

Aminosäuren und aromatische Acyloine bei
Wildhefen und *Saccharomyces cerevisiae*

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

Genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin

Ulla Richter

geboren am 9. Januar 1968 in Berlin-Wilmersdorf

Referent: Prof. Dr. Dr. R.G. Berger, Institut für Lebensmittelchemie,
Universität Hannover

Coreferent: Prof. Dr. T. Scheper, Institut für Technische Chemie,
Universität Hannover

Datum der Promotion: 27.04.1998

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VII
Danksagung	IX
1. Einleitung	
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.2 Zielsetzung	3
2. Ergebnisse	
2.1 Durchführung der Analyse	5
2.2 Standardmedium, SNLH	5
2.3 Komplexmedien mit Hefeextraktzusatz	6
2.3.1 Zusatz von Threonin	6
2.3.1.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte	13
2.3.1.2 Wachstum	13
2.3.1.3 Aminosäureverbrauch	13
2.3.1.4 pH-Verlauf	21
2.3.2 Zusatz von Glutamin	21
2.3.2.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte	22
2.3.2.2 Wachstum	22
2.3.2.3 Aminosäureverbrauch	29
2.3.2.4 pH-Verlauf	31
2.3.3 Zusatz von Glutamat	32
2.3.3.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte	32
2.3.3.2 Wachstum	32
2.3.3.3 Aminosäureverbrauch	34
2.3.3.4 pH-Verlauf	34
2.3.4 Interessante Verbindungen aus den Komplexmedien	35
2.4 Medien ohne Hefeextraktzusatz	40
2.4.1 Zusatz von L-Threonin	41
2.4.2 Zusatz von L-Glutaminsäure	42
2.4.2.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte	42
2.4.2.2 Wachstum	43
2.4.2.3 Aminosäureverbrauch	44
2.4.2.4 pH	44
2.4.3 Zusatz von Phenylalanin	45
2.4.3.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte	45
2.4.3.2 Wachstum	46
2.4.3.3 Aminosäureverbrauch	46
2.5 Optimierung der Medienzusammensetzung	47
2.5.1 Zusatz von weiteren Stickstoffquellen	47
2.5.1.1 Ammoniumsulfat als zusätzliche Stickstoffquelle	47
2.5.1.2 L-Alanin als zusätzliche Stickstoffquelle	49
2.5.2 Zusatz von Glucose	50

2.5.3 Zusatz von Ammoniumsulfat und Glucose	51
2.5.3.1 Gluc 5 g L ⁻¹	52
2.5.3.2 Gluc 10 g L ⁻¹	52
2.5.4 Änderung des pH-Wertes	54
2.5.5 Zusatz von EtOH, Gluc, Phe (pH = 6,0)	57
2.5.6 Zusatz von EtOH, Gluc, Phe, Ala (pH = 6,0)	58
2.6 Zusatz von weiteren Aminosäuren	61
2.6.1 Zusatz von L-Tyrosin	61
2.6.1.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte	61
2.6.1.2 Wachstum	65
2.6.1.3 Aminosäureverbrauch	65
2.6.2 Zusatz von Leucin, Isoleucin und Valin	66
2.6.2.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte	67
2.6.2.2 Wachstum	69
2.6.2.3 Aminosäureverbrauch	70
2.7 Identifizierung und Verifizierung der Strukturen von 1-HPB und 4-HPB.	70
2.7.1 Derivatisierungen	70
2.7.1.1 Derivatisierung zum Oxim	70
2.7.1.2 Silylierung	74
2.7.1.3 Reduktion	76
2.7.2 Synthese der Vergleichssubstanzen und Vergleich der NMR-Spektren	77
2.7.3 Stereochemische Untersuchungen	81
2.7.4 Stabilität von 1-HPB	81
3. Diskussion	
3.1 Enzyme mit Carboligaseaktivität	84
3.2 Kohlenstoffkettenverlängerung durch Pyruvatdecarboxylase	86
3.2.1 PDC	86
3.2.2 Biosynthese einiger Aromastoffe	90
3.2.3 Acetoin synthese	94
3.2.4 Synthese von Phenylacetylcarbinol	95
3.2.5 HPB-Synthese	97
3.2.6 Synthese von Hyd-HPB	104
3.3 Auf Acyloinkondensation untersuchte Organismen	105
3.4 Ausblick	107
4. Experimenteller Teil	
4.1 Materialien	110
4.1.1 Hefen	110
4.1.2 Lösungsmittel	111
4.1.3 Sonstige Chemikalien	111
4.1.4 Gase für die Gaschromatographie	112
4.1.5 Sonstige Hilfsmittel	113

