Einfluss von Methylglyoxal auf die Maillard-Reaktion beim Backprozess und *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Diplom-Lebensmittelchemiker Tobias Jost geb. am 10. Juni 1991 in Wolfen

- erster Gutachter: Prof. Dr. Marcus A. Glomb (Halle)
- zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Henle (Dresden)

Datum der Einreichung: 25.03.2021

Datum der Verteidigung: 12.07.2021

DANKSAGUNG

Im Folgenden möchte ich den Personen danken, die mich während der Promotionszeit fachlich wie auch persönlich unterstützt haben. Mein Dank gilt als erstes Professor Marcus Glomb für die Unterstützung bei der Erlangung meines Promotionsstipendiums, für die fachliche Betreuung während meiner Zeit als Mitarbeiter im Arbeitskreis und darüber hinaus sowie für die stets kritischen, jedoch produktiven Besprechungen. Ich danke Professor Thomas Henle für die Bereitschaft als Zweitgutachter und für die zahlreichen freundlichen Gesprächen bei Fachtagungen. Ein großer Dank gilt meinen ehemaligen Oberassistenten des Arbeitskreises. Ich danke Dr. Mareen Smuda für die intensive Betreuung während meiner Anfangszeit als Doktorand und die Unterstützung bei zahlreichen Fragestellungen, insbesondere bei organischen Synthesen. Ich danke Dr. Christian Henning für seine experimentellen Zuarbeiten und für die ständige Bereitschaft bei technischen Problemen der verschiedenen analytischen Geräte. Ich danke Dr. Thomas Heymann für seine stets offene Tür, seinen fachlichen Ratschlägen, seinem Engagement in der Lehre und für seine immer humorvollen Art, die so manchen schlechten Tag aufgewertet hat. Daneben danke ich allen anderen ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für ein kollegiales Miteinander, insbesondere meinem guten Freund Dr. Alexander Klaus, der über die fachliche Zusammenarbeit hinaus ein treuer Begleiter durch diese aufregende Zeit war.

Des Weiteren möchte ich den Menschen danken, die durch ihre fachlichen Zuarbeiten einen wesentlichen Beitrag zu den vorliegenden Ergebnissen beigetragen haben. Das sind in erster Linie meine Diplomanden Johannes Rätzer, Neele Puhlmann, Sophia Thiele, Florian Geyer und Stephan Weber – danke für eure zuverlässige und gewissenhafte Arbeit. Ich danke Dr. Alexander Zipprich und Sabine Pohl vom Universitätsklinikum (KIM I) für die angenehme Kooperation im Rahmen unserer Kollagen-Studie. Ich danke den Werksleitern der HARRY Brot GmbH Henry Coldewey und Volker Dürkob für die Kooperation im Rahmen der Backwaren-Studie. Ich danke Dr. Frank Hirche und Dr. Holger Kluge vom Arbeitskreis von Professorin Gabriele Stangl für die Möglichkeit der Durchführung von Gesamtproteinbestimmungen mit dem nötigen Probendurchsatz. Ich danke Dr. Andrej Frolov und Annegret Laub vom Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie für die Aufnahme hochaufgelöster Massenspektren. Danke an Dr. Annemarie Kramell für die Durchführung der Farbmessung. Danke an Dr. Uwe Morgenstern und Andreas Kiowski für die Hilfsbereitschaft bei gaschromatographischen Fragestellungen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung außerhalb des Labors danken, insbesondere Robert Berger, Dr. Bob-Dan Lechner, Dr. Witali Schmidt sowie meiner Verlobten Natalie, die mich in dieser Zeit am meisten unterstützt hat.

VORWORT

Diese Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Marcus A. Glomb, Fachbereich Lebensmittelchemie, am Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt. Die Ergebnisse entstanden im Zeitraum von Juli 2014 bis Juni 2018 im Rahmen einer Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter. Nach Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt wurde das Projekt von Juli 2014 bis Juni 2015 finanziert. Die vorliegende Dissertation wurde in kumulativer Form verfasst. Die enthaltenen Forschungsergebnisse wurden vollständig in international anerkannten Fachzeitschriften publiziert, denen die experimentellen Daten, Einzelergebnisse sowie deren Diskussion zu entnehmen sind. Der Fokus dieser Dissertation liegt auf der Zusammenführung der drei Einzelpublikationen und deren Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext.

PUBLIKATIONSLISTE

VERÖFFENTLICHUNGEN

Jost T., Henning C., Heymann T., Glomb M. A. Comprehensive Analyses of Carbohydrates, 1,2-Dicarbonyl Compounds and Advanced Glycation Endproducts in Industrial Bread Making. *J. Agric. Food Chem.* 2021, *XX*, XXXX–XXXX

Jost T., Heymann T., Glomb M. A. Efficient Analysis of 2-Acetyl-1-pyrroline in Foods Using a Novel Derivatization Strategy and LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3046–3054

Baldensperger T., **Jost T.**, Zipprich A., Glomb M. A. Novel α -Oxoamide Advanced Glycation Endproducts within the N⁶-Carboxymethyl Lysine and N⁶-Carboxyethyl Lysine Reaction Cascades. J. Agric. Food Chem. **2018**, 66, 1898–1906

Jost T., Zipprich A., Glomb M. A. Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Rat Tail Collagen and Correlation to Tendon Stiffening. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 3957–3965

TAGUNGSVORTRÄGE

Regionalverbandstagung Süd-Ost (LChG) Jena, 22. – 23.03.2018 "Veränderung von Weizenproteinen beim Backprozess"

Young AGErs Symposium Dresden, 21. – 22.07.2016 "Methylglyoxal Changes the Mechanical Properties of Tendons"

Regionalverbandstagung Süd-Ost (LChG) Dresden, 17. – 18.03.2016 "Methylglyoxal verändert die mechanischen Eigenschaften von Sehnen"

POSTERBEITRÄGE

46. Deutscher Lebensmittelchemikertag (GDCh) Würzburg, 25. – 27.09.2017 "Einfluss von Methylglyoxal auf die Alterung von Sehnen *in vivo*"

45. Deutscher Lebensmittelchemikertag (GDCh) Freising, 12. – 14.09.2016 "Einfluss von Methylglyoxal auf die Alterung von Sehnen *ex vivo*"

LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Tobias Jost

geboren am 10. Juni 1991 in Wolfen

ledig

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

seit 08/2018	wissenschaftlicher Mitarbeiter, ÖHMI Analytik GmbH, Magdeburg
07/2015 – 06/2018	Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis Prof. Dr. Marcus A. Glomb, Lebensmittelchemie, Institut für Chemie, Naturwissenschaftliche Fakultät II, Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg
07/2014 – 06/2015	Doktorand im Rahmen der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt, Betreuung durch Prof. Dr. Marcus A. Glomb

BILDUNGSWEG

10/2009 — 04/2014	Studium der Lebensmittelchemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg			
	Diplom, Note:	1,2		
	Diplomthesis:	"Korrelation der Alterung von Sehnen mit mechanischen und chemischen Parametern" (AK Prof. Dr. Marcus A. Glomb)		
09/2003 – 06/2009	Heinrich-Heine-Gymna	sium, Bitterfeld-Wolfen		
	allgemeine Ho	chschulreife, Note: 1,1		

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation "Einfluss von Methylglyoxal auf die Maillard-Reaktion beim Backprozess und *in vivo*" selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

.....

Datum, Unterschrift

INHALTSVERZEICHNIS

1		Einle	eitung	3	1
2		Grur	ndlag	en und Stand der Forschung	2
	2.	1	Die l	Maillard-Reaktion	2
		2.1.2	L	Grundlegende Reaktionsmechanismen	2
		2.1.2	2	Bildung von Advanced Glycation Endproducts	5
	2.	2	Met	hylglyoxal	8
		2.2.1	L	Bildung und Metabolismus von Methylglyoxal in vivo	8
		2.2.2	2	Bildung und AGEs von Methylglyoxal in der Maillard-Reaktion	12
	2.	3	Kolla	agen1	15
		2.3.2	L	Struktur und Eigenschaften	15
		2.3.2	2	Biosynthese und enzymatische Quervernetzung	18
		2.3.3	3	Maillard-Reaktion und nicht-enzymatische Quervernetzung	19
	2.	4	Back	kwaren	22
		2.4.1	L	Teigzusammensetzung und Veränderungen während der Fermentation	22
		2.4.2	2	Folgestrukturen und Veränderungen während des Backens	25
		2.4.3	3	Brotaroma und 2-Acetyl-1-pyrrolin	29
3		Ziels	tellu	ng	32
4		Disk	ussio	n und Einordnung der Ergebnisse	34
	4.	1	Advo	anced Glycation Endproducts in Kollagen	34
	4.	2	2-Ac	zetyl-1-pyrrolin in Lebensmitteln	11
	4.	3	Advo	anced Glycation Endproducts in Brot	1 5
5		Zusa	mme	enfassung	57
6		Sum	mary	,	59
7		Abki	irzun	gsverzeichnis	51
8		Abbi	ldun	gsverzeichnis	53
9		Tabe	ellenv	verzeichnis	54
1(C	Liter	atur.		55
1	1	Einze	elpub	likationen	76

1 **EINLEITUNG**

Methylglyoxal ist eine reaktive α-Dicarbonylverbindung. In Lebensmitteln und auch *in vivo* wird diese Struktur unter anderem im Verlauf der Maillard-Reaktion gebildet. Dabei reagieren reduzierende Zucker mit Aminkomponenten, z.B. Aminosäuren, in komplexen Reaktionskaskaden zu einem breiten Spektrum an Folgestrukturen. Proteingebundene Aminosäuremodifikationen werden unter dem Begriff *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) zusammengefasst. Diese Glykierungsprodukte verändern die biologische Wertigkeit, aber auch die Funktionalität von Proteinen. Das betrifft besonders die Seitenketten von Lysin und Arginin. Eine zweite bedeutende Quelle für Methylglyoxal ergibt sich aus dem Abbau von Triosephosphaten, die wichtige Intermediate des Kohlenhydratstoffwechsels (Glycolyse) von lebenden Organismen darstellen. Daher wird Methylglyoxal vor allem *in vivo* als potentielles Glykierungsagens diskutiert. Besonders langlebige Proteine wie Kollagen im Bindegewebe aller höherer Organismen unterliegen im Laufe der natürlichen Alterung einer stetigen Veränderung durch Maillard-Prozesse. Bisher sind jedoch nur einzelne AGEs *in vivo* identifiziert worden. Häufig wird auch der Zusammenhang mit altersbedingten oder diabetischen Spätkomplikationen diskutiert. Dazu fehlen jedoch umfassende Kenntnisse der Kollagenmodifizierung auf molekularer Ebene.

Auch Proteine in thermisch prozessierten Lebensmitteln weisen einen hohen Glykierungsgrad auf. Vor allem bei hohen Temperaturen und geringer Wasseraktivität, wie beim Braten, Backen oder Frittieren, läuft die Maillard-Reaktion bevorzugt ab. Lebensmittel, die bei der Herstellung einem fermentativen Schritt durch Mikroorganismen unterliegen, beispielsweise Backwaren, können vergleichsweise hohe Methylglyoxalgehalte aufweisen. Während des Backens kommt es durch Maillard-Prozesse schließlich zur gewünschten Farb- und Aromabildung. Als unerwünschter Nebeneffekt tritt jedoch die Proteinglykierung ein. Insofern können AGEs auch als Prozesskontaminanten betrachtet werden. Aufgrund ihrer antinutritiven Eigenschaften hat sich auch der Begriff Glycotoxine etabliert, der gleichzeitig eine Verbindung zwischen Lebensmittelchemie und Medizin schafft. Die Aufnahme über die Nahrung und Wirkung von AGEs ist nur spärlich erforscht. Eine umfassende Charakterisierung der ablaufenden Reaktionen und des resultierenden AGE-Spektrums in Backwaren wie auch in Lebensmitteln allgemein steht bis heute aus. Nicht zuletzt werden solche Untersuchungen durch eine komplexe Lebensmittelmatrix sowie unzureichende Proteinreinheit und -löslichkeit erschwert. Kenntnisse über die zu Grunde liegenden Mechanismen könnten perspektivisch zur Verbesserung des Herstellungsprozesses beitragen, indem die Bildung gewünschter Strukturen forciert bzw. die Bildung unerwünschter Strukturen supprimiert wird.

2 **GRUNDLAGEN UND STAND DER FORSCHUNG**

2.1 Die Maillard-Reaktion

Der Begriff Maillard-Reaktion beschreibt die nicht-enzymatische Reaktion von reduzierenden Carbonylverbindungen mit Aminkomponenten und umfasst eine komplexe Reaktionskaskade mit einem sehr heterogenen Produktspektrum. Der Name wurde zu Ehren ihres Entdeckers Louis Camille Maillard vergeben, der 1912 als erster diese Reaktion beschrieb.¹ Durch die Arbeiten weiterer Chemiker wie Mario Amadori, Kurt Heyns und John Edward Hodge in den 1930er bis 50er Jahren entwickelten sich konkrete Vorstellungen über die ablaufenden Reaktionsschritte.² Die im Modellversuch beobachtete, charakteristische Bildung von hochmolekularen, braunen Strukturen - den sogenannten Melanoidinen - ließ bereits damals auf die Relevanz bei der Zubereitung von Lebensmitteln schließen. Dabei treten vor allem reduzierende Zucker wie Glucose, Fructose, Lactose und Maltose mit Aminosäuren bzw. Proteinen in Interaktion. Begünstigt durch hohe Temperaturen beim Backen, Braten oder Frittieren, entstehen in Folge der Maillard-Reaktion neben den Melanoidinen auch niedermolekulare, teilweise aromaaktive Verbindungen (Maillard-Reaktionsprodukte, MRPs) sowie stabile, proteingebundene Aminosäuremodifikationen (Advanced Glycation Endproducts, AGEs). Abzugrenzen davon ist die Karamellisation, eine thermische Zersetzung von Zuckern (ohne Aminkomponente) zu flüchtigen sowie polymeren, braunen Strukturen. Dass Maillard-Prozesse nicht nur in Lebensmitteln sondern auch in vivo ablaufen, ist seit den frühen 1980er Jahren bekannt.³ Dabei war N⁶-Carboxymethyllysin (CML) das erste identifizierte AGE in vivo,⁴ das auch heute noch zu den quantitativ bedeutendsten AGEs sowohl in Lebensmitteln als auch in vivo zählt. Die moderne Definition der Maillard-Reaktion berücksichtigt auch andere Quellen von Carbonylverbindungen und Aminkomponenten, darunter Metabolite aus Stoffwechselwegen, Intermediate der Lipidperoxidation oder zelluläre Inhaltsstoffe (z.B. α -Dicarbonyle, Reduktone, Phospholipide, Desoxyribonucleinsäuren).

2.1.1 Grundlegende Reaktionsmechanismen

Mechanistisch betrachtet, ist die Maillard-Reaktion eine ständige Abfolge nucleophiler Substitutionen von Aminkomponenten an Carbonylgruppen, Isomerisierung der intermediären Imine, Amin- oder Wassereliminierung, Fragmentierung und Cyclisierung. Von zentraler Bedeutung und verantwortlich für die Komplexität der Reaktion ist hierbei die Enolisierung entlang des gesamten Kohlenstoffgerüsts der reduzierenden Zuckerkomponente, ermöglicht durch die benachbarten Hydroxylgruppen. Diese basenkatalysierte Form der Keto-Enol-Tautomerie bei Zuckern bezeichnet man auch als Lobry-de-Bruyn-Alberda-van-Ekenstein-Umlagerung. In Verbindung mit der Eliminierung von Wasser oder anderen Abgangsgruppen entstehen auf diese Weise eine Vielzahl von neuen reaktiven Intermediaten, welche die Reaktion weitertragen (Abb. 1). Bei diesen Intermediaten handelt es sich um α -Dicarbonylverbindungen. Besitzt das Dicarbonyl das ursprüngliche Zuckerrückgrat, beispielsweise nach Oxidation des Zuckers, spricht man von Osonen. Ist das Dicarbonyl durch eine vorangegangene Eliminierung entstanden, handelt es sich um Desoxyosone. Die Lage der Methylengruppe bezüglich der Dicarbonylfunktion beeinflusst maßgeblich die Reaktivität von Desoxyosonen. Isoliert die Methylengruppe die beiden Carbonylgruppen von den restlichen Hydroxylgruppen, ist das Molekül wesentlich stabiler. Befinden sich in α -Position eine oder mehrere Hydroxylgruppen, so wie bei Osonen, liegt eine Reduktonstruktur (α -Oxoendiol) vor, welche eine deutlich höhere Reaktivität besitzt.⁵ Diese Reaktivität äußert sich in weiteren Fragmentierungsreaktionen, für die konkrete Mechanismen postuliert wurden (Abb. 2).^{6,7}



Abb. 1 Anfangsphase der Maillard-Reaktion.



Abb. 2 Fragmentierungsmechanismen von Dicarbonylverbindungen mit Reduktonstruktur.

Der Hauptabbauweg von Reduktonen verläuft über die β -Dicarbonylspaltung (Abb. 2, unten).⁸ Durch nucleophilen Angriff von Wasser (hydrolytisch) oder einer Aminofunktion (Amin-induziert) an eine der Carbonylgruppen erfolgt die Spaltung des Kohlenstoffskeletts. In Folge resultieren eine Carbonsäure bzw. das entsprechende Säureamid sowie eine Ketose. Mechanistische Studien haben gezeigt, dass die Spaltung sowohl links als auch rechts vom mittleren Kohlenstoff des Reduktons stattfinden kann.⁹ Am Beispiel von 1-Desoxyglucoson (1-DG) entstehen auf diese Weise Essigsäure und Erythrulose (C₂+C₄) sowie Acetol und Glycerinsäure (C₃+C₃). Betrachtet man nun die Tatsache, dass die Carbonylgruppen entlang des Kohlenstoffgerüsts "wandern" können (*Carbonyl Mobility*¹⁰), eröffnen sich weitere Möglichkeiten an Spaltprodukten.¹¹ Ein zweiter wichtiger Abbauweg von Reduktonen ist die oxidative α -Dicarbonylspaltung(Abb. 2, oben).^{8,12} Durch den Einbau von molekularem Sauerstoff entsteht intermediär ein gemischtes Anhydrid, das durch nucleophilen Angriff entweder hydrolytisch oder Amin-induziert in zwei Carbonsäuren bzw. eine Carbonsäure und ein Säureamid gespalten wird. Dieser Mechanismus wurde durch Experimente mit isotopenmarkiertem Sauerstoff (¹⁸O₂) von Smuda *et al.* belegt.⁶ Am Beispiel der oxidativen α -Dicarbonylspaltung von 1-DG resultieren demnach Essigsäure und Erythronsäure bzw. je ein Amid davon. Alternativ zur Spaltung führt die intramolekulare Cyclisierung (Lactolisierung) von Reduktonen und α -Dicarbonylen zu weiteren Folgestrukturen ohne Inkorporation der Aminkomponente. Als Beispiele für solche MRPs sind γ -Pyranon und Acetylformoin aus 1-DG oder 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) aus 3-DG zu nennen.

2.1.2 Bildung von Advanced Glycation Endproducts

Als Aminkomponenten in Lebensmitteln wie auch in vivo spielen vor allem Aminosäuren, überwiegend als Proteine, eine tragende Rolle. Während prinzipiell jede freie Aminosäure mit ihrer verfügbaren lpha-Aminogruppe im Sinne der Maillard-Reaktion reagieren kann, kommen bei proteingebundenen Aminosäuren nur zwei nucleophile Seitenketten in Frage. Dabei unterscheiden sich die funktionellen Gruppen von Lysin (ε -Aminogruppe, pK_s = 10,3) und Arginin (δ -Guanidinogruppe, $pK_s = 12,1)$ grundlegend in ihrer Reaktivität voneinander. Die Säurekonstanten zeigen, dass beide Gruppen unter lebensmitteltypischen (pH = 3–7) bzw. physiologischen Bedingungen (pH = 7,4) überwiegend protoniert vorliegen und daher kaum als Nucleophil zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund reagiert die Aminkomponente nicht stöchiometrisch mit dem Carbonyl, sondern nur in geringem Umfang. Während die ε-Aminogruppe von Lysin mit jeder Carbonylgruppe reagieren kann und damit überhaupt erst die Maillard-Reaktion auslöst, reagiert die δ -Guanidinogruppe von Arginin nur mit α -Dicarbonylen, die in der fortgeschrittenen Phase entstehen.¹³ Dafür ist die Affinität der Arginin-Seitenkette gegenüber Dicarbonylen höher, was zu einer bevorzugten Glykierung von Arginin führt.¹⁴ So verschiebt sich im Verlauf der Maillard-Reaktion das Glykierungsmuster am Protein. Aminoketosen und -aldosen, die entsprechend ihrer Entdecker auch als Amadori- bzw. Heyns-Produkte bezeichnet werden, sind die ersten stabileren Intermediate an Lysin-Seitenketten. Diese Umlagerungsprodukte der initialen α -Hydroxyimine kennzeichnen die Anfangsphase der Maillard-Reaktion (Abb. 1) und sind in quantitativen Mengen in Lebensmitteln und *in vivo* an Proteinen nachweisbar.^{2,13} In der fortgeschrittenen Phase kommt es wie bereits beschrieben zur Dehydratisierung, Fragmentierung oder Cyclisierung des Kohlenstoffgerüsts, wodurch reaktive α -Dicarbonylverbindungen als zentrale Intermediate der Maillard-Reaktion entstehen. In der Endphase entstehen unter Inkorporation der Aminkomponente (i.d.R. Lysin oder Arginin) AGEs als stabile Modifikationen am Protein sowie Melanoidine als polymere Bräunungsstrukturen.

Für die AGE-Bildung aus α-Dicarbonylen lassen sich drei grundlegende Mechanismen formulieren: Dicarbonylspaltung, Umlagerung und Kondensation. Die Amin-induzierte α- und β-Dicarbonylspaltung wurde bereits für Reduktone im vorherigen Abschnitt beschrieben. Die resultierenden Amide stellen eine eigenständige Klasse von AGEs dar. Mittlerweile ist ein recht breites Spektrum an Amid-AGEs *in vivo* bekannt.^{5,15–17} Beispielhaft seien hier *N*⁶-Formyllysin oder *N*⁶-Acetyllysin genannt. Als bisher einziges Amid-Crosslink ist GOLA hervorzuheben.¹⁸ Crosslinks sind in diesem Zusammenhang intra- oder intermolekulare Quervernetzungsstrukturen, die zwei Proteinseitenketten kovalent miteinander verknüpfen. Die neuesten Vertreter von Amid-AGEs sind die α-Oxoamide *N*⁶-Glyoxylyllysin und *N*⁶-Pyruvoyllysin, die ausschließlich oxidativ gebildet werden und daher als potentielle Marker für oxidativen Stress *in vivo* gelten.¹⁹ Beide homologe Verbindungen werden im Zuge einer Reaktionskaskade gebildet, die über eine Tautomerisierung von Enaminolen verläuft (Abb. 3).



Abb. 3 Bildung von Lysin-AGEs durch Tautomerisierung.

Diese Umlagerung im Sinne einer prototropen Isomerisierung führt unter Erhalt der Gesamtoxidationsstufe zu säurestabilen α -Aminoalkylcarbonsäuren oder in geringerem Ausmaß den isomeren α -Hydroxyamiden bzw. α -Oxoamiden. Die bekanntesten Vertreter dieser Klasse sind N^6 -Carboxymethyllysin (CML) und N^6 -Carboxyethyllysin (CEL) mit ihren respektiven Amiden N^6 -Glycoloyllysin (GALA) und N^6 -Lactoyllysin (Lac).¹⁹ Die Bildung von CML, GALA und Lac beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Umlagerung, sondern ist ebenso über Dicarbonylspaltung von längerkettigen Präkursoren möglich. Somit ist die AGE-Bildung nicht immer auf eine konkrete Vorläuferstruktur zurückzuführen, weshalb mechanistische Untersuchungen fundamental für das Verständnis von Vorgängen in komplexen Matrices wie Lebensmitteln oder Lebewesen sind.

Die Kondensation ist charakteristisch für die Bildung von Arginin-Modifikationen. Analog dem Prinzip der Click-Chemie²⁰ reagiert die Seitenkette von Arginin mit α-Dicarbonylen. Unter Inkorporation der Guanidinofunktion entstehen Stickstoffheterocyclen verschiedener Ringgrößen wie Imidazolinone, Pyrrole, Pyrimidine oder cyclische Amidine. Monovalente Fünfringe wie MG-H1 sind dabei von quantitativer Bedeutung.^{14,21–23} Typische Kondensationsprodukte sind außerdem bivalente Lysin-Arginin-Crosslinks, die jedoch mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle spielen. Als Proteinquervernetzer werden sie allerdings mit pathophysiologischen Erscheinungen im Alter oder bei bestimmten Krankheiten wie *Diabetes mellitus* in Verbindung gebracht.²⁴ Nennenswerte Vertreter dieser Klasse sind Glucosepan²⁵, Pentosidin²⁶ sowie GODIC, MODIC und DODIC^{27,28} (Abb. 4).







Glucosepan

Pentosidin

Imidazol-Crosslinks GODIC: R = -HMODIC: $R = -CH_3$ DODIC: $R = -CH_2$ -(CHOH)₂-CH₂OH

Abb. 4 Lysin-Arginin-Quervernetzungsstrukturen in der Maillard-Reaktion.

2.2 Methylglyoxal

Methylglyoxal (MGO), auch 2-Oxopropanal oder Pyruvaldehyd (Abb. 5), ist eine kurzkettige α -Dicarbonylverbindung mit einer Aldehyd- und einer Ketogruppe an einem C₃-Kohlenstoffgerüst. In Lebensmitteln und in vivo wird diese hochreaktive Verbindung über verschiedene Wege gebildet und trägt zur Glykierung von Proteinen bei. Reines MGO ist eine farblose, licht- und luftempfindliche Flüssigkeit, die in Anwesenheit von Wasserspuren leicht zu einer festen glasartigen Substanz polymerisiert.²⁹ Gefriergetrocknetes MGO aus konzentrierten Lösungen liegt als diverse lineare oder cyclische Di-, Tri- und Oligomere vor.³⁰ Aus ¹H-NMR-Studien ist bekannt, dass MGO in verdünnter wässriger Lösung nur zu einem Bruchteil als freies Dicarbonyl (< 1%) vorliegt und hauptsächlich als Mono- (56–71%) oder Dihydrat (29–44%) präsent ist.^{31,32} Dieses Hydratationsgleichgewicht (Abb. 5) beeinflusst maßgeblich die Reaktivität der zwei benachbarten Carbonylgruppen. Während etwa ein Drittel als Dihydrat vorliegt und keine Reaktion eingehen kann, ist bei zwei Dritteln die Aldehydfunktion im Monohydrat blockiert, wodurch ausschließlich die Ketogruppe für Reaktionen zur Verfügung steht. Da sich die drei Spezies in einem dynamischen Gleichgewicht befinden, liegt dennoch ein kleiner Teil der freien Form vor, wodurch MGO auch als Aldehyd oder Dicarbonyl reagieren kann. Diese unterschiedliche Reaktivität hinsichtlich Nucleophilen, insbesondere den Lysin- und Arginin-Seitenketten von Proteinen, lenkt den Verlauf der Maillard-Reaktion und bestimmt das resultierende Produktspektrum.



Abb. 5 Hydratationsgleichgewicht von Methylglyoxal in wässriger Lösung.

2.2.1 Bildung und Metabolismus von Methylglyoxal in vivo

Aufgrund der Reaktivität gegenüber Stickstoffnucleophilen wie Proteinen oder DNA, besitzt MGO eine ausgeprägte Cytotoxizität. Es wird im Zellstoffwechsel aus verschiedenen Vorläuferstrukturen über "Unfallwege" gebildet. *In vivo* wurden mehrere Stoffwechselwege identifiziert, aus denen MGO hervorgeht. Direkte Präkursoren sind Aminoaceton aus dem Aminosäuremetabolismus von Threonin und Glycin oder Hydroxyaceton (Acetol) aus dem Fettsäuremetabolismus. Durch Monooxygenasen oder Dehydrogenasen erfolgt letztlich die enzymatische Oxidation zu MGO. Der Hauptbildungsweg verläuft jedoch über die Glycolyse, wo MGO enzymatisch wie auch nicht-enzymatisch aus den Triosephosphaten Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) gebildet wird.^{33–35} Die Glycolyse ist der vorrangige Abbauweg von Hexosen zur Energiegewinnung aller eukaryotischen Zellen. In zehn enzymkatalysierten Schritten erfolgt im Cytoplasma der Abbau zu Pyruvat unter Generierung von Adenosintriphosphat (ATP). Bei der Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat entstehen zu gleichen Teilen DHAP und GAP. Durch das Enzym Triosephosphat-Isomerase (TPI) wird DHAP in GAP überführt, da nur diese Verbindung entlang der Glycolyse verwertet wird. In wässriger Lösung stehen beide Triosephosphate in einem thermodynamischen Gleichgewicht, das weit auf der Seite von DHAP (DHAP:GAP = 24:1) liegt. Die Isomerisierung verläuft über das intermediäre 1,2-Propendiol-3-phosphat. Unter physiologischen Bedingungen (pH = 7,4) neigt dieses 1,2-Endiol zu spontaner β-Eliminierung der Phosphatgruppe, wodurch irreversibel MGO entsteht (Abb. 6).



Abb. 6 Bildung von Methylglyoxal (MGO) aus Triosephosphaten.

Die Enolisierung von GAP verläuft dreizehnmal schneller als die von DHAP. Aus diesem Grund ist auch die Freisetzung von MGO aus GAP um das Achtfache schneller, wie den Geschwindigkeitskonstanten zu entnehmen ist ($k_{GAP} = 1,55 \cdot 10^{-4} s^{-1} vs. k_{DHAP} = 0,194 \cdot 10^{-4} s^{-1}$).³⁶ Mechanistische Studien zeigten, dass die Phosphateliminierung schrittweise über einen E1_{cb}-Mechanismus verläuft (Abb. 6).³⁷ Dabei erfolgt zunächst die Eliminierung eines Protons durch das Dianion der Phosphatgruppe, wodurch sich ein Endiolat bildet. Im zweiten Schritt wird die Phosphatgruppe eliminiert, was durch den Elektronenüberschuss des Endiolats begünstigt wird. Befindet sich das Endiol im aktiven Zentrum der TPI, wird die Geschwindigkeitskonstante der Phosphateliminierung um das 10^5 – 10^8 -fache herabgesetzt. Dennoch wird in Anwesenheit von TPI ein geringfügiger Abbau der Triosephosphate beobachtet. Unter Berücksichtigung der zellulären TPI-Konzentration lässt sich eine MGO-Bildungsrate von 0,1 mM/d (nicht-enzymatisch) bzw. 0,4 mM/d (TPI-katalysiert) abschätzen.³⁷ Zur Beseitigung dieser cytotoxischen Verbindung verfügen alle Zellen lebender Organismen über das sogenannte Glyoxalase-System.³⁸ Das ubiquitäre, zweistufige Enzymsystem wurde 1913 entdeckt und besteht aus Glyoxalase I (Isomerase) und Glyoxalase II (Hydrolase). Cytosolisches MGO wird zunächst durch Glutathion (GSH) abgefangen. Die Reaktion mit der freien Thiolgruppe von GSH erfolgt spontan und liefert ein Hemithioacetal. Dieses Addukt ist das Substrat von Glyoxalase I und wird zu *S*-Lactoylglutathion isomerisiert. Unter Bildung von D-Lactat wird dieser Thioester von Glyoxalase II hydrolysiert (Abb. 7, grüne Box). Beide enzymatischen Reaktionen verlaufen irreversibel.³¹ Ausgehend von der täglichen Bildung von D-Lactat lässt sich ableiten, dass etwa 0,1% der Triosephosphate zu MGO zerfallen, während 99,9% dem Substratfluss der Glycolyse folgen.³³ Neben dem Glyoxalase-System kann auch eine ungerichtete Entgiftung über Dehydrogenasen zu Pyruvat oder über Reduktasen zu Lactaldehyd bzw. Acetol erfolgen.^{34,39,40} Die grundlegenden Vorgänge des MGO-Metabolismus sind nochmals in Abbildung 7 zusammengefasst.



Abb. 7 Metabolismus von Methylglyoxal *in vivo*. (DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, GSH: Glutathion AGEs: Advanced Glycation Endproducts, TPI: Triosephosphat-Isomerase)

Die Analytik von MGO erfolgt typischerweise entweder über ein enzymatisches Assay mit Glyoxalase I+II oder flüssigchromatographisch nach Derivatisierung mit einem *ortho*-Phenylendiamin-Derivat.⁴¹ Generell hat sich die Überführung von reaktiven Dicarbonylen in stabile Chinoxaline mittels Abfangreagenzien etabliert.⁴² Darüber hinaus ermöglicht die Derivatisierung hohe Trennleistungen mittels Umkehrphasen-HPLC sowie selektive und sensitive Detektionstechniken (UV-Absorption, Fluoreszenz, Massenspektrometrie). Tabelle 1 zeigt Methylglyoxal-Level in verschiedenen biologischen Geweben und Flüssigkeiten.

	Kontrollgruppe	diabetische Gruppe	Literatur
a)	humanes Blutplasma [nM] (n))	
	123 ± 37 (<i>28</i>)	189 ± 39 (<i>27</i>)	43
	520 ± 42 (<i>10</i>)	708 ± 125 (<i>29</i>)	44
	439 ± 90 (<i>18</i>)	842 ± 238 (56)	45
	137 ± 17 (<i>10</i>)	233 ± 7 (50)	46
	61 ± 7 (15)	-	15
	98 ± 27 (14)	190 ± 68 (<i>14</i>)	47
b)	humanes Vollblut [nM] (n)		
	256 ± 92 (<i>12</i>)	479 ± 49 (55)	41
	338 ± 62 (<i>10</i>)	409 ± 131 (<i>41</i>)	48
	82 (21)	484 <i>(43,</i> Typ 1) 295 (<i>105,</i> Typ 2)	49
c)	Ratte [nmol/g Frischgewicht]	(n)	
	Augenlinse 2,10 (15)	4,54 (14)	50
	Aorta 6,1 ± 1,8 (6)	-	51
	Blut 0,16 (15)	0,22 (15)	50
	0,67 ± 0,3 (<i>6</i>)	_	51
	Herz 1,9 ± 0,5 (<i>6</i>)	-	51
	Leber 1,10 (<i>18</i>)	1,07 (17)	50
	1,6 ± 0,5 (6)	-	51
	Niere 1,02 (<i>18</i>)	1,40 (17)	50
	$1,3 \pm 0,3$ (6)	-	51

Tab. 1 Methylglyoxal-Konzentrationen in vivo.

n: Anzahl der Probanden/Versuchstiere

Die übliche MGO-Konzentration in humanem Plasma liegt zwischen 100 und 500 nmol/l. Bei vorliegendem *Diabetes mellitus* sind die Gehalte um 50–100% erhöht, weil in Folge der Hyperglykämie der Substratfluss durch die Glycolyse zunimmt. Da die Glycolyse ausschließlich intrazellulär abläuft, sind bei Diabetes nur die Zellen einem erhöhten Carbonylstress ausgesetzt, die insulinunabhängig Glucose aufnehmen, z.B. Nervenzellen oder Erythrozyten. Das erklärt einerseits gesteigerte Gehalte im Blut oder Auge, anderseits gleichbleibende MGO-Level in Organen von diabetischen Ratten (Tab. 1c). Damit im Einklang ist das spezifische Auftreten diabetischer Spätkomplikationen wie Retinopathie (Netzhaut), Katarakt (Augenlinse), Neuropathie (Nerven), Nephropathie (Nieren) oder periphere Makroangiopathie (Arterien) an Geweben, die hohen Glucosekonzentrationen ausgesetzt sind. Deswegen wird vermutet, dass Maillard-Prozesse mit solchen alters- oder krankheitsbedingten Symptomen korrelieren.

2.2.2 Bildung und AGEs von Methylglyoxal in der Maillard-Reaktion

Neben dem spontanen Zerfall von Triosephosphaten oder der enzymatischen Umwandlung von entsprechenden C₃-Präkursoren, kann MGO auch im Verlauf der Maillard-Reaktion aus längerkettigen Zuckern gebildet werden. Fragmentierungsstudien von Gobert *et al.* mit Glucose und N^2 -Boc-Lysin ergaben, dass MGO unter physiologischen Bedingungen lediglich zu 0,4 Mol-% aus dem Amin-katalysierten Abbau von Glucose entsteht.⁵² Weiterführende Experimente mit isotopenmarkierter Glucose ($^{13}C_1$ vs. $^{13}C_6$) enthüllten, dass dabei 47% MGO aus C₄–C₆, 32% aus C₁–C₃ und 21% aus C₂–C₅ des sechszähligen Kohlenstoffskeletts hervorgehen. Diese Tatsache unterstreicht die Komplexität der Reaktionskaskade und erklärt gleichzeitig, warum MGO nur zu einem so geringen Teil aus Glucose gebildet wird. Die nötigen Isomerisierungs- und Fragmentierungsschritte hin zu MGO sind zu lang und damit zu unwahrscheinlich, als dass eine mengenmäßig bedeutende Bildung auf diesem Weg erfolgt. Weitere MGO-Bildungsstudien wurden analog mit Maltose (0,005 Mol-%)⁵³, 1-DG (Spuren)⁹, 3-DG (nicht nachweisbar)⁵², Glucoson (0,03 Mol-%)⁵² sowie Ascorbinsäure (0,01 Mol-%)⁵⁴ durchgeführt. Auch diese Daten belegen, dass die Bildung von MGO über Maillard-Prozesse bei niedrigen Temperaturen nur von marginaler Bedeutung ist (siehe Abschnitt 2.2.1).

Die Reaktion von MGO mit Lysin- oder Arginin-Seitenketten führt letztlich zu stabilen Aminosäuremodifikationen, die am Protein kovalent gebunden vorliegen. Thornalley *et al.* führten Modellversuche zur Bindung von MGO an *N*²-Acetyllysin, -arginin und -cystein unter physiologischen Bedingungen durch.⁵⁵ Die Ergebnisse trugen zum grundlegenden Verständnis der Reaktivität von MGO gegenüber Nucleophilen bei: (I) Die Bindung von MGO an alle drei Aminosäureseitenketten ist möglich und erfolgt zunächst reversibel über ein Halbacetal. (II) Irreversible Addukte werden im weiteren Verlauf nur mit Arginin und Lysin gebildet. (III) Die Guanidinofunktion von Arginin bildet als Hauptprodukt ein Hydroimidazolon. (IV) Durch Lysin könnten hypothetisch Proteinquervernetzungen (Crosslinks) ausgebildet werden. Weiterführende Versuche mit bovinem Serumalbumin (BSA) ergaben, dass nach vier Tagen 55% MGO irreversibel am Protein gebunden vorlagen, 30% reversibel gebunden waren (als Halbacetal, nicht als Imin), 14% Abbauprodukte entstanden und noch 1% freies MGO nachweisbar war. Die bevorzugten Positionen der Modifizierung waren dabei Arginin-Seitenketten. So wurden durchschnittlich 6–8 Argininreste (von 26) und < 1 Lysinrest (von 60) pro Molekül BSA durch MGO modifiziert.⁵⁵

Klöpfer *et al.* untersuchten schließlich die Reaktion von MGO mit N²-Boc-Arginin und klärten den vollständigen Mechanismus der Reaktionskaskade auf (Abb. 8).⁵⁶ Im ersten Schritt bildet die Guanidinogruppe ein reversibel gebundenes, endocyclisches Dihydroxyimidazolidin. Unter Wasserabspaltung entsteht MG-H3 als kinetisch kontrolliertes Intermediat. Durch Ringöffnung steht

MG-H3 über seine offenkettige Form, *N*⁷-Carboxyethylarginin (CEA), im Gleichgewicht mit dem exocyclischen MG-H1. Sowohl CEA als auch MG-H1 sind die thermodynamisch kontrollierten Produkte und entstehen langsam aus MG-H3. Im Sauren wird dieses Gleichgewicht auf die Seite von MG-H3 verschoben. Im Gegensatz zu MG-H1 besitzt MG-H3 an Position 9 ein acides Proton, wodurch MG-H3 in der Lage ist mit weiteren Carbonylverbindungen Aldol-Reaktionen einzugehen. So entstehen durch Reaktion mit einem weiteren Äquivalent MGO Tetrahydropyrimidin (THP) sowie Argpyrimidin. Beide Strukturen sind jedoch nur bei MGO-Überschuss zu beobachten und daher unter physiologischen Bedingungen von untergeordneter Bedeutung.



Abb. 8 Methylglyoxal-Arginin-Reaktionskaskade.

Da die Guanidinofunktion von Arginin selbst keine Maillard-Reaktion triggern kann, sondern lediglich mit vorhandenen Dicarbonylen reagiert, können alle MGO-Arginin-Addukte als MGOspezifisch eingeordnet werden. Alle bisher bekannten MGO-Lysin-Addukte sind in Abbildung 9 dargestellt. Während N^6 -Carboxyethyllysin (CEL) ein MGO-spezifisches AGE darstellt, das ausschließlich über Isomerisierung entsteht, kann N^6 -Lactoyllysin (Lac) zusätzlich aus β-Dicarbonylspaltung längerkettiger Reduktone (z.B. 1-DG) hervorgehen.⁵ Dennoch ist CEL gegenüber Lac die quantitativ bedeutendere Lysin-Modifikation.¹⁹ Die Modifikationen MOLD und MODIC sind bivalente Crosslinks, die sich von MGO ableiten. MOLD ist ein Lysin-Lysin-Crosslink, wird aus zwei Molekülen MGO gebildet und wurde erstmals in humanem Serumprotein nachgewiesen.⁵⁷ MODIC ist ein Lysin-Arginin-Crosslink, das aus einem Molekül MGO gebildet wird und bereits in Lebensmitteln²⁸ sowie in menschlichem Gewebe²⁵ nachgewiesen wurde.



Abb. 9 Methylglyoxal-Lysin-Reaktionskaskade.

Generell sind nur wenige AGEs unter den Bedingungen einer sauren Proteinhydrolyse stabil, z.B. CEL oder MOLD. Alle anderen säurelabilen Strukturen müssen durch mehrstufigen, enzymatischen Verdau aus dem Protein freigesetzt werden. Dafür werden in der Praxis Gemische verschiedener Proteasen (Endo-, Amino- und Carboxypeptidasen) eingesetzt. Anschließend können die Aminosäuremodifikationen flüssigchromatographisch getrennt und mittels Fluoreszenzdetektor (ggf. nach Derivatisierung) oder Massenspektrometer analysiert werden.

2.3 Kollagen

Kollagen ist ein fibrilläres Strukturprotein, das in allen höher entwickelten tierischen Organismen vorkommt und beim Aufbau von Haut, Knochen, Sehnen, Gefäßen, Knorpeln sowie den inneren Organen beteiligt ist. Bei Säugetieren macht es etwa ein Viertel des Gesamtproteins aus. Als langlebiges Strukturprotein ist Kollagen allerdings dem Angriff reaktiver Moleküle ausgesetzt. Dies führt zu einer Vielzahl von Modifikationen, die während des Alterns auftreten und physiologische Degenerationserscheinungen hervorrufen, was mit einem Verlust von Elastizität und Spannkraft der betroffenen Gewebe einhergeht.⁵⁸ Kollagen bildet den Hauptbestandteil des Bindegewebes, das als Stütz- und Gerüstwerk den gesamten Körper durchzieht. Bindegewebe setzt sich aus drei Grundeinheiten zusammen: den Bindegewebszellen (Fibroblasten), den Skleroproteinen Kollagen und Elastin sowie der strukturlosen Grundsubstanz, welche die Zwischenräume ausfüllt und die Skleroproteine umhüllt. Sie besteht aus Glycoproteinen und Mucopolysacchariden (Hyaluronsäure, Chondroitin-, Heparin, Keratansulfat).⁵⁹ Kollagen und Elastin verleihen unter anderem Zugfestigkeit und Elastizität, wobei unterschiedlichste mechanische Eigenschaften die Mannigfaltigkeit von kollagenem Gewebe widerspiegeln. Dazu zählen Haut und Gefäßwände (weich, elastisch), Kornea und Augenlinse (kristallin, transparent), Sehnen und Knorpel (zugfest, gleitfähig) sowie Knochen (hart, spröde).58

2.3.1 Struktur und Eigenschaften

Das Kollagenmolekül ist eine rechtsgängige Tripelhelix bestehend aus drei Polypeptidketten und wird als Tropokollagen bezeichnet. Tropokollagen besitzt ein Molekulargewicht von etwa 400 kDa, ist ca. 280 nm lang und hat einen Durchmesser von 1,4 nm. Je nach Kollagentyp liegt die Tripelhelix als Homotrimer, also drei identischen Ketten, oder Heterotrimer vor. Jede Polypeptidkette besitzt etwa 1.050 Aminosäuren. Der helikale Teil umfasst etwa 1000 Aminosäuren und ist über Wasserstoffbrücken stabilisiert, die hauptsächlich über Glycin und 4-Hydroxyprolin ausgebildet werden. Glycin befindet sich etwa an jeder dritten Position und ist in das Innere der Tripelhelix gerichtet, während die längerkettigen Aminosäurereste nach außen orientiert sind. Die nichthelikalen Bereiche am N- und C-Terminus werden als Telopeptide bezeichnet. Sie enthalten die für die Quervernetzung wichtigen Lysinreste. Tabelle 2 zeigt eine typische Aminosäurezusammensetzung von Kollagen. Glycin, Prolin, Alanin und das für Kollagen spezifische 4-Hydroxyprolin sind die häufigsten Aminosäuren. Eine sich stetig wiederholende Aminosäuresequenz innerhalb der Polypeptidketten ist –Gly–Pro–Hyp–. Eine weitere spezifische Aminosäure ist 5-Hydroxylysin, das allerdings nur in geringen Mengen in Kollagen vorkommt. Dennoch spielt es für die natürliche

Quervernetzung eine entscheidende Rolle. Kollagen enthält außerdem etwa 0,5% Glucose und Galactose, die jeweils *O*-glykosidisch mit einigen 5-Hydroxylysinresten verknüpft sind.

