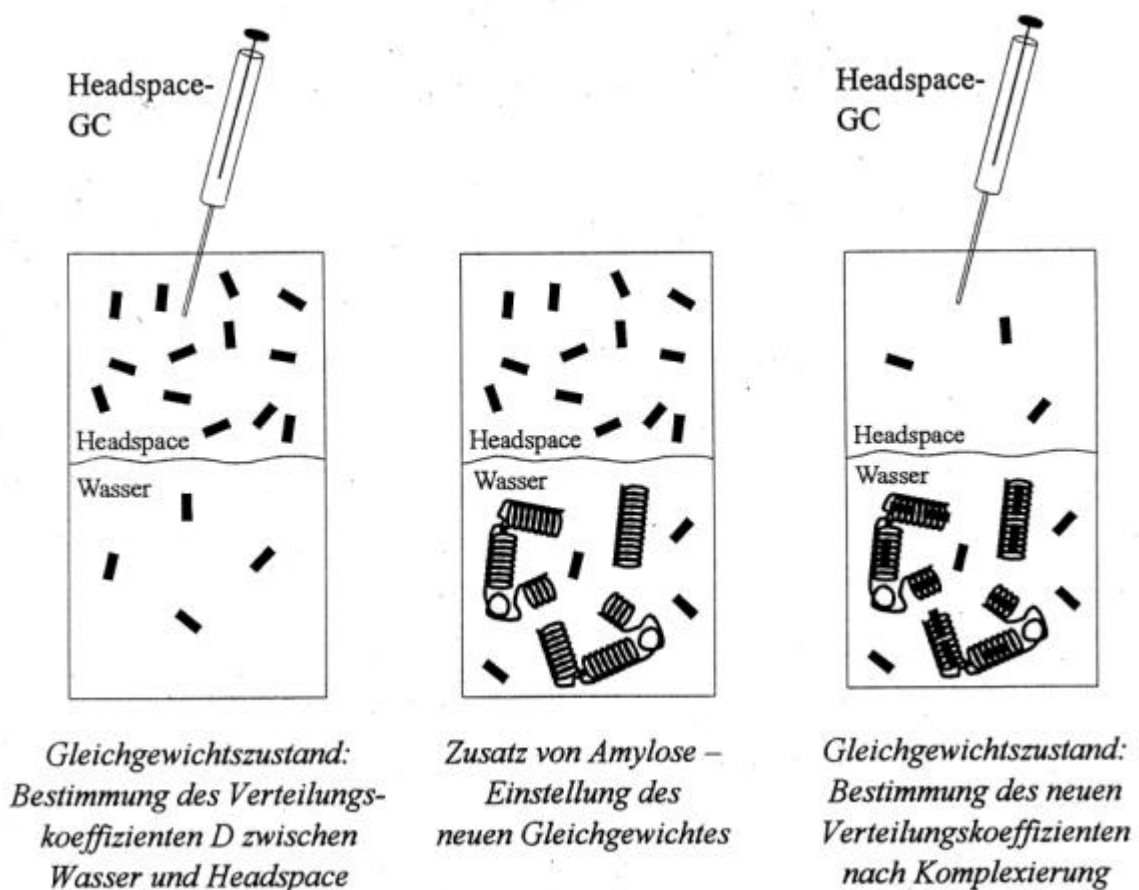
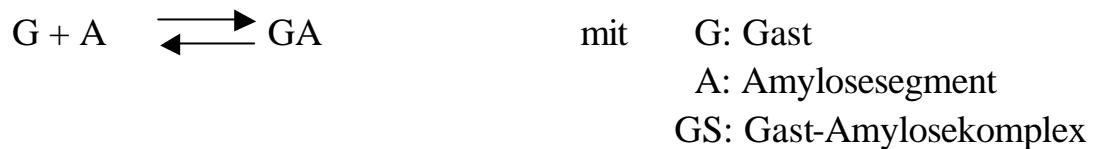


Abb. 25: Vorgänge zur Ermittlung der Verteilungskoeffizienten.⁹³

 : Wirtmolekül;  : Gastmolekül

Gibt man nun zu dieser Gastlösung eine bestimmte Menge an Amylose hinzu, so setzt folgende Komplexbildung ein:



$$(6) \quad K = \frac{[GA]}{[G] \cdot [A]}$$

Zur Vereinfachung der Berechnung wird das Wirtmolekül Amylose, welches mehrere Bindungsstellen besitzt, theoretisch in Segmenten so unterteilt, daß einem Gastmolekül konform seiner molekularen Dimension genau ein Amylosesegment zugeordnet wird.

Nach Erreichen des neuen Gleichgewichtszustandes, der durch die Komplexbildungskonstante K beschrieben wird, kann die verminderte Headspace-Konzentration des Gastes bestimmt werden. Mit dieser neuen Information kann die Assoziationskonstante K in Gleichung (7) umgewandelt werden:

$$(7) \quad K = \frac{[G_0 - G_L - G_{HS}]}{[A_0 - (G_0 - G_L - G_{HS})] \cdot [G_L]}$$

mit $[G_0 - G_L - G_{HS}]$ = Konzentration der inkludierten Aromastoffe
 $[G_0]$ = Gesamtkonzentration des Aromastoffes
 $[A_0]$ = Gesamtkonzentration der Amylose

Die Gesamtkonzentrationen an Gast G_0 und an Amylose A_0 sind von Beginn an bekannt, die Konzentration G_{HS} wird gaschromatographisch bestimmt, und die verbliebene Gastkonzentration in Lösung G_L kann mittels Gleichung (5) errechnet werden.

Das Verfahren wurde bereits von Guzman⁹³ für lösliche Amylosekomplexe unter Verwendung von hydroxypropylierter Kartoffelamylose mit einem Substitutionsgrad von DS = 0,1 angewendet. Die auf diesen Weise erhaltene Assoziationskonstante eines 2-Hexanon-Komplexes ($K = 18,5 \text{ l/mol}$) zeigt eine

gute Korrelation mit dem iterativ errechneten Wert ($K = 25,5 \text{ l/mol}$) aus CD-spektroskopischen Messungen.

Im wässrigem Medium liegen die in dieser Arbeit hergestellten Amylosekomplexe allerdings aufgrund der Schwerlöslichkeit in einem heterogenen System vor. Daher könnten möglicherweise Adsorptionserscheinungen der Aromastoffe an der Oberfläche der Amylose das Dissoziationsgleichgewicht beeinflussen. Allerdings lieferten Vergleichsmessungen des Verteilungskoeffizienten von Hexanal in An- sowie in Abwesenheit von Cellulose, die keine Einlagerungskomplexe zu bilden vermag, gleiche Werte. Bedingt durch das Rühren der Mischung kann ein Auftreten der Adsorption ausgeschlossen werden. Setzt man nun gleiche Adsorptionseigenschaften von Cellulose und Amylose voraus, kann der Effekt der Oberflächenadsorption bei der Bestimmung von K vernachlässigt werden.

Um eine Auswertung der Assoziationskonstanten nach Gleichung (7) zu ermöglichen, müssen unterschiedliche Konzentrationen der Aromastoffe im Komplex eingesetzt werden. Die Variation des Gastgehaltes einzelner Komplexe wird erreicht, indem die aus der gleichen Charge stammenden Aromastoffkomplexe nach Gefriertrocknung unterschiedlich lange mit Methylenchlorid gewaschen werden. Anschließend wird der Gastgehalt $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch ermittelt. Zur Bestimmung der Stabilitätskonstanten werden 1%-ige Suspensionen eingesetzt. Für alle Analysen wird eine konstante Menge an pulverförmigem Komplex in einem Probeglas genau eingewogen und mit einer konstanten Menge an destilliertem Wasser versetzt. Nach mindesten 15 stündigem Rühren sind die Proben äquilibriert, und es werden $500 \mu\text{l}$ aus dem Headspace entnommen.

Zwei Untersuchungreihen werden durchgeführt: Ausgehend von der gleichen Amylosequelle (aus AM-70-Stärke entfettet und mit Cyclohexanon fraktioniert) werden die Assoziationskonstanten für die verschiedenen eingesetzten Aromastoffe ermittelt (Tab. 14). In einer zweiten Reihe wird durch Variation der Amyloseherkunft der Einfluß der Amylosesorte auf das Komplexierungsgleichgewicht unter Verwendung des gleichen Gastmoleküls (Hexanal) herausgestellt (Tab. 15).

Die zur Inklusion eines Gastmoleküls benötigten AHG-Einheiten werden gemäß seiner Dimensionen errechnet und fließen in die Ermittlung der Konstanten ein.

Erwartungsgemäß weisen die Komplexe der vier unterschiedlichen Aromastoffverbindungen verschiedene Stabilitäten auf. Der lineare kurzkettige Aldehyd Hexanal hat die kleinste Assoziationskonstante von 40 mol/l . Wegen der

längeren C-Kette des ungesättigten Aldehyds Nonenal resultierte in diesem Falle eine sechsfach höhere Konstante. Dazwischen liegt die Stabilität des Octenol-Komplexes, wobei hierbei neben der C-Kettenlänge des Alkohols noch die Funktionalität eine Rolle spielt. Sie beeinflusst die Polarität des Gastes und somit seine Wasserlöslichkeit, die einen großen Einfluß auf die Stabilität der gebildeten Komplexe ausübt. Es zeigt sich, daß die stabilsten Komplexe mit dem geometrisch anspruchsvollen und unpolaren Aromaten Guajacol erzielt werden. In diesem Falle resultiert eine 12-fach höhere Assoziationskonstante als beim Hexanal-Komplex. Generell wird mit zunehmender Raumerfüllung des Komplexanden eine erhöhte Stabilität beobachtet. Dies läßt sich auf die größere Anzahl an Anhydroglucoseeinheiten zurückführen, die beim Übergang von der 6-er zur 7-er Helix pro Helixwindung als aktive Bindungsstellen zur Verfügung stehen.

Die Bandbreite der ermittelten Assoziationskonstanten bei den untersuchten Aromastoffen ist relativ groß. Diese Tatsache beruht auf den vielen unterschiedlichen Faktoren, die die Komplexbildungsfähigkeit beeinflussen, wie zum Beispiel:

- sterischer Anspruch und Raumerfüllung des Gastmoleküls
- Polarität und Wasserlöslichkeit
- Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen
- Flüchtigkeit.

Somit sind Vorhersagen zum Ausmaß der Komplexbildungsfähigkeit unterschiedlicher Aromastoffverbindungen nur begrenzt möglich. Lediglich Tendenzen zu ihrer Komplexierbarkeit können unter Berücksichtigung von Informationen über ähnlich strukturierte Gastmoleküle aufgezeigt werden.