4.2 Chromatographie	
4.2.1 Kapillargaschromatographie (HRGC)	114
4.2.1.1 HRGC mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektion (FID)	114
4.2.1.2 HRGC mit On-Column-Injektion, Flammenionisationsdetektion und olfaktorischer Detektion (GCO)	115
4.2.1.3 Präparative HRGC mit Flammenionisationsdetektion	115
4.2.1.4 HRGC-Kopplung mit Massenspektroskopie (MS)	116
4.2.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	118
4.2.2.1 Analytische HPLC	118
4.2.2.2 Semipräparative HPLC	119
4.2.3 Spektroskopische Methoden	120
4.2.3.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)	120
4.2.3.2 UV/VIS-Spektroskopie	120
4.3 Synthesen	121
4.3.1 Synthese von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon und 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	
4.3.1.1 Synthese I	121
4.3.1.2 Synthese 2	122
4.3.2 Synthese von (R,S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	123
4.4 Derivatisierungen	125
4.4.1 Acetylierung mit Pyridin	125
4.4.2 Acetylierung ohne Pyridin	125
4.4.3 Silylierung	125
4.4.4 Derivatisierung zu Oximen	126
4.4.5 Bildung von TFA-Estern	126
4.4.6 Reduktion mit NaBH ₄	126
4.5. Isolierung mittelpolarer Verbindungen aus Hefeextrakten	126
4.6 Hefekulturen	127
4.6.1 Zusammensetzung der Nährmedien	127
4.6.2 Vorkulturen	136
4.6.3 Ansetzen der Hefekulturen	137
4.6.4 Monitoring des Kulturverlaufes	137
4.6.4.1 Abfolge der Trenn- und Analysenschritte	137
4.6.4.2 Qualitative und quantitative Analyse der Metabolite	138
4.6.4.3 Bestimmung des Trockenmassegehaltes der Submerskulturen	
4.6.4.3.1 Bestimmung im Trockenschrank	138
4.6.4.3.2 Bestimmung durch Turbidimetrie	138
4.6.4.4 Bestimmung des Aminosäuregehaltes der Submerskulturen	140
5.Literatur	141
6.Anhang	161

Verzeichnis der Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALS	Acetolactatsynthase
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
B	Blindwert
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Caet	<i>Candida etchelsii</i>
Cave	<i>Candida versatilis</i>
<i>d</i>	Dublett (NMR-Signal)
δ	Chemische Verschiebung in ppm (10^6), NMR-Skala
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, NMR-Methode (^{13}C)
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
eV	Elektronenvolt
FBP	Fructose-1,6-bisphosphatase
FID	Flammenionisationsdetektor
Fit	Übereinstimmung des Massenspektrums mit dem entsprechenden Library-Vorschlag [%]
GC	Gaschromatographie (auch HRGC)
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gluc	Glucose