Aminosäure	Abkürzung	Anzahl	Anteil [%]
Glycin	Gly	345	32,8
Prolin	Pro	124	11,8
Alanin	Ala	123	11,7
4-Hydroxyprolin	Нур	113	10,7
Arginin	Arg	52	4,9
Glutaminsäure	Glu	47	4,5
Serin	Ser	40	3,8
Lysin	Lys	35	3,3
Asparaginsäure	Asp	32	3,0
Glutamin	Gln	27	2,6
Leucin	Leu	21	2,0
Valin	Val	19	1,8
Threonin	Thr	16	1,5
Phenylalanin	Phe	13	1,2
Asparagin	Asn	11	1,0
Methionin	Met	8	0,8
Isoleucin	lle	7	0,7
Tyrosin	Tyr	5	0,5
Glutamin(säure)	Glx	5	0,5
5-Hydroxylysin	Hyl	4	0,4
Asparagin(säure)	Asx	3	0,3
Histidin	His	2	0,2
Cystein	Cys	0	0,0
Tryptophan	Trp	0	0,0

Tab. 2 Aminosäurezusammensetzung von Kollagen Typ I.⁶⁰

Zum jetzigen Zeitpunkt sind 26 Kollagen-Typen bekannt, von denen Kollagen Typ I das am besten untersuchte ist. Es ist das Hauptkollagen der meisten Gewebe (Knochen, Sehnen, Haut) und bildet hochgradig geordnete supramolekulare Aggregate, woraus die enorm hohe Zugfestigkeit resultiert. Die Tropokollagenmoleküle dieser Kollagenklasse haben die besondere Fähigkeit, sich in einem Selbstassemblierungsprozess spontan zu Fibrillen zusammenzulagern. Polare Sequenzabschnitte innerhalb der Tripelhelix verleihen dem Molekül ein spezifisches Ladungsmuster, das durch elektrostatische Kräfte die Zusammenlagerung der einzelnen Moleküle steuert. Gleiches gilt für hydrophobe Seitenketten.⁵⁸ Fibrillen sind die nächst höhere strukturelle Einheit des Kollagens. Sie besitzen einen Durchmesser von 50 bis 500 nm und sind unter dem Elektronenmikroskop mit charakteristischer Querstreifung sichtbar.⁶¹ Diese Querstreifung ergibt sich aus der besonderen Viertelstaffelung der einzelnen Tripelhelices (Abb. 10). Dabei ordnen sich die Kollagenmoleküle um ein Viertel ihrer Länge stufenweise versetzt an. So erscheinen innerhalb einer Fibrille durch vollständige bzw. teilweise Überlappung dunkle und helle Abschnitte. Diese einzelnen Fibrillen sind von einem feinen Netzwerk aus Glucosaminoglykanen umgeben, welche die Matrix zwischen den Fibrillen ausfüllt.⁶² Die nächstgrößere Struktureinheit sind Fibrillenbündel mit Durchmessern von 50 bis 300 µm. Mehrere Fibrillenbündel bilden schließlich die Sehnenfaser, deren Durchmesser zwischen 100 und 500 µm liegt.⁶¹ Der hierarchische Aufbau einer Sehnenfaser ist in Abbildung 11 dargestellt. Die elektronenmikroskopische Aufnahme in Abbildung 12 zeigt den Querschnitt einer Sehnenfaser, wo die gerade, parallele Anordnung der einzelnen Fibrillenbündel zu erkennen ist.



Abb. 10 Schematische Darstellung von Tropokollagen und der Viertelstaffelung innerhalb einer Fibrille.⁶³



Abb. 11 Hierarchischer Aufbau einer Sehnenfaser (links).⁶¹

Abb. 12 Querschnitt einer Sehnenfaser unter dem Elektronenmikroskop (SEM), Balken: 50 µm (rechts).⁶⁴

2.3.2 Biosynthese und enzymatische Quervernetzung

Die Kollagenbiosynthese ist äußerst komplex, weshalb nachfolgend nur ein kurzer Abriss der einzelnen Schritte gegeben werden soll. Nach der Transkription der entsprechenden Gene erfolgt die Synthese der Propeptidketten aus der mRNA. Sofort nach der Ablösung der Einzelketten vom Polysom werden Lysin- und Prolinreste durch ihre jeweiligen Eisen(II)-abhängigen Hydroxylasen teilweise hydroxyliert. Dadurch erfolgt eine Ausrichtung der Einzelpeptidstränge und eine Zusammenlagerung von drei Ketten unter Ausbildung der Tripelhelix. Zuletzt werden einzelne 5-Hydroxylysinreste glycosyliert und das so vorbereitete Prokollagen wird durch die Zellmembran in die extrazelluläre Matrix geschleust. Dort werden durch spezielle Prokollagenasen die verlängerten N- und C-Termini abgespalten. Das entstandene Tropokollagen lagert sich zu Fibrillen zusammen, deren Struktur durch kovalente Quervernetzung stabilisiert wird.⁶⁵ Die Quervernetzung der einzelnen Tropokollagenmoleküle innerhalb einer Fibrille ist somit ein natürlicher Reifungsprozess, der auf enzymatischem Weg exakt gesteuert wird. Das Ausmaß der extrazellulären Quervernetzung ist abhängig vom Grad der posttranslationalen Hydroxylierung der Lysinreste, die stark zwischen den Kollagentypen bzw. den einzelnen Geweben variiert.⁶⁶



Abb. 13 Enzymatische Quervernetzung von Kollagen durch Lysyl-Oxidase (LOX).

Die Quervernetzungstheorie geht bis in die 1950er Jahre zurück, als erste Untersuchungen zur Kollagenalterung stattfanden. Mit zunehmendem Kollagenalter kommt es zur Strukturstabilisierung durch kovalente Quervernetzung. Zu Beginn dieses Prozesses erfolgt die enzymatische Oxidation der ϵ -Aminofunktion von Lysin- bzw. 5-Hydroxylysin durch die Kupfer(II)abhängige Lysyloxidase (LOX). Dieses Enzym benötigt die hochkonservierte Region –Hyl–Gly–His– Arg- einer gegenüberliegenden Tripelhelix, um spezifisch an den Telopeptiden Lysinaldehyd (Allysin) zu bilden. Diese Aldehyde kondensieren nachfolgend mit Amino- oder Aldehydgruppen anderer Lysin- bzw. Allysinseitenketten zu bivalenten Quervernetzungsstrukturen (Abb. 13). Häufig erfolgt zusätzlich die Inkorporation einer Histidinseitenkette. So ist eine Veränderung des Crosslink-Profils im Verlauf des Alterns feststellbar. Während in unreifem Kollagen reduzierbare Kondensationsprodukte (Dehydrolysinonorleucin, Allysin-Aldol, Dehydromerodesmosin) vorliegen, verschiebt sich das Profil bei der Reifung hin zu multivalenten, nicht-reduzierbaren Crosslinks.⁶⁷ Beispielhaft seien hier Histidinohydroxylysinonorleucin und Histidinohydroxymerodesmosin genannt, die in Haut mengenmäßig am bedeutendsten sind.⁶⁸ Die Gesamtzahl der enzymatischen Crosslinks bleibt dabei weitestgehend erhalten, was auf eine reduzierte LOX-Aktivität im Alter und eine begrenzte Anzahl von Lysin in den Telopeptiden zurückzuführen ist.²⁴

2.3.3 Maillard-Reaktion und nicht-enzymatische Quervernetzung

Im Zuge der Alterung erfolgt eine zusätzliche Quervernetzung von Kollagen, die auf nichtenzymatische Glykierungsprozesse zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu den natürlichen Reifungsvorgängen ist die Glykierung ungerichtet und bewirkt pathologische Veränderungen des Bindegewebes. Monovalente AGEs an den ursprünglich positiv geladenen Seitenketten von Lysin und Arginin verändern das Ladungsmuster des Kollagenmoleküls. Das wiederum verändert unter anderem interfibrilläre Wechselwirkungen sowie Wechselwirkungen mit Zellmembranrezeptoren (Integrine) und mit Mucopolysacchariden der extrazellulären Matrix.²⁴ AGE-Crosslinks bewirken eine undefinierte Vernetzung von Kollagenmolekülen. Der wesentliche Unterschied ist die Lage innerhalb der Viertelstaffelung. Während LOX-vermittelte Crosslinks in der Telopeptidregion liegen und terminale Enden verknüpfen, befinden sich Maillard-induzierte Crosslinks in den helikalen Bereichen (Abb. 14). Das führt dazu, dass die Moleküle innerhalb der parallelen Viertelstaffelung bei äußerer Krafteinwirkung (Dehnung) nicht mehr gleichmäßig aneinander vorbeigleiten.⁶⁹ Die Fibrille verformt sich dadurch inhomogen, das Bindegewebe verliert an Viskoelastizität. Im Organismus äußern sich diese Veränderungen z.B. durch Gefäßerkrankungen (Angiopathien) oder eine Trübung der Augenlinse (Katarakt). Das frühzeitige Auftreten bei Diabetes mellitus dieser eigentlich altersbedingten Komplikationen deutet auf einen direkten Zusammenhang mit der Kollagenglykierung hin.

	₩		╤ ╤०००००००००००००	
	▓▓▓▓▓▓▓▓▓▓▓▓▓	£		=======================================
	₩₩₩₩₩	∞∞∞∞∞⊊ ⊋∞∞∞∞∞	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
	∞; ⊉	‱ ∃‱‱	‱⊊ ⊉‱‱	
£				

Abb. 14 Lage von LOX- (blau) und AGE-Crosslinks (rot) innerhalb einer Kollagenfibrille.⁷⁰

Aus mechanistischer Sicht ist das Verhältnis von Gesamtglykierung und Quervernetzung abhängig von den Reaktionsbedingungen. Man konnte zeigen, dass die Glykierung von Sehnenkollagen in vitro unter anaeroben Bedingungen von der Vernetzung entkoppelt wird.⁷¹ So findet in Anwesenheit von Metallchelatoren oder Antioxidantien bzw. unter Sauerstoffausschluss die Glykierung der Sehne in gleichem Maße statt, jedoch ohne die Ausbildung von Crosslinks. Umgekehrt führten aerobe Bedingungen sowie die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid nachweislich zu einer Quervernetzung. Die Identifizierung der verantwortlichen Strukturen sowie Strategien zur Minderung sind nach wie vor zentrale Fragestellungen. Sehneninkubationen mit MGO (30 mM) belegen, dass vorrangig Arginin glykiert wird. So wurden etwa 80% der verfügbaren Argininseitenketten modifiziert, gleichzeitig aber nur etwa 5% der Lysinseitenketten.⁶⁹ Ein Drittel der Argininmodifikationen entfallen dabei auf MG-H1. AGE-Gehalte in nativem Sehnenkollagen zeigen ein gleiches Muster und sind in Tabelle 3 aufgeführt. Im Gegensatz zur enzymatischen Reifung können bei der Glykierung zusätzlich Argininseitenketten an der Ausbildung von Crosslinks beteiligt sein. Durch Simulationen in silico wurden 14 potentielle Lysin-Arginin-Paare innerhalb einer Kollagenfibrille identifiziert.⁷² Pentosidin nimmt mit dem Kollagenalter linear zu.⁷³ Allerdings kommt es nur in Spuren vor, weshalb die drastischen Veränderungen der mechanischen Eigenschaften nicht allein auf Pentosidin zurückzuführen sein können.⁶⁶ Weiterhin wurden GODIC, MODIC, DODIC und Glucosepan in Hautkollagen quantifiziert.⁷⁴ Bei Patienten mit Diabetes waren die Gehalte aller vier Parameter verdoppelt gegenüber der Kontrollgruppe. So stieg Glucosepan von 2000 auf 4500 pmol/mg Kollagen, während GODIC, MODIC und DODIC von 15, 30 bzw. 14 pmol/mg auf jeweils 27, 55 bzw. 32 pmol/mg anstiegen. Die Lysin-Lysin-Crosslinks GOLD und MOLD korrelieren zwar mit dem Alter, sind jedoch quantitativ von geringer Bedeutung.⁷⁵ Deshalb gilt Glucosepan als mengenmäßig bedeutendstes Maillard-Crosslink in Kollagen.

AGE	Gehalt [mmol/mol Hyp]
CML	35
CEL	9
MG-H1	150
Pentosidin	0,08

Tab. 3 AGE-Gehalte in nativen Mausschwanzsehnen.⁷⁶

Experimentell lässt sich die Quervernetzung von Kollagen auf unterschiedliche Weise bestimmen. Etabliert hat sich dabei vor allem die Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Natriumdocecylsulfat (SDS-PAGE). Da Kollagen selbst unlöslich und das Molekül zu groß ist (400 kDa) um in das Gel einzudringen, wird häufig eine definierte Spaltung mit Bromcyan oder Pepsin durchgeführt.^{77,78} Dadurch entstehen in Abhängigkeit vom Vernetzungsgrad unterschiedlich große Fragmente. Eine empfindliche Bandenvisualisierung kann mittels Silber- oder Coomassie-Färbung erfolgen.⁷⁹ Weiterhin lässt sich der Grad von Quervernetzungen über mechanische Belastungstests bestimmen.⁸⁰ Eine simplere Methode stellt das sogenannte *tail tendon breaking time assay* (TTBT-Assay) dar.⁸¹ Dabei wird eine Kollagensehne mit einem Gewicht versehen und in eine temperierte, denaturierende Harnstofflösung gehängt. Die Zeit bis zum Reißen wird als Bruchzeit bezeichnet. Je mehr Quervernetzungen innerhalb der Sehne vorliegen, umso höher ist die Bruchzeit. Andere Einflussfaktoren wie Geschlecht, Alter, Genotyp und Fütterung sind beim Versuchsdesign zu berücksichtigen.

2.4 Backwaren

Backwaren unterliegen im Zuge ihrer Herstellung sowohl einer fermentativen als auch einer thermischen Prozessierung. Dadurch ist ein hoher Grad der Proteinglykierung zu erwarten, der mit einem Verlust von ernährungsphysiologisch essentiellen Aminosäuren (z.B. Lysin) einhergeht. Daher sind proteingebundene AGEs als Prozesskontaminanten bei der Herstellung von Backwaren anzusehen. Während mechanistische Zusammenhänge der AGE-Bildung in wässrigen Modellsystemen weitestgehend verstanden sind, stehen Untersuchungen von komplexen Lebensmittelmatrices noch aus. Grundsätzlich wird das AGE-Spektrum in Brot durch drei Faktoren beeinflusst: den Ausgangsstoffen (Getreideart, Mehltype, Kohlenhydratzusammensetzung, Enzyme), der Fermentation (Hefen/Milchsäurebakterien, Stärkeabbau, Proteolyse, Bildung von Vorläuferstrukturen) und der thermischen Prozessierung (Ausbildung von Krume/Kruste, Bräunung, Aromabildung, Glykierung).

2.4.1 Teigzusammensetzung und Veränderungen während der Fermentation

Brot gehört zu den wichtigsten Grundnahrungsmitteln des Menschen. Für die Herstellung von Broten werden grundsätzlich drei Zutaten benötigt: Getreidemehl, Wasser und ein Teiglockerungsmittel. Am häufigsten werden Weizen- und Roggenmehl verwendet, für Mehrkornbrote teilweise auch Gerste, Hafer, Mais oder Hirse. Für Vollkornbrote wird häufig Schrot benutzt, das einen bis zu 100-fach größeren Partikeldurchmesser als Mehl besitzt. Für die Teigherstellung ist das u.a. in Weizen enthaltene Klebereiweiß (Gluten) maßgeblich von Bedeutung. Diese Speicherproteine des Getreidekorns setzen sich aus den beiden Osborne-Fraktionen der Prolamine und der Gluteline zusammen (Tab. 4).⁸² Im Weizen werden sie als Gliadine und Glutenine bezeichnet. Durch sie bildet sich beim Kneten ein elastisches Netzwerk aus, das letztlich für das Gashaltevermögen des Teiges verantwortlich ist. Gliadine sind Monomere (28–55 kDa), die dem Teig Viskosität und Dehnbarkeit verleihen. Glutenine sind hochmolekulare Aggregate (500–10.000 kDa), die über Disulfidbrücken von Cysteinseitenketten vernetzt werden und die Elastizität bewirken. Über den Redoxzustand der Cysteinreste lässt sich die Vernetzung und somit die Teigrheologie beeinflussen.⁸³ Das Roggenkorn besitzt wie Weizen monomere Prolamine (Secalin) und polymere Gluteline (Secalinin), jedoch in geringerem Maße und anderem Verhältnis (Tab. 4). Daraus resultieren weniger optimale Teigrheologie und Backeigenschaften von Roggen- im Vergleich zu Weizenmehl. Der Gluten- wie auch der Proteingehalt von Roggenmehl (3,4% / 7,4%) ist insgesamt niedriger als der von Weizenmehl (10,2% / 13,0%). Vom Gesamtprotein lassen sich für beide Mehle Extraktionsraten von 70% erzielen.⁸⁴

Fraktion	Weizen	Roggen	Extraktion	Funktion
Albumine	14,7	44,4	Wasser	Korngenese, Enzyme
Globuline	7,0	10,2	Kochsalzlösung (0,4 M)	Korngenese, Enzyme
Prolamine	32,6	20,9	Ethanol (70%)	Speicherproteine
Gluteline	45,7	24,5	unlöslicher Rückstand	Speicherproteine

Tab. 4 Prozentuale Verteilung der Osborne-Fraktionen auf das Gesamtprotein.⁸⁵

Tabelle 5 zeigt die chemische Zusammensetzung von Weizen und Roggen. Das Verhältnis der Makronährstoffe im Korn ist annähernd gleich. Roggenprotein besitzt insgesamt mehr Lysin und Arginin, die für Glykierungsreaktionen zur Verfügung stehen. Der Anteil an freien Zuckern und Oligosacchariden ist in beiden Arten mit rund 2% der Trockenmasse relativ gering, dabei macht Saccharose etwa 0,7% aus. Roggen beinhaltet tendenziell längerkettige Oligosaccharide, Weizen hingegen mehr Mono- und Trisaccharide. Maltose ist im Korn gar nicht enthalten.

Inhaltsstoff	Matrix	Weizen	Roggen	Einheit	Literatur
Rohprotein		13,0	7,4	g/100 g TM	
davon Lysin	Mahl	1,98	3,41	%	0.4
davon Arginin	Ivieni	3,26	4,42	%	84
Gluten		10,2	3,4	g/100 g TM	
Wasser		13,2	13,7		
Rohprotein		11,7	9,5		
Lipide	K a sur	2,2	1,7	- /100 -	05
Kohlenhydrate	Korn	59,6	60,7	g/100 g	85
Ballaststoffe		13,3	13,2		
Mineralstoffe		1,5	1,9		
Glucose		< LOQ	0,10		
Fructose		1,45	0,07		
Saccharose		7,91	7,07		
Raffinose		4,72	0,79		
Stachyose	Korn	0,06	0,02	g/kg TM	86
Kestose	KOITI	2,86	0,93	6/ 16 114	00
Nystose		1,52	1,63		
Pentasaccharide		0,45	1,15		
Oligosaccharide		3,06	12,9		
gesamt		20,7	21,4		

Tab. 5 Chemische Zusammensetzung von Weizen und Roggen.

TM: Trockenmasse

Mehl enthält getreideeigene Amylasen, die beim Anteigen durch Wasserzugabe aktiv werden. Erst der enzymatische Stärkeabbau liefert ausreichend kurzkettige Zucker, die bei der Fermentation durch Mikroorganismen verstoffwechselt werden können. Getreide enthält geringe Mengen α -Amylase und adäquate Mengen β -Amylase. α -Amylase besitzt eine *endo*-Aktivität und baut Stärke zu Maltodextrinen und Oligosacchariden ab. β -Amylase hingegen weißt eine *exo*-Aktivität auf und spaltet Maltose am nicht-reduzierenden Ende von Stärke, Maltodextrinen oder Oligosacchariden ab.⁸⁷ Da die Geschwindigkeit des Stärkeabbaus von der α -Amylaseaktivität abhängt, wird zur Beschleunigung häufig bakterielle α -Amylase zugesetzt. Ein weiterer Vorteil ist ihre höhere Temperaturstabilität um etwa 10–20 °C. α -Amylase aus Getreide besitzt ein Temperaturoptimum im Bereich von 68–72 °C und wird bereits bei 85 °C inaktiviert.⁸⁷ Neben bakterieller α -Amylase wird häufig γ -Amylase (Glucoamylase, Amyloglucosidase) zugesetzt. Ihre *exo*-Aktivität spaltet Glucose von Stärke und Maltodextrinen ab.⁸⁸ Hohe Maltosegehalte verlängern nur die produktive Zeit der Fermentation, während hohe Glucosegehalte die Fermentationsrate erhöhen.⁸⁹ Glucose und Maltose sind nicht nur Energiequelle für Mikroorganismen, sondern als reduzierende Zucker auch Promotoren der Maillard-Reaktion.

Parallel zum enzymatischen Stärkeabbau finden bei der Teiggare mikrobielle Abbauprozesse statt, die zum einen der Teiglockerung dienen und zum anderen zur Aromabildung beitragen. Bei reinen Weizenteigen werden Hefen der Gattung Saccharomyces cerevisiae eingesetzt. Sie vergären homofermentativ die enthaltenen Kohlenhydrate (Hexosen, Pentosen, Disaccharide) zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid, welche den Teig aufgehen lassen. Als Substrate können Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Xylose, Arabinose, Maltose und Saccharose dienen.⁹⁰ Glucose und Fructose werden dabei bevorzugt und mit ähnlicher Geschwindigkeit verstoffwechselt. Lediglich die Glucoseaufnahme erfolgt schneller aufgrund der höheren Affinität zum Membrantransporter. Zur Verwertung von Saccharose sekretieren Hefen β -Fructosidase (Invertase). Erst wenn Glucose, Fructose, Saccharose und Fructane als Energiequelle erschöpft sind, schalten Hefezellen auf Maltose-Stoffwechsel um. Dafür werden ein eigener Membrantransporter (Permease) und α -Glucosidase (Maltase-Glucoamylase) exprimiert.⁸⁸ Die aufgenommenen Monosaccharide münden in die Glycolyse und das resultierende Pyruvat wird schließlich vergärt. Etwa 50% der freien Aminosäuren im Teig werden durch Hefen verstoffwechselt.91 Weißbrotaroma ist weitestgehend durch Metabolite des Hefestoffwechsels geprägt, von denen etwa 300 flüchtige Verbindungen (Alkohole, Carbonyle, Ester) bekannt sind.⁹⁰

Roggenteig muss bei der Zubereitung zusätzlich angesäuert werden, um die Quellung von Proteinen zu bewirken, die für die Gashaltung verantwortlich sind. Das wird durch spezielle Milchsäurekulturen (*Lactobacillus brevis, L. plantarum*) realisiert. Häufig werden noch säuretolerante Hefen zugesetzt, die das Gehen beschleunigen. Zusätzlich zum Klebereiweiß erzeugen bestimmte Ballaststoffe (Pentosane) einen backfähigen Teig. Im Gegensatz zur Hefegärung, die eine bis wenige Stunden andauert, erfolgt die Sauerteigführung 12–24 Stunden, selten bis zu 144 Stunden. Milchsäurebakterien verstoffwechseln Pentosen, Hexosen, Maltose und Saccharose. Je nach Bakterienstamm münden die Zucker in die Glycolyse oder den Pentosephosphatweg.⁸⁷ Während der heterofermentativen Gärung werden Kohlenstoffdioxid, Ethanol, Milchsäure und Essigsäure produziert, welche zur typischen Geschmacks- und Aromabildung von Roggen- und Mischbroten beitragen. Durch die Säureproduktion wird der pH-Wert des Teiges auf 4–5 abgesenkt. Dadurch werden Amylasen inaktiviert und der Stärkeabbau reduziert. Gleichzeitig erfolgt durch die Säure und endogene Proteasen eine teilweise Proteolyse (< 5%) der Getreideproteine.⁹² Das setzt geschmacksaktive Peptide und Aminosäuren frei, die wiederum Vorläuferstrukturen anderer Aromastoffe darstellen. Dabei ist die Aminosäuregärung (*Ehrlich pathway*) der Hauptbildungsweg aromarelevanter Aldehyde und Alkohole während der Fermentation.⁹³

2.4.2 Folgestrukturen und Veränderungen während des Backens

Beim Backen treten in Folge der hohen Temperaturen physikalische und chemische Veränderungen des Teiges ein. Beim Eintritt in den heißen Ofen wird an der Oberfläche des Teiglings Wasser verdampft, wodurch ein Wassergradient zwischen innen und der Teigoberfläche entsteht. Da die Verdampfung schneller erfolgt als der Wassertransport zur Oberfläche, bildet sich eine Trockenzone aus. Diese Zone verhindert ein weiteres Ausdehnen des Teiglings. Durch die niedrige Wasseraktivität werden Maillard-Prozesse und damit die Melanoidinbildung (Bräunung) angeschoben. Es kommt zur Krustenbildung, wobei die Dicke (meist 2–5 mm) maßgeblich von der Ofentemperatur abhängt.⁹⁴ Im Inneren hingegen steigt die Temperatur nur langsam an, weil die Verdampfungswärme des Wassers ihrer Umgebung Wärme entzieht. Enzymatische Prozesse wie Stärkeabbau, Proteolyse oder Glycolyse werden beschleunigt, bis die entsprechenden Enzyme inaktiviert werden. Bei 60 °C kommt der Hefestoffwechsel zum Erliegen. Zwischen 60–80 °C setzen Stärkeverkleisterung, Proteindenaturierung sowie Fettschmelzen ein. Ab 72 °C bzw. 85 °C werden β -Amylase bzw. α -Amylase vollständig inaktiviert.⁸⁷ Durch das dreidimensionale Protein-Stärke-Netzwerk und die eingeschlossenen Gasbläschen bildet sich beim Backen eine porige Krume aus.

Weizen-, Misch- und Roggenbrote werden üblicher Weise bei etwa 280 °C wenige Minuten gebacken, wonach die Temperatur schrittweise auf 180 °C gesenkt wird. Dies führt zu einer schnellen Krustenbildung und sorgt danach für eine ideale Krume. Für die Herstellung von Pumpernickel wird der sauer geführte Teig in abgedichteten Dampföfen mehr gekocht als gebacken. Durch die sehr lange Erhitzung (bis 36 h) wird die Stärke in erheblichem Umfang zu Dextrinen und Maltose abgebaut, die für den süßlichen Geschmack verantwortlich sind. Bei dieser Art der Zubereitung ist die Melanoidinbildung in Folge der Maillard-Reaktion stark erhöht. Knäckebrot ist ein Flachbrot, das bevorzugt aus Roggenschrot hergestellt wird. Dafür wird der Teig eisgekühlt und unter Anwendung eines Kompressors schaumig geschlagen (Eisknäcke). Diese

25

Lockerung kann alternativ auch biologisch durch Hefe- oder Sauerteig hervorgerufen werden (Gärknäcke). Danach wird es sehr dünn ausgewalzt und 8–10 Minuten bei bis zu 360 °C gebacken. Durch Trocknung wird der Wassergehalt von 10–20% auf etwa 5% herabgesetzt.⁹⁵

Die Maillard-Reaktion lässt sich während des Backens anhand der Oberflächenfarbe qualitativ verfolgen. Damit die Bräunung einsetzt, muss mindestens eine Temperatur von 120 °C und eine Wasseraktivität von 0,6 vorliegen.⁹⁶ Die Farbe lässt sich colorimetrisch sehr einfach bestimmen und idealer Weise über den $L^*a^*b^*$ -Farbraum beschreiben.⁹⁷ Dieses dreidimensionale Farbmodell ist international genormt und gibt den absoluten Farbeindruck geräteunabhängig wieder. Die drei Vektoren beschreiben in *xyz*-Richtung die rot-grün Achse (a^*), die blau-gelb Achse (b^*) und die Helligkeit (L^*). Der Farbunterschied zwischen einem Referenzobjekt und einem Untersuchungsobjekt wird als Farbdistanz (ΔE) ausgedrückt. Getoastetes Weißbrot liefert Farbdistanzen im Bereich von 14–30,⁹⁸ Brotkruste von 28–51.⁹⁴ Als Markerstruktur für die thermische Belastung von Lebensmitteln hat sich 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) etabliert. HMF ist in unprozessierten Lebensmitteln praktisch nicht vorhanden und entsteht erst durch thermisch induzierte Maillard-Prozesse beim Abbau von reduzierenden Zuckern.⁹⁹



Abb. 15 Bildung von Furfural, 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) und Pyrralin.

Beispielsweise erfolgt der Amin-katalysierte Abbau von Glucose über 3-DG und führt durch Cyclisierung und Wasserabspaltung zu HMF (Abb. 15). Parallel, unter Inkorporation einer Lysin-Seitenkette, entsteht Pyrralin als proteingebundenes Analogon.¹⁰⁰ In gleicher Weise führt der Abbau von Disacchariden oder Pentosen über 3-Desoxypentoson (3-DP) zu Furfural bzw. Formylin.¹⁰¹ Lange Fermentationszeiten, lange Backzeiten oder hohe Temperaturen fördern die Bildung von Furfuralen.⁹⁹ Jedoch sind Furfurale keine stabilen Produkte, sondern werden bei höheren Temperaturen wieder abgebaut. Folgeprodukte von HMF sind u.a. 5-Methylfurfural, Furfural und Furfuryldialdehyd.¹⁰² Zur Bestimmung wird HMF zunächst aus der Matrix extrahiert und anschließend mittels HPLC-UV oder HPLC-FLD (nach Vorsäulenderivatisierung mit 1-Naphthylamin) analysiert.^{103,104} HMF-Gehalte in verschiedenen Getreideprodukten sind in Tabelle 6 gegenübergestellt. Üblicherweise liegen HMF-Gehalte zwischen 40–80 mg/kg, hochprozessierte Lebensmittel besitzen Gehalte über 120 mg/kg. Beim Vergleich der HMF-Gehalte in Brot ist entscheidend, ob das gesamte Brot oder nur die Kruste analysiert worden ist, da HMF überwiegend in der Kruste entsteht.

Matrix	HMF [mg/kg]	Literatur
Kekse	0,5 – 74,6	
Pasta	0,1 - 7,0	
Brot	2,2 - 87,7	105
Kleinkindernahrung	0,4 - 65,5	
Frühstücksflocken	3,7 – 193,3	
Kekse	0,3 – 488	
Bretzeln	0,9-3,1	106
Brot	1,9 – 163	
Kekse	1,65 - 82,8	
Kuchen	0,06 - 44,3	107
Brot	0,66 - 18,3	

Tab. 6 Gehalte von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in verschiedenen Lebensmitteln.

Amadori- bzw. Heyns-Produkte und α-Dicarbonylverbindungen sind reaktive Intermediate, die während des Backens entstehen und fortlaufend zu stabileren Verbindungen (MRPs, AGEs) umgesetzt werden. Eine Möglichkeit Amadori-Produkte analytisch zu erfassen, ist die Messung als Furosin, das als Artefakt zu etwa 40 Mol-% nach saurer Totalhydrolyse aus dem Amadori-Produkt entsteht.¹⁰⁸ Weiterhin können Amadori- und Heyns-Verbindungen mittels enzymatischer Proteinhydrolyse freigesetzt und direkt gemessen werden.¹⁰⁹ Tabelle 7 fasst die Gehalte verschiedener Intermediate und Folgeprodukte der Maillard-Reaktion in Keksen zusammen. 3-DG ist verhältnismäßig stabil und daher in höheren Mengen gegenüber MGO enthalten. Furfural wird generell in geringerem Umfang als HMF gebildet. Das Amadori-Produkt ist etwa um das Dreifache

höher als das Heyns-Produkt. MG-H1 ist das häufigste AGE, CML wird tendenziell mehr gebildet als CEL. Zum Vergleich liefert Brot Gehalte von 13–619 mg/kg (3-DG), 0–28 mg/kg (MGO) sowie 1,9–163 mg/kg (HMF).¹⁰⁶ Ein wichtiger Aspekt der Maillard-Reaktion in Backwaren ist der Amin-katalysierte Abbau von Oligo- und Disacchariden, der aus dem Überschuss von Stärke, Dextrinen und Maltose gespeist wird. Prinzipiell besitzen Mehrfachzucker eine geringere Reaktivität im Vergleich zu Monosacchariden, jedoch bewirkt ihre $(1\rightarrow 4)$ -glykosidische Verknüpfung ein charakteristisches Dicarbonylspektrum, das über einen sogenannten *peeling off*-Mechanismus zu erklären ist.¹¹⁰ Dabei erfolgt der nucleophile Angriff des Amins am reduzierenden Ende des Oligosaccharids, was eine Eliminierung des glykosidischen Rests an Position C₄ auslöst. 4-Desoxyglucoson (4-DG), 1,4-Didesoxyglucoson (1,4-DDG) sowie 1-Lysino-1,4-DDG sind disaccharidspezifische C₆-Dicarbonyle.⁵³ C₁₂-Dicarbonyle werden entsprechend als Maltosone bzw. Desoxymaltosone bezeichnet.

Verbindung	Gehalt [mg/kg]	Literatur	
3-Desoxyglucoson (3-DG)	8,5 – 385		
Methylglyoxal (MGO)	1,8 - 68	106	
5-Hydroxymethylfurfural (HMF)	0,3 – 488		
Furfural	n.n. – 10,5	107	
5-Hydroxymethylfurfural (HMF)	1,65 – 82,8	107	
N ⁶ -Fructosyllysin (Amadori-Produkt)	108 – 717		
Glucosyl-/Mannosyllysin (Heyns-Produkt)	19 – 287		
N ⁶ -Carboxymethyllysin (CML)	10 – 76	109	
N ⁶ -Carboxyethyllysin (CEL)	2 – 53		
MG-H1	10-218		

Tab.	7	Intermediate une	d Produkte	der Maillard	-Reaktion in	Keksen.
------	---	------------------	------------	--------------	--------------	---------

n.n. – nicht nachweisbar
2.4.3 Brotaroma und 2-Acetyl-1-pyrrolin

Die bei der Fermentation gebildeten Aromen überstehen nur vereinzelt den Backprozess. Doch beim Backen entstehen in Folge der Maillard-Reaktion neue aromaaktive Verbindungen. Häufig werden die unmittelbaren Vorläuferstrukturen während der Fermentation gebildet. Brotaroma setzt sich aus mehreren hundert Verbindungen zusammen, von denen allerdings nur wenige relevant für das produkttypische Aroma sind. Der Geruchseindruck ist abhängig von der Konzentration der Verbindung sowie von synergistischen Effekten bei der Kombination mehrerer Substanzen. Jede Substanz besitzt einen Geruchsschwellenwert, der die minimale noch wahrnehmbare Konzentration beschreibt. Zur Beurteilung des Beitrags am Geruch eines Lebensmittels wird die Konzentration des Stoffes zu seinem Geruchsschwellenwert ins Verhältnis gesetzt. Dieser Quotient ist der sogenannte Aromawert (odor activity value, OAV) und ermöglicht außerdem Rückschlüsse auf die wahrgenommene Geruchsintensität.¹¹¹ Mit dem OAV gelang die Identifizierung von insgesamt 226 Schlüsselgeruchsstoffen in 227 Lebensmitteln. Das bedeutet, dass von schätzungsweise 10.000 flüchtigen Verbindungen im Gasraum eines Lebensmittels weniger als 3% für den Geruch verantwortlich sind. Von diesen 226 Verbindungen wurden mittels multivariater Datenanalyse 16 Verbindungen erkannt, die in über 25% aller Lebensmittel vorkommen und daher als "Generalisten" bezeichnet werden. 2-Acetyl-1-pyrrolin (2-AP) ist so ein Generalist und besitzt mit 0,05 μ g/kg einen sehr niedrigen Geruchsschwellenwert.¹¹¹

Das Aroma von 2-AP wird als "röstig, popcornartig" beschrieben. So ist es vor allem für das typische Aroma von Weißbrot verantwortlich, aber auch u.a. in Duftreis, Popcorn, Tortillas, gekochten Kartoffeln, Honig, Milch, Käse sowie gekochtem Fleisch und Fisch als Duftstoff von Bedeutung.¹¹² 2-AP ist damit ein wichtiges Maillard-Reaktionsprodukt (MRP), das während des Kochens oder Backens aus MGO und 1-Pyrrolin gebildet wird. Abzugrenzen davon ist 2-AP in Basmati, wo es bereits in der Reispflanze als Metabolit gebildet wird und somit kein MRP darstellt.¹¹³ In Backwaren entsteht 2-AP überwiegend durch die Stoffwechselaktivität der Hefen. Das wurde durch eine positive Korrelation zwischen Hefemenge sowie Fermentationszeit und der gebildeten Menge 2-AP bestätigt.¹¹⁴ Die Freisetzung von MGO aus Triosephosphaten wurde bereits ausführlich in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. 1-Pyrrolin entsteht durch Strecker-Abbau der Aminosäuren Prolin und Ornithin, die ebenfalls in Hefezellen in relevanten Mengen (89 bzw. 318 mg/kg) frei vorliegen.¹¹⁵ Der tatsächliche Bildungsweg von 2-AP aus MGO und 1-Pyrrolin ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisher sind zwei mögliche Mechanismen postuliert, die jedoch nicht ausreichend experimentell untermauert sind. Zusammengefasst besteht die Bildung aus dem nucleophilen Angriff von 1-Pyrrolin an MGO, der Umlagerung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung sowie der Eliminierung eines C₁-Fragments, z.B. Ameisensäure oder Kohlenstoffdioxid (Abb. 16).

29



Abb. 16 Bildung von 2-Acetyl-1-pyrrolin (2-AP) und 2-Acetyltetrahydropyridin (2-ATHP).

Parallel zu 2-AP wird das homologe 2-Acetyltetrahydropyridin (2-ATHP) gebildet, das ebenfalls aromaaktiv ist. Welche der beiden Verbindungen bevorzugt gebildet wird, hängt vom Verhältnis MGO/Aminosäure ab. Als bisher einziges Intermediat wurde 2-(1-Hydroxy-2-oxo-1-propyl)pyrrolidin (HOP) als Präkursor von 2-ATHP identifiziert.¹¹⁶ Aufgrundlage von Experimenten wird 2-ATPH nicht direkt aus MGO, sondern seiner reduzierten Form Acetol (Hydroxyaceton) gebildet, das wie 1-Pyrrolin beim Strecker-Abbau entsteht.

Die Analytik von 2-AP erfolgt üblicherweise mittels Gaschromatographie gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer (GC-MS/MS). Während früher mehrere Kilogramm Probenmaterial extrahiert werden mussten, reichen heute einzelne Reiskörner aus, um 2-AP aus dem Dampfraum (*headspace*, HS) mit einer Bestimmungsgrenze von 0,10 µg/kg zu quantifizieren.¹¹⁷ Die größte Herausforderung an die Analytik stellt jedoch die instabile Natur des 2-AP-Moleküls dar. Zum einen ist ein rapider Abbau innerhalb der Lebensmittel zu beobachten. So verliert frisch gebackenes Weißbrot innerhalb von drei Stunden bereits 53% seines ursprünglichen 2-AP-Gehalts.¹¹⁸ Auch müssen Diskriminierungseffekte während der Aufarbeitung, z.B. durch die *headspace solid phase mico-extraction* (HS-SPME), kompensiert werden. Zum anderen ist die Lagerstabilität authentischer Standards ein Problem. Vor allem isotopenmarkierte Standards (¹³C₁, ²H₄) müssen häufig selbst synthetisiert werden, neigen jedoch selbst bei -20 °C aufgrund ihrer Oxidationsempfindlichkeit zur Polymerisation.¹¹⁹ Ein neuer Ansatz ist deshalb die Lagerung als Zinkhalogenid-Komplex.¹²⁰

Gehalte von 2-AP und 2-ATHP in typischen Lebensmitteln und dazugehörige Aromawerte sind in Tabelle 8 gegenübergestellt. Diese Gegenüberstellung verdeutlicht, dass für die Geruchsqualität des Lebensmittels nicht der Gehalt des Aromastoffs, sondern sein Aromawert ausschlaggebend ist. Deshalb ist 2-AP als MRP trotz seines häufig geringen Gehalts vor allem für das Aroma von Backwaren von großer Bedeutung.

B. G A S	2-AP		2-ATHP		
Matrix	Gehalt [µg/kg]	OAV	Gehalt [µg/kg]	OAV	
Weißbrot (Kruste)	78	10685	53	981	
Weißbrot (Krume)	2,8	383	2,0	37	
Roggenbrot (Kruste)	0,8	110	n.a.	-	
Popcorn (frisch)	24	3288	437	8092	
Toastbrot (getoastet)	8,8	1205	1,5	28	
Sesam (geröstet)	30	4110	n.a.	-	
Duftreis (Basmati)	610	83516	n.a.	-	
Mais (gekocht)	4	6027	n.a.	-	

 Tab. 8
 2-Acetyl-1-pyrrolin (2-AP), 2-Acetyltetrahydropyridin (2-ATHP) und ihre Aromawerte (OAV) in verschiedenen Lebensmitteln.¹¹⁶

n.a.: nicht analysiert

3 ZIELSTELLUNG

Maillard-Prozesse spielen im täglichen Leben eine wichtige Rolle, da sie sowohl gewünschte Vorgänge wie die Bräunung und Aromabildung bei der Zubereitung von Lebensmitteln bewirken, aber auch pathogene Effekte durch die Glykierung körpereigener Proteine oder die Bildung sogenannter Glycotoxine. Ein umfassendes Verständnis über die ablaufenden Vorgänge ist daher wichtig für die Steuerung industrieller Herstellungsverfahren oder die Vorbeugung, Erkennung und Behandlung pathologischer, glykierungsassoziierter Spätkomplikationen *in vivo*. Aus Modell-reaktionen sind bereits zahlreiche Strukturen sowie grundlegende Bildungsmechanismen von Maillard-Produkten bekannt. Das Auftreten von Aminosäuremodifikationen in biologischen Geweben sowie in Lebensmitteln allgemein wurde bislang nur unzureichend untersucht. Häufig beschränkt sich der Nachweis auf einzelne Verbindungen, jedoch fehlen umfassende Analysen ganzer Lebensmittelgruppen sowie eine zusammenhängende Betrachtung der zahlreichen Strukturen. Speziell Methylglyoxal, das hauptsächlich aus Triosephosphaten entsteht, wurde als relevante Dicarbonylverbindung bei Maillard-Prozessen unterschätzt.

Die vorliegende Arbeit sollte den Beitrag von Methylglyoxal als reaktives Intermediat innerhalb der Maillard-Reaktion untersuchen und neu bewerten. Dabei wurde die Fragestellung sowohl aus lebensmittelchemischer (Proteinglykierung beim Backprozess) wie auch aus biochemischer Sicht (Kollagenglykierung beim Altern) auf molekularer und makroskopischer Ebene bearbeitet. Basierend auf bekannten Reaktionsmechanismen wurde die Bildung eines Amid-Crosslinks ausgehend von Methylglyoxal und Lysin postuliert. Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Bestätigung dieser Hypothese, wofür zunächst die Synthese und Charakterisierung eines authentischen Referenzstandards nötig war. Dazu wurde nach Erweiterung der etablierten HPLC-MS/MS-basierten Bestimmungsmethode für posttranslationale Aminosäuremodifikationen der Nachweis in Modellsystemen und anschließend in Realproben (Kollagen und Brot) untersucht. Langlebige Proteine wie Kollagen unterliegen einer fortwährenden Glykierung beim Altern. Für Kollagen musste ein effizientes Protokoll entwickelt werden, um das unlösliche Bindegewebsprotein unter Erhalt säurelabiler Strukturen in Lösung zu bringen und einem enzymatischen Verdau zugängig zu machen. In hochprozessierten Lebensmitteln wie Backwaren ist ebenfalls ein hoher Grad der Proteinmodifizierung zu erwarten. Die Bilanzierung der täglichen Aufnahme von Glycotoxinen über die Nahrung sowie ihre Bildung bei der Herstellung war daher ein weiterer zentraler Aspekt dieser Arbeit. Bei der Herstellung von Brot erfolgt vor dem Backen zusätzlich ein mikrobieller Fermentationsschritt. Deshalb war es ein Teil der Fragestellung dieser Arbeit, zu untersuchen ob fermentativ hergestellte Produkte aus Hefe- oder Sauerteig wesentlich durch Methylglyoxal-Modifikationen geprägt sind. Die Einbindung der Getreideproteine in eine komplexe Stärkematrix erforderte ein neues Aufarbeitungskonzept, um möglichst reines Protein für die nachfolgende Proteinhydrolyse zu erhalten. Gleichzeitig wurde eine neuartige, empfindliche Nachweismethode für 2-Acetyl-1-pyrrolin entwickelt, das als typisches Brotaroma beim Backen aus Methylglyoxal gebildet wird.

So wie die moderne Definition der Maillard-Reaktion eine Verbindung zwischen Lebensmittelchemie und Medizin schafft, muss die vorliegende Arbeit inhaltlich eine Brücke schlagen zwischen mechanistischer Grundlagenforschung, anwendungsbezogener Lebensmittelanalytik und molekularer Pathobiochemie. Dabei stellt Methylglyoxal das thematische Bindeglied zwischen den einzelnen Themengebieten dar. Im nachfolgenden Kapitel sind die Ergebnisse der drei zugrundeliegenden Publikationen kapitelweise zusammengetragen und diskutiert. Ein besonderer Fokus lag dabei auf den Gesetzmäßigkeiten der ablaufenden Mechanismen, insbesondere der Herausarbeitung von Haupt- und Nebenwegen innerhalb der Maillard-Kaskade. So konnte die Rolle von Methylglyoxal in den Gesamtkontext der Maillard-Reaktion eingeordnet werden.

