

Bildung und Stabilität von Glucosinolatabbauprodukten und Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in erhitzten Lebensmitteln am Beispiel Gemüse-angereicherter Brote

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

an der Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik, Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie

Institut für Lebensmittelchemie

vorgelegt von

Mareike Brigitte Gertrud Krell

Hamburg, Juli 2022

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2018 bis April 2022 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Sascha Rohn am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

Dissertation

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Sascha Rohn
- 2. Gutachterin: Prof.in Dr. Agnes Weiß

Disputation

Datum: 23.09.2022

Prüfungskommission: Prof. Dr. Wolfgang Maison, Prof. Dr. Volkmar Vill, Prof. Dr. Sascha Rohn

Freigabe zur Veröffentlichung: 10.10.2022

I Wissenschaftliche Publikationen

Publikationen in Fachzeitschriften

Krell, M.; Hanschen, F. S.; Rohn, S. Formation and stability of isothiocyanate protein conjugates at different pH values and bread types enriched with nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). *Food Research International*, **2022**, 158, 111492. doi: 10.1016/j.foodres.2022.111492

Krell, M.; Cvancar, L.; Poloczek, M.; Hanschen, F.S.; Rohn, S. Determination of Isothiocyanate-Protein Conjugates in a Vegetable-Enriched Bread. *Foods*, **2021**, 10, 1300. doi: 10.3390/foods10061300

Tran, Hoi T. T.; Stetter, R; Herz, C; Spöttel, S; Krell, M.; Hanschen, F.S.; Schreiner, M; Rohn S.; Behrens, M; Lamy, E. Allyl Isothiocyanate: A TAS2R38 Receptor-Dependent Immune Modulator at the Interface Between Personalized Medicine and Nutrition. *Frontiers in Immunologie*, **2021**, 12, 669005. doi: 10.3389/fimmu.2021.669005

Vorträge

Krell M., Cvancar, L.; Poloczek, M.; Hanschen, F.S.; Rohn, S. Determination of benzyl isothiocyanate-protein conjugates in a vegetable-enriched bread with different cress genera. XXI EuroFoodChem, 22.-24. November 2021, digital, ausgezeichnet mit dem ReadyToPub Award vom Tagungsgremium der XXI EuroFoodChem

Krell, M.; Cvancar, L.; Poloczek, M.; Hanschen, F.S.; Rohn, S. Identification of isothiocyanate-protein conjugates in a vegetable-enriched bread.

Joint Meeting for Plant and Human Sulfur Biology and Glucosinolates, 26.–30. September 2021, Sevilla

Krell, M.; Poloczek, M.; Rohn, S. Nachweis von Isothiocyanat-Proteinaddukten in Gemüseangereicherten Broten.

58. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, 17.-19. Februar 2021, digital

Krell, M.; Poloczek, M.; Rohn, S. Nachweis von Isothiocyanat-Proteinaddukten in Gemüse-angereicherten Broten.

Virtuelle Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 18. März 2021, digital

Posterpräsentationen

Krell, M.; Cvancar, L.; Poloczek, M.; Hanschen, F.S.; Rohn, S. Untersuchung der Bildung von Benzylisothiocyanat-Getreideproteinaddukten in Gemüse-angereicherten Broten

49. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 30.08.2021-01.09.2021, online

Krell, M.; Poloczek, M.; Rohn, S. Untersuchung und Identifizierung von Isothiocyanat-Proteinaddukten in Gemüse-angereicherten Broten

54. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V. (DGQ) zum Thema „Produktqualität und Konsumentenverhalten im Spannungsfeld von Nachhaltigkeit und Krisen“, 23.03.2021, digital

Krell, M.; Cvancar, L.; Rohn, S. Nachweis von Isothiocyanat-Proteinaddukten in Gemüse-angereicherten Broten

LChG Tweet-your-Poster-Event 2020, 14.09.2020-15.09.2020, digital

Krell, M.; Rohn, S. Nachweis von Isothiocyanat-Proteinaddukten in Lebensmitteln

48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16.-18. September 2019, Dresden

II Inhaltsverzeichnis

I Wissenschaftliche Publikationen	I
II Inhaltsverzeichnis.....	III
III Abkürzungsverzeichnis	V
IV Abbildungsverzeichnis.....	VII
V Tabellenverzeichnis	XI
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	4
1 Einleitung.....	7
2 Theoretischer Hintergrund.....	9
2.1 Sekundäre Pflanzenstoffe	9
2.2 Glucosinolate.....	10
2.3 Isothiocyanate.....	15
2.4 Analytik von Proteinkonjugaten.....	24
3 Zielsetzung	26
4 Ergebnisse.....	28
4.1 Glucosinolatabbauprodukte und Proteinkonjugate in Broten angereichert mit Kapuzinerkresse (<i>Tropaeolum majus</i> L.) und Gartenkresse (<i>Lepidium sativum</i> L.).....	28
4.2 Vergleich der Bildung von Proteinkonjugaten in Brot mit 1% und 5% frischen Kapuzinerkresseblättern (<i>Tropaeolum majus</i> L.).....	34
4.3 Gehalt an Abbauprodukten und Untersuchung der Bildung von ITC-Proteinkonjugaten bei der Verwendung von Kapuzinerkresseblüten (<i>Tropaeolum majus</i> L.).....	36
4.4 Vergleich der Bildung von Benzylisothiocyanat-Lysin Addukten in Weizenbroten mit Blatt- und Blütenmaterial der Kapuzinerkresse (<i>Tropaeolum majus</i> L.).....	38
4.5 Bildung und Stabilität von Glucosinolatabbauprodukten und Isothiocyanat-Proteinaddukten in unterschiedlichen Brottypen mit Kapuzinerkressezusatz (<i>Tropaeolum majus</i> L.).....	40
4.6 Bildung und Stabilität von Benzylglucosinolatabbauprodukten und Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Modellbrot mit spezifischen pH-Werten und Kapuzinerkressezusatz (<i>Tropaeolum majus</i> L.)	46
4.7 Analyse der Glucosinolatabbauprodukte in Broten angereichert mit Kapuzinerkresse (<i>Tropaeolum majus</i> L.) vor und nach dem Backprozess	48
4.8 Migration von Benzylcyanid und Benzylisothiocyanat und die Bildung von Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Brot mit den Kressesorten <i>Lepidium sativum</i> L. und <i>Tropaeolum majus</i> L.	49
4.9 Lagerstabilität der Isothiocyanat-Proteinkonjugate im Probenmaterial und Probenlösungen ..	56
5 Diskussion.....	58
5.1 Glucosinolatabbauprodukte und Proteinkonjugate in Broten angereichert mit Kapuzinerkresse (<i>Tropaeolum majus</i> L.) und Gartenkresse (<i>Lepidium sativum</i> L.).....	58

5.2	Gehalt an Abbauprodukten und Untersuchung der Bildung von Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Weizenbrot mit unterschiedlichen Pflanzenteilen und Zusatzarten der Kapuzinerkresse (<i>Tropaeolum majus</i> L.).....	62
5.3	Bildung und Stabilität von Glucosinolatabbauprodukten und Isothiocyanat-Proteinkonjugate in unterschiedlichen Brottypen mit Kapuzinerkressezusatz (<i>Tropaeolum majus</i> L.).....	66
5.4	Bildung und Stabilität von Benzylglucosinolatabbauprodukten und Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Modellbrot mit spezifischen pH-Werten und Kapuzinerkressezusatz (<i>Tropaeolum majus</i> L.)	71
5.5	Analyse der Glucosinolatabbauprodukte vor und nach dem Backprozess.....	72
5.6	Migration von Benzylcyanid und Benzylisothiocyanat und die Bildung von Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Brot mit den Kressesorten <i>Lepidium sativum</i> L. und <i>Tropaeolum majus</i> L.	75
5.7	Lagerstabilität der Benzylisothiocyanat-proteinkonjugate im gefriergetrockneten Probenmaterial und hergestellten Probenlösungen für die LC-ESI-MS/MS-Analyse	77
5.8	Vergleich zwischen der Bildung von Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugaten und Benzylisothiocyanat-Cysteinkonjugaten.....	79
5.9	Auswirkungen der Proteinkonjugatbildung auf die Proteinfunktion und weitere potenzielle Reaktionen	80
6	Material und Methoden	83
6.1	Pflanzenmaterial	83
6.2	Herstellung der Brote und des Analysenmaterials	83
6.3	Bestimmung des Proteingehaltes nach KJELDAHL	90
6.4	Untersuchung des Glucosinolatgehaltes	91
6.5	Analyse der Glucosinolatabbauprodukteauproducte mittels GC-MS	93
6.6	Analyse der Proteinkonjugate mittels LC-ESI-MS/MS.....	94
6.7	Stabilitätstests	97
6.8	Statistische Analyse.....	98
7	Literaturverzeichnis.....	100
Anhang	115
Anhang I	Rezepturen der Brote mit unterschiedlicher Applikationsart und diverser Pflanzenteile der Kapuzinerkresse (<i>Tropaeolum majus</i> L.), sowie Gartenkresse (<i>Lepidium sativum</i> L.)	115
Anhang II	Rezepturen der diversen Brottypen.....	117
Anhang III	Rezepturen der Modellbrote mit unterschiedlichen pH-Werten.....	118
Anhang IV	Zusätzliche Daten zu den Ergebnissen	119
Anhang V	Proteingehalte der Referenzbrote nach KJELDAHL.....	120
Anhang VI	Auflistung der verwendeten Chemikalien	120
Eidesstattliche Versicherung	123

III Abkürzungsverzeichnis

1-MeO-IMG	1-Methoxy-indol-3-ylmethylglucosinolat, Neoglucobrassicin
2-PE	2-Phenylethylglucosinolat, Gluconasturtiin
AITC	Allylisothiocyanat
ARE	<i>antioxidant response element</i>
BC	Benzylcyanid
BG	Benzylglucosinolat, Glucotropaeolin
BITC	Benzylisothiocyanat
BITC-Cys	Benzylisothiocyanat-Cystein
BITC-Lys	Benzylisothiocyanat-Lysin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EI	<i>electron ionization</i>
ESI	Elektronenspray-Ionisation
ESM	<i>epithiospecifier modifier protein</i>
ESP	<i>epithiospecifier protein</i>
FA	Ameisensäure
FG	Frischgewicht
GLS	Glucosinolat
GSH	Glutathion
HPLC-UV	Hochleistungsflüssigchromatographie mit ultraviolett Detektor, <i>high-performance liquid chromatography-ultraviolet</i>
IGZ	Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V.
IMG	Indol-3-ylmethylglucosinolat, Glucobrassicin
ITC	Isothiocyanat
KEAP1	<i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
MeOH	Methanol
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>

MS	Massenspektrometrie
MYR	Myrosinase
NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cysteine
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid related factor 2</i>
NSP	<i>nitrile specifier protein</i>
OPA	o-Phthaldialdehyde
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEITC	Phenethylisothiocyanat
SPE	<i>solid phase extraction</i> , Festphasenextraktion
SPS	Sekundäre Pflanzenstoffe
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TM	Trockenmasse
WHO	<i>World Health Organisation</i>

IV Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Strukturelle Darstellung des Glucosinolat-Grundgerüsts, aufgebaut aus einem sulfonierten Oximrest, einer β -D-Thioglucose und der variablen Seitenkette (R) nach Ettliger et al. (1956)..... 12
- Abbildung 2:** Klasseneinteilung und Strukturbeispiele der variablen Seitenkette R. Aliphatische GLS: Sinigrin (a), Glucoputranjivin (b) und Glucocochlearin (c), aromatisches GLS: Glucotropaeolin (d), indolisches GLS: Glucobrassicin (e) GLS, R': Glucosinolatgrundgerüst..... 12
- Abbildung 3:** LOSSEN-ähnliche Umlagerung bei einem neutralen pH-Wert des Thiohydroximat-O-sulfonats zu ITC..... 14
- Abbildung 4:** Darstellung des enzymatischen Abbaus der Glucosinolate in Abhängigkeit von diversen Einflussfaktoren zu Isothiocyanaten, Nitrilen, Epithionitrilen, Thiocyanaten und Oxazolidin-2-thionen. Abkürzungen: ESM: *epithiospecifier modifier protein*, ESP: *epithiospecifier protein*, NSP: *nitrile specifier protein*, TFP: *thiocyanate forming protein*, R: variable Seitenkette..... 16
- Abbildung 5:** Bildung der Reaktionsprodukte BITC-Cystein (Dithiocarbamat) und BITC-Lysin (Thioharnstoff) durch die Reaktion zwischen BITC und der Thiol- bzw. Aminogruppe der Aminosäuren Cystein und Lysin in einem Protein..... 22
- Abbildung 6:** Bilder der hergestellten Brote mit unterschiedlichem Kressezusatz. (a) Brot mit 4% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., Rezeptur 1), (b) Brot mit frischer Gartenkresse (*Lepidium sativum* L., Rezeptur 2), (c) Referenzbrot ohne Pflanzenmaterial. Abbildung nach Krell et al. (2021). 28
- Abbildung 7:** Gehalt an Benzylglucosinolat in den verwendeten Kressegerattungen Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., gefriergetrocknet) und Gartenkresse (*Lepidium sativum* L., frisch) vor der Zugabe zum Teig (unverarbeitet) und nach dem Backprozess (gebacken). Die Asterisken zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den verwendeten sowie dem unverarbeiteten und gebackenen Pflanzenmaterial. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse..... 30
- Abbildung 8:** Thermischer Abbau von Benzylglucosinolat in Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) nach einem 10-minütigen Kochprozess zur Inaktivierung der Myrosinase und anschließendem Backprozess. Das Experiment wurde im Duplikat durchgeführt. Abkürzungen: n.n.: nicht nachweisbar. Die Asterisken zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den Verarbeitungsstufen. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse..... 31
- Abbildung 9:** Benzylglucosinolatbauprodukte Benzylisothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) in Brot mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (4%, *Tropaeolum majus* L., Rezeptur 1) und frischer Gartenkresse (1,5%, *Lepidium sativum* L., Rezeptur 2). Die Brote wurden in Triplikaten hergestellt. Der Asterik zeigt einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) im Gehalt an den analysierten Abbauprodukten. Großbuchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) an einem Abbauprodukt in den untersuchten Rezepturen. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse..... 33
- Abbildung 10:** Gebildete Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugate (BITC-Lys) in Brot mit unterschiedlicher Kresseapplikation. Abkürzungen: Rezeptur 1: Brot mit 4% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse

(*Tropaeolum majus* L.); Rezeptur 2: Brot mit 1,5% frischer Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.). Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. ¹Für Rezeptur 1 wurden zwei Replikate für die Auswertung verwendet. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.....34

Abbildung 11: Beispielbild eines Brotes (a), das mit 5% intakten frischen Kapuzinerkresseblättern (*Tropaeolum majus* L., KLBÄ 5%) angereichert wurde und (b) das entsprechende Referenzbrot ohne Pflanzenmaterial.....35

Abbildung 12: Bildung von Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugaten (BITC-Lys) in Broten mit 1% (KBLÄ 1%) oder 5% (KBLÄ 5%) frischen Blättern der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.). Der Asterik zeigt einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den hergestellten Broten. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten..... 36

Abbildung 13: Bild eines Brotes (a), das mit 1,5% Kapuzinerkresseblüten (*Tropaeolum majus* L., KLBÜ) angereichert wurde, sowie (b) das entsprechende Referenzbrot ohne Anreicherung..... 36

Abbildung 14: Gehalt an den Abbauprodukten Benzylcyanid (BC), Benzylisothiocyanat (BITC) und des gebildeten Reaktionsproduktes Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys) in Brot angereichert mit Kapuzinerkresseblüten (2,5%, *Tropaeolum majus* L.). Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede in den analysierten Gehalten in dem angereicherten Brot. ¹Für BC wurden zwei Replikate für die Auswertung verwendet..... 37

Abbildung 15: Gehalt an Benzylisothiocyanat-Lysin Addukten in den unterschiedlichen Weizenbroten mit diversen Arten des Kapuzinerkressezusatzes (*Tropaeolum majus* L.). Die Asterisken zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den analysierten Gehalten an BITC-Lys in den Broten. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. ¹Für Rezeptur 1 wurden zwei Replikate für die Auswertung verwendet. Abkürzungen: Rezeptur 1: Weizenbrot mit 4% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse; KBLÄ 1%: Weizenbrot mit 1% frischen Kapuzinerkresseblättern zum Gesamtgewicht; KBLÄ 5%: Weizenbrot mit 5% frischen Kapuzinerkresseblättern zum Gesamtgewicht; KBLÜ: Weizenbrot mit 1,5% frischen Kapuzinerkresseblüten.....38

Abbildung 16: Bilder der verschiedenen mit Kresse angereicherten Brottypen (a-e, rechts) mit den jeweils dazugehörigen Referenzbroten (a-e, links). (a) Weizenvollkornbrot (WVK) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) angereichert (rechts); b) Roggenvollkornbrot (RVK) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse angereichert (rechts); c) Weizen-Sodabrot (WSB) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse angereichert (rechts); d) Dinkelmehlbrot (DMB) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse angereichert (rechts); Kichererbsenmehlbrot (KEMB) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse angereichert (rechts). Abbildung veröffentlicht in Krell et al. (2022).....42

Abbildung 17: Gehalt an Benzylglucosinolatabbauprodukten (a) Benzylisothiocyanat (BITC) und (b) Benzylcyanid (BC) in den verschiedenen Brottypen. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen einen statistischen Unterschied zwischen den Brottypen an den untersuchten Tagen ($p \leq 0,05$). Großbuchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) in einer Brotsorte zwischen den verschiedenen Tagen. Abkürzungen: WVK: Weizenvollkornbrot; RVK: Roggenvollkornbrot; DMB: Dinkelmehlbrot; KEMB: Kichererbsenmehlbrot; WSB: Weizen-Sodabrot. Abbildung nach Krell et al. (2022)..... 44

- Abbildung 18:** Gehalt an Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugaten (BITC-Lys) in Brottypen mit unterschiedlichen Mehlen und Backtriebmitteln. Die Asterisken zeigen einen statistischen Unterschied zwischen den Broten an den jeweiligen Tagen ($p \leq 0,05$). Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Abkürzungen: WVK: Weizenvollkornbrot; RVK: Roggenbrot; DMB: Dinkelmehlbrot; KEMB: Kichererbsenmehlbrot; WSB: Weizen-Sodabrot. ¹Für WVK wurden an Tag 5 nur zwei Replikate für die Auswertung verwendet. Abbildung nach Krell et al. (2022).45
- Abbildung 19:** Gehalt an Benzylcyanid (BC) und Benzylisothiocyanat (BITC) in Modellbrot mit spezifisch pH-Werten. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen einen statistischen Unterschied zwischen den BC und BITC für das jeweilige Brot mit bestimmtem pH-Wert ($p \leq 0,05$). Unterschiedliche Großbuchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied im BC-Gehalt in den verschiedenen Modellbrot ($p \leq 0,05$). Abbildung nach Krell et al. (2022).47
- Abbildung 20:** Gehalt an Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugaten (BITC-Lys) in Broten mit unterschiedlichen pH-Werten des Teiges. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten, außer wenn anders angegeben: ¹Für pH 7,3 und 10,1 wurden zwei Wiederholungen für die statistische Analyse verwendet. Der Asterisk zeigt einen statistischen Unterschied zwischen BITC-Lys-Gehalten in den unterschiedlichen Broten mit bestimmten pH-Werten ($p \leq 0,05$). Abbildung nach Krell et al. (2022). 48
- Abbildung 21:** Gehalt an Benzylisothiocyanat (BITC, a) und Benzylcyanid (BC, b) vor und nach dem Backvorgang in Brot, das mit trockener, gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., Nr. 1) und einer inkubierten Kapuzinerkresse-Suspension hergestellt (Nr. 2) wurde. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen statistische Unterschiede vor und nach dem Backvorgang und zwischen den verschiedenen Kressezusätze ($p \leq 0,05$). Abbildung nach Krell et al. (2022).50
- Abbildung 22:** Bilder der hergestellten Brote mit mittlerer Applikation von (a) 1,5% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., Rezeptur 3) und (c) 2,5% frischer Gartenkresse (*Lepidium sativum* L., Rezeptur 4), sowie (b) des Referenzbrotes ohne Pflanzenmaterial. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.51
- Abbildung 23:** Gehalt an den Abbauprodukten Benzylisothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC), in Broten mit mittlerer Applikation von Kressematerial. Abkürzungen: Rezeptur 3: gefriergetrocknete Kapuzinerkresse (1,5%, *Tropaeolum majus* L.); Rezeptur 4: Gartenkresse (2,5%, *Lepidium sativum* L.). Die Asterisken zeigen Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Gehalt an BITC oder BC in den unterschiedlichen Rezepturen. Großbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) innerhalb der Rezeptur 4 in den unterschiedlichen Fraktionen, während kleine Buchstaben die Unterschiede ($p \leq 0,05$) in Rezeptur 3 in den drei Fraktionen zeigen. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.53
- Abbildung 24:** Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys)-Konjugate in den Broten mit mittig applizierter gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (Rezeptur 3, 1,5%, *Tropaeolum majus* L.) und frischer Gartenkresse (Rezeptur 4, 2,5%, *Lepidium sativum* L.) in unterschiedlichen Fraktionen der Brotkrume. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. ¹Für Rezeptur 3 wurden für die

mittlere und äußere Fraktion zwei Replikate für die Auswertung verwendet. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.	55
Abbildung 25: Lagerstabilität von Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys) in gefriergetrocknetem Probenmaterial. Verglichen werden die Ergebnisse nach Tag 1, Woche 3 und Woche 10. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Der Asterisk zeigt einen statistischen Unterschied zwischen den Lagerungszeiträumen ($p \leq 0,05$).....	56
Abbildung 26: Lagerstabilität von Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys) in aufgearbeiteten Probelösungen. Verglichen werden die LC-ESI-MS/MS-Ergebnisse an Tag 1, nach 3 Wochen und nach 10 Wochen. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen statistische Unterschiede zwischen den Lagerungszeiträumen ($p \leq 0,05$). ¹ Für Woche 10 wurden zwei Replikate für die statistische Analyse verwendet.	57
Abbildung 27: Temperaturverläufe im Brot bei der Verwendung des Basis- und des Basis-Vollkorn Programmes des UNOLD Backmeister® extra Modell 65811 im Brot.....	86
Abbildung 28: Temperaturverlauf im Weizenbrot mit Soda (WSB), gebacken in einem handelsüblichen Ofen bei 180 °C (Umluft) für 20 min.....	87
Abbildung 29: Herstellen des Analysenmaterials zur Untersuchung einer möglichen Migration von GLS und ihren Abbauprodukten in die umgebende Brotmatrix aus dem eingesetzten Pflanzenmaterial. ..	89
Abbildung 30: Elutionsmittelzusammensetzung für die HPLC-Analyse der Desulfo-Glucosinolate. Eluent A: Wasser; Eluent B: Acetonitril.	93
Abbildung 31: Gradientenzusammensetzung der HPLC-Methode für die LC-ESI-MS/MS-Analyse der ITC-Aminosäurekonjugate. Eluent A: wässrige Ameisensäure (0,1% in Wasser); Eluent B: methanolische Ameisensäure (0,1% in Methanol).	96
Abbildung 32: Darstellung der Strukturen von Benzylisothiocyanat-Cystein (BITC-Cys) und Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys), die zur Analyse eine Konjugation zwischen Aminosäuren und Isothiocyanaten dienen.	97

V Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Glucosinolatprofil und -gehalt in der verwendeten Kapuzinerkresse (<i>Tropaeolum majus</i> L.) und Gartenkresse (<i>Lepidium sativum</i> L.) vor (unverarbeitet) und nach (gebacken) dem Backvorgang. Die Ergebnisse sind in $\mu\text{mol/g}$ Trockenmasse (TM) \pm Standardabweichung angegeben. Zusätzlich wurde der Wert der Gartenkresse auf das Frischgewicht (FG) umgerechnet, da diese frisch verwendet wurde. Abkürzungen: n.n.: nicht nachweisbar; BG: Benzylglucosinolat, IMG: Indol-3-ylmethylglucosinolat, 2-PE: 2-Phenylethylglucosinolat, 1-MeO-IMG: 1-Methoxy-Indol-3-ylmethylglucosinolat. Werte veröffentlicht in Krell et al. (2021).....	30
Tabelle 2: Probenbezeichnungen, Abkürzungen, sowie die Zusatzart und -menge und der resultierende Gehalt an Benzylglucosinolat (BG) in den Broten mit unterschiedlicher Kapuzinerkresse (<i>Tropaeolum majus</i> L.)-Anreicherung.	39
Tabelle 3: Hergestellte Brote und ihre Probenbezeichnung, sowie die Zusatzart und -menge.....	84
Tabelle 4: Backprogramme mit zeitlichem Ablauf und Temperaturen der Programmabschnitte des UNOLD Backmeister® extra Modell 65811.	85
Tabelle 5: Temperaturverlauf im Weizenbrot mit Soda (WSB) während des Backens bei einer Backzeit von 20 Min in einem handelsüblichen Backofen (180 °C, Umluft).....	87
Tabelle 6: Hergestellte Brote mit mittlerer Applikation des Pflanzenmaterials und ihre Probenbezeichnungen, sowie die Zusatzart, -menge und das verwendete Backprogramm des Backautomaten.....	88
Tabelle 7: Lysin und Cysteingehalt in den verwendeten Mehlen.....	90
Tabelle 8: Retentionszeiten und Fragmentmassen, die zur Qualifizierung und Quantifizierung von Benzylisothiocyanat-Cystein (BITC-Cys) und Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys) mittels der LC-ESI-MS/MS-Methode verwendet wurden.	97
Tabelle 9: Zusammensetzung der hergestellten Teige, sowie Zusatzart und -menge des Pflanzenmaterials.....	115
Tabelle 10: Zusammensetzung der hergestellten Teige diverser Brotsorten, sowie Zusatzmenge an gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (<i>Tropaeolum majus</i> L.).....	117
Tabelle 11: Zusammensetzung der hergestellten Teige für die Modellbrote mit unterschiedlichen pH-Werten und die Zusatzmenge an gefriergetrockneter Kapuzinerkresse.....	118
Tabelle 12: Analytierte Gehalte der Abbauprodukte Benzylisothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) in den unterschiedlichen Brottypen während einer Lagerung von fünf Tagen, untersucht an Tag 1, 3 und 5. Abkürzungen: WVB: Weizenvollkornbrot; RVK: Roggenvollkornbrot; DMB: Dinkelmehlbrot; KEMB: Kichererbsenmehlbrot; WSB: Weizen-Sodabrot. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei echten Replikaten im technischen Duplikat.....	119
Tabelle 13: Analytierte Gehalte vom Aminosäurekonjugat BITC-Lysin (BITC-Lys) in den unterschiedlichen Brottypen während einer Lagerung von fünf Tagen, untersucht an Tag 1, 3 und 5. Abkürzungen: WVK: Weizenvollkornbrot; RVK: Roggenvollkornbrot; DMB: Dinkelmehlbrot; KEMB: Kichererbsenmehlbrot; WSB: Weizen-Sodabrot. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei echten Replikaten im technischen Duplikat.....	119

Tabelle 14: Analysierte Gehalte der Abbauprodukte Benzylisothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) in den unterschiedlichen Broten mit spezifischen pH-Werten (pH-Brote) Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei echten Replikaten im technischen Duplikat.....119

Tabelle 15: Durchschnittliche Proteingehalte der Referenzbrote nach Kjeldahl. Angegeben sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung von drei echten Replikaten im technischen Duplikat. ¹Von WSB und dem pH-Modellbrot wurde nur ein Referenzbrot hergestellt und im technischen Duplikat analysiert.120

Tabelle 16: Verwendete Gefahrstoffe mit ihrer Einstufung nach der VO (EG) Nr. 1272/2008.....120

Zusammenfassung

Um die Aufnahme an Gemüse und Obst mit ihren potenziell gesundheitsfördernden sekundären Pflanzenstoffen (SPS) zu erhöhen, werden vermehrt traditionelle Lebensmittel angereichert. *Brassica*-Gemüse ist besonders reich an Glucosinolaten (GLS), die, während der Prozessierung, zu einer Reihe von Folgeprodukten, wie Nitrile und Isothiocyanate (ITC) abgebaut werden. Die ITC sind mit einer Reihe von positiven Eigenschaften assoziiert und können den gesundheitlichen Nutzen eines Lebensmittels erhöhen. Aufgrund der hohen Elektrophilie können ITC allerdings auch mit den nukleophilen Seitenketten von anderen Lebensmittelinhaltsstoffen wie Proteinen und Peptiden Konjugate bilden, die unter anderem die biologische Wertigkeit der Proteine vermindern können. Trotz der Reaktivität wäre es für die menschliche Gesundheit dennoch interessant, durch eine Anreicherung eines Lebensmittels mit *Brassica*-Gemüse, ein Produkt herzustellen, das reich an ITC ist.

Einige Studien beschäftigten sich bereits entweder mit der Bildung von ITC-Proteinkonjugaten oder dem generellen Gehalt von freiem ITC in einem Lebensmittel. Bisher gibt es allerdings wenig bis keine Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen den freiwerdenden ITC-Gehalt und der Bildung von ITC-Proteinkonjugaten. Dazu zählt zusätzlich der mögliche Einfluss der Prozessierung, sowie unterschiedliche pH-Werte auf das Abbauverhalten der GLS und die ITC-Konjugation. Darüber hinaus gibt es keine Daten zu dem Migrationsverhalten der GLS und ihrer Abbauprodukte, sowie Untersuchungen der gebildeten Abbauprodukte im Lebensmittel vor der Prozessierung und im Endprodukt.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher unterschiedliche Faktoren der ITC-Bildung und eine mögliche Einflussnahme der Lebensmittelmatrix und -herstellung auf den ITC-Gehalt untersucht. Als Grundmatrix diente Brot, das für eine Anreicherung geeignet ist, da es vor allem in westlichen Ländern viel verzehrt wird. Als Pflanzenmaterial wurde Kresse (*Lepidium sativum* L., *Tropaeolum majus* L.) in unterschiedlichen Homogenisierungsgraden zugesetzt. Kresse wird bereits als würzende Zutat, beispielsweise auf Brot mit Käse, verwendet und daher wird eine gute Verbraucherakzeptanz von einem Kresse-angereicherten Brot erwartet. Das dominierende Glucosinolat der Kresse ist Benzylglucosinolat (BG), das im Laufe des Herstellungsprozesses in Benzyliothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) abgebaut wird. Zur

Identifizierung und Quantifizierung der BITC-Proteinkonjugate diente eine LC-ESI-MS/MS-Methodik. Mit Hilfe einer GC-MS-Methode konnte der Gehalt an den Abbauprodukten BITC und BC bestimmt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass in erhitzten Lebensmitteln eine Konjugation zwischen ITC und Aminosäuregruppen erfolgte und zu einer Verringerung des „freien“ ITC-Gehaltes beitrug. Zusätzlich führte der Hitzeprozess beim Backen zu der vermehrten Bildung von hitzestabilen Nitrilen, wodurch die ITC-Konzentration im Endprodukt niedriger war als in nicht erhitzten Lebensmitteln. Die Abbaurate der Glucosinolate im Pflanzenmaterial wurde darüber hinaus durch dessen Zustand, in stückiger oder pulverisierter Form, beeinflusst. Die Rate des Abbaus der GLS im intakten Pflanzenmaterial war geringer, trotzdem konnten insgesamt mehr Abbauprodukte in den Broten mit stückigem Pflanzenmaterial nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass im pulverisierten Material bereits vor Beginn des Backprozesses ein Abbau durch Myrosinase und während des Backvorgangs eine Zersetzung von BITC und BC erfolgen könnte, was insgesamt zu einem geringeren Gehalt an Abbauprodukten in den Broten mit homogenisierten Pflanzenmaterial führte.

Anhand weiterer Experimente ließ sich feststellen, dass die Glucosinolatabbauprodukte nicht örtlich in der Nähe der Gemüsekomponente gebunden waren, sondern eine Migration in die umgebende Lebensmittelmatrix erfolgte und dort ebenfalls ITC-Konjugate gebildet wurden. Dementsprechend lassen sich Abbauprodukte und Konjugate nicht örtlich begrenzen, was mögliche negative Auswirkungen auf die Lebensmittelmatrix erhöhen könnte.

Zusätzlich ließen die Untersuchungen von unterschiedlichen Brotmatrices und Broten mit spezifischen pH-Werten keine signifikanten pH-Einflüsse auf die Bildung an ITC und Folgeprodukte erkennen. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass ein höherer pH-Wert des Teigs die Reaktivität zwischen ITC und Lysin förderte, wohingegen bei sehr niedrigen pH-Werten die Bildung von ITC stark unterbunden wurde. Lebensmittel mit sehr sauren oder neutralen bis basischen pH-Werten scheinen demnach keine geeignete Anreicherungsbasis für ein ITC-reiches Lebensmittel zu sein. Stattdessen sollte ein Produkt mit einem pH-Wert von 5-6 gewählt werden, da in diesem Bereich die Myrosinase aktiv ist, die die Bildung von ITC fördert.

Die Untersuchungen zur Stabilität der Abbauprodukte und der ITC-Konjugate über mehrere Tage in unterschiedlichen Brotmatrices zeigten, dass die ITC-Lysinkonjugate sowie die Abbauprodukte BITC und BC weitgehend stabil waren. Eine Lagerung des hergestellten Probenmaterials der gebackenen und gefriergetrockneten Brote und der Probelösungen für die LC-ESI-MS/MS-Messung sollte allerdings vermieden werden, da die Lysin-Addukte eine geringe Stabilität aufwiesen.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass Brot als Anreicherungsmatrix für ein ITC-reiches Lebensmittel aufgrund des Hitzeprozesses ungeeignet ist, da der ITC-Gehalt beim Backen stark reduziert wurde. Die vorliegenden Ergebnisse lassen annehmen, dass die pH-Wert abhängige Bildung von ITC im Brot nicht signifikant ist, da die Temperatur einen größeren Einfluss auf die Gesamt-ITC-Konzentration im Endprodukt hat. Nicht erhitzte Lebensmittel, wie Quark, eignen sich demnach besser für eine Anreicherung mit glucosinolathaltigem Gemüse, um eine möglichst hohe Konzentration an ITC zu erreichen. Der Abbau der GLS bei Raumtemperatur erfolgt hauptsächlich über das Enzym Myrosinase, wodurch mehr ITC anstelle von hitzestabilen Nitrilen gebildet werden. Hohe Gehalte an ITC können allerdings auch in einer erhöhten Bildung von ITC-Konjugaten resultieren.

Summary

In order to increase the intake of vegetables and fruits with their potentially health-promoting secondary plant metabolites (SPS), traditional foods are enriched with vegetables, for example with those from the Brassicaceae family. These are rich in glucosinolates (GLS), which are degraded, among other products, to isothiocyanates (ITC) during processing. ITC are associated with beneficial properties, such as antimicrobial and anti-inflammatory effects, and can increase the health benefits of a food product when consumed. However, due to the high electrophilicity of ITC, they can form conjugates with the nucleophilic side chains of other food ingredients such as proteins and peptides, which can, among other effects, decrease the biological value of the food. Despite the reactivity, it would still be interesting for human health to produce a food product rich in ITC by fortifying with *Brassica* vegetables.

Some studies already investigated the formation of ITC conjugates or the general content of free ITC in a food product. However, to date, there has been little to no research on the relationship between free ITC and the formation of ITC conjugates. This additionally includes the possible influence of processing, as well as different pH values on the degradation behavior of GLS and ITC conjugation. Furthermore, there are no data on the migration behavior of GLS and their degradation products, as well as studies of the formed degradation products in the food before processing and in the final product.

Therefore, in the present work different factors of ITC formation and a possible influence of the food matrix and production on the ITC content were investigated. Bread, which is widely consumed especially in Western countries and thus suitable for enrichment, served as the basic matrix. Cress (*Lepidium sativum* L., *Tropaeolum majus* L.) was added as plant material in different degrees of homogenization. Garden cress is already used as a seasoning ingredient e.g., on bread with cheese. The main glucosinolate in cress is benzyl glucosinolate (BG), which is degraded to benzyl isothiocyanate (BITC) and benzyl cyanide (BC) during the heating process. LC-ESI-MS/MS methodology was used to identify and quantify the BITC-amino acid conjugates and a GC-MS-method to determine the content of the degradation products BC and BITC.

In the present work, it was demonstrated that conjugation between ITC and amino acid groups occurred in heated food products and contributed to a reduction in the 'free' ITC content. The

heat process during baking led to the increased formation of heat-stable nitriles, resulting in lower ITC levels in the final product than in non-heated foods. Additionally, the rate of degradation of glucosinolates in the plant material was influenced by its condition. The rate of degradation of GLS in intact plant material was lower, but more overall degradation products were detected in these breads. This is presumably mainly due to the fact that in the homogeneous material, degradation by myrosinase could take place before the start of the baking process and decomposition of the degradation products could occur during the baking process, resulting in a lower content of degradation products in these breads.

Based on further experiments, it could be determined that the glucosinolate degradation products were not directly localized near the vegetable component, but migrate into the surrounding food matrix, where ITC conjugates were also formed. Accordingly, degradation products and conjugates cannot be localized, which could increase potential negative effects on the food matrix.

In addition, the studies of different bread matrices and breads with specific pH values did not indicate any significant pH-influences on the formation of ITC and reaction products. However, it was found that a higher pH of the dough promoted the reactivity between ITC and lysine, whereas very low pH values strongly inhibited the formation of ITC. Accordingly, foods with very acidic or neutral to basic pH values do not seem to be a suitable enrichment base for an ITC-rich food. Instead, a product with a pH of 5-6 seems to be best, since myrosinase is active in this range, which promotes the formation of ITC.

The studies on the stability of the degradation products and the ITC conjugates over several days in different bread matrices showed that the ITC-lysine conjugates as well as the degradation products were mainly stable. However, storage of the prepared sample material of the baked and freeze-dried breads and the sample solutions for the LC-ESI-MS/MS measurement should be avoided as the lysine conjugates did not show a good stability over a longer time period.

In summary, bread is not suitable as an enrichment matrix for an ITC-rich food due to the heat process, because the ITC content was greatly reduced during baking. A dependence of the formation of ITC in bread on the pH value of the prepared dough can be considered low since temperature has a greater influence on the total ITC level in the final product. Accordingly, non-

heated foods, such as curd, are more suitable for an enrichment with glucosinolate-containing vegetables to achieve a high level of ITC for health-promoting effects. Degradation at room temperature occurs mainly due to the enzyme myrosinase, resulting in the formation of more ITC instead of heat-stable nitriles. However, high levels of ITC can also result in increased formation of ITC-conjugates.

1 Einleitung

Aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel stammen eine Vielzahl bioaktiver Verbindungen, die beim Verzehr pharmakologische Eigenschaften und positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben können. Die tägliche Aufnahmemenge an Obst und Gemüse ist allerdings niedrig und erreicht nicht die empfohlenen 400 g am Tag, wodurch auch die positiven Eigenschaften der enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe (SPS) nicht zu tragen kommen (WHO, 2021). Um gesundheitsfördernde Wirkungen durch die SPS und die Zufuhr von Obst und Gemüse zu erhöhen werden daher vermehrt Lebensmittel hergestellt, denen neben Pflanzenextrakten auch gefriergetrocknete oder frische Frucht- und Gemüsepartikel zugesetzt werden (Bernhoft, 2010; Henry, 2010; Kaur et al., 2011). Auch Gemüse aus der Pflanzenfamilie Brassicaceae, zu denen diverse Kohl- und Kressesorten zählen und die reich an Glucosinolaten (GLS) sind, werden für eine Anreicherung verwendet. Die gesundheitsfördernden Eigenschaften dieser SPS, wie eine antibakterielle und entzündungshemmende Wirkung, sind hierbei vor allem auf die Isothiocyanate (ITC) zurückzuführen. Diese resultieren durch die Zerstörung des Pflanzengewebes bei der Lebensmittelverarbeitung aus den GLS als Abbauprodukte (Gupta et al., 2014; Palliyaguru et al., 2018; Veeranki et al., 2015). Neben den positiven Eigenschaften der ITC haben diese allerdings auch eine hohe Elektrophilie, die zu Reaktionen mit nukleophilen Lebensmittelbestandteilen, einschließlich der Amino- und Thiolgruppen der Aminosäureseitenketten von Peptiden und Proteinen, führen können (Kroll et al., 1994). In unterschiedlichen Modellsystemen, aber auch in kombinierten Lebensmitteln konnten solche Konjugate bereits nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass die ITC-Proteinkonjugation nicht nur die technofunktionellen und physikochemischen Eigenschaften beeinflusst, sondern auch die Funktion der Enzyme im Magen-Darm-Trakt beeinträchtigen können (Keppler et al., 2014; Kroll et al., 1996; Spöttel et al., 2021b). Die Bildung der ITC-Konjugate steht demnach der Anreicherung von Lebensmitteln mit GLS-reichen Gemüse entgegen, da diese auch zu Veränderungen des Lebensmittels führen kann und den Gehalt an „freiem“ ITC verringert. Aufgrund dessen, dass auch eine Wirkung von ITC zur Reduktion bestimmter Krebsarten diskutiert wird, bleibt das Interesse an der Verwendung von *Brassica*-Gemüse als Zutat für eine Anreicherung bestehen. Es ist daher wichtig, mögliche

Einflussfaktoren auf den GLS-Abbau und die Reaktivität der ITC zu untersuchen, um eine ITC-Konjugation und mögliche negative Einflüsse im Endprodukt gering zu halten (Anwar et al., 2017). Dies wurde bisher in der Literatur nicht ausreichend dargestellt.

Mögliche Einflussfaktoren auf den ITC-Gehalt im Endprodukt bringt auch das Anreicherungsmedium, also das anzureichernde Lebensmittel, mit sich. Für die Erhöhung des Gemüsekonsums durch eine Anreicherung eignen sich vor allem Produkte, die viel verzehrt werden. Dazu zählt beispielsweise Brot, da es unabhängig von Alter und Geschlecht in allen westlichen Ländern häufig konsumiert wird (Belderok, 2000; Hobbs et al., 2014). Der Brotteig kann je nach Mehlsorte und Zubereitung unterschiedliche pH-Werte und Strukturen aufweisen. Darüber hinaus ist für die Brotherstellung eine Hitzebehandlung notwendig, bei der Temperaturen um 100 °C erreicht werden, die einen Einfluss auf die bioaktiven Inhaltsstoffe haben kann. Bei der Anreicherung von Brot mit *Brassica*-Gemüse könnten diese Faktoren nicht nur den ITC-Gehalt, sondern auch die ITC-Proteinkonjugatbildung beeinflussen (Hanschen et al., 2018).

Vorangegangene Studien untersuchten den ITC-Gehalt und ITC-Konjugate in unterschiedlichen Lebensmittelmatrices unabhängig voneinander (Klopsch et al., 2019; Kühn et al., 2018b). Bisher erfolgten noch keine Untersuchungen zu einem Zusammenhang zwischen dem ITC-Gehalt und der Bildung von ITC-Proteinkonjugaten in einem prozessierten Lebensmittel. Dies ist aber für eine Einschätzung des gesundheitlichen Nutzens des Endproduktes und mögliche Auswirkung der Konjugation auf das Lebensmittel von Bedeutung. Grundsätzlich muss darüber hinaus geprüft werden, ob sich ein erhitztes Lebensmittel, wie Brot, für eine Anreicherung mit *Brassica*-Gemüse für einen hohen ITC-Gehalt für einen potentiellen gesundheitlichen Nutzen beim Verzehr eignet.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Sekundäre Pflanzenstoffe

Alle Pflanzen haben gemein, dass sie unter anderem Kohlenhydrate, Lipide, Proteine und organische Säuren für die Entwicklung und Erhaltung der Pflanzenzellen benötigen. Diese Stoffe sind primär am Stoffwechsel beteiligt, und werden daher auch als primäre Pflanzenstoffe bezeichnet (Wink, 1999). Zusätzlich zu diesen Stoffen synthetisieren Pflanzen weitere organische Verbindungen während ihres Stoffwechsels, die keine direkte lebenswichtige Rolle in der Entwicklung der Pflanze einnehmen. Diese pflanzlichen Sekundärprodukte sind unabhängig vom primären Stoffwechsel von entscheidender Bedeutung und können eine Vielzahl von Aufgaben übernehmen. Unter anderem sind sekundäre Pflanzenstoffe (SPS) an den Abwehrmechanismen gegen Fressfeinde beteiligt, können die Pflanze vor einem mikrobiellen Befall schützen und helfen Stresssituationen, wie Dürre, zu überstehen (Akula et al., 2011; Crozier et al., 2008). Gleichzeitig dienen SPS auch zur Anlockung für Bestäuber oder Symbionten (Fraenkel, 1959).

Entsprechend der unterschiedlichen Bedürfnisse der Pflanzen gibt es eine Vielzahl von SPS, die in unterschiedlichen Pflanzenarten spezifische Profile bilden, wobei bestimmte Gruppen nur in einzelnen Pflanzenarten auftreten (De Luca et al., 2000; Pichersky et al., 2000). Beispielsweise lassen sich Cumarin hauptsächlich in Umbelliferae und Glucosinolate in Brassicaceae nachweisen, während Flavonoide in einer Vielzahl von Pflanzenfamilien vorkommen (Iwashina, 2000; Rask et al., 2000; Rosenthal et al., 1979).