1-HPB	3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon
4-HPB	3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon
Hyd-1-HPB	3-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-2-butanon
Hyd-4-HPB	3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanon
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
HRGC	High Resolution Gas Chromatography
ID	innerer Durchmesser
Ile	Isoleucin
<i>j</i>	Kopplungskonstante (¹ H-NMR)
KI	Kovats Index
^L	Literatur (in Tabellen)
Leu	Leucin
Lit.	Literatur
<i>m</i>	Multiplett (NMR-Signal)
M	mol L ⁻¹ , Stoffmengenkonzentration
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
N-Quelle	Stickstoffquelle
PAC	Phenylacetylcarbinol
PDC	Pyruvatdecarboxylase
ppm	parts per million (10 ⁻⁶)
RM	Reaktionsmedium
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur

s	Singulett (NMR-Signal)
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TM	Trockenmasse
Tode	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tyr	Tyrosin
Saba	<i>Saccharomyces bayanus</i>
Sace	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SNLH	Standard Nährmedium mit Hefeextrakt
SPME	Solid Phase Micro Extraction
Val	Valin
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zyba	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
Zybi	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
Zyro	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

Zusammenfassung

Der biotechnologischen Herstellung von Aromastoffen erwächst immer mehr Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es, den Aromastoffwechsel einiger an Sherry-, Soya- und Weinherstellung beteiligter Wildhefen genauer zu betrachten. Besonderes Interesse galt hier enzymatischen Reaktionen, die Kohlenstoffketten zu neuen, chiralen Verbindungen verknüpfen oder verlängern können. Da das ganze organische Leben im Prinzip auf dem Knüpfen von C-C-Bindungen beruht, sind diese Reaktionen von allgemeinem Interesse für die organische Chemie und die Biochemie.

Hier ist besonders die Acyloinkondensation von großer Bedeutung. In dieser Reaktion werden Aldehyde durch Anlagerung von Acetaldehyd um eine C₂-Einheit zu optisch aktiven α -Ketolen verlängert.

Da auch interessante Aromastoffe wie Sotolon durch Acyloinkondensation aus Aminosäurevorstufen entstehen, sollte der Metabolismus einiger bei der Lebensmittelherstellung verwendeten Hefen auf diesen Aspekt hin genauer untersucht werden.

Dazu wurden mit insgesamt 11 Hefen, die aus Wein, Sake oder Sojasauce isoliert wurden, Supplementierungsversuche mit verschiedenen Aminosäuren durchgeführt. Verglichen wurden 7 Wildhefen und 4 "klassische" *Saccharomyces cerevisiae*-Arten. Nach Kultivierung der Hefen im Batchverfahren in definierten Medien wurde die flüchtigen Metabolite durch flüssig/flüssig-Extraktion isoliert und mit GC-MS analysiert. Gleichzeitig wurde der Kulturverlauf durch Bestimmung der Geruchseindrücke, Trockenmasse, pH-Verlauf und Substratverbrauch festgehalten.

Die Wildhefen *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces bailii* und die Weinhefe *Saccharomyces cerevisiae* 457 waren in der Lage aus den gebotenen Aminosäuren Phenylalanin die Acyloinkondensationsprodukte 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (1-HPB) und 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (4-HPB) zu bilden. Nach anfänglich gerade detektierbaren Mengen konnte der 1-HPB-Gehalt auf 36 mg L⁻¹ in einer Fed-Batch-Kultur von *Zygosaccharomyces bisporus* gesteigert werden. Die Kinetik der Produktbildung zeigte einem zum Wachstum parallelen Verlauf mit einem Maximum 5 Tage nach Erreichen der stationären Phase.

4-HPB wurde bereits in Hefekulturen nachgewiesen [73], das tautomere Produkt 1-HPB wurde bislang noch nie als Naturstoff erwähnt. In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, daß nahezu ausschließlich das Tautomer 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon in einen 88%-igen Enantiomerenüberschuß gebildet wurde, das sonst in der Literatur erwähnte 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon aber kaum vorkam. Dies steht in Widerspruch mit bereits veröffentlichten Untersuchungen und wirft ein interessantes neues Licht auf die Biosynthese dieser Substanzen.

Z. bisporus war auch in der Lage aus Tyrosin in einer analogen Kondensation Spuren von 3-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-2-butanon und 3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-butanon zu bilden. Diese beiden Verbindungen wurden noch nicht als Metabolite von Hefen beschrieben. Hier ist besonders die strukturelle Ähnlichkeit dieser Substanzen zum "Himbeerketon", 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon, hervorzuheben, einem hochaktivem, äußerst potentem Aromastoff, der die Impact-Character-Komponente von Himbeere darstellt. 3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-butanon könnte eventuell als neues Intermediat einer Biosynthese zur Herstellung dieser Substanz dienen.