4 DISKUSSION UND EINORDNUNG DER ERGEBNISSE

4.1 Advanced Glycation Endproducts in Kollagen

Kollagen ist der Hauptbestandteil von Bindegewebe und somit in hohem Maß am Aufbau unseres Organismus beteiligt. Als langlebiges Protein unterliegt es jedoch im Laufe des Alterns strukturellen Veränderungen durch Maillard-Prozesse, die seine natürlichen Eigenschaften negativ beeinflussen. Das Wissen über die Bildungswege bekannter AGEs ermöglicht Voraussagen zur Bildung noch unbekannter Strukturen. Die Methylglyoxal-Lysin-Reaktionskaskade führt durch prototrope Umlagerung (Tautomerisierung) initialer Halbaminale zum stabilen N⁶-Carboxyethyllysin (CEL) bzw. N^6 -Lactoyllysin (Lac). So führt hypothetisch der nucleophile Angriff von zwei Lysinresten an jeweils eine Carbonylgruppe von Methylglyoxal (MGO) mit anschließender Tautomerisierung zu einer Lysin-Lysin-Amid-Quervernetzung. Die Struktur dieses MGO-Crosslinks wurde bereits 1994 von Thornalley postuliert, aber bis heute noch nie nachgewiesen.⁵⁵ Die Synthese und der Nachweis des Glyoxal-Analogon GOLA erfolgten bereits 2001 durch Glomb und Pfahler.¹⁸ Ausgehend von dieser Syntheseroute erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die zielgerichtete Herstellung von 2,15-Diamino-8-methyl-9-oxo-7,10-diaza-1,16-hexadecandisäure. Anstelle von Glyoxylsäure wurde Brenztraubensäure (Pyruvat) verwendet. In Analogie zu GOLA erhielt das neue Amid-Crosslink die Bezeichnung MOLA (Methylglyoxal-Lysinamid). Die Synthese erfolgte über sechs Stufen ausgehend vom doppelt geschützten Lysin 1 (Abb. 17). Das wurde in zwei einfachen Schritten mittels Boc-Anhydrid (Boc₂O) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) als Katalysator sowie anschließender Hydrierung zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe in **3** überführt. Mit Pyruvat (PyrOH) wurde nach reduktiver Aminierung das N⁶-Carboxyethyl-Derivat 4 erhalten. Dessen freie sekundäre N⁶-Aminogruppe musste für den nächsten Schritt mit Boc-Anhydrid geschützt werden. Anschließend erfolgte eine Amid-Kopplung von 3 und 5 mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt). Die umgekehrte Strategie, erst die Amid-Synthese gefolgt von der reduktiven Aminierung, wurde ebenfalls getestet. In diesem Fall musste für die EDC-vermittelte Amid-Kopplung die Carbonylgruppe von Pyruvat als Dimethylhydrazon (DMH) geschützt werden.¹²¹ Im Zuge dieser Syntheseroute wurde ausgehend von 8 ein weiteres mögliches AGE entdeckt, dass in weiterführenden Arbeiten schließlich als N⁶-Pyruvoyllysin eingeführt wurde.¹⁹ Der kritische Schritt in der alternativen Route war die reduktive Aminierung. Wahrscheinlich erfolgte der nucleophile Angriff der N⁶-Aminogruppe von **3** an die Carbonylgruppe von **8** wesentlich schlechter als an die von freiem Pyruvat. Auch die direkte Kopplung von **3** und **4** zu **9** war nicht erfolgreich. Dazu war ein zusätzlicher Schritt via 5 notwendig. Vermutlich störte die sekundäre *N*⁶-Aminofunktion von **4** die Aktivierung mittels EDC. Ein zusätzlicher Vorteil war, dass sich die Verbindung **6** perspektivisch besser säulenchromatographisch aufreinigen lies als **8** und **9**, weil keine polaren Gruppen mehr im Molekül vorhanden waren, die Wasserstoffbrücken mit Kieselgel ausbilden. Nach saurer Abspaltung der Schutzgruppen von **6** wurde MOLA mit einer Gesamtausbeute von 24% erhalten.





Zur Ermittlung der Bildungskinetik von MOLA unter aeroben Bedingungen wurden zuerst Modellinkubationen von N^2 -Boc-Lysin (42 mM) mit MGO (21 mM) in Phosphatpuffer (37 °C, pH = 7,4) durchgeführt (Tab. 9). Zum Vergleich wurde eine anaerobe Kontrolle für sieben Tage mitgeführt. Dabei wurden u.a. die drei Produkte CEL, Lac und MOLA der MGO-Lysin-Reaktionskaskade (Abb. 9) bestimmt. CEL war erwartungsgemäß in beiden Systemen die mengenmäßig bedeutendste Lysinmodifikation. Im Modellsystem lag nach 24 h ein Verhältnis von 4:2:1 vor, welches sich nach sieben Tagen zu 7:2:1 verschob. Die Bildung von MOLA und Lac erfolgte also in einem konstanten Verhältnis, während die CEL-Bildung unabhängig von diesem Verhältnis über die Zeit anstieg. Das deutet darauf hin, dass MOLA und Lac dem gleichen Bildungsweg folgen. Dass CEL in einem so deutlichen Überschuss gebildet wird, kann nur über das Hydratationsgleichgewicht von MGO in wässriger Lösung erklärt werden (Abb. 5). Etwa zwei Drittel von MGO liegen als Monohydrat vor, bei dem die Ketogruppe für eine nucleophile Reaktion zur Verfügung steht. Die Aldehydgruppe ist bis auf einen kleinen Anteil (< 1%) als Hydrat inaktiviert, wodurch ein nucleophiler Angriff an dieser Position deutlich unwahrscheinlicher ist. Die Inkubation unter Ausschluss von Sauerstoff lieferte nach einer Woche die gleichen Konzentrationen wie unter Zutritt von Sauerstoff. Das untermauert den postulierten Mechanismus, bei dem alle drei Strukturen nicht-oxidativ durch Umlagerung gebildet werden (Abb. 18).

70:+ [4]	А	Vorbältnin		
Zeit [d]	CEL	Lac	MOLA	vernaithis
0	2	n.n.	2	1:0:1
1	16	9	4	4:2:1
2	26	11	5	5:2:1
3	33	13	6	6:2:1
4	38	13	6	6:2:1
7	50	16	7	7:2:1
7 (anaerob)	47	13	8	6:2:1

Tab. 9 Bildungskinetik von MOLA im *in vitro* Modell mit N²-Boc-Lysin (42 mM) und MGO (21 mM).

n.n.: nicht nachweisbar

Tab. 10 Bildungskinetik von MOLA im *ex vivo* Modell mit Kollagen (5 mg) und MGO (0,2 mM).

7.14 [4]	AGE [µ	Manhälteria		
Zeit [d]	CEL	Lac	MOLA	vernaithis
0	1,5	0,2	n.n.	8:1:0
3	6,5	0,8	1,3	8:1:2
5	7,3	0,8	1,5	9:1:2
7	8,5	1,0	1,9	9:1:2

n.n.: nicht nachweisbar



Abb. 18 Postulierter Bildungsweg von MOLA innerhalb der Methylglyoxal-Lysin-Reaktionskaskade.

In Kollagen kehrte sich das Verhältnis von Lac und MOLA um. Als *ex vivo* Modell wurden im Rahmen dieser Arbeit Rattenschwanzsehnen (ca. 5 mg Trockenmasse) mit MGO (200 μM) unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH = 7,4) inkubiert und anschließend die Glykierungskinetik bestimmt (Tab. 10). Ein neuer Aspekt in diesem Versuch war die vergleichsweise geringe MGO-Konzentration von 0,2 mM, die verwendet wurde. In vergleichbaren Studien wurden Konzentrationen von 20 mM oder höher eingesetzt, um Effekte zu zeigen oder Strukturen nachweisen zu können.^{69,78} Aus diesem MGO-Überschuss ergibt sich jedoch das Problem, dass Strukturen wie MOLD gebildet werden, die unter physiologischen Bedingungen eher unüblich sind und somit zu einer "Über-Glykierung" führen. Im hier verwendeten Modell hingegen wurde kein MOLD nachgewiesen. Erst die Entwicklung eines effizienten Protokolls zur Denaturierung und enzymatischen Hydrolyse des unlöslichen Sehnenkollagens ermöglichte umfassende Untersuchungen zur strukturellen Modifizierung durch Maillard-Prozesse. Im ersten Schritt wurde die stark hierarchische Anordnung des Kollagens innerhalb der Sehne mechanisch mit einer Kugelmühle aufgelockert. Verdünnte Essigsäure störte die Wasserstoffbrücken der Tripelhelices, was einen Anverdau durch Pepsin ermöglichte. Ein weiterer Verdauungsschritt mit Kollagenase erzeugte lösliche Peptide, die schließlich durch eine Mischung von Endo- und Exopeptidasen verdaut werden konnten. Damit wurde für das Sehnenkollagen ein durchschnittlicher Hydrolysegrad von 73% erreicht. Die nativen Sehnen von drei Monate alten Versuchstieren enthielten bereits CEL und Lac aufgrund natürlicher Glykierung. In den ersten drei Tagen verlief die Modifizierung durch MGO am schnellsten, danach nahm der Anstieg deutlich ab. Das deutet darauf hin, dass der überwiegende Teil des eingesetzten MGO bereits abreagiert war. Dieser Verlauf befindet sich im Einklang mit der Studie von Thornalley *et al.* an bovinem Serumalbumin (BSA), wonach im Zeitraum von vier Tagen 55% MGO irreversibel am Protein gebunden vorlagen, 30% reversibel gebunden waren und 14% MGO-Abbauprodukte, z.B. Lactat und Pyruvat, entstanden.⁵⁵

Die Modifizierung von Arginin im selben Versuch (Tab. 11) war um den Faktor 1000 höher, was aus der hohen Affinität der N^5 -Guanidino-Gruppe gegenüber α -Dicarbonylen resultiert und in Einklang mit der Literatur ist.^{69,76} Die identifizierten Hauptmodifikationen waren MG-H1 und seine offenkettige Form N^7 -Carboxyethylarginin (CEA). Das deckt sich mit dem bisherigen Wissen über die MGO-Arginin-Reaktionskaskade im wässrigen Modellsystem.⁵⁶ Bereits die nativen Sehnen enthielten beträchtliche Mengen von beiden Verbindungen. Das endocyclische Isomer MG-H3 war erwartungsgemäß nur zu einem geringen Teil in nativem Gewebe vorhanden, weil es sich als kinetisch kontrolliertes Produkt über CEA in das thermodynamisch stabilere MG-H1 umwandelt. Der Anteil der Quervernetzungsstruktur MODIC war etwa um das Fünffache höher als der von MOLA, was andeutet, dass in Kollagen bevorzugt Lysin-Arginin-Crosslinks gebildet werden. Das könnte wiederum auf die räumliche Anordnung der Kollagenmoleküle innerhalb einer Fibrille zurückzuführen sein. Eine Simulation *in silico* von Gautieri *et al.* ergab 14 potentielle Lysin-Arginin-Paare, die aufgrund ihres intrafibrillären Abstands Glykierungscrosslinks ausbilden können.⁷²

76:4[4]		AGE [µmol/n	nol Leu-Äq]	
zeit [d]	CEA	MG-H1	MG-H3	MODIC
0	7,2	18	0,57	n.n.
3	7500	7000	250	5,0
5	8300	8500	320	7,4
7	9500	10400	400	11

Tab. 11	Glykierung von	Arginin im <i>e</i> :	<i>x vivo</i> Modell	mit Kollage	n (5 mg	;) unc	I MGO	(0,2 mM	i).
---------	----------------	-----------------------	----------------------	-------------	---------	--------	-------	---------	-----

n.n.: nicht nachweisbar

Um die Auswirkung der molekularen Veränderungen auf makroskopischer Ebene zu untersuchen, wurden die mit MGO inkubierten Sehnen einem Bruchtest (TTBT-Assay, siehe 2.3.3) unterzogen. Der Anstieg der Sehnenbruchzeit korrelierte dabei mit zunehmender Inkubationszeit (Abb. 19, links), wobei dieser Effekt mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Bildung von Crosslinks zurückzuführen ist. Eine Untersuchung des modifizierten Kollagens mittels SDS-PAGE belegte, dass es sich dabei um intermolekulare Crosslinks handelt (Daten nicht gezeigt). Weiterführend wurden die Bestimmung der Sehnenbruchzeit und der natürlichen Glykierung *in vivo* an Rattenschwanzsehnen unterschiedlichen Alters (3, 12 und 22 Monate) durchgeführt. Bezogen auf die übliche Lebenserwartung sind die Versuchstiere entsprechend als jung (3 Monate), erwachsen (12 Monate) und alt (22 Monate) einzuordnen. Die Sehnenbruchzeit ermöglichte eine klare Differenzierung zwischen den jeweiligen Altersgruppen (Abb. 19, rechts).



Abb. 19 Sehnenbruchzeit (TTBT) von inkubierten Sehnen (links) und nativen Sehnen unterschiedlichen Alters (rechts).

Das AGE-Spektrum der nativen Sehnen (Tab. 12) zeigte eine ähnliche Verteilung der unterschiedlichen Modifikationen wie im *ex vivo* Modell. Alle AGE-Gehalte waren in den alten Tieren (22 Monate) signifikant erhöht gegenüber den erwachsenen Tieren (12 Monate). MG-H1 war auch hier die mengenmäßig bedeutendste Struktur. *N*⁶-Carboxymethyllysin (CML) war die häufigste Lysin-Modifikation in Kollagen. Der Hauptbildungsweg von CML in Bindegewebe verläuft vermutlich über das Amadori-Produkt der Glucose. Der Verlust von positiv geladenen Aminosäureseitenketten verändert den isoelektrischen Punkt von Kollagen, was sich auf weitere physikalische Eigenschaften auswirken kann.²⁴ Zur Bestimmung von AGE-Crosslinks in den Sehnen unterschiedlichen Alters war vorab eine Anreicherung aus den enzymatischen Hydrolysaten durch wiederholte Fraktionierung mittels analytischer HPLC notwendig. In Sehnen junger Tiere (3 Monate) waren auch nach Anreicherung keine Crosslinks nachweisbar. Die Ergebnisse zeigen, dass die Maillard-vermittelte Kollagenquervernetzung erst im Zuge des Alterns eintritt, wo entsprechende AGEs

akkumuliert werden. Dadurch könnten typische Alterungserscheinungen von Bindegewebe wie Verlust von Spannkraft und Elastizität teilweise erklärt werden. In Übereinstimmung mit der Literatur war Glucosepan das Hauptcrosslink in Kollagen.⁷⁴ Seine Bildung über das Lederer-Glucoson erfolgt ebenfalls ausgehend von Glucose. Zusammen mit DODIC und MODIC erfolgt *in vivo* überwiegend die Ausbildung von Lysin-Arginin-Crosslinks, was sich wiederum mit den Ergebnissen des *ex vivo* Modells mit MGO deckt. MOLA war darüber hinaus als einziges Lysin-Lysin-Crosslink in nativem Kollagen enthalten. Unter Berücksichtigung der typischen Aminosäurezusammensetzung von Typ I-Kollagen entspricht das schätzungsweise einem Molekül MOLA auf 1200 Kollagenmoleküle. Im Vergleich kommt ein Molekül MG-H1 auf 20 Kollagenmoleküle. Alle anderen bekannten AGE-Crosslinks, darunter MOLD, GOLD und GOLA sowie GODIC und Pentosidin waren im nativen Kollagen in keiner Altersgruppe nachweisbar.

AGE	Alter [Monate]			
[µmol/mol Leu-Äq]	3	12	22	
CEL	1,5	1,6	1,8	
CEA	7,3	7,0	8,4	
MG-H1	18	21	25	
CML	4,7	6,9	13	
Glucosepan*	n.n.	n.b.	0,72	
DODIC*	n.n.	n.b.	0,24	
MODIC*	n.n.	n.b.	0,04	
MOLA*	n.n.	n.b.	0,34	

Tab. 12 Ausgewählte AGEs in Rattenschwanzsehnen verschiedenen Alters.

* nach präparativer Anreicherung mittels HPLC

n.n.: nicht nachweisbar, n.b.: nicht bestimmbar

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit, dass neben Glucose vor allem MGO maßgeblich an der Glykierung des Bindegewebsproteins Kollagen *in vivo* beteiligt ist. Dabei erfolgt überwiegend die Modifizierung von Argininseitenketten der Kollagenhelices. Kovalente, intermolekulare Maillard-Crosslinks werden vorrangig zwischen Lysin und Arginin gebildet und während des Alterns akkumuliert. Diese irreversible, chemische Modifizierung verändert nachweislich die mechanischen Eigenschaften der Sehnen, was durch den Bruchtest gezeigt wurde. Als neuartiges Amid-Crosslink wurde MOLA erstmalig *in vivo* nachgewiesen und neben einer Reihe anderer AGEs in Sehnenkollagen quantifiziert.

4.2 2-Acetyl-1-pyrrolin in Lebensmitteln

Der Duftstoff 2-Acetyl-1-pyrrolin (2-AP) ist für die Lebensmittelindustrie ein wichtiger Aromastoff hinsichtlich der Geruchsqualität und der Verbraucherakzeptanz frischer Backwaren und anderer Lebensmittel wie Duftreis. Seit den 1980er Jahren wird 2-AP in Lebensmitteln intensiv erforscht. Für die Analytik wird üblicherweise die Gaschromatographie herangezogen, bei der entweder der Dampfraum oder der Lösungsmittelextrakt eines Lebensmittels untersucht wurden. Ein kritischer Punkt ist jedoch immer die Instabilität des Moleküls, die während der Probenaufarbeitung oder der Lagerung des Standards zum Abbau von 2-AP führt.^{119,120,122} Diese Instabilität ist auf die intrinsische α-Dicarbonylstruktur zurückzuführen, die sich aus der Nachbarschaft der Acetyl-Gruppe zur Imino-Gruppe des Pyrrolinrings ergibt. Dadurch unterliegt das Molekül verschiedenen Abbaureaktionen wie hydrolytische Ringöffnung, nucleophile Angriffe, Aldol-Reaktionen oder Polymerisierung, die besonders unter basischen Bedingungen begünstigt sind. Einerseits abstrahieren Lewis-Basen acide Protonen von Carbonylen und erhöhen damit deren Reaktivität. Andererseits sind z.B. Hydroxidionen selbst starke Nucleophile, die die Ringöffnung von 2-AP und somit den weiteren Abbau triggern. Apintanapong et al. haben den unterschiedlichen Abbau in wässriger Lösung nach sieben Tagen bei pH = 2 (5%) und pH = 8 (67%) demonstriert.¹²² Für weiterführende Abbau-Studien wurde in der vorliegenden Arbeit der frisch synthetisierte Standard in wässriger Lösung über zehn Stunden mittels GC-MS sowie -FID kontrolliert (Abb. 20). Parallel dazu wurden ein wässriger Extrakt sowie ein Phosphatpuffer-Extrakt von Langkornreis angefertigt, die als blindwertfreie Lebensmittelmatrix dienten. Denn im Gegensatz zu Basmati enthält Langkornreis keine relevanten Mengen 2-AP.¹¹⁷ In diesen beiden Extrakten wurde ebenfalls die Stabilität des selbst synthetisierten 2-AP gemessen.



Abb. 20 Abbau von 2 Acetyl-1-pyrrolin (2-AP) in wässriger Lösung.

In reinem Wasser erfolgte kein Abbau, jedoch bei pH = 9 um 14% (Graph nicht gezeigt) und in wässriger Reismatrix sogar um 60%. Das belegt wie schnell 2-AP in Gegenwart von Nucleophilen aus der Lebensmittelmatrix, z.B. Alkohole, Amine oder Thiole, abgebaut wird. Im Gegensatz dazu war 2-AP in phosphatgepufferter Matrix (pH = 7,4) wesentlich stabiler und zeigte nach zehn Stunden lediglich einen Abbau von 8%. Innerhalb der ersten zwei Stunden war kein Abbau festzustellen.

Die verkappte Dicarbonylstruktur gab Grund zu der Annahme, dass 2-AP stöchiometrisch mit Abfangreagenzien wie ortho-Phenylendiamin (OPD) reagieren kann. Die Reaktion von OPD zu stabilen Chinoxalinen erfolgt so schnell, dass selbst kurzlebige Dicarbonylspezies damit erfasst werden können.⁴² Testreaktionen im Rahmen der Arbeit mit 2-AP und OPD führten zu einem einzigen Produkt mit einem Absorptionsmaximum bei 320 nm, wie es für Chinoxaline typisch ist. Das deutete auf eine vollständige Derivatisierung ohne Nebenreaktionen hin. Die isolierte Verbindung wurde schließlich durch ein- und zweidimensionale NMR-Experimente sowie hochauflösende Massenspektrometrie als 1-(3-Methyl-2-chinoxalinyl)-3-aminopropan identifiziert. Folglich leitet sich dieses Chinoxalin (2-APQ) von 6-Amino-2,3-hexandion ab, welches die offenkettige Form von 2-AP darstellt (Abb. 21). Die Derivatisierungskinetik wurde in 0,2 M Phosphat-Puffer (pH = 7,4) bestimmt. Nach einer Stunde waren bereits 85% 2-AP umgesetzt, nach 20 h war die Reaktion quantitativ abgelaufen. Triebkraft dieser Umsetzung muss die Bildung des erweiterten aromatischen Systems des Chinoxalins sein. Ein großer Überschuss OPD erhöhte die Umsatzrate, weil dadurch das chemische Gleichgewicht auf die Seite von 2-APQ verschoben wird. Durch Verwendung von vierfach deuteriertem OPD wurde auf einfache Weise der isotopenmarkierte interne Standard (2-APQ-d₄) hergestellt, der als interner Standard für eine massenspektrometrische Quantifizierung diente. Bei Raumtemperatur waren die zwei neuen Chinoxaline 2-APQ und 2-APQ- d_4 in Phosphat-Puffer über 120 Stunden stabil.



Abb. 21 Derivatisierung von 2 Acetyl-1-pyrrolin (2-AP) mit o-Phenylendiamin (OPD).

Mit dem stabilisierenden Effekt von Phosphat-Puffer und der effektiven Umsetzung zum stabilen Chinoxalin konnte im Rahmen der Arbeit ein völlig neuer Ansatz zur Bestimmung von 2-AP in Lebensmitteln entwickelt werden. Verteilungsexperimente mit dem wässrigen Standard und organischen Lösungsmitteln haben gezeigt, dass 2-AP als polares Molekül auch bevorzugt in der wässrigen Phase verbleibt. Ausgehend davon wurde eine effiziente Flüssigextraktion für Lebensmittel entwickelt. Die Aufarbeitungszeit von weniger als 60 Minuten mit anschließender Derivatisierung stellte sicher, dass keine oder vernachlässigbar geringe Verluste von 2-AP auftraten. Die Bestimmung erfolgte mit einer empfindlichen HPLC-MS/MS-Methode unter Einbeziehung des deuterierten Standards. Die Verfahrenskenndaten Systempräzision (7%), Wiederholpräzision (14%), Wiederfindung (92%), Linearität (1–500 μg/kg), Nachweisgrenze (0,26 μg/kg) und Bestimmungsgrenze (0,79 µg/kg) wurden für die Matrix "Reis" validiert. Diese Ergebnisse charakterisieren eine leistungsstarke Nachweismethode mittels Flüssigchromatographie als gleichwertige Alternative zur bisher verwendeten Gaschromatographie. Der deutlichste Vorteil ist die Stabilisierung von 2-AP in Form seines respektiven Chinoxalins 2-APQ. Damit ist erstens die Stabilität der teuren analytischen Standards gewährleistet. Zweitens eröffnen sich damit neue Möglichkeiten bei der Untersuchung von 2-AP, z.B. die Bildung in situ bei der Lebensmittelherstellung sowie die Durchführung umfangreicher Messreihen ohne Analytverluste. Als Nachteil ist die aufwendigere Probenvorbereitung im Vergleich zur Dampfraumanalyse zu nennen. Mit dieser neuen Methode wurden verschiedene Lebensmittelgruppen auf ihren 2-AP-Gehalt untersucht (Tab. 13). Basmatireis enthielt erwartungsgemäß die höchsten Gehalte, die auch gut mit Literaturwerten übereinstimmen, die mittels Gaschromatographie bestimmt wurden. Die breite Schwankung der 2-AP-Gehalte könnte auf unterschiedliche Faktoren wie Verpackung, Lagerung oder Transportzeiten zurückzuführen sein. 2-AP stammt dabei aus dem Metabolismus der Reispflanze.¹¹³ Gewöhnlicher Langkornreis enthielt dagegen kein oder nur marginale Mengen 2-AP. In thermisch prozessierten Lebensmitteln wie Popcorn oder Brot wird 2-AP durch Maillard-Prozesse aus MGO und Prolin bzw. Ornithin gebildet (Abb. 16). In Fertigpopcorn wurden ähnliche Gehalte gefunden, wie zuvor in der Literatur beschrieben.¹²³ In den Krusten aller drei untersuchten Brotsorten wurden ähnliche 2-AP-Gehalte gefunden, obwohl nach bisherigem Kenntnisstand in Weizenbrot mehr zu erwarten war als in Roggen- oder Mischbrot. So zeigten ältere Studien, dass Weizenbrot etwa zwanzigmal mehr 2-AP enthält als Roggenbrot.^{124,125} Dass heute alle Brotsorten gleiche Mengen des gewünschten Aromastoffs beinhalten, könnte am technologischen Fortschritt bei der industriellen Brotherstellung und einer zielgerichteteren Teigführung liegen.

Matuix	2-ΑΡ [μg/kg]				
Iviatrix	Spanne	Mittelwert	Literatur		
Weizenbrot (Kruste)	11 – 29	18	19 ¹²⁵		
Mischbrot (Kruste)	12 – 24	18	-		
Roggenbrot (Kruste)	6 – 35	18	0,8 ¹²⁵		
Popcorn (Fertigprodukt)	10 - 70	38	20 – 57 ¹²³		
Langkornreis	n.b. – 2,0	-	0,066 – 0,075 ¹¹⁷		
Duftreis (Basmati)	41 – 356	131	167 - 1432 ¹¹⁷		

Tab. 13 Gehalte von 2-Acetyl-1-pyrrolin (2-AP) in ausgewählten Lebensmitteln.

n.b.: nicht bestimmbar

Zusammenfassend erfüllt die entwickelte Bestimmungsmethode für 2-AP alle Anforderungen an eine moderne, leistungsfähige Spurenanalytik. Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass es unter herkömmlichen Aufarbeitungsbedingungen zum Abbau von 2-AP in Gegenwart der Matrix kommt. Den Syntheseweg von 2-AP auf der stabilen Vorstufe 2-Acetyl-1-pyrrolidin-Hydrochlorid zu unterbrechen, ermöglichte zwei große Vorteile: (I) Die langfristige Lagerung des sonst instabilen Standards, der über mindestens sechs Stufen synthetisiert werden muss sowie (II) 2-AP für jedes Experiment *in situ* aus saurer Lösung durch Neutralisation mit verdünnter Base stöchiometrisch freizusetzen. Mit der quantitativen Überführung in das stabile Chinoxalin 2-APQ mittels Abfangreagenz OPD wird der rapide Abbau verhindert und so eine Momentaufnahme des aktuellen 2-AP-Gehalts im Lebensmittel ermöglicht. Darüber hinaus wurde ein kostengünstiger und einfach herzustellender isotopenmarkierter Standard (2-APQ- d_4) für die massenspektrometrische Untersuchung von 2-AP vorgestellt. Die bestehende massenspektrometrische Methode könnte auch auf das homologe 2-Acetyltetrahydropyridin (2-ATHP) erweitert werden, welches parallel zu 2-AP gebildet wird (Abb. 16) und ein ähnliches Aroma besitzt.

4.3 Advanced Glycation Endproducts in Brot

Thermisch prozessierte Lebensmittel enthalten in Folge der ablaufenden Maillard-Reaktion einen hohen Anteil an modifizierten Proteinen. Bei Backwaren kommt vorab noch ein Fermentationsschritt hinzu, bei dem durch enzymatische oder mikrobielle Aktivität zusätzliche Präkursoren freigesetzt werden, die zahlreiche Folgeprodukte beim Backen bilden. In der vorliegenden Arbeit wurde der gesamte industrielle Herstellungsprozess von Weizenbrötchen begleitet. Dabei wurden vom Rohteig bis zum fertigen Produkt ausgewählte Stoffklassen (Zucker, α -Dicarbonyle, Furfurale und AGEs) untersucht, die an Maillard-Prozessen beteiligt sind. Dazu mussten zunächst geeignete Extraktionsmethoden entwickelt werden, um die entsprechenden Analyten aus der stärkereichen Matrix möglichst quantitativ zu isolieren. Brotmatrix (basierend auf Nährwertangaben) besteht überwiegend aus Stärke (50%) und Protein (10%). Der Fettgehalt ist vernachlässigbar gering (1%). Die restlichen Inhaltsstoffe sind Salz (1%), Ballaststoffe (2%), Zucker (3%) und Wasser (30%). Zur Proteinextraktion wurde das von Biemel et al. beschriebene Protokoll für die Brötchenmatrix optimiert.²⁸ Im Ergebnis dieser Arbeit konnte durch den Einsatz von hitzestabilen Amylasen die Reinheit des isolierten Proteins von 19% auf 84% deutlich verbessert werden (Tab. 14). Die Wiederfindung des Gesamtproteins betrug mit der optimierten Methode 97% und bestätigt damit eine quantitative Erfassung des Gesamtproteins in Weizenbrötchen. Dennoch verblieben 23% des Gesamtproteins im Extraktionsrückstand. Weder die Verlängerung der Extraktionszeit noch ein zusätzlicher Extraktionsschritt verringerten die Proteinmenge im Rückstand. Bei diesen Proteinen muss es sich um die hochmolekularen Einheiten der Glutenin-Fraktion handeln, die aufgrund ihres hohen Molekulargewichts (500–10.000 kDa) praktisch unlöslich sind. Beim anschließenden vierstufigen, enzymatischen Verdau wurde ein Hydrolysegrad von 70–80% erreicht.

Kenngröße [%]	Methode nach Biemel <i>et al.</i>	optimierte Methode
Rückstand		
Proteingehalt	4,0	4,0
Wiederfindung*	23	23
Extrakt		
Proteingehalt	19	84
Wiederfindung*	59	74
Gesamtwiederfindung*	82	97

Tab. 14	Vergleich o	der Extraktion	smethoden für	r Protein aus	Weizenbrötchen
---------	-------------	----------------	---------------	---------------	----------------

* bezogen auf das Gesamtprotein

Für die freien, niedermolekularen Verbindungen wurde eine Extraktion basierend auf dem Protokoll von Petisca *et al.* entwickelt.¹⁰³ Um einen möglichst breiten Polaritätsbereich abzudecken, wurde Wasser/Methanol (50:50) verwendet, was hier für alle Analyten sehr hohe Wiederfindungsraten von rund 90% lieferte. Durch eine unmittelbare Derivatisierung wurden alle Analyten in eine stabile Form überführt, sodass praktisch jeder Gehalt zum Zeitpunkt der Probenahme momentgenau festgehalten wurde. Reaktive α -Dicarbonylverbindungen wurden mit OPD in ihre analogen Chinoxaline überführt und mittels HPLC-MS/MS bestimmt. Reduzierende Zucker und flüchtige Furfurale wurden mit 1-Naphthylamin durch reduktive Aminierung nach Rakete *et al.* zu den entsprechenden Naphthylderivaten umgesetzt.¹²⁶ Das hatte die zusätzlichen Vorteile, dass die ursprünglich polaren Analyten auf einer Umkehrphase flüssigchromatographisch getrennt und sehr empfindlich über das eingeführte Fluorophor detektiert werden konnten.

Der industrielle Herstellungsprozess von Aufbackbrötchen ist in Abbildung 22 schematisch dargestellt: Nach dem Mischen der Ausgangsstoffe (Weizenmehl, Salz, Additive, Hefe, Wasser) erfolgt das Kneten zum Rohteig (1). Nach dem Formen wird der Rohling für 10 min vorgegart (2). Danach schließt sich die eigentliche Teiggärung bei 25 °C und 85% Luftfeuchte für 90 min an (3). Beim Vorbacken (4) werden drei Temperaturzonen durchlaufen: 205 °C / 5 min (4.1), 190 °C / 5 min (4.2) sowie 182 °C / 4 min (4.3). Nach 14 min sind die Brötchen zu 60–70% durchgebacken. Das Fertigbacken erfolgt im Backshop oder zu Hause bei 190 °C für weitere 10 min (5).



Abb. 22 Schematische Darstellung der industriellen Herstellung von Brötchen. (1 Rohteig, 2 Vorgare, 3 Fermentation, 4 Vorbacken, 5 Fertigbacken)

Innerhalb dieses kontinuierlichen Fließbandprozesses wurden an jedem Punkt acht Proben genommen. Drei Proben je Punkt wurden auf Zucker, Furfurale und Dicarbonyle analysiert. Drei weitere Proben wurden der optimierten Proteinextraktion unterzogen und das AGE-Spektrum untersucht (Tab. 15). Bereits während der Vorgare (2) stiegen alle Zuckergehalte sprunghaft an, was durch die weizeneigene Amylase-Aktivität hervorgerufen wird, sobald Wasser zum Mehl gegeben wird.⁸⁸ Oligosaccharide wie Maltotetraose und Maltotriose werden beim Stärkeabbau durch α -Amylase freigesetzt. Maltose wird durch β -Amylase von Oligosacchariden abgespalten, bis das Enzym bei etwa 70 °C inaktiviert wird.⁸⁷ Maltose war bei weitem der mengenmäßig bedeutendste Zucker im Teig. Der Maltosegehalt stieg bei der Vorgare (2) bereits von 2 auf 60 g/kg an und wurde beim Vorbacken (4.1) nochmals auf 116 g/kg verdoppelt. Glucose kann sowohl durch zugesetzte Glucoamylase als auch durch hefeeigene Enzyme freigesetzt werden. Hefen besitzen α -Glucosidase und β -Fructosidase (Invertase), um Glucosereste von anderen Zuckern abzuspalten und als Substrat für die Energiegewinnung zu nutzen.⁸⁷ Die Verdopplung des Glucosegehalts auf 20 g/kg während der Fermentation (3.2) zeigt, dass die enzymatische Freisetzung schneller als die Aufnahme durch die Hefen erfolgt. Während der ersten 5 min des Vorbackens (4.1) ist fast die gesamte Glucose schlagartig verschwunden. Durch die vergleichsweise hohe Reaktivität von Monosacchariden gegenüber längerkettigen Zuckern setzten vermutlich sofort die Bildung von Amadori-Produkten und weitere Abbaureaktionen ein. Pentosen waren nur in verhältnismäßig geringen Mengen $(\leq 0,3 \text{ g/kg})$ enthalten.

Wie erwartet setzte die Bildung von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) und Furfural erst in der mittleren Phase des Vorbackens (4.2) ein. Ein drastischer Anstieg war dann während des Fertigbackens festzustellen, da beide Strukturen erst durch Erhitzung und resultierender Wasserabspaltung gebildet werden. Kurzkettige Dicarbonyle (C_2-C_5) waren ebenfalls erst nach längerer Backzeit bestimmbar. Langkettige Dicarbonyle (C_6-C_{12}) hingegen waren von Anfang an im Teig enthalten und ihr Gehalt veränderte sich auch nicht merklich bis zum Fertigbacken. Nur Methylglyoxal (MGO) wurde bereits ab der Fermentation (3.2) gebildet. Das untermauert die zentrale These, dass MGO in relevanten Mengen durch Hefen gebildet wird und dadurch maßgeblich das AGE-Spektrum in Backwaren beeinflusst. Entgegen den Erwartungen waren AGEs bereits im Rohteig (1) vorhanden, was darauf hindeutet, dass eine Proteinglykierung bereits im Getreidekorn stattfindet. Tatsächlich berichten aktuelle Studien von einer deutlichen Glykierung pflanzlicher Proteine, die womöglich regulatorische Signalwege steuert.^{129,130} Alle AGE-Gehalte stiegen erst beim Fertigbacken (5) signifikant an. Das spricht dafür, dass hohe Temperaturen allein – wie sie auch beim Vorbacken vorliegen – nicht unmittelbar zur AGE-Bildung führen.

	Rohteig	Vorgare	Fer	mentat	ion	V	orbacke	en	Fertigbacken
	1	2	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3	5
Zucker [g/kg]									
Maltotetraose	0,1	1	1	1	1	2	2	2	2
Maltotriose	0,1	2	2	2	2	3	3	4	4
Maltose	2	60	68	58	67	116	107	107	110
Glucose	0,2	10	13	21	19	0,6	0,7	0,8	1,3**
Furfurale [mg/kg]									
HMF	n.n.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	7	12	78**
Furfural	n.n.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	6	9	44**
Dicarbonyle [mg/kg]								
GO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,9	1,4	2,0
MGO	n.n.	n.n.	n.n.	n.b.	n.b.	n.b.	1,6	2,1	4,1*
3-DP	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.b.	4	8	19**
3-DG	4	4	4	4	4	4	8	12	38 *
Glucoson	8	14	17	17	16	8	12	21	29
1,5-DDMal	14	11	12	12	12	14	38	210	930
1-DMal	35	33	32	31	33	35	550	2000	3600**
3-DMal	1	1	1	1	1	2	14	37	87**
Maltoson	8	10	8	5	8	8	13	16	28**
AGEs [mg/kg]									
CEL ^b	1,6	1,7	1,8	1,6	1,9	2,2	1,8	1,9	3,1*
CEA	8,5	9,3	9,4	9,3	9,3	9,8	9,1	11	16*
MG-H1	8,8	9,4	9,7	9,4	9,6	9,9	9,3	11	19**
CML ^b	2,3	2,9	2,6	2,4	2,8	3,4	4,0	4,9	6,3
N ⁶ -Formyllysin	1,6	1,8	1,6	1,5	1,6	1,8	1,8	2,1	3,0**
N ⁶ -Acetyllysin	1,8	2,6	2,3	1,9	2,3	2,4	2,1	2,2	2,7
Pyrralin	11	11	11	11	11	11	11	15	46**

Tab. 15 Veränderung ausgewählter Teiginhaltsstoffe^a während der Brötchenherstellung.

n.n.: nicht nachweisbar, n.b.: nicht bestimmbar

a: Gehalte sind als Mittelwerte der Dreifachbestimmung angegeben.
 statistische Signifikanz zwischen Vorbacken und Fertigbacken: * P ≤ 0,05 / ** P ≤ 0,01

^b: mittels saurer Hydrolyse bestimmt

Um einen tieferen Einblick in die mechanistischen Zusammenhänge zwischen Präkursoren, Backbedingungen und Folgestrukturen zu gewinnen, wurden vorgebackene Brötchen zeitaufgelöst (0–21 min, 3 min-Schritte) fertig gebacken. Hierbei ist zu erwähnen, dass Aufbackbrötchen einer anderen Marke verwendet wurden, weshalb die Absolutgehalte in den nachfolgenden Grafiken von den Werten in Tabelle 15 abweichen. Die relative Änderung der einzelnen Gehalte ist jedoch ähnlich, weshalb eine Vergleichbarkeit zwischen den Werten gegeben ist. Zusätzlich zu den vorherigen Parametern wurden Krusten- und Krumentemperatur, Wassergehalt und Oberflächenfarbe verfolgt (Abb. 23). Die Oberflächentemperatur überstieg 120 °C nicht, obwohl die Ofentemperatur bei 200 °C lag. Ebenso erreichte die Innentemperatur nach der Aufwärmphase lediglich 80 °C. Diese Temperaturkonstanz wird durch die Verdunstung des Wassers bewirkt. Zum einen entzieht Wasser beim Verdampfen der Krume Wärme. Zum anderen kühlt der aufsteigende Wasserdampf (100 °C) die heißere Kruste.¹²⁷ Beim Verlauf des Wasserverlusts und der Oberflächenfarbe (angegeben als Farbdistanz) war eine Initialphase in den ersten 9 min zu beobachten. In dieser Zeit liefen praktisch keine Maillard-Prozesse ab. Nach 12 min erreichte die Oberflächentemperatur 100 °C, wodurch eine maximale Verdunstung des Wassers einsetzte. Ab diesem Zeitpunkt trat auch die Temperaturkonstanz in Kruste und Krume ein. Parallel dazu begann die Bräunung der Oberfläche durch anlaufende Melanoidinbildung. In diesem Moment sank der Wassergehalt im Teigling auf unter 30%. Während der gesamten Backzeit korrelierte die Bräunung mit dem Wasserverlust, was im Einklang mit bisherigen Ergebnissen ist.¹²⁸ Demnach ist die Maillard-Reaktion in Backwaren primär vom Wassergehalt abhängig, während höhere Temperaturen nur die Reaktionsgeschwindigkeit heraufsetzen.



Abb. 23 Veränderung physikalischer Parameter von Weizenbrötchen während des Fertigbackens.

Allgemein betrachtet, blieben die Gehalte der α -Dicarbonylverbindungen während der Initialphase unverändert und stiegen erst in den letzten Minuten des Aufbackens stark an. Auch hier lässt sich eine Korrelation mit dem Wasserverlust feststellen. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit dem mechanistischen Verständnis, da Desoxyosone erst durch Dehydratisierung gebildet werden. Die Bildungskinetik von Dicarbonylen mit einem C₆-Kohlenstoffskelett ist in Abbildung 24 (links) gezeigt. Die höchsten Gehalte dieser Gruppe erreichte 3-DG. Bereits in den vorgebackenen Brötchen waren 3-DG-Gehalte von 10 mg/kg vorhanden, die beim Fertigbacken nach 21 min auf 28 mg/kg anstiegen. Im Vergleich dazu war das aufgrund seiner Reduktonstruktur reaktivere 1-DG in 20-fach geringeren Gehalten zu finden (Graph nicht gezeigt). Der Glucoson-Gehalt hingegen stieg bereits während der Initialphase schwach an, weil keine Wasserabspaltung zur Bildung nötig ist. Mit zunehmender Backzeit nahm er wieder ab und blieb konstant auf Höhe des Ausgangsgehalts von 3,4 mg/kg. Das deutet darauf hin, dass Bildung und Abbau von Glucoson in der fortgeschrittenen Backphase etwa gleich schnell sind. Dieser Verlauf steht im Gegensatz zu allen anderen Dicarbonylen und unterstreicht die hohe Reaktivität von Oxyosonen allgemein aufgrund ihrer Reduktonstruktur. Die kurzkettigen Dicarbonyle Glyoxal (GO, C_2) und Methylglyoxal (MGO, C_3) waren erst gegen Ende des Aufbackens nachweisbar und zeigten dann starke Anstiege ihrer Gehalte. Sie werden unter anderem durch Fragmentierung längerkettiger Zucker gebildet. Für MGO ist zusätzlich die Bildung aus Triosephosphaten bekannt (Abb. 6), die in diesem Fall aus dem Hefestoffwechsel stammen. Die Bildung von MGO durch Hefen während der Teigherstellung wurde im Rahmen dieser Arbeit durch experimentelle Daten belegt (Tab. 15). Zwar werden Hefezellen bereits bei etwa 60 °C inaktiviert, aber wahrscheinlich sind enzymatische und nicht-enzymatische Phosphateliminierung bei hohen Temperaturen noch begünstigt. Der parallele Anstieg des Gehalts von Pyruvat, dem Produkt der Glycolyse, ab 12 min deutet auf eine Lyse der Hefezellen infolge der thermischen Belastung und der einsetzenden Krustenbildung hin.



Abb. 24 Bildung von α-Dicarbonylen in Weizenbrötchen während des Fertigbackens.

Da Maltose der Hauptzucker in den untersuchten Brötchen war, mussten auch Maillard-Prozesse durch Disaccharid-spezifische Intermediate geprägt sein. Die Bildungskinetiken der von Maltose abgeleiteten Dicarbonyle sind in Abbildung 24 (rechts) dargestellt. Vertreter mit einem intakten C12-Kohlenstoffskelett, nämlich 1-Desoxymaltoson (1-DMal) und 1,5-Didesoxymaltoson-4-en (1,5-DDMal), waren bei weitem die häufigsten Dicarbonyle mit Gehalten von jeweils rund 600 mg/kg. Die vorliegenden Gehalte spiegeln die hohe Stabilität dieser beiden langkettigen Dicarbonyle wider. Erstens ist für C12-Disaccharide allgemein aufgrund ihrer Molekülgröße eine geringere Reaktivität verglichen mit C₆-Monosacchariden beschrieben.¹¹⁰ Zweitens verhindert der Glucoserest an Position 4 von 1-DMal bzw. 1,5-DDMal eine Enolisierung entlang des Moleküls und folglich die Fragmentierung des Kohlenstoffrückgrats. Die Gehalte von 3-Desoxymaltoson (3-DMal) bzw. Maltoson zeigten die gleichen kinetischen Verläufe wie die ihrer C₆-Analoga 3-DG und Glucoson, die bereits im vorherigen Absatz diskutiert wurden. Die relativen Bildungsraten der einzelnen Dicarbonyle im wässrigen Maltose-Lysin-Modellsystem (50 °C, pH = 7,4) wurden bereits von Smuda et al. bestimmt und nun durch die vorliegenden Ergebnisse erstmalig in authentischer Lebensmittelmatrix belegt.⁵³ C₅-Dicarbonyle wie 3-Desoxypentoson (3-DP) sind wichtige Intermediate des Amin-katalysierten Abbaus von Disacchariden. Der Gehalt von 3-DP stieg nach dem Fertigbacken auf 10 mg/kg an, während Pentoson, 1-Desoxypentoson (1-DP) sowie 3,4-Didesoxypentoson (3,4-DDP) gar nicht oder nur in marginalen Mengen auftraten. 3-DP wird aus Maltose durch β -Dicarbonylspaltung gebildet (Abb. 15) und erklärt zudem die gefundenen Gehalte von Furfural (Tab. 15), die nicht ausschließlich aus Pentosen stammen können, weil Pentosen in den untersuchten Weizenbrötchen einen zu geringen Gehalt (≤ 0,3 g/kg) aufwiesen.