Zusätzlich lassen sich erhöhte Gehalte an SPS während des Fortpflanzungsstudiums feststellen (Barton et al., 2010). In dieser Zeit sind die Pflanzen durch die Blüten besonders attraktiv für Insektenherbivoren, daher ist zu dieser Zeit auch ein gesteigerter Bedarf an pflanzlichen Abwehrsystemen, wie durch die SPS erreicht wird, vorhanden (Karban et al., 1997; Karban et al., 2007).

2.1.1 Gesundheitsfördernde Eigenschaften

Sekundäre Pflanzenstoffe sind nicht nur für die Pflanze wichtige Metabolite, sondern können auch einen positiven Einfluss auf die menschliche Gesundheit haben. So werden einigen SPS

antimikrobielle, antioxidative, cholesterolsenkende und entzündungshemmende Wirkungen zugeschrieben (Schreiner et al., 2012).

Bereits im Jahr 1985 konnte von Endo (1985) Mevastatin, ein Pilzfermentationsprodukt aus *Penicillium* spp., als ein Statin, ein Medikament mit einer cholesterinsenkenden Wirkung, identifiziert werden. Diese Wirkung ist dabei vor allem auf die starke Inhibitorwirkung der Verbindung auf die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase zurückzuführen, die den Stoffwechselweg zur Isoprenoid-Bildung inhibiert. Gleichzeitig weisen Statine einen antimikrobiellen Effekt auf, was in einem Experiment mit Simvastatin und Fluvastatin von Jerwood et al. (2008) nachgewiesen werden konnte.

Shikonin, hergestellt aus Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon*, wurde bereits in der traditionellen chinesischen Medizin zur Wundheilung und bei Entzündungen der Haut eingesetzt. Heutzutage wird des Weiteren eine antitumorale Wirkung und eine Wirkung gegen die HIV-Viren vermehrt untersucht. Auch in der Kosmetikindustrie wird Shikonin eingesetzt, in dem es als ein Naphthaquinon-Pigment zur Färbung unterschiedlicher Produkte eingesetzt wird (Andujar et al., 2013; X. Chen et al., 2003; H.-J. Lee et al., 2008).

Der Verzehr von Obst und Gemüse mit ihren SPS ist mit gesundheitsfördernden Eigenschaften verknüpft. Wird die Gruppe der *Brassica*-Gemüse betrachtet, so zeichnet diese neben dem Gehalt an Vitaminen und Mineralien auch der Gehalt an SPS mit positiven Eigenschaften für die menschliche Gesundheit aus (Hanson et al., 2009; Singh et al., 2007). Neben phenolischen Verbindungen, wie Flavonoide, die eine antioxidative Aktivität zeigen, sind vor allem die Glucosinolate (GLS) charakteristisch. Die Abbauprodukte der GLS, die bei der Zerstörung des Pflanzengewebes entstehen, können beim Verzehr eine Vielzahl an positiven Eigenschaften für den Menschen haben, zu denen antimikrobielle und entzündungshemmende Wirkungen zählen (Kapusta-Duch et al., 2012; Morales-López et al., 2017; Verkerk et al., 2009).

2.2 Glucosinolate

2.2.1 Vorkommen und Funktion

Glucosinolate (GLS), auch bekannt unter der Bezeichnung Senfölglykoside, sind hauptsächlich in Pflanzen der Ordnung der Kreuzblüterartigen (Brassicales) zu finden und nehmen einen wichtigen Anteil der SPS ein (Clarke, 2010). Die unterschiedlichen Pflanzenfamilien, zu denen

neben den Kreuzblütlern (*Brassicaceae*) auch die Kapuzinerkressegewächse (*Tropaeolaceae*) und Kaperngewächse (*Capparaceae*) zählen, lassen sich anhand ihrer Glucosinolatprofile differenzieren. In der Gattung *Brassica*, zu denen diverse Kohlsorten zählen, ist die Diversität der Glucosinolate besonders hoch (Cartea et al., 2008a; Fahey et al., 2001).

Werden einzelne Sorten der genannten Familien betrachtet, so zeigen sich auch in den einzelnen Wachstumsphasen und Pflanzenteilen Unterschiede in dem Gehalt der GLS. In den Blättern und Samen konnte bisher der höchste Gehalt an GLS analysiert werden, wobei ebenfalls ein Anstieg während der Saatgutentwicklung zu verzeichnen war (P. Brown et al., 2003; Lykkesfeldt et al., 1993). Zusätzlich können saisonale Unterschiede und tageszeitliche Schwankungen in dem GLS-Profil und dem Gehalt auftreten (Cartea et al., 2008b; Rosa, 1997). In den Pflanzen sind die GLS vermutlich hauptsächlich in einer Gruppe von schwefelreichen Zellen, den sogenannten S-Zellen, lokalisiert (Koroleva et al., 2000). Zusätzlich konnten auch in den Vakuolen GLS nachgewiesen werden (Grob et al., 1979).

Die Abwehrfunktion der Glucosinolate geht mit ihrem Abbau während der Zerstörung des Pflanzengewebes einher. Die Abbauprodukte der GLS weisen ein intensiv scharfes oder bitteres Aroma auf, das der Pflanze zur Abwehr gegen Fraßfeinde wie Insekten dient, aber auch einen Angriff von pathogenen Mikroorganismen, wie Bakterien, verhindern soll. Gleichzeitig können GLS als Lockstoffe für Insekten dienen, die die Pflanzen als Eiablageplatz nutzen (Baskar et al., 2012; Halkier et al., 2006; Lambrix et al., 2001).

2.2.2 Grundstruktur und Biosynthese

Bereits im Jahr 1956 wurde die Grundstruktur der GLS analysiert, die auch heute noch ihre Gültigkeit hat (Blažević et al., 2020; Ettliger et al., 1956). Obwohl sich GLS nur anhand ihrer variablen Seitenkette unterscheiden und ansonsten ein gemeinsames Grundgerüst besitzen, gibt es eine große Diversität an GLS, von denen bisher ca. 200 identifiziert werden konnten (Baskar et al., 2012; Clarke, 2010). Das Grundgerüst wird aus einer β -D-Thioglucose und einem sulfonierten Oximrest gebildet, an dem sich die variable Seitenkette (**R**) befindet (Abbildung 1).

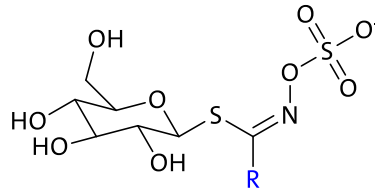


Abbildung 1: Strukturelle Darstellung des Glucosinolat-Grundgerüsts, aufgebaut aus einem sulfonierten Oximrest, einer β -D-Thioglucose und der variablen Seitenkette (R) nach Ettliger et al. (1956).

Die Seitenkette (R) wird durch die bei der Synthese im pflanzlichen Gewebe vorliegende Vorläuferaminosäure bestimmt und dient zur Einteilung in aliphatische, schwefelhaltige, aromatische und indolische GLS (Fenwick et al., 1983; Haller et al., 2013; Kjær, 1981). In die aliphatische Gruppe werden GLS, wie Sinigrin und Glucoputranjivin (Abbildung 2a, b) gezählt, die auf die Aminosäuren Methionin und Valin zurückzuführen sind (Benn et al., 1965; Matsuo, 1968). Zusätzlich zählen zu dieser Gruppe GLS auf Grundlage der Aminosäuren Alanin, Leucin oder Isoleucin, zu denen beispielsweise Glucocochlearin (Abbildung 2c) zählt (Benn et al., 1967). Aromatische GLS, wie Glucotropaeolin (Abbildung 2d), basieren hingegen auf Phenylalanin oder Tyrosin und indolischen GLS, beispielsweise Glucobrassicin (Abbildung 2e), liegt die Aminosäure Tryptophan zugrunde (Mikkelsen et al., 2002; Pfalz et al., 2009; Wittstock et al., 2002).

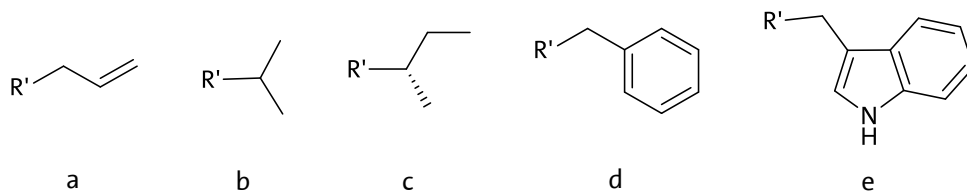


Abbildung 2: Klasseneinteilung und Strukturbeispiele der variablen Seitenkette R. Aliphatische GLS: Sinigrin (a), Glucoputranjivin (b) und Glucocochlearin (c), aromatisches GLS: Glucotropaeolin (d), indolisches GLS: Glucobrassicin (e) GLS, R': Glucosinolatgrundgerüst.

Die Biosynthese der GLS beginnt mit der Elongation, die mit einer Modifizierung der Aminosäure einhergeht, die durch eine Transaminierung in eine α -Ketosäure umgesetzt wird. Im nächsten Schritt erfolgt eine Kondensation, an der Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) beteiligt ist. Nach einer Isomerisierung, die zu der Verschiebung der Hydroxylgruppe führt, kommt es zu einer oxidativen Decarboxylierung, aus der schließlich eine verlängerte α -Ketosäure erhalten wird. Diese kann weiter verlängert werden oder eine erneute Transaminierung zu einer erweiterten Aminosäure durchlaufen (Fahey et al., 2001; Halkier et al., 2006). Diese verlängerte

Aminosäure dient als Grundlage für weitere Reaktionen zur Bildung des Grundgerüsts der GLS, in dem sie im nächsten Schritt über die Cytochrom-P450-Monooxygenase (CYP450) in ein Aldoxim und anschließend über CYP83 in ein reaktives Zwischenprodukt umgesetzt wird, dessen Struktur bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte (Mikkelsen et al., 2002). Auch der weitere Reaktionsprozess konnte bisher noch nicht vollständig charakterisiert werden. Es wird vermutet, dass eine Konjugation des Zwischenproduktes zu S-Alkylthiohydroxymaten mit einem Schwefeldonor, wie Cystein, erfolgen könnte und durch eine C-S-Lyase (SUR-1) eine Thiohydroximsäure freigesetzt wird, die in weiteren Schritten eine Glucosylierung und Sulfatierung durchläuft (Halkier et al., 1997; Mikkelsen et al., 2002; Mithen et al., 2000; Wittstock et al., 2002). Weitere mögliche Modifikationen der Seitenkette, wie Hydroxylierungen, Sulfatierungen und Oxidationen, in Verbindung mit der variablen Länge der elongierten Vorläufer-Aminosäure führen zu der hohen Diversität der GLS in der Pflanzenordnung Brassicales (Fahey et al., 2001; Halkier et al., 2006).

2.2.3 Abbauprozesse

Die intakten GLS sind im Gegensatz zu ihren Abbauprodukten reaktionsträge und relativ stabile Verbindungen, die in den S-Zellen oder Vakuolen der Pflanzenzellen lokalisiert sind (Kapitel 2.2.1) (Grob et al., 1979; Koroleva et al., 2000). Ein Abbau der GLS erfolgt erst über das pflanzeigene Enzym Myrosinase (MYR), wenn die Zellen zerstört werden, beispielsweise durch Fressfeinde (Grob et al., 1979). Darüber hinaus kann ein hitzeinduzierter Abbau erfolgen, wie bei der Verarbeitung des Gemüses (Sarvan et al., 2012).

Im intakten Pflanzenmaterial liegt die MYR, eine β -Thioglucosidase, räumlich isoliert von den GLS in den sogenannten MYR-Zellen vor (Bones et al., 1996). Erst durch eine Zerstörung des pflanzlichen Materials, wie es unabhängig von Fressfeinden auch bei der Ernte und anderen mechanischen Einwirkungen, wie dem Kauen auftritt, wird die Zellkompartimentierung aufgehoben und die MYR kommt in Kontakt mit den GLS. Daraufhin wird die Thioglycosidbindung der GLS enzymatisch gespalten und die Hydrolyseprodukte, wie Thiocyanate, Epithionitrile, Nitrile und ITC entstehen, wobei letztere hauptsächlich für die Abwehrfunktion der Pflanze verantwortlich sind (Kissen et al., 2009; Wittstock et al., 2016).

Bei dem enzymatischen Abbau wird die Glucose vom restlichen Molekül getrennt, indem die Thioglycosidbindung von der MYR gespalten wird. Durch die Hydrolyse entsteht ein instabiles Thiohydroximat-O-sulfonat, das durch den Einfluss unterschiedlicher Faktoren in diverse Produkte umgesetzt werden kann (Abbildung 4). Bei Anwesenheit von Spezifizierungsproteinen, wie den *epithiospecifizier protein* (ESP), *nitrile spezifier protein* (NSP) oder *thiocyanate forming protein* (TFP) wird beispielsweise die Bildung von Epithionitrilen, Nitrilen und Thiocyanaten begünstigt, wohingegen das *epithio spezifier modifier protein* (ESM) vermehrt zu der Bildung von ITC führt (Bones et al., 2006; Burow et al., 2009; Hanschen et al., 2014; MacLeod et al., 1985). Des Weiteren kann eine LOSSEN-ähnliche Umlagerung des Zwischenproduktes zu ITC erfolgen (Abbildung 3), die abhängig von dem umgebenden pH-Wert ist. Bei einem neutralen pH-Wert wird die Umlagerung bevorzugt, während ein saurer pH-Wert zu einem deutlich verminderten Abbau über diesen Weg führt, da die Reaktionsstelle durch ein Proton blockiert ist (Gil et al., 1980; Uda et al., 1986).

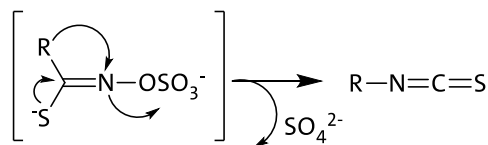


Abbildung 3: LOSSEN-ähnliche Umlagerung bei einem neutralen pH-Wert des Thiohydroximat-O-sulfonats zu ITC. Die entstehenden ITC aus der Umlagerung können unterschiedliche Stabilitäten aufweisen und cyclisieren bei Anwesenheit einer β -Hydroxylgruppe weiter zu Oxazolidin-2-thionen. Vor allem aromatische und aliphatische GLS werden bevorzugt in ITC umgesetzt, während die Anwesenheit von Eisen-Ionen zu der vermehrten Bildung von Nitrilen führt (Hanschen et al., 2014; Hasapis et al., 1982). Die Bildung der Hydrolyseprodukte ist demnach von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, die auch die Myrosinaseaktivität in den unterschiedlichen Pflanzen und die umgebende Temperatur einschließen. Insbesondere bei der Zubereitung von glucosinolathaltigem Gemüse spielt die Temperatur eine entscheidende Rolle, da die diversen Kohlsorten, wie Brokkoli oder Rotkohl, typischerweise gedünstet oder gekocht verzehrt werden. Bei diesem Hitzeprozess wird neben den Spezifizierungsproteinen auch die Myrosinase inaktiviert, dadurch erfolgt im weiteren Verlauf der Verarbeitung hauptsächlich ein hitzeinduzierter Abbau der GLS. Auch in Bezug der Hitzestabilität zeigen die GLS Unterschiede

aufgrund ihrer Struktur, beispielsweise haben indolische GLS eine geringere Stabilität als aliphatische GLS (Hanschen et al., 2012b; Oerlemans et al., 2006). Zusätzlich hat die Hitze einen Einfluss auf die Bildung der Abbauprodukte. Während bei einer kurzen Hitzeeinwirkung eine vermehrte Bildung von ITC beobachtet wurde, zeigte eine längere Kochzeit, dass der Abbau zu den hitzestabilen Nitrilen verschoben wird (Hanschen et al., 2018). Auch bei dem hitzeinduzierten Abbau der GLS spielen weitere Faktoren eine Rolle, die den Abbau verstärken oder vermindern können, wie beispielsweise die Größe und Art des Gemüses, sowie die generelle Zubereitungsform (Hanschen et al., 2018).

2.2.4 Bedeutung in der menschlichen Ernährung

Brassica-Gemüse haben einen für die Gruppe charakteristisches Aroma und einen unverkennbaren Geschmack, der als „kohlartig“ bezeichnet wird und insbesondere auf die GLS und ihre Hydrolyseprodukte zurückzuführen ist. Besondere Vertreter dieser Pflanzenfamilie, sind vor allem Brokkoli, Wirsing, Grünkohl und die weiteren bekannten Kohlsorten, die zu der Bezeichnung des Aromas beitragen. Auch für den scharfen Geschmack in Senf und Meerrettich sind die GLS, beziehungsweise ihre Abbauprodukte verantwortlich (Kjær, 1981). Die Verzehrsmenge wird nicht nur von den individuellen Essgewohnheiten bestimmt, beispielsweise verzehren Vegetarier*innen/Veganer*innen deutlich mehr glucosinolathaltiges Gemüse, sondern ist auch von dem Alter, der geographischen Lage und der Jahreszeit abhängig. In Deutschland lag im Jahr 2009 die durchschnittliche Verzehrsmenge bei 14,5 mg/Glucosinolat am Tag, darüber hinaus konnte herausgefunden werden, dass der Verzehr im Alter und in den Wintermonaten ansteigt (Mensink et al., 2002; Rabenberg et al., 2011; Steinbrecher et al., 2009).

2.3 Isothiocyanate

2.3.1 Physiologische Wirkungen

Insbesondere die ITC sind maßgeblich an der Geschmacks- und Geruchsgebung der *Brassica*-Gemüse beteiligt und hauptverantwortlich für die physiologischen Wirkungen, die die menschliche Gesundheit positiv beeinflussen können (Traka et al., 2009; Wieczorek et al., 2018). ITC weisen eine hohe Reaktivität auf und sind dementsprechend in der Lage mit unterschiedlichen Molekülen in Wechselwirkung zu treten und physiologische Prozesse zu beeinflussen.

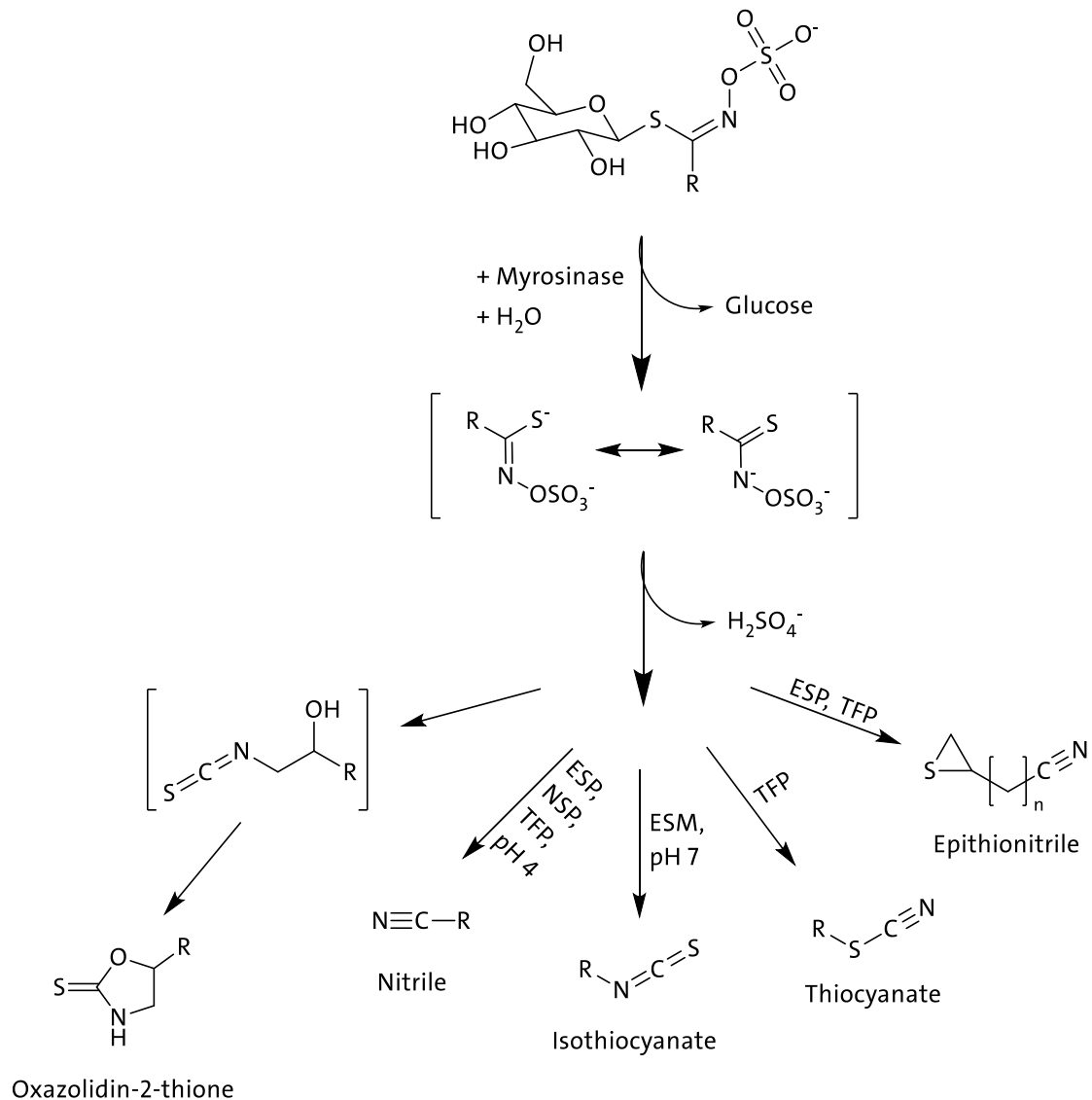


Abbildung 4: Darstellung des enzymatischen Abbaus der Glucosinolate in Abhängigkeit von diversen Einflussfaktoren zu Isothiocyanaten, Nitrilen, Epithionitrilen, Thiocyanaten und Oxazolidin-2-thionen. Abkürzungen: ESM: *epithiospecifier modifier protein*, ESP: *epithiospecifier protein*, NSP: *nitrile specifier protein*, TFP: *thiocyanate forming protein*, R: variable Seitenkette.

Beispielsweise wird den ITC eine antimikrobielle und antibiotische Wirkung zugeschrieben, die schon in diversen *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden konnte. Beim Verzehr von Kapuzinerkresse konnte bereits im Jahr 1954 eine antibiotische Wirkung im Urin festgestellt werden (Winter, 1954). Im Jahr 1995 wurde eine Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen durch Allyl-ITC (AITC) beobachtet, die in den darauffolgenden Jahren mit unterschiedlichen ITC an diversen Organismen weiter untersucht und bestätigt wurde (Brabban et al., 1995; Conrad et al., 2006; Hashem et al., 1999). Bisher konnte allerdings keine genaue Charakterisierung der Wirkweise der ITC vorgenommen werden. Es wird unter

anderem vermutet, dass die ITC aufgrund ihrer lipophilen und elektrophilen Eigenschaften einen Einfluss auf das Membranpotential der Bakterien haben, was zum Verlust der Membranintegrität und dadurch zu einer Zytolyse führt (Sofrata et al., 2011). Zusätzlich erfolgen Untersuchungen zu einer antiinflammatorischen Wirkung von ITC. So konnte innerhalb einer Studie mit Mäusen eine Hemmung der Entzündungsreaktion durch BITC festgestellt werden, die vermutlich auf die Herunterregulierung der NFκB-Signalisierung zurückzuführen ist (Y. M. Lee et al., 2009). Ein ähnliches Verhalten wurde für AITC und weitere ITC beobachtet (Cheung et al., 2009; Dey et al., 2006; Subedi et al., 2017). Ein weiterer interessanter Aspekt ist eine mögliche antidiabetogene Wirkung der ITC, die ebenfalls *in vitro* bestätigt werden konnte (Guzmán-Pérez et al., 2016).

Im medizinischen Kontext finden bereits Arzneimittel die Kapuzinerkresse und Meerrettichwurzeln beinhalten zur Behandlung von Atemwegs- und Harnwegsinfektionen Anwendung. Des Weiteren werden vermehrt Untersuchungen zu einer potenziell antikanzerogenen Wirkung durchgeführt, um einen möglichen Einsatz in der Krebsprävention zu untersuchen (Lipowicz, 2017; Zhang, 2004). Sowohl in Zellversuchen als auch mittels *in vivo* Studien konnte ein Einfluss der ITC auf die Krebsentstehung festgestellt werden. Während bei dem Verzehr von *Brassica*-Gemüse eine Abnahme von zum Beispiel Blasen-, Lungen- und Darmkrebs beobachtet werden konnte, zeigten *in vitro* Studien eine Hemmung des Wachstums oder sogar eine Apoptose von beispielsweise Leber- und Brustkrebszellen (Lamy et al., 2013a; Michaud et al., 1999; Pawlik et al., 2013; Verhoeven et al., 1996; Voorrips et al., 2000). Besonders scheinen sich in diesem Zusammenhang BITC, Phenethyl-ITC (PEITC) und Sulphoraphan zu eignen (Juge et al., 2007; WHO, 2004). Der genaue Mechanismus der antikanzerogenen Wirkung von ITC ist allerdings noch nicht vollständig charakterisiert. ITC zeigen eine Wirkung in diversen Stadien der Krebsentstehung, die komplexe mehrstufige Prozesse umfasst, daher wird ein Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Wirkweisen vermutet (Fimognari et al., 2012). Beispielsweise können ITC Einfluss auf die Biotransformation nehmen, indem Phase-I-Enzyme inhibiert und Phase-II-Enzyme aktiviert werden (Dinkova-Kostova et al., 2012; Fernando et al., 2007). Besonders den Phase-I-Enzymen, die zur Gruppe der Cytochrom-P450-Monooxygenasen gehören, wird eine große Beteiligung an der Krebsentstehung zugeschrieben. Diese Enzyme oxidieren gebundenen Kohlenstoff,

Schwefelatome und Stickstoff wodurch hydroxylierte Metabolite entstehen. Gebildete instabile Epoxide können anschließend mit der körpereigenen Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder anderen Verbindungen in Wechselwirkung treten (Hecht, 2000; Juge et al., 2007; Traka et al., 2009). Insbesondere durch eine Schädigung der DNA und den darauffolgenden regulatorischen Funktionsverlust ist es den geschädigten Zellen möglich sich unkontrolliert zu vermehren und Tumore zu bilden (Hanschen et al., 2014). Befinden sich neben den Xenobiotika auch ITC in den Zellen binden vermutlich bevorzugt letztere irreversibel an die Enzyme, wodurch die Bindung der inaktiven Kanzerogenen unterbunden und die Vermehrung geschädigter Zellen verhindert wird (Fimognari et al., 2012; Mahéo et al., 1997; Stan et al., 2008). Durch die Beeinflussung des *kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1)/*nuclear factor erythroid related factor 2* (Nrf2)/*antioxidant response element* (ARE) Signalweges können ITC darüber hinaus auf die Aktivität der Phase-II-Enzyme einwirken (Kobayashi et al., 2005; Taguchi et al., 2011). Die Aktivierung der Phase-II-Enzyme, wie die Glutathion-S-transferase, führt dazu, dass bereits durch die Phase-I-Enzyme gebildete aktive Kanzerogene über ihre reaktiven Gruppen an polare Moleküle gebunden werden. Dadurch entstehen hydrophile Verbindungen, die über den Urin ausgeschieden werden können (Fahey et al., 2002; Heaney et al., 1995; Traka et al., 2009). Zusätzlich konnte eine Hemmung des Enzyms Telomerase nachgewiesen werden, dass an der unkontrollierten Wucherung von Tumorzellen beteiligt ist, sowie eine Verringerung der Cyclin-abhängigen Kinasen, die für die Regulation des Zellyklus verantwortlich sind (Cho et al., 2016; Lamy et al., 2013b).

Entsprechend der *in vivo* und *in vitro* nachgewiesenen Wirkungen könnten ITC bei der Bekämpfung von Krebs eine entscheidende Rolle spielen, allerdings können die ITC aufgrund ihrer hohen Reaktivität auch negative Einflüsse mit sich bringen. Kommt es zu einer erhöhten Dosierung von ITC kann es statt zu einer präventiven zu einer genotoxischen Wirkung kommen. Diese konnten beispielsweise bei Untersuchungen mit AITC, BITC und PEITC nachgewiesen werden (Fimognari et al., 2012). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen einer allergischen Reaktion durch Neoprenanzügen und ITC hergestellt werden. Diese ist eventuell auf die Reaktion zwischen den Hautproteinen und der ITC zurückzuführen, die zu einer immunologischen Reaktion führte (Karlsson et al., 2016).

2.3.2 Metabolisierung

GLS und ITC bringen Eigenschaften mit sich, die sich auf die menschliche Gesundheit auswirken können. Für einen positiven Effekt ist neben der generellen Aufnahme von *Brassica*-Gemüse die Metabolisierung ein entscheidender Aspekt.

ITC werden nach der Aufnahme relativ schnell über die Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes passiv in den Organismus aufgenommen (Haller et al., 2013; Mithen et al., 2000). Die Metabolisierung erfolgt anschließend spontan oder enzymatisch über eine Konjugation zwischen den ITC und der Thiolgruppe des Tripeptid Glutathion (GSH). Diese Reaktion kann durch die GSH-S-Transferase begünstigt werden, die sich, wie das GSH, im Zytoplasma und in den Mitochondrien befindet (Lamy et al., 2011). Anschließend werden die gebildeten GSH-Dithiocarbamate über den Mercaptursäure-Stoffwechselweg in hydrophile Verbindungen umgesetzt und ausgeschieden (Kolm et al., 1995; Lamy et al., 2011; Shapiro et al., 1998). Dazu erfolgen nach der Konjugation mehrere enzymatisch induzierte Schritte bis die Mercaptursäure erhalten wird. Nach der Konjugation wird zunächst Glutaminsäure durch das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase abgespalten und das entstandene Cysteinglycinkonjugat über eine Abspaltung von Glycin, die ebenfalls enzymatisch über eine Cysteinglycinase erfolgt, in ein Cysteinkonjugat umgesetzt. Dieses wird schließlich durch eine Acetyltransferase acetyliert, wodurch die entsprechende Mercaptursäure erhalten wird, die abschließend hauptsächlich über den Urin, ausgeschieden werden kann (Brüsewitz et al., 1977; Shapiro et al., 1998; Zhang, 2004). Die Reaktion von ITC mit der Thiolgruppe des GSH ist reversibel, daher kann es zu einer Auflösung der Konjugation kommen, insbesondere, wenn ein basischer pH-Wert vorliegt. Durch die Spaltung der Reaktion kommt es nicht nur zu einer Verzögerung der Metabolisierung, sondern das freigesetzte ITC kann ebenfalls mit weiteren Thiolgruppen in Wechselwirkung treten (Platz et al., 2013; Zhang, 2012). Im Urin sind daher zusätzlich zu den Stoffwechselmetaboliten auch freie ITC nachweisbar (Márton et al., 2013). Nicht konjugiertes ITC kann darüber hinaus über die Atemluft ausgeschieden werden und war in geringer Menge auch in Fäzes-Proben in Tierversuchen vorhanden (Bollard et al., 1997; Capizzo et al., 1970; Ioannou et al., 1984; Lamy et al., 2011).

2.3.3 Bioverfügbarkeit

Eine positive Wirkung der ITC kann neben der Metabolisierung zusätzlich nur eintreten, wenn die Bioverfügbarkeit entsprechend hoch ist. Intakte GLS weisen beispielsweise generell eine geringere Metabolisierungsrate auf als das korrespondierende ITC (Shapiro et al., 2006). Zusätzlich ist die Aufnahme, mit der die Bioverfügbarkeit oft gleichgesetzt wird, von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Insbesondere die Lebensmittelverarbeitung kann einen wesentlichen Einfluss auf die Aufnahmemenge des Nährstoffes haben, der im Körper resorbiert und metabolisiert wird (O'Dell, 1984). Eine Abhängigkeit besteht des Weiteren zum jeweils enthaltenen GLS in der Pflanzenmatrix und der individuellen Verstoffwechslung. Bei dem Verzehr von rohem *Brassica*-Gemüse wurde bis zu 88% der aufgenommenen Glucosinolatmenge metabolisiert und in gekochtem Gemüse weniger als 20% (Barba et al., 2016; Conaway et al., 2000). Hierbei könnte beispielsweise ein Übergang der GLS aus der Pflanzenmatrix in das Kochwasser eine Rolle spielen (Cieślik et al., 2007). Auch bei der Verwendung von frischem zu gefrorenem Gemüse zeigt sich ein Unterschied in der Bioverfügbarkeit, so ergab sich bei dem Verzehr einer Brokkolisuppe aus frischem Brokkoli eine 10-mal höhere Aufnahme als bei dem Verzehr des gleichen Produktes hergestellt mit gefrorenem Material (Saha et al., 2012). In den genannten Untersuchungen erfolgte jeweils ein Hitzeprozess, der mit der Reduzierung der Bioverfügbarkeit einherging, wodurch ein Zusammenhang mit der Reduzierung der Myrosinase (MYR)-Aktivität in Betracht gezogen wird (Rungapamestry et al., 2006). Wird das Lebensmittel erhitzt kann die MYR entweder teilweise oder vollständig inaktiviert werden, was dazu führt, dass kein enzymatischer Abbau der GLS mehr erfolgt und der Abbau hitzeinduziert zu den Nitrilen verschoben wird (Hanschen et al., 2017a; Klopsch et al., 2019). Die Bioverfügbarkeit nicht abgebauter GLS ergibt sich dann nur noch über die individuelle Mikrobiota des Menschen. In Studien konnte gezeigt werden, dass auch Bakterien, wie *Bacteroides*, *Escherichia*, *Enterobacter*, sowie *Bifidobacterium* in der Lage sind GLS zu spalten und die Hydrolyseprodukte für den Menschen verfügbar zu machen (Cartea et al., 2008a; Krul et al., 2002; Traka et al., 2009).

Neben der Reduzierung der Bioverfügbarkeit durch Hitzeeinwirkung beim Herstellungsprozess wird diese ebenfalls durch die jeweilige Lebensmittelmatrix beeinflusst. So konnten bereits in proteinreichen Lebensmitteln, wie Quark angereichert mit Kresse, Konjugationen von ITC an

die freien Aminosäureseitenketten von Lysin und Cystein nachgewiesen werden (Kühn et al., 2018b). Die gebundenen ITC können nicht mehr über den Mercaptursäure-Stoffwechselweg metabolisiert werden, was zu einer Verringerung der Bioverfügbarkeit von ITC, aber auch von essentiellen Aminosäuren, wie Lysin, führt (Kumar et al., 2010).

2.3.4 Interaktionen mit Proteinen

Die ITC bringen starke elektrophile Eigenschaften mit sich, die nicht nur die Konjugation an das GSH bei der Metabolisierung ermöglichen (Kapitel 2.3.2), sondern auch weitere Reaktionen mit anderen nukleophilen Gruppen begünstigen. Die Reaktivität ist insbesondere auf das zentrale Kohlenstoffatom der funktionellen Gruppe ($-N=C=S$) zurückzuführen, das als Elektronenakzeptor dient. Als Elektronendonatoren können neben Thiolgruppen, wie im GSH, auch Amino- oder Hydroxylgruppen fungieren, die in den Aminosäureseitenketten von Proteinen und Peptiden zu finden sind (Kawakishi et al., 1987). Diese primären Pflanzenstoffe kommen sowohl im tierischen Körper als auch in Pflanzen und somit in Lebensmitteln vor und sind daher ein wichtiger Reaktionspartner von ITC. Insbesondere reagiert ITC mit den Thiol- und Aminogruppen der Aminosäuren Cystein, Arginin, Asparagin und Lysin, was zu der Bildung von Dithiocarbamaten und Thioharnstoffen führt (Zhang et al., 1994). Diese Reaktionsprodukte konnten bereits in Modellversuchen und in kombinierten Lebensmitteln nachgewiesen und charakterisiert werden (Cejpek et al., 2000; Hanschen et al., 2012a; Kühn et al., 2018b). Thiole und Amine weisen spezifische Reaktivitäten auf, die unter anderem von dem pK_a -Wert, aber auch von dem umgebenden pH-Wert abhängig sind. So zeigt sich, dass eine Reaktion zwischen ITC und Aminogruppen bevorzugt in einem neutralen bis basischen Bereich erfolgt, wohingegen Thiolgruppen vermehrt in sauren Milieu reagieren (Hanschen et al., 2012a; Podhradský et al., 1979). Zusätzlich zeigte sich, dass die Reaktion zwischen ITC und Thiolgruppen mindestens 1000-mal schneller abläuft als die Reaktion mit Aminogruppen (K. Brown et al., 2011). Die Reaktivität ist allerdings nicht nur von der Nukleophilie der Amino- und Thiolgruppen abhängig, sondern auch von dem ITC. Besitzt dieses elektroziehende Gruppen in der Seitenkette, kann die Reaktivität erhöht werden, während sterische Hinderungen bei großen Seitenketten zu einer Verringerung führen (K. Brown et al., 2011).

Die gebildeten Reaktionsprodukte zeigen ebenfalls eine pH-Abhängigkeit in ihrer Stabilität. Während die Thioharnstoffe, die ein irreversibles Konjugat mit ITC darstellen, bei allen pH-Werten eine gute Stabilität zeigen, sind die Dithiocarbamate labile Verbindungen, die insbesondere bei basischen und neutralen pH-Werten instabil sind (Kumar et al., 2010; Platz et al., 2013; Podhradský et al., 1979). Durch die reversible Reaktion zwischen ITC und Thiolen kann wieder freiwerdendes ITC mit einer Aminogruppe ein stabiles Reaktionsprodukt ausbilden. Zu den diversen Reaktionsprodukten wurden vor allem die Konjugate von BITC mit Cystein und Lysin (Abbildung 5) bereits vermehrt untersucht (Keppler et al., 2014; Kühn et al., 2018c; Spötzel et al., 2021b). Durch die irreversible Bindung von ITC an die Aminogruppe des Lysins ist diese Verbindung besonders für einen Nachweis von ITC-Proteinkonjugaten geeignet und wurde bereits auf unterschiedliche Matrices angewendet (Kühn et al., 2018a; Kühn et al., 2018b).

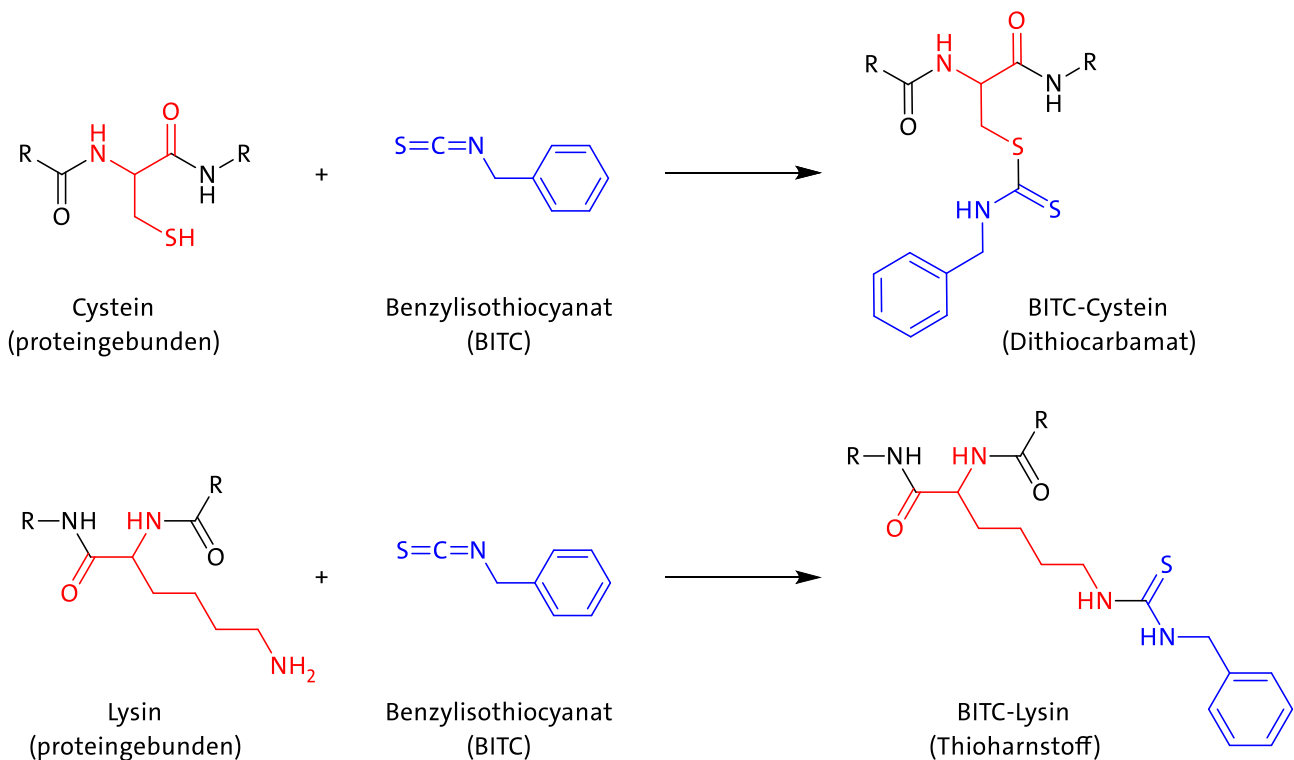


Abbildung 5: Bildung der Reaktionsprodukte BITC-Cystein (Dithiocarbamat) und BITC-Lysin (Thioharnstoff) durch die Reaktion zwischen BITC und der Thiol- bzw. Aminogruppe der Aminosäuren Cystein und Lysin in einem Protein.

Generell führt die Reaktivität von ITC gegenüber nukleophilen Gruppen der Proteine zu zufälligen Veränderungen, die die biochemischen Prozesse stören können. Beispielsweise ist Cystein durch die Ausbildung von Disulfidbrücken für die Stabilität der Proteinstruktur verantwortlich. Durch ITC-Cysteinkonjugate kann es zu Veränderungen in der Proteinstruktur

kommen, die Auswirkungen auf die Funktionalität haben können (Dufour et al., 2015). Durch die irreversible Bindung an die essentielle Aminosäure Lysin wird darüber hinaus die biologische Wertigkeit des Proteins herabgesetzt (Hernández-Triana et al., 1996). Ebenfalls konnte in unterschiedlichen Untersuchungen gezeigt werden, dass Proteine, die eine ITC-Modifizierung aufweisen, eine geringere Löslichkeit in wässrigen Medien haben, was auf das hydrophobe ITC im Vergleich zur hydrophilen Aminogruppe des Lysins zurückzuführen ist (Kroll et al., 1994; Rawel et al., 1998a). Weitere Auswirkungen ergeben sich auf die Schaumbildung und Emulgierungsfähigkeit des Proteins. Werden insbesondere bei der Lebensmittelverarbeitung diese ITC-Proteinkonjugate gebildet, hat dies demnach Auswirkungen auf die generellen Eigenschaften des Endproduktes, nicht nur in Hinblick auf die Stabilität, sondern auch auf die biologische Wertigkeit. Trotz der negativen Aspekte, die die ITC-Konjugate mit sich bringen können, können die ITC-Konjugate auch positive Einflüsse haben. Beispielsweise konnte eine mögliche Verringerung der allergenen Aktivität von α -Lactalbumin durch eine ITC-Modifizierung beobachtet werden (Spöttel et al., 2021a).

Im menschlichen Körper übernehmen Proteine eine Reihe von Funktionen, die durch eine Konjugatbildung verloren gehen könnten. Beispielsweise können ITC-modifizierte Proteine die Hydrolyse durch typische Verdauungsenzyme, wie Trypsin und Chymotrypsin verringern, da die entsprechenden Spaltstellen blockiert sind. Durch freies ITC können des Weiteren die Enzyme selbst modifiziert und in ihren Eigenschaften verändert werden, was ebenfalls zu einer verringerten Hydrolyse führt (Rawel et al., 1998b; Rawel et al., 1998c; Spöttel et al., 2021b). Viele weitere regulatorische Prozesse sind betroffen, wenn es zu einer Konjugation von Proteinen mit ITC kommt. Dazu zählt auch die antikanzerogene Wirkung durch die Wachstumshemmung von Tumoren, die vermutlich über eine Bindung von ITC an das Proteosom erfolgt, wodurch eine Dysfunktion hervorgerufen wird (Mi et al., 2011). Die entzündungshemmende Wirkung ist möglicherweise auch auf die ITC-Proteinkonjugation zurückzuführen, so konnte eine Inaktivierung des immunregulierenden *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), durch die ITC-Konjugation an einen Prolin-Rest nachgewiesen werden (Cross et al., 2009). Diese positiven Effekte sind abhängig von der aufgenommenen ITC-Konzentration, werden zu viele ITC-Proteinkonjugate gebildet, können vermehrt negative Effekte resultieren. Beispielsweise wurde in Ratten eine nekrotische Zytotoxizität, die durch eine hohe Rate an

Proteinmodifizierungen ausgelöst wurde nachgewiesen, die die chemische Karzinogenese in der Harnblase gefördert hat (Akagi et al., 2003).