Summary

The biotechnological production of flavor compounds is of ever growing importance.

The objective of this work was to explore the metabolism of some unconventional yeasts occurring in sherry-, soy sauce- and wineproduction with a particular stress on enzymatic reactions capable of creating new, chiral compounds by forming new C-C-bonds. Since all organic life is basically a matter of forming carbon-carbon-bonds, these reactions are of general interest for organic chemistry and biochemistry.

Of great importance is the acyloin condensation. In this reaction aldehydes are transformed to optically active α -ketoles by addition of acetaldehyde.

Since some interesting flavor compounds, such as sotolone are synthesized from amino acid precursors by acyloin condensation, the metabolism of some food yeasts was investigated in this regard. For this purpose 11 yeasts, 7 unconventional and 4 "classic" *Saccharomyces cerevisiae* yeasts were supplemented with various amino acids and compared. After feed-batch-cultivation in chemically defined media the volatile metabolites were isolated *via* liquid/liquid-extraction and analyzed by GC/MS. Simultaneously the course of cultivation was recorded by determining the odorous impressions, pH, dry-weight and substrate consumption.

The unconventional yeasts *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces bailii* and the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* 457 were capable of transforming the amino acid phenylalanine into the acyloins 3-hydroxy-1-phenyl-2-butanone (1-HPB) and 3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone (4-HPB). After forming barely detectable amounts in the beginning the final concentration of 1-HPB could be raised to 36 mg L⁻¹ in a feed-batch-culture of *Zygosaccharomyces bisporus*. The kinetics of product formation shows a growth related course with a maximum 5 days after entering the stationary phase.

4-HPB was previously found in yeast extract [73], the tautomere 1-HPB was never before mentioned as a natural compound. During the course of this work it could be proved that the tautomere 3-hydroxy-1-phenyl-2-butanone was nearly exclusively formed with an optical purity of 88% whereas 3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone was hardly detected. This is contradictory to former publications and spreads an interesting new light on the biosynthesis of these substances.

Z. bisporus was also capable of synthesizing 3-hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-2-butanone and 3-hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-butanone from tyrosine. These two substances were not previously identified as yeast metabolites. Notable is the structural similarity of these substances to the "raspberry ketone", 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanone, the highly potent character impact flavor compound of raspberries. In the future it might be possible to use 3-hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-butanone as an intermediate in a new biosynthetic approach.

Keywords: VOLATILE FLAVOR COMPOUNDS; UNCONVENTIONAL YEASTS; AMINO ACIDS; AROMATIC ACYLOINS; FOOD

Schlagwörter: FLÜCHTIGE AROMASTOFFE; WILDHEFEN; AMINOSÄUREN; AROMATISCHE ACYLOINE; LEBENSMITTEL

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. R.G. Berger danke ich für die Bereitstellung des Themas und für sein Geschick in organisatorischen und finanziellen Angelegenheiten, die es einem ermöglichten, unter Bedingungen zu promovieren, die man sonst wohl kaum noch an deutschen Hochschulen vorfindet.

Ich danke Herrn Dr. Dietmar Ganßer, der mich nie aufgeben ließ und immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne ihn wäre diese Arbeit niemals fertig geworden. Sein nie versiegender Einfallsreichtum und ebensolche Hilfsbereitschaft werden ihn an diesem Institut legendär werden lassen, wenn es seine liebe Art und seine Kompetenz allein nicht tun sollten.

Frau Martina Weiß vom Institut für Technische Chemie schulde ich großen Dank für die schnellen und sorgfältigen Aminosäurebestimmungen, die sie durchgeführt hat, Proben über Proben über Proben. Sie waren ein wichtiger Beitrag zu meiner Arbeit.