Die Bildungskinetik ausgewählter AGEs beim Fertigbacken ist in Abbildung 25 gezeigt. Die Arginin-Derivate MG-H1 und *N*⁷-Carboxyethylarginin (CEA) gehörten zu den dominierenden Strukturen in Weizenbrötchen. Bereits die vorgebackenen Teiglinge enthielten je 2 mg/kg. Ab 12 min, als parallel ein Anstieg von MGO (Abb. 24) zu beobachten war, stiegen die Gehalte auf je 5 mg/kg an (21 min). Die Bildung von CEL als Hauptprodukt der MGO-Lysin-Reaktionskaskade war auch in Weizenbrötchen zu beobachten (2 mg/kg, 21 min). Während des Fertigbackens war der CEL-Gehalt gegenüber *N*⁶-Lactoyllysin etwa um den Faktor 30 erhöht. Auch die kürzlich entdeckten MGO-Amid-AGEs *N*⁶-Pyruvoyllysin und MOLA wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals in Lebensmitteln nachgewiesen und lieferten Gehalte von 0,1 bzw. 0,2 mg/kg (Graphen nicht gezeigt). Auch wenn diese drei Amid-AGEs nicht von quantitativer Bedeutung sind, untermauern sie die postulierten Reaktionswege und die Relevanz von MGO bei der Proteinglykierung in Backwaren. Die Ergebnisse zeigen, dass auch in Backwaren vornehmlich Argininseitenketten durch MGO modifiziert werden, während Lysinseitenketten quantitativ kaum von Bedeutung sind.



Abb. 25 Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in Weizenbrötchen während des Fertigbackens.

Das Glykierungsmuster insgesamt legte nahe, dass insbesondere Mono- und Disaccharide für die Modifikation von Lysinseitenketten verantwortlich sein müssen. N⁶-Carboxymethyllysin (CML) gilt nach wie vor als eines der häufigsten Glykierungsprodukte in Lebensmitteln und *in vivo*.^{7,109} Auch in der vorliegenden Arbeit war CML mit 4 mg/kg (21 min) eines der dominierenden AGEs in Weizenbrötchen. Die Bildung ist u.a. über Glyoxal (GO) oder das Amadori-Produkt zu erklären. In Anbetracht des starken Abbaus von Glucose während des Backens (Tab. 15) ist vermutlich letzteres als Hauptpräkursor zu betrachten. Die Gehalte der Amid-AGEs N⁶-Formyllysin und N⁶-Acetyllysin wurden beim Fertigbacken jeweils verdoppelt auf etwa 1 mg/kg. Ihre Bildung erfolgt über die β -Dicarbonylspaltung bestimmter Reduktone. Dabei stammt N⁶-Formyllysin von Glucoson bzw. Maltoson ab, während N⁶-Acetyllysin aus 1-Desoxyosonen wie 1-DG gebildet wird. Da weder 1-Desoxythreoson noch 1-Desoxypentoson detektiert wurden, muss 1-DG der Hauptpräkursor von N^6 -Acetyllysin sein. 1-DMal kommt hingegen nicht in Frage, wie bereits im vorherigen Absatz diskutiert. Der Anstieg des Gehalts von N^6 -Formyllysin setzte ab 12 min ein, als die Initialphase des Fertigbackens vorüber war. Mechanistisch betrachtet, ist die Formyl-Gruppe (C1-Fragment) das Gegenstück zu Furfural (C5-Fragment), dessen Bildung parallel ab 12 min begann. Die zugrundeliegende β -Dicarbonylspaltung führt Amin-induziert zu N⁶-Formyllysin und, in wesentlich höheren Maß, über den hydrolytischen Weg zu Ameisensäure, die im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt wurde. Aus diesem Grund weichen die Gehalte von *N*⁶-Formyllysin (1 mg/kg) und Furfural (35 mg/kg) nach 21 min so stark voneinander ab. Als quantitativ bedeutendstes AGE in Weizenbrötchen wurde Pyrralin identifiziert, dessen Gehalt nach 21 min bei 19 mg/kg lag und damit bei weitem MG-H1, CEA oder CML übertraf. Beim Fertigbacken wurde der Pyrralin-Gehalt verfünffacht, was der stärkste Anstieg von allen AGE-Gehalten war. In Übereinstimmung mit den bisherigen mechanistischen Kenntnissen verliefen die Bildungskinetiken der Präkursoren 3-DG und 3-DMal (Abb. 24) parallel zu der von Pyrralin (Abb. 25, rechts). Gleichzeitig stieg auch der Gehalt von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), dem freien *O*-Analogon von Pyrralin, in gleicher Weise auf 65 mg/kg (21 min), was gut mit den Ergebnissen ähnlicher Studien übereinstimmt.^{98,99} Das von 3-DG abgeleitete Crosslink DODIC erreichte nach 21 min einen Gehalt von 0,42 mg/kg (Graph nicht gezeigt). Damit sind DODIC und MOLA die einzig relevanten AGE-Crosslinks in Weizenbrötchen, was wiederum ein mechanistischer Beleg für den Stellenwert von 3-DG und MGO bei der Proteinglykierung in diesen Produkten ist.

Über den industriellen Herstellungsprozess von Weizenbrötchen hinaus wurden verschiedene Brotsorten im Handel auf ihr AGE-Spektrum untersucht. Dabei wurden fünf Sorten (Weizen-, Roggen-, Misch-, Knäckebrot und Pumpernickel) gewählt, die hinsichtlich ihrer Zutaten oder ihres Herstellungsverfahrens variieren. Insgesamt wurden je Sorte fünf verschiedene Brote untersucht, die jeweils als Dreifachbestimmung aufgearbeitet wurden. Die Gehalte sind in Tabelle 16 gegenübergestellt. Tendenziell war der Gesamtgehalt an AGEs in den Standardsorten Weizen-, Roggen- und Mischbrot sehr ähnlich. Pyrralin, MG-H1 und CEA waren wie auch in Brötchen die mengenmäßig bedeutendsten Strukturen. CML-Gehalte waren im Allgemeinen immer doppelt so hoch wie die von CEL. N⁶-Formyllysin war gegenüber N⁶-Acetyllysin, mit Ausnahme von Weizenbrot, in höheren Mengen zu finden. Obwohl sich Weizen- und Roggenbrot in ihrer Zusammensetzung (Kohlenhydrate, Proteine, Amylasen) und Herstellung (Hefeteig vs. Sauerteig) unterscheiden, waren keine wesentlichen Unterschiede im AGE-Spektrum festzustellen. Die AGE-Gehalte in den thermisch stärker prozessierten Sorten Pumpernickel und Knäckebrot waren erwartungsgemäß höher und erreichten etwa 1800 mg/kg Protein. Eine klare Abgrenzung durch das AGE-Muster war jedoch auch hier nicht möglich. Die Unterteilung der Knäckebrote hinsichtlich ihres Teiglockerungsverfahrens mit Hefe (Gärknäcke) oder kalter Luft (Eisknäcke) zeigte eindeutige Unterschiede sowohl im AGE-Gesamtgehalt als auch für einzelne Strukturen. Alle analysierten MGO-AGEs waren in Gärknäcke signifikant erhöht. AGEs, die aus anderen Präkursoren entstehen, wie z.B. N^6 -Formyllysin, N^6 -Acetyllysin, N^6 -Glycoloyllysin (GALA) oder N^7 -Carboxymethylarginin (CMA), waren hingegen in annähernd gleichen Mengen enthalten. Das ist ein deutlicher Beweis für die These, dass

MGO aus dem Hefestoffwechsel maßgeblich das Glykierungsmuster von Proteinen in Backwaren beeinflusst. Neben den Gehalten MGO-spezifischer AGEs war auch der Pyrralin-Gehalt in Gärknäcke signifikant erhöht. Da Hefen durch ihre Enzymaktivität (Glucosidase, Invertase)⁸⁷ große Mengen Glucose freisetzen (siehe Tab. 15), die beim Backen überwiegend zu 3-DG abgebaut wird, erklärt das möglicherweise den hohen Pyrralin-Gehalt von 78 mg/kg in Gärknäcke. 3-DMal ist, wie schon mehrfach erwähnt, ebenfalls ein Präkursor von Pyrralin und erklärt zudem den nicht unerheblichen Gehalt von rund 40 mg/kg in Eisknäcke und den anderen Brotsorten. Die Bildung von Pyrralin aus dem Maltose-spezifischen 4-Desoxyglucoson (4-DG) wäre grundsätzlich auch möglich. Jedoch ist zu erwarten, dass 4-DG aufgrund seiner Reduktonstruktur eher zur Fragmentierung und anderen Folgestrukturen neigt. Umgekehrt war in Eisknäcke der Gehalt von *N*⁶-Carboxymethyllysin (CML) signifikant erhöht. Das Einschlagen von Luft in den gekühlten Teig fördert möglicherweise oxidative Prozesse, die nötig sind, um CML u.a. aus dem Amadori-Produkt zu bilden. Der eigentliche Präkursor ist bis heute noch nicht in der Literatur beschrieben worden.

Analut	Brotsorte							
[mg/kg Brot]	Weizenbrot	Roggenbrot	Mischbrot	Pumpernickel	Knäckebrot (Gärknäcke)	Knäckebrot (Eisknäcke)		
MGO-AGEs								
CEL ^b	2,3	2,1	2,5	2,6	8,1**	4,9		
CEA	15	11	19	18	13*	7		
MG-H1	18	13	26	21	27*	14		
andere AGEs								
CML ^b	4,5	5,1	4,9	5,2	7,7	10,4*		
N ⁶ -Formyllysin	3,2	3,5	3,5	2,8	5,1	5,6		
N ⁶ -Acetyllysin	3,0	1,3	1,8	1,5	3,6	3,2		
Pyrralin	36	28	45	34	78*	42		
Amadori-Produkt (be	estimmt als Furo	osin ^b)						
[mg/kg Brot]	61	58	31	163	124	165*		
[mg/kg Protein]	689	953	395	3110	1550	1800		
Gesamtgehalt								
[mg/kg Brot]	87	69	109	92	149**	92		
[mg/kg Protein]	984	1135	1395	1763	1857**	1004		

 Tab. 16 Gehalte ausgewählter Advanced Glycation Endproducts (AGEs) und des Amadori-Produkts in verschiedenen Brotsorten^a.

Gehalte sind als Mittelwerte der Dreifachbestimmung aus je fünf Proben je Sorte angegeben.
 statistische Signifikanz zwischen Gär- und Eisknäcke: * P ≤ 0,05 / ** P ≤ 0,01

^b: mittels saurer Hydrolyse bestimmt

Wie bereits im Abschnitt 2.1.2 beschrieben, sind Amadori-Produkte Intermediate der Anfangsphase der Maillard-Reaktion. Die Bildungskinetik im Weizenbrötchen-Modell zeigte, dass der Gehalt an Amadori-Produkten dennoch im weiteren Verlauf des Fertigbackens (12–21 min) stetig anstieg (Graph nicht gezeigt). Dieses Ergebnis geht einher mit den gefundenen Amadori-Produkt-Gehalten in den untersuchten Brotsorten. Analytisch wurden die Amadori-Produkte als Furosin erfasst, das bei der sauren Proteinhydrolyse als Artefakt zu etwa 40 Mol-% aus dem Amadori-Produkt entsteht.¹⁰⁸ Damit lässt sich generell der Gesamtgehalt an proteingebundenen Amadori-Produkten in Lebensmitteln abschätzen. Die in verschiedenen Brotsorten gefundenen Gehalte sind ebenfalls in Tabelle 16 gegenübergestellt. Pumpernickel wies im Vergleich zu allen anderen untersuchten Sorten den höchsten Gehalt an Amadori-Produkten (3110 mg/kg Protein) auf. Diese Tatsache ist über das spezielle Herstellungsverfahren von Pumpernickel zu erklären (siehe Abschnitt 2.4.2), wodurch im Vergleich zu anderen Brotsorten ein wesentlich umfangreicherer Stärkeabbau zu reduzierenden Zuckern stattfindet. Generell machten die Amadori-Produkte einen Großteil der proteingebundenen Maillard-Produkte in den untersuchten Backwaren aus. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten AGE-Gehalte in Broten stimmen gut mit bisher berichteten Gehalten überein, wenngleich häufig nur einzelne Strukturen quantifiziert wurden. Für CML wurden in Weißbrot Gehalte von 31,4 bzw. 382 mg/kg Protein (Krume/Kruste) bestimmt.¹³¹ In Brotkruste wurden Pyrralin-Gehalte im Bereich 27,3–242,6 bzw. 53,9–234,8 mg/kg Protein (Weizen/Roggen) gefunden.¹³² Die Aufnahme solcher Aminosäuremodifikationen mit der Nahrung über den Gastrointestinaltrakt sowie die weitere Metabolisierung im Körper ist noch weitestgehend unverstanden und rückt deswegen zunehmend in den Fokus der aktuellen Forschung. Einzelne Studien zeigten z.B. die Aufnahme von Pyrralin aus Brötchen in den humanen Blutkreislauf¹⁷ sowie die *in vitro* Umwandlung von CML in verschiedene Metabolite, darunter N⁶-Carboxymethylcadaverin, durch verschiedene Stämme von Escherichia coli.133

Im Rahmen der Arbeit wurde eine umfangreiche Untersuchung zur Maillard-Reaktion beim Backprozess von Weizenbrötchen durchgeführt. Dabei wurden alle Herstellungsschritte begleitet und die relevanten Verbindungen quantifiziert: (I) reduzierende Zucker als Marker für die Amylaseaktivität und Ausgangsstoffe für die Glykierung, (II) α -Dicarbonylverbindungen als zentrale Intermediate der Maillard-Reaktion, (III) Furfurale als Marker für die thermische Behandlung sowie (IV) AGEs und Amadori-Produkte als kovalent gebundene Maillard-Produkte am Protein. Damit wurde erstmalig ein breites Substanz-Portfolio in einer authentischen Lebensmittelmatrix quantifiziert. Zwei grundlegende Bildungswege von α -Dicarbonylen beeinflussen maßgeblich das AGE-Spektrum in Backwaren. Zum einen die nicht-enzymatische Bildung von MGO aus Triosephosphaten, die aus dem Stoffwechsel von Mikroorganismen stammen. Dadurch werden vorwiegend Argininseitenketten in Form von MG-H1 und seiner offenkettigen Form CEA glykiert. Zum anderen die Bildung von 3-Desoxyosonen (3-DG, 3-DMal), wobei Glucose und Maltose durch enzymatischen oder thermischen Stärkeabbau entstehen. Daraus resultiert Pyrralin als quantitativ bedeutendstes AGE in Weizenbrötchen und allen untersuchten Brotsorten. Aus Maltose, dem mit Abstand häufigsten reduzierenden Zucker in Weizenbrötchen, werden außerdem unreaktivere Dicarbonyle (1-DMal, 1,5-DDMal) in großen Mengen gebildet. Die in Backwaren allgemein hohen Gehalte von α-Dicarbonylen ohne Redukton-Struktur, z.B. 3-DG, geben Grund zu der Annahme, dass basierend auf den bisher bekannten AGEs auch Analoga von CEL oder MG-H1 in relevanten Mengen zu finden sein könnten. So sind bereits DOLD und DODIC als Folgestrukturen von 3-DG etabliert. Ein Ansatz zum Nachweis postulierter Strukturen wäre die Simulation von Massenübergängen (HPLC-MS/MS) ausgehend von bekannten AGEs, bevor die vergleichsweise aufwendige Synthese authentischer Standards durchgeführt wird. Weiterführende Studien zum Einfluss der Teigführung von Hefe- bzw. Sauerteig auf die Bildung von MGO und dem weiteren Dicarbonylspektrum wären ein vielversprechender Ausblick, um technologische Prozesse zukünftig zielgerichteter steuern zu können.

5 **ZUSAMMENFASSUNG**

Maillard-Prozesse führen sowohl bei der Zubereitung von Lebensmitteln als auch *in vivo* zu negativ assoziierten Veränderungen von Proteinen. In Lebensmitteln wird häufig der Verlust essentieller Aminosäuren wie Lysin sowie die Entstehung sogenannter Glycotoxine diskutiert. Nahezu unbekannt ist die Resorption und die Wirkung von *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs), die über die Nahrung aufgenommen werden. Auf der anderen Seite werden AGEs durch metabolische Prozesse in unserem Körper gebildet. Häufig werden Alterungserscheinungen oder pathologische Spätkomplikationen bei *Diabetes mellitus* mit diesen Strukturen korreliert. Die Veränderung der betroffenen Gewebe auf molekularer Ebene ist jedoch noch weitestgehend unerforscht.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden umfassende Kenntnisse über AGE-Gehalte in Backwaren und Bindegewebe sowie zugrundeliegende Bildungsmechanismen gewonnen. Für beide Matrices wurden zunächst effektive Protokolle zur Proteinextraktion, -solubilisierung und -hydrolyse entwickelt. Bindegewebe (Rattenschwanzsehnen) von jungen, erwachsenen und alten Organismen (3, 12 und 22 Monate) wurde auf sein AGE-Profil untersucht. MOLA wurde als neuartiges Amid-AGE-Crosslink erstmalig *in vivo* identifiziert. Daneben waren Glucosepan und DODIC die bedeutendsten AGE-Crosslinks in Bindegewebe. Mittels TTBT-Assay und SDS-PAGE wurde der Einfluss kovalenter, intermolekularer AGE-Crosslinks auf Sehnenkollagen belegt. Die aus Methylglyoxal gebildeten Arginin-Derivate MG-H1 und *N*⁷-Carboxyethylarginin waren die häufigsten AGEs und untermauern die Relevanz von Methylglyoxal hinsichtlich der Protein-glykierung *in vivo*. Dabei scheint die zelleigene Glycolyse, die zur Energiegewinnung ubiquitär im Cytoplasma lokalisiert ist, die Hauptquelle von Methylglyoxal zu sein.

Gleichzeitig wurde in Backwaren, speziell Weizenbrötchen und verschiedenen Brotsorten, erstmalig ein breites AGE-Spektrum quantifiziert. Auch hier wurden in Folge der Glycolyse des Hefestoffwechsels von Methylglyoxal abgeleitete AGEs, genauer MG-H1 und *N*⁷-Carboxyethylarginin in relevanten Mengen gebildet. Durch die Entwicklung einer quantitativen Extraktionsmethode mit anschließender Derivatisierung konnten reduzierende Zucker und reaktive Carbonylverbindungen simultan erfasst werden. Bei der Begleitung des industriellen Herstellungsprozesses wurden die Schlüsselschritte in der Bildung von Präkursoren für die Maillard-Reaktion erkannt. Über intermediäre Dicarbonyle wie 3-Desoxyglucoson oder 3-Desoxymaltoson aus Zuckern des Stärkeabbaus wurde vornehmlich Pyrralin als mit Abstand häufigstes AGE in Backwaren gebildet. Für 2-Acetyl-1-pyrrolin, das unter anderem aus Methylglyoxal im Zuge der Maillard-Reaktion gebildet wird, wurde eine leistungsstarke Analytik in Lebensmitteln entwickelt. Dabei wurde die intrinsische Dicarbonylstruktur des Aromastoffs ausgenutzt, um das instabile Molekül mittels Abfangreagenz in ein stabiles Chinoxalin (2-APQ) zu überführen und einer sensitiven Analytik mittels HPLC-MS/MS zugängig zu machen. Die finale Methode war den etablierten Methoden mittels HS-GC-MS/MS hinsichtlich der Verfahrenskenndaten (Präzision, Wiederholbarkeit, Wiederfindung, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze) ebenbürtig und wurde erfolgreich auf verschiedene Lebensmittelgruppen (Reis, Brot, Popcorn) angewandt. Dieser neuartige analytische Ansatz bildet u.a. die Grundlage für weiterführende Forschung, z.B. im Bereich der Lebensmitteltechnologie und Prozessoptimierung.

In der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche mechanistische Zusammenhänge innerhalb der Maillard-Reaktion untersucht. Interessanterweise ist in beiden Systemen, Kollagen und Brötchen, trotz grundlegender Unterschiede (Wassergehalt, Temperatur, Matrix) eine gewisse Kongruenz hinsichtlich der gebildeten AGEs zu erkennen, beispielsweise die Verhältnisse innerhalb der Methylglyoxal-Arginin- bzw. Methylglyoxal-Lysin-Reaktionskaskade. Auch die bisherigen Erkenntnisse zur α -Dicarbonylbildung aus Modellversuchen haben gut mit den hier vorliegenden Ergebnissen für Sehnenkollagen und Weizenbrötchen übereingestimmt. Das deutet auf feste Gesetzmäßigkeiten hin, die der Maillard-Reaktion zu Grunde liegen. So führen Zucker überwiegend zu Lysin-Derivaten, α -Dicarbonyle wie Methylglyoxal hingegen bevorzugt zu Arginin-Addukten. Die Reaktivität von Dicarbonylen nimmt mit zunehmender Kettenlänge schnell ab. Isolierte Dicarbonylgruppen wie bei 3-Desoxyosonen reagieren ausschließlich unter Erhalt des Kohlenstoffskeletts. Reduktone sind wesentlich reaktiver und neigen zur Fragmentierung. Je mehr Bildungsschritte hin zu einem Dicarbonyl nötig sind, umso unwahrscheinlicher ist dessen Bildung bzw. umso niedriger sind die respektiven AGE-Gehalte. Die bisher etablierten AGE-Bildungsmechanismen deuten darauf hin, dass noch weitere, bisher unbekannte Folgestrukturen, z.B. ausgehend von 3-Desoxyglucoson, gebunden an Proteinseitenketten vorliegen.

6 **SUMMARY**

Maillard processes in food or *in vivo* are connected to negatively associated protein modifications. The loss of essential amino acids such as lysine is commonly discussed for foods. Additionally, the nutritional uptake and physiological effects of dietary *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs), also referred to as glycotoxins, are almost unknown to date. Moreover, AGEs are also formed as a result of nonenzymatic, metabolic processes in our body. Diabetic or age-related complications are often associated with these compounds although molecular changes of the respective tissues remain poorly understood.

In the present study comprehensive mechanistic knowledge of AGE formation in both bakery products and collagen was gained. For both matrices, efficient protocols for protein extraction, solubilization and hydrolysis were developed. Connective tissue (rat tail tendon) of young, adult, and old subjects (3, 12, and 22 months) was profiled for collagen-bound AGEs. Besides glucosepane and DODIC as major Maillard crosslinks, MOLA was identified as a novel amide AGE crosslink *in vivo* for the first time. The structural impact of glycation crosslinks on collagen was demonstrated by gel electrophoresis and tail tendon breaking time assay. Arginine-derived MG-H1 and *N*⁷-carboxyethyl arginine were dominant in senescent collagen and underline the relevance of methylglyoxal as a potent glycation agent *in vivo*. The cellular glycolysis, ubiquitously located in the cytoplasm, seems to be the main source of endogenous methylglyoxal.

In parallel, the portfolio of AGEs in wheat bread rolls and other prominent bread types was significantly enlarged on a quantitative basis for the first time. Again, high amounts of MG-H1 and N^7 -carboxyethyl arginine were found indicating yeast metabolism as a key step in precursor formation before baking. This was deeply investigated within the industrial bread making. Therefore, a quantitative extraction procedure with following derivatization was developed to facilitate the simultaneous determination of reducing sugars and reactive carbonyl compounds. Results revealed intermediate dicarbonyls formed from sugars of starch degradation to determine the course of the Maillard reaction in wheat bread rolls. Pyrraline formed from 3-deoxyglucosone or 3-deoxymaltosone, respectively, was by far the most dominating compound in bakery products. In addition, a convenient method for the quantitation of the aroma compound 2-acetyl-1-pyrrolin was developed. It is formed in numerous foods from methylglyoxal during heat-induced Maillard processes. The intrinsic dicarbonyl moiety was converted into a stable quinoxaline (2-APQ) using 1,2-phenylendiamine as a trapping agent. The former instable molecule was then conducted a sensitive HPLC-MS/MS method which was comparable to established HS-GC-MS/MS methods regarding analytical performance (precision, repeatability, recovery, linearity, level of

detection/quantitation). This new approach was successfully applied to various food matrices (rice, bread, popcorn) and enables further research studies, e.g. in the field of food technology and process optimization.

The recent study revealed comprehensive mechanistic relations within the Maillard reaction. Interestingly, a certain pattern of AGE formation was observed in both systems, collagen and bread, despite their fundamental differences (temperature, water activity, matrix). For example, molecular ratios within the reaction cascades of lysine and arginine with methylglyoxal or similar dicarbonyl formation in model systems and complex matrices indicating strict rules in Maillard chemistry. Thus, reducing sugars tend to form lysine modifications whereas dicarbonyls like methylglyoxal preferentially form arginine adducts. Reactivity of dicarbonyls decreases rapidly with increasing chain length. Isolated dicarbonyl groups as in 3-deoxyosones react under preservation of the carbon backbone whereas reductones are even more reactive and are prone to fragmentation. Dicarbonyl or AGE formation, respectively, via numerous steps only rarely occurs. Current knowledge of Maillard mechanisms and established compounds suggest additional proteinbound follow-up structures, e.g. derived from 3-deoxyglucosone, in analogy to methylglyoxal.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-AP	2-Acetyl-1-pyrrolin
2-APQ	2-Acetyl-1-pyrrolin-Chinoxalin
2-ATHP	2-Acetyltetrahydropyridin
AGE	Advanced Glycation Endproduct
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat (Boc-Anhydrid)
tBuOH	<i>tert</i> -Butanol
CEA	N ⁷ -Carboxyethylarginin
CEL	N ⁶ -Carboxyethyllysin
CMA	N ⁷ -Carboxymethylarginin
CML	N ⁶ -Carboxy methyllys in
1,5-DDMal	1,5-Didesoxymaltoson-4-en
3,4-DDP	3,4-Didesoxypentoson
1-DG	1-Desoxyglucoson
3-DG	3-Desoxyglucoson
4-DG	4-Desoxyglucoson
1-DMal	1-Desoxymaltoson
3-DMal	3-Desoxymaltoson
3-DP	3-Desoxypentoson
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMH	Dimethylhydrazin
DODIC	3-deoxyglucosone-derived imidazoline crosslink
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
GALA	N ⁶ -Glycoloyllysin (<i>glycolic acid lysine amide</i>)
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
G-H3	Glyoxal-Hydroimidazolon 3
GO	Glyoxal
GODIC	glyoxal-derived imidazoline crosslink
GOLA	Glyoxal-Lysinamid
GOLD	Glyoxal-Lysindimer
GSH	Glutathion

HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
НОР	2-(1-Hydroxy-2-oxo-1-propyl)-pyrrolidin
Lac	N ⁶ -Lactoyllysin
Leu-Äq	Leucin-Äquivalente
LNL	Lysinonorleucin
LOX	Lysyl-Oxidase
MG-H1/3	Methylglyoxal-Hydroimidazolon 1/3
MGO	Methylglyoxal
MODIC	methylglyoxal-derived imidazoline crosslink
MOLA	Methylglyoxal-Lysinamid
MOLD	Methylglyoxal-Lysindimer
MRP	Maillard-Reaktionsprodukt
n.a.	nicht analysiert
n.b.	nicht bestimmbar
n.n.	nicht nachweisbar
OAV	Aromawert (aroma activity value)
OPD	ortho-Phenylendiamin
PBS	phosphate buffered saline
PyrOH	Brenztraubensäure (Pyruvat)
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPME	solid phase microextraction
THP	Tetrahydropyrimidin
TPI	Triosephosphat-Isomerase
TTBT	tail tendon breaking time

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.	1	Anfangsphase der Maillard-Reaktion	. 3
Abb.	2	Fragmentierungsmechanismen von Dicarbonylverbindungen mit Reduktonstruktur	. 4
Abb.	3	Bildung von Lysin-AGEs durch Tautomerisierung.	. 6
Abb.	4	Lysin-Arginin-Quervernetzungsstrukturen in der Maillard-Reaktion.	. 7
Abb.	5	Hydratationsgleichgewicht von Methylglyoxal in wässriger Lösung.	. 8
Abb.	6	Bildung von Methylglyoxal aus Triosephosphaten.	. 9
Abb.	7	Metabolismus von Methylglyoxal in vivo	10
Abb.	8	Methylglyoxal-Arginin-Reaktionskaskade	13
Abb.	9	Methylglyoxal-Lysin-Reaktionskaskade.	14
Abb.	10	Schematische Darstellung von Tropokollagen und der Viertelstaffelung	17
Abb.	11	Hierarchischer Aufbau einer Sehnenfaser	17
Abb.	12	Querschnitt einer Sehnenfaser unter dem Elektronenmikroskop	17
Abb.	13	Enzymatische Quervernetzung von Kollagen durch Lysyl-Oxidase	18
Abb.	14	Lage von LOX- und AGE-Crosslinks innerhalb einer Kollagenfibrille	20
Abb.	15	Bildung von Furfural, 5-Hydroxymethylfurfural und Pyrralin.	26
Abb.	16	Bildung von 2-Acetyl-1-pyrrolin und 2-Acetyltetrahydropyridin	30
Abb.	17	Verwendete Strategien für die Synthese von MOLA	35
Abb.	18	Postulierter Bildungsweg von MOLA innerhalb der MGO-Lysin-Reaktionskaskade	37
Abb.	19	Sehnenbruchzeit von inkubierten Sehnen und nativen Sehnen	39
Abb.	20	Abbau von 2 Acetyl-1-pyrrolin in wässriger Lösung	41
Abb.	21	Derivatisierung von 2 Acetyl-1-pyrrolin mit o-Phenylendiamin	42
Abb.	22	Schematische Darstellung der industriellen Herstellung von Weizenbrötchen	46
Abb.	23	Veränderung physikalischer Parameter während des Fertigbackens.	49
Abb.	24	Bildung von $lpha$ -Dicarbonylen in Weizenbrötchen während des Fertigbackens	50
Abb.	25	Bildung von AGEs in Weizenbrötchen während des Fertigbackens.	52

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Methylglyoxal-Konzentrationen in vivo1	11
Tab. 2	Aminosäurezusammensetzung von Kollagen Typ I 1	16
Tab. 3	AGE-Gehalte in nativen Mausschwanzsehnen 2	20
Tab. 4	Prozentuale Verteilung der Osborne-Fraktionen auf das Gesamtprotein	23
Tab. 5	Chemische Zusammensetzung von Weizen und Roggen 2	23
Tab. 6	Gehalte von 5-Hydroxymethylfurfural in verschiedenen Lebensmitteln	27
Tab. 7	Intermediate und Produkte der Maillard-Reaktion in Keksen	28
Tab. 8	2-Acetyl-1-pyrrolin, 2-Acetyltetrahydropyridin und ihre Aromawerte in Lebensmitteln 3	31
Tab. 9	Bildungskinetik von MOLA im <i>in vitro</i> Modell mit N ² -Boc-Lysin und Methylglyoxal	36
Tab. 10	Bildungskinetik von MOLA im <i>ex vivo</i> Modell mit Kollagen und Methylglyoxal	36
Tab. 11	Glykierung von Arginin im <i>ex vivo</i> Modell mit Kollagen	38
Tab. 12	Ausgewählte AGEs in Rattenschwanzsehnen verschiedenen Alters	10
Tab. 13	Gehalte von 2-Acetyl-1-pyrrolin in ausgewählten Lebensmitteln	14
Tab. 14	Vergleich der Extraktionsmethoden für Protein aus Weizenbrötchen.	15
Tab. 15	Veränderung ausgewählter Teiginhaltsstoffe während der Brötchenherstellung	18
Tab. 16	Gehalte ausgewählter AGEs und des Amadori-Produkts in verschiedenen Brotsorten	54
10 LITERATUR

- Maillard, L. C. Action of Amino Acids on Sugars. Formation of Melanoidins in a Methodical Way, *Compte-Rendu de l'Academie des Sciences*. **1912**, *154*, 66–68.
- (2) Hellwig, M.; Henle, T. Baking, ageing, diabetes: a short history of the Maillard reaction, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 10316–10329.
- (3) F.J. Tessier The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation, *Pathol. Biol.* **2010**, *58*, 214–219.
- (4) Ahmed, M. U.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein, J. Biol. Chem. **1986**, 261, 4889–4894.
- (5) Henning, C.; Smuda, M.; Girndt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Molecular Basis of Maillard Amide-Advanced Glycation Endproduct (AGE) Formation *in vivo*, *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 44350–44356.
- (6) Smuda, M.; Glomb, M. A. Fragmentation pathways during Maillard-induced carbohydrate degradation, J. Agric. Food Chem. 2013, 61, 10198–10208.
- (7) Henning, C.; Glomb, M. A. Pathways of the Maillard Reaction under Physiological Conditions, *Glycoconjugate J.* **2016**, *33*, 499–512.
- (8) Tomas Davídek; Fabien Robert; Stéphanie Devaud; Francia Arce Vera; and Imre Blank* Sugar Fragmentation in the Maillard Reaction Cascade: Formation of Short-Chain Carboxylic Acids by a New Oxidative α-Dicarbonyl Cleavage Pathway, J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 6677–6684.
- (9) Michael Voigt; Marcus A. Glomb Reactivity of 1-Deoxy-d-erythro-hexo-2,3-diulose: A Key Intermediate in the Maillard Chemistry of Hexoses, J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 4765–4770.
- (10) Biemel, K. M.; Conrad, J.; Lederer, M. O. Unexpected Carbonyl Mobility in Aminoketoses: The Key to Major Maillard Crosslinks, *Angewandte Chemie International Edition*. 2002, *41*, 801–804.
- (11) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose in the presence of lysine leads to formation of carboxylic acid amides, *J. Agric. Food Chem.* 2010, *58*, 6458–6464.
- (12) Michael Voigt; Mareen Smuda; Christoph Pfahler; Marcus A. Glomb Oxygen-Dependent Fragmentation Reactions during the Degradation of 1-Deoxy-d-erythro-hexo-2,3-diulose, J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 5685–5691.

- (13) Ledl, F.; Schleicher, E. New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body, Angew. Chem. Int. Ed. **1990**, *29*, 565–594.
- (14) Thornalley, P. J. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 111–117.
- (15) Henning, C.; Liehr, K.; Girndt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Extending the Spectrum of α-Dicarbonyl Compounds *in vivo*, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 28676–28688.
- (16) Smuda, M.; Henning, C.; Raghavan, C. T.; Johar, K.; Vasavada, A. R.; Nagaraj, R. H.; Glomb, M. A. Comprehensive Analysis of Maillard Protein Modifications in Human Lenses: Effect of Age and Cataract, *Biochemistry*. **2015**, *54*, 2500–2507.
- (17) Hohmann, C.; Liehr, K.; Henning, C.; Fiedler, R.; Girndt, M.; Gebert, M.; Hulko, M.; Storr, M.;
 Glomb, M. A. Detection of Free Advanced Glycation Endproducts in Vivo during Hemodialysis,
 J. Agric. Food Chem. 2017, 65, 930–937.
- (18) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars, J. Biol. Chem. 2001, 276, 41638–41647.
- (19) Baldensperger, T.; Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Novel α-Oxoamide Advanced Glycation Endproducts within the N⁶-Carboxymethyl Lysine and N⁶-Carboxyethyl Lysine Reaction Cascades, J. Agric. Food Chem. **2018**, 66, 1898–1906.
- (20) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, Angewandte Chemie International Edition. 2001, 40, 2004–2021.
- (21) Ahmed, N.; Thornalley, P. J. Quantitative Screening of Protein Biomarkers of Early Glycation, Advanced Glycation, Oxidation and Nitrosation in Cellular and Extracellular Proteins by Tandem Mass Spectrometry, *Biochemical Society Transactions*. 2003, *31*, 1417–1422.
- (22) Thornalley, P. J.; Battah, S.; Ahmed, N.; Karachalias, N.; Agalou, S.; Babaei-Jadidi, R.; Dawnay,
 A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular
 proteins by tandem mass spectrometry, *Biochem. J.* 2003, *375*, 581–592.
- (23) Ahmed, N.; Thornalley, P. J.; Dawczynski, J.; Franke, S.; Strobel, J.; Stein, G.; Haik, G. M. Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolone Advanced Glycation End-Products of Human Lens Proteins, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2003, 44, 5287–5292.
- (24) Avery, N. C.; Bailey, A. J. The Effects of the Maillard Reaction on the Physical Properties and Cell Interactions of Collagen, *Pathol. Biol.* **2006**, *54*, 387–395.

- (25) Biemel, K. M.; Friedl, D. A.; Lederer, M. O. Identification and quantification of major maillard cross-links in human serum albumin and lens protein. Evidence for glucosepane as the dominant compound, J. Biol. Chem. 2002, 277, 24907–24915.
- (26) Henle, T.; Schwarzenbolz, U.; Klostermeyer, H. Detection and quantification of pentosidine in foods, *Z. Lebensm. Unters. Forch.* **1997**, *204*, 95–98.
- (27) Lederer, M. O.; Klaiber, R. G. Crosslinking of Proteins by Maillard Processes, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2499–2507.
- (28) Biemel, K. M.; Bühler, H. P.; Reihl, O.; Lederer, M. O. Identification and quantitative evaluation of the lysine-arginine crosslinks GODIC, MODIC, DODIC, and glucosepan in foods, *Food / Nahrung.* 2001, 45, 210–214.
- (29) Moulds, L. V.; Riley, H. L. The Polymerisation of Methylglyoxal, J. Chem. Soc. 1938, 621–626.
- (30) Nemet, I.; Vikić-Topić, D.; Varga-Defterdarović, L. Spectroscopic studies of methylglyoxal in water and dimethylsulfoxide, *Bioorganic Chemistry*. 2004, 32, 560–570.
- (31) Rae, C.; Berners-Price, S. J.; Bulliman, B. T.; Kuchel, P. W. Kinetic analysis of the human erythrocyte glyoxalase system using 1H NMR and a computer model, *Eur. J. Biochem.* 1990, 193, 83–90.
- (32) McLellan, A. C.; Thornalley, P. J. Synthesis and Chromatography of 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzene, 6,7-Dimethoxy-2-methylquinoxaline and 6,7-Dimethoxy-2,3-dimethylquinoxaline for Use in a Liquid Chromatographic Fluorimetric Assay of Methylglyoxal, *Anal. Chim. Acta.* **1992**, *263*, 137–142.
- (33) Thornalley, P. J. Pharmacology of Methylglyoxal: Formation, Modification of Proteins and Nucleic Acids, and Enzymatic Detoxification, *Gen. Pharmacol.* **1996**, *27*, 565–573.
- (34) David L Vander Jagt; Lucy A Hunsaker Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase, *Chemico-Biological Interactions*. **2003**, *143-144*, 341–351.
- (35) Kalapos, M. P. Where does plasma methylglyoxal originate from?, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2013**, *99*, 260–271.
- (36) Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 101–105.
- (37) Richard, J. Mechanism for the formation of methylglyoxal from trisephosphates, *Biochemical Society Transactions.* **1993**, *21*, 549–553.

- (38) Thornalley, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life, *Biochem. J.* **1990**, 269, 1–11.
- (39) Schumacher, D.; Morgenstern, J.; Oguchi, Y.; Volk, N.; Kopf, S.; Groener, J. B.; Nawroth, P. P.;
 Fleming, T.; Freichel, M. Compensatory mechanisms for methylglyoxal detoxification in
 experimental & clinical diabetes, *Molecular Metabolism.* 2018, 18, 143–152.
- (40) Thornalley, P. J. The glyoxalase system in health and disease, *Molecular Aspects of Medicine*. **1993**, *14*, 287–371.
- (41) McLellan, A. C.; Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The assay of methylglyoxal in biological systems byderivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene, *Analytical Biochemistry*. **1992**, 206, 17–23.
- (42) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of α-Dicarbonyl Compounds in Maillard Reaction Systems and in Vivo, J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5543–5550.
- (43) Beisswenger, P. J.; Howell, S. K.; Touchette, A. D.; Lal, S.; Szwergold, B. S. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes, *Diabetes*. **1999**, *48*, 198–202.
- (44) Nemet, I.; Varga-Defterdarovic, L.; Turk, Z. Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography, *Clinical Biochemistry.* **2004**, *37*, 875–881.
- (45) Han, Y.; Randell, E.; Vasdev, S.; Gill, V.; Gadag, V.; Newhook, L. A.; Grant, M.; Hagerty, D.
 Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes, *Molecular and Cellular Biochemistry*.
 2007, 305, 123–131.
- (46) Ogawa, S.; Nakayama, K.; Nakayama, M.; Mori, T.; Matsushima, M.; Okamura, M.; Senda, M.;
 Nako, K.; Miyata, T.; Ito, S. Methylglyoxal Is a Predictor in Type 2 Diabetic Patients of Intima Media Thickening and Elevation of Blood Pressure, *Hypertension*. **2010**, *56*, 471–476.
- (47) Dhananjayan, K.; Irrgang, F.; Raju, R.; Harman, D. G.; Moran, C.; Srikanth, V.; Munch, G. Determination of glyoxal and methylglyoxal in serum by UHPLC coupled with fluorescence detection, *Analytical Biochemistry*. **2019**, *573*, 51–66.
- (48) Nemet, I.; Turk, Z.; Duvnjak, L.; Car, N.; Varga-Defterdarović, L. Humoral methylglyoxal level reflects glycemic fluctuation, *Clinical Biochemistry*. **2005**, *38*, 379–383.

- (49) McLellan, A. C.; Thornalley, P. J.; Benn, J.; Sonksen, P. H. Glyoxalase System in Clinical Diabetes Mellitus and Correlation with Diabetic Complications, *Clinical Science*. **1994**, *87*, 21–29.
- (50) Susan A. Phillips; Donald Mirrlees; Paul J. Thornalley Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats: Effect of the aldose reductase inhibitor statil, *Biochemical Pharmacology*. **1993**, *46*, 805–811.
- (51) Randell, E. W.; Vasdev, S.; Gill, V. Measurement of methylglyoxal in rat tissues by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* **2005**, *51*, 153–157.
- (52) Gobert, J.; Glomb, M. A. Degradation of Glucose: Reinvestigation of Reactive α-Dicarbonyl Compounds, J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 8591–8597.
- (53) Smuda, M.; Glomb, M. A. Novel Insights into the Maillard Catalyzed Degradation of Maltose, J. Agric. Food Chem. **2011**, *59*, 13254–13264.
- (54) Smuda, M.; Glomb, M. A. Maillard degradation pathways of vitamin C, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4887–4891.
- (55) Thornalley, P. J.; Westwood, M. E.; McLellan, A. C.; Lo, T. W.C. Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiological Conditions, J. Biol. Chem. 1994, 51, 32299–32305.
- (56) Klöpfer, A.; Spanneberg, R.; Glomb, M. A. Formation of Arginine Modifications in a Model System of N^α-tert-Butoxycarbonyl (Boc)-Arginine with Methylglyoxal, J. Agric. Food Chem.
 2011, 59, 394–401.
- (57) Nagaraj, R. H.; Shipanova, I. N.; Faust, F. M. Protein Crosslinking by the Maillard Reaction: Isolation, Characterization and *in vivo* Detection of a Lysine-Lysine Crosslink Derived from Methylglyoxal, J. Biol. Chem. **1996**, 271, 19338–19345.
- (58) Kühn, K. Struktur und Biochemie des Kollagens, Chemie in unserer Zeit. 1974, 8, 97–103.
- (59) Buddecke, E. Biochemie des Bindegewebes, Angewandte Chemie. 1960, 72, 663–677.
- (60) Hulmes, D. J.S.; Miller, A.; Parry, D. A.D.; Piez, K. A.; Woodhead-Galloway, J. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing, *J. Mol. Biol.* 1973, *79*, 137–148.
- (61) Fratzl, P. Cellulose and collagen: From fibres to tissues, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. **2003**, *8*, 32–39.

- (62) Raspanti, M.; Congiu, T.; Guizzardi, S. Structural aspects of the extracellular matrix of the tendon: an atomic force and scanning electron microscopy study, *Archives of histology and cytology*. **2002**, *65*, 37–43.
- (63) Streeter, I.; Leeuw, N. H. de A Molecular Dynamics Study of the Interprotein Interactions in Collagen Fibrils, *Soft Matter.* **2011**, *7*, 3373–3382.
- (64) Ottani, V.; Raspanti, M.; Ruggeri, A. Collagen structure and functional implications, *Micron.* 2001, 32, 251–260.
- (65) Gelse, K. Collagens Structure, Function and Biosynthesis, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 1531–1546.
- (66) Bailey, A. J.; Paul, R. G.; Knott, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen, Mech. Ageing Dev. 1998, 106, 1–56.
- (67) Bailey, A. Molecular Mechanisms of Ageing in Connective Tissues, *Mech. Ageing Dev.* **2001**, *122*, 735–755.
- (68) Naffa, R.; Holmes, G.; Ahn, M.; Harding, D.; Norris, G. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the simultaneous quantitation of collagen and elastin crosslinks, J. Chromatogr. A. 2016, 1478, 60–67.
- (69) Fessel, G.; Li, Y.; Diederich, V.; Guizar-Sicairos, M.; Schneider, P.; Sell, D. R.; Monnier, V. M.;
 Snedeker, J. G.; Screen, Hazel R. C. Advanced Glycation Endproducts Reduce Collagen
 Molecular Sliding to Affect Collagen Fibril Damage Mechanisms but Not Stiffness, *PLoS ONE*.
 2014, 9, 1–12.
- (70) Fessel, G. Mechanics of Collagen Cross-Links in Tendon Aging, Disease and as Potential Treatment for Injuries; ETH-Zürich: Zürich.
- (71) Monnier, V. M.; Glomb, M.; Elgawish, A.; Sell, D. R. The Mechanism of Collagen Crosslinking in Diabetes. *Diabetes*. **1996**, *45*, 67–72.
- (72) Gautieri, A.; Redaelli, A.; Buehler, M. J.; Vesentini, S. Age- and Diabetes-related Non-enzymatic Crosslinks in Collagen Fibrils: Candidate Amino Acids Involved in Advanced Glycation Endproducts, *Matrix Biol.* **2014**, *34*, 89–95.
- (73) Sell, D. R.; Monnier, V. M. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21597–21602.