Gast	Stöchiometrie [AHG/Gastmolekül]	Assoziationskonst. K [l/mol]	Spanne der Gastgehalte im Komplex
Hexanal	9,0	40 ± 8	63–37 mg/g
1-Octen-3-ol	12,4	120 ± 16	58-45 mg/g
E-2-Nonenal	13,5	240 ± 22	64-54 mg/g
Guajacol	11,0	502 ± 70	56-48 mg/g

Tab. 14: Assoziationskonstanten schwerlöslicher Aromastoffkomplexe mit Amylose aus entfetteter und fraktionierter AM-70-Stärke

Das eingesetzte Wirtmolekül, die fraktionierte Amylose, stellt keine einheitliche Verbindung dar, sondern besitzt aufgrund seiner Herkunft eine breite Molmassenverteilung. Aus mikrokolorimetrischen Messungen ist bekannt, daß eine Abhängigkeit der Komplexstabilität von der Molmasse der verwendeten

Amylosen besteht. Mit zunehmender Kettenlänge erhöht sich bei der Bildung des Natriumdodecylsulfat-Amylosekomplexes die Reaktionsenthalpie (und somit seine Stabilität) bis zu einem Polymerisationsgrad P_n von 200. Bei größeren Molmassen wird keine Molmassenabhängigkeit mehr registriert.^{58,94}

In den weiteren Untersuchungen werden fraktionierte Amylosen, die aus drei unterschiedlichen Stärkequellen isoliert werden, sowie fünf enzymatisch hergestellte Amylosen verwendet, um Hexanal-Komplexe zu synthetisieren.

Aus Tab. 15 kann man entnehmen, daß im Falle der Amylosen mit definiertem Polymerisationsgrad die Komplexbildungskonstante bis zu einem Polymerisationsgrad von $P_n=270$ auf ca. 90 l/mol ansteigt. Hingegen bei höheren Polymerisationsgraden bleibt sie annähernd konstant. Dieses Ergebnis entspricht obigem Sachverhalt.

Tab. 15 verdeutlicht ebenfalls, daß die Stabilität der untersuchten Hexanalkomplexe von der eingesetzten Wirtquelle abhängt. Benutzt man ausgehend von Amylomais-70-Stärke bei der Komplexherstellung fraktionierte Amylose aus, so resultieren mit 40 l/mol die niedrigsten Komplexbildungskonstanten. Stammt die verwendete Amylose von der Kartoffelstärke oder Markerbsenstärke ab, so entstehen die stabilsten Hexanal-Komplexe mit doppelt so hohen Assoziationskonstanten.

Herkunft der Amylose		BV	Assoziationskonst. K [l/mol]
Entfettet und fraktioniert aus	Amylomais-70-Stärke	10,2	40 ± 8
	Kartoffelstärke	12,1	80 ± 15
	Markerbsenstärke (WPS)	11,3	83 ± 16
Enzymatisch synthetisiert	$P_n= 55$	14,0	30 ± 10
	$P_n= 103$	14,3	55 ± 12
	$P_n= 290$	14,5	89 ± 13
	$P_n= 475$	14,8	93 ± 15
	$P_n= 980$	14,5	95 ± 16

Tab. 15: Assoziationskonstanten der Hexanal-Amylosekomplexe in Abhängigkeit von der Herkunft der Amylose

Erste Anhaltspunkte über die Reinheit der Amylosefraktionen liefert der Blauwert (BV), der die Fähigkeit zur Bildung des blauen Iodkomplexes ausdrückt. Ermittelt wird der Blauwert durch Messung der Extinktion einer Amylozelösung bekannter Konzentration bei 680 nm, die mit einer 0,2% -igen I₂-KI-Lösung versetzt ist.

Nach der folgenden Formel läßt er sich berechnen:

$$BV = \frac{40 \cdot E}{c} \quad E = \text{Extinktion der Lösung bei 680 nm}$$

c = Konzentration der Lösung in mg Amylose / 100 ml Lösung

Er stellt ein Maß für das Vorhandensein von langen helikalen unverzweigten Bereichen dar, und liefert damit einen Hinweis auf die Komplexbildungseigenschaften von verschiedenen Stärkefraktionen. Bei sehr reinen Amylosen, nimmt der Blauwert Werte von etwas über 14 an.⁹⁵ Diese werden erwartungsgemäß von allen enzymatisch hergestellten Amylosen erreicht. Es hat sich gezeigt, daß nach der Fraktionierung der Stärken mit Cyclohexanon ein recht hoher Blauwert von 12,1 für die Kartoffel- und von 11,3 für Markerbsenamylose resultiert. Die Maisamylose erreicht dagegen nur einen Blauwert von 10,2. Ursächlich für die unterschiedliche Reinheit der fraktionierten Amylosen kann die Mitfällung von gewissen Teilen des in unterschiedlichem Maße enthaltenen Amylopektins sein. Um zu testen, inwieweit Amylopektinanteile während der Fraktionierung mitausgefallen sind, werden GPC-Chromatogramme der Amyloseproben aufgenommen. Hierfür müssen diese unter Druck und starkem Rühren bei 140°C innerhalb einer für alle Proben exakt eingehaltenen Zeit in Wasser aufgelöst werden. Dabei kann wegen der Spaltung einzelner Valenzketten (Fragmentierung) die Kettenstruktur der Proben etwas von der tatsächlich vorliegenden abweichen. Vernachlässigt man dies, so lassen sich zumindest durch einen Vergleich der GPC-Kurven qualitative Aussagen treffen. Für die Messungen werden zwei Shodex-Säulen hintereinandergeschaltet. Durch Kalibrierung mittels Pullulanen läßt sich eine obere Ausschlussgrenze bei einer Retentionszeit von 10,5 min feststellen. Somit sind quantitative Aussagen erst bei einer Retentionszeit größer als 10,5 min (dies entspricht $M_w=250.000$) zulässig.

Betrachtet man die GPC-Chromatogramme der fraktionierten Amylosen, so liegt bei den drei fraktionierten Amylosen eine bimodale Verteilung vor. Wie erwartet weisen dagegen alle enzymatisch hergestellten Amylosen eine enge unimodale Verteilung auf. Die angegebenen Molekulargewichte sind den lokalen Peakmaxima zugeordnet (Abb. 26).

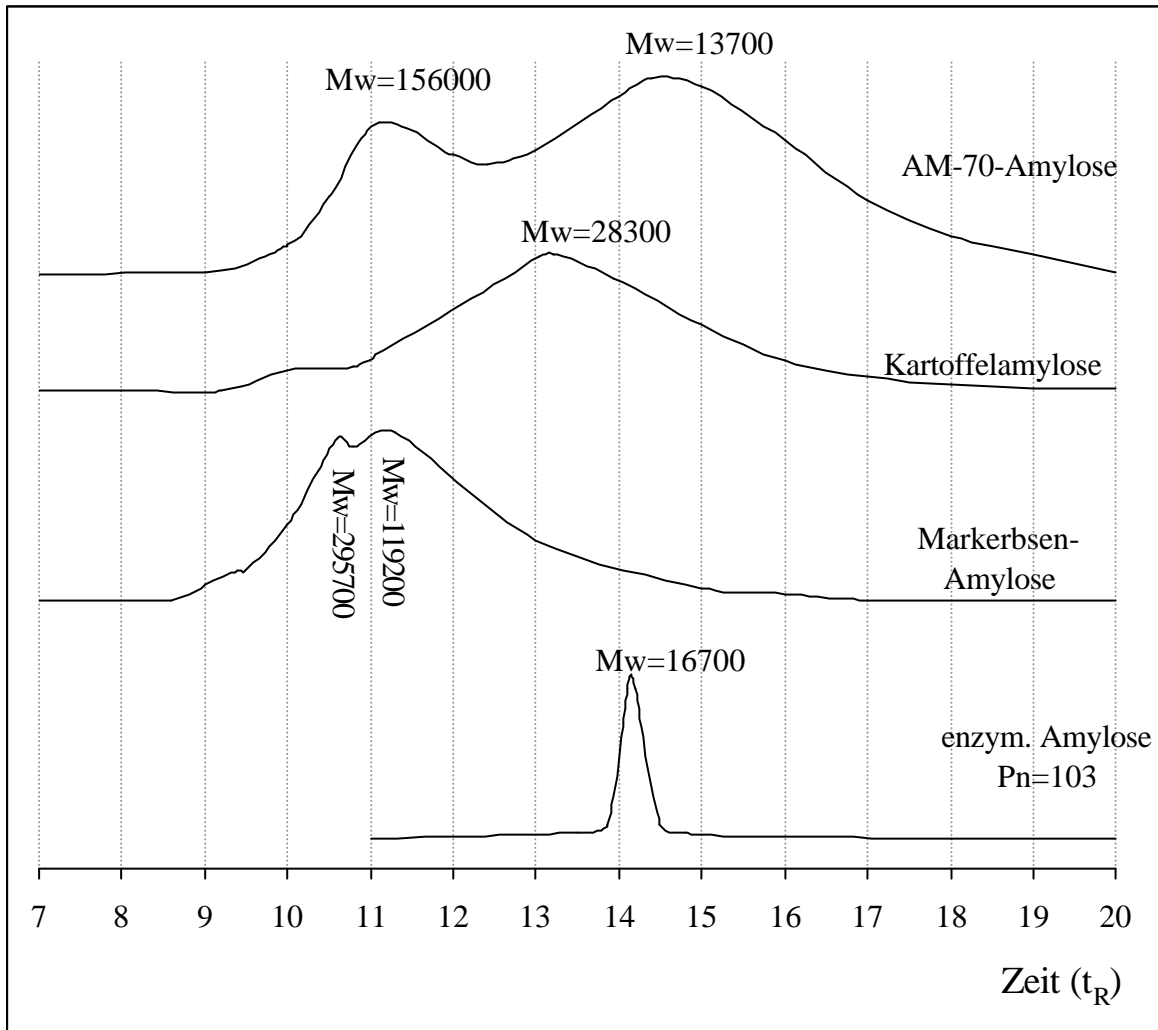


Abb. 26: GPC Untersuchungen der verwendeten Amylose

Es zeigt sich, daß durch die Komplexierung mit Cyclohexanon bei allen drei Stärkesorten keine vollständige Trennung des Amylopektins stattgefunden hat. Vielmehr werden gewisse Anteile mitgefällt. Aus Strukturaufklärungen ist bekannt, daß je nach botanischer Herkunft die Molekulargewichte von Amylose zwischen 40.000 und 160.000 liegen, während das Amylopektinmolekül, welches ein mehrfach verzweigtes Molekül mit kürzeren und längeren Kettensegmenten darstellt, ein Molekulargewicht von 1.000.000 bis 20.000.000 besitzen kann.^{96a,b} Eine klare Abgrenzung, ab welchem Molekulargewicht es sich größtenteils um Amylopektinanteile handelt, ist allerdings aus den aufgezeichneten Chromatogrammen nicht möglich.