2.4 Analytik von Proteinkonjugaten

Aufgrund der diversen Auswirkungen und Einflussfaktoren, die immer noch nicht vollständig charakterisiert sind, ist die Identifizierung von Proteinkonjugaten auch heute noch von wissenschaftlicher Bedeutung.

Dazu können beispielsweise indirekte Methoden eingesetzt werden, wie eine photometrische Messung der Abnahme der freien Aminogruppen bei steigendem Modifizierungsgrad mit ITC. Als Reagenz kann das o-Phthaldialdehyde (OPA) dienen, dass in Verbindung mit einer Thiolverbindung, wie *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) ein 1-Alkylthio-2-alkyl substituiertes Isoindol bildet. Dieses kann Licht der Wellenlänge von 340 nm absorbieren und zur Quantifizierung eingesetzt werden (Spöttel et al., 2021b). Eine weitere photometrische Messung der freien Aminogruppen kann über die Proteinfraction erfolgen, die mit Trinitrobenzolsulfonsäure in ein Trinitrobenzolderivat umgesetzt wird und bei 416 nm photometrisch analysiert werden kann.

Direkte Bestimmungen können anhand der Analyse von Proteinkonjugaten mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ausgestattet mit einem ultraviolett (UV)-Detektor erfolgen. Die Identifizierung der ITC und nukleophiler Verbindungen erfolgte über die Retentionszeiten und ihre charakteristischen UV-Spektren (Hanschen et al., 2012a).

Immer mehr Bedeutung erhalten vor allem massenspektrometrische (MS) Methoden, womit ITC-Proteinkonjugate in diversen Matrices nachgewiesen werden können. Die Bestimmung erfolgt über eine HPLC (LC)-MS-Kopplung. Als erstes fand diese Anwendung bei der Untersuchung von ITC-Konjugaten in Hämoglobin und Albumin, nachdem die Proteine aus der Matrix entfernt und proteolytisch zu den einzelnen Aminosäuren hydrolysiert wurden. Diese Methode ermöglichte demnach zum ersten Mal die direkte Analyse von Aminosäurekonjugaten (Kumar et al., 2010).

In jüngeren Untersuchungen werden vermehrt LC-MS-Untersuchungen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie durchgeführt, bei denen das *multiple reaction monitoring* (MRM) verwendet wird. Bei dem MRM handelt es sich um eine selektive Methode zur Identifizierung des gewünschten Analyten anhand von charakteristischen

Massenübergängen. Durch die Selektion der Massen ist ein Nachweis ausgewählter ITC-Konjugate, wie Benzyl-ITC oder Allyl-ITC modifiziertes Lysin und Cystein auch in komplexen Matrices möglich.

Die Massenselektion erfolgt nach der Ionisierung mittels einer Elektronenspray-Ionisation (ESI) durch drei aufeinanderfolgende Quadrupole. Im ersten Quadrupol werden die Analytionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs (m/z)-Verhältnis zunächst von den weiteren nicht relevanten Analyten isoliert und im zweiten Quadrupol durch die Kollision mit eingeleitetem Stickstoff fragmentiert. Im dritten Quadrupol erfolgt erneut eine Selektion zuvor festgelegter m/z -Verhältnisse, die aus den Fragmenten der Analytionen resultieren. Abschließend werden die verbleibenden Ionen in ein elektrisches Signal umgewandelt und dieses über einen Sekundärelektronenvervielfacher verstärkt und detektiert.

Diese Methode diente bereits der Analyse von ITC-Konjugaten in Serum und Urin in einer Studie, in der glucosinolathaltiges Gemüse verzehrt wurde. Auch zum Nachweis einer Konjugatbildung von ITC mit Lysin und Cystein in zusammengesetzten Lebensmitteln, wie Quark angereichert mit Kresse wurde diese Methode bereits angewendet (Kühn et al., 2018b). Neben der *targeted*-Analyse über die MRM-Methode konnten in weiteren Untersuchungen ebenfalls eine *untargeted*-LC-MS-Methode auf Proteine und Peptide angewendet werden, sodass Untersuchungen zu dem Reaktionsort der ITC im Protein erfolgen konnten (Spöttel et al., 2021b).

3 Zielsetzung

Neben den positiven Eigenschaften besitzen ITC auch eine hohe Reaktivität, wodurch sie mit Lebensmittelinhaltsstoffen in Wechselwirkung treten und Reaktionsprodukte, wie ITC-Proteinkonjugate bilden. Diese Konjugate können Auswirkungen auf die Eigenschaften der Proteine haben und den Gehalt an vermeintlich gesundheitsfördernden „freien“ ITC verringern. Aufgrund des möglichen Einflusses auf bestimmte degenerative Erkrankungen ist es allerdings von Interesse ein optimiertes, ITC-reiches Lebensmittel herzustellen und daher muss die Bildung von ITC-Konjugaten und ihre möglichen Abhängigkeiten von unterschiedlichen Faktoren, wie eine Hitzeeinwirkung und der pH-Wert, untersucht werden.

Der Hitzeprozess beim Backen kann einen großen Einfluss auf den Abbau der GLS und auf eine mögliche Konjugatbildung haben. Um diese Auswirkungen einer Prozessierung zu untersuchen, sollte die Bildung von ITC und ITC-Proteinkonjugaten in einem thermisch prozessierten Lebensmittel, wie Brot, untersucht werden.

Hierbei steht zunächst die generelle Entstehung von Reaktionsprodukten zwischen BITC mit den Aminosäuren Lysin und Cystein, die eine Amino- beziehungsweise eine Thiolgruppe besitzen, im Fokus. Zusätzlich sollten unterschiedliche Einflussfaktoren auf die ITC und ITC-Konjugatbildung untersucht werden, wie die Form des Gemüsezusatzes, da der Abbau von Glucosinolaten in intaktem Pflanzenmaterial im Vergleich zu homogenem und gefriergetrocknetem Material gemindert sein könnte. Dies sollte durch die Verwendung von homogenen gefriergetrocknetem und frischen Material an Kapuzinerkresse und Gartenkresse untersucht werden. Zusätzlich sollten als weitere Variationen unterschiedliche Pflanzenteile der Kapuzinerkresse zum Einsatz kommen.

Vermeehrt werden darüber hinaus Vollkorn- und proteinreiche Brote verzehrt, die die Verwendung von unterschiedlichen Backtriebmitteln fordern und zu Teigen mit unterschiedlichen pH-Werten und Broten unterschiedlichster Struktur führen. Bei einer Anreicherung mit *Brassica*-Gemüse wird angenommen, dass die unterschiedlichen Einflussfaktoren der verwendeten Basiszutaten, insbesondere der pH-Wert des Teiges, Auswirkungen auf die ITC-Bildung und die Reaktivität, sowohl der ITC als auch der nukleophilen Gruppen der Aminosäureseitenkette, haben kann. Daher sollten neben Weizenbrot auch

diverse andere Brote hergestellt und auf Abbauprodukte, sowie ITC-Konjugate untersucht werden. Für eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Brotsorten sollte in diesem Fall das gleiche Pflanzenmaterial im selben prozentualen Verhältnis zum Brot eingesetzt werden. Es wurde angenommen, dass insbesondere der pH-Wert ein Einfluss auf den GLS-Abbau haben kann. In einem Modellversuch, in dem sich nur der pH-Wert der Teige unterschied, sollte dazu ein direkter Zusammenhang zwischen dem pH-Wert, der ITC-Bildung und resultierende Reaktionsprodukte hergestellt werden.

Für direkte Untersuchungen des Hitzeeinflusses auf den GLS-Abbau sollte vor dem Backen Probenmaterial vom Teig entnommen und auf die Abbauprodukte BITC und BC untersucht werden. Diese Ergebnisse sollten dann mit den Ergebnissen nach dem Backen verglichen werden. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob ein Zusatz einer Kresse-Suspension zu einem höheren ITC-Gehalt im Brot führen könnte, da bereits in der inkubierten Suspension ein Myrosinase-induzierter Abbau der GLS zu ITC erfolgen könnte, was bei dem trockenen Material nicht der Fall ist.

Auch besteht die Möglichkeit, dass GLS und ihre Abbauprodukte aus dem zugesetzten Pflanzenmaterial in die Lebensmittelmatrix migrieren können und somit ungerichtete Reaktionen zwischen ITC und Proteinen im gesamten Lebensmittel erfolgen, ohne, dass eine Lokalisierung möglich ist. Um ein solches Verhalten zu prüfen, sollten Modellbrote mit mittig platziertem Pflanzenmaterial hergestellt werden und eine fraktionierte Untersuchung der Krume auf GLS-Abbauprodukte und ITC-Konjugate erfolgen.

Gleichzeitig sollte auch die Stabilität der ITC-Konjugate in den hergestellten gefriergetrockneten Brotproben und den hergestellten Probenlösungen für die LC-ESI-MS/MS-Analyse untersucht werden. Dies sollte der Prüfung dienen, ob die Proben vor einer Aufarbeitung und Messung zunächst gelagert werden können. Entsprechend der typischen Lagerung von Brot über mehrere Tage war es des Weiteren von Interesse die Stabilität der Abbauprodukte und der ITC-Konjugate in den hergestellten Broten über einen bestimmten Zeitraum von fünf Tagen zu analysieren.

4 Ergebnisse

4.1 Glucosinolatbauprodukte und Proteinkonjugate in Broten angereichert mit Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) und Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.)

4.1.1 Erscheinungsbild der Brote nach dem Backen

Aufgrund der unterschiedlichen Zusätze konnten die Brote mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., 4%, Rezeptur 1) und frischer Gartenkresse (*Lepidium sativum* L., 1,5%, Rezeptur 2) deutlich visuell voneinander unterschieden werden. Während das Brot mit Kapuzinerkresssepulver (Abbildung 6a) eine einheitliche grüne Färbung durch die homogene Verteilung des Pflanzenmaterials in der gesamten Krume aufwies, zeigte die Krume bei der Verwendung von Gartenkresse (Abbildung 6b) eine heterogene Verteilung des Pflanzenmaterials, die sich durch einzelne grüne Partikel erfassen ließ. Beide angereicherten Brote unterschieden sich von dem Referenzbrot (Abbildung 6c), das eine für Weizenbrot gleichmäßige typische braun-beige Färbung aufzeigte.

Die olfaktorischen Untersuchungen zeigten, dass die angereicherten Brote einen leicht kohlrartigen Geruch aufwiesen, der bei dem Brot mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse stärker ausgeprägt war als bei dem Brot mit der frischen Gartenkresse. Entsprechend der Erwartung wies das Referenzbrot einen klassischen Geruch von Weizenbrot auf.

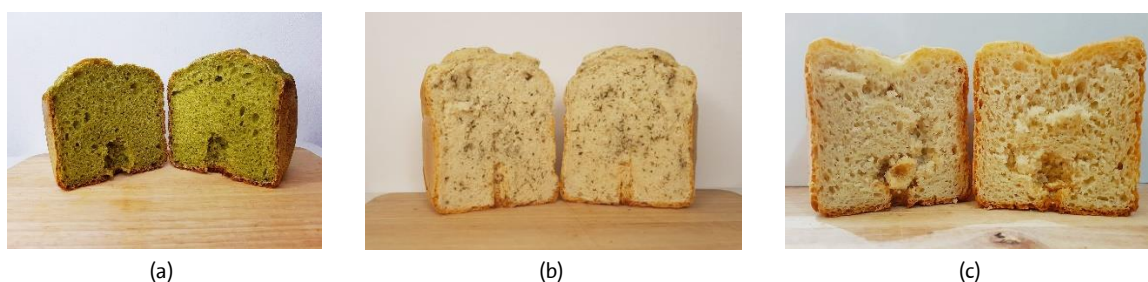


Abbildung 6: Bilder der hergestellten Brote mit unterschiedlichem Kressezusatz. (a) Brot mit 4% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., Rezeptur 1), (b) Brot mit frischer Gartenkresse (*Lepidium sativum* L., Rezeptur 2), (c) Referenzbrot ohne Pflanzenmaterial. Abbildung nach Krell et al. (2021).

4.1.2 Analyse des Glucosinolatgehaltes des Pflanzenmaterials vor und nach dem Backprozess

Um einen Hinweis auf den thermisch bedingten Abbau von Glucosinolaten während des Backprozesses zu erhalten, wurden die Glucosinolatprofile von der verwendeten gefriergetrockneten Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) und der frischen Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) vor und nach dem Backprozess analysiert. Der Fokus lag dabei auf dem

Glucosinolat Glucotropaeolin (Benzylglucosinolat, BG), das typischerweise zu Benzylisothiocanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) abgebaut wird. Das BITC kann im weiteren Verlauf des Verarbeitungsprozesses mit Proteinen zu ITC-Proteinkonjugaten oder mit anderen nukleophilen Verbindungen, die in einer komplexen Lebensmittelmatrix enthalten sein können, zu weiteren Reaktionsprodukten reagieren. Zusätzlich sollte überprüft werden, inwieweit der Zustand des Pflanzenmaterials bei dem Abbau der Glucosinolate eine Rolle spielt, hierfür wurde homogenisiertes, gefriergetrocknetes Kapuzinerkressepulver und intaktes frisches Pflanzenmaterial der Gartenkresse eingesetzt.

Das Glucosinolatprofil der nicht verarbeiteten Kapuzinerkresse bestand ausschließlich aus Glucotropaeolin (Benzylglucosinolat, BG) mit einem Gehalt von 11,5 $\mu\text{mol/g}$ Trockenmasse (TM). In der Gartenkresse wurde hingegen ein breiteres Spektrum an unterschiedlichen Glucosinolaten analysiert, das sich aus 48,8 $\mu\text{mol/g}$ TM BG, 0,36 $\mu\text{mol/g}$ TM Glucobrassicin (Indol-3-ylmethylglucosinolat, IMG), 0,45 $\mu\text{mol/g}$ TM Gluconasturtiin (2-Phenylethylglucosinolat, 2-PE), und 0,08 $\mu\text{mol/g}$ TM Neoglucobrassicin (1-Methoxy-indol-3-ylmethylglucosinolat, 1-MeO-IMG) zusammensetzte.

Im Vergleich der verwendeten Materialien zeigte sich, dass signifikant ($p \leq 0,05$) mehr BG in der Trockenmasse der Gartenkresse analysiert werden konnte. Das Material wurde allerdings frisch verwendet, dadurch ergab sich für das frische Pflanzenmaterial der Gartenkresse ein Anteil von 12,14 $\mu\text{mol/g}$ BG, was vergleichbar mit dem trockenen verwendeten Kapuzinerkressepulver ist. Zur Analyse des Verlustes der GLS während des Backprozesses wurde für das gefriergetrocknete Material das Pflanzenmaterial aus der mittigen Applikation (Kapitel 6.2.2, Rezeptur 3) nach dem Backprozess entnommen und analysiert. Um den Verlust der GLS in der eingesetzten Gartenkresse zu untersuchen, wurde Gartenkressematerial aus Rezeptur 2 nach dem Backen verwendet. In dem gebackenen gefriergetrockneten Kapuzinerkressematerial aus Rezeptur 3 konnte kein BG mehr nachgewiesen werden (Abbildung 7), woraus geschlossen werden kann, dass BG während der Prozessierung im gefriergetrockneten Material vollständig abgebaut wurde. In der Gartenkresse konnte ebenfalls ein signifikanter Verlust ($p \leq 0,05$) an BG nachgewiesen werden (Abbildung 7), dieser lag allerdings nur bei 44%, wodurch mehr als 50% BG intakt im Material verblieben. Im gefriergetrockneten Material wurde demnach mehr BG während des Backprozesses abgebaut als in dem Gartenkressematerial.



Abbildung 7: Gehalt an Benzylglucosinolat in den verwendeten Kressegeräten Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., gefriergetrocknet) und Gartenkresse (*Lepidium sativum* L., frisch) vor der Zugabe zum Teig (unverarbeitet) und nach dem Backprozess (gebacken). Die Asterisken zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den verwendeten sowie dem unverarbeiteten und gebackenen Pflanzenmaterial. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.

Auch die anderen GLS in der Gartenkresse zeigten einen Verlust während des Backprozesses, wobei die Abbauraten abhängig von dem jeweiligen GLS waren. Während für IMG ein Verlust während des Backens von 17% nachgewiesen werden konnte, verringerte sich der Gehalt an 2-PE signifikant ($p \leq 0,05$) um circa 60% und 1-MeO-IMG konnte in dem gebackenen Material nicht mehr nachgewiesen werden. Alle entsprechenden analysierten Daten sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Glucosinolatprofil und -gehalt in der verwendeten Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) und Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) vor (unverarbeitet) und nach (gebacken) dem Backvorgang. Die Ergebnisse sind in $\mu\text{mol/g}$ Trockenmasse (TM) \pm Standardabweichung angegeben. Zusätzlich wurde der Wert der Gartenkresse auf das Frischgewicht (FG) umgerechnet, da diese frisch verwendet wurde. Abkürzungen: n.n.: nicht nachweisbar; BG: Benzylglucosinolat, IMG: Indol-3-ylmethylglucosinolat, 2-PE: 2-Phenylethylglucosinolat, 1-MeO-IMG: 1-Methoxy-Indol-3-ylmethylglucosinolat. Werte veröffentlicht in Krell et al. (2021).

		Kapuzinerkresse		Gartenkresse	
		unverarbeitet	gebacken ¹	unverarbeitet	gebacken ¹
BG	TM	11,51 ± 0,42	n.n.	48,80 ± 3,78	27,28 ± 2,92
	FG	-	-	12,14 ± 0,94	6,79 ± 0,73
IMG	TM	-	-	0,36 ± 0,15	0,30 ± 0,13
2-PE	TM	-	-	0,44 ± 0,07	0,19 ± 0,01
1-MeO-IMG	TM	-	-	0,08 ± 0,01	n.n.

¹Ergebnisse von drei Replikaten im technischen Duplikat

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Abbau der GLS während des Backprozesses erfolgte, allerdings können keine Rückschlüsse gezogen werden, ob der Abbau enzymatisch oder hitzeinduziert ablief. Aufgrund dessen wurde in einem zusätzlichen Experiment die Myrosinase in dem gefriergetrockneten Kapuzinerkressepulver durch Erhitzen inaktiviert und das Material anschließend zum Backen eingesetzt. Abbildung 8 zeigt, dass bereits nach einem 10-minütigen Erhitzungsprozess bei 100 °C BG um 75% von 11,51 $\mu\text{mol/g}$ TM auf 2,79 $\mu\text{mol/g}$ TM abgebaut wurde. Während des anschließenden Backprozesses, bei dem ebenfalls Temperaturen bis 100 °C erreicht wurden, erfolgte ein weiterer Abbau, sodass schließlich im Pflanzenmaterial kein BG mehr nachgewiesen werden konnte. Die Erkenntnisse lassen annehmen, dass ein stark hitzeinduzierter Abbau des BG sowohl während des Siedeprozesses als auch während des Backprozesses in dem Kapuzinerkressepulver stattfand, da die Myrosinase inaktiviert wurde und somit kein enzymatischer Abbau mehr erfolgen konnte.

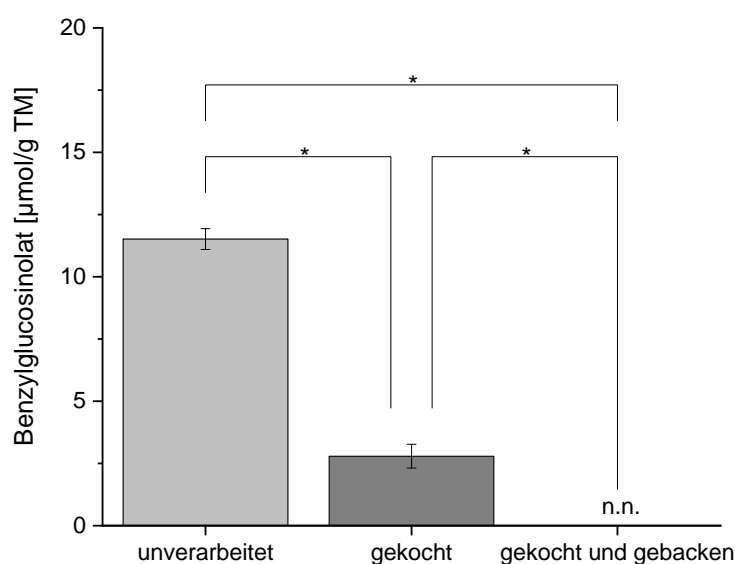


Abbildung 8: Thermischer Abbau von Benzylglucosinolat in Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) nach einem 10-minütigen Kochprozess zur Inaktivierung der Myrosinase und anschließendem Backprozess. Das Experiment wurde im Duplikat durchgeführt. Abkürzungen: n.n.: nicht nachweisbar. Die Asterisken zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den Verarbeitungsstufen. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.

4.1.3 Gehalt an Benzylisothiocyanat und Benzylcyanid in Brot angereichert mit unterschiedlichen Kressesorten

Die bisher durchgeführten Experimente zeigten, dass ein Abbau von BG während des Backprozesses erfolgte und somit Folgeprodukte, wie Benzylisothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) vor oder während des Backprozesses gebildet werden können. Der Hitzeprozess während des Backens kann einen Einfluss auf die Bildung der unterschiedlichen Abbauprodukte haben, daher sollte neben dem Gehalt an reaktiven BITC auch der Gehalt an dem hitzestabileren BC bestimmt werden. Hierfür wurden die Brote mit homogenisiertem Kapuzinerkressepulver (Rezeptur 1) und mit intakter Gartenkresse (Rezeptur 2) untersucht. Der Zustand des Pflanzenmaterials könnte auch bei der Bildung der Abbauprodukte zu einem Unterschied führen, was durch den Einsatz des homogenen Kapuzinerkressematerials und der frischen, intakten Gartenkresse untersucht werden kann.

Abbildung 9 zeigt den BITC- und BC-Gehalt der Rezeptur 1 und Rezeptur 2. Bei Betrachtung der Abbauprodukte in Rezeptur 1 konnte nur ein geringer Unterschied zwischen dem freigesetzten BITC (5,93 nmol/g Brot) und BC (4,30 nmol/g Brot) festgestellt werden, wohingegen der Unterschied der entstandenen Abbauprodukte in Rezeptur 2 signifikant ($p \leq 0,05$) war. In Rezeptur 2 wurde 40-mal mehr BC (42,74 nmol/g Brot) als BITC (1,51 nmol/g Brot) gebildet.

Vor dem Backen enthielt die Rezeptur 1 etwa 500 nmol BG/g Brot, wohingegen in Rezeptur 2 etwa 200 nmol BG/g Brot vorhanden waren. Es wurde daher davon ausgegangen, dass nach dem Backen mehr Abbauprodukte in Rezeptur 1 nachzuweisen sind, dies konnte anhand der Ergebnisse nicht bestätigt werden. Während der BITC-Gehalt in Rezeptur 1 und Rezeptur 2 vergleichbar ist unterschieden sich die Gehalte an BC signifikant ($p \leq 0,05$). In Rezeptur 2 war nahezu 10-mal mehr BC nachweisbar als in Rezeptur 1. Somit scheint die Applikationsform des Pflanzenmaterials als intaktes oder gefriergetrocknetes, pulverförmiges Material einen Einfluss auf den resultierenden Gehalt an Abbauprodukten im Endprodukt zu haben.

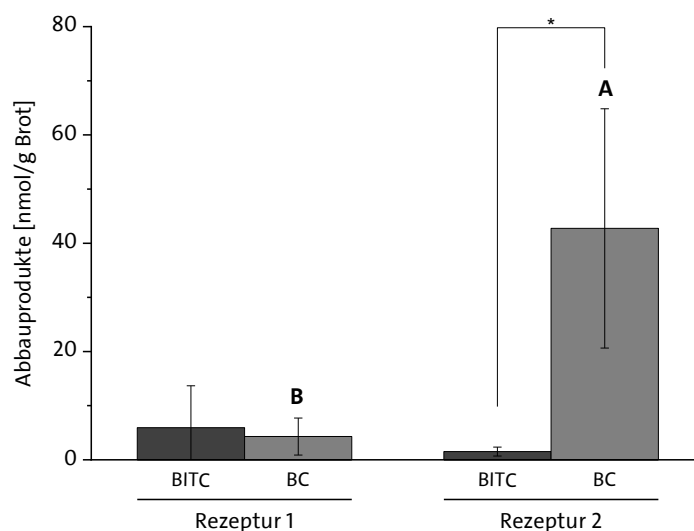


Abbildung 9: Benzylglucosinolat-Abbauprodukte Benzyliothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) in Brot mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (4%, *Tropaeolum majus* L., Rezeptur 1) und frischer Gartenkresse (1,5%, *Lepidium sativum* L., Rezeptur 2). Die Brote wurden in Triplikaten hergestellt. Der Asterik zeigt einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) im Gehalt an den analysierten Abbauprodukten. Großbuchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) an einem Abbauprodukt in den untersuchten Rezepturen. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.

4.1.4 Bildung von Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Brot mit unterschiedlichen Kressesorten

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 zeigen, dass ein Abbau von BG während des Backprozesses erfolgte und reaktives BITC freigesetzt wurde, das mit nukleophilen Verbindungen, wie beispielsweise Aminosäureseitenketten der Proteine, reagieren kann. Die entstandenen Reaktionsprodukte von ITC mit Amino- und Thiolgruppen wurden anhand modifizierter Aminosäuren wie BITC-Lysin (BITC-Lys) und BITC-Cystein (BITC-Cys) nachgewiesen. Abbildung 10 zeigt den Gehalt an BITC-Lys in den beiden Applikationsformen. In Rezeptur 1 mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) konnten 3,39 nmol BITC-Lys/g Brot und in Rezeptur 2 mit frischer Gartenkresse 3,26 nmol BITC-Lys/g Brot analysiert werden. Demnach ergaben sich anhand des BITC-Lys Gehaltes keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den beiden hergestellten Broten mit unterschiedlicher Kresseapplikation und -art. Es ergaben sich in Rezeptur 1 nur 4% mehr BITC-Konjugate als in Rezeptur 2. Aufgrund des 2,5-fachen höheren Gehaltes an BG in Rezeptur 1 wurde angenommen, dass nicht nur mehr Abbauprodukte, sondern auch eventuell mehr BITC-Proteinkonjugate gebildet werden könnten, dies konnte jedoch anhand der

Ergebnisse nicht bestätigt werden. Während über die LC-ESI-MS/MS-Methode in allen Proben BITC-Lys nachgewiesen werden konnte, konnte kein positiver Nachweis von BITC-Cys erfolgen.

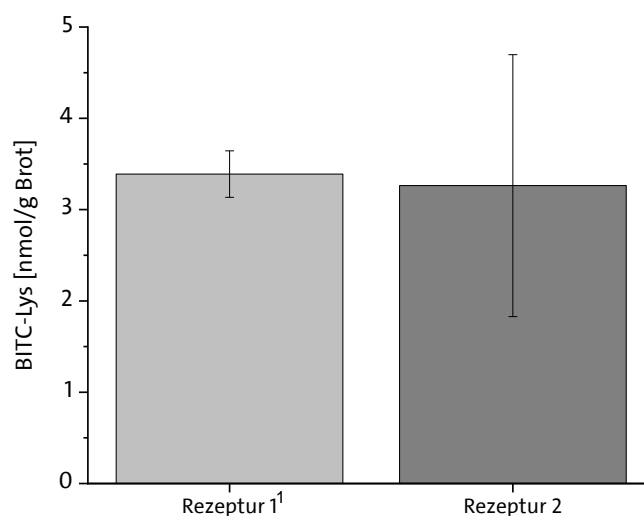


Abbildung 10: Gebildete Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugate (BITC-Lys) in Brot mit unterschiedlicher Kresseapplikation. Abkürzungen: Rezeptur 1: Brot mit 4% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.); Rezeptur 2: Brot mit 1,5% frischer Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.). Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. ¹Für Rezeptur 1 wurden zwei Replikate für die Auswertung verwendet. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.

4.2 Vergleich der Bildung von Proteinkonjugaten in Brot mit 1% und 5% frischen Kapuzinerkresseblättern (*Tropaeolum majus* L.)

4.2.1 Erscheinungsbild der Brote

Neben der Verwendung von gefriergetrocknetem Material der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) wurde ebenfalls frisches intaktes Blattmaterial als Zusatz verwendet. Zusätzlich wurden die frischen Blätter in prozentual unterschiedlichen Gehalten zugegeben, um zu untersuchen, ob eine Konzentrationsabhängigkeit besteht. Abbildung 11a zeigt beispielhaft ein angereichertes Brot mit Kapuzinerkresseblättern, die in den Teig eingearbeitet wurden. Der Zusatz des Pflanzenmaterials (5%) ist deutlich durch die grünen Partikel in der Krume zu erkennen, wohingegen das Referenzbrot (Abbildung 11b) eine gleichmäßige beige-braune Färbung aufweist. Der Geruch des angereicherten Brotes war leicht kohlartig und von dem Referenzbrot daher leicht abweichend, dass nach typischem Weizenbrot roch.



Abbildung 11: Beispielbild eines Brotes (a), das mit 5% intakten frischen Kapuzinerkresseblättern (*Tropaeolum majus* L., KLBÄ 5%) angereichert wurde und (b) das entsprechende Referenzbrot ohne Pflanzenmaterial.

4.2.2 Vergleich der Bildung von Proteinkonjugaten bei unterschiedlichem prozentualen Zusatz an Kapuzinerkresseblättern (*Tropaeolum majus* L.)

Zum einen ist es von Interesse nachzuweisen, dass es generell in Broten, die mit *Brassica*-Gemüse angereichert sind, zur Bildung von BITC-Proteinkonjugaten kommt. Zum anderen sollte analysiert werden, inwieweit die zugesetzte Menge des Pflanzenmaterials und somit der Gehalt des Glucosinolates BG einen Einfluss auf die Bildung von BITC-Proteinkonjugaten hat. Um dies zu untersuchen, wurde das gleiche Pflanzenmaterial, in diesem Fall frische Blätter der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.), in zwei verschiedenen prozentualen Anteilen (1% und 5%) in den Teig eingearbeitet und gebacken. Entsprechend des Gehaltes an BG im Ausgangsmaterial entsprach die Menge im Kapuzinerkresseblätterbrot mit 1% Zusatz (KBLÄ 1%) durchschnittlich 61 nmol BG/g Brot und mit dem Zusatz von 5% (KBLÄ 5%) 351 nmol BG/g Brot. Demnach ist der Gehalt an BG im KBLÄ 5% circa sechsmal höher als im KBLÄ 1%.

Abbildung 12 zeigt, die Ergebnisse der LC-ESI-MS/MS-Analyse von BITC-Lys in den Broten mit 1% und 5% frischen Kapuzinerkresseblättern. In beiden Broten konnten BITC-Lys-Konjugate quantifiziert werden. In KBLÄ 1% wurden 0,47 nmol BITC-Lys/g Brot und in KBLÄ 5% 8,7 nmol BITC-Lys/g Brot nachgewiesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass infolge der höheren Zugabe von Kresse mehr Reaktionsprodukte zwischen BITC und der Aminogruppe von Lysin gebildet werden. Eine Abhängigkeit der ITC-Proteinkonjugatbildung von dem Ausgangsgehalt des Glucosinoltes BG in dem Pflanzenmaterial konnte demnach bestätigt werden, es handelt sich dabei allerdings nicht um eine proportionale Zunahme.

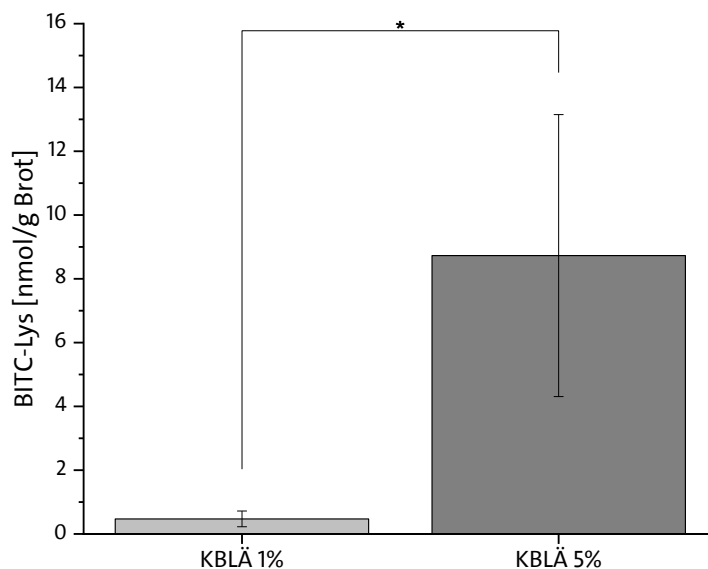


Abbildung 12: Bildung von Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugaten (BITC-Lys) in Broten mit 1% (KBLÄ 1%) oder 5% (KBLÄ 5%) frischen Blättern der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.). Der Asterik zeigt einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den hergestellten Broten. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten.

4.3 Gehalt an Abbauprodukten und Untersuchung der Bildung von ITC-Proteinkonjugaten bei der Verwendung von Kapuzinerkresseblüten (*Tropaeolum majus* L.)

4.3.1 Erscheinungsbild der Brote

Dem Trend folgend, dass auch Kapuzinerkresseblüten zum Verzehr verwendet werden, wurde neben den Blättern der Kapuzinerkresse auch die Blüten für eine Anreicherung von Brot verwendet. Wie in Abbildung 13a dargestellt, ist die beige-braune Krume des angereicherten Brotes punktuell mit gelbem, rotem und orangenem Blütenmaterial durchzogen. Im Gegensatz dazu weist das Referenzbrot (Abbildung 13b) eine einheitlich beige-braune Krume auf. Der Geruch des Brotes mit Kapuzinerkresseblüten ließ sich nicht von dem Referenzbrot unterscheiden und konnte als typisch für Weizenbrot bezeichnet werden.



Abbildung 13: Bild eines Brotes (a), das mit 1,5% Kapuzinerkresseblüten (*Tropaeolum majus* L., KLBÜ) angereichert wurde, sowie (b) das entsprechende Referenzbrot ohne Anreicherung.

4.3.2 Gehalt an Benzylcyanid und Benzylisothiocyanat und die Bildung von Benzylisothiocyanat-Proteinkonjugaten

Für das Kapuzinerkresseblütenbrot (KBLÜ) wurde wie für die Rezeptur 1 und Rezeptur 2 der Gehalt an den Benzylglucosinolat (BG)-Abbauprodukten BC und BITC analysiert, sowie der Gehalt an Reaktionsprodukten (BITC-Lys, BITC-Cys) bestimmt. Der Gehalt an BG in den Blüten, vor Verwendung als Brotzusatz, lag bei 67 nmol/g Brot, dieses wurde während des Backprozesses zu BC und BITC abgebaut. Die Analyse der Abbauprodukte (Abbildung 14) zeigte, dass signifikant ($p \leq 0,05$) mehr BC (19,22 nmol/g Brot) als BITC (0,97 nmol/g Brot) in der Krume nachgewiesen werden konnte. In Bezug auf die analysierten BITC-Lys-Konjugate konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zu dem „freien“ BITC bestimmt werden, wobei der Gehalt an BITC-Lys bei 2,92 nmol/g Brot lag und somit dem dreifachen Gehalt an BITC entspricht. Demnach ließen sich mehr BITC-Konjugate als freies BITC im KBLÜ nachweisen.

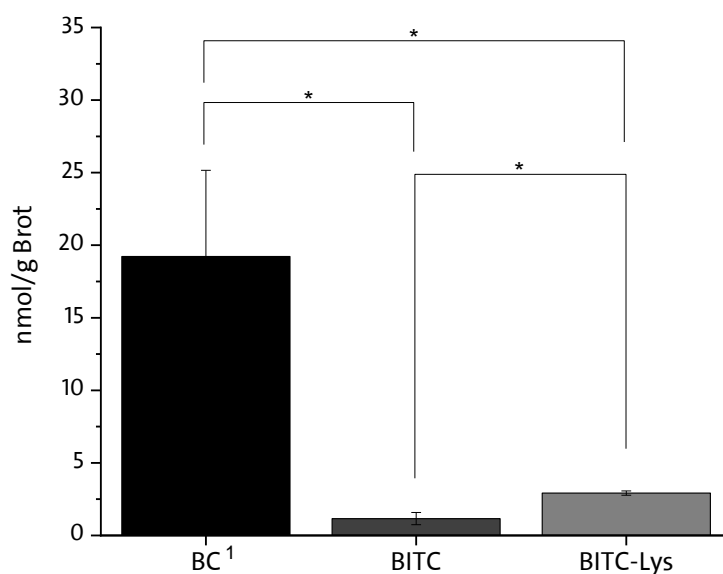


Abbildung 14: Gehalt an den Abbauprodukten Benzylcyanid (BC), Benzylisothiocyanat (BITC) und des gebildeten Reaktionsproduktes Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys) in Brot angereichert mit Kapuzinerkresseblüten (2,5%, *Tropaeolum majus* L.). Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede in den analysierten Gehalten in dem angereicherten Brot. ¹Für BC wurden zwei Replikate für die Auswertung verwendet.

4.4 Vergleich der Bildung von Benzylisothiocyanat-Lysin Addukten in Weizenbroten mit Blatt- und Blütenmaterial der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.)

Für die Anreicherungen der Brote wurden Blätter (frisch, gefriergetrocknet) und Blüten der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) verwendet.

Abbildung 15 stellt die Gehalte der BITC-Lys-Konjugate in Rezeptur1 (Weizenbrot mit 4% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse), KBLÄ 1% (Weizenbrot mit 1% frischen Kapuzinerkresseblättern), KBLÄ 5% (Weizenbrot mit 5% frischen Kapuzinerkresseblättern) und KBLÜ (Weizenbrot mit 1,5% frischen Kapuzinerkresseblüten) gegenüber.

Der Ausgangsgehalt an BG unterschied sich in den hergestellten Broten, daher sind diese in Tabelle 2 zusammengefasst.

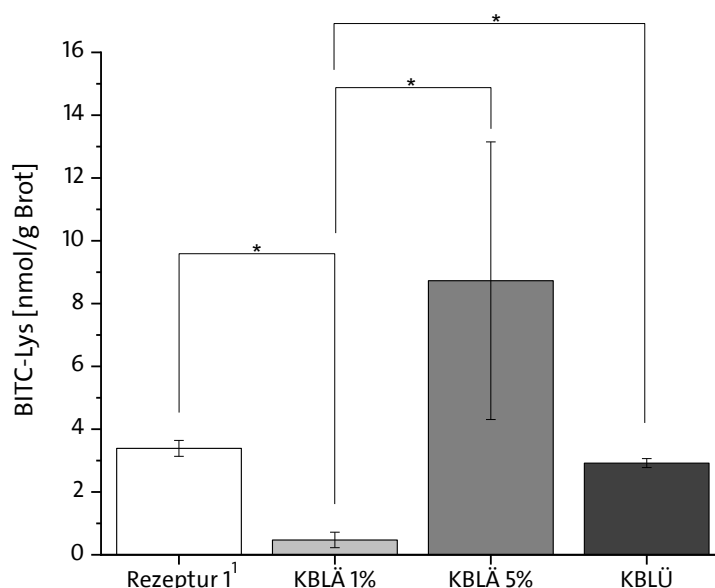


Abbildung 15: Gehalt an Benzylisothiocyanat-Lysin Addukten in den unterschiedlichen Weizenbroten mit diversen Arten des Kapuzinerkressezusatzes (*Tropaeolum majus* L.). Die Asterisken zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den analysierten Gehalten an BITC-Lys in den Broten. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. ¹Für Rezeptur1 wurden zwei Replikate für die Auswertung verwendet. Abkürzungen: Rezeptur1: Weizenbrot mit 4% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse; KBLÄ 1%: Weizenbrot mit 1% frischen Kapuzinerkresseblättern zum Gesamtgewicht; KBLÄ 5%: Weizenbrot mit 5% frischen Kapuzinerkresseblättern zum Gesamtgewicht; KBLÜ: Weizenbrot mit 1,5% frischen Kapuzinerkresseblüten.

Die Ausgangskonzentration von BG durch das zugesetzte Pflanzenmaterial im Brot KBLÄ 5% betrug 351 nmol/g Brot. Anhand der Abbildung 15 wird ersichtlich, dass in KBLÄ 5% der höchste Gehalt an BITC-Lys (8,7 nmol BITC-Lys/g Brot) quantifiziert werden konnte. Der BITC-Lys-Gehalt

in KBLÄ 5% unterschied sich signifikant ($p \leq 0,05$) von dem im KBLÄ 1% (0,47 nmol/g Brot), begründet durch den geringeren Zusatz an Pflanzenmaterial und resultierenden Gehalt an BG (Kapitel 4.2.2). Im Vergleich zu allen hergestellten Broten mit Kapuzinerkressezusatz weist das KBLÄ 1% sowohl die geringste Ausgangskonzentration an BG (61 nmol/g Brot) als auch den signifikant ($p \leq 0,05$) geringsten Gehalt an BITC-Lys-Reaktionsprodukten auf (0,47 nmol/g Brot). Demnach ist die Bildung von ITC-Reaktionsprodukten abhängig von dem Ausgangsgehalt des enthaltenen Glucosinolates im Pflanzenmaterial.

Es zeigt sich allerdings auch erneut eine Abhängigkeit in der Zusatzart von intaktem zu gefriergetrockneten Kapuzinerkressematerial. Rezeptur 1 wurde mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse hergestellt und trotz des höchsten Wertes an BG (500 nmol/g Brot) aus dem zugesetzten Pflanzenmaterial, wurden nur 3,39 nmol/g BITC-Lys-Konjugate gebildet, was dem zweithöchsten Gehalt zwischen den gezeigten Broten entspricht und vergleichbar mit dem Gehalt im KBLÜ mit 2,92 nmol BITC-Lys/g Brot ist. Im KBLÜ betrug die Ausgangsmenge an BG nur 67 nmol/g Brot, dennoch wurden ungefähr gleich viele ITC-Proteinkonjugate gebildet wie in Rezeptur 1. Auch im Vergleich zwischen Rezeptur 1 und KBLÄ 5%, mit 500 nmol BG/g Brot und 351 nmol BG/g Brot wurden mehr als doppelt so viele Reaktionsprodukte im Brot mit intaktem Blättern gebildet, obwohl die Menge an BG in dem Brot mit gefriergetrocknetem Material (Rezeptur 1) vor dem Backen höher war.

Tabelle 2: Probenbezeichnungen, Abkürzungen, sowie die Zusatzart und –menge und der resultierende Gehalt an Benzylglucosinolat (BG) in den Broten mit unterschiedlicher Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.)-Anreicherung.

Probenbezeichnung	Abkürzung	Pflanzenteil	Zusatzart	Zusatzmenge [%]	BG [nmol/g Brot]
Kapuzinerkresseblätterbrot	Rezeptur 1	Blätter	gefriergetrocknet	4	500
Kapuzinerkresseblätterbrot	KBLÄ 1%	Blätter	frisch	1	61
Kapuzinerkresseblätterbrot	KBLÄ 5%	Blätter	frisch	5	351
Kapuzinerkresseblütenbrot	KBLÜ	Blüten	frisch	1,5	67

4.5 Bildung und Stabilität von Glucosinolatabbauprodukten und Isothiocyanat-Proteinaddukten in unterschiedlichen Brottypen mit Kapuzinerkressezusatz (*Tropaeolum majus* L.)

4.5.1 Erscheinungsbild der Brote sowie Eigenschaften und Veränderungen während einer Lagerung

Vermeehrt werden Brote mit Vollkorn- und proteinreichen Mehlen hergestellt, die unterschiedliche Backtriebmittel fordern und die Bildung von ITC und ITC-Proteinkonjugaten beeinflussen könnten, da sie unter anderem unterschiedliche pH-Werte des Teiges aufweisen. Zur Untersuchung, ob ein Einfluss auf die Bildung von BITC, BC und BITC-Proteinaddukte vorliegt, wurden daher Brote mit unterschiedlichen Mehlsorten und Backtriebmitteln hergestellt, wobei die zugesetzte prozentuale Menge an gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) in allen Broten gleich war.

Die hergestellten Teige unterschieden sich in ihren pH-Werten. Das Roggenvollkornmehlbrot (RVK) hatte einen pH-Wert von 4,5; das Weizenvollkornmehlbrot (WVK) einen pH-Wert von 5,7; das Kichererbsenmehlbrot (KEMB) einen pH-Wert von 6,0; das Dinkelmehlbrot (DMB) einen pH-Wert von 6,5 und Weizensodabrot (WSB) einen pH-Wert von pH 7,2.

Nach dem Backen konnten alle Brote aufgrund der Brotstruktur und der Färbung der Krume voneinander unterschieden werden. Zusätzlich zeigten sich über einen typischen Lagerzeitraum von 4 Tagen, in einem Beutel aus Polyethylen, Unterschiede zwischen den Broten. Bei der olfaktorischen Untersuchung des jeweiligen Referenzbrotes, die in Abbildung 16a-e jeweils links dargestellt sind, konnten folgende Eigenschaften und Veränderungen während der Lagerung festgestellt werden:

Das WVK hatte nach dem Backen eine dunkelbraun-graue Färbung, die typisch für das verwendete Weizenvollkornmehl ist, auch der Geruch war charakteristisch für diese Brotsorte. Nach dem Abkühlen hatte das Brot am ersten Tag eine feste, elastische Krume. Während der Lagerung trocknete die Krume kontinuierlich aus und verlor an Elastizität, wodurch das Brot fester wurde. Die Kruste war nach dem Backen knusprig und wurde im Laufe der Lagerung weicher.