- (74) Sell, D. R.; Biemel, K. M.; Reihl, O.; Lederer, M. O.; Strauch, C. M.; Monnier, V. M.
 Glucosepane is a Major Protein Crosslink of the Senescent Human Extracellular Matrix,
 J. Biol. Chem. 2005, 280, 12310–12315.
- (75) Frye, E. B.; Degenhardt, T. P.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Role of the Maillard Reaction in Aging of Tissue Proteins, *Journal of Biological Chemistry*. **1998**, *273*, 18714–18719.
- (76) Skovgaard, D.; Svensson, R. B.; Scheijen, J.; Eliasson, P.; Mogensen, P.; Hag, A. M. F.; Kjaer, M.; Schalkwijk, C. G.; Schjerling, P.; Magnusson, S. P.; Couppe, C. An Advanced Glycation Endproduct (AGE)-Rich Diet Promotes Accumulation of AGEs in Achilles Tendon, *Physiol. Rep.* 2017, *5*, 1–7.
- (77) Sokolov, B. P.; Sher, B. M.; Kalinin, V. N. Modified Method for Peptide Mapping of Collagen Chains Using Cyanogen Bromide-Cleavage of Protein Within Polyacrylamide Gels, *Analytical Biochemistry.* **1989**, *176*, 365–367.
- (78) Nowotny, K.; Grune, T. Degradation of Oxidized and Glycoxidized Collagen: Role of Collagen Cross-Linking, Arch. Biochem. Biophys. **2014**, 542, 56–64.
- (79) Dyballa, N.; Metzger, S. Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels, *J. Visualized Exp.* **2009**.
- (80) Yufei Li; Gion Fessel; Marios Georgiadis; Jess G. Snedeker Advanced Glycation Endproducts Diminish Tendon Collagen Fiber Sliding, *Matrix Biol.* **2013**, *32*, 169–177.
- (81) Harrison, D. E.; Archer, J. R. Measurement of Changes in Mouse Tail Collagen with Age, *Exp. Gerontol.* **1978**, *13*, 75–82.
- (82) Shewry, P. R.; Tatham, A. S.; Forde, J.; Kreis, M.; Miflin, B. J. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment, J. Cereal Sci. 1986, 4, 97–106.
- (83) Wieser, H. Chemistry of gluten proteins, Food Microbiology. 2007, 24, 115–119.
- (84) Ewart, J. A. D. Amino acid analyses of cereal flour proteins, *J. Sci. Food Agric.* 1967, 18, 548–552.
- (85) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 6th ed.; Springer-Verlag; Springer: Berlin Heidelberg, 2008.
- (86) Henry, R. J.; Saini, H. S. Characterization of Cereal Sugars and Oligosaccharides, *Cereal Chem.* 1989, 66, 362–365.
- (87) Martínez-Anaya, M. A. Enzymes and Bread Flavor, J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 2469–2480.

- (88) Struyf, N.; Van der Maelen, Eva; Hemdane, S.; Verspreet, J.; Verstrepen, K. J.; Courtin, C. M. Bread Dough and Baker's Yeast: An Uplifting Synergy, *Compr. Rev. Food Sci. F.* 2017, 16, 850–867.
- (89) Struyf, N.; Verspreet, J.; Verstrepen, K. J.; Courtin, C. M. Investigating the impact of αamylase, α-glucosidase and glucoamylase action on yeast-mediated bread dough fermentation and bread sugar levels, *Journal of Cereal Science*. **2017**, *75*, 35–44.
- (90) Faria-Oliveira, F.; Puga, S.; Ferreir, C. Yeast: World's Finest Chef. In *Food Industry;* Muzzalupo, I., Ed.; InTech, **2013**.
- (91) Collar, C.; Mascarós, A. F.; Barber, C. B. de Amino Acid Metabolism by Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Bread Dough Fermentation, *J. Food Science*. **1992**, *57*, 1423–1427.
- (92) Gänzle, M. G. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation, Food Microbiol. 2014, 37, 2–10.
- (93) Hansen, A.; Schieberle, P. Generation of Aroma Compounds During Sourdough Fermentation: Applied and Fundamental Aspects, *Trends in Food Science & Technology*. **2005**, *16*, 85–94.
- (94) Soleimani Pour-Damanab, A.; Jafary, A.; Rafiee, S. Kinetics of the crust thickness development of bread during baking, *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 3439–3445.
- (95) Fischer, M.; Glomb, M. A. *Moderne Lebensmittelchemie*, 1st ed.; Behr's Verlag: Hamburg, 2015.
- (96) Purlis, E.; Salvadori, V. O. Modelling the browning of bread during baking, *Food Research International.* **2009**, *42*, 865–870.
- (97) Ameur, L. A.; Mathieu, O.; Lalanne, V.; Trystram, G.; Birlouez-Aragon, I. Comparison of the Effects of Sucrose and Hexose on Furfural Formation and Browning in Cookies Baked at Different Temperatures, *Food Chemistry*. **2007**, *101*, 1407–1416.
- (98) Capuano, E.; Ferrigno, A.; Acampa, I.; Ameur, L. A.; Fogliano, V. Characterization of the Maillard Reaction in Bread Crisps, *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *228*, 311–319.
- (99) Ramírez-Jiménez, A.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Browning Indicators in Bread, J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 4176–4181.
- (100) Henle, T.; Klostermeyer, H. Determination of protein-bound 2-amino-6-(2-formyl-1-pyrrolyl)-hexanoic acid (pyrraline) by ion exchange Chromatography and photodiode array detection, *Z. Lebensm. Unters. Forch.* 1993, *196*, 1–4.

- (101) Hellwig, M.; Henle, T. Formyline, a new glycation compound from the reaction of lysine and
 3-deoxypentosone, *Eur Food Res Technol.* 2010, 230, 903–914.
- (102) Lothar W. Kroh Caramelisation in food and beverages, *Food Chemistry*. **1994**, *51*, 373–379.
- (103) Petisca, C.; Henriques, A. R.; Pérez-Palacios, T.; Pinho, O.; Ferreira, I. M.P.L.V.O. Study of hydroxymethylfurfural and furfural formation in cakes during baking in different ovens, using a validated multiple-stage extraction-based analytical method, *Food Chem.* 2013, 141, 3349–3356.
- (104) Rakete, S.; Klaus, A.; Glomb, M. A. Investigations on the Maillard reaction of dextrins during aging of Pilsner type beer, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9876–9884.
- (105) Ameur, L. A.; Trystram, G.; Birlouez-Aragon, I. Accumulation of 5-Hydroxymethyl-2-furfural in Cookies During the Backing Process: Validation of an Extraction Method, *Food Chemistry*.
 2006, 98, 790–796.
- (106) Degen, J.; Hellwig, M.; Henle, T. 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods,J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 7071–7079.
- (107) Petisca, C.; Henriques, A. R.; Pérez-Palacios, T.; Pinho, O.; Ferreira, I.M.P.L.V.O. Assessment of hydroxymethylfurfural and furfural in commercial bakery products, *Journal of Food Composition and Analysis.* **2014**, *33*, 20–25.
- (108) Henle, T.; Zehetner, G.; Klostermeyer, H. Fast and sensitive determination of furosine, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung.* **1995**, *200*, 235–237.
- (109) Treibmann, S.; Hellwig, A.; Hellwig, M.; Henle, T. Lysine-Derived Protein-Bound Heyns Compounds in Bakery Products, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10562–10570.
- (110) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Degradation of Oligosaccharides in Nonenzymatic Browning by Formation of α-Dicarbonyl Compounds via a "Peeling Off" Mechanism, J. Agric. Food Chem.
 2000, 48, 6219–6226.
- (111) Dunkel, A.; Steinhaus, M.; Kotthoff, M.; Nowak, B.; Krautwurst, D.; Schieberle, P.; Hofmann,
 T. Nature's Chemical Signatures in Human Olfaction: A Foodborne Perspective for Future
 Biotechnology, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 7124–7143.
- (112) Adams, A.; Kimpe, N. de Chemistry of 2-Acetyl-1-pyrroline, 6-Acetyl-1, 2, 3, 4tetrahydropyridine, 2-Acetyl-2-thiazoline, and 5-Acetyl-2, 3-dihydro-4 H-thiazine, *Chemical Reviews.* 2006, 106, 2299–2319.

- (113) Yoshihashi, T. Quantitative Analysis on 2-Acetyl-1-pyrroline of an Aromatic Rice by Stable Isotope Dilution Method and Model Studies on its Formation During Cooking, J. Food Science. 2002, 67, 619–622.
- (114) Zehentbauer, G.; Grosch, W. Crust Aroma of Baguettes I. Key Odorants of Baguettes Prepared in Two Different Ways, *Journal of Cereal Science*. **1998**, *28*, 81–92.
- (115) Schieberle, P. The role of free amino acids present in yeast as precursors of the odorants 2acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine in wheat bread crust, *Z. Lebensm. Unters. Forch.* **1990**, *191*, 206–209.
- (116) Hofmann, T.; Schieberle, P. 2-Oxopropanal, Hydroxy-2-propanone, and 1-PyrrolineImportant Intermediates in the Generation of the Roast-Smelling Food Flavor Compounds 2-Acetyl-1-pyrroline and 2-Acetyltetrahydropyridine, J. Agric. Food Chem. **1998**, 46, 2270–2277.
- (117) Hopfer, H.; Jodari, F.; Negre-Zakharov, F.; Wylie, P. L.; Ebeler, S. E. HS-SPME-GC-MS/MS Method for the Rapid and Sensitive Quantitation of 2-Acetyl-1-pyrroline in Single Rice Kernels, J. Agric. Food Chem. **2016**, 64, 4114–4120.
- (118) Schieberle, P.; Grosch, W. Changes in the concentrations of potent crust odourants during storage of white bread, *Flavour Fragr. J.* **1992**, *7*, 213–218.
- (119) De Kimpe, Norbert G.; Stevens, C. V.; Keppens, M. A. Synthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, the principal rice flavor component, *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1458–1461.
- (120) Fang, M.-C.; Cadwallader, K. R. Stabilization of the potent odorant 2-acetyl-1-pyrroline and structural analogues by complexation with zinc halides, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8808–8813.
- (121) Katayama, H.; Utsumi, T.; Ozawa, C.; Nakahara, Y.; Hojo, H.; Nakahara, Y. Pyruvoyl, a novel amino protecting group on the solid phase peptide synthesis and the peptide condensation reaction, *Tetrahedron Letters*. **2009**, *50*, 818–821.
- (122) Apintanapong, M.; Noomhorm, A. The Use of Spray Drying to Microencapsulate 2-Acetyl 1-pyrroline, a Major Flavour Component of Aromatic Rice, *Int J Food Sci Tech.* 2003, *38*, 95–102.
- (123) Schieberle, P. Quantitation of Important Roast-Smelling Odorants in Popcorn by Stable Isotope Dilution Assays and Model Studies on Flavor Formation during Popping, J. Agric. Food Chem. 1995, 43, 2442–2448.

- (124) Schieberle, P.; Grosch, W. Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay, *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 252–257.
- (125) Schieberle, P.; Grosch, W. Potent Odorants of Rye Bread Crust: Differences from the Crumb and from Wheat Bread Crust, *Z Lebensm Unters Forch.* **1994**, *198*, 292–296.
- (126) Rakete, S.; Glomb, M. A. A novel approach for the quantitation of carbohydrates in mash, wort, and beer with RP-HPLC using 1-naphthylamine for precolumn derivatization, *J. Agric. Food Chem.* 2013, *61*, 3828–3833.
- (127) Chevallier, S.; Della Valle, G.; Colonna, P.; Broyart, B.; Trystram, G. Structural and Chemical Modifications of Short Dough During Baking, *J. Cereal Sci.* 2002, *35*, 1–10.
- (128) Purlis, E.; Salvadori, V. O. Bread browning kinetics during baking, J. Food Eng. 2007, 80, 1107–1115.
- (129) Shumilina, J.; Kusnetsova, A.; Tsarev, A.; Janse van Rensburg, H.C.; Medvedev, S.; Demidchik, V.; Van den Ende, W.; Frolov, A. Glycation of Plant Proteins: Regulatory Roles and Interplay with Sugar Signalling?, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2366.
- (130) Rabbani, N.; Al-Motawa, M.; Thornalley, P.J. Protein Glycation in Plants —
 An Under-Researched Field with Much Still to Discover. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, *21*, 3942.
- (131) Assar, S. H.; Moloney, C.; Lima, M.; Magee, R.; Ames, J. M. Determination of N ε-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino Acids* 2009, *36*, 317–326.
- (132) Hellwig, M.; Henle, T. Quantification of the Maillard reaction product 6-(2-formyl-1-pyrrolyl)-L-norleucine (formyline) in food. *Eur. Food Res. Technol.* 2012, 235, 99–106.
- (133) Hellwig, M.; Auerbach, C.; Müller, N.; Samuel, P.; Kammann, S.; Beer, F.; Gunzer, F.; Henle,
 T. Metabolization of the advanced glycation end product N-2-carboxymethyllysine (CML)
 by different probiotic E. coli strains, *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1963-1972.

11 EINZELPUBLIKATIONEN

PUBLIKATION A

AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Cite This: J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 3957–3965



Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Rat Tail Collagen and Correlation to Tendon Stiffening

Tobias Jost,^{†©} Alexander Zipprich,[‡] and Marcus A. Glomb^{*,†©}

[†]Institute of Chemistry–Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Strasse 2, D-06120 Halle, Germany

[‡]Department of Internal Medicine I, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Ernst-Grube-Strasse 40, D-06120 Halle, Germany

ABSTRACT: Methylglyoxal is a major 1,2-dicarbonyl compound in vivo and leads to nonenzymatic protein modifications, known as advanced glycation endproducts. Especially long-lived proteins like collagen are prone to changes of the mechanical or biological function, respectively, by accumulation of Maillard-derived modifications. Specifically, the resulting nonenzymatic cross-link structures in parallel to the natural maturation process of collagen fibrils lead to complications with age or during disease. A novel lysine–lysine amide cross-link derived from methylglyoxal, 2,15-diamino-8-methyl-9-oxo-7,10-diaza-1,16-hexadecanedioic acid, named MOLA, was synthesized and identified in vitro and in vivo. Tail tendons of young, adult, and old rats (3, 12, and 22 months) were enzymatically digested prior to analysis of acid-labile glycation products via liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). As a result, nine monovalent amino acid modifications, mostly originating from methylglyoxal (36 μ mol/mol leucine-equivalents in total), and four glycation cross-links (0.72 μ mol/mol MODIC (3-deoxyglucosone-derived imidazoline cross-link), 0.04 μ mol/mol MODIC (methylglyoxal-derived imidazoline cross-link), 0.34 μ mol/mol MOLA) were quantitated in senescent tendon collagen. The results correlated with increased tail tendon breaking time from 10 to 190 min and indicate that methylglyoxal is a major player in the aging process of connective tissue.

KEYWORDS: methylglyoxal, Maillard reaction, advanced glycation endproducts, collagen, glycation cross-links, connective tissue stiffening

INTRODUCTION

The Maillard reaction or glycation is one crucial aspect of protein modification during aging in vivo. In complex reaction cascades reducing sugars, especially 1,2-dicarbonyl compounds, interact with functional groups of lysine and arginine side chains to form stabile amino acid modifications, named advanced glycation endproducts (AGEs).¹ Long-lived proteins of the extracellular matrix, with a turnover of several years, are highly susceptible to structural changes due to accumulation of AGEs over time resulting in tissue stiffening and dysfunction.² Collagen is the most abundant polypeptide in connective tissues (e.g., tendon, skin, bone, cartilage, or vessels). A total of 26 different types of collagen with a broad functional diversity exist.3 The fibril-forming type I collagen, mainly found in skin and tendons, is an established model for both in vitro and in vivo studies due to its structural homology among different organisms and, thus, has been studied intensively. Glycation cross-link structures are assumed to contribute and to explain collagen damage on a molecular basis.^{4,5} However, only a few selected structures, specifically N⁶-carboxymethyl lysine (CML), N⁶-carboxyethyl lysine (CEL), MG-H1, and pentosidine, were reported in literature as collagen modifications in vivo." In more recent work, glucosepane was considered as a major glycation cross-link in extracellular matrix protein.5

One very potent glycating agent in biological systems is methylglyoxal (MGO). MGO is a short-chained, highly reactive 1,2-dicarbonyl compound originating from numerous sources in vivo including the Maillard triggered breakdown of longerchained sugars but foremost the enzymatic and nonenzymatic degradation of triose phosphates.⁹ Quantitation of MGO in vivo was conducted comprehensively. Reported MGO levels in human plasma range from 100 to 500 nM in healthy nondiabetic subjects, ¹⁰ while in rats plasma levels are around $2~\mu\text{M.}^{11}$ In cells and tissues, MGO levels are commonly 2–4 μ M.¹² Until now, nine MGO-related amino acid derivatives are reported in the literature. Lysine modifications are CEL and N⁶-lactoyl lysine.^{13,14} The methylglyoxal hydroimidazolones MG-H3 and MG-H1, their open-chained form N^7 -carboxyethyl arginine (CEA) and the two pyrimidine structures tetrahydropyrimidine (THP) and argpyrimidine are derived from arginine.¹⁵ Two cross-link structures are known to originate from MGO, the acid-stable lysine-lysine imidazolium compound MOLD (methylglyoxal lysine dimer),16 and the acidlabile lysine-arginine amidine MODIC (methylglyoxal-derived imidazoline cross-link).¹⁷ The aim of the present work was therefore to gain further insights into the mechanisms of AGE formation in collagen and to highlight relevant structures with a focus on MGO chemistry. Correlation of degree of chemical modification to change of physical properties was first accessed in an ex vivo model using 3 months old rat tail tendons incubated with methylglyoxal (200 μ M) under physiological conditions (pH 7.4, 37 °C) for 7 days. The study was then extended to the natural aging process using native tendons of

Received:February 20, 2018Revised:March 29, 2018Accepted:March 31, 2018Published:April 5, 2018

	ACC	Dub	lightions	
Ae /	ACD	Pub	ICALIONS	

© 2018 American Chemical Society

3957

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00937 J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 3957–3965

young, adult and old rats (3, 12, and 22 months). A novel MGO-derived amide AGE cross-link structure was identified and quantitated in parallel to other established AGEs.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals of the highest quality available were purchased from Sigma-Aldrich (Munich/Steinheim, Germany) and Carl Roth AG (Karlsruhe, Germany) unless otherwise indicated. Methylglyoxal was prepared freshly from its dimethyl acetal as described by Klöpfer et al.¹⁵ N⁶-carboxymethyl lysine (CML),¹⁸ N⁶, glycoloyl lysine (GALA),¹⁹ N⁷-carboxymethyl arginine (CMA),²⁰ glycoxia hydroimidazolone (G-H2), ²¹ N^6 -carboxynteniyi aginine (CEL),¹³ N^6 -lactoyl lysine,¹⁴ and argpyrimidine²² were synthesized according to literature. Methylglyoxal hydroimidazolones (MG-H1 and MG-H3) as well as N7-carboxyethyl arginine (CEA) and tetrahydropyrimidine (THP) were isolated from methylglyoxal/N²-t-Boc-arginine reaction mixtures as described previously by our working group.¹⁵ Preparation of glucosepane,²³ MODIC (methylglyoxal-derived imidazoline crossand DODIC (3-deoxyglucosone-derived imidazoline crosslink) link)²⁴ was carried out as described by Lederer's group.

Synthesis of MOLA. The basic synthetic route was adapted with modifications from Glomb and Pfahler.¹⁹ Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 (Merck, Germany). Visualization of separated material was achieved with ninhydrin (2% ninhydrin + 5% acetic acid in n-butanol, w/v/v). Preparative column chromatography was performed on silica gel 60 (0.06-0.20 mm, Merck, Germany). Solvents were all chromatographic grade. From the individual fractions, solvents were removed under reduced pressure.

t-Butyl-N²-(t-butyloxycarbonyl)-N⁶-(benzyloxycarbonyl)-L-lysinate (2). 2 was synthesized according to Strazzolini et al.:²⁵ 2.0 g (5.26 mmol) of N2-(t-butyloxycarbonyl)-N6-(benzyloxycarbonyl)-L-lysine (1) and 330 mg (2.70 mmol) of 4-dimethylaminopyridine were dissolved in 10 mL of warm t-butanol. 1222 mg (5.60 mmol) of di-tbutyl dicarbonate (Boc_2O) were added. The solution was stirred for 24 h at room temperature (RT). Solvents were evaporated and the resulting residue was subjected to column chromatography (silica gel, *n*-hexane/acetone, 3:1, v/v). Fractions with an R_f value of 0.38 were combined (TLC, same eluent), and solvents were evaporated to yield 2 as a colorless oil (2.2 g, 95%).

t-Butyl-N²-(t-butyloxycarbonyl)-L-lysinate (3). 2.2 g (5.01 mmol) of 2 were dissolved in 10 mL of methanol/dichloromethane (1:1) with a small amount of palladium/activated charcoal (10%). The stirred mixture was purged with hydrogen for 2 h. The reaction was monitored by TLC (Rf 0.24, silica gel, methanol/dichloromethane/ triethylamine, 70:29:1, v/v/v). After filtration through Celite, solvents were evaporated to yield 3 as a brown oil (1.4 g, 93%).

t-Butyl-N²-(t-butyloxycarbonyl)-N⁶-(carboxyethyl)-L-lysinate (4). 700 mg (2.31 mmol) of 3 and 203 mg (2.31 mmol) of pyruvic acid were dissolved in 5 mL of absolute methanol. After addition of 435 mg (6.93 mmol) of sodium cyanoborohydride, the solution was stirred at RT for 3 h. Solvents were evaporated and the resulting residue was subjected to column chromatography (silica gel, methanol/ethyl acetate, 30:70, v/v). Fractions with material having an R_f value of 0.24 were combined and solvents were evaporated to yield 4 as a white powder (450 mg, 52%).

HR-MS: m/z 373.2339 [M - H]⁻ (found), m/z 373.2344 (calculated for $C_{18}H_{33}N_2O_6 [M - H]^-$).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 174.4, 173.5, 158.1, 82.6, 80.5, 59.2, 55.5, 47.1, 32.1, 28.7, 28.3, 27.0, 24.1, 16.2.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 4.00-3.91 (m, 1H), $\begin{array}{l} 3.52 \ (q, J=7.2 \ Hz, 1H), \ 3.05-2.90 \ (m, 2H), \ 1.85-1.48 \ (m, 6H), \ 1.48 \\ (d, J=7.2 \ Hz, 3H), \ 1.46 \ (s, 9H), \ 1.44 \ (s, 9H). \end{array}$

t-Butyl-N², N⁶-bis(t-butyloxycarbonyl)-N⁶-(carboxyethyl)-L-lysinate (5). 450 mg (1.20 mmol) of 4 were dissolved in 10 mL of a triethylamine solution (10% in absolute methanol, v/v). 1310 mg (6.00 mmol) of Boc₂O were added and the reaction mixture was refluxed for 30 min while stirring. Stirring was continued for 30 min at RT, solvents were evaporated, and the resulting residue was taken up in ice-cold 0.5 N hydrochloric acid. The emulsion was immediately extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried with sodium sulfate, solvents were evaporated, and the residue was subjected to column chromatography (silica gel, n-hexane/acetone, 80:20, v/v). Fractions with material having an Rf value of 0.10 were combined and solvents were evaporated to yield 5 as a colorless oil (301 mg, 53%). HR-MS: m/z 473.2864 [M - H]⁻ (found), m/z 473.2868

(calculated for $C_{23}H_{41}N_2O_8$ [M – H]⁻). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 175.6, 173.8, 158.1,

154.3, 83.4, 82.5, 80.4, 57.2, 55.8, 47.6, 32.4, 28.8, 28.7, 28.3, 28.0, 24.0, 17.4.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 4.03 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.94 (s, 1H), 3.30–3.04 (m, 2H), 1.82–1.51 (m, 6H), 1.47 (d, J = 2.0 Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.45 (s, 18H).

1,16-Di(t-butyl)-2,15-di[(t-butyloxycarbonyl)amino]-7-(t-butyloxycarbonyl)-8-methyl-9-oxo-7,10-diazahexadecanedioate (6). 100 mg (0.21 mmol) of 5 were dissolved in 2 mL of absolute tetrahydrofuran (THF) and 41 mg (0.30 mmol) of 1-hydroxybenzotriazole were added while stirring. 47 mg (0.30 mmol) of 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide dissolved in 1 mL of THF were added dropwise at 0 °C. After 30 min 64 mg (0.21 mmol) of 3 dissolved in 2 mL of THF were added to the solution. The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature. Solvents were evaporated and the resulting residue was subjected to column chromatography (silica gel, n-hexane/acetone, 70:30, v/v). Fractions with an R_f value of 0.43 were combined and solvents were evaporated to yield 6 as a colorless oil (150 mg, 95%).

HR-MS: m/z 759.5121 [M + H]⁺ (found), m/z 759.5114 (calculated for $C_{38}H_{71}N_4O_{11} [M + H]^+$).

2,15-Diamino-8-methyl-9-oxo-7,10-diaza-1,16-hexadecanedioic acid (MOLA, 7). 100 mg (0.13 mmol) of 6 were dissolved in 2 mL of THF and 2 mL of hydrochloric acid (6.0 M) were added. The reaction was monitored by TLC (silica gel, n-butanol/water/acetic acid/ pyridine, 4:2:3:3, v/v/v/v). Solvents were removed under reduced pressure. The product was dried over potassium hydroxide under high vacuum to yield 7 as a brown, amorphic material (44 mg, 98%, MOLA \times 3 HCl).

HR-MS: m/z 345.2141 [M-H]⁻ (found), m/z 345.2143 (calculated

for $C_{15}H_{29}N_4O_5$ [M-H]⁻). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 172.99, 172.89, 170.48, 170.39, 57.21, 53.88, 53.76, 46.76, 40.03, 39.90, 30.43, 30.29, 28.74, 28.72, 26.17, 22.58, 22.49, 16.72.

¹H NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 4.14–4.07 (m, 2H), 3.98 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.37-3.21 (m, 2H), 3.14-2.94 (m, 2H), 2.09-1.89(m, 4H), 1.84-1.73 (m, 2H), 1.67-1.38 (m, 6H), 1.53 (d, J = 7.0 Hz, 3H)

Animals. Three and 12 months old male Wistar rats were bred in the Center of Medical Basic Research (ZMG), Medical Faculty, Martin-Luther-University (Halle, Germany). Eighteen months old male Wistar rats were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France) and kept in the ZMG until the age of 22 months. Rats were housed in standard cages in a climate room with 12 h light and dark phases and free access to food. The American Physiological Society guide principles for the care and use of animals were followed. All animal experiments were approved by the local animal committee (42502-2-1123 MLU, Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Germany). Individuals at the age of 3 months (n =8), 12 months (n = 8), and 22 months (n = 6) were anaesthetized with 150 mg/kg bodyweight Narcoren (Merial, France). In deep narcosis, animals were killed by exsanguination and tails were removed. Tendons of the same diameter were prepared from the ventral bundles of the skinned tails.

Incubation of Tendons. Tendons at the age of 3 months were incubated separately in 1.5 mL of phosphate buffered saline (PBS, 10 mM phosphate, 150 mM sodium chloride, pH 7.4) containing methylglyoxal (0.2 mM) and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA, 1 mM) under deaerated conditions at 37 °C in an incubator shaker (New Brunswick Scientific, New Jersey) for 1-7 days. A control was incubated in PBS under the same conditions. Six tendons were incubated for each time point. Afterward, tendons were washed three times with PBS and kept at -20 °C until analyses.

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00937 J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 3957–3965

Article

Journal of Agricultural and Food Chemistry

T

able	1.1	LC-	ESI-	MS	MS	P	arameters	for	AGE	Measurement	ŝ
aute			LOI	1110/	1110		arameters	101	TIOL	in cubui cincinc	9

		precurs	or ion	pr	oduct ion	1 ^{<i>a</i>}	pro	oduct ion 2	b	pro	oduct ion 3	Ь
analyte	retention time	m/z	DP ^c	m/z	CEd	CXP ^e	m/z	CE	CXP	m/z	CE	CXP
	[min]		[V]		[eV]	[V]		[eV]	[V]		[eV]	[V]
CML	11.6	205.1	42	<mark>84</mark> .1	30	14	130.2	17	9	56.1	59	9
GALA	12.2	205.2	40	142.1	20	11	84.1	36	14	56.2	64	8
N ⁶ -lactoyl lysine	16.0	219.2	40	156.2	20	8	84.1	35	9	173.1	17	8
CEL	17.1	219.1	54	84.1	33	7	130.1	18	11	56.1	59	8
THP	18.6	319.2	52	70.2	66	11	116.3	36	9	186.4	33	10
G-H3	19.5	215.1	48	100.1	20	8	70.1	38	11	116.2	20	10
СМА	19.8	233.1	55	70.1	43	12	116.1	23	8	118.2	22	6
MG-H3	24.2	229.2	45	114.2	21	9	70.2	45	11	116.1	21	9
CEA	24.4	247.1	51	70.2	48	11	116.2	25	10	132.1	24	10
MG-H1	24.4	229.2	55	166.2	23	12	70.1	43	12	116.1	21	9
LNL	27.4	276.1	70	84.1	44	14	130.1	27	11	213.2	27	16
GOLD	28.6	327.2	60	84.1	51	13	282.3	31	14	198.1	28	14
glucosepane	28.8	429.3	15	384.5	41	19	269.2	55	20	339.2	55	20
GOLA	28.8	333.2	45	84.3	54	13	169.1	26	12	130.2	32	9
DODIC	29.3	447.4	45	301.3	33	16	402.5	42	20	357.2	53	18
MOLD	29.7	341.3	45	296.3	33	18	84.2	52	14	212.3	31	17
MOLA	29.8	347.5	80	84.1	58	7	173.2	31	10	130.2	37	12
GODIC	30.3	343.3	20	298.4	32	7	183.2	44	13	70.2	74	11
argpyrimidine	31.0	255.3	50	70.2	44	12	140.0	24	10	192.1	28	13
MODIC	31.3	357.3	25	197.4	45	14	312.2	35	7	267.3	45	15
pentosidine	31.7	379.2	20	187.3	47	16	316.3	36	8	84.2	59	14
^{<i>a</i>} MRM transition us ^{<i>e</i>} Cell exit potential.	sed for quantitation	n (quantifi	er). ^b MR	M transitio	n used fo	r confirma	tion (quali	fier). ^c De	clustering	potential.	^d Collision	1 energy

Tail Tendon Breaking Time Assay. Measurement of tail tendon breaking time (TTBT) of incubated tendons (3 months old) and native tendons of different age (3, 12, and 22 months) was performed as described by Harrison and Archer.²⁶ Two centimeters of each tendon were fixated with surgical thread at both ends with a slipknot and a weight of 2.746 g. The tendons were immersed in a urea solution (7.0 M urea, 4.3 mM potassium dihydrogen phosphate, 1.4 mM sodium tetraborate, pH 7.5) held at a constant temperature of 40 °C. Time counting was stopped automatically when the tendon broke. TTBT of six tendons per individual were measured for both incubated and native tendons, respectively.

Preparation and Solubilization of Collagen. Tendons were washed with purified water three times and then cut into small pieces. In 2 mL tubes filled with 500 μ L of water, tendons were minced with a zirconium oxide grinding ball (5 mm in diameter) in a mixer mill (MM400, Retsch, Germany) at 30 Hz for 30 min. After lyophilization, 3 mg of tendon were solubilized in 1.2 mL of diluted acetic acid (20 mM) at 37 °C and 1000 rpm for 30 min (Thermomixer compact, Eppendorf, Germany) to give a collagen solution.

SDS-PAGE. 100 μ L of above collagen solution were predigested with 25 units of pepsin at 37 °C for 1 h. The reaction was stopped by adding 100 μ L of SDS solution (160 mM TRIS, 4% (w/v) SDS) and 100 μ L of nonreducing Laemmli buffer (125 mM TRIS, 20% (w/v) glycerin, 5% (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 0.05% (w/v) bromophenol blue). 20 μ L of this solution (20 μ g of protein) were analyzed by denaturing polyacrylamide electrophoresis using discontinuous acrylamide gels (resolving gel, T = 6%, C = 3.3%; stacking gel, T = 5%). Protein bands were visualized with colloidal Coomassie staining overnight as described by Dyballa.²⁷

Acid Hydrolysis. 400 μ L of above collagen solution were evaporated to dryness by vacuum centrifugation (Savant Speed Vac Concentrator, Thermo Scientific, Germany). 200 μ L of sodium borohydride (8 mg/mL) in sodium hydroxide (0.01 mM) were added and incubated at room temperature for 1 h. The solution was evaporated to dryness again. After addition of 800 μ L of hydrochloric acid (6.0 M), the head space was purged with argon and the reaction tube was sealed and kept in a drying oven at 110 °C for 20 h.

Hydrochloric acid was removed by vacuum centrifugation. The dry residue was taken up in 492 μ L of diluted hydrochloric acid (0.05 mM) and filtered through a centrifugal tube filter (Costar Spin-X, 0.45 μ m, cellulose acetate, Corning Inc., New York).

Enzymatic Hydrolysis. To 500 μ L of above collagen solution, 25 units of pepsin were added and incubated at 37 °C for 24 h. The solution was evaporated to dryness by vacuum centrifugation. The residue was taken up in 480 μ L of TRIS acetate buffer (TA, 100 mM TRIS, 5 mM calcium chloride, pH 7.4). Stepwise, the following proteases were added every 24 h: 10.0 units of collagenase, again 10.0 units of collagenase, 0.3 units of Pronase E, again 0.3 units of Pronase E, 1.0 unit of leucine aminopeptidase (LAP), and 0.95 units of carboxypeptidase Y. The samples were incubated in an incubator shaker at 37 °C. A small crystal of thymol was added with the first digestion step in TA. After the last digestion step, solutions were filtered through a molecular weight cutoff membrane (MWCO 3000 centrifugal filters, VWR International, Germany). Efficiency of the enzymatic hydrolysis for each sample was compared to the acid hydrolysis by LC-MS/MS analysis of the acid-stable modification N⁶carboxyethyl lysine (CEL).

Preparative Fractionation of Enzymatic Hydrolysates. 150 μ L of individual enzymatic hydrolysates were pooled for each age group. The pooled samples were separated by high-performance liquid chromatography (HPLC) on an analytical stainless steel column packed with RP-18 material (Vydac Protein & Peptide C18, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, Grace, Maryland). The HPLC system (Jasco, Germany) consisted of a pump (PU-2080 Plus) with a degasser (DG-2080-54) and a quaternary gradient mixer (LG-2080-04), a column oven (Jetstream II) and an autosampler (AS-2057 Plus). The mobile phase used was water (eluent A) and methanol with water (7:3, v/v, eluent B). 1.2 mL/L of heptafluorobutyric acid was added to both eluents (A and B) as ion pair reagent. Analyses were performed at a column temperature of 25 °C using a flow rate of 1.0 mL/min and gradient elution: 2% B (15 min isocratic), to 70% B (35 min), to 100% B (5 min), and hold (10 min). 100 μ L of pooled samples were repetitively injected, and eluate from 37 to 52 min was collected. Eight chromatographic runs were performed in total for each group. The

combined fraction were evaporated by vacuum centrifugation and freeze-dried. The amorphic material was dissolved in 80 μ L of water and analyzed by LC–MS/MS.

Ninhydrin Assay. The amino acid content of acid collagen hydrolysates was measured by the ninhydrin method of Smuda et al. with *L*-leucine as the reference standard.²⁸ After derivatization, absorption of the diluted samples and a standard curve was determined at 566 nm with a microplate reader (infinite M200, Tecan, Switzerland) using 96-well plates.

HPLC-MS/MS Analysis. The high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Jasco, Germany) consisted of a pump (PU-2080 Plus) with a degasser (DG-2080-02) and a quaternary gradient mixer (LG-2080-04), a column oven (Jetstream II), and an autosampler (AS-2057 Plus). Mass spectrometric detection was conducted on an API 4000 QTrap LC-MS/MS system (Applied Biosystems/AB Sciex, Germany) equipped with a turbo ion spray source using electrospray ionization in positive ion mode: ion spray voltage of 2.5 kV, nebulizing gas pressure of 70 psi, heating gas pressure of 80 psi at 650 °C, and curtain gas pressure of 30 psi. Chromatographic separations were performed on a stainless steel column packed with RP-18 material (Xselect HSS T3, 250 mm \times 3.0 mm, 5 μ m, Waters, Massachusetts) using a flow rate of 0.7 mL/min. The mobile phase used was water (eluent A) and methanol with water (7:3, v/v, eluent B). 1.2 mL/L of heptafluorobutyric acid were added to both eluents (A and B) as ion pair reagent. Analyses were performed at a column temperature of 25 °C using gradient elution: 2% B (2 min) to 14% B (10 min) to 87% B (22 min) to 100% B (0.5 min) and hold (7 min). For mass spectrometric detection, the scheduled multiple-reaction monitoring (sMRM) mode was used, utilizing collision-induced dissociation (CID) of the protonated molecules with compound specific orifice potentials and fragment specific collision energies (Table 1). Appropriate dilutions of the samples were injected dependent on analyte concentration and matrix interference. Quantitation was based on the standard addition method. More precisely, increasing concentrations of authentic reference compounds at factors of 0.5, 1, and 2 times the concentration of the compounds in the sample were added to separate aliquots of the sample. The aliquots were analyzed, and a regression of response versus concentration was used to determine the concentration of the analyte in the sample. Calibration with this method resolves potential matrix interference.

High-Resolution Mass Determination (HR-MS). Positive and negative ion high-resolution ESI mass spectra were obtained from an Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermofisher Scientific, Germany) equipped with an HESI electrospray ion source (spray voltage 4 kV; capillary temperature 275 °C, source heater temperature 40 °C; FTMS resolution >30 000). Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. The sample solutions were introduced continuously via a 500 μ L Hamilton syringe pump with a flow rate of 5 μ L/min. The data were evaluated by the Xcalibur software 2.7 SP1.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). NMR spectra were recorded on a VXR 400 spectrometer (Varian, California) operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C or on a Unity Inova 500 instrument (Varian, California) operating at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C, respectively. Tetramethylsilane was used as a reference for calibrating the chemical shift.

Statistical Analysis. Statistical significance between two adjacent groups was examined using Fisher's test (*F*-test) with a probability value of 95%. All significance tests were performed by two-sample Student's *t*-test or Welch's *t*-test, respectively, with a probability value of at least 95%. Limits of detection (LOD, $3 \times S/N$) and limits of quantitation (LOQ, $10 \times S/N$) for each analyte were estimated according to signal/noise ratio (S/N) and are given in Table 2.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of MOLA. The present paper aimed to investigate the impact of nonenzymatic protein modification on the physical properties of collagen. Therefore, the formation of Maillard endproducts leading to intra- and intermolecular

Table 2. Limits of Detection (LOD) and Limits of Quantitation (LOQ) for AGEs and Lysinonorleucine (LNL) in Tendon Collagen

	[µmol/mol leu-eq]					
analytes	LOD	LOQ				
CEL	1.4	3.6				
N ⁶ -lactoyl lysine	0.12	0.86				
MG-H1	10	13				
MG-H3	0.14	0.23				
CEA	5.2	10.3				
THP	10	35				
argpyrimidine	0.03	0.06				
CML	1.1	3.6				
GALA	0.7	2.2				
СМА	3.5	7.3				
G-H3	5	12				
glucosepane	0.21	0.52				
DODIC	0.04	0.19				
MODIC	0.005	0.016				
MOLA	0.10	0.21				
LNL	6	10				

cross-linking was a particular focus. Interestingly, for the MGOderived cross-link structures MOLD (methylglyoxal lysine dimer) and MODIC (methylglyoxal-derived imidazoline cross-link), there are also homologous compounds GOLD² and GODIC¹⁷ derived from glyoxal (GO). Consequently, a counterpart for the GO-amide cross-link GOLA, which was first described by Glomb and Pfahler¹⁹ in 2001, should be two lysine molecules linked by MGO via an amine and an amide bond, respectively. However, this hypothetical structure has not been described in the literature so far, although Thornalley had already suggested the compound as a "putative crosslink" in 1994. 30 We thus synthesized the novel AGE cross-link mainly according to the synthetic route for GOLA by Glomb and Pfahler using a carbodiimide catalyzed coupling strategy of protected lysine derivatives. The final authentic reference material as well as all intermediates were confirmed by one- and two-dimensional NMR experiments (1H, 13C, H,H-COSY, HSQC, HMBC) and by accurate mass determination. In analogy to GOLA, we named the new compound MOLA for methylglyoxal lysine amide. To date, GOLA and MOLA are the only known glycation cross-links with an amide bond.

Preparation and Solubilization of Tail Tendon Collagen. Rat tail tendons are highly hierarchical constructs consisting of almost exclusively type I collagen. A tendon is built of fiber bundles, whereas fibers are composed of many fibrils. A fibril is formed from single collagen molecules, called tropocollagen, which consist of three polypeptide chains forming a triple helix (~3000 amino acids) with short nonhelical ends, called telopeptides. A high content of glycine (33%), proline (12%), alanine (12%) and 4-hydroxyproline (11%) is characteristic for type I collagen and allows very tight packing of helices and stabilization via hydrogen bonds.³¹ Final mechanical and chemical stability results from enzymatic crosslinking of collagen molecules. Especially the explicit water insolubility required the development of an optimized protein workup protocol. To achieve solubility, tendons were first cut into small pieces and minced in a mixer mill to disrupt the fibrillar packing. A fluffy and weighable material resulted after lyophilization. As a result, the processed collagen was then soluble in diluted acetic acid (0.1%, pH 3.5, 37 °C, 30 min).

Importantly, neither collagen nor amide AGEs were hydrolyzed under these conditions. The protein solution was then aliquoted for both acid and enzymatic hydrolyses. For acid hydrolysis, a reduction step with sodium borohydride converted dehydrolysinonorleucine into the stabile lysinonorleucine (LNL) and avoided CML artifact formation from the Amadori product. Enzymatic hydrolysis was carried out for 7 days at 37 °C by adding fresh proteases every 24 h. Pepsin (25 U) was used in the first digestion step to generate smaller-weight soluble peptides. Collagenase was added (20 U) for the next 48 h to further breakup the collagen peptide structure. The clear solution was then subjected to the standard digestion protocol published by our working group.²⁸ The complete procedure led to an average hydrolysis efficiency of 73%, which is comparable to values obtained for soluble proteins (e.g., bovine serum albumin).

MOLA in ex Vivo Tendon Incubations. After identifying MOLA in a simple model system comprising of N^2 -*t*-Boc-lysine and MGO (data not shown), we investigated AGE formation by MGO in an ex vivo system of 3 months old rat tail tendons. Tendons were incubated under physiological, deaerated conditions over a period of 7 days. Formation of MGO-derived AGEs is shown in Figure 1. As expected, the quantitative



Figure 1. AGE formation in rat tail tendons (3 months) incubated with methylglyoxal (200 μ M).

important structures were MG-H1 and N7-carboxyethyl arginine (CEA). Condensation with the N^5 -guanidino function of arginine residues has been reported to be a dominating reaction pathway of MGO.⁶ In the first step, MGO condenses with the guanidino group to give the short-lived N5-endocyclic dihydroxyimidazolidine. After elimination of water, MG-H3 is formed, which is the kinetically controlled product. Hydrolysis converts to the open-chained intermediate CEA to form the thermodynamically controlled N7-exocyclic MG-H1.15 This reaction course was reflected by the tendon model. The levels of both MG-H1 and CEA were about 30 times higher than that of MG-H3. THP and to a much lesser extend argpyrimidine are secondary products resulting from the reaction of MG-H3 with another molecule of MGO indicating an excess of MGO in our system. All other structures were found at concentrations 1000

Article

times lower than the hydroimidazolones underlining that arginine guanidino functions are the preferred glycation sites in collagen. In the α_1 -chain of collagen type I with a total number of 1052 amino acids, there are 52 arginine and 35 lysine residues³¹ explaining the higher capacity of arginine over lysine binding sites. CEL was the dominant lysine modification which is formed nonoxidatively via isomerization from the Schiff base of the keto group of MGO and the N6-amino function of lysine (Figure 2). Interestingly, in contrast to all other MGO-derived AGEs, native tendons already contained CEL (0 days, 1.5 µmol/mol leucine-equivalents). The lysinearginine cross-link MODIC was formed at the same concentration levels as CEL until 3 days. After that, CEL formation slowed down, while MODIC formation proceeded to increase linearly. N^6 -lactoyl lysine is the amide analogue of CEL formed from the Schiff base adduct of the aldehyde group of MGO. Thus, formation of CEL and Nº-lactoyl lysine is competitive and driven by the reactivity and availability of the respective carbonyl moiety. In our experiment, CEL levels were constantly about 10 times higher. This ratio can be explained by the initial step of Schiff base formation. In line with the carbonyl reactivity, free MGO (<1%) is in equilibrium with its mono- (56%) and dihydrate (44%) in aqueous solution.³ Thus, the monohydrate form showing a free keto group is much more available for nucleophilic attack than the aldehyde group of free MGO. Based on the isomerization mechanism leading to N⁶-lactoyl lysine, we postulate the formation of MOLA. After formation of the hemiaminal at the aldehyde group, a second lysine residue attacks the free keto group and rearrangement leads to MOLA. Indeed, MOLA formation proceeded in parallel to that of CEL and N^6 -lactoyl lysine in our system. MOLA levels were twice as high as N⁶-lactoyl lysine levels. In accordance with above overall amino acid content, arginine modification increased in a linear fashion indicating still free reaction sites while lysine modification slowed down after 3 days indicating limitations of formation, e.g., de novo synthesis of MODIC and CEL was almost the same until 3 days but diverted to 11 and 8 µmol/mol leucine-equivalents after 7 days, respectively. Comparison of MODIC and MOLA formation suggested that cross-linking in collagen is especially favored between lysine and arginine side chains in collagen due to sterical aspects. Gautieri et al. simulated possible crosslinking sites in collagen fibrils in silico and indeed identified 14 possible lysine-arginine pairs of which six were intra- and eight were intermolecular.