Verglichen mit Amylomais-Amylose sind mit den beiden fraktionierten Amylosen aus Kartoffel- und Markerbsenstärke, die höhere Blauwerte besitzen, stabilere Hexanal-Komplexe erhältlich. Aus den GPC-Chromatogrammen wird ersichtlich

daß, die letzten beiden Amylosesorten mehr höhermolekulare Anteile besitzen. Diese können den Komplexbildungsvorgang begünstigen. Aus den GPC-Chromatogrammen lassen sich aber keine weiteren Aussagen über Anzahl und Art der Verzweigungen der fraktionierten Amylosen treffen.

3 Zusammenfassung

Mit Amylose als Wirtsmolekül konnten im Rahmen dieser Arbeit alle vier Aromastoffe Hexanal, E-2-Nonenal, 1-Octen-3-ol und Guajacol sowohl als Einzelkomponenten als auch im Gemisch komplexiert werden. Die Synthese der Amylosekomplexe setzt sich dabei aus folgenden Schritten zusammen:

1. Mischen definierter Gastmengen und Zugabe zu einer 1%-igen heißen Amyloselösung
2. Abkühlen und Isolieren der schwerlöslichen Komplexe durch Zentrifugation und Gefriertrocknung
3. Anschließende Reinigung durch Waschen der pulverförmigen Komplexe mit Methylenchlorid. Dies dient der Entfernung adsorbierter Aromastoffe.

Die Ausbeuten bezogen auf die eingesetzte Amylose beliefen sich zwischen 68% und 80 %.

Geht man von einer vollständig ausgefüllten Amylosehelix aus, so kann eine maximale Einlagerung der flüchtigen Verbindungen von knapp 8% errechnet werden. Bei den Mono-Komplexen konnten unter Zugabe von sehr hohen Überschüssen (6 bis 10-fach je nach Gastart) hohe Gastgehalte von über 5% und bis zu 7% realisiert werden. Mit abnehmender Zugabe reduzierten sich erwartungsgemäß die Gastgehalte.

Bei einer gleichzeitigen Zugabe zweier unterschiedlicher aromawirksamer Komponenten wurden auch bei sehr hohen Überschüssen von Aromastoffen Gastgehalte von knapp unter 5% erzielt. Denkbar wäre es, daß der Gefriertrocknungsschritt zu Verlusten von inkludierten Aromastoffen führt. Im Falle der Mischkomplexierung, insbesondere wenn die beiden Gastmoleküle unterschiedliche Helixdurchmesser induzieren (wie beim Hexanal und Guajacol), treten Knicke und Übergangsstellen der helicalen Struktur in erhöhtem Maße auf. Diese Tatsache könnte Ursache für das Entweichen inkludierter Aromastoffe sein. Durch die Anwendung der Gefriertrocknung über einen zweiwöchigen Zeitraum zeigte sich allerdings, daß lediglich die an der Oberfläche adsorbierten Aromamoleküle entfernt werden. Die inkludierten Anteile verbleiben unabhängig von der Komplexierungsform in der Amylosehelix.

Die in der Lebensmitteltechnologie verwendeten Aromaextrakte mit ihrer vorgegebenen Komponentenzusammensetzung können aromawirksame Verbindungen in geringer Konzentration aufweisen. Daher ist von Bedeutung, ob

unter diesen Bedingungen ein zufriedenstellender Einschluß mit Hilfe der Amylose mit annähernd gleichem Aromaprofil möglich ist. Durch die Variation der Zugabeverhältnisse wie auch der Konzentration der unterschiedlichen Aromamoleküle kann demonstriert werden, daß die entstehenden Mischkomplexstöchiometrien nur selten die Molverhältnisse der zugegebenen Aromastoffmischungen widerspiegeln.

Treten flüchtige Gastverbindungen in einem Gemisch auf, so konkurrieren sie bei der Inklusion offenbar um die Bindungsstellen im Inneren der Amylosehelix. In Abhängigkeit von der chemischen Struktur und Molekülgeometrie weisen die flüchtigen Gastmoleküle eine unterschiedlich hohe Komplexbildungsneigung mit Amylose auf. Im Falle der Mono-Komplexierung konnten über Headspace-Messungen die Assoziationskonstanten der vier Aromastoffe ermittelt werden. Das angewendete Verfahren beruhte auf der Kopplung des Komplexbildungsgleichgewichtes mit dem Verteilungsgleichgewicht. Es zeigte sich, daß das lineare kurzkettige Hexanal mit 40 l/mol die niedrigste Assoziationskonstante, das aromatische Guajacol mit 502 l/mol die höchste aufwies. Dazwischen lagen mit 129 l/mol die Stabilitätskonstante des 1-Octen-3-ol-Amylosekomplexes und mit 240 l/mol die Konstante des E-2-Nonenal-Amylosekomplexes.

Die Kenntnis der Größenordnung der Komplexbildungsfähigkeit jeder einzelnen Aromaverbindung reicht aber nicht aus, um in einer Mischung Vorhersagen über deren Komplexbildungsverhalten machen zu können. In Bereichen geringfügiger Überschußzugaben konnte zum Beispiel beim Hexanal-E-2-Nonenal-Komplex ein synergistischer Effekt beobachtet werden. In diesem Konzentrationsbereich wird mehr Nonenal (aus dem Nonenal-Hexanal-Gemisch) eingelagert als Nonenal bei der Einzelkomplexierung.

Andererseits traten in Bereichen extremer Überschüsse beider Gäste kompetitive Effekte auf, d.h. in Anwesenheit von großen Mengen Hexanal wurde verglichen zur Nonenal-Einzelkomplexierung viel weniger Nonenal inkludiert.

In allen Mischkomplexbildungsfällen fand eine gegenseitige Beeinflussung der Gastkomponenten während des Inkludierungsvorganges statt, deren Ausmaß und Richtung sowohl vom Konzentrationsbereich als auch vom Molverhältnis der zugesetzten Gäste abhing. Diese Tatsache belegt die gleichzeitige Inklusion verschiedener Aromastoffmoleküle innerhalb des gleichen Helixstranges.

Die hergestellten pulverförmigen Komplexe bieten eine gute Dosiermöglichkeit an. Möchte man durch Aromatisierung von Speisen ein definiertes Aromaprofil erzeugen oder verbessern, ist es allerdings schwierig die gewünschte

Zusammensetzung der Komponenten aus dem Aromaextrakt in die molekular verkapselten Form zu überführen. Vielmehr muß man die Aromastoffe erst einzeln komplexieren, und nach Erhalt der pulverförmigen Mono-Komplexe zusammenmischen. Dies läßt sich allerdings nur für die Fälle realisieren, in denen einige wenige Aromastoffverbindungen das charakteristische Aroma eines Lebensmittels prägen. Andernfalls wäre dieser Verkapselungsprozess zu aufwendig und kostenintensiv.

Bei der Untersuchung der Lagerstabilitäten wiesen sämtliche Amylosekomplexe mit ausschließlich komplexierten Aromamolekülen konstante Inklusionsraten über einen Zeitraum von 1 Jahr auf. Damit ist der durch die Einlagerung erreichte Schutz vor Verflüchtigung belegt. Wurde dagegen bei den gleichen Komplexen der Waschvorgang mit Methylenchlorid unterlassen, hafteten an der Amyloseoberfläche adsorbierte Aromastoffe. Diese sind im Vergleich zu den inkludierten Aromastoffmolekülen schwächer gebunden, daß nach einjähriger Lagerung etwa 10% der gesamten Aromastoffmenge verloren gehen.

Um das Entfalten des Aromas aus der hergestellten Amylosematrix zu erfassen, wurde ein Headspace-gaschromatographisches Verfahren neu entwickelt. Unter Verwendung einer Kryofokussierung und Optimierung der Einspritztechnik sowie geeigneter Einstellung der Meßparameter war es möglich eine reproduzierbare Quantifizierung des Kopfraumes über einer Probe im geschlossenen und temperierten System zu bewerkstelligen. Somit konnte die Freisetzungskinetik der Aromastoffkomplexe unter definierten Bedingungen mit einer Abweichung von max. 5% bestimmt werden.

Im wäßrigen Medium wurde unabhängig von der Temperatur ein rapider Anstieg der freigesetzten Aromastoffmengen innerhalb der ersten Stunde beobachtet. Nach einem weiteren Zeitraum konnte das Erreichen einer Sättigungskonzentration im Headspace festgestellt werden. Dabei stieg mit zunehmender Temperatur die in den Gasraum freigesetzte Menge an Aromastoff, und die Sättigungskonzentration konnte schneller erreicht werden. Ausgehend von einem Hexanal-Amylosekomplex, der in einer 9%-igen Suspension vorliegt, werden in der ersten halben Stunde bei 40°C 65%, bei 60°C 71% und bei 80°C 89% der maximalen Freisetzungsrates im Headspace ermittelt. Das gleiche Phänomen findet sich ebenso bei der 2%-igen Suspension in Wasser wieder, wobei die prozentualen Verhältnisse sich von 22% (40°C) bis hin zu 59% (80°C) erhöhen. Damit wurde demonstriert, daß eine kontrollierte Freisetzung aus der Helix über die Zeit möglich ist. Eine Überführung des geschlossenen Systems in ein offenes könnte

weiterhin das bestehende Gleichgewicht zur vollständigen Dissoziation hin verschieben, so daß letztendlich alle Aromastoffmoleküle aus der Helix entweichen können.

Geht man von Hexanal-Mischkomplexen aus, so erfolgte bei allen Temperaturen nach Zusatz von Wasser eine deutlich höhere Freisetzung des flüchtigen Aldehyds in den Headspace als bei der Einzelkomplexierung. Auch im Falle des Nonenals wurde ein analoges Phänomen beobachtet. Aufgrund der Schwerflüchtigkeit dieser Verbindung beliefen sich Freisetzungsraten des Nonenals auf ein Zehntel der Freisetzungsraten des Hexanals. Beim Guajacol waren die gaschromatographisch registrierten Mengen sogar so gering, daß die Erstellung einer Freisetzungskinetik nicht möglich war.