Das RVK war bräunlich-grau und hatte einen leicht säuerlichen Geruch, der charakteristisch für Sauerteig ist. Am ersten Tag nach dem Backen hatte das Brot bereits eine sehr feste Textur. Die Krume trocknete über die Lagerperiode von Tag 1 zu Tag 5 aus und wurde zunehmend porös.

Das DMB hatte eine typische beige Farbe und einen typischen Geruch für Dinkelbrot. Nach dem Abkühlen war die Kruste knusprig und die Krume weich. Die Eigenschaften des Brotes änderten sich innerhalb von fünf Tagen nur wenig, es konnte nur ein geringfügiger Verlust an Elastizität festgestellt werden. Im Gegensatz zu den anderen Broten war dieses Brot auch am fünften Tag nicht so stark austrocknet und hart wie die anderen Brottypen.

Das WSB hatte im Vergleich zum WVK eine hellere, beige-braune Krume. Dieser Unterschied könnte auf den Anteil an Weizenmehl des Typs 450 zurückgeführt werden. Trotz der Verwendung von Natriumbicarbonat als Backtriebmittel statt Hefe konnte kein Unterschied im Geruch zum Weizenbrot festgestellt werden. Im Vergleich zu den anderen Broten besaß das WSB nach dem Backen keine krosse Kruste, die sich über den Lagerzeitraum nicht veränderte. Die anfangs weiche Krume wurde mit der Zeit allerdings weniger elastisch bis gummiartig.

Das KEMB unterschied sich deutlich von den anderen Broten aufgrund der gelblichen Färbung der Krume, die vom Kichererbsenmehl herrührte. Der Geruch des Brotes war hefig und süßlich. Die Kruste war nach dem Backen knusprig und die Krume fest ohne Luftpinschlüsse. Im Laufe der Lagerzeit von vier Tagen wurde die Krume fester.

Im Vergleich zu den Referenzbroten wiesen die angereicherten Brote vor allem unterschiedliche Strukturen der Krume auf. Eine visuelle Unterscheidung anhand der Farbe war nur bedingt möglich, da alle Brote eine grüne Färbung durch die Anreicherung mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (2,5%, *Tropaeolum majus* L.) aufwiesen (Abbildung 16a-e, rechts). Besonders auffällig war hierbei die besonders hellgrüne Färbung des WSB (Abbildung 16c). Darüber hinaus hatten alle angereicherten Brote einen leichten kohlartigen Geruch, welcher insbesondere bei dem WSB deutlich wahrnehmbar war. Auch waren die Kruste und die Krume der angereicherten Brote fester und trockener als die der entsprechenden Referenzbrote.

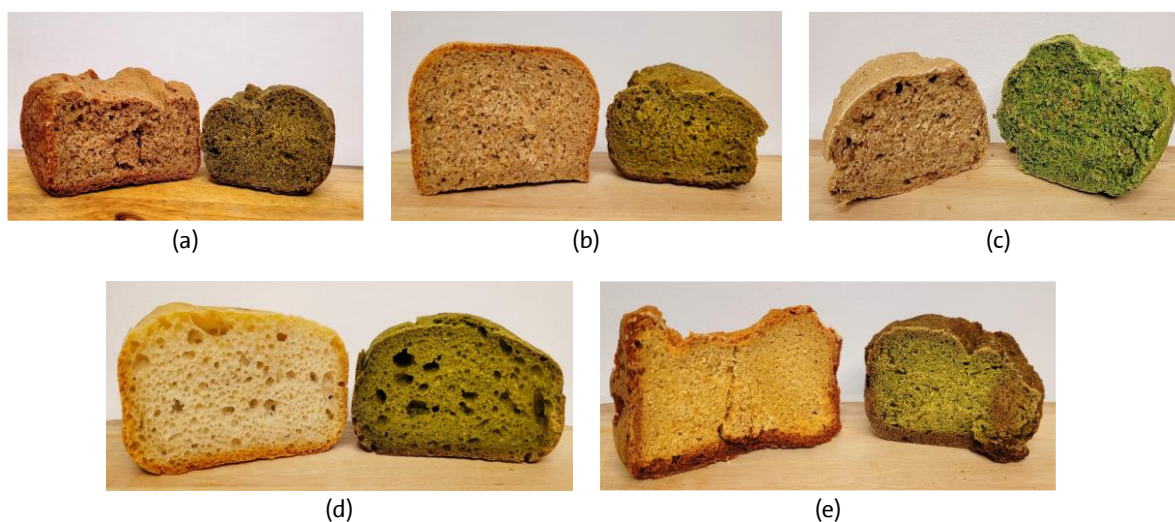


Abbildung 16: Bilder der verschiedenen mit Kresse angereicherten Brottypen (a-e, rechts) mit den jeweils dazugehörigen Referenzbroten (a-e, links). (a) Weizenvollkornbrot (WVK) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) angereichert (rechts); b) Roggenvollkornbrot (RVK) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse angereichert (rechts); c) Weizen-Sodabrot (WSB) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse angereichert (rechts); d) Dinkelmehlbrot (DMB) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse angereichert (rechts); Kichererbsenmehlbrot (KEMB) Referenz (links) und mit Kapuzinerkresse angereichert (rechts). Abbildung veröffentlicht in Krell et al. (2022).

4.5.2 Gehalt an Benzylcyanid und Benzylisothiocyanat in der Brotmatrix und die Stabilität während der Lagerung

Analog zu der vorangegangenen Auswertung wurden die Abbauprodukte BITC und BC in den unterschiedlichen Brottypen analysiert. In diesem Fall war von Interesse, inwieweit die Brottypen mit den unterschiedlichen pH-Werten der Teige, der durch die verwendeten Mehle und Backtriebmittel zustande kommt, einen Einfluss auf das Verhältnis der Abbauprodukte haben könnte. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Abbauprodukte über einen Lagerungszeitraum von vier Tagen stabil sind und im Brot verbleiben. Die detaillierten Ergebnisse sind in Anhang IV in der Tabelle 12 zusammengefasst.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, wurden in den verschiedenen Brottypen unterschiedliche Gehalte von BITC und BC nachgewiesen. Demnach konnte an Tag 1 im WVK (pH 5,7) der höchste Gehalt an BITC mit 71,35 nmol/g Brot nachgewiesen werden (Abbildung 17a), wobei der Gehalt mindestens doppelt so hoch war, wie in den anderen analysierten Broten. Der geringste Gehalt an BITC wurde im WSB (pH 7,2) nachgewiesen, während die anderen drei Brote RVK (pH 4,5),

DMB (pH 6,5) und KEMB (pH 6,0) nur geringe Unterschiede untereinander aufwiesen (Tabelle 12, Abbildung 17).

Im Vergleich zwischen BITC und BC war der Gehalt des Abbauproduktes BC in allen Broten signifikant ($p \leq 0,05$) geringer. Im WSB konnte nicht nur der geringste Gehalt an BITC quantifiziert werden, sondern auch an BC. In diesem Brot wurden 3,6 nmol BC/g Brot nachgewiesen und somit signifikant ($p \leq 0,05$) weniger als in den Broten WVK (9,2 nmol BC/g Brot), RVK (9,0 nmol BC/g Brot) und KEMB (10,1 nmol/g Brot). Zwischen den Brottypen WVK, RVK und KEMB konnte kein Unterschied in dem Gehalt an BITC und BC festgestellt werden.

Über einen Zeitraum von Tag 1 zu Tag 5 zeigte sich eine hohe Stabilität der Abbauprodukte in der Brotkrume. Bei dem Gehalt an BITC konnte nur im DMB eine 60%ige Abnahme von Tag 1 zu Tag 5 nachgewiesen werden, wohingegen in den anderen Broten keine Unterschiede identifiziert werden konnten (Abbildung 17). Bei dem Gehalt an BC konnte in keinem Brot eine signifikante Abnahme ($p \leq 0,05$) festgestellt werden, lediglich an Tag 5 zeigte sich, dass der Gehalt an BC im DMB sich so weit verringerte, dass ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zum KEMB identifiziert werden konnte. An den anderen Tagen lag kein signifikanter Unterschied in den Gehalten der beiden Brote vor.

4.5.3 Bildung und Stabilität von Benzylisothiocyanat-Proteinkonjugaten in den unterschiedlichen Brottypen

Die unterschiedlichen Brottypen zeichnen sich durch unterschiedliche pH-Werte, Proteingehalte und -zusammensetzungen aus, die nicht nur einen Einfluss auf das Verhältnis der Abbauprodukte im Endprodukt haben können, sondern auch auf die Bildung von Reaktionsprodukten zwischen dem Abbauprodukt BITC und nukleophilen Seitenketten der enthaltenen Proteine. Aufgrund dessen wurden alle Brote auf den Gehalt an BITC-Lys und BITC-Cys, als Marker für Konjugationen, untersucht. Wie in den bisher beschriebenen Experimenten konnten keine Reaktionsprodukte zwischen Cystein und BITC nachgewiesen werden, wohingegen BITC-Lysin in allen Broten identifiziert und quantifiziert werden konnte. Die detaillierten Ergebnisse sind in Anhang IV in Tabelle 13 zusammengefasst.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der LC-ESI-MS/MS-Analyse an Tag 1, 3 und 5, die zusätzlich zur generellen Bildung der Konjugate einen Rückschluss auf die Stabilität zuließen.

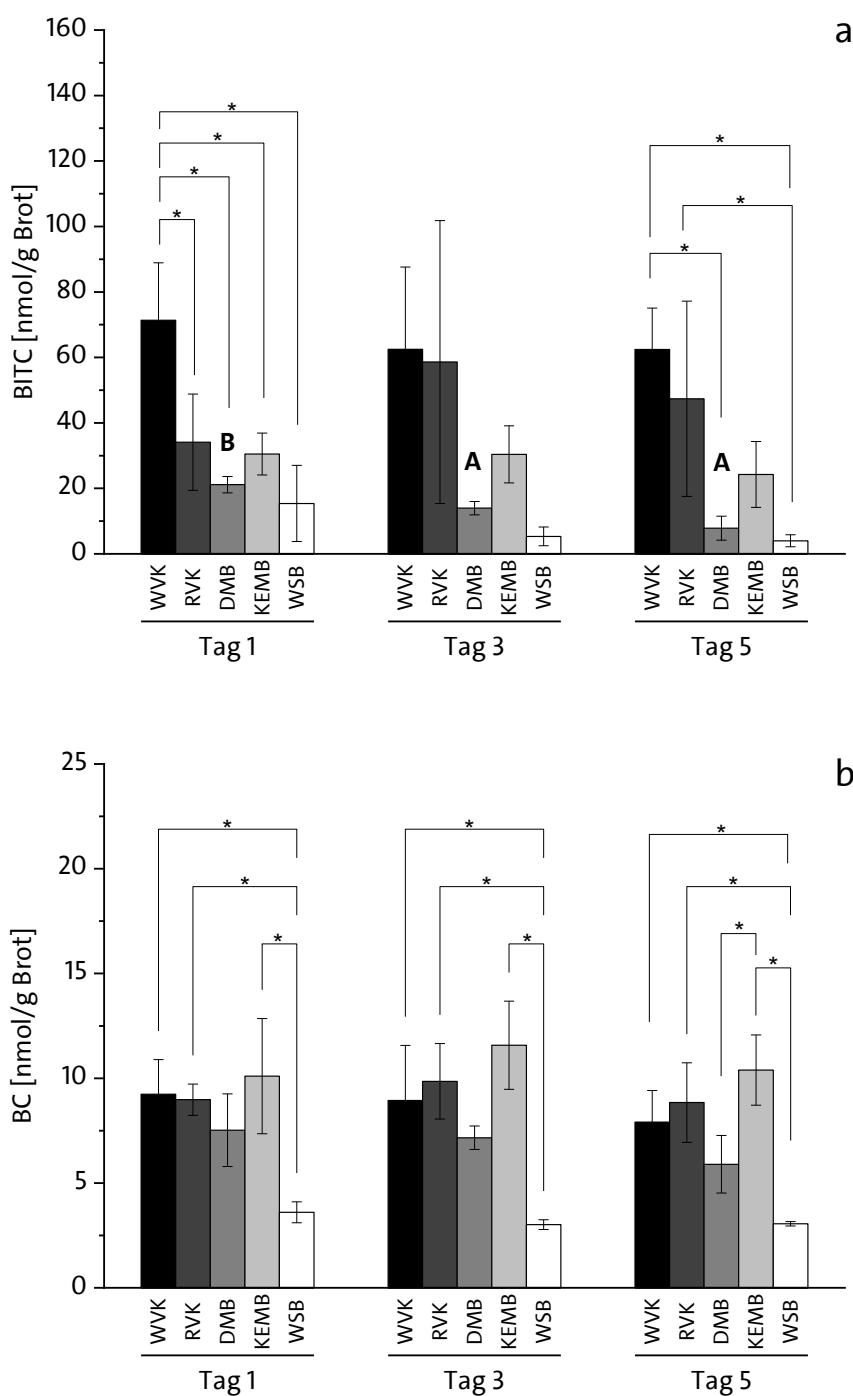


Abbildung 17: Gehalt an Benzylglucosinolatabbauprodukten (a) Benzylisothiocyanat (BITC) und (b) Benzylcyanid (BC) in den verschiedenen Brottypen. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen einen statistischen Unterschied zwischen den Brottypen an den untersuchten Tagen ($p \leq 0,05$). Großbuchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) in einer Brotsorte zwischen den verschiedenen Tagen. Abkürzungen: WVK: Weizenvollkornbrot; RVK: Roggenvollkornbrot; DMB: Dinkelmehlbrot; KEMB: Kichererbsenmehlbrot; WSB: Weizen-Sodabrot. Abbildung nach Krell et al. (2022).

Am ersten Tag wies WSB (pH 7,2) mit 33,95 nmol/g Brot den höchsten BITC-Lys-Gehalt auf, gefolgt von WVK (pH 5,7) mit 15,60 nmol BITC-Lys/g Brot. RVK (pH 4,5) und DMB (pH 6,5) hatten mit 2,2 nmol BITC-Lys/g Brot und 3,4 nmol BITC-Lys/g Brot ähnliche und signifikant niedrigere Werte als das WSB ($p \leq 0,05$). Der niedrigste BITC-Lys-Gehalt wurde im KEMB (pH 6,0) analysiert mit 0,2 nmol BITC-Lys/g Brot. Dieser Gehalt wies ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zum WSB auf. Zwischen den Broten WVK, RVK, DMB und KEMB konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Während der Lagerung über vier Tage nach dem Backen konnte, wie aus Abbildung 18 hervorgeht, für WVK ein abnehmender Trend des BITC-Lys-Gehaltes von 33,95 nmol BITC-Lys/g Brot an Tag 1 über 7,3 nmol BITC-Lys/g an Tag 3 bis auf 1,8 nmol BITC-Lys/g an Tag 5 festgestellt werden. In den anderen Brottypen konnte kein Trend im Rückgang an BITC-Lys während der Lagerung beobachtet werden. An allen Tagen wies WSB den höchsten Gehalt an BITC-Lys auf, der sich auch an Tag drei signifikant ($p \leq 0,05$) von den Brottypen RVK, DMB und KEMB unterschied. Zusätzlich konnte an Tag 3 festgestellt werden, dass der Gehalt an BITC-Lys in KEMB signifikant ($p \leq 0,05$) geringer war als im WVK, während am letzten Tag der Lagerung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Brottypen mehr festgestellt werden konnten.

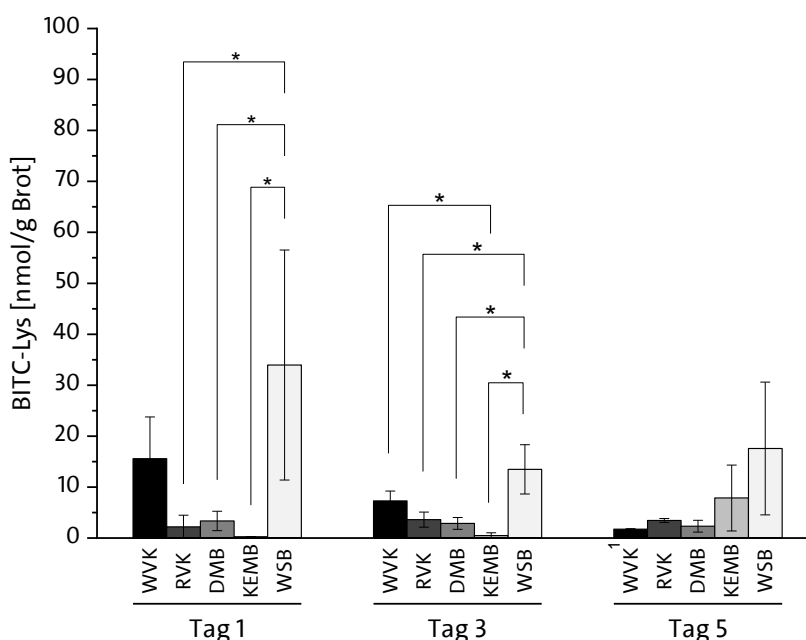


Abbildung 18: Gehalt an Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugaten (BITC-Lys) in Brottypen mit unterschiedlichen Mehlen und Backtriebmitteln. Die Asterisken zeigen einen statistischen Unterschied zwischen den Broten an den jeweiligen Tagen ($p \leq 0,05$). Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Abkürzungen: WVK: Weizenvollkornbrot; RVK: Roggenbrot; DMB: Dinkelmehlbrot; KEMB: Kichererbsenmehlbrot; WSB: Weizen-Sodabrot. Für WVK wurden an Tag 5 nur zwei Replikate für die Auswertung verwendet. Abbildung nach Krell et al. (2022).

4.6 Bildung und Stabilität von Benzylglucosinolat-Abbauprodukten und Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Modellbrot mit spezifischen pH-Werten und Kapuzinerkressezusatz (*Tropaeolum majus* L.)

4.6.1 Gehalt an Benzylisothiocyanat und Benzylcyanid in Brot mit unterschiedlichen pH-Werten

Durch die Verwendung unterschiedlicher Mehle kann kein direkter Rückschluss auf einen spezifischen Einflussfaktor auf die Bildung der Abbauprodukte BITC und BC und insbesondere die Proteinkonjugation gezogen werden. Um daher einen Einfluss des pH-Wertes zu untersuchen wurden Modellbrote hergestellt, die sich nur in ihren pH-Werten im Teig unterschieden, während die anderen Inhaltsstoffe, wie Mehl und Kapuzinerkressepulver (2%) gleich waren. Nach Zugabe der pH-Lösung zu den trockenen Zutaten und Vermischen wurde der pH-Wert des Teiges bestimmt. Durch Zugabe von Milchsäurelösungen resultierten pH-Werte des Teiges von 3,4 und 5,0, während die pH-Werte der Teige hergestellt mit Natriumhydroxid-Lösung bei 7,3; 7,9; 10,1 und 11,6 lagen. Als Referenzbrot diente ein Teig bestehend aus Wasser und Kressematerial, der einen pH-Wert von 5,6 hatte. Nach dem Backen wurden die Brote auf den Gehalt an BITC und BC mittels GC-MS analysiert. Die Ergebnisse sind unter Anhang IV in Tabelle 14 aufgeführt.

Abbildung 19 zeigt die quantifizierten Gehalte an BITC und BC in den Modellbrot anhand ihrer pH-Werte. Im Vergleich zu den anderen Modellbrot wies das Brot mit einem pH-Wert im Teig von 3,4 die höchste Konzentration an BC in Höhe von 472 nmol BC/g Brot auf. Diese Menge war 50-mal so hoch wie in den anderen untersuchten Modellbrot und unterschied sich dadurch signifikant ($p < 0,05$). Bei den Modellbrot mit pH-Werten zwischen 5,0 bis 11,6 lag der Gehalt an BC in einem vergleichbaren Bereich zwischen 9 und 11 nmol BC/g Brot

Die Ergebnisse für das Abbauprodukt BITC zeigten nur geringe Unterschiede zwischen allen Modellbrot unabhängig von den pH-Werten im Teig. Die niedrigsten Gehalte von 4,5 bis 6,5 nmol BITC/g Brot wurden in den Brot mit pH 3,4; pH 5,6; pH 7,3; pH 7,9 und pH 11,6 nachgewiesen. In den Brot mit pH-Werten von 5,0 und 10,1 wurden höhere BITC-Konzentrationen von 8,1 nmol BITC/g Brot und 11,2 nmol/g Brot quantifiziert. Beim

Vergleich der beiden Abbauprodukte BC und BITC konnte in den Modellbroten der pH-Werte 3,4; 5,0; 5,6; 7,3 und 7,9 ein signifikant ($p \leq 0,05$) höherer Gehalt an BC analysiert werden.

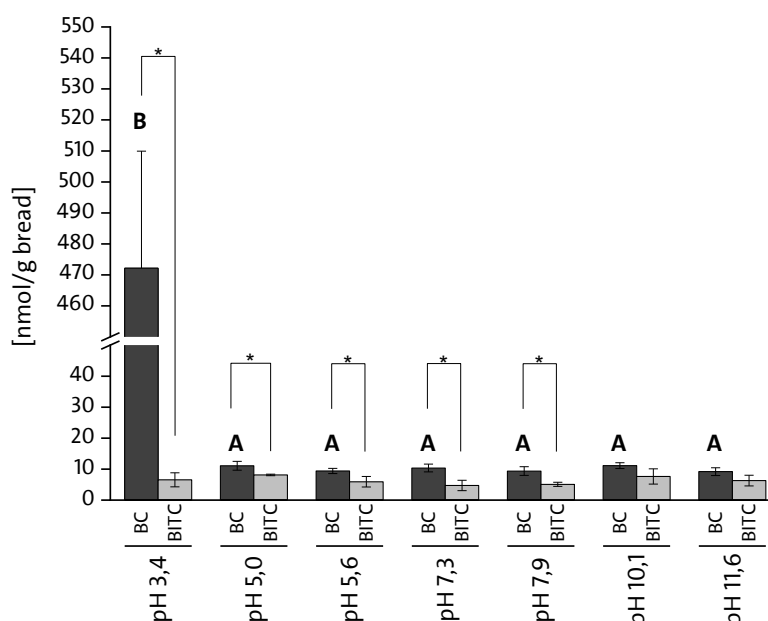


Abbildung 19: Gehalt an Benzylcyanid (BC) und Benzylisothiocyanat (BITC) in Modellbroten mit spezifisch pH-Werten. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen einen statistischen Unterschied zwischen den BC und BITC für das jeweilige Brot mit bestimmtem pH-Wert ($p \leq 0,05$). Unterschiedliche Großbuchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied im BC-Gehalt in den verschiedenen Modellbroten ($p \leq 0,05$). Abbildung nach Krell et al. (2022).

4.6.2 Analyse der Abhängigkeit der Bildung von Benzylisothiocyanat-Proteinkonjugaten vom pH-Wert

Neben den Benzylglucosinolat (BG)-Abbauprodukten BITC und BC wurden die Modellbrote auf gebildete Aminosäurekonjugate (BITC-Lys, BITC-Cys) mittels LC-ESI-MS/MS untersucht. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der BITC-Lys-Konjugatbildung in den Modellbroten mit unterschiedlichen pH-Werten.

Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, lag die Menge der BITC-Lys-Konjugate in allen analysierten Broten unter 2,0 nmol/g Brot. Zwischen den Modellbroten mit pH 5,0 mit dem niedrigsten Gehalt an BITC-Lys (0,12 nmol /g Brot) und dem Brot pH 7,3, mit dem höchsten Gehalt (1,36 nmol BITC-Lys/g Brot) konnte ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) festgestellt werden. Die Modellbrote, mit pH-Werten im Teig von 3,4 (0,5 nmol BITC-Lys/g Brot), pH 5,6 (0,6 nmol BITC-Lys/g Brot), pH 7,9 (0,8 nmol BITC-Lys/g Brot) und pH 11,6 (0,6 nmol BITC-Lys/g Brot),

zeigten hingegen nur geringe Unterschiede in dem Gehalt von BITC-Lys. Die Konjugation von BITC an die Aminosäure Cystein konnte auch in diesen Broten nicht nachgewiesen werden.

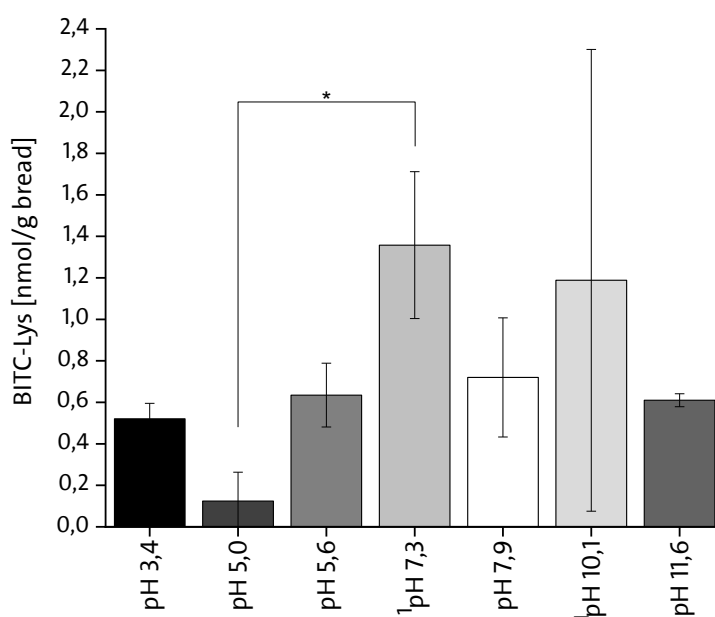


Abbildung 20: Gehalt an Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugaten (BITC-Lys) in Broten mit unterschiedlichen pH-Werten des Teiges. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten, außer wenn anders angegeben: ¹Für pH 7,3 und 10,1 wurden zwei Wiederholungen für die statistische Analyse verwendet. Der Asterisk zeigt einen statistischen Unterschied zwischen BITC-Lys-Gehalten in den unterschiedlichen Broten mit bestimmten pH-Werten ($p \leq 0,05$). Abbildung nach Krell et al. (2022).

4.7 Analyse der Glucosinolatbauprodukte in Broten angereichert mit Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) vor und nach dem Backprozess

Neben der Analyse der Abbauprodukte und gebildeten ITC-Konjugate in den gebackenen Broten war es von Interesse zu untersuchen, ob ein Abbau von Benzylglucosinolat (BG) zu den entsprechenden Abbauprodukten BC und BITC bereits vor dem Backprozess induziert wird. Zusätzlich wurde analysiert, ob es einen Unterschied bei dem Abbau von BG gibt, wenn trockenes Kapuzinerkressepulver (Nr. 1, Abbildung 21) oder eine inkubierte wässrige Kapuzinerkresse-Suspension (Nr. 2, Abbildung 21) für die Teigherstellung verwendet wird. Die Teige und Brote wurden nach demselben Protokoll wie die pH-angepassten Brote zubereitet (Kapitel 6.2.3). Abbildung 21 zeigt die Gehalte der Abbauprodukte BITC und BC in Abhängigkeit des Kapuzinerkressezusatzes, als trockenes Material oder Suspension. Zusätzlich sind die

Ergebnisse der Analyse im Teig (vor dem Backen), als auch in den gebackenen Broten gegenübergestellt.

Wie in Abbildung 21a dargestellt hatte die Art der Zugabe als trockene oder suspendierte Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) zum Teig einen Einfluss auf den BITC-Gehalt. In dem Teig, der mit der wässrigen Kapuzinerkresse-Suspension hergestellt wurde (Nr. 2), konnte signifikant ($p \leq 0,05$) mehr BITC (425 nmol BITC/g Teig) nachgewiesen werden als in dem Teig, der mit trockenem Material (372 nmol BITC/g Teig) hergestellt wurde (Nr. 1).

Bei der Betrachtung nach dem Backvorgang ist ein deutlicher Rückgang des BITC-Gehaltes nachweisbar. In beiden Broten konnte nur noch weniger als 6 nmol BITC/g Brot nachgewiesen werden, was einer Reduzierung während des Backvorgangs von 98-99% entspricht.

Der Gehalt an BC lag in den hergestellten Teigen mit gefriergetrocknetem Kapuzinerkressematerial (Nr. 1) und der Kapuzinerkresse-Suspension (Nr. 2) in einem ähnlichen Bereich von 3,3 bzw. 3,2 nmol BC/g Teig (Abbildung 21b). Im Gegensatz zum BITC wiesen die Brote nach dem Backen einen signifikant ($p \leq 0,05$) höheren Gehalt an BC auf. Im Vergleich zum ungebackenen Teig lagen die Werte im Brot bei 9,4 nmol (Nr. 1) und 9,2 nmol BC/g Brot (Nr. 2).

4.8 Migration von Benzylcyanid und Benzylisothiocyanat und die Bildung von Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Brot mit den Kressesorten *Lepidium sativum* L. und *Tropaeolum majus* L.

4.8.1 Erscheinungsbild der Brote

Zur Untersuchung der Migration der Abbauprodukte BITC und BC, die während des Backens aus Benzylglucosinolat (BG) resultieren, sowie möglicher Reaktionsprodukte (BITC-Lys, BITC-Cys) war es notwendig, dass das verwendete Pflanzenmaterial sich nicht in der gesamten Brotkrume verteilt. Wie in Abbildung 22 gezeigt wird, war es möglich Brote mit mittiger Applikation des Pflanzenmaterials herzustellen. Das angereicherte Brot mit mittig platzierter gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (Rezeptur 3, Abbildung 22a) und das Brot mit mittiger Applikation von frischer Gartenkresse (Rezeptur 4, Abbildung 22c) zeigten keine Verfärbung der Krume im Vergleich zu den hergestellten Broten mit homogen verteiltem Pflanzenmaterial, wie beispielweise Rezeptur 1 in Abbildung 6a (Kapitel 4.1.1).

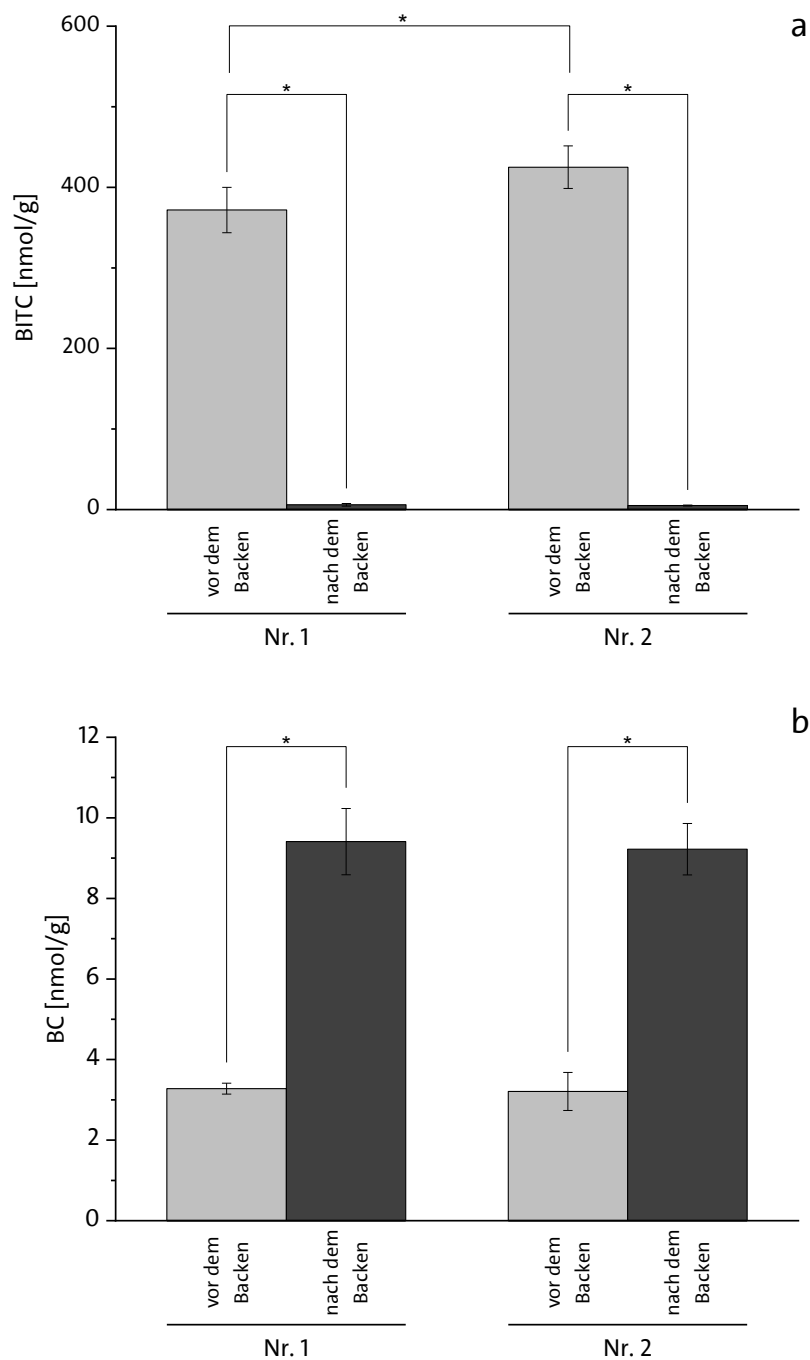


Abbildung 21: Gehalt an Benzylisothiocyanat (BITC, a) und Benzylcyanid (BC, b) vor und nach dem Backvorgang in Brot, das mit trockener, gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., Nr. 1) und einer inkubierten Kapuzinerkresse-Suspension hergestellt (Nr. 2) wurde. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen statistische Unterschiede vor und nach dem Backvorgang und zwischen den verschiedenen Kressezusätze ($p < 0,05$). Abbildung nach Krell et al. (2022).

Die angereicherten Brote lassen sich lediglich anhand der Färbung des zugesetzten Pflanzenmaterials in der Mitte unterscheiden. Während das gefriergetrocknete Material in Rezeptur 3 eine gleichmäßige hell-grüne Färbung aufwies (Abbildung 22a), war bei dem frischen Material die Pflanzenstruktur zu erkennen (Abbildung 22c). Die frische Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) weist darüber hinaus eine dunklere Grünfärbung auf als die gefriergetrocknete Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.).

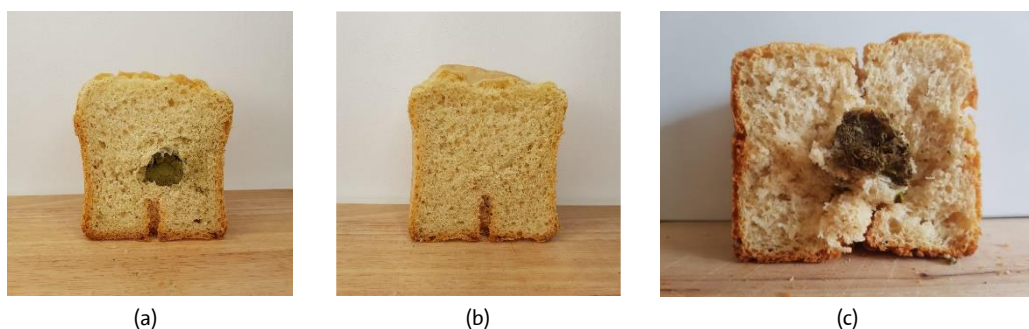


Abbildung 22: Bilder der hergestellten Brote mit mittlerer Applikation von (a) 1,5% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., Rezeptur 3) und (c) 2,5% frischer Gartenkresse (*Lepidium sativum* L., Rezeptur 4), sowie (b) des Referenzbrot ohne Pflanzenmaterial. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.

4.8.2 Untersuchung der Migration von Benzylisothiocyanat und Benzylcyanid in die Brotkrume

BITC-Lys-Konjugate können sich nur entfernt vom Pflanzenmaterial bilden, wenn die Glucosinolate aus dem zugesetzten Pflanzenmaterial oder mindestens die Abbauprodukte, insbesondere das BITC, in der Lage sind in die Brotkrume zu migrieren. Daher wurden die eingeteilten Fraktionen der Brotkrume (Kernfraktion, mittlere Fraktion, äußere Fraktion) mittels GC-MS auf die Abbauprodukte BITC und BC analysiert.

Zunächst wurde der Gehalt an Benzylglucosinolat (BG) in dem jeweiligen Kressematerial bestimmt, dass zur Anreicherung eingesetzt wurde. Für die Rezeptur 3 ergab sich 180 nmol BG/g Brot. Im Vergleich dazu lag der BG-Gehalt in dem Brot mit frischer Gartenkresse (Rezeptur 4, *Lepidium sativum* L.) bei 430 nmol/g Brot. Der höhere Gehalt an BG wurde gewählt, um ebenfalls den Einfluss des BG-Gehaltes und die Auswirkungen auf die Bildung der Abbauprodukte BITC und BC, sowie BITC-Lys-Konjugate zu untersuchen.

Abbildung 23 zeigt die Analysenergebnisse für die Abbauprodukte BITC und BC in den hergestellten Broten mit mittlerer Applikation aufgeteilt in die Kernfraktion, mittlere Fraktion

und äußere Fraktion. Wie in Abbildung 23b dargestellt, konnte BC in beiden Broten mit unterschiedlicher Kresseapplikation in allen untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden. In Rezeptur 3 wurde in der Kernfraktion die höchste Konzentration mit 653,02 nmol BC/g Brot analysiert. Der Gehalt an BC in der Kernfraktion zur mittleren Fraktion verringerte sich signifikant ($p \leq 0,05$) um 64% auf 235,25 nmol BC/g Brot. Ebenfalls war ein signifikanter ($p \leq 0,05$) Verlust von der mittleren zur äußeren Fraktion von 72% auf 66,98 nmol BC/g Brot nachweisbar. In der äußeren Fraktion konnten nur noch 10% der Menge an BC im Vergleich zur Kernfraktion nachgewiesen werden. Auch in Rezeptur 4, mit frischem Gartenkressematerial, konnte eine Reduzierung des Gehaltes an BC festgestellt werden.

Abbildung 23b zeigt, dass die Kernfraktion mit 693,17 nmol/g Brot den höchsten Gehalt an BC aufwies, der zur mittleren Fraktion um 40% auf 420,97 nmol/g Brot reduziert wurde. Eine signifikante Veränderung ($p \leq 0,05$) konnte in Rezeptur 4 beim BC-Gehalt zwischen der mittleren und äußeren Fraktion festgestellt werden, der Unterschied lag bei 70%. In der äußeren Fraktion konnten noch 124,44 nmol BC/g Brot nachgewiesen werden. Auch der Unterschied zwischen der Kernfraktion und der äußeren Fraktion zeigte eine signifikante Reduzierung ($p \leq 0,05$) des BC-Gehaltes um 82%.

Im Vergleich der Rezeptur 3 und Rezeptur 4 liegt die Konzentration an BC in der Kernfraktion in Rezeptur 4, mit frischer Gartenkresse, nur um 6% höher, obwohl die Ausgangskonzentration an BG in Rezeptur 3, mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse, 50 % geringer war. Die Erwartung, dass durch die Zugabe von einer signifikant ($p \leq 0,05$) höheren Ausgangskonzentration an BG mehr Abbauprodukte in der Kernfraktion gebildet werden, konnte demnach nicht bestätigt werden. Die Reduzierung des BC-Gehaltes zwischen den Fraktionen in beiden Rezepturen kann allerdings als vergleichbar angesehen werden.

Bei Betrachtung des Abbauproduktes BITC lässt sich anhand der Abbildung 23a feststellen, dass nur in der Kernfraktion von Rezeptur 3 BITC mit einer Konzentration von 0,52 nmol/g Brot quantifiziert werden konnte.

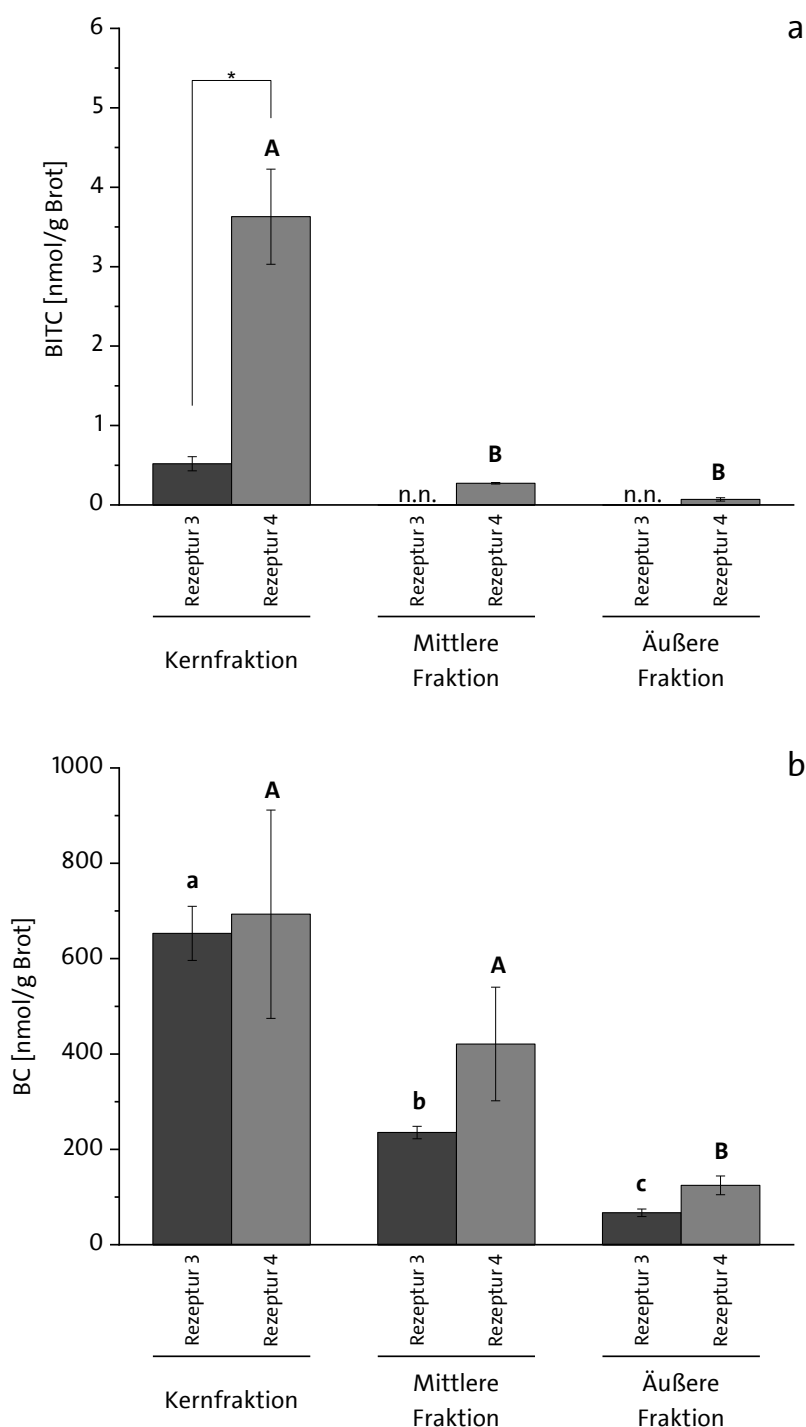


Abbildung 23: Gehalt an den Abbauprodukten Benzylisothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC), in Broten mit mittlerer Applikation von Kressematerial. Abkürzungen: Rezeptur 3: gefriergetrocknete Kapuzinerkresse (1,5%, *Tropaeolum majus* L.); Rezeptur 4: Gartenkresse (2,5%, *Lepidium sativum* L.). Die Asterisken zeigen Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Gehalt an BITC oder BC in den unterschiedlichen Rezepturen. Großbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) innerhalb der Rezeptur 4 in den unterschiedlichen Fraktionen, während kleine Buchstaben die Unterschiede ($p \leq 0,05$) in Rezeptur 3 in den drei Fraktionen zeigen. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.

In den weiteren Fraktionen war in diesem Brot kein BITC mehr nachweisbar. Im Vergleich dazu konnte in Rezeptur 4 in den drei untersuchten Fraktionen BITC quantifiziert werden. In der Kernfraktion lag der Gehalt bei 3,63 nmol BITC/g Brot, der sich im Vergleich zu der mittleren Fraktion bereits um 99,9% reduzierte. In der äußeren Fraktion konnten noch 0,07 nmol BITC/g Brot quantifiziert werden, und demnach eine weitere Reduzierung des Gehaltes im Vergleich zur mittleren Fraktion um 25% festgestellt werden. Von der Kernfraktion zur äußeren Fraktion konnte eine Verringerung um nahezu 100% in Rezeptur 4 festgestellt werden. In Bezug auf den Gesamtgehalt an BITC ist dieser in Rezeptur 4 signifikant höher ($p \leq 0,05$) als in Rezeptur 3. In Anbetracht der analysierten Konzentrationen in den beiden Rezepturen kann die Migration dennoch als vergleichbar betrachtet werden, da auch der höhere Gehalt an BITC um nahezu 100% von der Kernfraktion zur äußeren Fraktion reduziert wurde.