Mechanical Properties of Incubated and Aged Tendons. To evaluate the effect of MGO-mediated glycation on the physical characteristics of collagen, one part of each incubated tendon was subjected to the tail tendon breaking time (TTBT) assay as described by Harrison and Archer. Accordingly, TTBT mainly depends on covalent cross-linking within the collagen fibrils. The results are shown in Figure 3 for the present tendon incubations. Increase of TTBT from 10 min for native tendons to 600 min after 7 days correlated with increasing AGE levels, especially of the cross-link structures MODIC and MOLA. Several prerequisites were chosen to ensure that ex vivo incubation conditions were at least related to conditions found during the natural aging process. Preliminary experiments confirmed that MGO-glycation cross-links are formed nonoxidatively. Furthermore, reactive oxygen species like hydrogen peroxide lead to collagen crosslinking even in absence of glycation agents.⁴ For that reason, all incubation solutions were purged with helium to provide

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00937 J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 3957–3965



Figure 2. Postulated mechanism for the formation of MOLA according to the CEL and N⁶-lactoyl lysine reaction cascade.¹



Figure 3. Tail tendon breaking time of rat tail tendons (3 months) incubated with methylglyoxal (200 μ M).

strictly deaerated conditions. Second, only freshly prepared MGO was used to avoid side reactions of contaminants in commercial MGO solutions like formaldehyde.¹⁵ Third, compared to literature a relatively low MGO concentration of 200 μ M was chosen.⁶ In relation to MGO levels of 2 μ M normally found in rat plasma, this is still very high but allowed to monitor TTBTs comparable to those found in vivo within the given incubation time frame. Test incubations with MGO concentrations of 1 mM and 10 mM resulted in extremely long or not measurable TTBTs. From a mechanistic point of view, high dicarbonyl levels will shift the AGE spectrum to structures that are unlikely to form under physiological conditions which are characterized by low carbonyl but high amine concen-

trations.^{17,18} In the case of MGO for arginine modifications, high amounts of THP and argpyrimidine and for lysine modifications specifically the cross-link structure MOLD would result. In the present ex vivo setup at 200 μ M MOLD was never detected. In parallel to the TTBT assay, gel electrophoresis of the glycated tendons was conducted (Figure 4). After predigestion with pepsin for 1 h, soluble polypeptide cleavage



Figure 4. SDS-PAGE of rat tail tendons (3 months) incubated with methylglyoxal (200 μ M) and native rat tail tendons of different ages.

3962

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00937 J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 3957–3965

fragments with a molecular weight of around 116 kDa and over 200 kDa increased with incubation time up to 5 days indicating a progress of covalent cross-linking. At 7 days these bands faded out, as the highly glycated collagen became less digestible and major portions could no longer enter the gel.

The TTBT assay was then performed on native tendons of different ages (3, 12, and 22 months, Figure 5). TTBT



Figure 5. Tail tendon breaking time of native rat tail tendons of different age.

increased from 10 min of young, to 80 min for adult, to 190 min for old individuals ($r = 0.986, P \le 0.001$). These findings clearly confirmed that cross-linking proceeds with age. However, in vivo enzymatic cross-linking of collagen occurs in parallel to nonenzymatic processes. In immature collagen, lysyl oxidase (LOX)-mediated cross-links are labile aldimines, ketoamines, or aldol condensation products. During maturation of collagen, these bivalent structures are slowly converted into tri- and tetravalent cross-links between the collagen fibrils." Interestingly, the total number of enzymatic cross-links remains constant over time due to a decreased LOX activity and a limited number of lysine residues in the telopeptide region. As a probe for these processes, we determined lysinonorleucine (LNL) after reduction in acidic hydrolysates. LNL is the reduced form of the immature aldimine cross-link dehydrolysinonorleucine. In compliance to literature, LNL decreased with age from 32 to 20 μ mol/mol leucine-equivalents (Table 3). In contrast to LOX-modified lysine residues located in the telopeptides, lysine side chains within the triple helix remain susceptible to glycation during aging leading to accumulation of nonenzymatic cross-link structures.² Consequently, AGE crosslinks will significantly contribute to the increased TTBT in aged tendons. SDS-PAGE of aged tendons revealed a similar crosslinking pattern as in MGO-glycated tendons (Figure 4), however, to a much lesser extent.

Quantitation of MOLA and Other AGEs in Vivo. To elucidate AGE candidates responsible for collagen cross-linking during aging, native rat tendons of different age were processed via the optimized workup protocol. Results of AGE quantitation are summarized in Table 3. In line with above ex vivo MGO-incubation, MG-H1 was the major modification in young, adult, and old tail tendon collagen. Similar findings were made in different extracellular matrix proteins.³⁵ In our study, MG-H1, CEA, and MG-H3 increased significantly with age totaling up to 34 μ mol/mol leucine-equivalents. The ratio between these structures reflected again the above-described mechanistic relationship as in the ex vivo incubations. Although CEA and the hydroimidazolones are no cross-linking structures, monovalent modification of arginine residues will change the isoelectric point of collagen molecules affecting physical

		age [months]	
analyte [µmol/mol leu-eq]	3	12	22
MGO-Derived			
CEL	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2	$1.8 \pm 0.1^{*}$
N ⁶ -lactoyl lysine	0.20 ± 0.03	$0.32 \pm 0.07^{**}$	$0.5 \pm 0.1^{*}$
MG-H1	19 ± 1	$21 \pm 2^{**}$	$25 \pm 1^{***}$
MG-H3	0.57 ± 0.04	0.65 ± 0.04**	0.75 ± 0.03***
CEA	7.2 ± 0.6	7.4 ± 0.5	$8.0 \pm 0.3^{*}$
GO-Derived			
CML	4.7 ± 0.5	6.9 ± 0.7**	$13 \pm 1^{**}$
GALA	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	$1.1 \pm 0.4^{*}$
CMA	3.1 ± 0.5	$6 \pm 1^{***}$	$8 \pm 1^{*}$
G-H3 ^b	21 ± 2	23 ± 2	21 ± 2
Glycation Cross-Li	nks ^c		
glucosepane	n. d.	<loq< td=""><td>0.72</td></loq<>	0.72
DODIC	n. d.	<loq< td=""><td>0.24</td></loq<>	0.24
MODIC	n. d.	<loq< td=""><td>0.04</td></loq<>	0.04
MOLA	n. d.	<loq< td=""><td>0.34</td></loq<>	0.34
Enzymatic Cross-Li	nk ^d		
LNL	32 ± 3	$22 \pm 1^{**}$	$20 \pm 2^{*}$

Table 3. AGE and Lysinonorleucine (LNL) Levels^a in Native

"AGE levels are given as mean values \pm standard deviation; statistical significance between adjacent groups: * $P \le 0.05$, ** $P \le 0.01$, *** $P \le 0.001$. bSum parameter for dihydroxyimidazolidine and carboxymethylarginine (CMA) after acid hydrolysis. CAfter preparative enrichment (n. d., not detectable). ^dAfter reduction and acid hydrolysis.

properties like molecular packing but also biological function.³⁴ The MGO-lysine modifications CEL and N⁶-lactoyl lysine were also identified in tendon collagen at lower concentrations up to 2.3 μ mol/mol leucine-equivalent with a low but still significant increase in old tendons. Unlike to ex vivo experiments, a wide array of other AGEs was detected due to the occurrence of many additional 1,2-dicarbonyls in vivo.³⁶ A major group were GO-derived lysine and arginine modifications. CML was the most prominent lysine modification reaching 13 µmol/mol leucine-equivalents due to its multiple formation pathways.¹ In addition to GO-isomerization reactions, the predominant pathway in vivo is the oxidative fragmentation of fructosyl lysine. In contrary, GALA is a GO-specific alternative lysine modification from the CML isomerization cascade. GALA was about 10 times lower than CML which is not according to the ratio found for the pendants N⁶-lactoyl lysine and CEL. CML levels were 7-fold higher than CEL in old individuals. This again reflects that major portions of CML must originate from other sources, specifically the Amadori product. N7-Carboxymethyl arginine (CMA) is a GO-specific arginine modification.²¹ In acidic tendon hydrolysates, imidazolinone G-H3 was quantitated to estimate the total amount of arginine-bound GO. G-H3 is formed from both CMA and the dihydroxyimidazolidine under the harshly acidic conditions used for total protein hydrolysis.²¹ Thus, G-H3 can be regarded as a sum parameter for both structures. Interestingly, CMA increased significantly with age while G-H3 remained unchanged. This suggests that (I) most glyoxal is bound as dihydroxyimidazolidine at young age and converts slowly into CMA over time and (II) that total

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00937 J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 3957–3965

Article

GO-arginine modification does not accumulate in collagen with age.

In the original workup of both acidic and enzymatic hydrolysates no AGE cross-link structures were identified. For that reason, enzymatic hydrolysates of each age group were pooled and repetitively fractionated by analytical HPLC on a quantitative basis. The 10-fold concentrated samples were analyzed again and four glycation cross-links were quantitated. Glucosepane was the dominant structure in old tendons with 0.72 µmol/mol leucine-equivalents which is in support of the literature.^{5,8} Considering the amino acid composition of type I collagen, this can be estimated as one glucosepane molecule per 600 collagen molecules. This lysine-arginine cross-link is formed from the Lederer's glucosone resulting from degradation of the Amadori product. Amounts of MOLA and DODIC were about half and one-third of glucosepane concentrations, respectively. Surprisingly, MODIC, which was the dominant structure in the ex vivo incubations, was only formed in traces. These findings indicate in line with the above-discussed conformational conditions in type I collagen that covalent cross-linking of lysine and arginine residues was obviously favored over lysine-lysine cross-linking. Second, cross-linking was mainly mediated by the Amadori product and its dicarbonyl follow-up structures Lederer's glucosone and 3deoxyglucosone. Nevertheless, MOLA was the only quantitatively relevant lysine-lysine cross-link derived from MGO found in old collagen. With a concentration of 0.34 μ mol/mol leucine-equivalents this calculates to approximately one MOLA molecule per 1200 collagen molecules. In comparison, levels found for CEL and MG-H1 correspond to one molecule per 250 and 20 collagen molecules, respectively. Other AGE crosslinks, more precisely GOLA, GOLD, GODIC, MOLD, and pentosidine were also analyzed but were not detected.

In conclusion, collagen is proceedingly modified by glycation during aging. For the first time, based on an optimized protein workup protocol rat tail tendons were comprehensively analyzed by LC–MS/MS for monovalent and cross-link modifications. MGO was verified as the major glycating agent leading up to 36 μ mol/mol leucine-equivalents of mainly arginine directed monovalent modifications. MOLA, a novel lysine—lysine amide cross-link derived from methylglyoxal, was established for the first time as a quantitatively relevant cross-linking structure in senescent collagen. Chemical cross-linking was also visualized by SDS-PAGE and correlated with increase in collagen stiffening measured as TTBT.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de. Phone: +49-345-5525 784. Fax: +49-345-5527 341.

ORCID 💿

Tobias Jost: 0000-0001-7871-1345

Marcus A. Glomb: 0000-0001-8826-0808

Funding

Funding was supported in part by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Germany) Research Training Group 2155, ProMoAge.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany, for recording NMR spectra and A. Laub from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle/Saale, Germany, for performing accurate mass determination.

ABBREVIATIONS USED

AGE, advanced glycation endproduct; CEA, N⁷-carboxyethyl arginine; CEL, N⁶-carboxyethyl lysine; CMA, N⁷-carboxymethyl arginine; CML, N⁶-carboxymethyl lysine; DODIC, 3-deoxy-glucosone-derived imidazoline cross-link; GALA, N⁶-glycoloyl lysine (glycolic acid lysine amide); G-H3, glyoxal hydroimidazolone; GODIC, glyoxal-derived imidazoline cross-link; GOLA, glyoxal lysine amide; GOLD, glyoxal lysine dimer; leueq, leucine-equivalents; LNL, lysinonorleucine; MG-H1/3, methylglyoxal hydroimidazolone 1/3; MGO, methylglyoxal; MODIC, methylglyoxal lysine amide; MOLD, methylglyoxal lysine dimer; MW, molecular weight; n. d., not detectable; PBS, phosphate buffered saline; THP, tetrahydropyrimidine; TTBT, tail tendon breaking time

REFERENCES

 Henning, C.; Glomb, M. A. Pathways of the Maillard Reaction under Physiological Conditions. *Glycoconjugate J.* 2016, 33, 499–512.
 Bailey, A. Molecular Mechanisms of Ageing in Connective Tissues. *Mech. Ageing Dev.* 2001, 122, 735–755.

(3) Gelse, K. Collagens - Structure, Function and Biosynthesis. Adv. Drug Delivery Rev. 2003, 55, 1531–1546.

(4) Monnier, V. M.; Glomb, M.; Elgawish, A.; Sell, D. R. The Mechanism of Collagen Crosslinking in Diabetes. A Puzzle Nearing Resolution, *Diabetes* **1996**, *45*, S67–S72.

(5) Monnier, V. M.; Mustata, G. T.; Biemel, K. L.; Reihl, O.; Lederer, M. O.; Zhenyu, D.; Sell, D. R. Crosslinking of the Extracellular Matrix by the Maillard Reaction in Aging and Diabetes. An Update on "A Puzzle Nearing Resolution", Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005, 1043, 533– 544.

(6) Fessel, G.; Li, Y.; Diederich, V.; Guizar-Sicairos, M.; Schneider, P.; Sell, D. R.; Monnier, V. M.; Snedeker, J. G.; Screen; Hazel, R. C. Advanced Glycation Endproducts Reduce Collagen Molecular Sliding to Affect Collagen Fibril Damage Mechanisms but Not Stiffness. *PLoS One* **2014**, *9*, e110948.

(7) Skovgaard, D.; Svensson, R. B.; Scheijen, J.; Eliasson, P.; Mogensen, P.; Hag, A. M. F.; Kjaer, M.; Schalkwijk, C. G.; Schjerling, P.; Magnusson, S. P.; Couppe, C. An Advanced Glycation Endproduct (AGE)-Rich Diet Promotes Accumulation of AGEs in Achilles Tendon. *Physiol. Rep.* **2017**, *5*, e13215.

(8) Sell, D. R.; Biemel, K. M.; Reihl, O.; Lederer, M. O.; Strauch, C. M.; Monnier, V. M. Glucosepane is a Major Protein Crosslink of the Senescent Human Extracellular Matrix. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 12310–12315.

(9) Thornalley, P. J. Pharmacology of Methylglyoxal: Formation, Modification of Proteins and Nucleic Acids, and Enzymatic Detoxification. *Gen. Pharmacol.* **1996**, *27*, 565–573.

(10) Kalapos, M. P. Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2013**, *99*, 260–271.

(11) Nagaraj, R. H.; Sarkar, P.; Mally, A.; Biemel, K. M.; Lederer, M. O.; Padayatti, P. S. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 110–119.

(12) Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids* **2012**, *42*, 1133–1142.

3964

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00937 J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 3957–3965

(13) Ahmed, M. U.; Frye, E. B.; Degenhardt, T. P.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. N^e-Carboxyethyl Lysine, a Product of the Chemical Modification of Proteins by Methylglyoxal, Increases with Age in Human Lens Proteins. *Biochem. J.* **1997**, 324, 565–570.

(14) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-deoxy-Derythro-hexo-2,3-diulose in the presence of lysine leads to formation of carboxylic acid amides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6458–6464.

(15) Klöpfer, A.; Spanneberg, R.; Glomb, M. A. Formation of Arginine Modifications in a Model System of N^{α} -tert-Butoxycarbonyl (Boc)-Arginine with Methylglyoxal. J. Agric. Food Chem. **2011**, 59, 394–401.

(16) Nagaraj, R. H.; Shipanova, I. N.; Faust, F. M. Protein Crosslinking by the Maillard Reaction: Isolation, Characterization and *in vivo* Detection of a Lysine-Lysine Crosslink Derived from Methylglyoxal. J. Biol. Chem. **1996**, 271, 19338–19345.

(17) Lederer, M. O.; Klaiber, R. G. Crosslinking of Proteins by Maillard Processes. Characterization and Detection of Lysine-Arginine Crosslinks Derived from Glyoxal and Methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2499–2507.

(18) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of Protein Modification by Glyoxal and Glycolaldehyde, Reactive Intermediates of the Maillard Reaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 10017–10026.

(19) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars. J. Biol. Chem. 2001, 276, 41638–41647.

(20) Odani, H.; Iijima, K.; Nakata, M.; Miyata, S.; Yasuda, Y.; Irie, S.; Maeda, K.; Fujimoto, D. Identification of N^o-Carboxymethyl Arginine, as a new Advanced Glycation Endproduct in Serum Proteins of Diabetic Patients. *Int. Congr. Ser.* **2002**, *1245*, 295–301.

(21) Glomb, M. A.; Lang, G. Isolation and Characterization of Glyoxal–Arginine Modifications. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 1493–1501.

(22) Shipanova, I. N.; Glomb, M. A.; Nagaraj, R. H. Protein Modification by Methylglyoxal. Chemical Nature and Synthetic Mechanism of a Major Fluorescent Adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 344, 29–36.

(23) Lederer, M. O.; Bühler, H. P. Crosslinking of Proteins by Maillard Processes. Characterization and Detection of a Lysine-Arginine Crosslink Derived from D-Glucose. *Bioorg. Med. Chem.* 1999, 7, 1081–1088.

(24) Biemel, K. M.; Reihl, O.; Conrad, J.; Lederer, M. O. Formation Pathways for Lysine-Arginine Crosslinks Derived from Hexoses and Pentoses by Maillard Processes. Unraveling the Structure of a Pentosidine Precursor. J. Biol. Chem. 2001, 276, 23405–23412.

(25) Strazzolini, P.; Melloni, T.; Giumanini, A. G. Selective Nitrolytic Deprotection of N-Boc-Amines and N-Boc-Amino Acids Derivatives. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9033–9043.

(26) Harrison, D. E.; Archer, J. R. Measurement of Changes in Mouse Tail Collagen with Age. Temperature dependence and procedural details. *Exp. Gerontol.* **1978**, *13*, 75–82.

(27) Dyballa, N.; Metzger, S. Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels. *J. Visualized Exp.* **2009**, DOI: 10.3791/1431.

(28) Smuda, M.; Henning, C.; Raghavan, C. T.; Johar, K.; Vasavada, A. R.; Nagaraj, R. H.; Glomb, M. A. Comprehensive Analysis of Maillard Protein Modifications in Human Lenses: Effect of Age and Cataract. *Biochemistry* **2015**, *54*, 2500–2507.

(29) Chellan, P.; Nagaraj, R. H. Protein Crosslinking by the Maillard Reaction and diabetes. Dicarbonyl-derived Imidazolium Crosslinks in Aging. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *368*, 98–104.

(30) Thornalley, P. J.; Westwood, M. E.; McLellan, A. C.; Lo, T. W. Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiological Conditions. *J. Biol. Chem.* **1994**, *51*, 32299–32305.

(31) Hulmes, D. J.; Miller, A.; Parry, D. A.; Piez, K. A.; Woodhead-Galloway, J. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. Mol. Biol.* **1973**, *79*, 137–148.

(32) McLellan, A. C.; Thornalley, P. J. Synthesis and Chromatography of 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzene, 6,7-Dimethoxy-2-methylquinoxaline and 6,7-Dimethoxy-2,3-dimethylquinoxaline for Use in a

3965

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00937 J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 3957–3965

Reprinted with permission from Jost T., Zipprich A., Glomb M. A. Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Rat Tail Collagen and Correlation to Tendon Stiffening. *J. Agric. Food Chem.* 2018, *66*, 3957–3965. Copyright 2018 American Chemical Society.

Liquid Chromatographic Fluorimetric Assay of Methylglyoxal. Anal. Chim. Acta 1992, 263, 137-142.

(33) Gautieri, A.; Redaelli, A.; Buehler, M. J.; Vesentini, S. Age- and Diabetes-related Non-enzymatic Crosslinks in Collagen Fibrils: Candidate Amino Acids Involved in Advanced Glycation Endproducts. *Matrix Biol.* **2014**, *34*, 89–95.

(34) Avery, N. C.; Bailey, A. J. The Effects of the Maillard Reaction on the Physical Properties and Cell Interactions of Collagen, *Pathol. Biol.* **2006**, *54*, 387–395.

(35) Ahmed, N.; Thornalley, P. J.; Dawczynski, J.; Franke, S.; Strobel, J.; Stein, G.; Haik, G. M. Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolone Advanced Glycation End-Products of Human Lens Proteins, *Invest. Ophthalmol. Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2003**, *44*, 5287–5292.

(36) Henning, C.; Liehr, K.; Girndt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Extending the Spectrum of α -Dicarbonyl Compounds *in vivo*. J. Biol. Chem. **2014**, 289, 28676–28688.

PUBLIKATION B

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Scite This: J. Agric. Food Chem. 2019, 67, 3046-3054



Efficient Analysis of 2-Acetyl-1-pyrroline in Foods Using a Novel Derivatization Strategy and LC-MS/MS

Tobias Jost,[®] Thomas Heymann, and Marcus A. Glomb^{*®}

Institute of Chemistry—Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Strasse 2, D-06120 Halle/Saale, Germany

(5) Supporting Information

ABSTRACT: 2-Acetyl-1-pyrroline (2-AP) is a key odorant in many foods, such as aromatic rice and wheat bread, with a very low odor threshold of 0.05 μ g/L in water. The small molecule with a popcornlike, roasty odor is generated biologically or by Strecker degradation within the Maillard-reaction cascades during thermal food processing with methylglyoxal and 1-pyrroline as the main direct precursors. Numerous gas-chromatographic methods for the analysis of 2-AP have been published, but the reactivity of the compound leads to discrimination or degradation during sample workup. We developed a novel derivatization method for 2-AP with o-phenylenediamine followed by HPLC-MS/MS analysis of the resulting stable quinoxaline. The precision (7%), repeatability (14%), recovery (92%), linearity (0.79-500 µg/kg), limit of detection (LOD, 0.26 µg/kg), and limit of quantitation (LOQ, 0.79 μ g/kg) were validated for rice matrix and were excellent as compared with those of methods published before. With the novel method, 2-AP levels in typical foods like aromatic rice (131 μ g/kg), wheat bread (18 μ g/kg), brown bread (18 μ g/kg), rye bread (18 μ g/kg), and popcorn (38 μ g/kg) were determined.

KEYWORDS: 2-acetyl-1-pyrroline, Maillard reaction, methylglyoxal, o-phenylenediamine, aromatic rice, popcorn, bread crust

INTRODUCTION

2-Acetyl-1-pyrroline (2-AP) is a prominent aroma compound in many foods, such as aromatic rice, popcorn, and white bread. It is characterized by its pleasant popcornlike, roasty smell and its very-low odor threshold of 0.05 μ g/L in water.¹ 2-AP can be formed in two ways: (I) biosynthetically in the metabolic pathways of several plants, such as Basmati rice, bread flower (Vallaris glabra), or pandan (Pandanus amaryllifolius), or (II) nonenzymatically in the Maillard reaction during thermal food processing (baking, frying, or roasting).^{2,3} In the latter, the reactive 1,2-dicarbonyl compound methylglyoxal (MGO) was identified as one precursor of 2-AP. In addition to Maillard processes, MGO is primarily generated from triosephosphates by enzymatic and spontaneous phosphate elimination during glycolysis in plant and yeast metabolism.⁴ Second, the free amino acids proline and ornithine are converted via Strecker degradation into 1pyrroline, which reacts with MGO to give 2-AP (Figure 1).5,6 The formation and contents of 2-AP in foods were thoroughly investigated by Schieberle and co-workers in the 1980s and 1990s. Extensive and time-consuming methods like simultaneous distillation-extraction and solvent-assisted flavor evaporation from kilograms of rice and bread crusts were used for 2-AP analyses. Today, numerous gas-chromatographic methods have been reported utilizing few rice kernels to reach detection limits of only a few micrograms per kilogram.² Most of these methods use headspace techniques combined with solid-phase microextraction and mass-spectrometric detection (HS-SPME-GC-MS). To avoid discrimination of 2-AP by the SPME fiber material or equilibration conditions (temperature, time, pH) an internal standard must be used. In general, isotopically labeled standards (e.g., multiple-D- or ¹³Clabeled 2-AP) are used for quantitation in stable-isotope-

dilution assays (SIDA). Many synthetic routes for unlabeled and labeled 2-AP are described in literature.^{8,10-15} At the same time, authors reported that free 2-AP is not stable over time. This means, that not only is the instability of the synthetic standard during storage one crucial problem for quantitation, but the anticipated degradation of the analyte during sample workup is as well. Thus, for analysis of 2-AP as a highly important Maillard-reaction flavor product in various foods, we developed a novel analytical method where 2-AP is first derivatized with o-phenylenediamine into the corresponding stable quinoxaline, 2-APQ, and subsequently analyzed by HPLC-MS/MS using D4-labeled 2-APQ as an internal standard. The novel quinoxaline structure was unequivocally characterized, and the analytical method was thoroughly validated. Finally, 2-AP was quantitated in foods containing high amounts of this compound (aromatic rice, popcorn, and different bread types).

MATERIAL AND METHODS

Chemicals. Chemicals of the highest quality available were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen/Steinheim, Germany) and Carl Roth AG (Karlsruhe, Germany) unless otherwise indicated. Deuterated o-phenylenediamine (OPD- d_4) was purchased from Biozol GmbH (Eching, Germany).

Synthesis of 2-Acetyl-1-pyrroline Quinoxaline (2-APQ). The basic synthetic route of 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) was adapted with modifications from Grimm et al. 14 Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany). Visualization of the separated material was achieved with ninhydrin

Received: January 10, 2019 Revised: February 20, 2019 Accepted: February 21, 2019 Published: February 27, 2019



3046



Figure 1. Formation of 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) by Maillard reactions and derivatization with *o*-phenylenediamine (OPD).

(2% ninhydrin with 5% acetic acid in *n*-butanol, w/v/v). Preparative column chromatography was performed on silica gel 60 (0.06–0.20 mm, Merck).

N-(*t*-Buty/loxycarbony/)-*t*-proline (2). Compound 2 was synthesized according to Majumdar et al.:¹⁶ 2.1 g (9.62 mmol) of di-*t*-butyl dicarbonate was added dropwise to a mixture of 1.0 g (8.68 mmol) of *L*-proline (1) and 350 mg (1.74 mmol) of protic ionic liquid (1methylimidazole and trifluoroacetic acid, 1:1). The mixture was stirred at 70 °C under reflux for 1 h. Water (10 mL) was added, and the solution was extracted three times with 15 mL of ethyl acetate. Organic layers were combined and dried over sodium sulfate. Solvent was evaporated under reduced pressure to yield 2 as a white powder (1.7 g, 91%).

 13 C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 176.7/176.4, 156.3/155.9, 81.4/81.2, 60.5/60.1, 47.8/47.4, 31.8/31.0, 28.7/28.6, 25.2/24.6.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 4.27–4.16 (m, 1H), 3.52–3.36 (m, 2H), 2.34–2.18 (m, 1H), 2.04–1.83 (m, 3H), 1.46/1.42 (s, 9H).

N-(t-Butyloxycarbonyl)-L-proline N'-Methoxy-N'-methylamide (3). Compound 2 (500 mg, 2.32 mmol) was dissolved in 10 mL of absolute tetrahydrofuran. 1,1'-Carbonyldiimidazole (400 mg. 2.47 mmol) was added, and the solution was stirred for 1 h. Subsequently, 230 mg (2.36 mmol) of N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride Article

and 400 μ L of triethylamine were added, and the mixture was stirred overnight. Water (10 mL) was added, and the solution was extracted three times with 10 mL of ethyl acetate. Organic layers were combined and washed with solutions of hydrochloric acid (1.0 M), sodium bicarbonate (5%, w/v), and sodium sulfate (10%, w/v). The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated under reduced pressure. The resulting residue was subjected to column chromatography (silica gel; *n*-hexane/acetone, 2:1, v/v). Fractions with R_f values of 0.29 (TLC, same solvent) were combined. Solvents were evaporated to yield 3 as a pale-yellow liquid (441 mg, 74%).

 ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 175.5, 156.2/155.8, 81.4/81.1, 62.1/61.8, 58.4/58.1, 48.1/47.8, 32.7/32.6, 31.5/ 30.7, 28.8/28.7, 25.1/24.4.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 4.70–4.64 (m, 1H), 3.80/3.77 (s, 3H), 3.54–3.39 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 2.37–2.14 (m, 1H), 2.02–1.80 (m, 3H), 1.46/1.41 (s, 9H).

N-(*t*-Butyloxycarbonyl)-2-acetylpyrrolidine (**4**). Compound **3** (358 mg, 1.39 mmol) was dissolved in 20 mL of absolute diethyl ether. The solution was stirred under an argon atmosphere and cooled down to 0 °C; 600 μ L (1.80 mmol) of methyl magnesium bromide (3.0 M in diethyl ether) was added dropwise, and stirring was continued on ice for 1 h. The reaction was stopped by addition of 20 mL of ammonium chloride solution (10%, w/v). The reaction mixture was extracted twice with 20 mL of diethyl ether. Organic layers were combined and washed as described for 3. The organic phase was dried over sodium sulfate and evaporated under reduced pressure. The resulting residue was subjected to column chromatography (silica gel; *n*-hexane/acetone, 4:1, v/v). Fractions with *R*_f values of 0.37 (TLC, same solvent) were combined, and solvents were evaporated to yield **4** as a colorless liquid (240 mg, 81%).

 $^{13}\mathrm{C}$ NMR (125 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 210.1/209.9, 156.4/155.8, 81.5/81.3, 66.9/66.7, 48.1/47.8, 30.6/29.8, 28.7/28.6, 26.2, 25.3/24.5.

 $^1\mathrm{H}$ NMR (500 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 4.36–4.27 (m, 1H), 3.50–3.41 (m, 2H), 2.31–2.16 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.94–1.80 (m, 3H), 1.46/1.40 (s, 9H).

2-Acetylpyrrolidine Hydrochloride (5). Compound 4 (192 mg, 0.90 mmol) was dissolved in 2 mL of THF, and 2 mL of hydrochloric acid (6.0 M) was added. The reaction was monitored by TLC (*n*-butanol/water/acetic acid/pyridine, 4:2:3:3, v/v/v/v, $R_f = 0.24$). Solvents were removed under reduced pressure. The product was taken up in water and freeze-dried to yield 5 as a colorless, amorphic material (133 mg, 98%).

 $^{13}{\rm C}$ NMR (125 MHz, D2O) δ [ppm] = 205.2, 66.4, 46.4, 27.7, 26.0, 23.7.

¹H NMR (500 MHz, D_2O) δ [ppm] = 4.65–4.58 (m, 1H), 3.40–3.32 (m, 2H), 2.57–2.46 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.11–1.91 (m, 3H).

2-Acetyl-1-pyrroline (2-AP, 6). Compound 5 (75 mg, 0.50 mmol) was dissolved in 10 mL of water, and the pH was adjusted to 7.4 with sodium bicarbonate solution (5%, w/v). The color of the solution turned from pale yellow to deep yellow. The solution was stirred in air at room temperature for 30 min, and the color turned orange. The aqueous solution was extracted five times with 50 mL of diethyl ether. The organic layers were combined, dried over sodium sulfate, and removed under reduced pressure at 30 °C. Compound 6 was obtained as a clear, pale-yellow liquid (17 mg, 30%). Its identity and purity were checked by GC-MS ($t_{\rm R}$ = 9.66 min) and GC-FID ($t_{\rm R}$ = 5.38 min), respectively. The mass spectrum of 6 was identical to that in the literature.¹⁴

GC-MS (EI, 70 eV): *m/z* 111 (M⁺, 36%), 83 (50%), 69 (20%), 68 (25%), 43 (100%), 41 (46%).

In all isolations, a minor second peak (GC-MS, $t_R = 10.28$ min) appeared with an area of about 3%, as estimated by GC-FID, showing the following mass spectrum:

GC-MS (EI, 70 eV): *m*/*z* 111 (M⁺, 9%), 83 (20%), 55 (100%), 54 (30%), 52 (8%), 42 (68%).

2-Acetyl-1-pyrroline Quinoxaline (2-APQ, 7). Compound 5 (26 mg, 0.17 mmol) was dissolved in 2 mL of water. *o*-Phenylenediamine (OPD; 36 mg, 0.33 mmol) was dissolved in 2 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0) and added to the solution of 5. The pH was adjusted to 7.4, and the mixture was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 48 h. Afterward, the pH was adjusted to 6.0, and the solution was purified by preparative HPLC-UV. Material with a retention time of 25 min was collected. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in water and freeze-dried to obtain 7 as a brown, amorphic material (17 mg, 51%).

HR-MS: m/z 202.1345 $[M + H]^+$ (found), m/z 202.1344 (calcd for $C_{12}H_{16}N_3 [M + H]^+$).

Table 1. ¹ H	and ¹³ C	NMR	Spectroscopic	Data	of
Synthesized	2-APQª				

Position	$\delta^{ m 13}$ C [ppm]	δ ¹ Η [ppm]
		¹ ² ² ² ² ² ² ² ² ⁴ ² ² ¹ ² ² ² ² ² ² ² ² ² ²
2	155.3	-
3	153.7	-
5/10	139.4 / 139.3	-
6/9	130.0 / 129.8	7.65 – 7.58 (m, 2H)
7/8	127.0 / 126.8	7.70 – 7.65 (m, 2H)
1'	31.7	2.90 (t, ³ J = 7.8 Hz, 2H)
2'	24.9	2.04 (p, ³ J = 7.8 Hz, 2H)
3'	39.2	3.11 (t, ³ <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H)
1"	21.4	2.52 (s, 3H)

^aAll spectra were recorded in D₂O (¹³C: 125 MHz, ¹H: 500 MHz). δ , chemical shift; *J*, coupling constant. Hydrogen assignments were verified by APT, H, H–COSY, HSQC, and HMBC measurements. $\lambda_{max} = 240/320$ nm (in H₂O). $\varepsilon = 6700$ L/mol·cm (320 nm, 20 °C, in H₂O).

¹H and ¹³C NMR: see Table 1.

2-Acetyl-1-pyrroline Quinoxaline- d_4 (2-APQ- d_4 , **8**). The isotopically labeled analogue was prepared as described for 7 using 20 mg (0.13 mmol) of **5** and 25 mg (0.23 mmol) of OPD- d_4 . After lyophilization, **8** was obtained as a brown, amorphic material (9 mg, 28%).

HR-MS: m/z 206.1590 $[M + H]^+$ (found), m/z 206.1595 (calcd for $C_{12}H_{12}D_4N_3 [M + H]^+$).

Preparative HPLC-UV. A Besta HD 2-200 pump (Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 13 mL/min. Elution of material was monitored by a UV–vis detector (UV-2075 Plus, Jasco, Gross-Umstadt, Germany) with a detection wavelength of 320 nm. Chromatographic separation was performed on a stainless-steel column (Eurosphere-100 C18, 250 × 20 mm, 10 μ m, Knauer, Berlin,



Germany). The isocratic eluent consisted of methanol/water (20:80, v/v) containing formic acid (0.8 mL/L).

GC-MS Analysis. A Thermo Finnigan Trace GC Ultra coupled to a Thermo Finnigan Trace DSQ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany) was used with helium 5.0 as a carrier gas in constant-flow mode (linear velocity of 28.0 cm/s, flow of 1.0 mL/min). Separation was performed on a DB-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Samples were injected into a split–splitless injector at 200 °C (split ratio of 4). The oven temperature started at 50 °C, was raised to 110 °C (40 K/min) and then to 180 °C (5 K/min), and was finally ramped to 250 °C (40 K/min) and held for 5 min. Mass spectra were obtained at 70 eV with electron-impact ionization (source temperature starte of 270 °C, emission current of 80 mA) in full-scan mode (mass range of m/z 30–230).

High-Resolution Mass Spectrometry (HR-MS). Positive-ion high-resolution ESI mass spectra were obtained from an Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with an HESI electrospray ion source (spray voltage of 4 kV, capillary temperature of 275 °C, source-heater temperature of 40 °C, FTMS resolution >30.000). Nitrogen was used as the sheath and auxiliary gas. The sample solutions were introduced continuously via a 500 μ L Hamilton syringe pump with a flow rate of 5 μ L/min. The data were evaluated by the Xcalibur software 2.7 SP1.

Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy (NMR). NMR spectra were recorded on a VXR 400 spectrometer (Varian, Palo Alto, CA) operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C or on an Unity Inova 500 instrument (Varian) operating at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C, respectively. Tetramethylsilane was used as a reference for calibrating the chemical shift.

Stability of 2-AP. An aqueous 2-AP solution (500 μ L, 2 mM) was mixed with 500 μ L of water, water adjusted to pH 9.0 (with 0.01 M NaOH), aqueous matrix solution, or phosphate-buffered matrix solution, respectively. The matrix solution was prepared from nonaromatic rice as described for sample workup below by using either water (resulting pH 6.3) or phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4). Degradation of the compound was monitored over 10 h via GC-FID where 1.0 μ L of the solution was referenced against an external calibration curve of 2-acetylpyrazine (1–10 mM).

GC-FID Analysis. An Agilent 6890N Network GC System (Agilent Technologies) was used with helium 4.6 as a carrier gas in constant-flow mode (linear velocity of 31.0 cm/s, flow of 1.7 mL/min). Separation was performed on a HP-5 capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μ m, Agilent Technologies). Samples were injected to a split–splitless injector at 200 °C (split ratio of 4). The temperature program was identical to that used for GC-MS analysis. The detector was set at 270 °C.

Formation of 2-APQ. A 2-AP solution (2 mL, 100 μ M) in phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4) was mixed with 2 mL of an OPD solution (167 mM) in phosphate buffer. The reaction was monitored over 24 h at room temperature via HPLC-UV. Aliquots of the reaction mixture (20 μ L) were injected every 30 min during the first 5 h and then every 60 min. Stability of the formed quinoxaline ($t_{\rm R}$ = 12.3 min) at room temperature was evaluated by injections after 48, 72, and 120 h.

HPLC-UV Analysis. The high-performance liquid-chromatography (HPLC) system (Jasco) consisted of a quaternary gradient pump with a degasser (PU-2089 Plus), a column oven (Jetstream II), an autosampler (AS-2055 Plus), and a UV–vis detector (UV-2075 Plus). The detection wavelength was adjusted to 320 nm. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column packed with RP-18 material (Eurosphere-100 C18, 250 × 3.0 mm, 5 μ m, Knauer) using a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase used was water (eluent A) and methanol with water (7:3, v/v, eluent B). Formic acid (0.8 mL/L) was added to both eluents. Analyses were performed at a column temperature of 25 °C using gradient elution: 20% B (6 min isocratic) to 50% B (11 min) to 100% B (3 min) and hold for 7 min.

Food Samples and Preparation. Samples $(n \ge 10)$ of each product group were purchased from local supermarkets. All samples

3048

Table 2. HPLC-ESI-MS/MS Parameters for 2-APQ Measurements

		precursor ion			product ion	1 ^{<i>a</i>}		product ion	2 ^b	product ion 3 ^b		
analyte	retention time [min]	m/z	DP ^c [V]	m/z	CE^d [eV]	CXP ^e [V]	m/z	CE [eV]	CXP [V]	m/z	CE [eV]	CXP [V]
2-APQ	12.3	202	40	185	19	9	143	41	7	102	55	9
$2-APQ-d_4$	12.3	206	40	189	19	9	147	41	7	106	55	9

were ground in a universal shredder (Moulinette, Tefal, Rumilly, France). Grinding was performed five times at 3 s maximums with intervals to avoid any heating of samples. Nonaromatic and aromatic rice kernels were directly ground without cooking. Crusts of wheat breads, brown breads, and rye breads were separated from the crumb before grinding. For popcorn samples, only ready-to-eat popped products were used.

Sample Workup. In a 15 mL centrifuge tube, 1 g of ground sample was homogenized in 6 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4) using an Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Germany). After addition of 0.5 mL each of Carrez I and Carrez II, the suspension was vigorously shaken and extracted by ultrasound for 15 min. This was followed by shaking for an additional 15 min. The suspension was centrifuged (2000g, 5 min), and the supernatant was filtered through a syringe filter (0.45 μ m, cellulose acetate, Carl Roth AG). Fresh filtrate (500 μ L) was mixed with 500 μ L of OPD solution (167 mM in phosphate buffer) containing 42 nM of internal standard (2-APQ-d₄). The mixture was incubated in the dark at room temperature for 24 h and analyzed by HPLC-MS/MS.

HPLC-MS/MS Analysis. The high-performance liquid-chromatography (HPLC) system (Jasco) consisted of a pump (PU-2080 Plus) with a degasser (DG-2080-02) and a quaternary gradient mixer (LG-2080-04), a column oven (Jetstream II), and an autosampler (AS-2057 Plus). Mass-spectrometric detection was conducted on an API 4000 QTrap LC-MS/MS system (Applied Biosystems/AB Sciex, Darmstadt, Germany) equipped with a turbo ion-spray source using electrospray ionization in positive-ion mode: ion-spray voltage of 2.5 kV, nebulizing-gas pressure of 70 psi, heating-gas pressure of 80 psi at 650 °C, and curtain-gas pressure of 30 psi. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column packed with RP-18 material (Eurosphere-100 C18, 250 \times 3.0 mm, 5 μ m, Knauer) using a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase used was water (eluent A) and methanol with water (7:3, v/v, eluent B). Formic acid (0.8 mL/L) was added to both eluents. Analyses were performed at a column temperature of 25 °C using gradient elution: 20% B (6 min isocratic) to 50% B (11 min) to 100% B (3 min) and hold for 7 min. For mass-spectrometric detection, the scheduled multiple-reactionmonitoring (sMRM) mode was used, utilizing collision-induced dissociation (CID) of the protonated molecules with compoundspecific orifice potentials and fragment-specific collision energies (Table 2). The undiluted derivatized samples (25 μ L) were injected. Quantitation was based on the internal-standard method. More precisely, analyte concentrations in the samples were calculated from the peak-area ratios between 2-APQ and its deuterated analogue 2-APQ-d4, which was added as an internal standard during sample workup. As expected, slopes and linearity of both isotopologues were virtually identical.

Method Validation and Statistics. Nonaromatic rice was used as the matrix that was spiked with 100 μ L of free 2-AP (3.0 μ M, final concentration of 33.3 μ g/kg) and was worked up as described above. Precision was determined by six injections from the same sample solution. Repeatability and recovery were determined by six single sample workups. Linearity was determined by the standard-addition method to rice matrix using the internal standard 2-APQ- d_4 (0.5–3 and 50–300 nM, six-point-calibration, equidistant levels). More information is in the Supporting Information. The limit of detection (LOD, S/N = 3) and limit of quantitation (LOQ, S/N = 10) were estimated according to the signal/noise ratio (S/N) and determined in the presence of rice matrix. Kinetic-model incubations (n = 3) showed coefficients of variation of <5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of 1-(3-Methyl-2-quinoxalinyl)-3-aminopropane (2-APQ). Many different synthetic strategies for the aroma compound 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) have been proposed in recent years. We decided for the basic route by Grimm et al. starting from the amino acid proline (1, Figure 2). In the first step, the secondary amino group was protected



Figure 2. Synthesis of 2-acetyl-1-pyrroline quinoxaline (2-APQ). PIL, protic ionic liquid; CDI, 1,1'-carbonyldiimidazole; PBS, phosphatebuffered saline; OPD, *o*-phenylenediamine.

with a *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) group (2). Then, the carboxylic group was activated with 1,1'-carbonyldiimidazole to form an amide (3) with *N*,*O*-dimethylhydroxylamine. These Weinreb amides are very suitable for reactions with Grignard reagents because they are converted stoichiometrically to the corresponding ketones without formation of a tertiary alcohol.¹⁷ Deprotection of the resulting 2-acetyl-1-Boc-pyrrolidine (4) led to the hydrochloride salt (5), which is a convenient intermediate for storage. Under weak alkaline conditions (pH 7.4) this structure was spontaneously oxidized in air to 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP, 6) as described by Hofmann and Schieberle.¹² However, stirring in air for prolonged time periods led to browning of the solution, indicating degradation leading to polymerization, which was

also described by Fang et al. for pure 2-AP.¹⁸ For the synthesis of the novel quinoxaline structure (2-APQ, 7), compound 5 was autoxidized in the presence of o-phenylenediamine (OPD) to form instantly the stable quinoxaline, omitting the above reactivity of free 2-AP. The isotopically labeled standard was synthesized by using quadruple-deuterated OPD. Importantly, deuteration at the phenyl ring is inert against proton-deuteron exchange during handling in protic solvents. The identity and purity of 7 were unequivocally confirmed by one- and twodimensional NMR experiments, ESI-MS² fragmentation, highresolution mass spectrometry, and UV-vis spectroscopy. Specifically, NMR showed eight carbon resonances at 155.3, 153.7, 139.4/139.3, 130.0/129.8, and 127.0/126.8 ppm with two corresponding proton multiplets at 7.65-7.58 and 7.70-7.65 ppm, typical for the 2,3-disubstituted quinoxaline moiety. As expected, proton NMR revealed a singlet at 2.52 ppm for the methyl group, whereas the propylamine substituent at position 2 gave two triplets and one quintet at 2.90, 3.11, and 2.04 ppm, respectively (Table 1).