Obiges Resultat bestätigt, daß bei der Inklusion mehrerer Aromastoffkomponenten die unterschiedlichen Gäste innerhalb einer Amylosehelix statistisch verteilt sind. Beim Anfeuchten des erhaltenen Komplexpulvers bedingt der Einschluß zweier unterschiedlicher Gäste innerhalb dergleichen Amylosehelix eine leichtere Ablösung aus dem Helixinneren.

Bei der Untersuchung der Freisetzung der Aromastoffe aus den pulverförmigen Komplexen geht hervor, daß bis zu 30°C keine Aromastoffe aus der Helix in den Gasraum übergehen. Erst durch einem enormen Temperaturanstieg auf 80°C findet eine merkliche Freisetzung (von ca. 10%) statt. Liegen adsorbierte neben inkludierten Aromastoffanteilen vor, so befinden sich deutlich mehr Aromastoffmoleküle im Gasraum, da die Desorption von der Helixoberfläche leichter stattfindet.

Durch Variation der Komplexstöchiometrien, der Temperatur sowie des Wassergehalt konnten unterschiedliche Freisetzungsraten der Aromastoffe im Headspace detektiert werden. Die anfänglich spontane und über einen längeren Zeitraum andauernde Aromaentfaltung bei Wasseraktivitäten um 1 (wie sie bei den meisten Speisen angetroffen wird) bietet außerdem die ideale Voraussetzung, um ein Aroma von der Zubereitung bis hin zum Verzehr der Speisen zu simulieren.

Ausgehend von fünf enzymatisch hergestellten Amylosen konnten Hexanal-komplexe synthetisiert und ihre Komplexstabilität untersucht werden. Mit zunehmenden Polymerisationsgraden steigt die Assoziationskonstante auf ca. 90 l/mol, und bleibt ab einem Polymerisationsgrad von über 300 nahezu konstant. Unter Verwendung fraktionierter Amylosen, die aus drei unterschiedlichen Stärkequellen isoliert wurden, konnten in Abhängigkeit von der Wirtsquelle die Komplexstabilitäten der Hexanal-Komplexe eingeordnet werden. Stammt die verwendete Amylose von der Kartoffel- oder der Markerbsenstärke ab,

so entstehen die stabilsten Hexanal-Komplexe mit Assoziationskonstanten um 80 l/mol. Ist die Quelle dagegen die Amylomais-70-Stärke, deren fraktionierte Amylose den kleinsten Blauwert besitzt, so sinkt die Stabilitätskonstante um die Hälfte. Über GPC-Messungen der eingesetzten fraktionierten Amylosen wurde eine bimodale Verteilung der Molmassen beobachtet, d.h. es fallen Amylopektinanteile nach der Fraktionierung in allen drei Fällen mit aus. Diese haben ebenso einen Einfluß auf den Komplexbildungsvorgang. Die Amylomais-Amylose weist im Vergleich zu den anderen beiden Amylosesorten etwas weniger höhermolekulare Anteile auf, womit die geringere Stabilität des Hexanal-Komplexes zusammenhängen könnte. Allerdings darf man dabei nicht außer acht lassen, daß nicht nur die Kettenlänge sondern auch die Anzahl und Art der Verzweigungen, die zu den höhermolekularen Anteilen beitragen, eine Rolle spielen. Hierzu konnten aus den GPC-Chromatogrammen keine weiteren Aussagen abgeleitet werden.

4 Experimenteller Teil

4.1 Apparatives

UV-Spektroskopie	PERKIN- ELMER Spektralphotometer 554 Küvetten Quarzglas (1 cm)
CD-Spektroskopie	JASCO J-600 Spektralpolarimeter mit elektronischer Datenverarbeitung Quarzglasküvetten (Schichtdicke 1cm)
¹ H-NMR-Spektroskopie	Bruker DRX (500 Mhz)
Gaschromatographie	Carlo Erba HRGC 4160 Kryofocussierung SGE Säule: HT8, 50m 0,2mm ID(SGE) Integration: Watrex data Monitor 2000 v.1.5
GPC	Säule: Shodex Detektor: RI-Detektor
Autoklav	Berghof Autoklav 400ml mit Teflon- Becher, InnenrührerBRS856 + Heizmantel BTR841
Gefriertrocknung	Leybold Heraeus LS20

4.2 Chemikalien

Cerestar	native Amylomas -70-Stärke sowie native Kartoffelstärke und native Erbsenstärken
Wacker Chemie	native Cyclodextrine
Fluka	Hexanal, Deuteriumchlorid
Aldrich	E-2-Nonenal, d ⁶ -Dimethylsulfoxid, 4 tert-Bytylphenol, Cyclohexanon, Glucose-1-phosphat, Guajacol
Merck	Propylenoxid, Iod, Deuteriumoxid, 1-Octen-3-ol
Caesar & Lorentz	Kaliumiodid
SatoriusMembranfilter:	Regenerierte Cellulose 0,45µm und 0,8µm

4.3 Isolierung der Amylose aus diversen Stärken

4.3.1 Fraktionierung von nativer Kartoffelstärke

In 1700 ml entgaster 1N NaOH wird unter Rühren im Stickstoffgegenstrom eine Suspension von 45g nativer Kartoffelstärke in 80 ml Wasser gegeben. Die hochviskose leicht gelbliche Lösung wird bis zum vollständigem Auflösen der Stärke noch 1 bis 2 Stunden gerührt und anschließend filtriert. Nach Verdünnen mit 2,5 l Wasser wird die Lösung mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert und anschließend zum Sieden erhitzt. Nachdem man den pH-Wert gegebenenfalls auf 7 eingestellt hat, fügt man 60 ml Cyclohexanon hinzu und kocht weitere 20 Minuten. Man läßt den Ansatz über Nacht im Heizpilz langsam abkühlen. Der ausgefallene Cyclohexanon-Amylose-Komplex kann anschließend abzentrifugiert werden (20 min bei 5000 U/min) und wird zweimal je 30 min in 500 ml Ethanol sowie 30 min in 300ml Diethylether gerührt. Nach Abfiltrieren der Amylose wird sie im Vakuum über P_4O_{10} getrocknet.

Ausbeute: 9,4 g (20,9%)

Blauwert: 10,4

4.3.2 Fraktionierung der Markerbsenstärke und der Amylomais-70-Stärke

80g native Amylomais-70-Stärke bzw. Markerbsenstärke werden in 200 ml Wasser suspendiert und anschließend zu 1700 ml einer entgasten NaOH gegeben. Die gelb/grünlich gefärbte Lösung wird noch eine halbe Stunde gerührt. Anschließend verfährt man analog zu Vorschrift 4.3.1, wobei zur Fällung des Amyloseanteils 80 ml Cyclohexanon verwendet wird.

Bei der fraktionierung der nativen Palerbsenstärke werden 50g eingesetzt.

Ausbeuten: 52g Amylomais-70-Amylose(65%)

55g Markerbsen-Amylose (69%)

4.3.3 Nochmaliges Umfällen der fraktionierten Amylosen

Um die einmalig umgefällte Amylose von den Resten an Amylopektin zu reinigen wird sie nochmals nach obigen Verfahren als Cyclohexanon-Komplex ausgefällt und nach der gleichen Methode aufgearbeitet. Dabei setzt man 45g fraktionierte Amylose ein und fällt mit 80 ml Cyclohexanon um.

	Ausbeute	Blauwert
Kartoffelamylose	39,9 g	12,1
Amylomais-70-Amylose	42,1 g	10,0
Markerbsenamylose	38,5 g	11,3

Tab. 16: Ergebnisse der Fällung verschiedener Amylosen

4.3.4 Vorschrift zum Entfetten der fraktionierten Amylomais-70-Amylose

Die zweimalig umgefällte Amylomais-70-Amylose besitzt noch einen geringen Anteil an Lipiden, die aus dem Helixinneren der Amylose entfernt werden müssen. 40 g der zweimalig umgefällten Amylomais-70-Amylose werden zweimal für je 2 Stunden in 640 ml eines Propanol/Wasser Gemisches (im Verhältnis 3:1) aufgekocht und heiß filtriert. Nach Rühren in 200 ml Diethylether wird der abfiltrierte Niederschlag im Vakuum über P_4O_{10} getrocknet.

Blauwert: 10,2

4.4 Enzymatische Amylosesynthese mit Phosphorylase

4.4.1 Isolierung von Kartoffelphosphorylase

Der Saft von 5 kg Kartoffeln wird mit konz. Ammoniak auf pH 7 eingestellt und zum vollständigen Desaktivieren der α -Amylase 45min. auf 55,5°C erwärmt. Nun wird soviel Ammoniumsulfatpulver zu der Mischung hinzugegeben bis eine Dichte von 1,080g/ml erreicht ist. Der dabei gebildete Niederschlag kann durch anschließendes Abzentrifugieren (30min, 5000 U/min) abgetrennt werden. Die klare darüberstehende Lösung enthält noch die Phosphorylase, die aus der Lösung durch weiteren Zusatz von Ammoniumsulfat beim Erreichen der Dichte von 1,150 ausgefällt wird. Nach dem Abzentrifugieren des phosphorylasehaltige Niederschlages, wird er in einem 0,05 m 2,2',2''-Nitriloethanol-HCl Puffer (pH 7,75 ml) suspendiert und unter Toluol im Kühlschrank aufbewahrt.

4.4.2 Enzymatische Amylosesynthese mit Phosphorylase

Um Amylosen mit Polymerisationsgraden zwischen 1000 und 50 zu synthetisieren werden Maltoheptaose (als Starter) und Glucose-1-phosphat (G-1-P als Monomerbaustein) in den Mengen die aus folgender Tabelle zu entnehmen sind eingesetzt:

P_n	G-1-P		Maltoheptaose		Ausbeute		P_n (mittels GPC)
	[mg]	[*10 ⁻³ mol]	[mg]	[*10 ⁻⁶ mol]	[g]	[%]	
50	3990,6	10,609	284,5	246,71	0,6	30	55
100	4318,8	11,481	142,3	123,45	0,8	40	105
300	4534,4	12,054	47,4	41,14	0,7	35	290
500	4575,1	12,162	28,4	24,67	0,8	40	475
1000	2301,0	6,120	7,1	6,16	0,6	60	980

Tab. 17: Ansätze der enzymatisch hergestellten Amylosen

Synthesevorschrift für P_n 50 bis 500:

Zuerst wird das Glucose-1-Phosphat in wenig Wasser gelöst und durch Zutropfen von verdünnter Essigsäure ein pH-Wert vom 6.0 eingestellt. Nach Auffüllen mit Wasser auf insgesamt 100ml Lösung und temperieren in einem Wasserbad auf 45°C, gibt man 10ml Citratpuffer (pH = 6) sowie Maltoheptaose in 4ml Wasser gelöst hinzu.