Insgesamt zeigte die Analyse der Abbauprodukte einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) in dem Gehalt von BITC und BC in beiden Brotrezepturen. Während der Gehalt an BC meist über 100 nmol/g Brot lag, betrug der Gehalt von BITC in den hergestellten Broten und untersuchten Fraktionen unter 10 nmol/g Brot. Demnach wird während des Hitzeprozesses signifikant ($p \leq 0,05$) mehr BC gebildet, wenn die Applikation des Pflanzenmaterials mittig erfolgt, unabhängig vom Zerstörungsgrad des zugesetzten Pflanzenmaterials.

4.8.3 Bildung von Benzylisothiocyanat-Proteinkonjugaten in unterschiedlichen Fraktionen der Brotkrume

Sollten das Glucosinolat BG beziehungsweise die Abbauprodukte BITC und BC in der Lage sein in die Lebensmittelmatrix zu migrieren, muss die Konzentration an BITC ausreichend hoch sein, um auch entfernt vom Pflanzenmaterial Proteinkonjugate ausbilden zu können. Aufgrund dessen wurde neben den Abbauprodukten die eingeteilten Fraktionen des Brotes ebenfalls auf gebildete BITC-Lys und BITC-Cys-Konjugate untersucht.

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der LC-ESI-MS/MS-Analyse für die Proteinkonjugate in den unterschiedlichen eingeteilten Fraktionen (Kernfraktion, mittlere Fraktion, äußere Fraktion) der Rezeptur 3 (mit gefriergetrockneter Kaupuzinerkresse) und Rezeptur 4 (mit frischer Gartenkresse). In beiden Broten konnten BITC-Lys-Konjugate in allen Fraktionen nachgewiesen werden. Der Gehalt in der Kernfraktion von Rezeptur 3 lag bei 1,32 nmol BITC-Lys/g Brot,

wohingegen in der mittleren Fraktion nur noch 0,15 nmol BITC-Lys/g Brot und damit 89% weniger Addukte nachgewiesen werden konnten. In der äußeren Fraktion reduzierte sich der Gehalt an BITC-Lys weiter auf 0,04 nmol/g Brot, was einer weiteren Reduzierung zur mittleren Fraktion von 72% und im Vergleich zur Kernfraktion von 97% entspricht.

In Rezeptur 4 wurden in der Kernfraktion 1,00 nmol BITC-Lys/g Brot quantifiziert, wohingegen in der mittleren Fraktion nur noch 0,06 nmol/g und in der äußeren Fraktion keine Addukte mehr nachweisbar waren. Es erfolgte demnach eine Reduzierung des Gehaltes an BITC-Lys von der Kernfraktion zur mittleren Fraktion bereits um 94%.

Im Vergleich von Rezeptur 3 zu Rezeptur 4 zeigte sich, dass die Bildung von BITC-Lys-Konjugaten in beiden Broten vergleichbar erfolgte. Auch die Abnahme der nachweisbaren Reaktionsprodukte von der Kernfraktion zur äußeren Fraktion war in den beiden Broten ähnlich. Die größte Reduzierung des Gehaltes an BITC-Lys konnte jeweils zwischen der Kernfraktion und der mittleren Fraktion festgestellt werden, während in der äußeren Fraktion entweder kein oder nur noch ein sehr geringer Gehalt an Konjugationsprodukten mit der Aminogruppe von Lysin nachweisbar war.

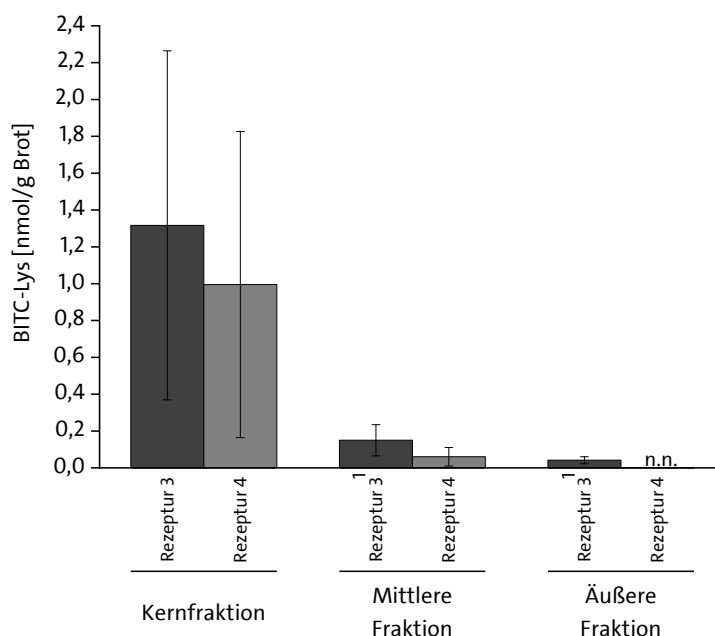


Abbildung 24: Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys)-Konjugate in den Broten mit mittig applizierter gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (Rezeptur 3, 1,5%, *Tropaeolum majus* L.) und frischer Gartenkresse (Rezeptur 4, 2,5%, *Lepidium sativum* L.) in unterschiedlichen Fraktionen der Brotkrume. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. ¹Für Rezeptur 3 wurden für die mittlere und äußere Fraktion zwei Replikate für die Auswertung verwendet. Abbildung in Anlehnung an die in Krell et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse.

4.9 Lagerstabilität der Isothiocyanat-Proteinkonjugate im Probenmaterial und Probenlösungen

4.9.1 Lagerstabilität der Isothiocyanat-Proteinkonjugate im gefriergetrockneten Probenmaterial

Entsprechend der durchgeführten Untersuchungen ist es wichtig die Lagerstabilität der Proteinkonjugate in den gefriergetrockneten Broten zu kennen, demnach wurde das gleiche gefriergetrocknete Brot als Probenmaterial direkt nach der Herstellung und erneut nach drei und nach zehn Wochen für die Analyse auf BITC-Lys und BITC-Cys aufgearbeitet und mittels LC-ESI-MS/MS auf die Aminosäurekonjugate untersucht.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der quantifizierten BITC-Lys-Konjugate direkt nach der Herstellung des Probenmaterials (Tag 1), sowie nach drei Wochen (Woche 3) und zehn Wochen (Woche 10) Lagerung bei Raumtemperatur. Anhand der Ergebnisse lässt sich ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen Tag 1 mit 2,92 nmol BITC-Lys/g Brot und Woche 10 mit 0,68 nmol BITC-Lys/g Brot feststellen. In dem Material konnten nach 10 Wochen nur noch 23% des ursprünglichen Gehaltes an BITC-Lys nachgewiesen werden. Nach drei Wochen (2,88 nmol/g Brot) ist keine signifikante Unterscheidung möglich.

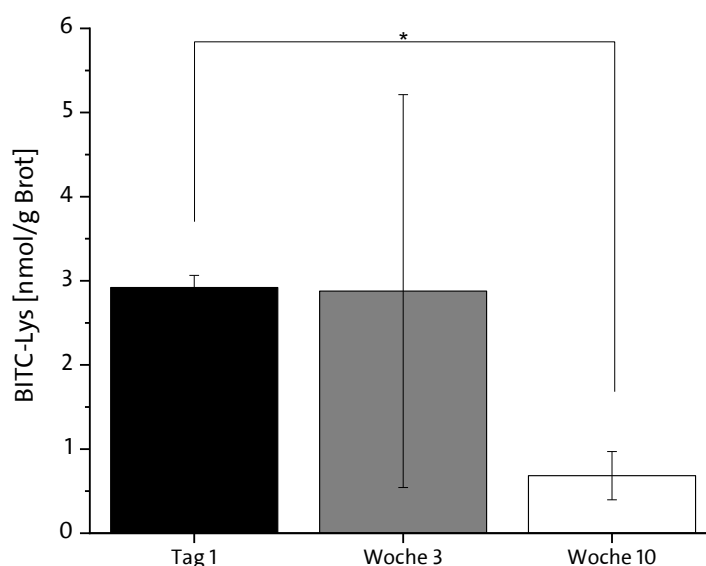


Abbildung 25: Lagerstabilität von Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys) in gefriergetrocknetem Probenmaterial. Verglichen werden die Ergebnisse nach Tag 1, Woche 3 und Woche 10. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Der Asterisk zeigt einen statistischen Unterschied zwischen den Lagerungszeiträumen ($p \leq 0,05$).

4.9.2 Lagerstabilität der Isothiocyanat-Proteinkonjugate in aufgearbeiteten Probelösungen

Neben der Lagerstabilität im gefriergetrockneten Probenmaterial wurde ebenfalls die Stabilität über einen Zeitraum von 10 Wochen bei einer Lagertemperatur von -80 °C von BITC-Lys in der hergestellten Analysenlösung für die LC-ESI-MS/MS-Messung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 gezeigt. Demnach konnte an Tag 1 zunächst $2,92\text{ nmol BITC-Lys/g Brot}$ quantifiziert werden und bereits nach Woche 3 ergab sich eine signifikante Reduzierung ($p \leq 0,05$) des BITC-Lys-Gehaltes um 40% auf $1,74\text{ nmol BITC-Lys/g Brot}$. Im Vergleich der BITC-Lys-Gehalte nach drei und zehn Wochen konnte eine weitere Abnahme um 80% festgestellt werden, resultierend in $0,29\text{ nmol BITC-Lys/g Brot}$, während von Tag 1 zu Woche 10 eine Reduzierung um 90% erfolgte.

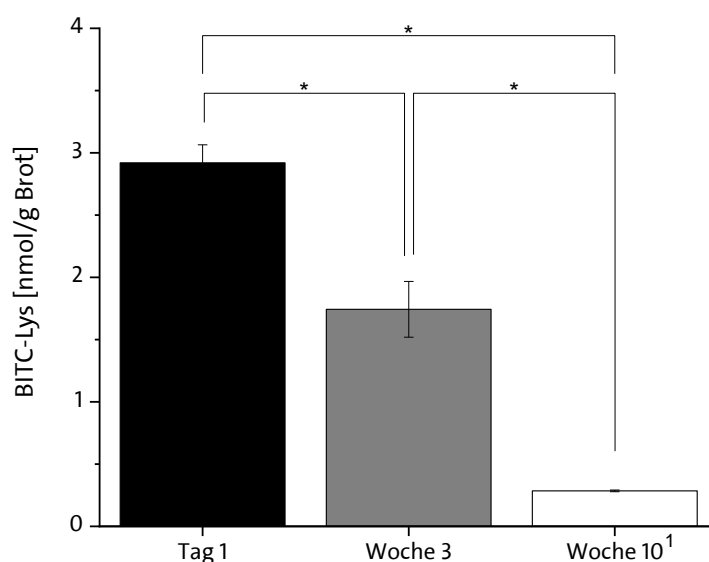


Abbildung 26: Lagerstabilität von Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys) in aufgearbeiteten Probelösungen. Verglichen werden die LC-ESI-MS/MS-Ergebnisse an Tag 1, nach 3 Wochen und nach 10 Wochen. Gezeigt werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von drei Replikaten. Die Asterisken zeigen statistische Unterschiede zwischen den Lagerungszeiträumen ($p \leq 0,05$). ¹Für Woche 10 wurden zwei Replikate für die statistische Analyse verwendet.

5 Diskussion

5.1 Glucosinolatbauprodukte und Proteinkonjugate in Broten angereichert mit Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) und Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.)

Für die Untersuchungen wurde Brot mit Teilen frischer Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) und homogenisierten, gefriergetrockneten und pulverisierten Kapuzinerkresseblättern (*Tropaeolum majus* L.) gebacken und analysiert. Die verschiedenen Kressegerattungen enthielten hauptsächlich das Glucosinolat (GLS) Benzylglucosinolat (BG), das zu Benzylisothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) abgebaut wurde (Kühn et al., 2018a; Mithen, 2001). Diese Ähnlichkeit im Glucosinolatprofil von Kapuzinerkresse und Gartenkresse erlaubt einen Vergleich des Abbauverhaltens in den verschiedenen Pflanzenmaterialien. Hierbei sollte auch der Zerstörungsgrad des Pflanzenmaterials und die möglichen Auswirkungen auf den GLS-Abbau untersucht werden. Dies konnte aufgrund des gleichen Haupt-GLS unabhängig von unterschiedlichen chemischen Strukturen der Glucosinolate und damit unterschiedlichen Abbauraten während der Prozessierung durchgeführt werden (Hanschen et al., 2012b). Aufgrund des unterschiedlichen prozentualen Zusatzes enthielt das Brot mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (Rezeptur 1, 500 nmol BG/g Brot) vor dem Backprozess 2,5-mal mehr BG als das Brot mit frischer Gartenkresse (Rezeptur 2, 200 nmol BG/g Brot).

Der Nachweis eines generell möglichen hitzeinduzierten Abbaus von BG in Pflanzenmaterial wurde anhand eines Modellversuchs durchgeführt, in dem gefriergetrocknete Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) zu siedendem Wasser gegeben wurde. Durch die hohe Temperatur wird die Myrosinase inaktiviert und es kann ein direkter Zusammenhang zwischen dem BG-Abbau und der Hitzeeinwirkung hergestellt werden. Demnach zeigte sich, dass bereits nach 10 min in siedendem Wasser 75% an BG abgebaut wurde und nach einem anschließenden Backvorgang kein BG mehr im Pflanzenmaterial nachweisbar war. Der Hitzeprozess beim Backen eignet sich demnach dazu einen Abbau von Glucosinolaten und die Freisetzung von BITC und BC zu initiieren.

Für einen direkten Vergleich des Abbauverhaltens von BG in der frischen Gartenkresse und der gefriergetrockneten Kapuzinerkresse wurde das Glucosinolatprofil der verwendeten Pflanzenmaterialien vor und nach dem Backprozess untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass in

der homogenisierten gefriergetrockneten Kapuzinerkresse nach dem Backvorgang nahezu kein BG mehr nachweisbar war. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das BG in diesem Material zu fast 100% unter Anderem zu BITC und BC abgebaut wurde. Im Vergleich dazu konnten in der frischen Gartenkresse (Rezeptur 2) nach dem Backen noch 56% des Anfangsgehaltes an BG quantifiziert werden, somit reduzierte sich der Gehalt an BG nur um 44%. Nach den Ergebnissen wurde in Rezeptur 1 etwa 500 nmol BG/g Brotteig und in Rezeptur 2 etwa 90 nmol BG/g Brotteig zu BITC und BC abgebaut. Eine frühere Studie ging davon aus, dass aufgrund einer geringen Zerstörung der Pflanzenmatrix die Glucosinolate länger im Pflanzenmaterial intakt bleiben und somit eine geringere Freisetzung von BITC aus frischem Pflanzenmaterial erfolgt (Klopsch et al., 2019). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern diese Vermutung. Bei dem gefriergetrockneten Material kann das Pflanzengewebe bereits durch die Pulverisierung zerstört sein und die Kompartimentierung, die die Myrosinase von den Glucosinolaten im intakten Pflanzenmaterial trennt ist eventuell aufgehoben. Beim Zusatz des trockenen Materials zum Brotteig kann es daher durch die Feuchtigkeit zu einem enzyminduzierten Abbau der GLS kommen, bevor der Backprozess beginnt. Während des Backvorgangs erfolgt dann ein zusätzlicher hitzeinduzierter Abbau. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu dem intakten Pflanzenmaterial, da in diesem hauptsächlich während des Backprozesses die GLS abgebaut werden, da die Kompartimentierung vorher noch intakt ist und somit vermutlich nur ein geringer Teil enzymatisch abgebaut wird. Das homogene gefriergetrocknete Material in Rezeptur 1 verteilt sich des Weiteren großflächig in dem hergestellten Brotteig, wie an der durchgehend grünen Färbung der Krume zu erkennen ist (Kapitel 4.1.1, Abbildung 6a). Diese Verteilung führt zu einer großen Reaktionsoberfläche und zu einem erleichterten Abbau der GLS. Das intakte Gartenkressematerial verteilt sich hingegen nur punktuell in der Krume und die Reaktionsoberfläche ist somit geringer. Es besteht demnach ein wesentlicher Unterschied im Abbau der GLS aus gefriergetrocknetem homogenisiertem oder frischem intaktem Material, wie durch die vorliegenden Ergebnisse gezeigt werden konnte.

Aufgrund dessen, dass durch das gefriergetrocknete Material in Rezeptur 1 nahezu 500 nmol BG/g Brot zu BITC und BC abgebaut wurden, wurde angenommen, dass ebenfalls mehr Proteinkonjugate in diesem Brot nachweisbar sein werden, da mehr reaktives BITC

vorhanden sein könnte. Die Ergebnisse der LC-ESI-MS/MS-Analyse zeigen jedoch, dass der Gehalt der nachgewiesenen BITC-Lys-Konjugate nahezu identisch ist für beide untersuchten Brote. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der GC-MS-Analyse der Abbauprodukte BITC und BC zeigen sich ebenfalls nur geringe Unterschiede in dem Gehalt an „freien“ BITC für Rezeptur 1 und Rezeptur 2. Im Vergleich dazu zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Gehalt an BC. In dem Brot mit frischer Gartenkresse (Rezeptur 2) konnte 10-mal mehr BC nachgewiesen werden als in dem Brot mit gefriergetrocknetem Kapuzinerkresspulver (Rezeptur 1). Entgegen den Erwartungen ließ sich demnach ein höherer Gehalt an Abbauprodukten in Rezeptur 2 nachweisen, obwohl die Ausgangsmenge an BG geringer war.

Der Unterschied lässt sich ebenfalls durch den unterschiedlichen Zustand des Pflanzenmaterials erklären. Es ist anzunehmen, dass durch die hauptsächliche enzymatische Hydrolyse von BG in Rezeptur 1 mehr BITC gebildet wird als in Rezeptur 2, da ein Myrosinase-induzierter Abbau die Bildung von BITC favorisiert. Durch den bereits vor dem Backvorgang stattfindenden enzyminduzierten Abbau von BG zu BITC in Rezeptur 1 kann das „freie“ BITC durch die anschließende Hitzeeinwirkung des Backvorgangs allerdings weiter abgebaut werden. Je nach ihrer chemischen Struktur können sich ITC in eine Vielzahl weiterer Abbauprodukte zersetzen. Als Beispiel für ein aromatisches ITC zeigte eine Studie mit Phenethylisothiocyanat (PEITC) in wässriger Lösung, dass PEITC thermisch zu Phenethylamin und weiter zu N,N'-Diphenethylthioharnstoff abgebaut werden kann (C.-W. Chen et al., 1998). Durch die Anwendung der Ergebnisse auf BITC könnte der Gehalt an „freiem“ BITC durch einen weiteren Abbau durch die Backtemperatur verringert werden und es steht nur das BITC für Folgereaktionen mit nukleophilen Aminosäureseitenketten zur Verfügung, dass im weiteren Verlauf des Prozesses entsteht.

In dem Brot der Rezeptur 2 mit frischer Gartenkresse wird der Abbau der Glucosinolate hauptsächlich während des Hitzeprozesses während des Backens initiiert. Dadurch wird weniger BITC durch die Hitze weiter abgebaut oder verflüchtigt und das freigesetzte BITC steht für Reaktionen mit Proteinen direkt während des Backvorgangs zur Verfügung. Dementsprechend resultieren vergleichbare Ergebnisse an Proteinkonjugaten in Rezeptur 1 und Rezeptur 2.

Der hauptsächlich hitzeinduzierte Abbau an BG in Rezeptur 2 lässt sich anhand der vermehrten Bildung des hitzestabilen Nitrils zeigen, das in höherer Konzentration im Vergleich zur Rezeptur 1 nachweisbar war (Kapitel 4.1.3, Abbildung 9) (Hanschen et al., 2018). Ausgewählte Studien zeigten, dass eine kurze Hitzeeinwirkung (10 min bei etwa 60 °C) bei Weißkohl (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba* cv. Minicole), Rotkohl (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* cv. Primero) und Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* cv. Kolibri) zu einer erhöhten ITC-Bildung führte. Dies wurde mit der Inaktivierung von Spezifizierungsproteinen, die den enzymatischen Abbau zu Nitrilen und Epithionitrilen fördern erklärt. Im Gegensatz dazu führten längere Hitzeeinwirkungen bis zu 120 min, insbesondere im Bereich von 100 °C, aufgrund des thermischen GLS-Abbaus zu einer verstärkten Nitrilbildung (Hanschen et al., 2018). Der hohe Gehalt an BC in Rezeptur 2 lässt sich demnach mit der Backtemperatur erklären, da im Brot Temperaturen um die 95 °C erreicht und für ca. 30 min gehalten wurden, die den Abbau von BG zu BC, statt BITC, fördern. Darüber hinaus verbleiben die Nitrile aufgrund ihrer Hitzestabilität in der Lebensmittelmatrix und können demnach auch nach dem Backprozess noch in hohen Mengen in Rezeptur 2 nachgewiesen werden (Klopsch et al., 2019). Durch den Abbau von BG in Rezeptur 1 vor Beginn des Backprozesses kann es auch zu einer Verflüchtigung von BITC, aber auch eventuell von BC während des Hitze Prozesses kommen, sodass insgesamt weniger Abbauprodukte in diesem Brot nachweisbar waren. Obwohl der Dampfdruck von BITC bei 25 °C weniger als 1 mm Hg beträgt, kann die Möglichkeit einer Verflüchtigung nicht vollständig ausgeschlossen werden und die Ergebnisse lassen die Vermutung zu (Vaughn et al., 1997). Aufgrund eines weiteren Abbaus des entstandenen BITC und einer möglichen Verflüchtigung lassen sich in Rezeptur 2 in Summe mehr Abbauprodukte nachweisen als in Rezeptur 1.

In den analysierten Broten wurden 0,01% des BG in Rezeptur 1 und 0,02% in Rezeptur 2 in BITC-Lys-Konjugate umgesetzt, was dazu führte das etwa 0,01% Lysin im Protein in beiden Broten modifiziert wurde. In einem von Kühn et al. (2018b) beschriebenen Versuch wurden ITC-Konjugate in Quark versetzt mit Gartenkresse nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten eine höhere Umsetzung von BG zu BITC-Lys Konjugaten von bis zu 2-4% (Kühn et al., 2018b). Thioharnstoffe werden bei einem pH-Wert nahe dem neutralen Bereich bevorzugt gebildet und zeigen eine gute Stabilität, wie von Kühn et al. (2018c) festgestellt werden konnte. Es wurde

daher angenommen, dass in Weizenbrot mit einem pH-Wert von 5,9 mehr Lysinkonjugate nachweisbar sind als in Quark mit einem saureren pH-Wert von 4,5. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden, demnach liegen neben dem pH-Wert noch weitere Einflussfaktoren vor, wie beispielsweise der Zubereitungsprozess. Dieser kann in diesem Fall zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse zwischen dem Experiment von Kühn et al. (2018b) und der vorliegenden Arbeit herangezogen werden. Beim Backen entstehen in der Brotmatrix Temperaturen von bis zu 95 °C über einen Zeitraum von bis zu 30 min (Kapitel 6.2.1, Abbildung 27), was dazu führt dass vermehrt Nitrile gebildet werden oder bereits freies BITC im weiteren Verlauf der Verarbeitung weiter abgebaut wird. Kräuterquark wird hingegen bei Raumtemperatur hergestellt, daher erfolgt der Abbau von BG hauptsächlich enzymatisch, was zu einer vermehrten Bildung von BITC führt im Vergleich zu einem erhitzten Produkt, da kein hitzeinduzierter Abbau erfolgt, der die Bildung von Nitrilen fördern würde. Der BITC Gehalt in den hergestellten Kräuterquark-Proben wurde nicht analysiert, es ist aber davon auszugehen, dass aufgrund der genannten Gründe ein höherer Gehalt an BITC vorliegt als in den hergestellten Broten. Dementsprechend kann die vermehrte Bildung von BITC-Lys-Konjugaten in Quark im Vergleich zu den Broten erläutert werden, da generell mehr reaktives BITC für Folgereaktionen vorhanden war. In einem erhitzten Lebensmittel resultieren demnach weniger Proteinkonjugate als in einem nicht erhitzten Produkt, wodurch auch weniger Auswirkungen auf die Proteinstruktur und -eigenschaften zu erwarten sind. Ein Vergleich zu den Abbauprodukten BITC und BC zwischen einem erhitzten und einem nicht erhitzten Produkt konnte nicht vorgenommen werden, da diese in den angereicherten Proben von Kühn et al. (2018b) nicht untersucht wurden.

5.2 Gehalt an Abbauprodukten und Untersuchung der Bildung von Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Weizenbroten mit unterschiedlichen Pflanzenteilen und Zusatzarten der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.)

Neben dem Einsatz von gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.), ist die Anreicherung von Brot mit frischen Kapuzinerkresseblättern und -blüten interessant. Es wurden daher Brote mit Kapuzinerkresseblättern (KBLÄ 1%, KBLÄ 5%) und mit Kapuzinerkresseblüten (KBLÜ) hergestellt und auf BITC-Konjugate untersucht.

Sowohl in dem Brot mit 1% (KBLÄ 1%), als auch mit dem Zusatz von 5% (KBLÄ 5%) frischen Kapuzinerkresseblättern konnten BITC-Lys-Konjugate nachgewiesen werden. Beim direkten Vergleich der Zusatzmenge von 1% und 5% der frischen Kapuzinerkresseblättern zeigte sich, dass durch den 5-fachen Zusatz von frischer Kapuzinerkresse im Brot ein Anstieg der BITC-Lys-Konjugatbildung um fast das 20-fache erfolgte. Die Ausgangsmenge an BG durch das zugesetzte Pflanzenmaterial zu dem Teig hat demnach Auswirkungen auf den Gehalt an BITC im prozessierten Lebensmittel, was sich anhand des Anstiegs der BITC-Lys-Konjugate zeigt. In einem nicht erhitzten Lebensmittel wurde in einer vorherigen Studie, Quark mit unterschiedlichen Mengen an Gartenkresse (10-50%, *Lepidium sativum* L.) angereichert und ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen dem Gemüsezusatz und der Bildung von ITC-Lys-Konjugaten untersucht. In diesem Experiment zeigte sich, dass mit zunehmendem Ausgangsgehalt des Pflanzenmaterials auch die BITC-Lys-Konjugate vermehrt gebildet wurden. Im Vergleich zwischen einem Zusatz von 10% und 50% Gartenkresse zu Quark erfolgte ein Anstieg der Konjugatbildung um das 10-fache (Kühn et al., 2018b). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen sogar einen deutlich stärkeren Anstieg von gebildeten BITC-Konjugaten mit steigendem Gemüsezusatz. Die Abhängigkeit der Bildung von Proteinkonjugaten von der Ausgangsmenge an BG konnte demnach unabhängig von der Zubereitung nachgewiesen werden, wobei der Anstieg des ITC-Lys Gehaltes in den Proben nach Kühn et al. (2018b) und den vorliegenden Broten nicht proportional zur Ausgangsmenge war.

Zusätzlich können die Brote KBLÄ 1% und KBLÄ 5% mit dem Brot mit frischer Gartenkresse (Rezeptur 2, Zusatz 1,5%) verglichen werden, da der Abbau an BG durch das intakte Pflanzenmaterial ähnlich abläuft. Entsprechend des hauptsächlich intakten Zustands des Pflanzenmaterials ist, wie für die frische Gartenkresse festgestellt wurde (Kapitel 5.1), ebenfalls davon auszugehen, dass BG in den frischen Kapuzinerkresseblättern durch den Backprozess nicht vollständig abgebaut wird. Es könnte allerdings einen Unterschied zwischen der Gartenkresse und den Kapuzinerkresseblättern aufgrund der Pflanzenstruktur geben, die sich auf den Abbau der GLS auswirken könnte. Die Kapuzinerkresseblätter waren größer und hatten eine festere Struktur gegenüber der frischen Gartenkresse, dies könnte in einer weiteren Reduzierung der Abbaurate von BG resultieren. Die Gartenkresse war eher klein und wies eine feine Pflanzenstruktur auf, wodurch die Hitze eventuell schneller die Glucosinolate in dem

Pflanzenmaterial abbauen kann, resultierend in mehr BITC und somit mehr ITC-Konjugaten. Der Glucosinolatgehalt und der Gehalt an den Abbauprodukten BITC und BC nach dem Backen wurden für die Brote, angereichert mit frischen Kapuzinerkresseblättern (KBLÄ 1% und KBLÄ 5%) allerdings nicht untersucht, daher kann hier keine endgültige Aussage getroffen werden. Hingegen kann der Gehalt an BITC-Lys in den unterschiedlichen Broten betrachtet und in einen Zusammenhang gebracht werden.

Der Anfangsgehalt an BG in Rezeptur 2 war 200 nmol BG/g Brot, wohingegen der Gehalt in KBLÄ 1% bei 61 nmol BG/g Brot und in KBLÄ 5% bei 351 nmol BG/g Brot lag. Die Ergebnisse der BITC-Lys-Konjugate in den genannten Broten zeigen ebenfalls eine Abhängigkeit des Gehaltes an BG im Teig unabhängig von der verwendeten Kressegattung. In Rezeptur 2 wurden 3,26 nmol BITC-Lys/g Brot und demnach mehr ITC-Konjugate als in KBLÄ 1% (0,47 nmol BITC-Lys/g Brot) aber weniger als in KBLÄ 5% (8,7 nmol BITC-Lys/g Brot) nachgewiesen. Durch die unterschiedlichen Ausgangsgehalte an BG werden unterschiedliche Gehalte an GLS-Abbauprodukten in den verschiedenen Broten gebildet, resultierend in unterschiedlichen BITC- und daraus folgend BITC-Lys-Gehalte. Im KBLÄ 5% war im Vergleich zu Rezeptur 2 (frische Gartenkresse) der BG-Gehalt fast zweimal so hoch, dadurch konnte auch ein höherer Gehalt an BITC-Lys-Konjugaten nachgewiesen werden, der sich mehr als verdoppelte. In Anbetracht dessen, dass neben den Blättern der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) auch die Blüten zum Verzehr geeignet sind und immer mehr Verwendung finden, wurden neben dem gefriergetrockneten und frischen Material der Blätter auch frische Blüten für eine Anreicherung von Brot eingesetzt.

Im direkten Vergleich der Glucosinolatgehalte der unterschiedlich verwendeten Pflanzenteile der Kapuzinerkresse zeigt sich, dass der Gehalt an BG in den verwendeten frischen Blättern (30,12 $\mu\text{mol/g TM}$) ungefähr doppelt so hoch war wie in den eingesetzten Kapuzinerkresseblüten (16,72 $\mu\text{mol/g TM}$) der gleichen Pflanze. Eine zuvor durchgeführte Studie identifizierte die grünen Blätter von *Tropaeolum majus* als hauptsächliches Pflanzenorgan zur Benzylglucosinolat (BG)-Biosynthese, wodurch der Gehalt an BG in den Blättern im Vergleich zu anderen Pflanzenteilen am höchsten ist. Die Ergebnisse des BG-Gehaltes in den Blüten zeigten, dass der Gehalt ungefähr halb so hoch war wie in den Blättern. Der geringere Gehalt in den Blüten ist dadurch zu erklären, dass weniger

Abwehrstoffe in den Blüten gebildet werden um Fressfeinde abzuwehren (Lykkesfeldt et al., 1993). Die vorliegenden Ergebnisse des BG-Gehaltes in den verwendeten Pflanzenteilen ist daher mit der Literatur konsistent.

Werden die Ergebnisse des BITC-Lys Gehaltes mit den anderen Broten in Bezug gesetzt, zeigt sich, dass im Vergleich des KBLÜ mit Rezeptur 1, in der gefriergetrockneten Kapuzinerkresse verwendet wurde, die ITC-Konjugation in beiden Broten in einem ähnlichen Bereich lag. In Rezeptur 1 war die zugesetzte Menge an BG (500 nmol/g Brot) aus dem Pflanzenmaterial allerdings 7,5-mal höher, wodurch auch eine höhere Menge an Proteinkonjugaten im Endprodukt erwartet wurde. Dieses Ergebnis kann, wie unter Kapitel 5.1 bereits erläutert, durch den unterschiedlichen Zerstörungsgrad des eingesetzten Pflanzenmaterials erläutert werden. In dem eingesetzten intakten Kapuzinerkresseblüten wird vermutlich erst durch den Hitzeprozess der Abbau der Glucosinolate initiiert, da das Pflanzenmaterial und somit die Zellkompartimentierung noch intakt ist, was einen Myrosinase-induzierten Abbau verhindert. Im Gegensatz dazu erfolgt der Abbau in dem gefriergetrockneten Kapuzinerkressematerial vor dem Backen bereits zum Teil enzymatisch durch die Aufhebung der Zellkompartimentierung beim Homogenisieren und den Kontakt des Pflanzenmaterials mit dem feuchten Teig, der die Myrosinase reaktiviert (Krell et al., 2021). Auch in Bezug auf den BC-Gehalt, lässt sich feststellen, dass mehr BC in KBLÜ nachweisbar ist als in Rezeptur 1, wohingegen der „freie“ BITC-Gehalt vergleichbar ist. Dies deutet auf einen vermehrten hitzeinduzierten Abbau der Glucosinolate in KBLÜ hin, da mehr hitzestabile Nitrile und weniger BITC gebildet werden (Hanschen et al., 2018). Dieses Abbauverhalten ist vergleichbar mit dem Abbau in Rezeptur 2, in der Brot mit frischer intakter Gartenkresse angereichert wurde. In Rezeptur 2 wurde allerdings im Vergleich zum KBLÜ nahezu doppelt so viel BC nachgewiesen. Dies könnte in diesem Fall anhand der Ausgangskonzentration des BG erläutert werden, der bei Rezeptur 2 (200 nmol/g Brot) mehr als 3-mal höher war als in KBLÜ (67 nmol/g Teig). In beiden Broten erfolgte der Abbau ähnlich, da es sich jeweils um nahezu intaktes Pflanzenmaterial mit feiner Pflanzenstruktur handelte. Der hitzeinduzierte Abbau resultierte in der bevorzugten Bildung von BC, wobei der Endgehalt in diesem Fall von der Ausgangskonzentration an BG abhängig war. Die Ergebnisse des BITC-Gehaltes und der BITC-Lys-Konjugate in KBLÜ und Rezeptur 2, sind vergleichbar, was

darauf zurückzuführen ist, dass der Abbau durch den Hitzeprozess generell zu BC verschoben ist (Hanschen et al., 2018).

Ein Unterschied in der Proteinkonjugatbildung zeigte sich zwischen dem Kapuzinerkresseblütenbrot (KBLÜ) und dem Brot mit 1% frischen Kapuzinerkresseblättern (KBLÄ 1%), obwohl in beiden Broten der Zusatz als intaktes Pflanzenmaterial erfolgte und eine ähnliche Ausgangsmenge an BG in beiden Teigen (KBLÜ: 67 nmol/g Teig; KBLÄ 1%: 61 nmol/g Teig) vorhanden war. In dem Blütenbrot KBLÜ wurden 6-mal mehr Konjugate gebildet als in KBLÄ 1%. In diesem Fall könnte der Unterschied, wie beim Vergleich zwischen frischen Kapuzinerkresseblättern und frischer Gartenkresse, durch die Struktur des Pflanzenmaterials erklärt werden. Während die Blattstruktur von Kapuzinerkresse eher fest ist, sind Blüten weich und haben eine feine Zellstruktur. Dementsprechend könnte es zu einem vermehrten Abbau der Glucosinolate in den Blüten kommen, da die Hitze die Zellstruktur schneller zerstören kann und BC und BITC in einem früheren Stadium des Backprozesses gebildet werden. Dadurch könnte in dem KBLÜ mehr BITC für Folgereaktionen zur Verfügung stehen, resultierend in mehr Reaktionsprodukten. In den Broten angereichert mit frischen Kapuzinerkresseblättern ist keine Analyse der BG-Abbauprodukte erfolgt, daher kann hierzu keine abschließende Aussage getroffen werden.

Insgesamt zeigte sich durch den Einsatz der unterschiedlichen Pflanzenteile, dass unabhängig des eingesetzten Pflanzenmaterials in Kapuzinerkresse-angereicherten Broten immer ITC-Proteinkonjugate gebildet werden.

5.3 Bildung und Stabilität von Glucosinolatabbauprodukten und Isothiocyanat-Proteinkonjugate in unterschiedlichen Brottypen mit Kapuzinerkressezusatz (*Tropaeolum majus* L.)

Für die Untersuchung wurden verschiedene Brotsorten wie Weizenvollkornbrot (WVK), Roggenvollkornbrot (RVK), Dinkelbrot (DMB), Kichererbsenmehlbrot (KEMB) und Weizen-Sodabrot (WSB) ausgewählt. Alle Teige und Brote wurden auf die gleiche Weise zubereitet, mit Ausnahme des WSB, das direkt nach Zugabe des Pflanzenmaterials gebacken wurde.

Die quantitativen Ergebnisse der ITC-Konjugate und Abbauprodukte BITC und BC zeigten, dass WSB (pH 7,2) im Vergleich zu den anderen Brotsorten den höchsten BITC-Lys-Konjugatgehalt (Kapitel 4.5.3, Abbildung 18) und den niedrigsten "freien" ITC-Gehalt (Kapitel 4.5.2, Abbildung 17) aufwies. Die erhöhte BITC-Lys-Bildung könnte auf den pH-Wert von 7,2 im Vergleich zu den anderen Brotsorten mit saureren pH-Werten zurückzuführen sein. Die neutralen bis basischen Bedingungen begünstigen die Bildung von Thioharnstoffderivaten, da ein höherer pH-Wert die Reaktivität mit Aminogruppen erleichtert, wie in unterschiedlichen Studien nachgewiesen werden konnte. Kinetische Messungen in Modellsystemen mit Peptiden zeigten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit für die Bildung von ITC-Aminosäurekonjugaten mit höheren Hydroxidkonzentrationen zunahm. In einem weiteren Modellsystem konnten des Weiteren bei pH 5 und Raumtemperatur keine Reaktionsprodukte nachgewiesen werden, wohingegen bei pH 7,3 eine Konjugatbildung erfolgte (Cejpek et al., 2000; Drobnica et al., 1977; Hanschen et al., 2012a). Demnach hat der pH-Wert des Teiges nicht nur einen eventuellen Einfluss auf die Bildung von BITC, sondern auch auf die Reaktivität der nukleophilen Gruppen der Aminosäureseitenketten.

Der hohe BITC-Lys-Gehalt im WSB korreliert mit dem niedrigen BITC-Gehalt in diesem Brot, was darauf hindeutet, dass vor und während des Backvorgangs mehr Folgereaktionen mit den Aminogruppen stattfanden als in den anderen Brotsorten. Dementsprechend weisen niedrige BITC- und hohe BITC-Lys-Gehalte auf eine erhöhte Reaktivität bei pH 7,2 hin, was zu einer erhöhten ITC-Konjugatbildung bei diesem pH-Wert führte (Cejpek et al., 2000).

Die nächsthöhere Konzentration von BITC und BITC-Lys wurde in WVK mit einem pH-Wert von 5,7 analysiert. In einer Studie wurde *in vitro* festgestellt, dass in behaarten Wurzelkulturen von Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) bei einem pH-Wert von 5,5 der Anteil von BITC an den BG-Abbauprodukten mehr als 50% an den Gesamtabbauprodukten betrug. Dies wurde mit der Myrosinaseaktivität erklärt, die bei einem pH-Wert von 5,5 optimal ist (Wielanek et al., 2004). Bei niedrigeren pH-Werten verschiebt sich das Verhältnis der Abbauprodukte jedoch in Richtung des entsprechenden Nitrils (Agerbirk et al., 1998; Uda et al., 1986). Diese Befunde könnten erklären, warum der BITC-Gehalt in WVK im Vergleich zu RVK (pH 4,5) um das Fünffache höher war. Es ist möglich, dass der niedrige pH-Wert von RVK die Bildung von BITC verminderte und zu einer stärkeren Nitrilbildung und damit zu weniger BITC führte,

resultierend in einer geringen Menge an BITC-Aminosäurekonjugaten. Aufgrund der höheren Menge an BITC im WVK wurden daher ebenfalls mehr BITC-Lys-Konjugate in diesem Brot gebildet, wohingegen im RVK der BITC-Lys-Gehalt zweimal niedriger war. Dies deutet darauf hin, dass der höhere BITC-Gehalt zu einer verstärkten Reaktion mit Aminogruppen führte, da mehr Edukte für eine Konjugatbildung vorhanden waren.

Beim Vergleich von WVK (pH 5,7) mit den anderen Brotsorten wurden in der Krume von DMB (pH 6,5) und KEMB (pH 6,0) weniger BITC und BITC-Konjugate nachgewiesen, obwohl der pH-Wert in diesen Broten höher war als im WVK. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass ein hoher pH-Wert in der Umgebung des Pflanzenmaterials die ITC-Bildung während des Glucosinolatabbaus fördert (Agerbirk et al., 1998; Hanschen et al., 2017a; Uda et al., 1986). Auf dieser Grundlage wurde angenommen, dass die Konzentration von BITC und BITC-Reaktionsprodukten in DMB und KEMB höher ist als in WVK. In WVK wurde allerdings zwei- bis dreimal mehr BITC gebildet als in den beiden anderen Broten. Dieser Unterschied in der BITC-Konzentration wirkt sich auch auf die Bildung der ITC-Konjugate aus. In DMB konnten nur 3,4 nmol BITC-Lys/g Brot nachgewiesen werden, und damit viermal weniger als in WVK. Am deutlichsten war der Unterschied jedoch zum KEMB, wo eine 50-fach niedrigere Konzentration von BITC-Lys im Vergleich zum WVK analysiert wurde. Die pH-Werte der Teige von DMB (6,5) und KEMB (6,0) könnten demnach im Vergleich zum WVK (pH 5,7) noch zu niedrig sein, um eine signifikante Veränderung des Abbaus von GLS in Richtung ITC-Bildung und eine erhöhte Reaktionsbereitschaft zwischen ITC und Aminogruppen, wie bei WSB (pH 7,2) beobachtet, zu erreichen. Des Weiteren wurde eine optimale Myrosinaseaktivität bei dem pH-Wert von 5,5 für behaarte Wurzelkulturen von Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) festgestellt, die höheren pH-Werte könnten demnach die Aktivität der Myrosinase verringern, was sich ebenfalls auf den BITC-Gehalt im Brot auswirken könnte (Wielanek et al., 2004).

Die pH-Wert-Differenz zwischen den Broten kann zur Erläuterung der unterschiedlichen BITC-Gehalte in WVK, DMB und KEMB genutzt werden, allerdings scheint es in Bezug auf die hohe Differenz der ITC-Konjugation in WVK und KEMB weitere Einflussfaktoren zu geben. Der „freie“ BITC-Gehalt in KEMB ist halb so hoch wie im WVK, daher kann davon ausgegangen werden, dass eventuell eine geringere ITC-Konjugation erfolgte. Diese liegt allerdings im KEMB 50-mal niedriger als im WVK und ist daher nicht mit der Differenz des „freien“ BITC-Gehaltes

vergleichbar. Aufgrund der hohen Differenz kann davon ausgegangen werden, dass neben dem pH-Wert weitere Faktoren aufgrund der Verwendung von unterschiedlichen Mehlen und Backtriebmitteln relevant sein könnten.

Dazu zählt beispielsweise der Proteingehalt der Brote und die damit verbundene Aminosäurezusammensetzung. Unter Berücksichtigung des Proteingehalts kann der Unterschied zwischen WVK und KEMB in dem Gehalt der Aminosäurekonjugate diskutiert werden. Während WVK einen Proteingehalt von circa 6,9% aufwies, hatte KEMB einen Proteingehalt von etwa 10,5%. Gleichzeitig ist der Lysingehalt in Weizenmehl geringer als im Kichererbsenmehl, was darin resultiert, dass in WVK 10,9 μmol Lysin/g Brot vorhanden sind und das KEMB 37,7 μmol Lysin/g Brot aufweist. Diese Unterschiede können einen Einfluss auf die Gesamtkonzentration der BITC-Aminosäurekonjugate in den Broten haben. Durch einen hohen Protein- und Lysingehalt ist der Anteil an gebildeten BITC-Lys-Konjugaten am Gesamtprotein geringer, wodurch auch der geringere Gehalt an BITC-Lys in KEMB im Vergleich zu WVK unabhängig vom pH-Wert erklärt werden könnte. Zusätzlich wird die Bildung von Reaktionsprodukten zwischen Lysin und BITC durch die Ausgangskonzentration von Benzylglucosinolat im Teig und dessen Abbau zu BITC und BC begrenzt. In beiden Broten wurde die gleiche Menge an BG durch die definierte Menge an Pflanzenmaterial zugesetzt, durch den höheren Gehalt an Lysin im KEMB können allerdings insgesamt weniger freie Aminogruppen mit dem gebildeten ITC interagieren, da mehr Lysin als freies ITC vorhanden ist, was in weniger ITC-Konjugaten im Gesamtprotein resultiert. Es kann demnach in dieser Untersuchung durch die unterschiedlichen Brotsorten kein direkter Zusammenhang zwischen der Bildung von BITC, BC und BITC-Konjugaten mit dem pH-Wert der Brote hergestellt werden.