Stability of 2-AP. As pointed out above, the unstable nature of free 2-AP is a critical point during analysis in aqueous solutions and matrices such as foods via headspace or distillation techniques. Unexpectedly, concrete data on the stability of 2-AP are poorly available in the literature. Fang et al. verified the stability in methylene chloride over 20 h, whereas storage in phosphate buffer (pH 7.0) at 10 $^\circ$ C led to total degradation within 2 weeks.¹⁸ Other working groups reported on the instability of 2-AP during storage as well. Buttery et al. described a color change from light yellow to dark red of pure 2-AP stored in vacuum-sealed vessels at -20 °C, indicating polymerization.¹⁰ Similar observations led De Kimpe et al. to recommend long-term storage of 2-AP as diluted solutions (<1%) in methylene chloride or pentane at -20 °C.19 The acetyl carbonyl group and the adjacent imino group of the pyrroline ring must be responsible for the reactivity. Due to this intrinsic 1,2-dicarbonyl moiety, 2-AP undergoes further reactions like hydrolytic ring-opening, attack of nucleophiles, aldol reactions, or polymerization, especially under alkaline conditions. Interestingly, GC-MS/FID measurements of the present synthesized 2-AP standard in aqueous solution revealed a minor second peak (\sim 3%) with the same molecular mass but a different mass spectrum. The same observation was made by De Kimpe et al., who considered 6amino-2,3-hexanedione as a possible intermediate to explain the formation of a putative 6-membered tetrahydropyridine ring isomer (Figure 1) in support of the discussed reactivity of 2-AP.11

Still, several headspace methods to analyze free 2-AP in food matrices use alkaline solutions (e.g., sodium carbonate and potassium hydroxide) for sample equilibration, obviously to enhance the volatility by deprotonation of the secondary imino function of this otherwise readily water-soluble molecule.⁸ Carbonyl compounds possess acidic protons that are easily removed under alkaline conditions, facilitating a high reactivity of 2-AP. Additionally, hydroxide anions are strong nucleophiles and will open the pyrroline ring, allowing further reactions and thus trigger degradation of 2-AP. On the other hand, Apintanapong et al. also demonstrated slight degradation of 2-AP in water even under acidic conditions. After 7 days, 2-AP was degraded by 5% at pH 2 compared with 67% at pH 8.20 Thus, to optimize our workup protocol, we reinvestigated the stability of 2-AP in different aqueous solutions at 20 °C. Results are shown in Figure 3. On the one hand, degradation in



Figure 3. Stability of 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) in water (\bullet), water of pH 9.0 (\blacktriangle), aqueous unbuffered rice matrix (\bigcirc), and phosphatebuffered (pH 7.4) rice matrix (\diamondsuit).

unbuffered systems was monitored. 2-AP was stable in aqueous solutions over 10 h; however, it was degraded by 14% (10 h) when incubations were conducted at pH 9.0. In food matrices, the range of nucleophiles with, for example, alcohols, thiols, or amines is even more complex. Thus, in the presence of an unbuffered aqueous matrix there was a significant decrease by 25% within the first 2 h, ultimately leading to 60% degradation of the added standard at 10 h.

On the other hand, the stability of 2-AP in the presence of matrix in phosphate-buffered solution at pH 7.4 was checked. In this case 2-AP was virtually stable for 2 h and slowly degraded linearly by only 8% after 10 h. After 5 days, the structure was completely degraded, which is in line with the above-discussed degradation at 10 °C within 2 weeks.¹⁸ Taken together, our findings suggested that 2-AP is a reactive molecule, and aqueous phosphate-buffered solutions can be used for extractions from food stuffs, but the molecule should be stabilized by derivatization within a short time frame to prevent degradation during further handling.

Derivatization of 2-AP. o-Phenylenediamine (OPD) is commonly used as a trapping reagent to convert 1,2-dicarbonyl compounds quantitatively into their corresponding quinoxalines. In fact, compared with the reactions of other trapping agents of dicarbonyl compounds, the condensation reaction proceeds fast enough to efficiently stabilize even very reactive structures.²¹ Given the above-described equilibrium to a tetrahydropyridine derivative, 2-AP can be interpreted also as an intramolecular imine of the 1,2-dicarbonyl compound 6amino-2,3-hexanedione (Figure 1). For our novel analytical approach, we used this intrinsic reactivity for conversion of the unstable 2-AP into the stable quinoxaline derivative, 2-APQ. Test reactions with OPD led to one single peak in the HPLC-UV chromatogram at 320 nm, indicating effective conversion without any side reactions. This compound was isolated from food workups by preparative HPLC, and the spectroscopic and chromatographic data were virtually identical to those of the the synthesized authentic standard (Figures 4 and 5 and Table 2). The conversion rate in 0.2 M phosphate buffer at pH 7.4 was then characterized via HPLC-UV (Figure 6). After 1 h, about 85% of 2-AP was already trapped, and at 20 h, the reaction reached quantitative yield. Obviously, the huge driving



Figure 4. Collision-induced-dissociation (CID) spectra of 2-acetyl-1pyrroline quinoxaline (2-APQ) in food matrix (A) and of synthesized 2-APQ-d₄ (B).

force of the formation of an aromatic ring system is also true in the case of 2-AP. In sight of the given instability of 2-AP, this means that the reaction proceeds fast enough to prevent any measurable degradation processes once OPD is added. Importantly, formed 2-APQ and also added 2-APQ- d_4 were stable under these conditions up to 120 h. In the setup, 50 μ M 2-AP and 84 mM OPD were used. In real food samples, 2-AP concentrations are expected to be much lower according to the literature.^{9,22} Still, the excess of OPD was maintained in order to guarantee completeness of derivatization in any matrix workup.

Sample Workup and Method Validation. Obviously, 2-AP is a relatively polar structure. Partition tests with the synthesized standard and several organic solvents showed that 2-AP remained preferentially in the aqueous phase. Thus, phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4) was chosen because of its stabilizing effect toward 2-AP, as shown above for the extraction of dry-food matrix. Homogenization of ground samples in phosphate buffer with an Ultra-Turrax was followed by Carrez precipitation for removal of proteins. The mixture was then extracted by ultrasound for 15 min and shaken for 15 min. After centrifugation, particles in the supernatant were removed by syringe filtration, and the clear solution was used for derivatization with OPD. As stated above, within this overall extraction time (<1 h) no degradation of 2-AP was observed. The isotopically labeled standard (2-APQ- d_4) was added with the derivatization reagent as an internal standard and allowed quantitation via HPLC-MS/MS.

To compare the present, newly developed method to recently published gas-chromatographic methods, the new method was thoroughly validated for rice matrix in terms of



Figure 5. LC-MS/MS chromatograms of 2-acetyl-1-pyrroline quinoxaline (2-APQ) in food matrix (A) and of synthesized 2-APQ- d_4 (B).



Figure 6. Derivatization of 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) with *o*-phenylenediamine in phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4) leading to 2-acetyl-1-pyrroline quinoxaline (2-APQ).

precision (system, method, and intermediate), accuracy (via recovery), repeatability, linearity, stability of solutions, limit of detection (LOD), and limit of quantitation (LOQ; Table 3 and the Supporting Information). For method validation, nonaromatic long-grain rice was used as the test matrix. Precision of our HPLC-MS/MS system was 7.5% expressed as relative standard deviation (RSD) of six injections of the same standard solution at a concentration of 0.5 nM 2-AP (reflecting

0.8 μ g/kg in rice). As expected, an even better RSD of just 2.0% was reached at the higher level of 3.0 nM 2-AP (5.0 μ g/ kg). The repeatability or method precision, which was determined from six individual workup procedures, was 13.7% for our method. This value was verified with a test sample with a concentration of just 33.3 μ g/kg 2-AP. Moreover, all data were tested for outliers (Dixon), trending (Neumann), and normal distribution (David) without showing any discrepancy. The precision of the newly established method is, at first sight, similar to previous works, but information about the concentration levels at which the data were generated is not always given. However, the herein presented precision has to be evaluated as more powerful when, for example, it is compared with the intraday and interday precision of the method by Wongpornchai et al., in which the same sample was analyzed at various times (RSD = $3.9\%, n = 35, c = 3830 \ \mu g/kg).$

The strategy of trapping unstable 2-AP with OPD and the addition of the authentic reference standard $(2\text{-}APQ\text{-}d_4)$ allowed an accuracy of 92 ± 6%, calculated as recovery of added reference before sample workup. These data reflect the mean recovery at three levels of 2-AP and verified the wide applicability of this method, which is absolutely comparable to those of the reported HS-GC-MS systems.

Linearity was verified in a wide range from 0.79 (LOQ) to 500 μ g/kg by two individually prepared standard rows. The regression coefficient, r, was 0.996, and the residual-value plot showed comparable results, with maximum deviations of about 6% and no indications of outliers. Moreover, the ordinate intercept was just 1.5% with regard to a 20 nM calibration concentration reflecting the added concentration of the internal standard. This fact highlights the very low noise level of the method and guarantees precise quantitation even at low concentrations in the presence of rice matrix. As illustrated in Table 3, the range of our method, with 3 orders of magnitude, is remarkable compared with those of other methods, which were only able to cover 10² (e.g., 0.053 to 5.38 μ g/kg). Consequently, when the present method was applied to commercial food samples (rice, bread, and popcorn), no modification in sample workup was necessary.

In general, the use of isotopically labeled internal standards for mass-spectrometric quantitation is by now state-of-the-art and enables very sensitive measurements at low LOQs. In the literature, Hopfer et al. achieved the lowest LOQ (0.10 μ g/kg) combined with the fastest sample-workup procedure. Surprisingly, 2-AP levels in all of the tested nonaromatic rice samples were clearly below the LOQ (<0.075 μ g/kg). In contrast, although the LOQ of the present method was slightly higher compared with the LOQ of that approach, it was possible to quantitate 2-AP in nonaromatic rice with amounts up to 2.00 μ g/kg. This discrepancy only underlines the potential of effective derivatization of 2-AP by OPD in the present method, even at concentrations close to the LOQ.

2-AP in Foods. The potential of the novel analytical method was then applied to various typical foods (Figure 7). Formation and quantitation of 2-AP as an important aromaimpact compound of aromatic rice and wheat-bread crust was thoroughly studied in the 1980s. The works of Buttery (rice) and Schieberle (wheat bread) significantly contributed to the major understanding of the origin and chemistry of 2-AP. Herein, on the one hand, different rice samples (nonaromatic vs aromatic) from local supermarkets were analyzed. In these cases, the pure rice kernels were analyzed to access 2-AP







Figure 7. Quantitation of 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) in different foods. Each point represents the average of three independent workups.

exclusively formed via metabolic pathways in the rice plant (2-AP can also be found in rice leaves).⁷ However, 2-AP can also be generated during prolonged heating of rice. As expected, the nonaromatic rice samples (n = 11) showed very low amounts of 2-AP (<LOQ to 2.00 μ g/kg). In contrast, the aromatic varieties (n = 11, Basmati rice) showed a wide span from 41 to 356 μ g/kg. Given the instability and also the volatility of 2-AP, these findings must depend not only on variety but also on the conditions of packaging, storage, and transport. All values found were in the same range as published before (Table 3).

On the other hand, popcorn and crusts of wheat bread in comparison with those of rye bread and brown bread were investigated. The term "brown bread" here refers to a typical German bread type with varying contents (50-90%) of both wheat and rye flour. In popcorn and bread crust, 2-AP is formed exclusively nonenzymatically by Maillard reactions. Levels in commercially popped popcorn (n = 12) were in the range of 10-70 μ g/kg. Interestingly, salt had no impact on 2-AP levels, but all toffee-popcorn samples gave lower levels (under 20 μ g/kg). The model studies of Schieberle, based on the composition of water-soluble, low-molecular-weight compounds in corn, revealed proline (155 mg/kg) and fructose (880 mg/kg) to be the main precursors of 2-AP in popcorn. In freshly popped popcorn, levels of 57 μ g/kg were found using simultaneous steam-distillation-extraction and stable-isotope-dilution analysis, which is in line with our findings.²³

High concentrations of 2-AP were detected in the crusts of wheat bread, brown bread, and rye bread. In baked wheat goods, the crust is reported to contain 30-fold higher levels than the crumb (96 vs 2.8 μ g/kg).²⁴ The origin of 2-AP was found to be mainly baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). High contents of free ornithine (318 mg/kg) and MGO, formed from triosephosphates by thermal phosphate elimination during baking, lead to increased formation of 2-AP, which is then liberated by cell rupture, especially during crust formation.³ In support, a decrease in yeast used in dough production from 1.53 to 0.75% and shorter fermentation times led to a significant reduction of 2-AP (16.7 vs 10.9 μ g/kg) in French-type baguettes.²⁵ Other studies reported 78 and 19 μ g/kg 2-AP in wheat-bread crusts, respectively.^{22,26} The latter is in

line with our findings of an average concentration of 18 μ g/kg. Schieberle demonstrated the loss of 2-AP in wheat-bread crusts during storage. Within the first 3 h, levels of 19 ppb decreased drastically by 53%; the levels had decreased by 77% after 24 h and by 89% after 96 h.26 These findings underline again the strong impact of the sample handling and the need to stabilize 2-AP for quantitation. Unexpectedly, rye- and brown-bread crusts showed the same average 2-AP level of 18 μ g/kg, which was significantly higher than that reported before. In a comparative study with one-stage and three-stage sourdough, 1-4 μ g/kg was found for rye bread, whereas wheat-bread crusts gave 78 $\mu {\rm g/kg.}^{22}$ In another study, levels of 0.8 and 19 μ g/kg were found, respectively.²⁷ In both cases, the factor between both bread types was about 20. This obvious discrepancy in the data obtained herein might be explained by advances in baking technology during the past 25 years.

In conclusion, a novel approach for the efficient determination of the odor-active Maillard-reaction product 2-AP in food matrices was developed on the basis of derivatization with OPD and LC-MS/MS analysis of the formed quinoxaline. Concentrations in various food matrices were in the same range as found before. Compared with established methods based on gas-chromatographic headspace techniques, the extra step of derivatization gave excellent validation parameters in terms of robustness and linearity. Most importantly, the total amount of unstable 2-AP present in a sample is stabilized for further handling during analysis. This opens new future research possibilities, such as in transferring the mechanistic aspects of 2-AP formation into optimized industrial baking technologies.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00220.

Statistical-evaluation parameters (system precision, calibration curve, and residual plot) and repeatability (PDF)

Article

Journal of Agricultural and Food Chemistry

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de. Tel.: +49-345-5525 784. Fax: +49-345-5527 341.

ORCID ©

Tobias Jost: 0000-0001-7871-1345 Marcus A. Glomb: 0000-0001-8826-0808

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany, for recording NMR spectra and Dr. A. Frolov from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle/Saale, Germany, for performing accurate-mass determination.

ABBREVIATIONS USED

2-AP, 2-acetyl-1-pyrroline; 2-APQ, 2-acetyl-1-pyrroline quinoxaline; HS, headspace; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation; MGO, methylglyoxal; OPD, *o*-phenylenediamine; RSD, relative standard deviation; SIDA, stable-isotopedilution analysis; S/N, signal-to-noise ratio; SPME, solid-phase microextraction

REFERENCES

(1) Dunkel, A.; Steinhaus, M.; Kotthoff, M.; Nowak, B.; Krautwurst, D.; Schieberle, P.; Hofmann, T. Nature's chemical signatures in human olfaction: a foodborne perspective for future biotechnology. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 7124–7143.

(2) Wongpornchai, S.; Sriseadka, T.; Kitsawatpaiboon, P. Rapid method for quantitative analysis of the aroma impact compound, 2-acetyl-1-pyrroline, in fragrant rice using automated headspace gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8183–8189.

(3) Schieberle, P. Formation of 2-acetyl-l-pyrroline and other important flavor compounds in wheat bread crust. In *Thermal generation of aromas;* Parliment, T. H., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1989; pp 268–275.

(4) Thornalley, P. J.; Phillips, S. A. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 101–105.

(5) Schieberle, P. The role of free amino acids present in yeast as precursors of the odorants 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine in wheat bread crust. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1990**, 191, 206–209.

(6) Hofmann, T.; Schieberle, P. 2-Oxopropanal, hydroxy-2propanone, and 1-pyrroline important intermediates in the generation of the roast-smelling food flavor compounds 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine. J. Agric. Food Chem. **1998**, 46, 2270– 2277.

(7) Yoshihashi, T. Quantitative analysis on 2-acetyl-1-pyrroline of an aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 619–622.

(8) Maraval, I.; Sen, K.; Agrebi, A.; Menut, C.; Morere, A.; Boulanger, R.; Gay, F.; Mestres, C.; Gunata, Z. Quantification of 2acetyl-1-pyrroline in rice by stable isotope dilution assay through headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 675, 148– 155.

(9) Hopfer, H.; Jodari, F.; Negre-Zakharov, F.; Wylie, P. L.; Ebeler, S. E. HS-SPME-GC-MS/MS method for the rapid and sensitive quantitation of 2-acetyl-1-pyrroline in single rice kernels. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 4114–4120.

(10) Buttery, R. G.; Ling, L. C.; Juliano, B. O.; Turnbaugh, J. G. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. J. Agric. Food Chem. **1983**, 31, 823–826.

(11) De Kimpe, N.; Keppens, M. Novel syntheses of the major flavor components of bread and cooked rice. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1515–1519.

(12) Hofmann, T.; Schieberle, P. New and convenient syntheses of the important roasty, popcorn-like smelling food aroma compounds 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine from their corresponding cyclic α -amino acids. J. Agric. Food Chem. **1998**, 46, 616–619.

(13) Harrison, T. J.; Dake, G. R. An expeditious, high-yielding construction of the food aroma compounds 6-acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine and 2-acetyl-1-pyrroline. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10872–10874.

(14) Grimm, C. C.; Champagne, E. T.; Lloyd, S. W.; Easson, M.; Condon, B.; McClung, A. Analysis of 2-acetyl-1-pyrroline in rice by HSSE-GC-MS. *Cereal Chem.* **2011**, *88*, 271–277.

(15) Deblander, J.; van Aeken, S.; Adams, A.; De Kimpe, N.; Abbaspour Tehrani, K. New short and general synthesis of three key Maillard flavour compounds: 2-acetyl-1-pyrroline, 6-acetyl-1,2,3,4tetrahydropyridine and 5-acetyl-2,3-dihydro-4H-1,4-thiazine. *Food Chem.* **2015**, *168*, 327–331.

(16) Majumdar, S.; De, J.; Chakraborty, A.; Maiti, D. K. General solvent-free highly selective N-tert-butyloxycarbonylation strategy using protic ionic liquid as an efficient catalyst. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 24544–24550.

(17) Nahm, S.; Weinreb, S. M. N-Methoxy-N-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815–3818.

(18) Fang, M.-C.; Cadwallader, K. R. Stabilization of the potent odorant 2-acetyl-1-pyrroline and structural analogues by complexation with zinc halides. J. Agric. Food Chem. 2014, 62, 8808–8813.

(19) De Kimpe, N. G.; Stevens, C. V.; Keppens, M. A. Synthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, the principal rice flavor component. J. Agric. Food Chem. **1993**, 41, 1458–1461.

(20) Apintanapong, M.; Noomhorm, A. The use of spray drying to microencapsulate 2-acetyl-1-pyrroline, a major flavour component of aromatic rice. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2003**, *38*, 95–102.

(21) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of α -dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5543–5550.

(22) Schieberle, P.; Grosch, W. Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, 35, 252–257.

(23) Schieberle, P. Quantitation of important roast-smelling odorants in popcorn by stable isotope dilution assays and model studies on flavor formation during popping. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2442–2448.

(24) Schieberle, P.; Grosch, W. Potent odorants of the wheat bread crumb: differences to the crust and effect of a longer dough fermentation. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1991**, *192*, 130–135.

(25) Zehentbauer, G.; Grosch, W. Crust aroma of baguettes I. Key odorants of baguettes prepared in two different ways. *J. Cereal Sci.* **1998**, 28, 81–92.

(26) Schieberle, P.; Grosch, W. Changes in the concentrations of potent crust odorants during storage of white bread. *Flavour Fragrance J.* **1992**, *7*, 213–218.

(27) Schieberle, P.; Grosch, W. Potent odorants of rye bread crust: differences from the crumb and from wheat bread crust. Z. Lebensm.-Unters. Forsch. **1994**, 198, 292–296.

3054

DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00220 J. Agric. Food Chem. 2019, 67, 3046–3054

Reprinted with permission from Jost T., Heymann T., Glomb M. A. Efficient Analysis of 2-Acetyl-1-pyrroline in Foods Using a Novel Derivatization Strategy and LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 2019, *67*, 3046–3054. Copyright 2019 American Chemical Society.

PUBLIKATION C



pubs.acs.org/JAFC

Article

Comprehensive Analyses of Carbohydrates, 1,2-Dicarbonyl Compounds, and Advanced Glycation End Products in Industrial Bread Making

Tobias Jost, Christian Henning, Thomas Heymann, and Marcus A. Glomb*

Cite This: http	s://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c076	614	Read Online	
ACCESSI	III Metrics & More		E Article Recommendations	s Supporting Information

ABSTRACT: The technology of bread making is characterized by three major steps: dough mixing, proofing, and baking. To follow the course of Maillard processes in an authentic food matrix, the complete manufacturing process of wheat bread rolls was assessed along all production steps with the quantitation of sugars, furfurals, 1,2-dicarbonyl compounds, and advanced glycation end products (AGEs). As a result, the AGE profile was significantly enlarged to more than 12 structures, and comprehensive mechanistic insights were provided. The analyses of five major German bread types including wheat, brown, rye bread, pumpernickel, and crispbreads led to AGE contents of 69–149 mg/kg bread or 984–1857 mg/kg protein. Major lysine protein modifications were carboxymethyl, carboxyethyl, and formyl lysine and pyrraline. Arginine was mainly modified by methylglyoxal (MGO) to give imidazolinones. A major part of MGO was confirmed to stem from microbial metabolism.

KEYWORDS: Maillard reaction, 1,2-dicarbonyl compounds, advanced glycation end products, methylglyoxal, dough, yeast, fermentation, baking process, bread

■ INTRODUCTION

Bread is a major source of carbohydrates and proteins. The bread making process consists of three basic steps influencing the composition and quality of the final product. After dough mixing, fermentation by yeast and/or lactic acid bacteria (LAB) delivers important precursor structures during proofing to give a broad spectrum of new compounds in the final heating process. On a consumer perception level, baking leads to crust and crumb formation, browning, and flavor generation.^{1–3} Thus, it is not surprising that research has been focused mainly on the influence of the technology and ingredients on the texture, aroma, and taste.

However, the thermal impact during the baking process leads to drastic changes of dough ingredients to result also in strong antinutritive aspects.⁴ Food process contaminants, also called food-borne contaminants, are formed, which are subject to strong research activities. Hot spots include monochloropropanediol esters and related glycidyl esters and, more bread-related, acrylamide and furan structures. For acrylamide and furans, the development of mitigation strategies is complex as they are related to the so-called Maillard reaction, which is also the major source of aroma compounds. This nonenzymatic browning reaction describes a complex series of parallel and interacting chemical cascades. In the early stages, reaction of reducing sugars leads to the formation of aminoketoses, also called Amadori products. In the further course, intermediate 1,2-dicarbonyl compounds react preferentially with lysine and arginine moieties to form three classes of compounds: (I) stable amino acid or protein modifications, named advanced glycation end products (AGEs), (II) low molecular carbohydrate and amino acid degradation products,

and (III) macromolecular, nitrogen-containing, brownish compounds, called melanoidins.

The intake of food-derived Maillard reaction products is estimated to reach about 1 g of Amadori products and 25-75 mg of AGEs per day in a western diet.¹ Thus, from the nutritional point of view, Maillard reaction does not only diminish essential amino acids. In fact, while endogenously formed AGEs have been associated with various pathologies including diabetes, kidney failure, metabolic disorders, and degenerative diseases, and also to the aging process, little is known on the fate and physiological significance of exogenous AGEs.⁵ As an additional aspect of abovementioned food-borne contaminants, here in this context, the term glycotoxins has been established to link the field of Maillard reaction between the medicine and food science. Indeed, a few recent studies have verified an uptake of AGEs via human blood circulation.^{6,7} While pyrraline is absorbed and almost quantitatively excreted via the urine, N⁶-carboxymethyl lysine (CML) lacks an active transport system, and only about 15-25% of the dietary intake is recovered in the urine. Instead, most of the CML is transferred to the large intestine and then processed by the microbiota so that about 20-30% is found in the feces. In vitro studies with Escherichia coli strains identified the biogenic amine N-carboxymethyl cadaverine as the main

Received: December 3, 2020 Revised: March 5, 2021 Accepted: March 6, 2021



 XXXX The Authors. Published by American Chemical Society

pubs.acs.org/JAFC

metabolite which may enter in vivo the human circulation system.⁸ The potential deleterious effects of these phenomenons remain to be uncovered. Even more surprising is the fact that the complete portfolio of AGEs in foods on a qualitative as well as quantitative basis is largely unknown.⁹ The literature focuses mainly on pyrraline and CML in selected snack and bakery products, but given the structures so far established in the field of Maillard reaction, the range must be significantly larger.¹⁰ Specifically, we expect that because of fermentative processes, methylglyoxal (MGO)-derived Maillard products are of major importance.

Thus, to understand the formation of AGEs in fermented bakery products, the technology of wheat rolls was followed through all manufacturing steps, which was finally enlarged by comparison to the typical range of German breads. An optimized workup protocol was developed to monitor sugars, intermediate Maillard carbonyl compounds, furfurals, and protein modifications in relation to physical parameters as the temperature, moisture, water content, and browning.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals of the highest quality available were purchased from Sigma-Aldrich (Munich/Steinheim, Germany) and Carl Roth AG (Karlsruhe, Germany), unless otherwise indicated. Pyrraline was obtained from PolyPeptide Laboratories (Strasbourg, France). CML,¹¹ N⁶-glycoloyl lysine (GALA),¹² N⁷-carboxymethyl arginine (CMA),¹³ glyoxal hydroimidazolone (G-H3),¹³ N⁶-carboxyethyl lysine (CEL), N⁶-lactoyl lysine,¹⁴ and furosine¹⁵ were synthesized according to the literature. MGO hydroimidazolones (MG-H1 and MG-H3) and N⁷-carboxyethyl arginine (CEA) were isolated from MGO/N²-t-Boc-arginine reaction mixtures as described previously by our working group.¹⁶

Dough and Bread Samples. Raw, fermented, and prebaked dough samples were obtained directly from an industrial production process of prebaked wheat bread rolls (Harry-Brot GmbH, Schenefeld, Germany) and stored immediately on dry ice until further analysis.

Different bread types (pumpernickel, wheat, rye, brown, and crispbread, n = 5) were purchased from local supermarkets or bakery stores. The fresh breads were ground in a Moulinette (Moulinex, France) and processed in triplicate as described below.

Baking Procedure. Prebaked wheat bread rolls were purchased from a local food store. Three rolls per time point were baked at 200 $^{\circ}$ C in a drying oven (Binder, Germany) without air circulation for 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 21 min. After baking, bread rolls were cooled down to room temperature, ground in a Moulinette after 15 min, and processed as described below.

Water, Temperature, and Color Measurements. Bread rolls were weighed before and after baking to determine the water loss. Surface and core temperatures were measured directly after baking using an infrared thermometer (MS6451, Mastech, Spain). The surface color of freshly baked bread rolls was determined with a color meter (colorStriker, Mathai GmbH, Germany) using the CIE $L \times a \times b$ color system. The colorimetric parameters lightness (L), redness (a), and yellowness (b) were measured under D65 illuminance (artificial daylight, 10° standard angle) and a fixed distance of 13 mm. Differences of the surface color were expressed as the color distance (ΔE) with reference to unbaked bread rolls.

Combined Extraction for Carbohydrates, Furfurals, and 1,2-Dicarbonyl Compounds. In a 50 mL centrifuge tube, 2 g of ground sample was homogenized in 12 mL of methanol/water (1:1, v/v) using an Ultra-Turrax (IKA, Germany). After addition of 1 mL each of Carrez I and Carrez II, the suspension was vigorously shaken and extracted by ultrasound for 15 min, followed by shaking for additional 15 min. The suspension was centrifuged (2000g, 5 min), and the supernatant was filtered through a syringe filter (0.45 μ m, cellulose acetate, Carl Roth AG, Germany). The filtrate was immediately used

for further analysis. Recoveries for each type of analytes were tested using D-galactose, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), furfural, and MGO-quinoxaline, respectively, at two different spike levels (10 and 200 mg/kg) in unbaked bread rolls.

Determination of 1,2-Dicarbonyl Compounds. Dicarbonyls were determined as their respective quinoxalines after derivatization with *o*-phenylenediamine (OPD). 500 μ L of the above filtrate was mixed with 500 μ L of OPD solution (160 mM in methanol/water 1:1, v/v), incubated in the dark at room temperature for 24 h, and analyzed by high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy/mass spectroscopy (HPLC-MS/MS).

Determination of Carbohydrates and Furfurals. Extracted samples were derivatized according to Rakete and Glomb.¹⁷ Briefly, 2 mL of the above filtrate was mixed with 500 μ L of 1-naphthylamine solution (0.2 M in DMSO/15% acetic acid 1:1, v/v) and 500 μ L of sodium cyanoborohydride solution (1.0 M in DMSO). The samples were incubated at 37 °C for 24 h and analyzed by HPLC–FLD (fluorescence detector).

High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector. The HPLC system (Jasco, Germany) consisted of a pump (PU-2080 Plus) with a degasser (DG-2080-54), a quaternary gradient mixer (LG-2080-04), a column oven (Jetstream II), an autosampler (AS-2057 Plus), and an FLD (FP-2020 Plus). The wavelengths of excitation and emission were adjusted to 318 and 440 nm, respectively. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column packed with the RP-18 material (Eurosphere-100 C18, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, Knauer, Germany) using a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase used was water (solvent A) and methanol with water (7:3, v/v, solvent B). 0.6 mL/L heptafluorobutyric acid was added to both eluents (A and B) as the ion pair reagent. Analyses were performed at a column temperature of 25 °C using gradient elution. For carbohydrates and furfurals, the method of Rakete et al. was used: 35% B (75 min isocratic) to 100% B (in 5 min) and hold (15 min).

Protein Extraction from Dough and Bread. For protein extraction, the protocol of Biemel et al. was used first.¹⁹ However, an insufficient extraction yield and poor protein purity for the bread matrix led to major modifications of the original protocol. In detail, 5 g of ground sample was refluxed in 50 mL of water/2-propanol (1:1, v/v) containing 0.25 mL of thioglycerol for 3 h. The hot solution was transferred to 50 mL tubes and centrifuged immediately (1000g, 2 min, Labofuge 400R, Heraeus, Germany). The supernatant was decanted, and the residue was extracted again as described. The supernatants were combined and stored at -20 °C overnight. After centrifugation (2000g, 4 °C, 10 min), the supernatant was discarded, and the pellet was washed twice with iced water. The pellet was suspended in 15 mL of water and heated at 95 °C under reflux for 30 min after addition of 100 μ L of α -amylase (heat-stable, from *Bacillus* licheniformis). The solution was tempered to 60 °C and stirred for further 30 min after addition of 500 μ L of amyloglucosidase (from Aspergillus niger, aqueous solution, > 300 U/mL). The solution was cooled down, 20 mL of absolute ethanol was added, and the solution was stored at-20 °C overnight. The precipitate was centrifuged (2000g, 4 °C, 10 min), washed twice with iced water, and lyophilized.

Determination of Extraction Yield, Protein Purity, and Recovery. The protein content of the bread roll, the extract, and the residue were analyzed by the Kjeldahl method: 0.5 g of minced and lyophilized sample was decomposed in concentrated sulfuric acid at 300 °C for 45 min in the presence of a selenium catalyst (Wieninger catalyst, Merck, Germany; Tecator Digester 2520, Foss, Denmark). After cooling down, 20 mL of water and 20 mL of sodium hydroxide solution (32%) were added, and ammonia was transferred into a sulfuric acid solution (0.05 M) by steam distillation for 10 min. After addition of Tashiro's indicator, the solution was titrated with sodium hydroxide solution (0.10 M). The total nitrogen was calculated from the difference of the required volume of the sodium hydroxide solution between a blank and the sample. For calculation of total protein, the conversion factor 5.70 was used.

Preparation of Protein Suspensions. In 2 mL tubes, 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS, 10 mM phosphate, 150 mM sodium

pubs.acs.org/JAFC

```
Article
```

Table 1. LC–Ele	ctrospray Ionization	-MS/MS Paramete	rs for AGE and	Furosine	Measurement
-----------------	----------------------	-----------------	----------------	----------	-------------

		precursor ion		product ion 1 ^a			1	product ion	2 ^b	product ion 3 ^b		
analyte	retention time [min]	m/z	DP ^c [V]	m/z	CE ^d [eV]	CXP ^e [V]	m/z	CE [eV]	CXP [V]	m/z	CE [eV]	CXP [V]
CML	11.6	205.1	42	84.1	30	14	130.2	17	9	56.1	59	9
GALA	12.2	205.2	40	142.1	20	11	84.1	36	14	56.2	64	8
N ⁶ -formyl lysine	13.0	175.1	40	112.1	20	13	84.1	35	7	129.1	15	13
N ⁶ -lactoyl lysine	16.0	219.2	40	156.2	20	8	84.1	35	9	173.1	17	8
N ⁶ -acetyl lysine	16.3	189.2	40	126.1	18	10	84.2	31	5	143.1	14	10
CEL	17.1	219.1	54	84.1	33	7	130.1	18	11	56.1	59	8
G-H3	19.5	215.1	48	100.1	20	8	70.1	38	11	116.2	20	10
CMA	19.8	233.1	55	70.1	43	12	116.1	23	8	118.2	22	6
MG-H3	24.2	229.2	45	114.2	21	9	70.2	45	11	116.1	21	9
CEA	24.4	247.1	51	70.2	48	11	116.2	25	10	132.1	24	10
MG-H1	24.4	229.2	55	166.2	23	12	70.1	43	12	116.1	21	9
furosine	26.0	255.2	50	84.1	33	7	130.3	21	10	192.0	23	12
pyrraline	27.6	255.2	38	175.2	17	11	237.2	12	13	148.3	29	10
^a MRM transition	used for quantitation	(quanti	fier). ^b MR	M transi	ition used fo	or confirmat	ion (qua	alifier). ^c De	clustering	potentia	l. ^d Collisio	on energy.

^eCell exit potential.

chloride, pH 7.4) was added to 3 mg of the lyophilized protein. Samples were homogenized in a mixer mill (MM400, Retsch, Germany) at 30 Hz for 30 min using a zirconium oxide grinding ball (5 mm in diameter).

Acid Hydrolysis (AGEs). 400 μ L of the above protein suspension was evaporated to dryness by vacuum centrifugation (Savant Speed Vac Concentrator, Thermo Scientific, Germany). 200 μ L of sodium borohydride (8 mg/mL) in sodium hydroxide (0.01 M) was added and incubated at room temperature for 1 h. The solution was evaporated to dryness again. After addition of 800 μ L of hydrochloric acid (6.0 M), degassing with helium and argon, the reaction tube was sealed and kept in a drying oven at 110 °C for 20 h. Hydrochloric acid was removed by vacuum centrifugation. The dry residue was taken up in 492 μ L of diluted hydrochloric acid (0.05 mM) and filtered through a centrifugal tube filter (Costar Spin-X, 0.45 μ m, cellulose acetate, Corning Inc., New York). For furosine analyses, the reduction step was omitted.

Ènzymatic Hydrolysis (AGEs). To 500 μ L of the above protein suspension, the following proteases were added every 24 h: 0.3 units of pronase E, again 0.3 units of pronase E, 1.0 unit of leucine aminopeptidase, and 0.95 units of carboxypeptidase Y.¹² The samples were incubated in an incubator shaker (New Brunswick Scientific, New Jersey) at 37 °C. A small crystal of thymol was added with the first digestion step. After the last digestion step, solutions were filtered through a molecular weight cutoff membrane (MWCO 3000 centrifugal filters, VWR International, Germany). The efficiency of the enzymatic hydrolysis for each sample was calculated based on the acid-stable modification N⁶-CEL in comparison to acid hydrolysis by liquid chromatography (LC)–MS/MS analysis. This means that each single sample was processed by both the acid and enzymatic hydrolysis, and the CEL ratio was used to adjust the quantitation of acid labile AGEs.

Ninhydrin Assay. The amino acid content of acid protein hydrolysates was measured by the ninhydrin method of Smuda et al. with L-leucine as the reference standard.²⁰ After derivatization, absorption of the diluted samples and a standard curve were determined at 566 nm with a microplate reader (infinite M200, Tecan, Switzerland) using 96-well plates.

High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectroscopy/Mass Spectroscopy. The HPLC system (Jasco, Germany) consisted of a pump (PU-2080 Plus) with a degasser (DG-2080-54) and a quaternary gradient mixer (LG-2080-04), a column oven (Jetstream II), and an autosampler (AS-2057 Plus). Mass spectrometric detection was conducted on an API 4000 QTrap MS/ MS system (AB Sciex, Germany) equipped with a turbo ion spray source using electrospray ionization in the positive ion mode: an ion spray voltage of 2.5 kV, a nebulizing gas pressure of 70 psi, a heating gas pressure of 80 psi at 650 °C, and a curtain gas pressure of 30 psi. For mass spectrometric detection of AGEs, the scheduled multiplereaction monitoring (sMRM) mode was used utilizing collisioninduced dissociation of the protonated molecules with compoundspecific orifice potentials and fragment-specific collision energies (Table 1). Mass spectrometric detection of 1,2-dicarbonyl compounds as their respective quinoxalines was conducted according to Smuda and Glomb.²¹ Appropriate dilutions of the samples were injected dependent on the analyte concentration and matrix interference. Quantitation was based on the standard addition method. More precisely, increasing concentrations of authentic reference compounds at factors of 0.5, 1, and 2 times the concentration of the compounds in the sample were added to separate aliquots of the sample. The aliquots were analyzed, and a regression of response versus concentration was used to determine the concentration of the analyte in the sample. Calibration with this method resolves the potential matrix interference. Analyses were performed at a column temperature of 25 °C using gradient elution. Limits of detection (LOD, 3× S/N) and limits of quantitation (LOQ, $10 \times$ S/N) for each analyte for the respective matrices were calculated according to the signal/noise ratio (S/N) and are given in Tables 2 and 3.

Dicarbonyl Compounds. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column packed with the RP-18 material (Eurosphere-100 C18, 250 mm × 4.6 mm, 5 μ m, Knauer, Germany) using a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase used was water (eluent A) and methanol with water (7:3, v/v, eluent B). 0.6 mL/L heptafluorobutyric acid was added to both eluents (A and B). For quinoxaline analyses, the following gradient was used: 10% B (2 min) to 100% B (in 10 min) and hold (8 min).

Advanced Glycation End Products. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column packed with the RP-18 material (Xselect HSS T3, 250 mm × 3.0 mm, 5 μ m, Waters, Massachusetts) using a flow rate of 0.7 mL/min. The mobile phase used was water (eluent A) and methanol with water (7:3, v/v, eluent B). 1.2 mL/L heptafluorobutyric acid was added to both eluents (A and B) as the ion pair reagent. For AGE analyses, the following gradient was used: 2% B (2 min), to 14% B (in 10 min), to 87% B (in 22 min), to 100% B (in 0.5 min), and hold (7 min).

Statistical Analysis. Statistical significance between two groups was examined using Fisher's test (*F*-test) with a probability value of 95%. All significance tests were performed by two-sample Student's *t*-test or Welch's *t*-test, respectively, with a probability value of at least 95%. Samples were worked up and analyzed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

С

Extraction Procedures for Cereal Proteins and Low Molecular Carbonyl Compounds. Analysis of protein-

Table 2. LOD and LOQ	for Sugars, Furfurals, and
Dicarbonyl Compounds	in Bakery Products

analyte	LOD [mg/kg]	LOQ [mg/kg]					
sugars							
maltotetraose	8.4	26.6					
maltotriose	6.4	20.1					
maltose	4.3	13.7					
glucose	2.3	7.2					
pentoses	1.9	6.0					
	furfurals						
HMF	1.6	5.0					
furfural	1.2	3.8					
	dicarbonyl compounds						
GO	0.27	0.91					
MGO	0.49	1.63					
pyruvate	0.41	1.38					
3-DP	0.49	1.65					
3,4-DDP	0.07	0.22					
3-DG	1.45	4.85					
1-DG	0.20	0.65					
glucosone	0.53	1.77					
1,5-DDMal	1.84	6.12					
1-DMal	1.08	3.59					
3-DMal	0.21	0.71					
maltosone	0.51	1.69					

Table 3.	LOD	and	LOQ	for	AGEs	and	Furosine	in	Bakery
Products									

analyte	LOD [mg/kg]	LOQ [mg/kg]
CEL	0.05	0.15
N ⁶ -lactoyl lysine	0.02	0.06
MG-H1	0.07	0.24
MG-H3	0.05	0.18
CEA	0.06	0.19
CML	0.06	0.21
GALA	0.06	0.19
СМА	0.17	0.57
G-H3	0.11	0.37
N ⁶ -formyl lysine	0.03	0.09
N ⁶ -acetyl lysine	0.01	0.03
pyrraline	0.12	0.40
furosine	0.02	0.08

bound AGEs in food stuff is challenging due to the complex matrix, especially after heating at high baking temperatures. Thus, an optimized separation procedure for proteins from the other bread ingredients is mandatory to guarantee a full picture of protein modifications dependent (I) on the completeness of protein extraction and (II) on protein purity to facilitate maximum efficiency, specifically of enzymatic hydrolysis. Bread is mainly composed of starch (\sim 50%), followed by proteins $(\sim 10\%)$, while fat is negligible $(\sim 1\%)$. The remainder is salt $(\sim 1\%)$, dietary fiber $(\sim 2\%)$, sugars $(\sim 3\%)$, and water $(\sim 30\%)$. In the first attempt, we used the extraction procedure described by Biemel et al., which was originally developed for biscuits and pretzel crusts (Table 4).¹⁹ This approach is based on an isopropanol-water extraction to separate from non-soluble matter (residue) to give after evaporation, defatting, and demineralization the crude protein (extract) for hydrolysis. However, this workup was not applicable to bread matrices, as the non-soluble residue still contained 4% of

Table 4. Protein Extraction from Wheat Bread Rolls [%]

	Biemel et al.	this work						
residue								
protein in residue	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1						
protein loss ^a	23 ± 1	23 ± 1						
extract								
protein in precipitation	19 ± 2	84 ± 1						
protein yield ^a	59 ± 4	74 ± 1						
total protein monitored ^a	82 ± 5	97 ± 2						
^a referring to total protein in bread rolls.								

protein, representing 23% of the original protein content, but, more importantly, the final protein material obtained related only to 59% of the total bread roll protein and showed a poor purity of 19%. We were not able to improve the yield of the initial extraction step, neither by prolonging the reflux time nor by working repetitively. Obviously, the insoluble protein material must belong to the high-molecular-weight glutenin fraction according to the Osborne classification.²² On the other hand, the protein isolation from the extract was significantly improved to an almost quantitative yield (74%) compared to the theoretical 77%) and a purity of 84% of the final material. This was achieved by a two-step precipitation initiated by cooling and addition of ethanol but more importantly by a two-step enzymatic digestion protocol to reduce the soluble polymeric carbohydrate load. First, heatstable α -amylase degraded starch to soluble dextrins, while glucoamylase released glucose from amylose or dextrins. With this, the hydrolysis efficiency of our four-step enzymatic procedure comprising three proteases reached 70-80%, which was calculated based on the quantitation of the acid-stable AGE CEL from a parallel acidic protein hydrolysis for each single protein isolation. By definition, acidic hydrolysis gives 100% release of CEL.