5 ml der im Kühlschrank aufbewahrten PhosphorylaseLösung (aus Kartoffeln isoliert) werden ebenfalls auf 45°C temperiert und unter Rühren zu dem obigen Reaktionsgemisch gegeben. Nach 2 Stunden kann die Reaktion durch Aufkochen beendet werden, da hierbei das Enzym koaguliert. Nachdem das denaturierte Enzym über Celite abfiltriert wird, versetzt man die Lösung mit 20ml Cyclohexanon, kocht erneut auf und lässt sie über Nacht langsam abkühlen. Der ausgefallene Amylosekomplex wird abzentrifugiert (20min. bei 5000 U/min), anschließend zweimal gründlich mit je 200 ml Ethanol sowie Diethylether gewaschen. Die somit synthetisch hergestellte Amylose kann nun im Vakuum über P₄O₁₀ getrocknet werden.

Bei P_n=50 fällt der Amylosekomplex erst aus nach Aufbewahren der Lösung im Kühlschrank. Hierbei findet eine teilweise Retrogradation der Amylose statt.

Synthesevorschrift für P_n 1000:

Analoges Vorgehen wie bei den übrigen enzymatisch hergestellten Amylosen. Allerdings kann hierfür das halbe Lösungsmittel eingesetzt werden und die Reaktion wird bei 37°C durchgeführt.

4.5 Hydroxypropylierung von Kartoffelamylose

4 g umgefällte Kartoffelamylose werden unter Stickstoffatmosphäre in 200 ml 1 N NaOH gelöst. Nach Zugabe von 2,5 ml Propylenoxid läßt man die Reaktionsmischung über Nacht rühren. Anschließend neutralisiert man die Lösung mit konzentrierter Salzsäure und unter kräftigem Rühren gibt man 500 ml Ethanol hinzu. Nach 15 Min. wird der gebildete Niederschlag abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Unter leichtem Erwärmen wird er wieder in 200 ml Wasser gelöst und die Lösung filtriert (Filterpore 4). Die hydroxypropylierte Amylose wird erneut durch Zugabe von 400 ml Ethanol ausgefällt, abgesaugt und mit etwas Ethanol und Diethylether gewaschen. Zum Schluß wird sie über P₄O₁₀ im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,7 g

DS(¹H-NMR): 0,072

4.6 Synthese vom Aromastoff-Amylose-Komplexen

4.6.1 Behandlung der Amylosen im Autoklaven

12 g umgefällte Amylose werden in ca. 80 ml Ethanol suspendiert und in 500 ml kochendes dest. Wasser unter Rühren gegeben. Das Ethanol wird dann azeotrop mit Wasser abdestilliert (insgesamt 200 ml des Wasser-Ethanol Gemisches). Die heiße Amylozelösung, die eine leichte Trübung aufweist, wird daraufhin in den auf 120°C vorgeheizten Autoklaven überführt. Man löst die Amylose unter Rühren (30 U/min) und unter Druck, indem man die Heizung des Autoklaven auf 190°C einstellt. Nach 1,5 stündigem Autoklavieren hat die Amylozelösung eine Temperatur von 140°C erreicht. Der Autoklav wird anschließend in einem Wasserbad innerhalb von 30 Minuten auf 90°C abgekühlt. Die heiße Lösung wird über eine Glasfritte (Pore 4) abfiltriert. Die erhaltene klare Lösung wird zur Amylosekomplexbildung eingesetzt.

4.6.2 Darstellung verschiedener Aromastoff-Amylose-Komplexe

Die aus obigem Abschnitt autoklavierte und noch heiße Amylozelösung wird mit heißem dest. Wasser auf eine 1%ige Lösung verdünnt. Bei 80°C können nun die unterschiedlichen Aromastoffe unter Rühren zugesetzt werden. Es werden 3g Amylose pro Ansatz eingesetzt. Die molaren Zugaben der Gäste sind im theoretischen Teil aufgeführt. Man rührt noch weitere 15 Minuten bei dieser Temperatur und läßt die Lösung im Heizpilz über Nacht abkühlen. Die entstandenen schwerlöslichen Komplexe können abzentrifugiert werden. Die Niederschläge werden in wenigen ml der über dem Komplex stehende Lösung aufgeschlämmt, um sie dann zu gefriertrocknen. Nach ca. 16 bis 20 Stunden ist das Wasser vollständig entfernt und die Komplexe werden zweimal 2 Stunden mit je 30 ml trockenem Methylenchlorid gewaschen, um die oberflächlich anhaftenden Aromastoffe zu entfernen. Anschließend können Spuren des Methylenchlorid im Exsikator bei 8 mbar entfernt werden.

4.7 Spektroskopische Untersuchungen

4.7.1 Bestimmung des Blauwertes

In einem 100 ml Meßkolben werden etwa 100 mg Amylose genau eingewogen und in 10 ml 1N NaOH gelöst. Nach Neutralisation mit 10 ml 1N Salzsäure, puffert man mit 2ml Phosphatpuffer und füllt mit dest. Wasser bis zur Eichmarke auf. Man pipetiert 1 ml dieser Lösung in einen anderen 100 ml Meßkolben, verdünnt mit dest. Wasser auf etwa 90 ml und gibt 1ml einer 0,2%-igen Iodlösung zu. Der Meßkolben wird anschließend bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Nach 20 Minuten bestimmt man die Extinktion dieser Lösung bei 680 nm. Als Referenz verwendet man eine reine Iodlösung (1 ml der 0,2%-igen Iodlösung in 100 ml Wasser).

Der Blauwert (BV) errechnet sich dann nach der Formel:

$$BV = \frac{40 \cdot E}{c}$$

E = Extinktion der Lösung bei 680 nm

c = Konzentration der Lösung in mg Amylose / 100 ml Lösung

0,2%-ige Iodlösung: 2,000 g Iod und 20,0 g KI in 1l dest. H₂O

4.7.2 Aufnahme der CD-Spektren

200 mg hydroxypropylierte Kartoffelamylose bzw. 50 mg Cyclodextrin (α , β) werden exakt eingewogen und in ca. 6 ml Wasser unter leichtem Erwärmen gelöst. Man gibt 4 Tropfen des wenig in Wasser löslichen Aldehydes zu, füllt bis zur Eichmarke auf und läßt die Lösung 5 Stunden rühren und 1 Stunde stehen. Vor der Aufnahme der UV- und CD-Spektren wird der überschüssige Aldehyd, der an den öligen Tropfen in der Lösung erkennbar ist, durch Membranfiltration (Pore 0,8 μ m für hydroxypropylierte Amylose und Pore 0,45 μ m für Cyclodextrine) aus der Lösung entfernt. Die klaren Lösungen können dann im interessierenden Wellenlängenbereich untersucht werden.

4.7.3 ^1H -NMR-spektroskopische Bestimmung des Substitutionsgrades hydroxypropylierter Amylose

Ungefähr 30 mg hydroxypropylierter Amylose werden in 0,4 ml D_2O und 0,3 ml DCl gelöst und 30 Minuten bei 60°C im Trockenschrank gelöst, um vollständige Hydrolyse zu gewährleisten. Nach Filtration wird das ^1H -NMR-Spektrum vermessen. Der Substitutionsgrad DS kann aus den Flächenintegralen mittels nachfolgender Formel berechnet werden:

$$\text{DS} = \frac{A / 3}{(B - A) / 7}$$

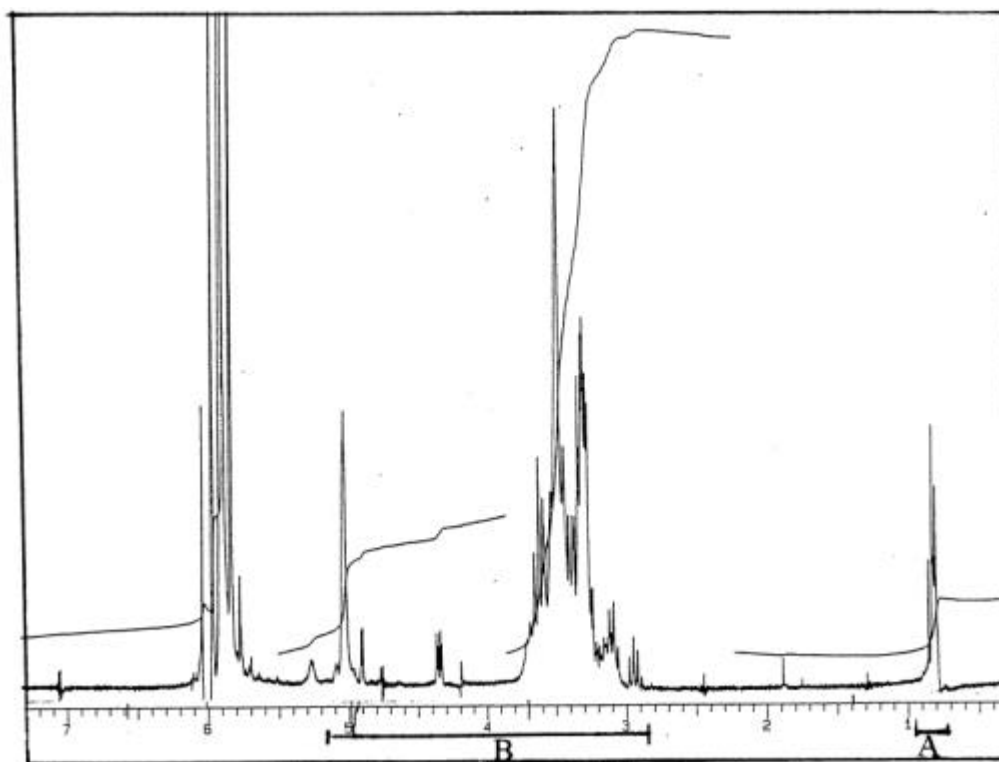


Abb. 27: ^1H -NMR-Spektrum einer hydroxypropylierten Amylose in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$

4.7.4 Gehaltsbestimmung der Amylose-Aromastoff-Komplexe mittels ^1H -NMR-Spektroskopische

4.7.4.1 Stöchiometriebestimmung der Amylose-Aldehyd-Komplexe

In einem Schraubdeckelgefäß werden etwa 25 mg eines Aldehyd-Amylose-Komplexes in 0,7 ml deuteriertem d^6 -DMSO und 0,07 ml DCl gelöst. Zur vollständigen Hydrolyse wird die Probe 45 min bei 60°C im Trockenofen stehengelassen. Nach Filtration der klaren meist leicht gelblichen Lösung wird das ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen. Zur Berechnung der stöchiometrischen Zusammensetzung werden die Integrale der Methylenprotonen des Aldehydes (A) ins Verhältnis zu den Integralen der Protonen der Anhydroglucoseeinheiten der Amylose (B und C) gesetzt.