Werden die Abbauprodukte aller Brotsorten (WVK, RVK, DMB, KEMB, WSB) betrachtet, so wurde in allen Brottypen generell mehr BITC als BC analysiert. In Anbetracht des Hitzeprozesses wurde hingegen ein höherer Nitrilgehalt erwartet, da ein Hitzeeinfluss von glucosinolathaltigen Gemüse über einen längeren Zeitraum zu der vermehrten Bildung von hitzestabilen Nitrilen führt (Hanschen et al., 2012a; Krell et al., 2021). Dies wurde bereits für die unterschiedlichen Brote mit unterschiedlichen Applikationsformen in dieser Arbeit gezeigt. In den Broten WVK, RVK, DMB, KEMB und WSB wurde wie in Rezeptur 1 gefriergetrocknetes Kapuzinerkressematerial eingesetzt. Bisher wurde, wie beispielsweise in Rezeptur 1 ein höherer

BC-Gehalt im Vergleich zum BITC (Kapitel 5.1) nachgewiesen, in dem aktuellen Experiment zeigen sich allerdings gegenteilige Ergebnisse.

Durch die anteilige Zugabe der Kapuzinerkresse ergaben sich unterschiedliche BG-Gehalte in den Broten, so dass Rezeptur 1 circa 500 nmol BG/g Brot enthielt und in den anderen Brottypen (WVK, RVK, KEMB, DMB, WSB) rund 850 nmol BG/g zugesetzt waren. Diese verschiedenen Faktoren könnten einen Einfluss auf den möglichen Abbau während der Prozessierung und damit auf die Konzentration von BITC und BC haben. Während der BC-Gehalt in den diversen Brottypen (WVK, RVK, KEMB, DMB, WSB) doppelt so hoch war wie in Rezeptur 1, war der BITC-Gehalt beispielsweise in WVK um mehr als das Zehnfache höher als in Rezeptur 1. Auch die Brotstruktur könnte für den Unterschied von Bedeutung sein, da die unterschiedlichen Brottypen eine festere Konsistenz aufwiesen als das Brot der Rezeptur 1, wodurch eine Verflüchtigung von BITC und BC während des Backens verringert werden könnte. Hierzu sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

Neben der generellen Bildung von BITC, BC und Konjugaten in Abhängigkeit des pH-Wertes in den unterschiedlichen Brotsorten WVK, RVK, KEMB, DMB und WSB wurde die Stabilität der Verbindungen über einen Zeitraum von insgesamt fünf Tagen betrachtet.

Während der Lagerung wies der BITC-Lys-Gehalt in den verschiedenen Brotsorten über die fünf untersuchten Tage keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) auf, was darauf hindeutet, dass die Konjugate während dieses Zeitraums weitgehend stabil waren. Nur in dem WVK konnte ein Trend in der Abnahme des BITC-Lys-Gehaltes identifiziert werden, wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Tagen vorlagen. In bereits durchgeführten Experimenten mit BITC-Lys, konnte in Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten ein Rückgang von 10% der Konzentration in 48 Stunden beobachtet werden (Kühn et al., 2018c). Nach den aktuellen Ergebnissen scheinen die ITC-Lys-Konjugate auch länger als 48 h in der Brotmatrix stabil zu sein. Dadurch, dass WVK leicht andere Ergebnisse zeigt, könnte auch in diesem Fall die Brotstruktur, und damit die Lebensmittelmatrix einen Einfluss auf die Stabilität der Konjugate haben. Dieses Ergebnis kann jedoch noch nicht direkt mit einem einzelnen Einflussfaktor in Verbindung gebracht werden und muss zukünftig untersucht werden.

Bei Betrachtung der Abbauprodukte war BC über den fünftägigen Lagerungszeitraum stabil, während BITC in DMB vom ersten bis zum dritten Tag signifikant ($p \leq 0,05$) abnahm. Die beiden

untersuchten Abbauprodukte BC und BITC sind in der Lebensmittelmatrix nicht gebunden und könnten sich während der Lagerung verflüchtigen, mit anderen nukleophilen Verbindungen reagieren oder durch Hydrolyse abgebaut werden. Eine Zersetzung von ITC wurde bereits in Studien zur Untersuchung von ITC in Modellsystemen nachgewiesen. So wurde beispielsweise festgestellt, dass der ITC-Gehalt durch Hydrolyse in wässrigen Systemen verringert wird (Kawakishi et al., 1966; Kawakishi et al., 1969). Der Gehalt an BITC in DMB kann sich daher durch den Wassergehalt des Brotes und eine mögliche Hydrolyse während der Lagerung reduzieren. Allerdings wiesen alle Brote einen ähnlichen Wassergehalt auf, was darauf hindeutet, dass der Unterschied auf die Brotstruktur zurückzuführen sein könnte. DMB wies im Vergleich zu den anderen Broten nach fünf Tagen Lagerung noch die feuchteste Krume auf, daher könnte eine Hydrolyse zu der Abnahme von BITC führen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Abbauprodukte, dass BC in der Brotmatrix generell stabiler ist als BITC.

5.4 Bildung und Stabilität von Benzylglucosinolatbauprodukten und Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Modellbrot mit spezifischen pH-Werten und Kapuzinerkressezusatz (*Tropaeolum majus* L.)

Um den möglichen Einfluss anderer Parameter als den des pH-Wertes zu verringern, wurden Brote aus Weizenmehl ohne Backtriebmittel und mit bestimmten pH-Werten hergestellt. In diesem Modellexperiment wurde die höchste Menge an BITC-Lys in dem Brot mit einem pH-Wert von pH 7,3 nachgewiesen, dies ist vergleichbar mit dem WSB (pH 7,2; Kapitel 4.6.2, Abbildung 20). Auch hierbei ist die höhere Reaktivität der Aminogruppe bei dem nahezu neutralen pH-Wert für die vermehrte Bildung an ITC-Konjugaten im Vergleich zu den anderen Modellbrot mit niedrigeren pH-Werten verantwortlich (Drobnica et al., 1977). Wohingegen bei höheren pH-Werten keine weitere Zunahme an ITC-Konjugaten zu verzeichnen war, obwohl ein basischer pH-Wert sowohl die Reaktivität der nukleophilen Gruppen als auch die Bildung von ITC als Abbauprodukt der GLS fördert (Hanschen et al., 2012a). Die Ergebnisse der BITC-Lys-Konjugate der unterschiedlichen Modellbrote zeigen nur einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den Broten mit einem pH-Wert von 7,3 und pH 5. Diese Beobachtung bedeutet, dass die Ergebnisse des pH-Experiments die Hypothese des pH-Einflusses auf die Konjugatbildung nur bedingt unterstützen. Darüber hinaus zeigten die

pH-Experimente, dass der Gehalt an Glucosinolatabbauprodukten nur bei sehr sauren pH-Werten (pH 3,4) beeinflusst wird. Hinsichtlich des Gehaltes an Abbauprodukten in dem Brot mit einem pH-Wert von 3,4 wurde festgestellt, dass fast 50-mal mehr BC gebildet wurde im Vergleich zu den anderen Modellbroten mit höheren pH-Werten (Kapitel 4.61, Abbildung 19). Dies könnte durch die Blockierung der LOSSEN-Umlagerung bei niedrigen pH-Werten erklärt werden. Die Umlagerung zu ITC wird bei einem solch niedrigen pH-Wert von 3,4 gehemmt, da das während des Abbauprozesses enzymatisch gebildete Aglycon durch ein Proton für die weitere Reaktion blockiert wird (Kapitel 2.2.3). Dieser Effekt tritt bei den höheren pH-Werten und daher in den weiteren Modellbroten nicht auf (Gil et al., 1980; Uda et al., 1986). Im Gegensatz zu diesen niedrigen pH-Wert zeigen die Ergebnisse von BITC und BC nur geringe Unterschiede zwischen den anderen Modellbroten. Es ist festzustellen, dass generell in allen Modellbroten mehr BC als BITC gebildet wurde, was auf den Hitzeprozess während des Backens zurückzuführen ist und mit den Ergebnissen der Rezeptur 1, in der ebenfalls Weizenbrot mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse angereichert wurde, konsistent ist. Der BITC-Gehalt ist des Weiteren in allen Modellbroten unabhängig vom pH-Wert sehr ähnlich, daher konnte keine direkte pH-Abhängigkeit des BITC-Gehaltes im Endprodukt festgestellt werden.

Generell ist nach den Ergebnissen des Modellversuchs festzuhalten, dass Lebensmittel mit einem sehr sauren pH-Wert nicht für eine Anreicherung mit Glucosinolat-reichem Gemüse verwendet werden sollten, um einen gesundheitsfördernden Effekt durch ITC zu erreichen. Insgesamt werden allerdings unabhängig von den pH-Werten in allen Broten ITC-Konjugate gebildet, wobei eine pH-Abhängigkeit eher als gering eingeschätzt werden kann, da die Ergebnisse von BITC und der BITC-Lys-Konjugate vergleichbar sind. Der Hitzeprozess beim Backen könnte demnach einen stärkeren Einfluss auf die Bildung der Abbauprodukte und Konjugate haben als der pH-Wert in den hergestellten Teigen.

5.5 Analyse der Glucosinolatabbauprodukte vor und nach dem Backprozess

Um den direkten Einfluss des Backprozesses auf den Glucosinolatabbau und die entstehenden Glucosinolatabbauprodukte zu untersuchen wurden Proben von Modellbroten vor und nach dem Backprozess entnommen und mittels GC-MS analysiert. Zusätzlich zu einem Brot, das mit

gefriergetrocknetem Kapuzinerkressepulver (*Tropaeolum majus* L.) hergestellt wurde, wurde eine für fünf Minuten inkubierte Kapuzinerkresse-Suspension zur Teigherstellung verwendet. Beim Vergleich der Abbauprodukte BITC und BC vor und nach dem Backprozess zeigte sich, dass sowohl trockene als auch suspendierte Kapuzinerkresse zu hohen Gehalten an BITC im ungebackenen Teig (unprozessiert) führte, während BC nur in geringen Mengen mit unter 1% der Abbauprodukte, gebildet wurde. Bevor der Backprozess startet, werden demnach die vorhandenen Glucosinolate bereits von der pflanzeigenen Myrosinase hydrolysiert, wobei vorzugsweise BITC gebildet wird. In einer früheren Studie machte die ITC-Bildung in Kapuzinerkresse mehr als 99% der GLS-Hydrolyseprodukte aus, was wahrscheinlich auf das Fehlen von Spezifiziererproteinen, wie dem Epithiospezifiziererprotein, zurückzuführen ist und den hohen Gehalt an BITC im Teig erklärt (Kühn et al., 2018a).

Die Verwendung einer Kapuzinerkresse-Suspension zur Herstellung eines Teiges führte darüber hinaus zu signifikant ($p \leq 0,05$) mehr BITC im Vergleich zu dem Teig mit dem trockenen Material. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Myrosinase bereits in der wässrigen Kresse-Suspension aktiv sein könnte und die Glucosinolate abgebaut werden, bevor diese dem Weizenmehl zugesetzt wurde. Hauptsächlich liegt dies vermutlich daran, dass die Myrosinase im gefriergetrockneten Material inaktiviert ist und eine Reaktivierung des Enzyms bei Kontakt mit Feuchtigkeit erfolgt. Daher wird die Myrosinase bei Verwendung des trockenen Materials erst reaktiviert, wenn die Kapuzinerkresse mit dem feuchten Teig in Kontakt kommt und somit zu einem späteren Zeitpunkt im Vergleich zu der suspendierten Kresse. Die vorherige Inkubation des Pflanzenmaterials in Wasser führte demnach zu einer erhöhten Bildung von BITC im Teig, bevor dieser gebacken wurde.

Nach dem Backprozess hingegen zeigt sich, dass die Hitze das Verhältnis der Abbauprodukte in dem Endprodukt erheblich beeinflusste. Während des Backens wird die Myrosinase durch die Hitze inaktiviert und die verbliebenden Glucosinolate hitzeinduziert abgebaut, was den Abbau der GLS zu der vermehrten Bildung von Nitrilen verschiebt (Hanschen et al., 2018). Dies lässt sich anhand des dreifach höheren Nitrilgehaltes im gebackenen Produkt im Vergleich zum Teig vor dem Backen erkennen. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Exposition von Glucosinolaten gegenüber längerer Hitze (120 min, 100 °C) zu einer erhöhten Nitrilbildung aufgrund des thermischen Abbaus von GLS führt (Hanschen et al., 2018). Dies trifft auch auf die

Backtemperatur zu, durch die im Brot Temperaturen um die 100°C erreicht werden, die zu einer Bildung und Anreicherung von BC in der Brotmatrix führte und die BITC-Bildung verringert hat. Im Vergleich zu BC nahm der BITC-Gehalt nach dem Backen stark ab, von durchschnittlich 400 nmol BITC/g Teig in beiden analysierten Broten vor der Hitzeeinwirkung waren im Endprodukt nur noch 1-2% BITC der Anfangsmenge nachweisbar, was auf einen weiteren Abbau des BITC oder eine Verflüchtigung während des Backvorgangs hindeutet. In einem Experiment wurde gezeigt, dass der BITC-Gehalt in einer auf 90 °C erhitzten wässrigen Lösung nach etwa 15 min bereits um 50% und nach 60 min um 80% reduziert war (De Nicola et al., 2013). In den Broten wurde ein noch stärkerer Rückgang des BITC-Gehalts beobachtet, der bei 98% lag. Dies könnte auf einen Einfluss der Lebensmittelmatrix und des Prozesses hindeuten. Eine mögliche Verflüchtigung des BITC wird, wie in Kapitel 5.1 erläutert, als gering eingeschätzt, da der Dampfdruck von BITC bei 25 °C weniger als 1 mm Hg beträgt, die Möglichkeit kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden (Vaughn et al., 1997). Demnach scheint es hauptsächlich zu einer weiteren Zersetzung des BITC zu kommen, die dazu führt, dass im Endprodukt kaum noch freies BITC nachweisbar war.

Insgesamt führt die Verwendung einer Kresse-Suspension zu einem erhöhten BITC-Gehalt im Teig, aber nicht im fertig gebackenen Brot. Der Hitzeprozess hat somit einen deutlichen Einfluss auf den Endgehalt an BITC, in dem dieser stark reduziert wird, während der ebenfalls untersuchte pH-Wert nur eine untergeordnete Rolle hat. In dieser Untersuchung wurden nur die BG-Abbauprodukte untersucht. Es kann allerdings, durch die bisher angeführten Ergebnisse und dem Vergleich mit einer früheren Studie mit einem nicht erhitzten Produkt (Quark angereichert mit Gartenkresse), davon ausgegangen werden, dass eventuell auch bereits vor dem Backprozess ITC-Konjugate gebildet werden, aufgrund des hohen Gehaltes an BITC. Die Hitze bei der Prozessierung kann auch einen Einfluss auf die ITC-Konjugatbildung haben, dies sollte in Zukunft detaillierter betrachtet werden (Krell et al., 2021; Kühn et al., 2018b).

5.6 Migration von Benzylcyanid und Benzylisothiocyanat und die Bildung von Isothiocyanat-Proteinkonjugaten in Brot mit den Kressesorten *Lepidium sativum* L. und *Tropaeolum majus* L.

Um nicht nur die Bildung von ITC-Proteinkonjugaten, sondern auch die Migration von BG, BC, BITC und möglichen Reaktionsprodukten zu verstehen, wurden weitere Brote mit zentral platzierter gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L., Rezeptur 3) und frischer Gartenkresse (*Lepidium sativum* L., Rezeptur 4) hergestellt. Anschließend wurde die Krume in drei Fraktionen aufgeteilt, wobei die Kernfraktion die Fraktion beschreibt, die direkt mit dem Pflanzenmaterial im Kontakt war, mit steigendem Abstand folgten die mittlere und die äußere Fraktion.

In allen drei Fraktionen (Kernfraktion, mittlere Fraktion, äußere Fraktion) der Brotkrume konnten sowohl die Abbauprodukte BITC und BC, nachgewiesen werden. Demnach konnte gezeigt werden, dass in den Broten mit mittig platziertem intaktem beziehungsweise homogenisierten Pflanzenmaterial reaktives BITC bis in die äußere Fraktion migrierte. In Rezeptur 3 (mit Kapuzinerkresspulver) waren ebenfalls BITC-Lys-Konjugate in der äußeren Fraktion nachweisbar, wohingegen in Rezeptur 4 (mit frischer intakte Gartenkresse) keine ITC-Konjugate in derselben Fraktion quantifiziert werden konnten, obwohl im Gegensatz zu Rezeptur 3 noch „freies“ BITC nachweisbar war. Generell wurde in allen Fraktionen ein höherer Gehalt an BITC-Lys-Konjugaten in Rezeptur 3 als in Rezeptur 4 bestimmt. Dies könnte auf einen Unterschied in der Abbaukinetik von BG in den mittig applizierten Pflanzenmaterialien hinweisen. Durch die Gefriertrocknung und die Homogenisierung des Materials in Rezeptur 3 sind, wie bereits unter Kapitel 5.1 beschrieben, die Zellen zerstört und die Myrosinase kann durch die Feuchtigkeit des Teiges reaktiviert werden und BG vor dem Backprozess Myrosinase-induziert abbauen. Zusätzlich kann ein schnellerer hitzeinduzierter Abbau der Glucosinolate erfolgen, da die Hitze direkt auf eine große Oberfläche einwirken kann im Gegensatz zu einer Hitzeeinwirkung auf intaktes Material. Demnach wurde in Rezeptur 3 BITC eventuell schneller freigesetzt, dass in einem früheren Stadium des Backprozesses in die Lebensmittelmatrix migrierte und mehr Reaktionsprodukte mit Lysin bilden konnte, wodurch mehr BITC-Lys-Konjugate auch entfernt vom Pflanzenmaterial resultierten. In dem intakten

Pflanzenmaterial werden die Glucosinolate weiterhin hauptsächlich hitzeinduziert zu BITC und BC abgebaut. Der Abbau beginnt im späteren Verlauf des Backprozesses, wodurch auch die Migration und die resultierenden Reaktionen verzögert stattfinden. Dementsprechend lassen sich in Rezeptur 3 (gefriergetrocknete Kapuzinerkresse) in der mittleren und äußeren Fraktion kein „freies“ BITC, aber Lysin-Konjugate nachweisen, wohingegen in Rezeptur 4 (frische Gartenkresse) in der äußeren Fraktion keine Konjugate, aber noch freies BITC nachweisbar war. Insgesamt zeigte die Analyse von BC, dass dieses einen signifikant ($p \leq 0,05$) höheren Gehalt als BITC von der Kernfraktion bis zur äußeren Fraktion in beiden Broten aufwies. Der Ausgangsgehalt an BG in Rezeptur 4 mit frischer Gartenkresse war doppelt so hoch wie in dem gefriergetrockneten Kapuzinerkresspulver der Rezeptur 3, trotzdem lag der Gehalt an BC in der Kernfraktion des intakten Gartenkressematerials nur 6% höher. Dies kann anhand des verminderten Abbaus von BG in intakten Pflanzenmaterial im Gegensatz zu Gefriergetrockneten erklärt werden. Insgesamt wurden allerdings mehr Abbauprodukte in Rezeptur 4 mit frischem Pflanzenmaterial als in Rezeptur 3 mit gefriergetrocknetem Material detektiert, was wie in Kapitel 5.1 erläutert an dem Zustand des Pflanzenmaterials liegen könnte. Im Vergleich zur homogenen Verteilung des Pflanzenmaterials in Rezeptur 1 (gefriergetrocknete Kapuzinerkresse) und Rezeptur 2 (frische Gartenkresse), könnte es ebenfalls einen Unterschied zur mittigen Platzierung des gleichen Materials in Rezeptur 3 (gefriergetrocknete Kapuzinerkresse) und Rezeptur 4 (frische Gartenkresse) im Abbau von BG geben. Während BG bei Rezeptur 1 aufgrund der homogenen Verteilung im Teig hauptsächlich enzymatisch abgebaut wird, könnte das BG in Rezeptur 3 durch die punktuelle Zugabe als Bolus, vermehrt durch die Hitze während des Backvorgangs abgebaut werden, da nicht das gesamte Material mit der Feuchtigkeit des Brotteigs in Kontakt kommt. Dadurch wurde in Rezeptur 3 vermutlich mehr BC gebildet als in Rezeptur 1, da durch einen hitzeinduzierten Abbau das hitzestabile Nitril bevorzugt aus BG gebildet wird und in der Matrix verbleibt (Hanschen et al., 2018).

Insgesamt wurden in Rezeptur 3 und Rezeptur 4 weniger ITC-Lys-Konjugate gebildet als in Rezeptur 1 und Rezeptur 2. Dies könnte mit der Verteilung des Pflanzenmaterials zusammenhängen, da bei den homogenverteilten Materialien in Rezeptur 1 und Rezeptur 2

eine größere Reaktionsoberfläche während des gesamten Herstellungsprozesses des Brotes vorhanden ist als in Rezeptur 3 und 4.

Gleichzeitig war der Gehalt an BC in den Broten mit mittiger Applikation (Rezeptur 3 und Rezeptur 4) signifikant ($p \leq 0,05$) höher als bei den Broten mit homogenverteiltem Material (Rezeptur 1 und Rezeptur 2). Demnach scheint auch hier ein vermehrt hitzeinduzierter Abbau vor allem im Vergleich von Rezeptur 1 zu Rezeptur 3 mit gefriergetrocknetem Material zu erfolgen. Des Weiteren scheint der Zerstörungsgrad des Pflanzenmaterials einen Einfluss auf den Gesamtgehalt der Abbauprodukte zu haben. Dies könnte ebenfalls auf die größere Reaktionsoberfläche bei der homogenen Verteilung des Pflanzenmaterials zurückzuführen sein und der dadurch resultierenden schnelleren Hitzeeinwirkung auf die GLS. Durch die mittige Applikation könnte demnach der hitzeinduzierte Abbau verzögert sein und die Abbauprodukte werden im Verlauf des Backprozesses weniger stark abgebaut und verflüchtigt.

5.7 Lagerstabilität der Benzylisothiocyanat-proteinkonjugate im gefriergetrockneten Probenmaterial und hergestellten Probenlösungen für die LC-ESI-MS/MS-Analyse

Wie unter Kapitel 4.5.3 erläutert waren die BITC-Lys-Konjugate in den hergestellten unterschiedlichen Brottypen über einen Zeitraum von fünf Tagen weitgehend stabil. Die Untersuchung der Lagerstabilität über einen Zeitraum von 10 Wochen in dem gefriergetrockneten Probenmaterial von Weizenbrot, das mit Kapuzinerkresseblüten (*Tropaeolum majus* L.) hergestellt wurde, zeigte allerdings eine Abnahme des Konjugates um 77% von Tag 1 zu Woche 10 (Abbildung 25).

Unterschiedliche Studien untersuchten bereits die Stabilität von BITC-Lys- und BITC-Cys-Konjugaten. Dabei konnte in einer Studie mit Pufferlösungen und unterschiedlichen pH-Werten festgestellt werden, dass über einen Zeitraum von 48 h Cysteinkonjugate unter alkalischen Bedingungen nicht stabil sind, wohingegen Lysinkonjugate unabhängig vom pH-Wert eine gute Stabilität (Wiederfindung von 83%-93% nach 48 h) zeigten, die mit sinkenden Temperaturen (von 37 °C auf 4 °C) zunahm (Kühn et al., 2018c).

Ein Vergleich des eingesetzten gefriergetrockneten Materials mit den vorgestellten Pufferlösungen ist nicht vollumfassend möglich. Dem trockenen Probenmaterial wurde das Wasser entzogen und dadurch könnte ein anderes Verhalten der Inhaltsstoffe vorliegen als in

wässrigen Medien. Weitere Untersuchungen der Stabilität in gefriergetrocknetem Material von ITC-Konjugaten sind bisher nicht erfolgt. Allerdings wurde bereits bei Untersuchungen mit anderen sekundären Pflanzenstoffen, wie Carotinoiden, gezeigt, dass ein weiterer Abbau im gefriergetrockneten Material über einen Zeitraum von 6 Wochen erfolgt, was auch auf Reaktionsprodukte zutreffen kann (Harnkarnsujarit et al., 2011). Für die ITC-Lys-Konjugate in dem gefriergetrockneten Probenmaterial lässt sich demnach festhalten, dass diese über einen kurzen Zeitraum stabil sind, aber eine längere Lagerung zu einer Auflösung der Konjugation führt und das Material daher direkt nach der Aufarbeitung verwendet werden sollte, um eine Verfälschung der Daten auszuschließen.

Auch die BITC-Lys-Konjugate in den aufgearbeiteten Probelösungen für die LC-ESI-MS/MS-Messung zeigten keine gute Langzeitstabilität. Zwar konnten auch nach 10 Wochen noch BITC-Lys-Konjugate nachgewiesen werden, allerdings war der Gehalt um 90% im Vergleich zu Tag 1 reduziert. Entsprechend den Ergebnissen nach Kühn et al. (2018c) fördert eine Lagerung bei niedrigen Temperaturen die Stabilität der BITC-Lys-Konjugate. Dementsprechend wurden die Proben bei -80 °C gelagert um einen Verlust des Analyten so gering wie möglich zu halten. Trotz dessen war ein signifikanter Rückgang ($p \leq 0,05$) an BITC-Lys auch von Tag 1 zu Woche 3 von 40% zu verzeichnen. Die Proben werden nach der Aufreinigung über eine Festphasenextraktion und anschließendem Entfernen des Elutionsmittels in einem Gemisch aus 80% Methanol (in Wasser) mit 0,1% Ameisensäure (FA) aufgenommen. Dementsprechend hat das organische Medium, in dem sich die Analyten befinden einen sauren pH-Wert, der die Stabilität der Konjugate beeinflussen kann. Während der Lagerung von BITC-Lys-Konjugaten in Pufferlösungen wurde zwar kein großer Einfluss des pH-Wertes nachgewiesen, allerdings zeigen Thioharnstoffe generell in basischen Medien eine bessere Stabilität (Björkman, 1973; Kühn et al., 2018c). Daher kann aufgrund des sauren pH-Wertes die Stabilität der BITC-Lys-Konjugate verringert sein, was zu einem stetigen Verlust des Analyten über einen Zeitraum von 10 Wochen führt. Gleichzeitig handelt es sich bei Methanol um einen flüchtigen Stoff, was ebenfalls einen Verlust an Analyten mit sich bringen könnte. Entsprechend der Ergebnisse sollten aufgearbeitete Proben direkt analysiert werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern.

5.8 Vergleich zwischen der Bildung von Benzylisothiocyanat-Lysinkonjugaten und Benzylisothiocyanat-Cysteinkonjugaten

In allen Versuchen wurden BITC-Lys-Konjugate detektiert, wohingegen BITC-Cys-Konjugate nicht nachgewiesen werden konnten. In allen hergestellten Broten, mit Ausnahme des KEMB, war der Lysin- und Cysteinanteil im Protein ähnlich (Kapitel 6.3, Tabelle 7) und in vorherigen Studien wurde BITC-Cys in unterschiedlichen Medien und Matrices nachgewiesen, daher wurde davon ausgegangen dass auch BITC-Cys-Konjugate in allen analysierten Broten nachweisbar wären (Kühn et al., 2018a; Kühn et al., 2018b; Kühn et al., 2018c). In einer vorherigen Studie führte die Anreicherung von Quark mit Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) zu höheren Gehalten an BITC-Cys-Konjugaten im Vergleich zu BITC-Lys-Konjugaten, trotz der geringeren Konzentration von Cystein (0,3%) zu Lysin (8,2%) in den Milchproteinen (Kühn et al., 2018b). Aufgrund der Studienergebnisse wurde angenommen, dass in den hergestellten Broten zusätzlich zu den nachgewiesenen Lysinkonjugaten auch Cysteinkonjugate identifiziert werden können, was sich jedoch nicht bestätigen ließ. Diese Unterschiede in den Ergebnissen zwischen der Studie mit Milchprodukten und den aktuellen Ergebnissen lassen sich durch die unterschiedlichen Stabilitäten der untersuchten Konjugate erklären.

Einfluss auf die Bildung und Stabilität der Proteinkonjugate hat neben der Hitze auch der pH-Wert der Lebensmittelmatrix. Höhere pH-Werte fördern nicht nur die Reaktivität der ITC mit Aminogruppen, wie im Kapitel 5.4 erläutert, sondern auch zu Thiolgruppen. Zusätzlich werden Dithiocarbamate, zu denen das BITC-Cys-Konjugat zählt, auch unter leicht sauren Bedingungen bevorzugt gebildet, im Gegensatz zu Thioharnstoffen, wie das BITC-Lys-Konjugat. Die Stabilitäten der Reaktionsprodukte unterschieden sich allerdings in sauren oder basischen Medien. Dithiocarbamate sind unter sauren Bedingungen stabiler, während Thioharnstoffe eine bessere Stabilität bei basischen pH-Werten zeigen (Björkman, 1973; Hanschen et al., 2012a; Platz et al., 2013). Der genannte untersuchte Quark mit Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) wies einen pH-Wert von 4,5 auf, wodurch die Bildung und Stabilität von BITC-Cys gegenüber BITC-Lys erhöht war (Kühn et al., 2018b). Die pH-Werte der Weizenbrote mit Hefe und Soda über 5,9, führen dementsprechend gegenteilig zum Quark mit einem niedrigeren pH-Wert zu einer höheren Bildung und Stabilität von BITC-Lys-Konjugaten, während die Brote mit sauren pH-Werten, wie das RVK mit einem pH-Wert von 4,5 die Bildung und Stabilität von

Cysteinkonjugaten fördern sollte. Trotz des sauren pH-Wertes des RVK konnten allerdings auch in diesem Brot keine BITC-Cys-Konjugate nachgewiesen werden.

Der pH-Wert scheint daher in dem aktuellen Experiment nicht ausschlaggebend für den Nachweis von Dithiocarbamaten und Thioharnstoffen zu sein. Einen weiteren Einfluss auf die Nachweisbarkeit des BITC-Cys-Konjugates hat auch die Stabilität des Reaktionsproduktes. Im Gegensatz zum BITC-Lys ist die Reaktion zwischen ITC und Cystein reversibel, wodurch keine stabilen Reaktionsprodukte gebildet werden. Die Reaktion zwischen Lysin und ITC ist hingegen irreversibel. Ausschlaggebend für die nicht nachweisbaren Cysteinkonjugate ist zusätzlich der Hitzeprozess beim Backen. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass BITC-Cys nur eine geringe Stabilität bei steigender Temperatur hat, während die Temperatur nur einen geringen Einfluss auf BITC-Lys-Konjugate hatte (K. Brown et al., 2011; Kühn et al., 2018c; Nakamura et al., 2009). Dementsprechend lassen sich in den hergestellten Broten, die einen Hitzeprozess während des Backens, mit Temperaturen bis zu 95 °C (Kapitel 6.2.1, Abbildung 27), durchlaufen keine BITC-Cys-Konjugate mehr nachweisen, da diese hitzelabil sind.

Die geringen BITC-Lys Konzentrationen im Vergleich zu den Gehalten in Kresse-angereicherten Quark lassen sich ebenfalls durch den Hitzeprozess und den resultierenden reduzierten BITC-Gehalt erläutern, unabhängig von der Hitzestabilität des BITC-Lys-Konjugates. Darüber hinaus ist festzuhalten, dass trotz des geringen Gehaltes an BITC in allen Kapuzinerkressebrotten BITC-Lys-Konjugate nachgewiesen werden konnten. In mehreren Studien wurde bereits berichtet, dass Lysinkonjugate als Marker für ITC-Reaktionsprodukte geeignet sind, auch in Modellsystemen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass BITC-Lys auch als Marker für Proteinkonjugate in erhitzten Lebensmitteln herangezogen werden kann.

5.9 Auswirkungen der Proteinkonjugatbildung auf die Proteinfunktion und weitere potenzielle Reaktionen

Entsprechend der analysierten BITC-Aminosäurekonjugate können diese einen Einfluss auf die Proteine haben. Neben einer potenziell geringeren biologischen Wertigkeit des Lebensmittelproteins haben Proteinkonjugationen weitere Konsequenzen. In unterschiedlichen Studien wurde bereits ein Einfluss auf typische Verdauungsenzyme beobachtet. Trypsin und Chymotrypsin waren nicht in der Lage ITC-modifizierte Proteine

vollständig zu hydrolysieren, was zu veränderten Peptidmustern im Vergleich zu nicht modifizierten Proteinen führte und vermutlich auf die sterische Hinderung durch die konjugierten Lysin-Seitenketten zurückzuführen ist. Die Aktivität von Pepsin, die eine unspezifische Protease darstellt, wurde hingegen nicht gemindert (Kawakishi et al., 1987; Rawel et al., 1998a; Rawel et al., 1998b; Rawel et al., 1998c; Spöttel et al., 2021a). Neben dem Einfluss auf die Hydrolyse im menschlichen Gastrointestinaltrakt zeigte ein anderes Experiment, dass ITC-Modifikationen auch zu einer Verringerung von anderen Enzymaktivitäten führen können, wie es bei Untersuchungen mit der Tyrosinphosphatase gezeigt werden konnte (Lewis et al., 2015). In der Lebensmittelproduktion könnte eine verringerte Wasserlöslichkeit von Proteinen aufgrund einer Konjugation mit dem hydrophoben BITC von Bedeutung sein, ebenso wie ein verändertes Verhalten bei der Hitzeaggregation, Schaumbildung und Emulgierung, welches am Beispiel von AITC-modifiziertem β -Lactoglobulin gezeigt wurde (Rade-Kukic et al., 2011; Rawel et al., 1998b). Zusätzlich könnten sich ITC-Modifikationen auf die Allergenität des Lebensmittels auswirken, so wurden beispielsweise immunologische Untersuchungen an α -Lactalbumin durchgeführt, dass eines der Hauptallergene in Milchprodukten darstellt (Spöttel et al., 2021a; Villa et al., 2018). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die ITC-Konjugate einen Einfluss auf die Proteinstruktur haben, was dazu führt, dass allergene Epitope zerstört oder inaktiviert wurden, allerdings können gleichzeitig neue Epitope freigelegt oder gebildet werden, die wiederum die Allergenität des Milchproduktes erhöhen könnten (Spöttel et al., 2021a).

Zusätzlich zu GLS enthalten *Brassica*-Gemüse andere sekundäre Pflanzenstoffe wie Flavonoide und Carotinoide. Die Hitze einwirkung während des Backens könnte auch diese sekundären Pflanzenstoffe (SPS) beeinflussen, was ebenfalls zu Folgereaktionen führen könnte (Klopsch et al., 2019; Świeca et al., 2013). Es wurde bereits gezeigt, dass die antioxidative Aktivität von phenolischen Verbindungen in Gemüse oft nicht vermindert wird, selbst wenn es zu einem thermisch-induzierten Abbau zu kleineren Verbindungen kommt. Allerdings kommt es zeitgleich auch zu einer Bildung von Komplexen mit Proteinen während des Backprozesses die ebenfalls Auswirkungen haben können (Świeca et al., 2013).

Für die Anreicherung der aufgeführten Brote wurden 1,5% bis 4% homogenisierte Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) verwendet. In einer früheren Studie wurde Brot mit Gemüsepulver in einer Größenordnung von 1-5% angereichert, was im Bereich der verwendeten Menge liegt (Gawlik-Dziki et al., 2014; Rawel et al., 1998b). In Studien, in denen frische gewürfelte Gemüsezutaten wie Grünkohl, Rote Bete und Spinat verwendet wurden, lag die Anreicherung der Brote zwischen 10 und 40% (Hobbs et al., 2014; Kühn et al., 2018a; Lewis et al., 2015). Hier wurden die zubereiteten Brote mit frischen Kapuzinerkresseblättern und -blüten in einem Bereich von 1-5% angereichert. Bei einer höheren Anreicherung im Bereich von 10 bis 40% an frischem Material wäre der Gehalt an BG im Ausgangsmaterial höher, was ebenfalls einen Einfluss auf den BITC-Gehalt und Folgeprodukte mit Aminosäuren zur Folge haben könnte. Dies wiederum kann zu einer intensiveren Freisetzung und Migration von ITC und zu mehr Folgereaktionen mit Proteinen führen. Der Zusatz sollte demnach so gewählt werden, dass ausreichend ITC für einen gesundheitlichen Nutzen vorhanden ist, allerdings der Gehalt nicht so hoch ist, dass eine mögliche ITC-Konjugatbildung sich auf die Eigenschaften des Lebensmittels auswirkt.

Im Vergleich zu nicht erhitzten Lebensmitteln werden in erhitzten Lebensmitteln weniger Proteinkonjugate gebildet, da die Bildung von ITC während des Backvorgangs aufgrund von Hydrolysereaktionen stark vermindert wird (Krell et al., 2021; Kühn et al., 2018a). Daher sind negative Einflüsse, wie die verringerte Bioverfügbarkeit von Lysin aufgrund von Reaktionen mit ITC bei erhitzten verarbeiteten Lebensmitteln weniger bedenklich, gleichzeitig gibt es allerdings auch keinen gesundheitlichen Nutzen durch verfügbares ITC. Eine Anreicherung von Brot mit GLS-reichem Gemüse ist demnach keine geeignete Quelle für die Herstellung eines ITC-reichen Lebensmittels, da der ITC-Gehalt beim Backen nahezu eliminiert wird.

6 Material und Methoden

6.1 Pflanzenmaterial

Die Samen der Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) wurden von der Firma Dürr Samen (Stephan Schwenk e. K., Reutlingen, Deutschland) bezogen und bei Raumtemperatur auf Watte bei Tageslicht kultiviert. Die Watte wurde täglich mit Wasser besprüht, um eine ausreichende Feuchtigkeit zu gewährleisten. Die Sprossen wurden nach 7 Tagen geerntet und in zwei Aliquote aufgeteilt. Ein Teil wurde für die Analyse des Glucosinolat (GLS)-Gehaltes, der andere Teil als Zutat im Brotteig, als frisches Material verwendet.

Die gefriergetrockneten Blätter der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) wurden vom Leibniz Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) e.V. (Großbeeren, Deutschland) bezogen. Der Anbau erfolgte nach den Standardverfahren für *Brassica*-Gemüse, einschließlich Düngung, Bewässerung und Pflanzenschutz. Nach 10 Wochen wurden die Blätter geerntet und bei -50 °C eingefroren, gefriergetrocknet und zu einem feinen Pulver gemahlen (Kühn et al., 2018a). Ein Teil des homogenisierten Materials wurde mittels Hochleistungsflüssigchromatographie auf den GLS-Gehalt analysiert und der andere Teil in den Brotteig gegeben.

Weiteres verwendetes Kapuzinerkressematerial wurde aus Samen der Firma Samenhaus Müller GmbH (Wildeck, Deutschland) im Freien gezogen. Die Kultivierung erfolgte in einem 30 L Pflanzgefäß mit handelsüblicher Blumenerde, natürlichem Licht und regelmäßiger Wässerung. Die Blätter wurden nach 12 Wochen geerntet. Zusätzlich wurden auch Kapuzinerkresseblüten im blühenden Zustand von der Pflanze entnommen. Das Blütenmaterial wurde ausschließlich frisch verwendet, das Blattmaterial wurde sowohl frisch als auch gefriergetrocknet eingesetzt. Für das gefriergetrocknete Material wurden die geernteten Blätter bei -80 °C eingefroren, gefriergetrocknet und zu einem feinen Pulver vermahlen. Vor dem Einbacken wurden alle verwendeten Materialien auf den GLS Gehalt untersucht.

6.2 Herstellung der Brote und des Analysenmaterials

6.2.1 Brote mit homogen verteiltem Pflanzenmaterial

Es wurden unterschiedliche Brotsorten mit unterschiedlicher Kresseapplikation hergestellt. Als Pflanzenmaterial wurde sowohl Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) als auch Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) eingesetzt. Die Applikation erfolgte entweder als gefriergetrocknetes

oder frisches Material. Zusätzlich wurden neben den Blättern der Kapuzinerkresse auch dessen Blüten eingesetzt. Je Brot wurde eine Applikation mit einem bestimmten prozentualen Anteil ausgewählt und in dreifacher Ausfertigung hergestellt.

Für alle Brote wurde zunächst ein Teig hergestellt, in dem die entsprechende Wassermenge zu den zuvor vermengten trockenen Zutaten, wie Mehl, Backtriebmittel, Salz und Zucker, gegeben wurde. Der Teig wurde manuell für fünf Minuten geknetet und vor Zugabe des Pflanzenmaterials in zwei Teile geteilt. In einen Teil des Teiges wurde das Pflanzenmaterial homogen unter Kneten eingearbeitet, während der andere Teig ohne Pflanzenmaterial als Referenz diente. Jedes Brot wurde in dreifacher Ausfertigung hergestellt.

Ein Überblick der hergestellten Brote mit den Zusatzarten und deren prozentualen Anteile ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die detaillierten Rezepte sind im Anhang I und II angegeben.

Tabelle 3: Hergestellte Brote und ihre Probenbezeichnung, sowie die Zusatzart und -menge.

Probenbezeichnung	Abkürzung	Brotbasis	Zusatzart	Zusatz	Programm
Kapuzinerkressebrot gefriergetrocknetes Material	Rezeptur 1	Weizenmehl	Kapuzinerkresse- blätter gefriergetrocknet	4%	Basis
Gartenkressebrot frisches Material	Rezeptur 2	Weizenmehl	Gartenkresse frisch	1,5%	Basis
Kapuzinerkresse- blätterbrot	KBLÄ	Weizenmehl	Kapuzinerkresse- blätter - frisch	1%, 5%	Basis
Kapuzinerkresse- blütenbrot	KBLÜ	Weizenmehl	Kapuzinerkresse- blüten frisch	1,5%	Basis
Weizenvollkornmehl- brot	WVK	Weizen- vollkornmehl	Kapuzinerkresse- blätter gefriergetrocknet	2,5%	Basis- Vollkorn
Roggenvollkornmehl- brot	RVK	Roggen- und Weizen- vollkornmehl	Kapuzinerkresse- blätter gefriergetrocknet	2,5%	Basis- Vollkorn
Dinkelmehlbrot	DMB	Dinkelmehl	Kapuzinerkresse- blätter gefriergetrocknet	2,5%	Basis- Vollkorn
Kichererbsenmehlbrot	KEMB	Kichererbsen- und Weizenmehl	Kapuzinerkresse- blätter gefriergetrocknet	2,5%	Basis- Vollkorn
Weizenbrot mit Soda	WSB	Weizenmehl	Kapuzinerkresse- blätter gefriergetrocknet	2,5%	Ofen

Für die Herstellung der Brote, außer dem WSB, wurde ein handelsübliches Brotbackgerät (UNOLD Backmeister® extra Modell 65811, UNOLD AG, Hockenheim, Deutschland) verwendet, in dem sowohl der Aufgehvorgang als auch das Backen erfolgte. In diesem konnten zwei Teige gleichzeitig verarbeitet werden, um eine identische Behandlung des Referenzbrottes und des Probenbrottes zu gewährleisten. Es wurden die voreingestellten Programme „Basis“ und „Basis-Vollkorn“ des UNOLD Backmeister® verwendet. Beide Programme haben die gleiche Backzeit, unterscheiden sich aber in der Temperierung und dem dritten Aufgehvorgang (Tabelle 4). Von Interesse waren des Weiteren die Temperaturen, die während der Herstellung des Brottes entstehen, daher wurden die Temperaturen in den unterschiedlichen Abschnitten mittels eines Thermometers aufgezeichnet. Dieses befand sich während des gesamten Vorgangs im Teig und die jeweilige Temperatur wurde alle fünf Minuten abgelesen und notiert. Die Durchschnittswerte für die unterschiedlichen Abschnitte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Backprogramme mit zeitlichem Ablauf und Temperaturen der Programmabschnitte des UNOLD Backmeister® extra Modell 65811.

Programmabschnitt	Basis [min]	Temperatur [°C]	Basis-Vollkorn [min]	Temperatur [°C]
Temperierung	17	22,4	37	26,6
Langsames Rühren	3	25,6	3	26,7
Kneten (rechtslauf)	2	25,6	2	27,6
Kneten (rechts-. linkslauf)	13	27,8	13	28,6
1. Aufgehen (ohne Hitze)	45	28,0	45	31,7
Teig glätten	1	28,0	1	26,5
2. Aufgehen (ohne Hitze)	18	26,8	18	27,0
Teig glätten	1	26,8	1	30,0
3. Aufgehen (mit Hitze)	45	33,6	35	37,7
Backen	55	87,8	55	93,4
Gesamt	200		210	

Die Ähnlichkeit der beiden Backprogramme im Temperaturverlauf ergibt sich aus Abbildung 27, in der die aufgezeichneten Temperaturen gegen den zeitlichen Verlauf des

Aufgehens und Backens graphisch dargestellt sind. Zusätzlich ist der Auftragung zu entnehmen, dass in dem Brot für mehr als 30 min die Temperatur über 90 °C liegt.