For low-molecular-weight carbonyl compounds, namely, sugars, furfurals, and 1,2-dicarbonyl compounds (Table 2), an efficient extraction strategy (~45 min) with subsequent derivatization to stable analytes was developed in order to obtain results for each time point as precisely as possible. The water/methanol solvent composition of 50:50 in combination with Carrez clarification achieved almost quantitative recoveries (~90%) for all types of analytes (data not shown). Petisca et al. used a water/methanol ratio of 70:30 for extraction of furanoic compounds from cakes, but we found that a higher methanol ratio was necessary for the quantitative extraction of the relatively nonpolar furfural. The use of Carrez clarification instead of trichloroacetic acid was adopted to avoid HMF artifact formation from glucose at a low pH.²³

Industrial Bread Baking and Maillard Processes. The industrial bread manufacturing process for wheat bread rolls is schematically shown in Figure SI-1 (Supporting Information). After blending all ingredients (wheat flour, yeast, salt, and additives), water is added, and the mass is dispersed to a homogenous raw dough in a batch kneader (1). The dough is formed, portioned, and pre-proofed at room temperature for 10 min (2) before fermentation at 25 °C and 85% humidity for 90 min (3). Samples were collected every 30 min during fermentation (3.1, 3.2, and 3.3). The final prebaking (4) is divided into three steps, including different temperature regimes: 205 °C for 5 min (4.1), 190 °C for 5 min (4.2), and 182 °C for 4 min (4.3). After 14 min of prebaking, the product is about 60–70% baked. The bread rolls are cooled

D

pubs.acs.org/JAFC

rticle

Table 5. Concentrations^a of Sugars, Furfurals, Dicarbonyl Compounds, and AGEs in Different Steps of Industrial Bread Making Process

	raw dough	Pre-proofing	fermentation			prebaking			baking
	1	2	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3	5
				sugars [g/kg]				
maltotetraose	0.07 ± 0.01	0.85 ± 0.09	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	2.3 ± 0.3	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.5
maltotriose	0.11 ± 0.02	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.5	3.2 ± 0.4	3.4 ± 0.2	3.7 ± 0.3	4.0 ± 0.2
maltose	1.9 ± 0.3	60 ± 7	68 ± 8	58 ± 11	67 ± 1	120 ± 20	110 ± 20	110 ± 10	110 ± 10
glucose	0.18 ± 0.03	10 ± 2	13 ± 3	21 ± 3	19 ± 3	0.58 ± 0.10	0.72 ± 0.04	0.79 ± 0.07	$1.26 \pm 0.08^{**}$
pentoses	0.05 ± 0.01	0.29 ± 0.05	0.35 ± 0.07	0.53 ± 0.12	0.45 ± 0.08	0.27 ± 0.03	0.34 ± 0.08	0.28 ± 0.09	0.36 ± 0.02
				furfurals [mg/kg]				
HMF	<lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>7 ± 1</td><td>12 ± 1</td><td>$78 \pm 12^{**}$</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></lod<>	<loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>7 ± 1</td><td>12 ± 1</td><td>$78 \pm 12^{**}$</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>7 ± 1</td><td>12 ± 1</td><td>$78 \pm 12^{**}$</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>7 ± 1</td><td>12 ± 1</td><td>$78 \pm 12^{**}$</td></loq<></td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td><loq< td=""><td>7 ± 1</td><td>12 ± 1</td><td>$78 \pm 12^{**}$</td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td>7 ± 1</td><td>12 ± 1</td><td>$78 \pm 12^{**}$</td></loq<>	7 ± 1	12 ± 1	$78 \pm 12^{**}$
furfural	<lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq_< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq_< td=""><td>5.6 ± 0.4</td><td>9.4 ± 0.8</td><td>$44 \pm 4^{**}$</td></loq_<></td></loq<></td></loq<></td></loq_<></td></loq<></td></lod<>	<loq< td=""><td><loq_< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq_< td=""><td>5.6 ± 0.4</td><td>9.4 ± 0.8</td><td>$44 \pm 4^{**}$</td></loq_<></td></loq<></td></loq<></td></loq_<></td></loq<>	<loq_< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq_< td=""><td>5.6 ± 0.4</td><td>9.4 ± 0.8</td><td>$44 \pm 4^{**}$</td></loq_<></td></loq<></td></loq<></td></loq_<>	<loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq_< td=""><td>5.6 ± 0.4</td><td>9.4 ± 0.8</td><td>$44 \pm 4^{**}$</td></loq_<></td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td><loq_< td=""><td>5.6 ± 0.4</td><td>9.4 ± 0.8</td><td>$44 \pm 4^{**}$</td></loq_<></td></loq<>	<loq_< td=""><td>5.6 ± 0.4</td><td>9.4 ± 0.8</td><td>$44 \pm 4^{**}$</td></loq_<>	5.6 ± 0.4	9.4 ± 0.8	$44 \pm 4^{**}$
			d	icarbonyl compo	ounds [mg/kg]				
GO	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>0.9 ± 0.2</td><td>1.4 ± 0.1</td><td>2.0 ± 0.3</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>0.9 ± 0.2</td><td>1.4 ± 0.1</td><td>2.0 ± 0.3</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>0.9 ± 0.2</td><td>1.4 ± 0.1</td><td>2.0 ± 0.3</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>0.9 ± 0.2</td><td>1.4 ± 0.1</td><td>2.0 ± 0.3</td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td>0.9 ± 0.2</td><td>1.4 ± 0.1</td><td>2.0 ± 0.3</td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td>0.9 ± 0.2</td><td>1.4 ± 0.1</td><td>2.0 ± 0.3</td></lod<>	0.9 ± 0.2	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.3
MGO	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>1.6 ± 0.3</td><td>2.1 ± 0.3</td><td>$4.1 \pm 0.5^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>1.6 ± 0.3</td><td>2.1 ± 0.3</td><td>$4.1 \pm 0.5^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>1.6 ± 0.3</td><td>2.1 ± 0.3</td><td>$4.1 \pm 0.5^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></lod<>	<loq< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>1.6 ± 0.3</td><td>2.1 ± 0.3</td><td>$4.1 \pm 0.5^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td><loq< td=""><td>1.6 ± 0.3</td><td>2.1 ± 0.3</td><td>$4.1 \pm 0.5^{*}$</td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td>1.6 ± 0.3</td><td>2.1 ± 0.3</td><td>$4.1 \pm 0.5^{*}$</td></loq<>	1.6 ± 0.3	2.1 ± 0.3	$4.1 \pm 0.5^{*}$
pyruvate	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$3.9 \pm 0.8^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$3.9 \pm 0.8^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$3.9 \pm 0.8^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$3.9 \pm 0.8^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$3.9 \pm 0.8^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$3.9 \pm 0.8^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td>$3.9 \pm 0.8^{**}$</td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td>$3.9 \pm 0.8^{**}$</td></lod<>	$3.9 \pm 0.8^{**}$
3-DP	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td>4.0 ± 1.3</td><td>7.8 ± 0.9</td><td>$19.1 \pm 1.6^{**}$</td></loq<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td>4.0 ± 1.3</td><td>7.8 ± 0.9</td><td>$19.1 \pm 1.6^{**}$</td></loq<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td>4.0 ± 1.3</td><td>7.8 ± 0.9</td><td>$19.1 \pm 1.6^{**}$</td></loq<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td>4.0 ± 1.3</td><td>7.8 ± 0.9</td><td>$19.1 \pm 1.6^{**}$</td></loq<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><loq< td=""><td>4.0 ± 1.3</td><td>7.8 ± 0.9</td><td>$19.1 \pm 1.6^{**}$</td></loq<></td></lod<>	<loq< td=""><td>4.0 ± 1.3</td><td>7.8 ± 0.9</td><td>$19.1 \pm 1.6^{**}$</td></loq<>	4.0 ± 1.3	7.8 ± 0.9	$19.1 \pm 1.6^{**}$
3,4-DDP	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$2.5 \pm 0.3^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$2.5 \pm 0.3^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$2.5 \pm 0.3^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$2.5 \pm 0.3^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$2.5 \pm 0.3^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td>$2.5 \pm 0.3^{**}$</td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td>$2.5 \pm 0.3^{**}$</td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td>$2.5 \pm 0.3^{**}$</td></lod<>	$2.5 \pm 0.3^{**}$
1-DG	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>$1.1 \pm 0.1^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>$1.1 \pm 0.1^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>$1.1 \pm 0.1^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></lod<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>$1.1 \pm 0.1^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>$1.1 \pm 0.1^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><loq< td=""><td><loq< td=""><td>$1.1 \pm 0.1^{*}$</td></loq<></td></loq<></td></lod<>	<loq< td=""><td><loq< td=""><td>$1.1 \pm 0.1^{*}$</td></loq<></td></loq<>	<loq< td=""><td>$1.1 \pm 0.1^{*}$</td></loq<>	$1.1 \pm 0.1^{*}$
3-DG	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.5	4.2 ± 0.2	7.5 ± 0.5	12.3 ± 0.5	$38 \pm 3^*$
glucosone	8.4 ± 0.7	14 ± 2	17 ± 1	17 ± 4	16 ± 1	8.0 ± 0.9	12 ± 3	21 ± 4	29 ± 1
1,5-DDMal	14 ± 1	11.1 ± 0.2	12 ± 2	11.6 ± 0.1	12 ± 1	14 ± 1	38 ± 3	208 ± 9	933 ± 35**
1-DMal	35 ± 2	33 ± 2	32 ± 2	31.3 ± 0.1	33 ± 2	35.0 ± 0.6	550 ± 12	1980 ± 131	$3580 \pm 51^{**}$
3-DMal	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.47 ± 0.1	2.0 ± 0.2	14 ± 3	37 ± 1	$87 \pm 4^{**}$
maltosone	7.6 ± 0.8	10 ± 2	8 ± 1	4.6 ± 0.5	8 ± 1	8.5 ± 0.4	13 ± 1	16 ± 3	$28 \pm 1^{**}$
				AGEs [m	ng/kg]				
CEL ^b	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.9 ± 0.1	$3.1 \pm 0.4^*$
N ⁶ -lactoyl lysine	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	$0.16 \pm 0.01^{**}$
CEA	8.5 ± 0.4	9.3 ± 0.5	9.4 ± 0.5	9.3 ± 0.6	9.3 ± 0.2	9.8 ± 1.0	9.1 ± 0.6	10.9 ± 0.5	$16 \pm 2^*$
MG-H1	8.8 ± 0.1	9.4 ± 0.5	9.7 ± 0.7	9.4 ± 0.4	9.6 ± 0.4	9.9 ± 0.7	9.3 ± 0.5	11.4 ± 0.6	$19 \pm 2^{**}$
MG-H3	0.25 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.34 ± 0.02	$0.60 \pm 0.03^{**}$
CML ^b	2.3 ± 0.2	2.9 ± 0.5	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.1	2.8 ± 0.4	3.4 ± 0.5	4.0 ± 0.6	4.9 ± 0.6	6.3 ± 0.6
GALA	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.24 ± 0.03	0.33 ± 0.04
CMA	0.40 ± 0.03	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.50 ± 0.03	$0.72 \pm 0.06^{*}$
G-H3 ^{b,c}	2.2 ± 0.2	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.6 ± 0.4	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.3	3.0 ± 0.2	$3.7 \pm 0.1*$
N ⁶ -formyl lysine	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	$3.0 \pm 0.2^{**}$
N ⁶ -acetyl lysine	1.8 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.1 ± 0.4	2.2 ± 0.2	2.7 ± 0.3
pyrraline	10.6 ± 0.8	10.6 ± 0.3	10.7 ± 0.9	10.7 ± 0.7	10.6 ± 0.5	10.6 ± 0.4	11.5 ± 0.5	15.2 ± 0.9	46 ± 5**
Mean values \pm standard deviation ($n = 3$); statistical significance between prebaking and baking: * $P \le 0.05$ and ** $P \le 0.01$. ^b from acid hydrolysis.									

^cSum parameter for dihydroxyimidazolidine and CMA.

down, possibly frozen, and then packed for storage and transportation. The prebaked product is ultimately finished in a shop or by the consumer at around 190 $^{\circ}$ C for additional 10 min (5).

The change of sugars, furfurals, 1,2-dicarbonyl compounds, and AGEs was monitored in each step of the industrial production line (Table 5). To get first insights toward the effective consumer product, the final baking step (5) was here realized with a professional baking oven such as those found in today's convenience food shops. Levels of reducing sugars increased tremendously within the first 10 min after dough preparation, clearly indicating activity of endogenous wheat amylases as soon as water was added to the flour.²⁴ The oligosaccharides maltotriose and maltotetraose have to be attributed to the α -amylase activity toward amylose and increased by a factor of 10 to 1.6 g/kg. Over the whole process, both compounds continued to slightly increase due to the heat stability of α -amylase. Maltose was elevated by a factor of 30 to 60 g/kg due to β -amylase activity, representing the most abundant reducing carbohydrate in the dough. Glucose was raised by a factor 50 to 10 g/kg by glucoamylase activity.

Sucrose as a nonreducing sugar, which is also present in wheat flour $(2-3 \text{ g/kg})^{24}$ and a fermentable substrate for yeast, cannot be detected by our derivatization method. However, doubling of glucose after 60 min of fermentation (3.2) suggests sucrose hydrolysis by yeast invertase. During the first 5 min of baking, glucose levels decreased drastically (4.1). Obviously, the high reactivity of reducing monosaccharides leads instantly to Maillard-triggered degradation reactions via Schiff base and Amadori compound formation. On the contrary, maltose levels doubled and reached a maximum of 120 g/kg. Here, the temperature increase led to optimal β -amylase activity during the initial minutes of baking so that the release of maltose by far exceeded its degradation, which can be seen in the late stages of prebaking and baking. In addition, as long as hexoses are available, maltose is not consumed by yeast due to a lack of transporter proteins, explaining the relatively constant levels during the fermentation process.²⁴ The content of pentoses in wheat bread rolls was only negligible (<0.5 g/kg). As expected, formation of the furan derivatives HMF and furfural by cyclization and dehydration did not begin until baking time proceeded further (4.2) and elevated significantly during the

final baking step (5). Short-chained 1,2-dicarbonyl compounds $(C_{2-5} \text{ carbon backbone})$ were only detectable after the thermal impact, while dicarbonyls with an intact carbon backbone (C₆ or C₁₂) were already detectable in the raw dough (1) but did not markedly change until baking. As an exception, only MGO as a short-chained dicarbonyl (C3 backbone) started to show up during fermentation (3.2) at levels between the LOD and LOQ, supporting our hypothesis that yeast metabolism contributes to the AGE formation and profile in baked breads. Surprisingly, AGEs were clearly present from the very beginning of the technology, indicating that flour proteins must be already modified by Maillard processes in the plant under physiological conditions. Indeed, recent publications have reported that plant proteins are essentially strongly glycated compared to the mammalian situation, implying a potential role in plant regulatory and signaling biochemical pathways.²⁵ In the present investigation, the concentrations of AGEs, as well as of 1,2-dicarbonyl precursor compounds and furfural structures, increased significantly with the final baking step (5).

Baking of Prebaked Bread Rolls. Thus, to gain further insights into the mechanistic relationships between precursor structures, reaction conditions, and protein modification, the final baking was monitored in a more time-resolved manner. In this case, prebaked wheat bread rolls were obtained from a local supermarket and heated at 200 °C in a laboratory drying oven. It has to be noted that these roles were of a different brand, and thus, the deviation in monitored analyte concentrations in absolute numbers was to be expected because of differences in the recipe and technology. It is also clear that reactive intermediates such as dicarbonyl compounds will react away during transport and storage times, resulting in lower concentrations in the consumer prebaked product. This can be seen, for example, for glyoxal (GO) and MGO with values of 1.4 and 2.1 mg/kg, respectively, in the freshly produced prebaked roll versus values below the LOD at the time of purchase. Otherwise, trends and ranges were fully comparable. In addition to above parameters, crumb and crust temperatures, loss of water, and surface color were monitored during baking from 0 to 21 min (Figure 1). The surface temperature passed 100 °C at 12 min but did not exceed 120 °C even after 21 min. In parallel, the core temperature increased until 9 min and then remained almost stable at 80 °C. The maximum evaporation from the crust causes a water gradient toward the crumb, whereby water is transported to the outside.²⁶ This convection within the bread rolls keeps the inner temperature well below the boiling point of water on one hand. On the other hand, evaporating water with a temperature of 100 °C cools the outer layer, affecting only a moderate increase of the surface temperature.²⁷ Parallel measurement of the water loss proved that this process properly started after 9 min when the surface temperature reached 100 °C. Exactly after this initial phase, when the total moisture dropped under 30%, browning of the crust was evoked, which is a direct indicator for Maillard processes. Browning strongly correlated to water loss, which is in accordance with the findings of Purlis and Salvadori.²⁸ Obviously, Maillard reaction in bakery products depends primarily on the moisture content, while temperature influences the reaction rate.

The course of reducing carbohydrate formation during finishing (0-21 min) is displayed in Figure 2A. As discussed for dough preparation, endogenous enzymes lead to the release of low molecular sugars from starch. Maltose was the

F



Figure 1. Physical parameters during baking of prebaked wheat rolls. (A) \blacktriangle Crust temperature, \bigtriangleup crumb temperature. (B) \diamondsuit Loss of water, and \blacklozenge browning.



Figure 2. Formation of reducing sugars and furanoic compounds during baking of prebaked wheat rolls. (A) \blacksquare Glucose, \square maltose, \checkmark maltotriose, and \bigtriangledown maltotetraose. (B) \bullet HMF and \bigcirc furfural.

predominant sugar, increasing by 170%, almost in parallel to the much lower levels of maltotriose, maltotetraose, and glucose. These reactions take place as long as enzymes are not inactivated by heat during baking. The inactivation range of cereal β - and α -amylase is 58–72 and 72–85 °C,

In general, levels of 1,2-dicarbonyl compounds remained unchanged during the initial phase and rose strongly during the last minutes. Dicarbonyls with a C_6 carbon backbone derived from hexoses are displayed in Figure 3A, with 3-deoxygluco-



Figure 3. Formation of 1,2-dicarbonyl compounds during baking of prebaked wheat rolls. (A) \triangle 3-DG, \bigtriangledown glucosone, and \blacktriangle 1-DG. (B) \checkmark Pyruvate, \bigcirc MGO, and \blacklozenge GO.

sone (3-DG) showing the highest concentrations. The initial level of 10 mg/kg resulted from the fermentation and prebaking process, as discussed above. The much lower, at later baking times, rather decreasing concentrations of 1deoxyglucosone (1-DG, from <LOD via 1.6 to 0.7 mg/kg) and glucosone (from 3.3 via 4.5 to 3.4 mg/kg) are anticipated and have to be attributed to their well-known, much higher reactivity as reductone structures are highly prone to amine- or oxidatively induced degradations.³¹ The situation of the shortchained dicarbonyl structures GO and MGO is different (Figure 3B), which can be seen by their totally deviating formation pattern compared to that of all other dicarbonyls monitored. These structures not only are formed from Maillard processes via fragmentations, for example, retro-aldol reactions, but can also originate from fat peroxidation (GO) or from biochemical pathways (MGO). Specifically, the formation of GO in heat-stressed lipid food commodities and the high impact of fat peroxidation-related GO generation on CML formation even at low temperatures have been established.^{32,3} On the other hand, MGO is known to rise to a major extent both enzymatically and nonenzymatically from triose phos-phates during glycolysis.³⁴ While yeast is inactivated above 60 °C,²⁹ these pathways remain active even at higher temperatures. The likely thermal disruption of the yeast cells might therefore explain the marked increase of MGO starting from

pubs.acs.org/JAFC

12 min, particularly since the end product of glycolysis pyruvate increased almost in parallel.

Figure 4 shows the levels of 1,2-dicarbonyl compounds specifically derived from maltose chemistry. Dicarbonyls with



Figure 4. Formation of 1,2-dicarbonyl compounds derived from maltose during baking of prebaked wheat rolls. (A) \bigvee 3-DMal, \bigtriangledown maltosone, \oplus 3-DP, and \bigcirc 3,4-DDP. (B) \blacklozenge 1-DMal and \diamondsuit 1,5-DDMal.

an intact carbon backbone (C₁₂), namely, 3-deoxymaltosone (3-DMal), 1-deoxymaltosone (1-DMal), and its dehydration follow-up product 1,5-dideoxymaltosone-4-ene (1,5-DDMal), were the most dominant dicarbonyls in baked rolls, reaching levels of almost 1200 mg/kg in sum. While the time course of 3-DMal and maltosone basically reproduced that of 3-DG and glucosone, respectively, 1-DMal and 1,5-DDMal behaved differently to 1-deoxyglucosone. Here, the stability results from the glucose unit at position four hindering any enolization along the carbon backbone. Maltosone is not accumulating as it is the only structure with a reductone moiety, allowing scissions as hydrolytic β -fragmentations to give 3-deoxypentosone (3-DP) and formic acid. With final levels also around 10 mg/kg, the other maltose-specific C5dicarbonyl 3,4-dideoxypentosone showed up only in the finishing heating step (Table 5). It has so far not been mechanistically resolved, but it must be generated by redox processes in the late stages of baking. Interestingly, the herein found relative concentrations of all six structures basically resemble the results of a mechanistic study conducted with maltose and lysine in a buffered aqueous model system by Smuda and Glomb and now prove these results for the first time in an authentic food matrix.²¹ This is particularly notable as the used incubations setup at 50 °C with pH 7.4 differs strongly from the present baking conditions and also as cyclization and condensation reactions leading to, for example, maltol might dominate at high temperatures.

As a result of the reaction between reactive dicarbonyl precursor compounds and cereal proteins, there was a

https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07614 J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX-XXX

G
pronounced formation of AGEs during the final stages of the finishing baking step (Figure 5). All AGEs monitored, except



Figure 5. Formation of Amadori products measured as furosine and AGEs during baking of prebaked wheat rolls. (A) ● CEL, $\bigcirc N^6$ -lactoyl lysine, \Box MG-H1, \star CEA, and \blacksquare MG-H3. (B) ◆ CML, \diamondsuit GALA, \checkmark CMA, and \bigtriangledown G-H3. (C) ● pyrraline, \times furosine, $\blacktriangle N^6$ -formyl lysine, and $\bigtriangleup N^6$ -acetyl lysine.

for glyoxal-specific imidazolinone G-H3, showed this increase after the initiation phase until 9 min from levels approximately already being present endogenously in the flour, as discussed above. This indicates that these reactions take place preferably at the crust surface in parallel to browning.

Development of MGO-specific AGEs is displayed in Figure 5A. The arginine modifications MG-H1 and CEA were predominant and present since prebaking at levels around 4 mg/kg. After 9 min, when MGO was also detectable, levels rose in parallel to that of MGO and reached a maximum of 8.5 mg/kg. MG-H1 and CEA are derived from MG-H3, which is the kinetically controlled product from the reaction between arginine and MGO. CEA is the open-chain intermediate of N^7 -*exo*-cyclic MG-H1 and N^7 -*endo*-cyclic MG-H3.¹⁶ Both the thermodynamically stable structures MG-H1 was the expected main product due to water loss during baking. In support to the above-described mechanism, MG-H3 was only found at minor concentrations (0.3–0.7 mg/kg). However, it has to be stated that although these arginine–MGO adducts are termed

н

pubs.acs.org/JAFC

as AGEs, they are still reactive compounds due to the described equilibrium. This is also reflected by various halflives reported in the literature³⁵ and, in the present report, by their obvious decline at prolonged heating times at 21 min, although the MGO concentration was still rising (Figure 3B). CEL and N⁶-lactoyl lysine are exclusively formed by MGO via isomerization of the intermediate imine where CEL is the major product. Our findings in bread rolls were in good accordance, giving values for CEL and N⁶-lactoyl lysine as 2.9 and 0.06 mg/kg (21 min), respectively. Additionally, two structures recently discovered by our working group, N⁶-pyruvoyl lysine³⁶ and MOLA,³⁷ were identified and quantitated in the food matrix for the first time. Again, both MGO-derived structures correlated to MGO formation during baking (for better clarity, the time course is not shown in Figure 5A), reaching levels of 0.16 and 0.18 mg/kg (21 min), respectively. Although, Nº-lactoyl lysine, Nº-pyruvoyl lysine, and MOLA were not of quantitative importance, these amide AGEs underlined the relevance of MGO released in bread rolls during baking, leading to irreversible protein modifications.

Besides MGO-specific compounds, AGEs derived from glyoxal (GO) were monitored (Figure 5B). Both GALA and CMA are exclusively formed from GO.^{12,13} However, CML also results from oxidative fragmentation reactions of Amadori products. As expected, CML was a major modification in bread rolls. Levels in prebaked goods were around 3.2 mg/kg (0-9 min) and doubled within the last minutes of baking (6.9 mg/ kg, 21 min). In contrast, levels of GALA and CMA only slightly increased, verifying CML formation from other precursors than GO. This was in support to the rather low GO levels compared to that of other dicarbonyls discussed above. GO hydroimidazolone G-H3 can be regarded as a sum parameter of 5-(4,5-dihydroxy-2-imino-1-imidazolidinyl)norvaline (dihydroxyimidazolidine) and CMA, which is formed from both structures under the harsh conditions of acid protein hydrolysis.¹³ Dihydroxyimidazolidine is the kinetically controlled initial reaction intermediate of GO and arginine where GO is bound reversibly to the N5-guanidino group reacting slowly to the thermodynamically stable CMA. The consistent decrease of G-H3 from 4.6 to 2.4 mg/kg during baking therefore suggested a significant deterioration of the reactive dihydroxyimidazolidine intermediate to unknown structures under possible release of glyoxal at baking conditions.

Figure 5C shows AGEs derived from the C6- and C12dicarbonyl chemistry. In the case of amide modifications, N⁶formyl lysine and N⁶-acetyl lysine, β -dicarbonyl cleavage was shown to be the central reaction mechanism. Both compounds were of quantitative relevance in bread rolls, and their levels doubled to about 1.8 mg/kg during baking. Specifically, N6formyl lysine is formed from glucosone or maltosone and increased from 12 min, in line with the decrease of both dicarbonyls. N⁶-Acetyl lysine originates from 1-deoxyosones. Thus, 1-DG was likely the main precursor in bread rolls since 1-deoxypentosone and 1-deoxythreosone were not detected and glucose was the major monosaccharide. 1-DMal cannot account for N^6 -acetyl lysine formation because position four is blocked by a glucose unit, allowing no isomerization prerequisite for β -cleavage. Furosine is an artifact formed during acid hydrolysis from Amadori products by about 40 mol Thus, levels help in estimating quantitative formation and degradation of this early Maillard reaction product. Surprisingly, levels increased continuously, starting at 12 min to about 82 mg/kg at 21 min, and no degradation was observed.

https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07614 J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX-XXX

pubs.acs.org/JAFC

Article

	bread type					
analyte [mg/kg whole bread]	wheat bread	rye bread	brown bread	pumpernickel	crispbread (fermented)	crispbread (nonfermented)
		amadori j	product (determin	ned as furosine ^b)		
mg/kg whole bread	61 ± 11	58 ± 10	31 ± 7	163 ± 20	124 ± 21	$165 \pm 30^{*}$
mg/kg protein	689 ± 124	953 ± 164	395 ± 89	3109 ± 381	1547 ± 262	1798 ± 327
AGEs—MGO-derived						
CEL^{b}	2.3 ± 0.4	2.1 ± 0.3	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.3	$8.1 \pm 0.7^{**}$	4.9 ± 0.3
N ⁶ -lactoyl lysine	0.15 ± 0.03	0.22 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.16 ± 0.02	$0.72 \pm 0.1^*$	0.44 ± 0.05
CEA	15 ± 2	11 ± 1	19 ± 3	18 ± 3	$13 \pm 2^{*}$	7 ± 1
MG-H1	18 ± 3	13 ± 2	26 ± 4	21 ± 4	$27 \pm 4^{*}$	14 ± 2
MG-H3	0.51 ± 0.07	0.36 ± 0.04	0.72 ± 0.10	0.59 ± 0.11	0.30 ± 0.05	0.28 ± 0.04
AGEs-GO-derived						
CML^{b}	4.5 ± 1.3	5.1 ± 1	4.9 ± 1.5	5.2 ± 0.6	7.7 ± 0.7	$10.4 \pm 0.8*$
GALA	0.26 ± 0.06	0.34 ± 0.06	0.44 ± 0.11	0.23 ± 0.02	0.59 ± 0.08	0.59 ± 0.06
CMA	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3
G-H3 ^c	4.3 ± 0.8	5.2 ± 0.9	5.4 ± 1.0	5.5 ± 0.7	5 ± 1.7	3.8 ± 1.4
other AGEs						
N ⁶ -formyl lysine	3.2 ± 0.6	3.5 ± 0.4	3.5 ± 0.6	2.8 ± 0.1	5.1 ± 0.5	5.6 ± 0.6
N ⁶ -acetyl lysine	3.0 ± 0.4	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.5 ± 0.2	3.6 ± 0.4	3.2 ± 0.4
pyrraline	36 ± 8	28 ± 4	45 ± 10	34 ± 6	$78 \pm 12^{*}$	42 ± 5
			total AGE con	ntent		
mg/kg whole bread	87	69	109	92	149	92
mg/kg protein	984	1135	1395	1763	1857	1004
^a Levels are given as mean valu	ies + standard d	eviation $(n = 5)$	statistical signif	icance between v	east-leavened and unleav	ened crispbread: $*P < 0.05$

Table 6. Amadori Product and AGE Levels^{*a*} in Different Bread Types

"Levels are given as mean values \pm standard deviation (n = 5); statistical significance between yeast-leavened and unleavened crispbread: * $P \le 0.05$ and ** $P \le 0.01$. ^bFrom acid hydrolysis. ^cSum parameter for dihydroxyimidazolidine and CMA after acid hydrolysis.

I.

Obviously, accelerated enzymatic breakdown of starch to glucose, maltose, and oligosaccharides (as shown above) provided sufficient amounts of reducing sugars for Amadori product formation. Pyrraline was the most abundant modification found in baked bread rolls. Initial levels of 6 mg/kg from the prebaking process rose intensely from 12 min and reached 33 mg/kg after 21 min. The formation rate was identical to that of 3-DG and 3-DMal, which are the main precursors, and directly related to that of the precursor Amadori products measured here as furosine.⁶ Concurrently, the O-analogue of protein-bound pyrraline, HMF, showed the same behavior, giving levels around 65 mg/kg (Figure 2B), which was in accordance with the findings of other groups.^{38,39} Additionally, levels of the lysine-arginine cross-link DODIC which is also derived from 3-DG tripled during baking and reached 0.42 mg/kg (graphics not shown). Consequently, DODIC and MOLA were the only relevant AGE protein crosslink structures in wheat bread rolls, indicating 3-DG and MGO as superior intermediates. Besides HMF, furfural formation was of particular interest. Although pentoses were only present in negligible amounts (<0.3 mg/kg), furfural levels reached 35 mg/kg after 21 min. This finding can thus solely be explained by the disaccharide chemistry where 3-DP (C₅ backbone) was generated via above-discussed β -dicarbonyl fragmentation during maltose degradation.

In conclusion, two principle pathways of 1,2-dicarbonyl formation gave distinction to the AGE spectrum in baked wheat bread rolls: (1) formation of MGO from yeast via thermal triose phosphate degradation and reaction with primarily arginine side chains. (II) Formation of 3-deoxyglycosones (3-DG, 3-DMal) arising from both enzymatic and thermal starch degradation to give pyrraline as the main protein modification. Maltose was by far the most prevalent reducing sugar in wheat rolls, so that other specific follow-up intermediates such as maltosone and 3-DP also gave rise to

distinct products (N^6 -formyl lysine and furfural) following discrete mechanisms in Maillard reactions.

AGE Levels in Different Bread Types. The very recent call to establish quality criteria for studies on dietary glycation compounds and human health from the Senate Commission on Food Safety of the German Research Foundation resulted from a highly unsatisfying picture of the AGE literature in respect to analytical procedures and concluded on structurebased approaches to give a reliable food database for structure-activity-based argumentations.⁹ This is especially true for enzyme-linked immunosorbent assays used to access a general "AGE content" frequently utilized as a background for nutritional dietary recommendations. In sight of the present publication on AGE formation in bread, structure-based literature on a qualitative and quantitative level is extremely sparse, reporting only on five parameters in mainly white bread. White bread is a popular bread type in many parts of the world and refers to a yeast-leavened wheat bread with similar recipes and technologies as the abovementioned wheat bread rolls. Values given for furosine (1254-2081 mg/kg protein),³⁸ CML (3.1–12.9 mg/kg bread),^{40–42} CEL (1.3 mg/kg bread),⁴² MG-H1 (21 mg/kg bread),⁴² and pyrraline (6–56 data for rolls.

In the most recent effort to generate a solid data basis for dietary AGEs by Scheijen et al., the authors compromised on three major analytes, CML, CEL, and MG-H1, which can be accessed after acidic protein hydrolysis.⁴² They established a solid analytical procedure to cope for artifact formation during hydrolysis by reduction and for significant losses of acid-labile MG-H1 by using stable isotope dilution analysis. On the other hand, they extracted the protein fraction by an alkaline borate buffer and precipitation by trifluoroacetic acid or methanol– chloroform, but data on the absolute efficacy of protein extraction were never given. In contrast, Hellwig and Henle

> https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07614 J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX-XXX

had to choose an enzymatic protein digestion protocol to monitor for acid-labile pyrrol AGEs as pyrraline in foods, including a solid characterization of the protein extraction step. 43

Considering the lacking information in the literature, we screened five commonly consumed German bread types for their AGE levels on a qualitative and quantitative basis following our analytical protocol with the optimized extraction protocol for cereal proteins (Table 6). In total, five different breads for each category were obtained from local bakeries and analyzed in triplicate. Bread manufacturing in Germany is more diverse compared to that in other parts of the world. This includes in addition to variation in the technology and basic ingredients the use of various additives including shortenings to improve, for example, color formation or dough rheology. Most obvious is the use of sourdough not only for rye bread and brown bread with varying amounts of wheat and rye but also for wheat bread to facilitate taste and aroma formation in contrast to white bread depending solely on yeast fermentation. Sourdough is a complex mixture containing yeast and LAB. In general, fermentation by yeast (1-2 h) is faster than that by LAB (8-144 h) due to a higher metabolic activity, but the diversity of LAB leads to a broader spectrum of precursor compounds.⁴⁴ Hence, in theory, the resulting AGE patterns of baked goods are expected to differ. However, based on the common practice to use sourdough for all types of breads, no significant differences were monitored in wheat versus brown versus rye bread, with the total AGE content from 69-109 mg/kg bread and 984–1395 mg/kg protein. Absolute numbers and the ratio between AGEs were similar to those of wheat bread rolls.

The technology of pumpernickel production is different. This bread type is made of wholemeal rye sourdough and baked at relatively low temperatures of 100-120 °C for up to 36 h. In closed steam ovens, it is more cooked than baked, which significantly prolongs the enzymatic phase, leading to extensive starch degradation to reducing sugars. The most obvious effect is an intense browning by melanoidins and the sweetish taste. This resulted in significantly raised Amadori product levels of about 163 mg/kg bread compared to 31-61 mg/kg for wheat, brown, and rye bread. Interestingly, the absolute and relative AGE data on a mg/kg bread level were very similar to that of the other bread types but significantly higher expressed as mg/kg protein (1763 vs 984-1395) due to the higher Maillard reaction rates. Another specialty type of bread is crispbread, which is commonly produced from wholemeal rye flour and baked at much higher temperatures of up to 360 °C from dough with comparably low water content. In addition, there are two major varieties available, unfermented and yeast/sourdough fermented. This opened the chance to test for our hypothesis that fermentative metabolic intermediates have a major impact on the AGE profile. Indeed, specifically MGO-derived modifications were significantly higher (74%) in fermented crispbreads compared to that in unfermented (Table 6), while GO-related AGEs were not affected. As a single parameter within this group, CML was significantly raised in nonfermented samples by about 34%. However, as discussed above, in this case, formation pathways are more diverse and not specific for GO, that is, this increase correlated to the about 33% higher values for Amadori products. Obviously, in fermented crispbreads, reducing sugars were diminished due to the microbial/enzymatic action to, for example, MGO leading to related AGEs but also to precursors for pyrraline, which was significantly raised by about 87% in leavened samples.

In summary, the present paper for the first time considerably widens the knowledge on AGE profiles in breads based on an optimized extraction method for cereal protein. Especially for the production of wheat bread rolls, a comprehensive analysis of all parameters involved including reducing sugars, dicarbonyl compounds, and furanoic structures following all technological steps provided a completed picture. Following this notion, future research should include model baking experiments to give specific insights into the influence of sourdough versus yeast-only on AGE formation and also into the influence of fermentation time and backing temperature.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c07614.

Schematic illustration of the industrial baking process for wheat rolls (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Marcus A. Glomb – Institute of Chemistry—Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle/Saale D-06120, Germany; o orcid.org/0000-0001-8826-0808; Phone: +49-345-5525 784; Email: marcus.glomb@ chemie.uni-halle.de; Fax: +49-345-5527 341

Authors

- Tobias Jost Institute of Chemistry—Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle/Saale D-06120, Germany; o orcid.org/0000-0001-7871-1345
- Christian Henning Institute of Chemistry—Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle/Saale D-06120, Germany; o orcid.org/0000-0003-3109-8330
- Thomas Heymann Institute of Chemistry—Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle/Saale D-06120, Germany; Octid.org/0000-0002-9472-8611

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.0c07614

Notes

J

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank V. Dürkob and H. Coldewey from the Harry-Brot GmbH, Schenefeld, Germany, for providing the sample material and Dr. A. Kramell from the Institute of Organic Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle/ Saale, Germany, for performing color measurements of prebaked bread rolls.

ABBREVIATIONS

AGE, advanced glycation end product; CEA, N^7 -carboxyethyl arginine; CEL, N^6 -carboxyethyl lysine; CMA, N^7 -carboxymethyl arginine; CML, N^6 -carboxymethyl lysine; 1-DG, 1-deoxyglucosone; 3-DG, 3-deoxyglucosone; 3-DP, 3-deoxypentosone; 3,4-DDP, 3,4-dideoxypentosone; 1-DMal, 1-deoxymaltosone; 3-DMal, 3-deoxymaltosone; 1,5-DDMal, 1,5-

https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07614 J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

dideoxymaltosone-4-ene; DODIC, 3-deoxyglucosone-derived imidazoline cross-link; GALA, N^6 -glycoloyl lysine (glycolic acid lysine amide); G-H3, glyoxal hydroimidazolone; GO, glyoxal; leu-eq, leucine-equivalents; HMF, 5-hydroxymethylfurfural; LAB, lactic acid bacteria; MG-H1/3, methylglyoxal hydroimidazolone 1/3; MGO, methylglyoxal; MODIC, methylglyoxal-derived imidazoline crosslink; MOLA, methylglyoxal lysine amide; n. d., not detectable.

REFERENCES

(1) Hellwig, M.; Henle, T. Baking, ageing, diabetes: a short history of the Maillard reaction. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 10316–10329.

(2) Cho, I. H.; Peterson, D. G. Chemistry of bread aroma: a review. Food Sci. Biotechnol. 2010, 19, 575–582.

(3) Pico, J.; Bernal, J.; Gómez, M. Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: a review. *Food Res. Int.* **2015**, *75*, 200–215.

(4) Stadler, R. H. Food process contaminants. In *Food-Borne Toxicants: Formation, Analysis, and Toxicology*; Granvogl, M., MacMahon, S., Eds.; ACS symposium series 1306; Amercian chemical society: Washington, DC, 2019; pp 1–15.

(5) Guilbaud, A.; Niquet-Leridon, C.; Boulanger, E.; Tessier, F. How Can Diet Affect the Accumulation of Advanced Glycation End-Products in the Human Body? *Foods* **2016**, *5*, 84.

(6) Hohmann, C.; Liehr, K.; Henning, C.; Fiedler, R.; Girndt, M.; Gebert, M.; Hulko, M.; Storr, M.; Glomb, M. A. Detection of Free Advanced Glycation End Products in Vivo during Hemodialysis. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 930–937.

(7) Tessier, F. J.; Niquet-Léridon, C.; Jacolot, P.; Jouquand, C.; Genin, M.; Schmidt, A.-M.; Grossin, N.; Boulanger, E. Quantitative assessement of organ distribution of dietary protein-bound ¹³Clabeled N^e-carboxymethyllysine after oral exposure in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 2446–2456.

(8) Hellwig, M.; Auerbach, C.; Müller, N.; Samuel, P.; Kammann, S.; Beer, F.; Gunzer, F.; Henle, T. Metabolization of the Advanced Glycation End Product N-*e*-Carboxymethyllysine (CML) by Different Probiotic E. coli Strains. J. Agric. Food Chem. **2019**, 67, 1963– 1972.

(9) Hellwig, M.; Humpf, H.-U.; Hengstler, J.; Mally, A.; Vieths, S.; Henle, T. Quality Criteria for Studies on Dietary Glycation Compounds and Human Health. J. Agric. Food Chem. 2019, 67, 11307–11311.

(10) Henning, C.; Glomb, M. A. Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. *Glycoconjugate J.* 2016, 33, 499–512.
(11) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of protein

modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. J. Biol. Chem. **1995**, 270, 10017–10026.

(12) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides are novel protein modifications formed by physiological sugars. J. Biol. Chem. 2001, 276, 41638-41647.

(13) Glomb, M. A.; Lang, G. Isolation and Characterization of Glyoxal–Arginine Modifications. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 1493–1501.

(14) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose in the presence of lysine leads to formation of carboxylic acid amides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6458–6464.

(15) Henle, T.; Zehetner, G. n.; Klostermeyer, H. Fast and sensitive determination of furosine. Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 1995, 200, 235–237.

(16) Klöpfer, A.; Spanneberg, R.; Glomb, M. A. Formation of arginine modifications in a model system of N^{α} -tert-butoxycarbonyl (Boc)-arginine with methylglyoxal. J. Agric. Food Chem. **2011**, 59, 394–401.

(17) Rakete, S.; Glomb, M. A. A novel approach for the quantitation of carbohydrates in mash, wort, and beer with RP-HPLC using 1-naphthylamine for precolumn derivatization. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3828–3833.

к

(18) Rakete, S.; Klaus, A.; Glomb, M. A. Investigations on the Maillard reaction of dextrins during aging of Pilsner type beer. J. Agric. Food Chem. 2014, 62, 9876–9884.

pubs.acs.org/JAFC

(19) Biemel, K. M.; Bühler, H. P.; Reihl, O.; Lederer, M. O. Identification and quantitative evaluation of the lysine-arginine crosslinks GODIC, MODIC, DODIC, and glucosepan in foods. *Food* **2001**, *45*, 210–214.

(20) Smuda, M.; Henning, C.; Raghavan, C. T.; Johar, K.; Vasavada, A. R.; Nagaraj, R. H.; Glomb, M. A. Comprehensive analysis of maillard protein modifications in human lenses: effect of age and cataract. *Biochemistry* **2015**, *54*, 2500–2507.

(21) Smuda, M.; Glomb, M. A. Novel insights into the Maillard catalyzed degradation of maltose. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 13254–13264.

(22) Shewry, P. R.; Tatham, A. S.; Forde, J.; Kreis, M.; Miflin, B. J. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *J. Cereal Sci.* **1986**, *4*, 97–106.

(23) Petisca, C.; Henriques, A. R.; Pérez-Palacios, T.; Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O. Study of hydroxymethylfurfural and furfural formation in cakes during baking in different ovens, using a validated multiple-stage extraction-based analytical method. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3349–3356.

(24) Struyf, N.; Van der Maelen, E.; Hemdane, S.; Verspreet, J.; Verstrepen, K. J.; Courtin, C. M. Bread Dough and Baker's Yeast: An Uplifting Synergy. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16*, 850–867.

(25) Shumilina, J.; Kusnetsova, A.; Tsarev, A.; Janse van Rensburg, H. C.; Medvedev, S.; Demidchik, V.; Van den Ende, W.; Frolov, A. Glycation of plant proteins: regulatory roles and interplay with sugar signalling? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2366.

(26) Soleimani Pour-Damanab, A.; Jafary, A.; Rafiee, S. Kinetics of the crust thickness development of bread during baking. J. Food Sci. Technol. 2014, 51, 3439–3445.

(27) Chevallier, S.; Della Valle, G.; Colonna, P.; Broyart, B.; Trystram, G. Structural and chemical modifications of short dough during baking. *J. Cereal Sci.* **2002**, *35*, 1–10.

(28) Purlis, E.; Salvadori, V. O. Bread browning kinetics during baking. J. Food Eng. 2007, 80, 1107–1115.

(29) Martínez-Anaya, M. A. Enzymes and Bread Flavor⁺. J. Agric. Food Chem. **1996**, 44, 2469–2480.

(30) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Degradation of oligosaccharides in nonenzymatic browning by formation of α -dicarbonyl compounds via a "peeling off" mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 6219–6226.

(31) Gobert, J.; Glomb, M. A. Degradation of Glucose: Reinvestigation of Reactive α-Dicarbonyl Compounds[†]. J. Agric. Food Chem. **2009**, 57, 8591–8597.

(32) Jiang, Y.; Hengel, M.; Pan, C.; Seiber, J. N.; Shibamoto, T. Determination of Toxic α -Dicarbonyl Compounds, Glyoxal, Methylglyoxal, and Diacetyl, Released to the Headspace of Lipid Commodities upon Heat Treatment. J. Agric. Food Chem. **2013**, 61, 1067–1071.

(33) Fu, M.-X.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. The advanced glycation end product, N^e-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 9982–9986.

(34) Thornalley, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* **1996**, *27*, 565–573.

(35) Ahmed, N.; Argirov, O. K.; Minhas, H. S.; Cordeiro, C. A. A.; Thornalley, P. J. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N ϵ -carboxymethyl-lysine- and N ϵ -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.* **2002**, 364, 1–14.

(36) Baldensperger, T.; Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Novel α -Oxoamide Advanced-Glycation Endproducts within the N⁶-Carboxymethyl Lysine and N⁶-Carboxyethyl Lysine Reaction Cascades. J. Agric. Food Chem. **2018**, 66, 1898–1906.

https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07614 J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Article

pubs.acs.org/JAFC

Article

(37) Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Rat Tail Collagen and Correlation to Tendon Stiffening. J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 3957–3965.

(38) Ramírez-Jiménez, A.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Browning Indicators in Bread. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 4176-4181.

(39) Capuano, E.; Ferrigno, A.; Acampa, I.; Ait-Ameur, L.; Fogliano, V. Characterization of the Maillard reaction in bread crisps. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *228*, 311–319.

(40) Assar, S. H.; Moloney, C.; Lima, M.; Magee, R.; Ames, J. M. Determination of N^e-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino Acids* **2009**, *36*, 317–326.

(41) Hull, G. L. J.; Woodside, J. V.; Ames, J. M.; Cuskelly, G. J. Νε-(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. *Food Chem.* **2012**, *131*, 170–174.

(42) Scheijen, J. L. J. M.; Clevers, E.; Engelen, L.; Dagnelie, P. C.; Brouns, F.; Stehouwer, C. D. A.; Schalkwijk, C. G. Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry: presentation of a dietary AGE database. *Food Chem.* **2016**, *190*, 1145–1150.

(43) Hellwig, M.; Henle, T. Quantification of the Maillard reaction product 6-(2-formyl-1-pyrrolyl)-L-norleucine (formyline) in food. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, 235, 99–106.

(44) Gänzle, M. G. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiol.* **2014**, *37*, 2–10.

https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07614 J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Reprinted with permission from Jost T., Henning C., Heymann T., Glomb M. A. Comprehensive Analyses of Carbohydrates, 1,2-Dicarbonyl Compounds and Advanced Glycation Endproducts in Industrial Bread Making. J. Agric. Food Chem. 2021, XX, XXXX–XXXX. Copyright 2021 American Chemical Society.

L