Frau Iris Helms von der Tierärztlichen Hochschule in Hannover möchte ich nochmals herzlich danken für die sorgfältig gemessenen NMR-Spektren. Nur einige davon zieren diese Arbeit, aber alle haben mich ein Stück weiter gebracht.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs "Chemische und technische Grundlagen der Naturstofftransformation", das mich über Jahre ernährt hat und allen Kollegen aus dem Graduiertenkolleg, für ihre Zusammenarbeit und Hilfestellungen auf fachfremden Boden und für interessante Einblicke in

andere Forschungsbereiche. Besonderen Dank an Eddy, Markus, Ina und Thorsten, live long and prosper!

Allen Kollegen am Institut für Lebensmittelchemie danke ich für das schöne, freundschaftliche Betriebsklima, die die vielen gemeinsamen Tage (und Nächte!) zusammen so angenehm machten. Elke danke ich für ihre vielen Anregung zum Thema "Nahrungszubereitung mit Alkohol", von denen wir alle gelegentlich profitierten, obwohl ich, glaube ich, von weiterem Genuß von Paradiescreme mit Baileys absehen werde - Frauke und Sabine werden mir in diesem Punkte wohl zustimmen.

Die Mittagsrunde mit vielen lustigen Gespräche rund um das Thema "die Welt im allgemeinen und Johnny Depp im besonderen" werde ich vermissen.

Meiner Familie, besonders meiner Mutter, möchte ich dafür danken, daß sie immer für mich da war. Besonders dicken Knuddel an meinem Opa, Dr. Heinz Schünemann, der mir wohl sein Interesse für Chemie vererbte und meinem Vater, der mir die finanziellen Mittel mitgab. (Was meinst Du; hat es sich gelohnt?)

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Die Herstellung von Lebensmitteln mit Hilfe von Mikroorganismen ist Jahrtausende alt. Besonders Hefen werden in großem Maßstab für die Produktion von Brot, Bier, Wein und einer Vielzahl von Biochemikalien genutzt. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist als Bäcker-, Bier- und Weinhefe der am häufigsten benutzte Mikroorganismus und vermutlich der älteste von der Menschheit genutzte. Auf Grund ihrer wirtschaftlichen Bedeutung und da diese Hefe leicht zugänglich ist, keine human-pathogene Wirkung zeigt, keine Toxine produziert und zu 40% aus Enzymproteinen besteht, ist sie zum Modellorganismus für die Untersuchung von Stoffwechselvorgängen und molekularen Mechanismen geworden. Daher ist *S cerevisiae* einer der am besten untersuchten Mikroorganismen überhaupt, was am 24. April 1996 in der ersten Veröffentlichung des kompletten Genoms eines Eukaryonten gipfelte [1-4]. Heute kann man die vollständige Sequenz des Genoms in Datenbanken abrufen. Ähnliche Bedeutung für die Entwicklung der Mikrobiologie und der Biochemie hatte nur *Escherichia coli*, als Prokaryont allerdings deutlich einfacher strukturiert.

Viele der Aromastoffe, die in alkoholischen Getränken und Brot geschätzt werden, sind Stoffwechselprodukte von *S. cerevisiae*, aber auch einige "Off-Flavor"-Noten, wie Diacetyl in Bier.

"Wildhefen", akurater vielleicht als "nonconventional yeasts" bezeichnet, d.h. alle Hefen **außer** *S. cerevisiae* erlangten erst in den letzten Jahren steigende Beachtung in der Grundlagenforschung sowie in biotechnologischen Anwendungen [5]. Momentan sind ca. 700 Species bekannt und klassifiziert, aber nur einige wenige sind allgemein bekannt.

Die biosynthetische Herstellung von Aromastoffen, sowohl mit lebenden Mikroorganismen, wie auch mit Enzymen, gewinnt immer mehr an Bedeutung [für eine Übersicht siehe 125-127].