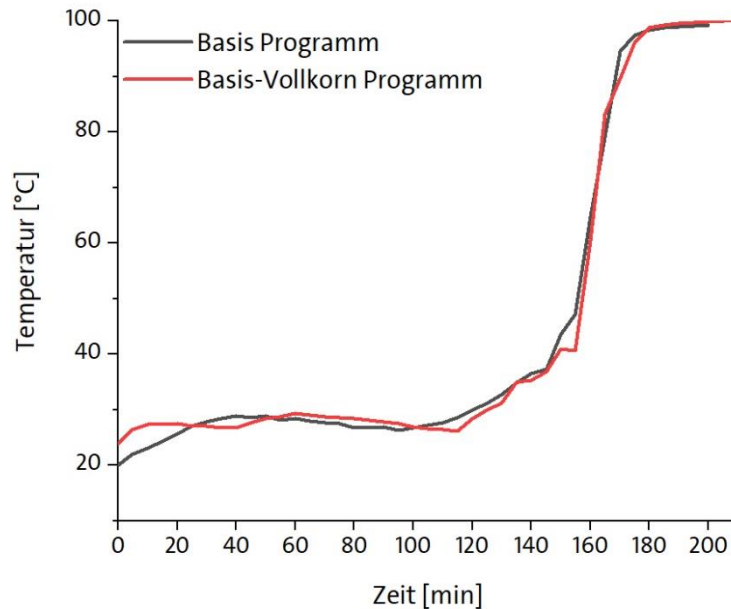


Abbildung 27: Temperaturverläufe im Brot bei der Verwendung des Basis- und des Basis-Vollkorn Programmes des UNOLD Backmeister® extra Modell 65811 im Brot.

Das Weizenbrot mit Soda (WSB) wurde aufgrund des Zusatzes von Backsoda an Stelle von Hefe direkt nach der Zugabe des Pflanzenmaterials in einem haushaltsüblichen vorgeheizten Backofen (180 °C, Umluft) für 20 min gebacken. Die Temperaturen während des Backens wurden ebenfalls mittels eines im Teig befindlichen Thermometers aufgezeichnet und sind in Tabelle 5 aufgeführt. Aufgrund der geringeren Backzeit wurde die Temperatur jede Minute notiert.

Tabelle 5: Temperaturverlauf im Weizenbrot mit Soda (WSB) während des Backens bei einer Backzeit von 20 Min in einem handelsüblichen Backofen (180 °C, Umluft).

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Temperatur [°C]
0	19,2	11	65,1
1	19,9	12	71,6
2	22,8	13	77,0
3	27,4	14	82,1
4	30,8	15	86,6
5	35,3	16	90,0
6	41,1	17	92,5
7	47,7	18	94,1
8	55,1	19	95,1
9	60,1	20	96,0
10	65,1		

Der Temperaturverlauf im WSB über die Backzeit ist zusätzlich in Abbildung 28 gezeigt.

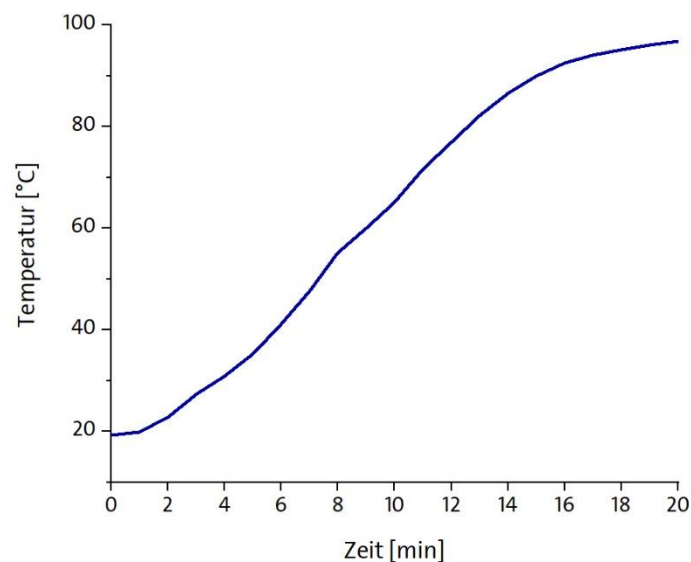


Abbildung 28: Temperaturverlauf im Weizenbrot mit Soda (WSB), gebacken in einem handelsüblichen Ofen bei 180 °C (Umluft) für 20 min.

Im Anschluss an das jeweilige Backprogramm wurde das Brot abgekühlt und die Kruste der Brote entfernt. Die Krume wurde bei -80 °C eingefroren und im gefrorenen Zustand unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff homogenisiert. Ein Teil dieses gefrorenen homogenen Materials wurde für die Analyse der GLS-Abbauprodukte verwendet, während ein zweiter Teil gefriergetrocknet und als Probenmaterial für die Analyse der Proteinkonjugate genutzt wurde.

6.2.2 Brote mit mittlerer Applikation des Pflanzenmaterials

Zur Untersuchung, ob es zu einer Migration der GLS und ihrer Abbauprodukte aus dem eingesetzten Pflanzenmaterial in die Brotkrume kommt, wurde gefriergetrocknete Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) und frische Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) mittig in den Brotteig platziert und dieser anschließend gebacken. Die Herstellung der Teige erfolgte, wie unter Kapitel 6.2.1 beschrieben mit einem Zusatz von 1,5% gefriergetrockneter Kapuzinerkresse, sowie 2,5% frischer Gartenkresse (Tabelle 6). Die detaillierte Zusammensetzung des Teiges ist im Anhang I aufgeführt.

Tabelle 6: Hergestellte Brote mit mittlerer Applikation des Pflanzenmaterials und ihre Probenbezeichnungen, sowie die Zusatzart, -menge und das verwendete Backprogramm des Backautomaten.

Probenbezeichnung	Abkürzung	Brotbasis	Zusatzart	Zusatz	Programm
Kapuzinerkressebrot - mittige Applikation	Rezeptur 3	Weizenmehl	Kapuzinerkresse- blätter - gefriergetrocknet	1,5%	Basis
Gartenkressebrot - mittige Applikation	Rezeptur 4	Weizenmehl	Gartenkresse - frisch	2,5%	Basis

Der Backvorgang wurde mit dem Basis-Programm durchgeführt (Kapitel 6.2.1). Die Zugabe des Pflanzenmaterials in die Mitte des Teiges erfolgte direkt nach dem zweiten Aufgehen, um eine homogene Verteilung durch die diversen Knetvorgänge zu unterbinden. Das Pflanzenmaterial durchlief demnach den dritten Aufgeh- und anschließenden Backvorgang. Nachdem das Brot abgekühlt war, wurden die Kruste und das Pflanzenmaterial entfernt und die Krume in drei verschiedene Fraktionen, die Kernfraktion, die mittlere Fraktion und die äußere Fraktion, aufgeteilt (Abbildung 29). Das entnommene Material wurde anschließend bei -80 °C eingefroren und unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Das homogenisierte Material wurde zur Untersuchung von GLS-Abbauprodukten verwendet. Für die Analyse auf ITC-Proteinkonjugate wurde das Analysenmaterial gefriergetrocknet eingesetzt.

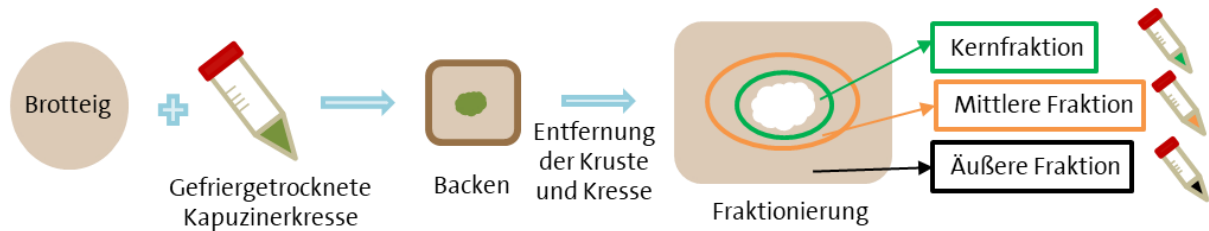


Abbildung 29: Herstellen des Analysenmaterials zur Untersuchung einer möglichen Migration von GLS und ihren Abbauprodukten in die umgebende Brotmatrix aus dem eingesetzten Pflanzenmaterial.

6.2.3 Herstellung von Broten mit spezifischen pH-Werten

Um zu bestimmen, ob der pH-Wert im Teig einen Einfluss auf das Verhältnis der gebildeten Abbauprodukte und die Bildung von BITC-Proteinkonjugaten während des Backprozesses hat, wurden Brotteige mit unterschiedlichen pH-Werten hergestellt und gebacken. Dabei wurde bei der Herstellung des Teiges das Wasser durch wässrige Lösungen mit eingestellten pH-Werten ersetzt. Um einen basischen pH-Wert zu generieren wurden wässrige Natronlauge in einem pH-Bereich von 8 - 13 und für einen sauren pH-Wert Milchsäure-Lösungen in einem pH-Bereich von 2 - 4 verwendet. Als Referenz diente ein Brotteig hergestellt mit reinem Wasser. Zur Herstellung wurden die trockenen Zutaten (Mehl, 2% Kapuzinerkresse bezogen auf das Teiggewicht) eingewogen und mit einer der hergestellten Lösungen mit eingestelltem pH-Wert (30% bezogen auf das Teiggewicht) vermengt. Der Backvorgang wurde in einem Laborofen des Modells ED 56 der Fa. BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland) bei 200 °C für 30 min durchgeführt. Alle Brote wurden in Triplikat hergestellt, die genauen Zusammensetzungen der Teige sind im Anhang III gezeigt.

6.2.4 Herstellung von Brot mit einer Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.)-Suspension

In einem weiteren Experiment wurde das Kapuzinerkressematerial vor der Zugabe zum Teig fünf Minuten lang in Wasser inkubiert, um festzustellen, ob dieser zusätzliche Schritt die Bildung von Abbauprodukten beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde das Kressematerial (2 g) 5 min in 30 mL demineralisiertem Wasser inkubiert und die Suspension für die Zubereitung des Teiges verwendet. Als Vergleich diente ein mit Wasser und trockenem Kressematerial hergestelltes Brot. Die Teig- und Brotproben wurden auf GLS-Abbauprodukte analysiert, um den Gehalt zu vergleichen und die Auswirkung der Inkubation und dem Backprozess zu untersuchen. Die Brote wurden in dreifacher Ausführung hergestellt und im Laborofen der

Firma Fa. BINDER GmbH gebacken. Die Zusammensetzung des Teigrohlings ist im Anhang III aufgeführt.

6.3 Bestimmung des Proteingehaltes nach KJELDAHL

Für die Bestimmung des Proteingehaltes der unterschiedlichen Brote wurden die Referenzen verwendet, um eine Verfälschung durch das Pflanzenmaterial zu vermeiden. Nachdem das Brot gefriergetrocknet und homogenisiert wurde erfolgte eine traditionelle Proteinbestimmung nach KJELDAHL. Dazu wurde gefriergetrocknetes Brot (2,5 g) mit 20 mL Schwefelsäure (96-98%, p.a.) versetzt und eine Katalysatortablette (KJELDAHL-Tablette TCT, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Germany) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 2-5 h in einem KJELDAHL-Aufschlussblock der Firma BÜCHI (Speed-Digester K-425, BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Germany) erhitzt, bis die Lösung klar war. Für die Wasserdampfdestillation wurde die K-355 Destillationsanlage der gleichen Firma verwendet. Zu dem abgekühlten Reaktionsgemisch wurden 75 mL Wasser und 75 mL Natriumhydroxidlösung (33%, w/v) gegeben und das Gemisch anschließend fünf Minuten bei einem 75%igen Dampfdruck in eine Vorlage aus 50 mL wässriger Borsäure (4%, w/v) destilliert. Die Titration erfolgte mit 0,1 M Salzsäure, bis zu einem Farbumschlag des Tashiro-Indikators von grün nach grau/farblos. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte auf der Grundlage des Stickstoffgehaltes und dem Proteinumrechnungsfaktor von 5,7 für die unterschiedlichen Mehlsorten (Abdel-Aal, 2008; Man et al., 2015; Qazanfarzadeh et al., 2021; Williams, 1973).

Die Menge an Cystein und Lysin wurde anhand des durchschnittlichen Gehaltes im Protein der verwendeten Mehlsorten berechnet und in Tabelle 7 zusammengefasst (Bonafaccia et al., 2000; Gellrich et al., 2003; Hefnawy et al., 2012; McDermott et al., 1957).

Tabelle 7: Lysin und Cysteingehalt in den verwendeten Mehlen.

Aminosäure	Weizenmehl ¹ [µmol/g Protein]	Roggenmehl ² [µmol/g Protein]	Dinkelmehl ³ [µmol/g Protein]	Kichererbsenmehl ⁴ [µmol/g Protein]
Lysin	157,3	253,10	191,50	492,50
Cystein	132,1	321,90	189,80	49,52

¹Bonafaccia et al., 2000; ²Gellrich et al., 2003; ³Hefnawy et al., 2012; ⁴McDermott et al., 1957

6.4 Untersuchung des Glucosinolatgehaltes

6.4.1 Probenmaterial

Von jedem verwendeten Pflanzenmaterial wurde eine Probe vor dem Backen entnommen und auf den Gehalt an GLS untersucht. Um zu analysieren, inwieweit ein Abbau der GLS während des Backvorganges erfolgt, wurde des Weiteren das gebackene Pflanzenmaterial, von Rezeptur 2 (Brot mit frischer Gartenkresse) und Rezeptur 3 (Brot mit gefriergetrockneter Kapuzinerkresse, mittig appliziert), aus dem Brot entfernt und auf den verbliebenen Gehalt der GLS ebenfalls untersucht.

Zusätzlich wurde ein Experiment durchgeführt, um herauszufinden, ob ein hitzebedingter Abbau der GLS während des Backvorgangs erfolgt. Dazu wurde gefriergetrocknete Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) für 10 min in Wasser zum Sieden erhitzt, um die Myrosinase zu inaktivieren und einen hitze-induzierten Abbau zu initiieren. Das Material wurde anschließend gefriergetrocknet und ein Teil auf den GLS-Gehalt untersucht. Der andere Teil wurde im nächsten Schritt in Brot eingebacken. Nach dem Backvorgang erfolgte erneut eine Analyse des GLS-Gehaltes.

6.4.2 Analyse der Desulfo-Glucosinolate mittels HPLC-UV

Die Extraktion von GLS und die Umwandlung in Desulfo-GLS wurde in Anlehnung an Wiesner et al. (2013) mit geringfügigen Abweichungen durchgeführt. Zur Extraktion der GLS aus gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial (10 mg) wurden zu den Proben 750 μ L Methanol (70% in Wasser, v/v, 70 °C), sowie 25 μ L einer p-Hydroxybenzyl-GLS-Lösung (Sinalbin, 1 mM in Wasser) als interner Standard gegeben. Das Gemisch wurde für 10 min bei 70 °C unter Schütteln (450 rpm, Thermoschüttler, Hettich Benelux B.V., Geldermalsen, Niederlande) erhitzt und anschließend bei 7748 \times g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes 2 mL-Reaktionsgefäß überführt, der Rückstand erneut mit 500 μ L Methanol (70% in Wasser, v/v, 70 °C) und einer verkürzten Inkubationszeit von 5 min extrahiert, sowie erneut zentrifugiert. Nach einer dritten Extraktion wurden alle Überstände vereinigt.

Im nächsten Schritt wurden die Extrakte aufgereinigt, dafür wurden Säulen mit 500 μ L DEAE-Sephadex A-25 verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit 6 M Imidazol (2x 1 mL, in Ameisensäure 30% in Wasser) aktiviert und zweimal mit reinst Wasser (1 mL) gewaschen, bevor

die Probenextrakte aufgebracht wurden. Anschließend wurden 75 µL gereinigte Glucuronidase (aus *Helix pomatia*) auf die Säule gegeben und über Nacht inkubiert. Die Desulfo-GLS wurden zweimal mit 500 µL Wasser eluiert und in Corning® Costar® Spin-X® Zentrifugenröhrchen-Filter (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) überführt. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei $5165 \times g$ wurden die Probenlösungen für die HPLC-UV-Analyse eingesetzt.

Für die Trennung der Desulfo-GLS wurde ein Agilent 1260 Infinity II LC-System ausgestattet mit einem UV-Detektor und einer Poroshell 120 EC-C18-Säule (2,7 µm, 2,1 mm x 100 mm) verwendet. Die Temperatur des Autosamplers wurde auf 4 °C und die Temperatur des Säulenofens auf 23 °C eingestellt. Die mobile Phase bestand aus Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B), die mit einer Flussrate von 400 µL/min eingestellt wurde. Zu Beginn wurde Eluent A für 2 min bei 99,8% gehalten. Anschließend wurde der prozentuale Anteil von Eluent B innerhalb von 10 min linear auf 19,8% erhöht und war bei dieser Zusammensetzung für 2 min konstant. Danach wurde die Konzentration von Eluent B innerhalb von 1 min weiter auf 50% erhöht und für 1 min nicht verändert. Abschließend wurde die Säule 2 min lang mit 99,8% Eluent A re-equilibriert (Abbildung 30).

Die Identifizierung der Desulfo-GLS basierte auf einem Vergleich der Retentionszeiten, die mittels hergestellter Standardlösungen mit Referenz-GLS wie BG, 4-(Methylsulfinyl)butylglucosinolat und 2-Propenyl Glucosinolat bei 229 nm analysiert wurden. Die Quantifizierung erfolgte mit *p*-Hydroxybenzylglucosinolat als internem Standard und dem spezifischen *response factor* für jede Verbindung (EN ISO 9167-1:1995 1995).

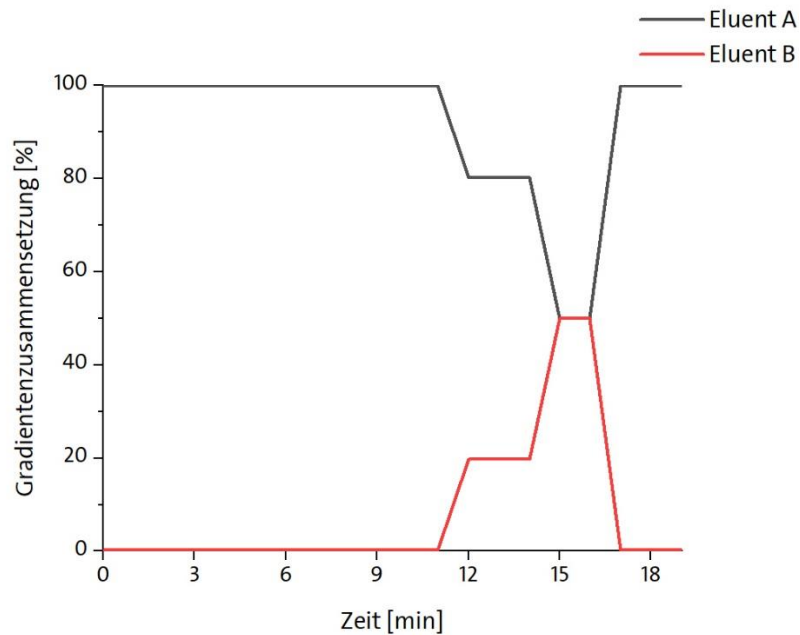


Abbildung 30: Elutionsmittelzusammensetzung für die HPLC-Analyse der Desulfo-Glucosinolate. Eluent A: Wasser; Eluent B: Acetonitril.

6.5 Analyse der Glucosinolatabbauprodukte mittels GC-MS

Die Analysen wurden am Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ, Großbeeren, Germany) durchgeführt.

Für die Analyse der GLS-Abbauprodukte wurde eine Kombination aus den beschriebenen Protokollen von Wermter et al. (2020) und Hanschen et al. (2017) verwendet (Hanschen et al., 2017b; Wermter et al., 2020). Die Extraktion erfolgte aus frisch gefrorenem homogenisiertem Brot (500 mg), das in ein lösungsmittelbeständiges Gefäß eingewogen wurde. Nach Zugabe von 2 mL Methylenchlorid und 0,2 mol Benzotrifluorid wurde das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und die Abbauprodukte anschließend extrahiert. Nach einer Zentrifugation wurde die Methylenchlorid-Phase abgetrennt und in ein sauberes Gefäß überführt. Insgesamt wurde die Extraktion dreimal durchgeführt, wobei bei der zweiten und dritten Extraktion 1,5 mL Methylenchlorid eingesetzt wurde. Nach Vereinigung der Überstände und Trocknung über wasserfreiem Natriumsulfat wurden die Proben auf 300 μ L aufkonzentriert und mittels GC-MS analysiert.

Das MS-System bestand aus einem Agilent 7890 A Series GC System (Agilent Technologies) ausgestattet mit einer Agilent J&W VF-5ms GC-MS-Säule (30 m, 0,25 mm 0,25 m) gekoppelt mit

einer 10 m EZ-Guard P/N:CP9013 Säule. Es wurde 1 mL Probenlösung injiziert und ohne split auf die Säule geleitet. Als Trägergas diente Helium (1,8 mL/min) und die Eingangstemperatur des Injektors lag bei 190 °C. Der Temperaturgradient des Säulenofens startete bei 35 °C, die für 3 min konstant gehalten wurden. Anschließend stieg die Temperatur um 9 °C/min auf 90 °C und blieb für 2 min konstant. Mit einer Rate von 3 °C/min wurde die Temperatur auf 110 °C und anschließend erneut mit 9 °C/min bis 210 °C erhöht. Der Temperaturanstieg wurde bis 223 °C auf 3 °C/min reduziert und bis 230 °C auf die ursprüngliche Steigungsrate (9 °C/min) erhöht. Die abschließende Temperatur lag bei 310 °C, die mit einer Rate von 35 °C/min erreicht und für 6 min konstant gehalten wurde. Die Parameter des massenspektrometrischen Detektors (MSD) waren wie folgt eingestellt: Die transfer line temperature lag bei 250 °C, die Ionenquelle hatte eine Temperatur von 230 °C, der Elektronenstoß-Ionisor (EI) war auf 70 eV eingestellt und es wurde ein Scanbereich von 30-240 m/z eingestellt.

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand von MS-Vergleichsspektren mit Hilfe von Retentionszeiten eigener gemessener authentischer Standards und mit Literaturdaten (Ohashi et al., 1963; Spencer et al., 1980). Die Quantifizierung erfolgte über den Totalionenstrom (*total ion current*, TIC) und die Verwendung von Benzonitril als internen Standard. Zusätzlich wurden die Korrekturfaktoren der verfügbaren Standards miteinbezogen.

6.6 Analyse der Proteinkonjugate mittels LC-ESI-MS/MS

6.6.1 Enzymatische Hydrolyse zur Isolierung der Isothiocyanat-Proteinkonjugate aus der Brotmatrix

Diese Methode wurde im Zuge der Diplomarbeit „Untersuchung und Identifizierung von Isothiocyanat-Getreideproteinaddukten in Gemüse-angereicherten Broten“ (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, Deutschland) im Wintersemester 2019/2020 eingeführt, optimiert und für alle Untersuchungen verwendet.

Die Isolierung der ITC-Konjugate basiert auf der Kombination von verschiedenen enzymatischen Hydrolyse-Protokollen. Zunächst wurde nach Pasini et al. (2001) ein *in vitro* Verdau imitiert, um die Proteine aus dem Brot zu Peptiden zu hydrolysieren (Pasini et al., 2001). Dazu wurden 50 mg gefriergetrocknetes Brot in 4 mL einer Pepsin-Lösung (0,05 mg/mL in 0,2 M Salzsäure, Enzym/Protein-Verhältnis: 1:30) suspendiert, sowie für 30 min bei 37 °C und

400 U/min in einem Heizblock (Hettich Benelux B.V., Geldermalsen, Niederlande) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 1,15 mL einer Pankreatinlösung (0,25 mg/mL in 1 M Borsäure und 0,5 M Natriumhydroxidlösung, pH 6,8, Enzym/Protein-Verhältnis 1:21) zu den Probenlösungen gegeben, mit einem resultierenden pH-Wert von 7,6. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 150 min (37 °C, 400 U/min) wurde der Verdau durch die Zugabe von 1 mL Trichloressigsäure (TCA, 20% (w/v)) beendet. Das Reaktionsgemisch präzipitierte für 60 min und wurde anschließend für 10 min bei $2576 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Gefäß überführt und gefriergetrocknet.

Das trockene Probenmaterial wurde in 2 mL Phosphatpuffer (*phosphate-buffered saline*, PBS) gelöst und der pH-Wert auf 6-7 eingestellt. Die weitere Hydrolyse der Peptide zu Aminosäuren mit dem Enzym Pronase E wurde nach einem angepassten Protokoll nach Kühn et al. (2018b) durchgeführt. Für den Verdau wurden 60 µL einer Pronase E-Lösung (1 mg/mL in PBS-Puffer, Enzym/Protein-Verhältnis 1:100) zu den Proben gegeben und das Gemisch 18-20 h bei 37 °C und 400 U/min inkubiert. Die Hydrolyse wurde durch die Zugabe von 100 µL TCA (20% (w/v)) beendet und die präzipitierte Pronase E durch eine Zentrifugation von 10 min bei $24.104 \times g$ vom Probenmaterial abgetrennt.

Die Überstände wurden anschließend über eine Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) aufgereinigt. Für diese wurden C18ec-Säulen (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) verwendet. Die Konditionierung erfolgte mit Methanol (MeOH, 3 mL) und die Equilibrierung mit Ameisensäure (FA, 3 mL, 0,1% in Wasser, v/v). Nachdem die Proben aufgetragen wurden, wurde zweimal mit wässriger FA (3 mL, 0,1% in Wasser, v/v) gewaschen und anschließend die Aminosäurekonjugate mit methanolischer FA (3 mL, 0,1% in Methanol, v/v) eluiert. Im letzten Schritt wurden die Extrakte unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom getrocknet und in 100 bzw. 200 µL FA (0,1% in Methanol/Wasser, 80:20, v/v) aufgenommen. Diese Extrakte wurden zur LC-ESI-MS/MS-Analyse eingesetzt.

6.6.2 Analyse der Isothiocyanat-Proteinkonjugate mittels LC-ESI-MS/MS

Für die LC-ESI-MS/MS-Analyse der ITC-Proteinkonjugate wurde die Methodik von Kühn et al. angepasst und verwendet (Kühn et al., 2018c).

Das LC-ESI-MS/MS-System bestand aus einem 5500 QTrap Triple Quadrupol-MS/MS-System (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland) kombiniert mit einem Agilent 1260 Infinity II HPLC-System (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland). Für die Messung und Datenanalyse wurde die Software Analyst 1.7.0 (AB Sciex Deutschland GmbH) verwendet.

Für die Messung wurde ein Aliquot von 4 μL der isolierten und gereinigten ITC-Proteinkonjugat-Extrakte (Kapitel 6.6.1) verwendet. Die Trennung der Analyten erfolgte auf einer Kinetex[®] C18-Säule (5 μm , 100 Å , 150 mm x 2,1 mm; Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland). Der Autosampler wurde auf 4 °C und der Säulenofen auf 20 °C eingestellt. Die Analyse erfolgte bei einer Flussrate von 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ der mobilen Phase, bestehend aus 0,1 % FA in Wasser (Eluent A) und 0,1 % FA in Methanol (Eluent B). Zu Beginn bestand der Gradient aus 90% Eluent A. Nach einer Minute stieg die Konzentration von Eluent B linear auf 90% innerhalb von 8 min an und blieb für 1 min konstant. Danach wurde die Ausgangszusammensetzung von Eluent A und B innerhalb von 1 min wieder erreicht und das System für 4 min re-equilibriert (Abbildung 31).

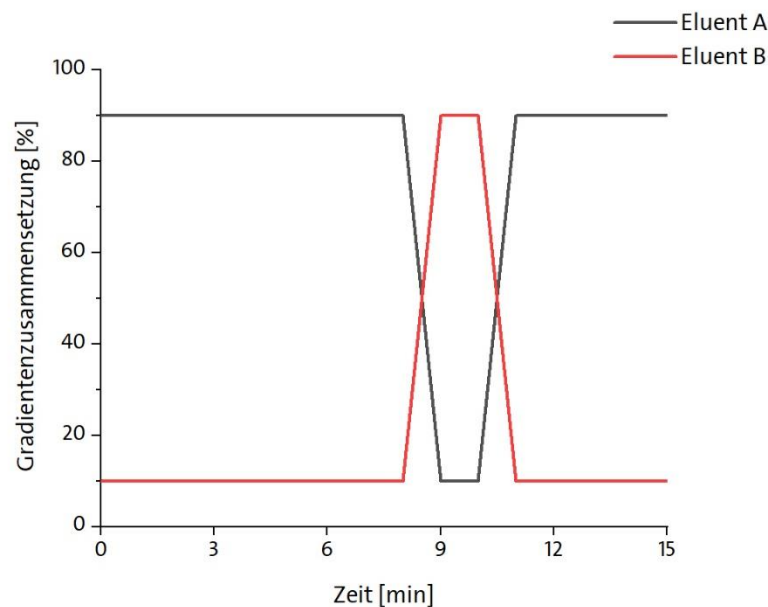


Abbildung 31: Gradientenzusammensetzung der HPLC-Methode für die LC-ESI-MS/MS-Analyse der ITC-Aminosäurekonjugate. Eluent A: wässrige Ameisensäure (0,1% in Wasser); Eluent B: methanolische Ameisensäure (0,1% in Methanol).

Das MS-System wurde auf den positiven Ionisierungsmodus mit einem Eingangspotential von 10 V eingestellt. Die Ionensprühspannung betrug 5,5 kV, die Temperatur des Desolvationsgases 550 °C, der Gasdruck der Ionenquelle betrug 70 psi für Gas 1 und 55 psi für Gas 2, und der Vorhanggasdruck betrug 40 psi.

Die Methode basiert auf den Massen der Aminosäurekonjugate BITC-Lys und BITC-Cys, die durch ihre nukleophilen Seitenketten einen Reaktionspartner von BITC darstellen. Die beiden genannten Verbindungen sind in Abbildung 32 gezeigt und die verwendeten Fragmente für die Identifizierung in Tabelle 8 aufgeführt. Für die Quantifizierung wurde eine externe Kalibrierung mit den von Kühn et al. synthetisierten BITC-Lys-Konjugat und BITC-Cys-Konjugat in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 6 µmol/L verwendet (Kühn et al., 2018b).

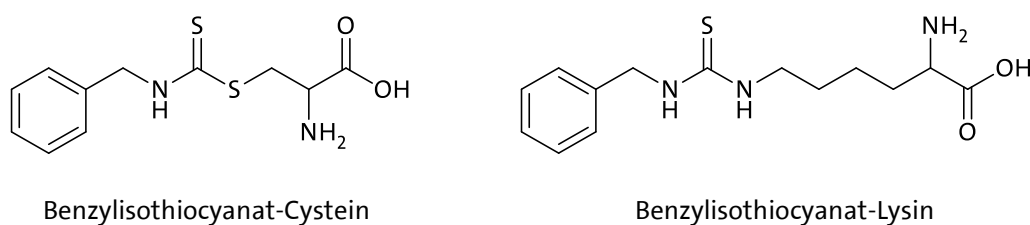


Abbildung 32: Darstellung der Strukturen von Benzylisothiocyanat-Cystein (BITC-Cys) und Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys), die zur Analyse eine Konjugation zwischen Aminosäuren und Isothiocyanaten dienen.

Tabelle 8: Retentionszeiten und Fragmentmassen, die zur Qualifizierung und Quantifizierung von Benzylisothiocyanat-Cystein (BITC-Cys) und Benzylisothiocyanat-Lysin (BITC-Lys) mittels der LC-ESI-MS/MS-Methode verwendet wurden.

Analyt	Retentionszeit [min]	Quantifizierung [m/z]	1. Qualifizierung [m/z]	2. Qualifizierung [m/z]
BITC-Lys	6,6	296,3 → 108,0	296,3 → 189,0	296,3 → 83,9
BITC-Cys	7,5	271,1 → 90,9	271,1 → 122,0	271,1 → 254,0

6.7 Stabilitätstests

6.7.1 Stabilität der Isothiocyanat-Proteinkonjugate im gebackenen Brot über mehrere Tage

Brot wird typischerweise über mehrere Tage verzehrt, was mit einer Lagerung des Produktes verbunden ist. Neben den untersuchten Abbauprodukten ITC und BC in den hergestellten Broten kann dies die Reaktionsprodukte zwischen ITC und Proteinen betreffen. Um mögliche Veränderungen in der Konzentration der genannten Verbindungen zu untersuchen, wurde ein Lagerungsversuch mit WVK, RVK, DMB, KEMB und WSB durchgeführt. Dabei wurden nicht nur

die Stabilität der Verbindungen, sondern auch der mögliche Einfluss der Brotstruktur und der pH-Werte untersucht. Von den genannten Broten wurde nach dem Backen und Abkühlen eine Probe für die Untersuchungen entnommen und das Brot anschließend in einem 1L-Polyethylenbeutel, als typische Lagerungsform, gelagert. Die Untersuchung erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen, wobei an jedem Tag eine Probe für die Analysen der Abbauprodukte und Proteinkonjugate entnommen wurde.

6.7.2 Stabilität der Isothiocyanat-Proteinkonjugate im gefriergetrockneten Probenmaterial

Für chemische Analysen ist es von Vorteil, wenn die zu untersuchenden Analyten in dem verwendeten Probenmaterial weitgehend stabil sind. Daher war es von Interesse die Stabilität der ITC-Proteinkonjugate in den bereits hergestellten Analysenmaterial zu untersuchen. Dazu wurde das gefriergetrocknete Brot bei Raumtemperatur an einem trockenen Ort gelagert und in einem Abstand von drei und zehn Wochen nach der ersten Untersuchung erneut aufgearbeitet und mittels LC-ESI-MS/MS auf Aminosäurekonjugate analysiert. Als Probenmaterial diente hierbei das Brot mit Kapuzinerkresseblütenmaterial (KBLÜ).

6.7.3 Stabilität der Isothiocyanat-Proteinkonjugate in aufgearbeiteten und gelagerten Proben

Neben der Stabilität im hergestellten fertigen Probenmaterial ist ebenfalls von Interesse, wie stabil die Proben während einer Lagerung sind. Dazu wurden die bereits analysierten Probenlösungen der Untersuchung des Brotes mit Kapuzinerkresseblüten (KBLÜ) bei -80 °C gelagert und nach drei und zehn Wochen am gleichen Gerät direkt aus den gelagerten Lösungen erneut analysiert.

6.8 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde entweder Statistica (Version 13, Version 13.5.0, Dell Inc., Tulsa, OK, USA) oder OriginLab (Version 2022, OriginLab Corporation, Northampton, MA, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet.

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Kresse-Anwendungen (Kapitel 4.1 und 4.8) sowie des nicht verarbeiteten und des gebackenen Pflanzenmaterials wurden mittels t-Test (Statistica 64) analysiert. Es wurde ein statistisches Konfidenzniveau von 95% ($p \leq 0,05$) festgelegt.

Die statistische Auswertung der Unterschiede zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Brottypen (WVK, RVK, DMB, KEMB, WSB) und Modellbrotten (Kapitel 4.5 -4.6), die Beobachtung von Veränderungen in der Konzentration der Abbauprodukte und der ITC-Aminosäurekonjugation über mehrere Tage im Brot, sowie in den hergestellten Probenmaterialien (Kapitel 4.5 und 4.9) wurden mit einem ANOVA-Test in Verbindung mit Tuckey-HSD mit einem statistischen Konfidenzniveau von mindestens 95% ($p \leq 0,05$) durchgeführt. Die gleiche Vorgehensweise wurde für die Zusätze vom frischen Blattmaterial und dem Vergleich zwischen den unterschiedlichen Zusätzen verwendet (Kapitel 4.2 - 4.4), sowie für den Vergleich der Abbauprodukte von BG vor und nach dem Backprozess (Kapitel 4.7). Für unabhängige Stichproben pro Gruppe wurde der t-test angewendet, ebenfalls mit einem Signifikanzlevel von 95%. Alle Experimente wurden in Triplikate durchgeführt und ausgewertet, sofern in den Ergebnissen nicht anders angegeben.

7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Aal, E.-S. (2008). Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two in vitro digestion methods. *LWT-Food Science and Technology*, 41(7), 1282-1288. doi:10.1016/j.lwt.2007.07.018
- Agerbirk, N., Olsen, C. E., & Sørensen, H. (1998). Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1563-1571. doi:10.1021/jf9708498
- Akagi, K., Sano, M., Ogawa, K., Hirose, M., Goshima, H., & Shirai, T. (2003). Involvement of toxicity as an early event in urinary bladder carcinogenesis induced by phenethyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, and analogues in F344 rats. *Toxicologic Pathology*, 31(4), 388-396. doi:10.1080/01926230390202326
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731. doi:10.4161/psb.6.11.17613
- Andujar, I., Recio, M., Giner, R., & Rios, J. (2013). Traditional chinese medicine remedy to jury: the pharmacological basis for the use of shikonin as an anticancer therapy. *Current medicinal chemistry*, 20(23), 2892-2898.
- Anwar, B., Allah, R., Mahmood, M., Iffat, B., Muhammad, S., & Sammar, R. (2017). Enrichment of wheat flour bread to enhance physicochemical and sensory attributes using broccoli powder. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 27(1), 39-45.
- Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelifa, A., Zhu, Z., & Koubaa, M. (2016). Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: Impact of processing. *Frontiers in Nutrition*, 3, 24. doi:10.3389/fnut.2016.00024
- Barton, K. E., & Koricheva, J. (2010). The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist*, 175(4), 481-493. doi:10.1086/650722
- Baskar, V., Gururani, M. A., Yu, J. W., & Park, S. W. (2012). Engineering glucosinolates in plants: current knowledge and potential uses. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(6), 1694-1717. doi:10.1007/s12010-012-9890-6
- Belderok, B. (2000). Developments in bread-making processes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(1), 1-14. doi:10.1023/A:1008199314267
- Benn, M., & Meakin, D. (1965). Glucoputranjivin. *Canadian Journal of Chemistry*, 43(6), 1874-1877. doi:10.1139/v65-244
- Benn, M., & Yelland, L. (1967). The synthesis of glucocochlearin. *Canadian Journal of Chemistry*, 45(13), 1595-1597.
- Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive Compounds in Plants-Benefits and Risks for Man and Animals*, 50, 11-17.

- Björkman, R. (1973). Interaction between proteins and glucosinolate isothiocyanates and oxazolidinethiones from *Brassica napus* seed. *Phytochemistry*, *12*(7), 1585-1590. doi:10.1016/0031-9422(73)80372-3
- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C. E., Burow, M., Rollin, P., & Agerbirk, N. (2020). Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry*, *169*, 112100. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112100
- Bollard, M., Stribbling, S., Mitchell, S., & Caldwell, J. (1997). The disposition of allyl isothiocyanate in the rat and mouse. *Food Chemical Toxicology*, *35*(10-11), 933-943. doi:10.1016/S0278-6915(97)00103-8
- Bonafaccia, G., Galli, V., Francisci, R., Mair, V., Skrabanja, V., & Kreft, I. (2000). Characteristics of spelt wheat products and nutritional value of spelt wheat-based bread. *Food Chemistry*, *68*(4), 437-441. doi:10.1016/S0308-8146(99)00215-0
- Bones, A. M., & Rossiter, J. T. (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, *97*(1), 194-208. doi:10.1111/j.1399-3054.1996.tb00497.x
- Bones, A. M., & Rossiter, J. T. (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, *67*(11), 1053-1067. doi:10.1016/j.phytochem.2006.02.024
- Brabban, A., & Edwards, C. (1995). The effects of glucosinolates and their hydrolysis products on microbial growth. *Journal of Applied Bacteriology*, *79*(2), 171-177. doi:10.1111/j.1365-2672.1995.tb00931.x
- Brown, K., & Hampton, M. (2011). Biological targets of isothiocyanates. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1810*(9), 888-894. doi:10.1016/j.bbagen.2011.06.004
- Brown, P., Tokuhisa, J., Reichelt, M., & Gershenzon, J. (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, *62*(3), 471-481. doi:10.1016/S0031-9422(02)00549-6
- Brüsewitz, G., Cameron, B., Chasseaud, L., Görler, K., Hawkins, D., Koch, H., & Mennicke, W. (1977). The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate. *Biochemical Journal*, *162*(1), 99-107. doi:10.3109/00498258209038932
- Burow, M., & Wittstock, U. (2009). Regulation and function of specifier proteins in plants. *Phytochemistry Reviews*, *8*(1), 87-99. doi:10.1007/s11101-008-9113-5
- Capizzo, F., & Roberts, R. J. (1970). Disposition of the hepatotoxin α -naphthylisothiocyanate (ANIT) in the rat. *Toxicology and applied pharmacology*, *17*(1), 262-271. doi:10.1016/0041-008X(70)90151-1
- Cartea, M. E., & Velasco, P. (2008a). Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, *7*(2), 213-229. doi:10.1007/s11101-007-9072-2

- Cartea, M. E., Velasco, P., Obregón, S., Padilla, G., & de Haro, A. (2008b). Seasonal variation in glucosinolate content in Brassica oleracea crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry*, *69*(2), 403-410. doi:10.1016/j.phytochem.2007.08.014
- Cejpek, K., Valušek, J., & Velíšek, J. (2000). Reactions of allyl isothiocyanate with alanine, glycine, and several peptides in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3560-3565. doi:10.1021/jf991019s
- Chen, C.-W., Rosen, R. T., & Ho, C.-T. (1998). Analysis of thermal degradation products of allyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate. In: ACS Publications.
- Chen, X., Yang, L., Zhang, N., Turpin, J. A., Buckheit, R. W., Osterling, C., Howard, O. (2003). Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *47*(9), 2810-2816. doi:10.1128/AAC.47.9.2810-2816.2003
- Cheung, K. L., Khor, T. O., & Kong, A.-N. (2009). Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation. *Pharmaceutical Research*, *26*(1), 224-231. doi:10.1007/s11095-008-9734-9
- Cho, H. J., Lim, D. Y., Kwon, G. T., Kim, J. H., Huang, Z., Song, H., Dong, Z. (2016). Benzyl isothiocyanate inhibits prostate cancer development in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) model, which is associated with the induction of cell cycle G1 arrest. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 264. doi:10.3390/ijms17020264
- Cieślik, E., Leszczyńska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., Sikora, E., & Pisulewski, P. M. (2007). Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables. *Food Chemistry*, *105*(3), 976-981. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.047
- Clarke, D. B. (2010). Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods*, *2*(4), 310-325. doi:10.1039/B9AY00280D
- Conaway, C. C., Getahun, S. M., Liebes, L. L., Pusateri, D. J., Topham, D. K., Botero-Omary, M., & Chung, F.-L. (2000). Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutrition and cancer*, *38*(2), 168-178. doi:10.1207/S15327914NC382_5
- Conrad, A., Kolberg, T., Engels, I., & Frank, U. (2006). In vitro study to evaluate the antibacterial activity of a combination of the haulm of nasturtium (*Tropaeoli majoris herba*) and of the roots of horseradish (*Armoraciae rusticanae radix*). *Arzneimittel-forschung*, *56*(12), 842-849.
- Cross, J. V., Rady, J. M., Foss Jr, F. W., Lyons, C. E., Macdonald, T. L., & Templeton, D. J. (2009). Nutrient isothiocyanates covalently modify and inhibit the inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemical Journal*, *423*(3), 315-321. doi:10.1042/BJ20091170
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*: John Wiley & Sons.