Prozentuale Gehaltsbestimmung des Aldehydes im Komplex (G) erfolgt nach:

$$G = \frac{M_{\text{Gast}}}{M_{\text{AHG}}} \cdot 1000 \cdot \frac{7 \cdot A}{x \cdot (B + C)}$$

G = prozentualer Gehalt an Aldehyd im Inklusionskomplex

M_{Gast} = Molmasse des Aldehyds

M_{AHG} = Molmasse einer AHG : 162,14 g/mol

A = Integral der Methylengruppen der Aldehyde zwischen 1,1 und 1,5 ppm

B und C = Summe der Integrale der Protonen der AHG

x = Anzahl der betrachteten Methylenprotonen des Aldehyds im Bereich 1,1 bis 1,6 ppm

Aldehyd	Molmassen	x
Hexanal	100,16	6
2-E-Nonenal	140,23	8

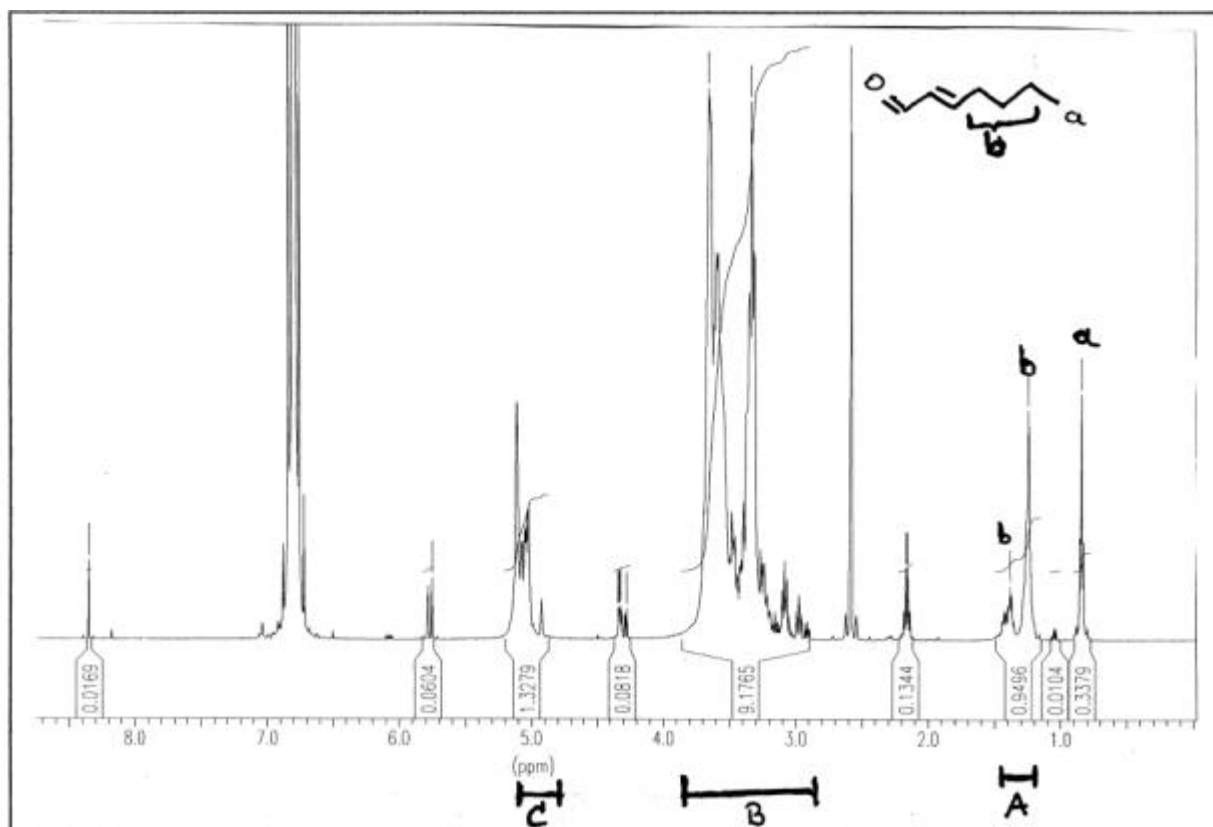


Abb. 28: ^1H -NMR-Spektrum eines E-2-Nonenal-Amylose-Komplexes

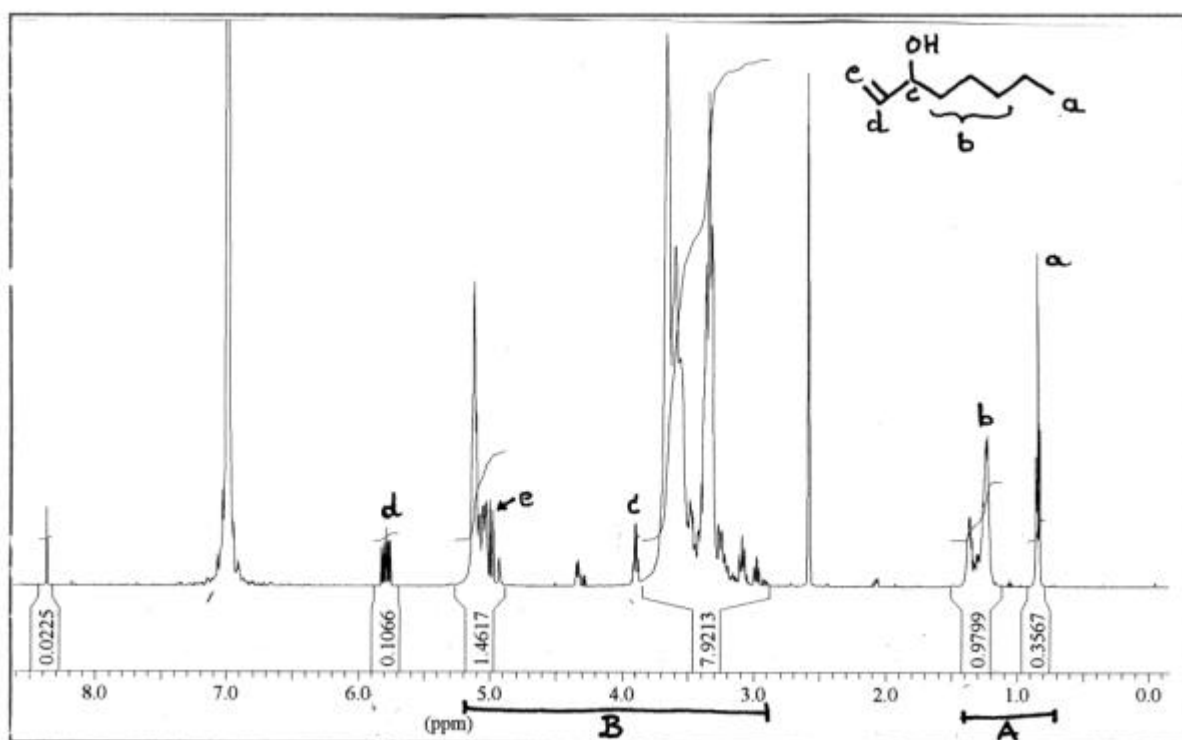


Abb. 29: ^1H -NMR-Spektrum eines 1-Octen-3-ol-Amylose-Komplexes

Die gleiche Formel wird für die Bestimmung der Gastgehalter G der 1-Octen-3-ol-Komplexe nach entsprechender Umwandlung benötigt.

Unter Berücksichtigung der Integrale A und B mit

A = Summe der Integrale der 11 Gastprotonen zwischen 0,7 und 1,5 ppm

B = Summe der Integrale der Protonen der AHG zuzüglich der Integrale der zwei Protonen des 1-Octen-3-ols

$$\text{folgt } G = \frac{M_{\text{Gast}}}{M_{\text{AHG}}} \cdot 1000 \cdot \frac{7 \cdot A}{11 \cdot (B - \frac{2}{11} \cdot A)}$$

Im Falle des Guajacols lautet die Gleichung zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie:

$$G = \frac{M_{\text{Gast}}}{M_{\text{AHG}}} \cdot 1000 \cdot \frac{7 \cdot A}{4 \cdot (B - \frac{3}{4} \cdot A)}$$

A = Summe der Integrale der 4 aromatischen Gastprotonen zwischen 6,7 und 7,1 ppm

B = Summe der Integrale der Protonen der AHG zuzüglich des Integrals stammend von den 3 Protonen der Methylgruppe

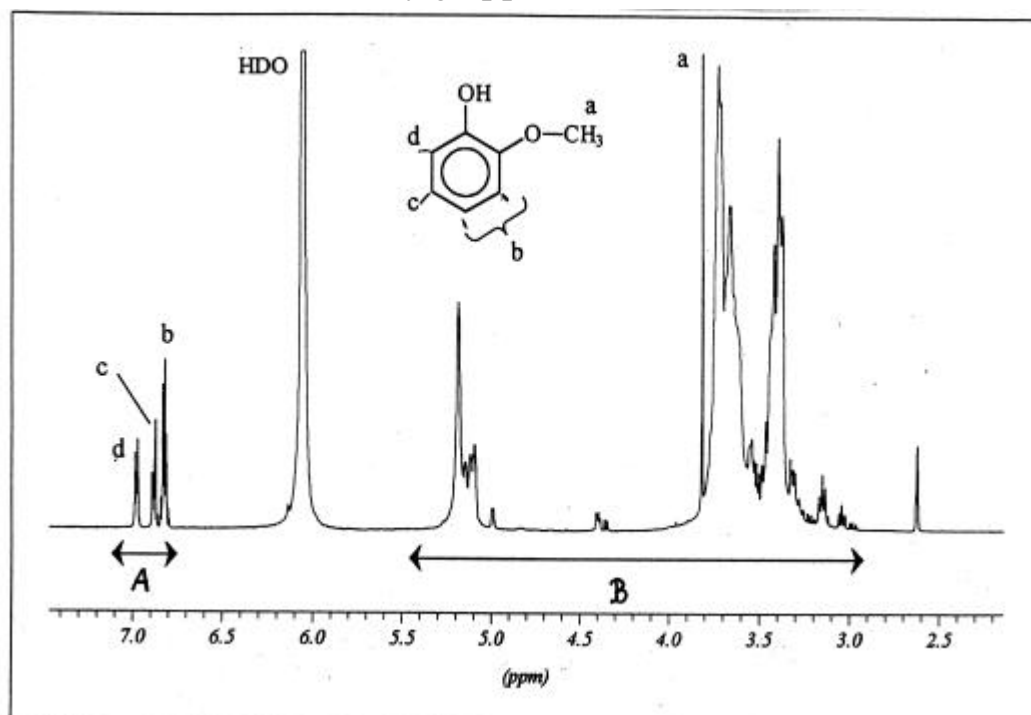


Abb. 30: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines Guajacol-Amylose-Komplexes