- De Luca, V., & St Pierre, B. (2000). The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in plant science*, 5(4), 168-173. doi:10.1016/S1360-1385(00)01575-2
- De Nicola, G. R., Montaut, S., Rollin, P., Nyegue, M., Menut, C., Iori, R., & Tatibouët, A. (2013). Stability of benzylic-type isothiocyanates in hydrodistillation-mimicking conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 137-142. doi:10.1021/jf3041534
- Dey, M., Ribnicky, D., Kurmukov, A. G., & Raskin, I. (2006). In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of a seed preparation containing phenethylisothiocyanate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(1), 326-333. doi:10.1124/jpet.105.096511
- Dinkova-Kostova, A. T., & Kostov, R. V. (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in molecular medicine*, 18(6), 337-347. doi:10.1016/j.molmed.2012.04.003
- Drobnica, L., Kristian, P., & Augustin, J. (1977). The chemistry of the—NCS group. In *The Chemistry of Cyanates and Their Thio Derivatives*, (Vol. Part 2, pp. 1003-1221): Wiley.
- Dufour, V., Stahl, M., & Baysse, C. (2015). The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology*, 161(2), 229-243. doi:10.1099/mic.0.082362-0
- EN ISO 9167-1:1995, D. (1995). Rapssamen—Bestimmung des Glucosinolatgehaltes—Teil 1: HPLC-Verfahren (ISO 9167-1: 1992). *DIN Deutsches Institut für Normung e.V*(ICS 67.200.20).
- Endo, A. (1985). Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *Journal of medicinal chemistry*, 28(4), 401-405.
- Ettlinger, M. G., & Lundeen, A. J. (1956). The structures of sinigrin and sinalbin; an enzymatic rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*, 78(16), 4172-4173.
- Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Lozniewski, A. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo [a] pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7610-7615. doi:10.1073/pnas.112203099
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5-51. doi:10.1016/S0031-9422(00)00316-2
- Fenwick, G., & Heaney, R. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feedingstuffs. *Food Chemistry*, 11(4), 249-271. doi:10.1016/0308-8146(83)90074-2
- Fernando, R. C., & Weiß-Schmidt, P. (2007). Sekundäre Pflanzenstoffe: Bioaktive Substanzen aus Obst und Gemüse in der Krebsprävention. *Erfahrungsheilkunde*, 56(04), 192-197. doi:10.1055/s-2007-968079
- Fimognari, C., Turrini, E., Ferruzzi, L., Lenzi, M., & Hrelia, P. (2012). Natural isothiocyanates: genotoxic potential versus chemoprevention. *Mutation Research*, 750(2), 107-131. doi:10.1016/j.mrrev.2011.12.001

- Fraenkel, G. S. (1959). The raison d'etre of secondary plant substances. *Science*, 1466-1470.
- Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Dziki, D., Sęczyk, Ł., Złotek, U., Różyło, R., Czyż, J. (2014). Anticancer and antioxidant activity of bread enriched with broccoli sprouts. *BioMed research international*, 2014. doi:10.1155/2014/608053
- Gellrich, C., Schieberle, P., & Wieser, H. (2003). Biochemical characterization and quantification of the storage protein (secalin) types in rye flour. *Cereal Chemistry*, 80(1), 102-109. doi:10.1094/CCHEM.2003.80.1.102
- Gil, V., & MacLeod, A. (1980). The effects of pH on glucosinolate degradation by a thioglucoside glucohydrolase preparation. *Phytochemistry*, 19(12), 2547-2551. doi:10.1016/S0031-9422(00)83916-3
- Grob, K., & Matile, P. (1979). Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root cells. *Plant Science Letters*, 14(4), 327-335. doi:10.1016/S0304-4211(79)90281-5
- Gupta, P., Wright, S. E., Kim, S.-H., & Srivastava, S. K. (2014). Phenethyl isothiocyanate: A comprehensive review of anti-cancer mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1846(2), 405-424. doi:10.1016/j.bbcan.2014.08.003
- Guzmán-Pérez, V., Bumke-Vogt, C., Schreiner, M., Mewis, I., Borchert, A., & Pfeiffer, A. F. (2016). Benzylglucosinolate derived isothiocyanate from *Tropaeolum majus* reduces gluconeogenic gene and protein expression in human cells. *PLoS One*, 11(9), e0162397. doi:10.1371/journal.pone.0162397.
- Halkier, B. A., & Du, L. (1997). The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in plant science*, 2(11), 425-431. doi:10.1016/S1360-1385(97)90026-1
- Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 303-333. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228
- Haller, D., Grune, T., & Rimbach, G. (2013). *Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe*: Springer.
- Hanschen, F., Brüggemann, N., Brodehl, A., Mewis, I., Schreiner, M., Rohn, S., & Kroh, L. (2012a). Characterization of products from the reaction of glucosinolate-derived isothiocyanates with cysteine and lysine derivatives formed in either model systems or broccoli sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7735-7745. doi:10.1021/jf301718g
- Hanschen, F., Klopsch, R., Oliviero, T., Schreiner, M., Verkerk, R., & Dekker, M. (2017a). Optimizing isothiocyanate formation during enzymatic glucosinolate breakdown by adjusting pH value, temperature and dilution in Brassica vegetables and Arabidopsis thaliana. *Scientific reports*, 7, 40807. doi:10.1038/srep40807
- Hanschen, F., Kühn, C., Nickel, M., Rohn, S., & Dekker, M. (2018). Leaching and degradation kinetics of glucosinolates during boiling of Brassica oleracea vegetables and the formation of their breakdown products. *Food Chemistry*, 263, 240-250. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.069

- Hanschén, F., Lamy, E., Schreiner, M., & Rohn, S. (2014). Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(43), 11430-11450. doi:10.1002/anie.201402639
- Hanschén, F., Rohn, S., Mewis, I., Schreiner, M., & Kroh, L. W. (2012b). Influence of the chemical structure on the thermal degradation of the glucosinolates in broccoli sprouts. *Food Chemistry*, 130(1), 1-8. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.109
- Hanschén, F., & Schreiner, M. (2017b). Isothiocyanates, nitriles, and epithionitriles from glucosinolates are affected by genotype and developmental stage in Brassica oleracea varieties. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1095. doi:10.3389/fpls.2017.01095
- Hanson, P., Yang, R. y., Chang, L. c., Ledesma, L., & Ledesma, D. (2009). Contents of carotenoids, ascorbic acid, minerals and total glucosinolates in leafy brassica pakchoi (*Brassica rapa* L. chinensis) as affected by season and variety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(5), 906-914. doi:10.1002/jsfa.3533
- Harnkarnsujarit, N., & Charoenrein, S. (2011). Influence of collapsed structure on stability of β -carotene in freeze-dried mangoes. *Food Research International*, 44(10), 3188-3194. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.008
- Hasapis, X., & MacLeod, A. J. (1982). Effects of metal ions on benzylglucosinolate degradation in *Lepidium sativum* seed autolysates. *Phytochemistry*, 21(3), 559-563. doi:10.1016/0031-9422(82)83140-3
- Hashem, F., & Saleh, M. (1999). Antimicrobial components of some cruciferae plants (*Diplotaxis harra* Forsk. and *Erucaria microcarpa* Boiss.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13(4), 329-332. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199906)13:4<329::AID-PTR458>3.0.CO;2-U
- Heaney, R. K., & Fenwick, G. R. (1995). Natural toxins and protective factors in Brassica species, including rapeseed. *Natural toxins*, 3(4), 233-237. doi:10.1002/nt.2620030412
- Hecht, S. S. (2000). Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metabolism Reviews*, 32(3-4), 395-411. doi:10.1081/DMR-100102342
- Hefnawy, T., El-Shourbagy, G., & Ramadan, M. (2012). Impact of adding chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour to wheat flour on the rheological properties of toast bread. *International Food Research Journal (Malaysia)*, 19(2), 521-525.
- Henry, C. (2010). Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(7), 657-659. doi:10.1038/ejcn.2010.101
- Hernández-Triana, M., Kroll, J., Proll, J., Noack, J., & Petzke, K. (1996). Benzyl-isothiocyanate (BITC) decreases quality of egg white proteins in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(6), 322-326. doi:10.1016/0955-2863(96)00033-2

- Hobbs, D., Ashouri, A., George, T., Lovegrove, J., & Methven, L. (2014). The consumer acceptance of novel vegetable-enriched bread products as a potential vehicle to increase vegetable consumption. *Food Research International*, *58*, 15-22. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.038
- Ioannou, Y., Burka, L., & Matthews, H. (1984). Allyl isothiocyanate: comparative disposition in rats and mice. *Toxicology and applied pharmacology*, *75*(2), 173-181. doi:10.1016/0041-008X(84)90199-6
- Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, *113*(3), 287. doi:10.1007/pl00013940
- Jerwood, S., & Cohen, J. (2008). Unexpected antimicrobial effect of statins. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *61*(2), 362-364. doi:10.1093/jac/dkm496
- Juge, N., Mithen, R., & Traka, M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(9), 1105-1127. doi:10.1007/s00018-007-6484-5
- Kapusta-Duch, J., Kopec, A., Piatkowska, E., Borczak, B., & Leszczynska, T. (2012). The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, *63*(4).
- Karban, R., Agrawal, A. A., & Mangel, M. (1997). The benefits of induced defenses against herbivores. *Ecology*, *78*(5), 1351-1355. doi:10.1890/0012-9658(1997)078[1351:TBOIDA]2.0.CO;2
- Karban, R., & Baldwin, I. T. (2007). Induced responses to herbivory. In *Induced responses to herbivory*: University of Chicago Press.
- Karlsson, I., Samuelsson, K., Ponting, D. J., Törnqvist, M., Ilag, L. L., & Nilsson, U. (2016). Peptide reactivity of isothiocyanates—implications for skin allergy. *Scientific Reports*, *6*(1), 1-12. doi:10.1038/srep21203
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, *20*(4), 861-875. doi:10.1007/s10068-011-0121-7
- Kawakishi, S., & Kaneko, T. (1987). Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *35*(1), 85-88.
- Keppler, J. K., Koudelka, T., Palani, K., Stuhldreier, M. C., Temps, F., Tholey, A., & Schwarz, K. (2014). Characterization of the covalent binding of allyl isothiocyanate to β -lactoglobulin by fluorescence quenching, equilibrium measurement, and mass spectrometry. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *32*(7), 1103-1117. doi:10.1080/07391102.2013.809605
- Kissen, R., Rossiter, J. T., & Bones, A. M. (2009). The 'mustard oil bomb': not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochemistry Reviews*, *8*(1), 69-86. doi:10.1007/s11101-008-9109-1

- Kjær, A. (1981). Glucosinolates and related compounds. *Food Chemistry*, 6(3), 223-234. doi:10.1016/0308-8146(81)90011-X
- Klopsch, R., Baldermann, S., Hanschen, F., Voss, A., Rohn, S., Schreiner, M., & Neugart, S. (2019). Brassica-enriched wheat bread: Unraveling the impact of ontogeny and breadmaking on bioactive secondary plant metabolites of pak choi and kale. *Food Chemistry*, 295, 412-422. doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.113
- Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7(3-4), 385-394. doi:10.1089/ars.2005.7.385
- Kolm, R. H., Danielson, U. H., Zhang, Y., Talalay, P., & Mannervik, B. (1995). Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. *Biochemical Journal*, 311(2), 453-459. doi:10.1042/bj3110453
- Koroleva, O. A., Davies, A., Deeken, R., Thorpe, M. R., Tomos, A. D., & Hedrich, R. (2000). Identification of a new glucosinolate-rich cell type in Arabidopsis flower stalk. *Plant Physiology*, 124(2), 599-608. doi:10.1104/pp.124.2.599
- Krell, M., Cvancar, L., Poloczek, M., Hanschen, F. S., & Rohn, S. (2021). Determination of isothiocyanate-protein conjugates in a vegetable-enriched bread. *Foods*, 10(6), 1300. doi:10.3390/foods10061300
- Krell, M., Hanschen, F. S., & Rohn, S. (2022). Formation and stability of isothiocyanate protein conjugates at different pH values and bread types enriched with nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). *Food Research International*, 111492. doi:10.1016/j.foodres.2022.111492
- Kroll, J., & Rawel, H. (1996). Chemical reactions of benzyl isothiocyanate with myoglobin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(3), 376-384. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199611)72:3<376::AID-JSFA670>3.0.CO;2-Y
- Kroll, J., Rawel, H., Kröck, R., Proll, J., & Schnaak, W. (1994). Interactions of isothiocyanates with egg white proteins. *Food/Nahrung*, 38(1), 53-60. doi:10.1002/food.19940380110
- Krul, C., Humblot, C., Philippe, C., Vermeulen, M., van Nuenen, M., Havenaar, R., & Rabot, S. (2002). Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model. *Carcinogenesis*, 23(6), 1009-1016. doi:10.1093/carcin/23.6.1009
- Kühn, C., Kupke, F., Baldermann, S., Klopsch, R., Lamy, E., Hornemann, S., Rohn, S. (2018a). Diverse excretion pathways of benzyl glucosinolate in humans after consumption of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.)—A pilot study. *Molecular nutrition & food research*, 62(20), 1800588. doi:doi.org/10.1002/mnfr.201800588
- Kühn, C., von Oesen, T., Hanschen, F. S., & Rohn, S. (2018b). Determination of isothiocyanate-protein conjugates in milk and curd after adding garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Food Research International*, 108, 621-627. doi:10.1016/j.foodres.2018.04.001

- Kühn, C., von Oesen, T., Herz, C., Schreiner, M., Hanschen, F. S., Lamy, E., & Rohn, S. (2018c). In vitro determination of protein conjugates in human cells by LC-ESI-MS/MS after benzyl isothiocyanate exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.8b01309
- Kumar, A., & Sabbioni, G. (2010). New biomarkers for monitoring the levels of isothiocyanates in humans. *Chemical research in toxicology*, 23(4), 756-765. doi:10.3109/1354750X.2010.517567
- Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D. J., & Gershenzon, J. (2001). The Arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *The Plant Cell*, 13(12), 2793-2807. doi:10.1105/tpc.010261
- Lamy, E., Hertrampf, A., Herz, C., Schüler, J., Erlacher, M., Bertele, D., Lauer, U. (2013a). Preclinical evaluation of 4-methylthiobutyl isothiocyanate on liver cancer and cancer stem cells with different p53 status. *PLoS One*, 8(8), e70846. doi:10.1371/journal.pone.0070846
- Lamy, E., Oey, D., Eißmann, F., Herz, C., Münstedt, K., Tinneberg, H. R., & Mersch-Sundermann, V. (2013b). Erucin and benzyl isothiocyanate suppress growth of late stage primary human ovarian carcinoma cells and telomerase activity in vitro. *Phytotherapy Research*, 27(7), 1036-1041. doi:10.1002/ptr.4798
- Lamy, E., Scholtes, C., Herz, C., & Mersch-Sundermann, V. (2011). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of isothiocyanates. *Drug Metabolism Reviews*, 43(3), 387-407. doi:10.3109/03602532.2011.569551
- Lee, H.-J., Lee, H.-J., Magesh, V., Nam, D., Lee, E.-O., Ahn, K. S., Kim, J.-Y. (2008). Shikonin, acetylshikonin, and isobutyroylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in lewis lung carcinoma-bearing mice. *Yakugaku Zasshi*, 128(11), 1681-1688. doi:10.1248/yakushi.128.1681
- Lee, Y. M., Seon, M. R., Cho, H. J., Kim, J.-S., & Park, J. H. Y. (2009). Benzyl isothiocyanate exhibits anti-inflammatory effects in murine macrophages and in mouse skin. *Journal of Molecular Medicine*, 87(12), 1251. doi:10.1007/s00109-009-0532-6
- Lewis, S. M., Li, Y., Catalano, M. J., Laciak, A. R., Singh, H., Seiner, D. R., Gates, K. S. (2015). Inactivation of protein tyrosine phosphatases by dietary isothiocyanates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(20), 4549-4552. doi:10.1016/j.bmcl.2015.08.065
- Lipowicz, B. (2017). Isothiocyanat-haltige Arzneimittel am Beispiel Angocin® Anti-Infekt N: Präklinik, Klinik eines modernen Phytotherapeutikums. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 38(S 01), V14. doi:10.1055/s-0037-1607129
- Lykkesfeldt, J., & Moller, B. (1993). Synthesis of benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L.(isothiocyanates as potent enzyme inhibitors). *Plant Physiology*, 102(2), 609-613. doi:10.1104/pp.102.2.609

- MacLeod, A. J., & Rossiter, J. T. (1985). The occurrence and activity of epithiospecifier protein in some cruciferae seeds. *Phytochemistry*, *24*(9), 1895-1898. doi:10.1016/S0031-9422(00)83087-3
- Mahéo, K., Morel, F., Langouët, S., Kramer, H., Le Ferrec, E., Ketterer, B., & Guillouzo, A. (1997). Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Research*, *57*(17), 3649-3652.
- Man, S., Păucean, A., Muste, S., & Pop, A. (2015). Effect of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour addition on physicochemical properties of wheat bread. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, *72*(1), 41-49. doi:10.15835/buasvmcn-fst:11023
- Márton, M.-R., Krumbein, A., Platz, S., Schreiner, M., Rohn, S., Rehmers, A., Lamy, E. (2013). Determination of bioactive, free isothiocyanates from a glucosinolate-containing phytotherapeutic agent: a pilot study with in vitro models and human intervention. *Fitoterapia*, *85*, 25-34. doi:10.1016/j.fitote.2012.12.016
- Matsuo, M. (1968). Biosynthesis of sinigrin. V. On the origin of thioglucoside moiety of sinigrin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *16*(6), 1128-1129. doi:10.1248/cpb.16.1128
- McDermott, E., & Pace, J. (1957). The content of amino-acids in white flour and bread. *British Journal of Nutrition*, *11*(4), 446-452. doi:10.1079/BJN19570067
- Mensink, G., Burger, M., Beitz, R., Henschel, Y., & Hintzpetter, B. (2002). *Was essen wir heute?* (Vol. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes): Robert Koch-Institut.
- Mi, L., Gan, N., & Chung, F.-L. (2011). Isothiocyanates inhibit proteasome activity and proliferation of multiple myeloma cells. *Carcinogenesis*, *32*(2), 216-223. doi:10.1093/carcin/bgq242
- Michaud, D. S., Spiegelman, D., Clinton, S. K., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Giovannucci, E. L. (1999). Fruit and vegetable intake and incidence of bladder cancer in a male prospective cohort. *Journal of the National Cancer Institute*, *91*(7), 605-613. doi:10.1093/jnci/91.7.605
- Mikkelsen, M. D., Petersen, B. L., Olsen, C., & Halkier, B. (2002). Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino acids*, *22*(3), 279-295. doi:10.1007/s007260200014
- Mithen, R. (2001). Glucosinolates and their degradation products. *Advances in Botanical Research*.
- Mithen, R., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S., & Johnson, I. (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 967-984. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<967::AID-JSFA597>3.0.CO;2-V
- Morales-López, J., Centeno-Álvarez, M., Nieto-Camacho, A., López, M. G., Pérez-Hernández, E., Pérez-Hernández, N., & Fernández-Martínez, E. (2017). Evaluation of antioxidant and hepatoprotective effects of white cabbage essential oil. *Pharmaceutical Biology*, *55*(1), 233-241. doi:10.1080/13880209.2016.1258424.

- Nakamura, T., Kawai, Y., Kitamoto, N., Osawa, T., & Kato, Y. (2009). Covalent modification of lysine residues by allyl isothiocyanate in physiological conditions: plausible transformation of isothiocyanate from thiol to amine. *Chemical research in toxicology*, 22(3), 536-542. doi:10.1021/tx8003906
- O'Dell, B. L. (1984). Bioavailability of Trace Elements. *Nutrition Reviews*, 42(9), 301-308. doi:10.1111/j.1753-4887.1984.tb02370.x
- Oerlemans, K., Barrett, D. M., Suades, C. B., Verkerk, R., & Dekker, M. (2006). Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chemistry*, 95(1), 19-29. doi:10.1016/j.foodchem.2004.12.013
- Ohashi, M., Wilson, J., & Djerassi, C. (1963). Mass spectra of isothiocyanates. *Acta Chemica Scandinavica*, 17, 2143-2157. doi:10.3891/acta.chem.scand.17-2143
- Palliyaguru, D. L., Yuan, J. M., Kensler, T. W., & Fahey, J. W. (2018). Isothiocyanates: translating the power of plants to people. *Molecular nutrition & food research*, 62(18), 1700965. doi:10.1002/mnfr.201700965
- Pasini, G., Simonato, B., Giannattasio, M., Peruffo, A. D., & Curioni, A. (2001). Modifications of wheat flour proteins during in vitro digestion of bread dough, crumb, and crust: an electrophoretic and immunological study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2254-2261. doi:10.1021/jf0014260
- Pawlik, A., Wiczak, A., Kaczyńska, A., Antosiewicz, J., & Herman-Antosiewicz, A. (2013). Sulforaphane inhibits growth of phenotypically different breast cancer cells. *European journal of nutrition*, 52(8), 1949-1958. doi:10.1007/s00394-013-0499-5
- Pfalz, M., Vogel, H., & Kroymann, J. (2009). The gene controlling the indole glucosinolate modifier1 quantitative trait locus alters indole glucosinolate structures and aphid resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(3), 985-999. doi:10.1105/tpc.108.063115
- Pichersky, E., & Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5(10), 439-445. doi:10.1016/S1360-1385(00)01741-6
- Platz, S., Kühn, C., Schiess, S., Schreiner, M., Mewis, I., Kemper, M., Rohn, S. (2013). Determination of benzyl isothiocyanate metabolites in human plasma and urine by LC-ESI-MS/MS after ingestion of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(23), 7427-7436. doi:10.1007/s00216-013-7176-7
- Podhradský, D., Drobnica, L., & Kristian, P. (1979). Reactions of cysteine, its derivatives, glutathione, coenzyme A, and dihydrolipoic acid with isothiocyanates. *Experientia*, 35(2), 154-155. doi:10.1007/BF01920581
- Qazanfarzadeh, Z., Kadivar, M., Shekarchizadeh, H., & Porta, R. (2021). Rye secalin characterisation and use to improve zein-based film performance. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(2), 742-752. doi:10.1111/ijfs.14718

- Rabenberg, M., & Mensink, G. (2011). *Obst-und Gemüsekonsum heute* (Vol. GBE kompakt 2(6)). www.rki.de/gbe-kompakt (Stand: 01.09.2011): Robert Koch-Institut Berlin
- Rade-Kukic, K., Schmitt, C., & Rawel, H. M. (2011). Formation of conjugates between β -lactoglobulin and allyl isothiocyanate: Effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties. *Food hydrocolloids*, 25(4), 694-706. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.08.018
- Rask, L., Andréasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., & Meijer, J. (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant molecular biology*, 42(1), 93-114. doi:10.1023/A:1006380021658
- Rawel, H., Kroll, J., Haebel, S., & Peter, M. (1998a). Reactions of a glucosinolate breakdown product (benzyl isothiocyanate) with myoglobin. *Phytochemistry*, 48(8), 1305-1311. doi:10.1016/S0031-9422(98)00101-0
- Rawel, H., Kroll, J., & Schröder, I. (1998b). In vitro enzymatic digestion of benzyl- and phenylisothiocyanate-derivatized food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5103-5109. doi:10.1021/jf980244r
- Rawel, H., Kroll, J., & Schröder, I. (1998c). Reactions of isothiocyanates with food proteins: Influence on enzyme activity and tryptical degradation. *Food/Nahrung*, 42(03-04), 197-199. doi:10.1016/S0031-9422(98)00101-0
- Rosa, E. A. (1997). Daily variation in glucosinolate concentrations in the leaves and roots of cabbage seedlings in two constant temperature regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(3), 364-368. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199703)73:3<364::AID-JSFA742>3.0.CO;2-O
- Rosenthal, G. A., & Janzen, D. (1979). *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites* (second ed. Vol. I: The Chemical Participants): Elsevier.
- Rungapamestry, V., Duncan, A. J., Fuller, Z., & Ratcliffe, B. (2006). Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cooked for different durations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7628-7634. doi:10.1021/jf0607314
- Saha, S., Hollands, W., Teucher, B., Needs, P. W., Narbad, A., Ortori, C. A., Kroon, P. A. (2012). Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Molecular nutrition & food research*, 56(12), 1906-1916. doi:10.1002/mnfr.201200225
- Sarvan, I., Verkerk, R., & Dekker, M. (2012). Modelling the fate of glucosinolates during thermal processing of Brassica vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 49(2), 178-183. doi:10.1016/j.lwt.2012.07.005
- Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M., Zrenner, R., Winkler, J., Krumbein, A. (2012). UV-B-induced secondary plant metabolites-potential benefits for plant and human health. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(3), 229-240. doi:10.1080/07352689.2012.664979

- Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Stephenson, K. K., Wade, K. L., Talalay, P. (2006). Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutrition and cancer*, 55(1), 53-62. doi:10.1207/s15327914nc5501_7
- Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K., & Talalay, P. (1998). Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 7(12), 1091-1100.
- Singh, J., Upadhyay, A., Prasad, K., Bahadur, A., & Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 106-112. doi:10.1016/j.jfca.2006.08.002
- Sofrata, A., Santangelo, E. M., Azeem, M., Borg-Karlson, A.-K., Gustafsson, A., & Pütsep, K. (2011). Benzyl isothiocyanate, a major component from the roots of *Salvadora persica* is highly active against Gram-negative bacteria. *PLoS One*, 6(8), e23045. doi:10.1371/journal.pone.0023045
- Spencer, G. F., & Daxenbichler, M. E. (1980). Gas chromatography-mass spectrometry of nitriles, isothiocyanates and oxazolidinethiones derived from cruciferous glucosinolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(4), 359-367. doi:10.1002/jsfa.2740310406
- Spöttel, J., Brockelt, J., Badekow, S., & Rohn, S. (2021a). Immunological analysis of isothiocyanate-modified α -lactalbumin using high-performance thin layer chromatography. *Molecules*, 26(7), 1842. doi:10.3390/molecules26206247
- Spöttel, J., Brockelt, J., Falke, S., & Rohn, S. (2021b). Characterization of conjugates between α -lactalbumin and benzyl isothiocyanate—effects on molecular structure and proteolytic stability. *Molecules*, 26(20), 6247. doi:10.3390/molecules26206247
- Stan, S. D., Kar, S., Stoner, G. D., & Singh, S. V. (2008). Bioactive food components and cancer risk reduction. *Journal of cellular biochemistry*, 104(1), 339-356. doi:10.1002/jcb.21623
- Steinbrecher, A., Nimptsch, K., Hüsing, A., Rohrmann, S., & Linseisen, J. (2009). Dietary glucosinolate intake and risk of prostate cancer in the EPIC-Heidelberg cohort study. *International journal of cancer*, 125(9), 2179-2186. doi:10.1002/ijc.24555
- Subedi, L., Venkatesan, R., & Kim, S. Y. (2017). Neuroprotective and anti-inflammatory activities of allyl isothiocyanate through attenuation of JNK/NF- κ B/TNF- α signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1423. doi:10.3390/ijms18071423
- Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., & Czyż, J. (2013). The influence of protein–flavonoid interactions on protein digestibility in vitro and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. *Food Chemistry*, 141(1), 451-458. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.048

- Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to cells*, 16(2), 123-140. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x
- Traka, M., & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 269-282. doi:10.1007/s11101-008-9103-7
- Uda, Y., Kurata, T., & Arakawa, N. (1986). Effects of pH and ferrous ion on the degradation of glucosinolates by myrosinase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(11), 2735-2740. doi:10.1080/00021369.1986.10867832
- Vaughn, S. F., & Boydston, R. A. (1997). Volatile allelochemicals released by crucifer green manures. *Journal of Chemical Ecology*, 23(9), 2107-2116. doi:10.1023/B:JOEC.0000006432.28041.82
- Veeranki, O. L., Bhattacharya, A., Tang, L., Marshall, J. R., & Zhang, Y. (2015). Cruciferous vegetables, isothiocyanates, and prevention of bladder cancer. *Current Pharmacology Reports*, 1(4), 272-282. doi:10.1007/s40495-015-0024-z
- Verhoeven, D. T., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Verhagen, H., & van den Brandt, P. A. (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 5(9), 733-748.
- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., Mithen, R. (2009). Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular nutrition & food research*, 53(S2), S219-S219. doi:10.1002/mnfr.200800065
- Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I. (2018). Bovine milk allergens: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 137-164. doi:10.1111/1541-4337.12318
- Voorrips, L., Goldbohm, R., van Poppel, G., Sturmans, F., Hermus, R., & Van Den Brandt, P. (2000). Vegetable and fruit consumption and risks of colon and rectal cancer in a prospective cohort study The Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *American journal of epidemiology*, 152(11), 1081-1092. doi:10.1093/aje/152.11.1081
- Wermter, N. S., Rohn, S., & Hanschen, F. S. (2020). Seasonal variation of glucosinolate hydrolysis products in commercial white and red cabbages (*Brassica oleracea* var. capitata). *Foods*, 9(11), 1682. doi:10.3390/foods9111682
- WHO. (2004). *Cruciferous vegetables, isothiocyanates and indoles*: IARC Handbooks.
- WHO. (2021). Obesity and Overweight. *Online verfügbar* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (Zugriff am 03.05.2022).
- Wieczorek, M. N., Walczak, M., Skrzypczak-Zielińska, M., & Jeleń, H. H. (2018). Bitter taste of Brassica vegetables: The role of genetic factors, receptors, isothiocyanates, glucosinolates, and flavor context. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(18), 3130-3140. doi:10.1080/10408398.2017.1353478

- Wielanek, M., Urbanek, H., & Majorowicz, H. (2004). Endogenous hydrolysis of glucotropaeolin to benzyl isothiocyanate in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. *biotechnologia*, *1*(64), 210-220.
- Wiesner, M., Zrenner, R., Krumbein, A., Glatt, H., & Schreiner, M. (2013). Genotypic variation of the glucosinolate profile in pak choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(8), 1943-1953. doi:10.1021/jf303970k
- Williams, P. C. (1973). The use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *24*(3), 343-348. doi:10.1002/jsfa.2740240311
- Wink, M. (1999). *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology* (Vol. 3): Taylor & Francis US.
- Winter, A. (1954). Untersuchungen über die Natur der flüchtigen antibiotischen Wirkstoffe aus *Tropaeolum maius*. *Naturwissenschaften*, *41*(14), 337-338. doi:10.1007/BF00644509
- Wittstock, U., & Halkier, B. A. (2002). Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in plant science*, *7*(6), 263-270. doi:10.1016/S1360-1385(02)02273-2
- Wittstock, U., Kurzbach, E., Herfurth, A.-M., & Stauber, E. (2016). Glucosinolate breakdown. *Advances in Botanical Research*, *80*, 125-169. doi:10.1016/bs.abr.2016.06.006
- Zhang, Y. (2004). Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *555*(1-2), 173-190. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.04.017
- Zhang, Y. (2012). The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. *Carcinogenesis*, *33*(1), 2-9. doi:10.1093/carcin/bgr255
- Zhang, Y., & Talalay, P. (1994). Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Research*, *54*(7 Supplement), 1976s-1981s.

Anhang

Anhang I Rezepturen der Brote mit unterschiedlicher Applikationsart und diverser Pflanzenteile der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.), sowie Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.)

Tabelle 9: Zusammensetzung der hergestellten Teige, sowie Zusatzart und -menge des Pflanzenmaterials.

Kürzel	Weizenmehl Typ 450 [g]	Salz [g]	Zucker [g]	Hefe [g]	Wasser [g]	Referenz [g]	Probe [g]	Material	Zusatzmenge [g]
Rezeptur 1.1	484	7	6	7	308	433	360	Kapuzinerkresseblätter gefriergetrocknet	8,35
Rezeptur 1.2	511	7	7	7	288	461	116	Kapuzinerkresseblätter gefriergetrocknet	4,99
Rezeptur 1.3	483	10	8	7	280	218	110	Kapuzinerkresseblätter gefriergetrocknet	4,98
Rezeptur 2.1	495	9	8	7	261	390	382	Gartenkresse frisch	6,14
Rezeptur 2.2	502	7	6	7	274	402	389	Gartenkresse frisch	6,10
Rezeptur 2.3	514	9	7	7	280	425	388	Gartenkresse frisch	6,91
Rezeptur 3.1	455	12	7	7	257	532	209	Kapuzinerkresseblätter gefriergetrocknet	3,00
Rezeptur 3.2	450	9	7	7	293	497	241	Kapuzinerkresseblätter gefriergetrocknet	3,79
Rezeptur 3.3	502	4	3	7	284	400	393	Kapuzinerkresseblätter gefriergetrocknet	4,10

Kürzel	Weizenmehl Typ 450 [g]	Salz [g]	Zucker [g]	Hefe [g]	Wasser [g]	Referenz [g]	Probe [g]	Material	Zusatzmenge [g]
Rezeptur 4.1	500	5	5	7	273	391	391	Gartenkresse frisch	9,33
Rezeptur 4.2	501	7	4	7	265	390	390	Gartenkresse frisch	8,80
Rezeptur 4.3	507	7	4	7	274	397	397	Gartenkresse frisch	9,86
KBLÄ 1% Nr. 1	507	6	7	7	271	399	393	Kapuzinerkresseblätter frisch	3,53
KBLÄ 1% Nr. 2	514	7	6	7	264	397	393	Kapuzinerkresseblätter frisch	3,18
KBLÄ 1% Nr. 3	505	8	5	7	279	398	397	Kapuzinerkresseblätter frisch	3,54
KBLÄ 5% Nr. 1	505	7	5	7	283	430	400	Kapuzinerkresseblätter frisch	19,0
KBLÄ 5% Nr. 2	503	7	4	7	285	402	402	Kapuzinerkresseblätter frisch	20,0
KBLÄ 5% Nr. 3	510	5	6	7	279	403	401	Kapuzinerkresseblätter frisch	21,0
KBLÜ Nr. 1	505	7	7	7	268	394	394	Kapuzinerkresseblüten frisch	5,64
KBLÜ Nr. 2	490	8	6	7	264	387	382	Kapuzinerkresseblüten frisch	5,77
KBLÜ Nr. 3	510	8	6	7	268	396	394	Kapuzinerkresseblüten frisch	5,34

Anhang II Rezepturen der diversen Brottypen

Tabelle 10: Zusammensetzung der hergestellten Teige diverser Brotsorten, sowie Zusatzmenge an gefriergetrockneter Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L).

Probe	Weizenmehl Typ 450 [g]	Weizen- vollkorn- mehl [g]	Roggen- vollkorn- mehl [g]	Dinkelmehl Typ 630 [g]	Kicher- erbsen- mehl [g]	Zucker [g]	Salz [g]	Hefe [g]	Sauer- teig [g]	Soda [g]	Wasser [g]	Referenz [g]	Probe [g]	Zusatz- menge [g]
WVK 1	-	270	-	-	-	2	2	3,46	-	-	180	252	200	4,99
WVK 2	-	270	-	-	-	3	2	3,75	-	-	176	252	200	5,05
WVK 3	-	221	-	-	-	2	2	3,57	-	-	170	190	200	5,01
RVK 1	-	205	304	-	-	-	9	7	15	-	351	670	204	5,06
RVK 2	-	205	304	-	-	-	6	7	15	-	350	659	202	5,01
RVK 3	-	203	306	-	-	-	8	7	15	-	337	639	202	4,98
DMB 1	-	-	-	275	-	2	2	3,39	-	-	199	266	201	5,07
DMB 2	-	-	-	273	-	3	2	3	-	-	170	247	200	4,99
DMB 3	-	-	-	273	-	3	3	4	-	-	185	263	200	4,95
WSB Basis	250	252	-	-	-	-	6	-	-	7	333	400	-	-
WSB 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	102	2,51
WSB 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	2,50
WSB 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	103	2,53
KEMB 1	131	-	-	-	201	-	5	7	-	-	192	291	202	5,07
KEMB 2	131	-	-	-	202	-	6	7	-	-	199	275	204	5,06
KEMB 3	132	-	-	-	222	-	6	7	-	-	182	334	202	4,97

Anhang III Rezepturen der Modellbrote mit unterschiedlichen pH-Werten

Tabelle 11: Zusammensetzung der hergestellten Teige für die Modellbrote mit unterschiedlichen pH-Werten und die Zusatzmenge an gefriergetrockneter Kapuzinerkresse.

Probenname	Weizenmehl Typ 450 [g]	pH-Lösung [g]	Art der pH-Lösung	Gesamtmenge [g]	Zusatzmenge [g]
Referenz	180,8	90,3	reinst Wasser	271,1	-
Brot pH 3,4 I	60,3	30,5	Milchsäure-Lösung pH 2	90,8	2,00
Brot pH 3,4 II	60,7	30,5	Milchsäure-Lösung pH 2	91,2	2,00
Brot pH 3,4 III	60,3	30,2	Milchsäure-Lösung pH 2	90,5	2,00
Brot pH 5,0 I	59,8	29	Milchsäure-Lösung pH 4	88,8	2,00
Brot pH 5,0 II	59,8	29,6	Milchsäure-Lösung pH 4	89,4	2,04
Brot pH 5,0 III	60,3	29	Milchsäure-Lösung pH 4	89,3	2,03
Brot pH 5,6 I	59,6	30,2	reinst Wasser	89,8	2,04
Brot pH 5,6 II	60,5	29,9	reinst Wasser	90,4	2,07
Brot pH 5,6 III	60,1	30,2	reinst Wasser	90,3	2,00
Brot pH 7,3 I	60,5	29,6	Natriumhydroxid-Lösung pH 8	90,1	1,99
Brot pH 7,3 II	60,1	30,2	Natriumhydroxid-Lösung pH 8	90,3	1,99
Brot pH 7,3 III	60,2	29,5	Natriumhydroxid-Lösung pH 8	89,7	2,01
Brot pH 7,9 I	60	30,1	Natriumhydroxid-Lösung pH 9	90,1	2,05
Brot pH 7,9 II	60,3	30,4	Natriumhydroxid-Lösung pH 9	90,7	2,00
Brot pH 7,9 III	59,7	30	Natriumhydroxid-Lösung pH 9	89,7	1,99
Brot pH 10,1 I	60,5	29,8	Natriumhydroxid-Lösung pH 11	90,3	2,02
Brot pH 10,1 II	59,9	30,1	Natriumhydroxid-Lösung pH 11	90	2,05
Brot pH 10,1 III	59,6	29,7	Natriumhydroxid-Lösung pH 11	89,3	1,98
Brot pH 11,6 I	60,1	30	Natriumhydroxid-Lösung pH 13	90,1	2,05
Brot pH 11,6 II	59,7	29,8	Natriumhydroxid-Lösung pH 13	89,5	2,06
Brot pH 11,6 III	60	29,9	Natriumhydroxid-Lösung pH 13	89,9	2,01
Brot Kresse-Suspension I	59,8	29,9	reinst Wasser	89,7	2,00
Brot Kresse-Suspension II	60,6	29,9	reinst Wasser	90,5	2,00
Brot Kresse-Suspension III	60,6	29,4	reinst Wasser	90	2,01

Anhang IV Zusätzliche Daten zu den Ergebnissen

Daten zu den Werten in Kapitel 4.5.2, Abbildung 17

Tabelle 12: Analyierte Gehalte der Abbauprodukte Benzylisothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) in den unterschiedlichen Brottypen während einer Lagerung von fünf Tagen, untersucht an Tag 1, 3 und 5. Abkürzungen: WVK: Weizenvollkornbrot; RVK: Roggenvollkornbrot; DMB: Dinkelmehlbrot; KEMB: Kichererbsenmehlbrot; WSB: Weizen-Sodabrot. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei echten Replikaten im technischen Duplikat.

Brottyp	BITC [nmol/g Brot]			BC [nmol/g Brot]		
	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 1	Tag 3	Tag 5
WVK	71,36 \pm 17,54	62,48 \pm 25,11	62,41 \pm 12,68	9,24 \pm 1,65	2,63 \pm 1,52	7,91 \pm 1,51
RVK	34,08 \pm 14,741	58,60 \pm 43,20	47,37 \pm 29,84	8,98 \pm 0,75	9,86 \pm 1,80	8,84 \pm 1,90
DMB	21,14 \pm 2,51	13,98 \pm 2,04	7,83 \pm 3,67	7,52 \pm 1,73	0,56 \pm 0,32	5,90 \pm 1,37
KEMB	30,48 \pm 6,40	30,39 \pm 8,74	25,25 \pm 10,07	10,10 \pm 2,75	11,58 \pm 2,10	10,39 \pm 1,68
WSB	15,38 \pm 11,63	5,33 \pm 2,87	4,00 \pm 1,84	3,60 \pm 0,50	3,02 \pm 0,24	3,056 \pm 0,10

Daten zu den Werten in Kapitel 4.5.2, Abbildung 18

Tabelle 13: Analyierte Gehalte vom Aminosäurekonjugat BITC-Lysin (BITC-Lys) in den unterschiedlichen Brottypen während einer Lagerung von fünf Tagen, untersucht an Tag 1, 3 und 5. Abkürzungen: WVK: Weizenvollkornbrot; RVK: Roggenvollkornbrot; DMB: Dinkelmehlbrot; KEMB: Kichererbsenmehlbrot; WSB: Weizen-Sodabrot. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei echten Replikaten im technischen Duplikat.

Brottyp	BITC-Lys [nmol/g Brot]		
	Tag 1	Tag 3	Tag 5
WVK	15,59 \pm 8,17	7,28 \pm 1,95	1,76 \pm 0,10
RVK	2,19 \pm 2,28	3,62 \pm 1,48	3,45 \pm 0,39
DMB	3,36 \pm 1,90	2,87 \pm 1,17	2,33 \pm 1,16
KEMB	0,24 \pm 0,054	0,48 \pm 0,57	7,85 \pm 6,46
WSB	33,95 \pm 22,58	13,48 \pm 4,83	17,58 \pm 13,03

Daten zu den Werten in Kapitel 4.4, Abbildung 19

Tabelle 14: Analyierte Gehalte der Abbauprodukte Benzylisothiocyanat (BITC) und Benzylcyanid (BC) in den unterschiedlichen Broten mit spezifischen pH-Werten (Modellbrote). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei echten Replikaten im technischen Duplikat.

„pH-Brot“	BC [nmol/g Brot]	BITC [nmol/g Brot]
pH 3,4	472,18 \pm 37,77	6,54 \pm 2,27
pH 5,0	11,10 \pm 1,43	8,13 \pm 0,25
pH 5,6	9,41 \pm 0,82	5,92 \pm 1,69
pH 7,3	10,36 \pm 1,24	4,74 \pm 1,68
pH 7,9	9,37 \pm 1,40	5,09 \pm 0,69
pH 10,1	11,12 \pm 0,93	7,63 \pm 2,47
pH 11,6	9,19 \pm 1,25	6,29 \pm 1,73







Anhang V Proteingehalte der Referenzbrote nach KJELDAHL















Tabelle 15: Durchschnittliche Proteingehalte der Referenzbrote nach Kjeldahl. Angegeben sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung von drei echten Replikaten im technischen Duplikat. ¹Von WSB und dem pH-Modellbrot wurde nur ein Referenzbrot hergestellt und im technischen Duplikat analysiert.




Brot	Mittlerer Proteingehalt [%]	Brot	Mittlerer Proteingehalt [%]
Rezeptur 1	6,4 ± 0,2	WVK	6,9 ± 0,1
Rezeptur 2	6,2 ± 0,2	RVK	5,4 ± 0,4
Rezeptur 3	6,2 ± 0,5	DMB	7,9 ± 0,1
Rezeptur 4	6,6 ± 0,1	WSB ¹	6,3 ± 0,1
KBLÄ 1%	6,0 ± 0,2	KEMB	10,5 ± 0,5
KBLÄ 5%	5,5 ± 0,1	pH-Modellbrot ¹	6,5 ± 0,1
KBLÜ	6,7 ± 0,1		

Anhang VI Auflistung der verwendeten Chemikalien

Tabelle 16: Verwendete Gefahrstoffe mit ihrer Einstufung nach der VO (EG) Nr. 1272/2008.

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Ameisensäure		H226, H302, H314, H331	P210, P280, P303+361+353, P304+340+310, P305+351+338, P403+233
Arylsulfatase (von <i>Helix pomatia</i>)	Kein gefährlicher Stoff gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Benzonitril (≥99.9 %),		H302+312	P264, P270, P280, P301+312, P302+352+312, P362+364
Benzylcyanid (≥98 %)		H301+311, H330	P280, P 302+352, P304+340, P308+310
Benzylglucosinolat (Glucotropaeolin)		H317	P280, P302+352
Benzylisothiocyanat (≥98.0%)		H302, H312, H332, H334, H315, H319, H335	P280, P337+313, P301+330+331, P305+351+338, P310, P304+340, P332+313
Benzylisothiocyanat- Cystein	Kein gefährlicher Stoff gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Benzylisothiocyanat-Lysin	Kein gefährlicher Stoff gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Borsäure (Pulver, Lösung 4%)		H360FD	P201, P308+313, P280
DEAE-Sephadex® A-25	Kein gefährlicher Stoff gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		

Dichlormethan (GC ultra grade)		H315, H319, H335, H336, H351, H373	P261, P281, P305+351+338
Ethanol		H225, H319	P210, P240, P305+351+338, P103+233
Glucobrassicin Kaliumsalz		H317	P261, P272, P280, P333+313, P362+364, P501
Glucoraphanin Kaliumsalz	Kein gefährlicher Stoff gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Imidazol		H360D, H302, H314	P201, P280, P301+330+331, P305+351+338, P308+310
Kjeldahl-Tablette TCT (3,71 g; aus K ₂ SO ₄ ; CuSO ₄ ·5 H ₂ O; TiO ₂)		H319, H410	P273, P280, P305+351+338
Methanol (LC-MS grade)		H225, H331, H311, H301, H370	P210, P233, P280, P302+352, P304+340, P308+310, P403+235
Methylenblau		H302	P301+312+330
Methylrot	Kein gefährlicher Stoff gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Milchsäure		H314, H318	P264, P280, P302+352, P305+351+338, P332+313, P362+364
Natriumhydroxid (≥98%)		H290, H314	P280, P308+310, P301+330+331, P305+351+338
Natriumsulfat	Kein gefährlicher Stoff gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Pancreatin (von porcine pancreas)		H315, H317, H319, H334, H335	P280, P305+351+338, P342+311
Pepsin (von porcine gastric mucosa)		H315, H319, H334, H335	P261, P284, P305+351+338, P342+311, P405
Pronase E (von Streptomyces griseus)		H315, H319, H334, H335	P260, P305+351+338, P304+341, P342+311, P302+352
Salzsäure (37%)		H290, H314, H335	P260, P280, P303+361+353, P304+340+310, P305+351+338
Salzsäure (0,1 M)		H290	P234, P390

Schwefelsäure (96-98%, p.a.)		H290, H314	P280, P308+310, P305+351+338, P301+330+331
Sinigrin Kaliumsalz		H317	P261, P272, P280, P333+313, P362+364, P501
Trichloressigsäure (TCA, \geq 99%)		H314, H410	P273, P280, P303+361+353, P304+340, P305+351+388, P310, P391
Wasser (LC-MS grade)	Kein gefährlicher Stoff gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Datum

Mareike Brigitte Gertrud Krell