4.8 Chromatographische Analytik

4.8.1 Bestimmung der Methodenfaktoren für die quantitative Analytik der verschiedenen Aromastoffe

In einem Probengefäß werden 9-10mg Aromastoff (Hexanal, E-2-Nonenal, Guajacol, bzw. 1-Octen-3-ol) sowie ebensoviel Octansäureethylester genau eingewogen und in 2ml absolutem Methanol gelöst. Die so hergestellten Kalibrierlösungen werden mehrfach gaschromatographisch analysiert.

Betriebsbedingungen:

Säule	:HT 8, 50m, 0.2mm ID
Injektor	:180°C, Split 20:1
Detektor	:FID, 200°C
Trärgas	:Helium, 80kPa
Temperaturprog.	:100°C(14min), 15°C/min, 160°C (iso)

Der Methodenfaktor läßt sich aus den prozentualen Flächenintegralen der einzelnen Peaks im Chromatogramm und den Einwaagen der verschiedenen Aromastoffe gemäß folgender Formel bestimmen:

$$fM = \frac{m_{\text{Aromast.}} \cdot \% \text{int. Stand.}}{m_{\text{int. Stand.}} \cdot \% \text{Aromast.}}$$

mit m = Einwaage in mg

$\%$ = Prozentuale Fläche im Gaschromatogramm

Aromastoff	Methodenfaktor f
Hexanal	1,173
E-2-Nonenal	0,971
Guajacol	1,120
1-Octen-3-ol	1,381

4.8.2 Gaschromatographische Bestimmung der Stöchiometrie der Amylose-Komplexe

200-260 mg des trockenen Komplexes sowie ca. 5-7mg Octansäureethylesters werden exakt in einem dicht verschließbarem Zentrifugenglas (ca. 15ml) eingewogen und in 5ml absolutem Methanol versetzt. Nach Aufschrauben des teflonbeschichteten Schraubverschlusses können die inkludierten Aromastoffe aus den Amylosekomplexen extrahiert werden, indem unter Rühren das Zentrifugenglas für 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt wird. Nach Abkühlen der Suspension und Zentrifugieren wird 1ml der überstehenden Lösung abpipetiert, filtriert und unter den obig genannten Betriebsbedingungen des Gaschromatographen analysiert.

Unter Kenntnis des Methodenfaktors f_M , der Einwaage des Komplexes und des internen Standards läßt sich nach Ermittlung der prozentualen Flächenintegrale aus den Chromatogramm ein exakter Aromastoffgehalt im Amylosekomplex nach folgender Formel berechnen:

$$m_{\text{Aromast.}} = f_M * \frac{m_{\text{int.Stand(mg)}} * \%_{\text{Aromast.}}}{\%_{\text{int.Stand.}} * m_{\text{Komplex (g)}}} \quad \text{in mg Aromastoff pro g Komplex}$$

4.8.3 Bestimmung der Freisetzung von Aromastoffen aus den Amylose-Komplexen mittels Headspace-Gaschromatographie

4.8.3.1 Silylierung der Probengefäße und der gasdichten Spritze

Die Probengefäße, die für die gaschromatographische Untersuchung der Freisetzungskinetik der Aromastoffe eingesetzt werden, müssen vorher silyliert werden, um die Adsorption der Aromastoffe an der Glasoberfläche während ihrer Freisetzung zu vermeiden. Hierfür werden die Glasdöschen unter Inertgas in eine 2%ige Lösung von Dichlordimethylsilan in absolutem CH_2Cl_2 getaucht. Nach zwei Stunden werden sie kurz mit absolutem CH_2Cl_2 gewaschen und anschließend in absolutem MeOH gegeben, um die bestehenden Chlorgruppierungen zu methylieren. Die auf diese Weise silylierten Glasgefäße werden vor deren Einsatz im Ofen getrocknet.

Zum Silylieren der 500 μl gasdichten Spritzen zieht man zwei mal eine 2%ige Lösung von Dichlordimethylsilan in absolutem CH_2Cl_2 auf, wobei der Glaszylinder der Spritze für je 10 Minuten mit der Lösung benetzt wird. Anschließend wird die Spritze ebenfalls mit CH_2Cl_2 und Methanol gespült.

4.8.3.2 Durchführung gaschromatographischer Messungen zur Bestimmung der Freisetzungskinetik der Aromastoffe aus den Amylosekomplexen

Probenvorbereitung:

In einem silylierten, gasdicht verschließbarem Probengefäß (Volumen: 11,3 ml) wird eine bestimmte Menge (20mg bzw. 40mg) eines Aromastoff-Amylose-Komplexes genau eingewogen.

Soll die Freisetzung des Aromastoffes aus dem trockenem Komplexpulver untersucht werden, kann das Probengefäß mit einem teflonbeschichteten Septum dicht verschlossen werden und in einem Temperierbad bei gegebener Temperatur für eine definierte Zeit aufbewahrt werden bevor 500 μl Gasvolumen aus dem Headspace über dem Pulver entnommen wird.

Im Falle der Zugabe einer bestimmten Menge an Wasser wird zur homogenen Durchmischung ein V2A-Edelstahl (Volumen 1,5 ml) in das Probengefäß eingeführt, das Probengefäß (mit einem Gasvolumen von 9,8ml) zügig verschlossen. Durch ein Rotieren des Glasgefäßes um seine Längsachse kann nun das heterogene zähe Gemisch homogen durchmischert werden. Weiterhin wird wie oben beschrieben verfahren.

4.8.4 Gelpermeatographische Messungen

4.8.4.1 Bestimmung der Molgewichtsverteilung der eingesetzten Amylosen

10 mg der entfetteten und fraktionierten Amylosen unterschiedlicher Herkunft sowie die enzymatisch hergestellten Amylosen werden in einem Schraubdeckelgefäß das dicht verschlossen wird eingewogen. Nach Zusatz von 5ml dest Wasser werden alle Proben genau 10 Minuten unter starkem Rühren auf 140°C erhitzt. Nach membranfiltrieren der erkalteten Lösungen, werden diese sofort t bei einer Betriebstemperatur von 60°C und einem Fluß von 1ml pro Minute analysiert.

Die Kalibrierung des GPC-Systems erfolgt unter Verwendung von Pullulan-Standards mit Molgewichten $M_n=5400$ bis $M_n=1.400.000$. sie liefert folgende Eichkurve:

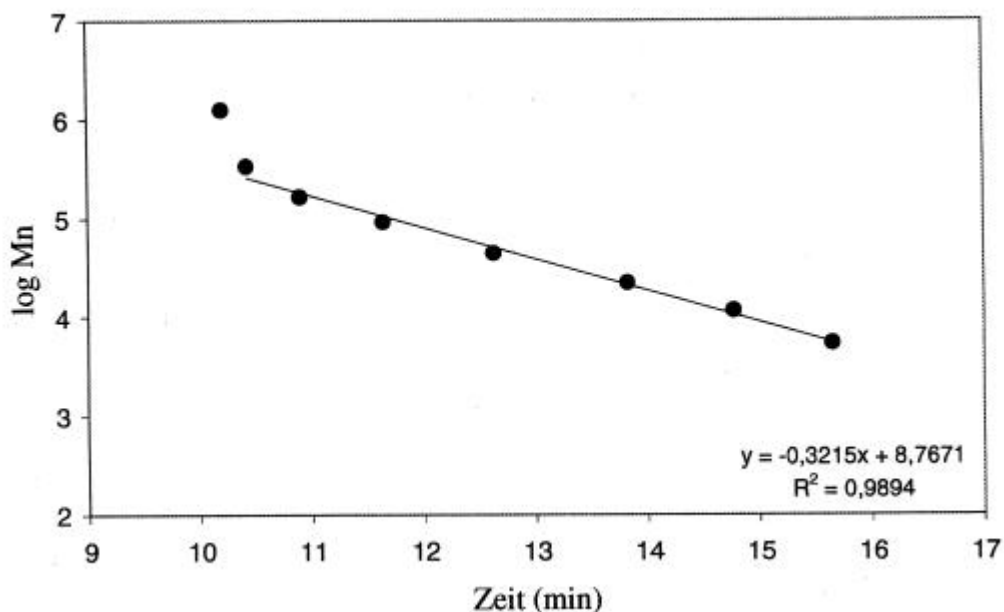


Abb. 31: Eichkurve des GPC-Systems

5 Literaturverzeichnis

- 1 M. Rothe, *Nahrung* **24**,7 (1980)
- 2 H.D. Berlitz, W. Grosch, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer-Verlag, Berlin (1992)
- 3 P. Schreier ,A. Mosandl, *Chemie in unserer Zeit* **19**, (1985), 22
- 4 D. Land, H.E. Nursten (Hrsg), *Progress in Flavour Research*, Applied Sciene Publishers, London
- 5 C .Franzke, *Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Behr´s Verlag (1996)
- 6 M. Tressl, R. Renner, *Dtsch. Lebenm.Rdsch.* **72**, 37
- 7 C. Baltes, *Lebensmittelchemie* 4. Aufl., Springer-Verlag,Berlin (1995)
- 8 U. Gasser ,W. Grosch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **186**, (1988), 498
- 9 G. Ohloff, *Riechstoffe und Geruchssinn*, Springer-Verlag, Berlin, (1990)
- 10 A. Monsandl, *Food Reviews Intern.* **4** (1), (1988) 1
- 11 R. Sakaguchi, E. Hayase, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, (1979), 1775
- 12 M. Rothe, *Introduction to Aroma Research*, Akademie-Verlag Berlin (1988)
Schwedt G., *Chemie und Analytik der Lebensmittelzusatzstoffe*, Thieme Verlag (1986)
- 13 P. Werkhoff, W. Bretschneider,H.Hermann K. Schreiber, *Fortschritte in der Aromastoffanalytik(1-9)*, *Labor Praxis* (1989) S. 306, 426, 514, 616, 766, 874, 1002, 1112 und (1990) S. 51
- 14 W. Jennings, *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 440 (1977)
- 15 P. Schreier, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **74**, 321.
- 16 R. Teranishi, P. Issenberg, I. Hornstein, E. L. Wick, *Flavor Research-Principles and Techniques*, Marcel Dekker, Inc., New York (1971)
- 17 H. Maarse, R. Belz (Hrsg.), *Isolation, Separation and Identification of volatile compounds in aroma research*, Akademie-Verlag, Berlin, 1981
- 18 W. Jennings, P..Schreier (Hrsg.), *Flavour ´81*, W. de Gruyter, Berlin, 1981
- 19 D.G. Guadagni, S.Okano, R.G. Buttery, H.K. Burr, *Food Technol.***20**, (1966), 518
- 20 W. Herres, in P. Schreier (Hrsg): *Analysis of Volatiles*, W. de Gruyter, Berlin (1984)
- 21 R. Tressl, *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* **34**, 47 (1980)

-
- 22 W. Auerswald, B. M. Brandstetter (Hrsg), *Probleme der Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaft 1 - Natürliche, naturidentische und synthetische Geschmacksstoffe und deren lebensmittelrechtliche Aspekte*, Wilhelm Maudrich Verlag, Wien
 - 23 E. Ziegler, *Die natürlichen und künstlichen Aromen*, Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg 1982
 - 24 D. G. Guadagni, J.L. Bomben, H. C. Mannheim, *J. Food Sci.*, **35**, (1970), 279
 - 25 H. Friedrich, B. A. Gubler, *Lebensmittel-Wissenschaft u. Technol.*, **11**, (1978), 251
 - 26 H.B. Heath, *Flavor Technologie*, AVI Publ. Company, Inc., Westport, Connecticut (1978)
 - 27 G.A. Reineccius, *Food Technol.* 45 (1991) 144
 - 28 S.J: Risch, G. A. Reineccius, ACS Symposium Series 370, *Am. Chem. Society*, Washington DC (1988)
 - 29 W. King, P. Trubiano, P. Perry, *Food Proc. Developm.*, **10**, (1976) 54
 - 30 L.Szente, J. Szejtli, (Risch,Reineccius Hrsg.) *Flavour Encapsulation* Am.Chem. Soc., Washington (1988), 148
 - 31 M. Gutcho, *Capsule Technology and Microencapsulation*. Noyes Data Corporation, Park Ridge, N.J. (1972)
 - 32 J. D. Dziezak, *Food Technol.*, **42**, (1988) 136
 - 33 H.G. Maier, K. Kessler, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* ,**79**, (1977), 241
 - 34 J.P. Dumont, (M. Martens, A. Dalen Hrsg.), *Flavour Science and Technology*, John Wiley& Sons (1987), S.143
 - 35 T.H. Schulz,K.P. Dimick, *Food Technology.*, **10** (1956)
 - 36 S.A. Goldblith, L. Rey, *Freeze Drying and advanced Food technology*, Academie Press, London (1975)
 - 37 H. G. Maier, R.U. Hartmann, *Lebensm. Unters. Forsch.*, **163**, (1977) 251
 - 38 A. C. Chen, M.F., Veigra, *Food Technol.* **42**, (1988), 87
 - 39 W. Saenger, *Angew. Chemie*, **92**,(1980), 343
 - 40 Dissertation A. Steinert, Dissertation 1998
 - 41 a) J. Szejtli, *Cyclodextrins and their inclusion complexes*, Akademia Kiado, Budapest, (1982)
b) T. Furuta, H. Yashi, *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, **191**, (2001), 23
c) I. Goubet, J.L. Le Quere, E. Semon, *ACS Symp. Ser.*, **763**, 2000, 246

-
- 42 H. U. Woelk, *Stärke*, **12**, (1981), 397
- 43 C.S. Hanes, *New Phytol.*, **31**, (1937), 189
- 44 B. Pfannemüller, h: Mayerhöfer, R.C. Schulz, *Biopolymers*, **23**, (1984), 2543
- 45 a) M. Yamamoto, T. Sano, T. Yasunaga, *Bull. Chem. Soc.*, **55**, (1982), 1886
b) Y. Muroga, *Macromol.*, **25**, (1992), 3385
- 46 W. Banks, C.T. Greenwood, *Stärke*, **23**, (1971), 300
- 47 W. Banks, *Carbohydrate Res.*, **7**, (1968), 414
- 48 W.Banks, C.T. Greenwood, *Carbohydr. Res.*, **7**, (1968), 349
- 49 Y. Hui, W.Zou, (H.J. Schneider, H. Dürr Hrsg), *Frontiers in Supramolecular Organic Chemistry and Photochemistry*, VCH Weinheim, (1991), 205
- 50 R.C. Jordan, D. A. Brandt, A. Cesaro, *Biopolymers*, **17**, (1978), 2617
- 51 V. S. R. Rao, N. Yathindra, P. R. Sundararajan, *Biopolymers*, **8**, (1969), 325
- 52 P.V. Bulpin, A. N. Cutler, A. Lips, *Macromolecules*, **20**, (1987), 44
- 53 Y. Hui, Y. Gai, *Macromol. Chem.*, **189**, (1988), 1287
- 54 M. A. Rutschmann, J. Solms, *Lebensm.- Wiss. u. Technol.*, **23**, (1990), 84
- 55 R. E. Rundle, *J.Amer. Chem. Soc.*, **69**, (1947), 1769
- 56 X. Yu, C. Houtman, R. H. Atalla, *Carbohydr. Res.*, **292**, (1996), 129
- 57 Y. Hui, C. Russel, D. G. Whitten, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, (1983), 1374
- 58 G. Wulff, S. Kubik, *Macromol. Chem.*, **193**, (1992), 1071
- 59 T. Kuge, K. Takeo, *Agr. Biol. Chem.*, Vol 32, **10**, (1968), 1232
- 60 a) Y. Yamashita, N. Hirai, *J. Polym. Sci.*, A2, **4**, (1966), 161
b) Y. Yamashita, K. Minobe, *J. Polym. Sci. A2*, **9**, (1971), 1471
- 61 K. Takeo, A. Tohundra, T. Kuge, *Stärke*, **25**, (1973), 357
- 62 D. French, *Denpun Kagaku*, **19**, (1972), 8
- 63 G. Wulff, S. Kubik, H.G. Breitingner (M. Eggersdorfer, S. Warwel Hrsg.), *Nachwachsende Rohstoffe – Perspektiven für die Chemie*, VCH Weinheim, (1993), 311
- 64 T. J. Schoch, *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, (1942), 2957
- 65 F. O-Ismail, J. Solms, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **6** (1973), 147-150
- 66 G. Avgenaki, Diplomarbeit, 1997
- 67 J.E. Fannon, J.M. Shull, J.N. BeMiller, *Cereal Chem*, **70**, (1993), 611-613
- 68 J. Solms (G.G. Birch, M.F. Lindsley Hrsg.) *Interaction of Food Components*, Elsevier London (1986), 189

- 69 J. Zhao, R.L. Whistler, *Food Technol.*, **48**, (1994) 104-105
- 70 G. Wulff, S. Kubik, *Makromol. Chem.*, **193**, (1992), 1071-1080
- 71 W. R. Morrison, A. M. Coverntry, *Starch/Stärke*, **41**, 1989, 24
- 72 G. Wulff, O. Höller, R. Beck (H. Eierdanz Hrsg.), in *Perspektiven Nachwachsender Rohstoffe in der Chemie*, VCH Weinheim, (1996), 263
- 73 R. Wyler, J. Solms, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **14**, (1981), 296-300
- 74 W. Gottwald (U. Gruber, W. Klein Hrsg.), in *GC für Anwender*, VCH Weinheim (1995), 125
- 75 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1991)
- 76 B. Pfannemüller, *Carbohydr. Res.*, **61**, (1981), 78
- 77 H. M. Bössler, R. C. Schulz, *Angew. Makrom. Chem.*, **29/30**, (1973), 431
- 78 S. Kubik, Dissertation Univ. Düsseldorf
- 79 R. Wyler, J. Solms, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **15**, (1982), 93-96
- 80 H. Hachenberg, K. Beringer, *Die Gaschromatographie als Analyse und Meßmethode*, Vieweg Verlag Braunschweig (1996)
- 81 W. Günter, (F. Schlegelmilch Hrg.) *Die Chromatographie mit Kapillartrennsäulen*, Vogel Buchverlag Würzburg (1986)
- 82 B. Kolb, *Labor Praxis*, **3** (1982), 45
- 83 P.L. Davis, *J. Chromatogr. Sci.*, **8** (1970), 423
- 84 B. Kolb, *Gaschromatographie in Bildern-Eine Einführung*-Wiley-VCH Weinheim (1999)
- 85 B. Kolb, **81 GIT Supplement Chromatographie**, 41
- 86 B.V. Ioffe, A.G. Vittenberg, *Headspace Analysis and Related Methods in GC*, Wiley-VCH Weinheim (1982)
- 87 D. Vetter, W. Thorn, *Starch/Stärke*, **7**, (1992), 271
- 88 Y. Aoyama, *Tetrahedron Letters*, **33**, (1992), 271
- 89 M. Yamamoto, T. Sano, S. Harada, T. Yasunaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, (1983), 2643
- 90 M.A. Rutschmann, J. Heiniger, V. Pliska, J. Solms, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, **22**, (1989), 240
- 91 M.A. Rutschmann, J. Solms, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, **23**, (1990), 80
- 92 Y. Saito, K. Yoshihara, I. Tanemura, H. Ueda, T. Sato, *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, (1997), 1711

- 93 M.Guzmann, Dissertation, Uni-Düsseldorf (1999)
- 94 G. Wulff, S. Kubik, *Starch*, **45**, (1993), 220
- 95 S. Kubik, Diplomarbeit, Uni Düsseldorf (1988)
- 96 a) C.T. Greenwood, *Stärke* **12** (1960), 169
b) G. Tegge, *Enzyklopedie der technischen Chemie*, Band 22, 4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, (1982), 125