Ein Grund dafür ist in der hohen Wertschöpfung der so gebildeten Produkte zu sehen: Mit mikrobiologischen Methoden gewonnene Aromastoffe gelten nach dem europäischem Lebensmittelrecht als "natürlich", ihr Wert ist gegenüber "naturidentischen" Aromastoffen um ein Vielfaches höher, in Einzelfällen sogar mehrere Zehnerpotenzen. Ein gern genanntes Beispiel ist das Vanillin, die "Character-Impact"-Komponente der Vanilleschote. Der Preis für synthetisches, d.h. naturidentisches Vanillin liegt bei $\$12 \text{ kg}^{-1}$, der Preis für natürliches Vanillin beträgt $\$ 4000 \text{ kg}^{-1}$ [123].

Weitere Vorteile: bei Aromastoffen handelt es sich häufig um chirale Substanzen, deren absolute Konfiguration eine wichtige Rolle bei der Geruchswahrnehmung spielt. Im Falle des Carvons (2-Methyl-5-(1-methylethenyl)-2-cyclohexenon) riecht das S-Isomer intensiv nach Kümmel, das R-Enantiomer dagegen nach Krauseminze (spearmint) [124]. Der Gebrauch von substratspezifischen Enzymen bietet sich bei der Produktion derartiger Substanzen besonders an.

Außerdem erreicht man durch biotechnologische Herstellung eine wachsende Unabhängigkeit von den ursprünglichen, natürlichen Quellen, meist exotische Pflanzen aus südlichen Ländern, aus denen die Aromastoffe durch physikalisch-chemische Prozesse (z.B. Extraktion, Destillation) gewonnen werden. Mit steigender Nachfrage kann der Bedarf häufig nicht befriedigt werden, ohne daß es zu einem schädlichen Raubbau der natürlichen Ressourcen kommt, was z.B zu einer bedrohlichen

Dezimierung des Sandelholzbaumes (*Santalum album*, *Santalaceae*) in weiten Teilen Ostasiens und Afrika geführt hat.

1.2 Zielsetzung

Während der Stoffwechsel von *S. cerevisiae* speziell unter den Bedingungen der alkoholischen Fermentation sehr gut untersucht ist, sind die metabolischen Vorgänge von Wildhefen unter aeroben Bedingungen noch weitgehend ungeklärt.

Wildhefen finden sich bei der Lebensmittelherstellung in vielen Prozessen als sogenannte "Begleitflora". Die Rolle dieser Begleitflora wurde bisher oft mit dem Begriff "Kontamination" abgetan. Tatsächlich können diese Hefen auch am Lebensmittelverderb beteiligt sein, ebenso wichtig aber ist ihr Beitrag zum Aroma vieler Lebensmittel, der lange unterschätzt wurde und der noch weitgehend ungeklärt ist. Dabei zeigten Untersuchungen in den letzten Jahren häufig, daß Wildhefen über einen Stoffwechsel verfügen, der oft wesentlich vielseitiger ist, als der ihrer "kultivierten" Verwandten.

Wildhefen finden sich in einer Reihe von Lebensmitteln, wie zum Beispiel Soya-Sauce, Sake oder Sherry. Bei der Herstellung von Sherry sind Wildhefen von maßgeblicher Bedeutung. Hier wird Wein, der nach dem klassischen Gärverfahren mit *S. cerevisiae* hergestellt wurde, einer zweiten, aeroben Fermentation unterzogen, wobei der Wein von einer Schicht verschiedener Wildhefen überzogen wird (siehe Abschnitt 3.2.2). Durch den Stoffwechsel der Wildhefen entstehen flüchtige Metabolite von zum Teil hoher Aromawirksamkeit, die das Aroma des Sherry bestimmen. Eine dieser Substanzen ist das bekannte Sotolon (4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanon), ein sehr intensiver Aromastoff, dessen Entstehung aus Threonin unter Einwirkung der Pyruvatdecarboxy

lase postuliert wird (siehe Abschnitt 3.2.2). Für Soleron (5-Oxo-4-hexanolid, das lange als Impact-Komponente von Sherry galt, wird ein analoger Entstehungsweg aus Glutaminsäure formuliert (siehe Abschnitt 3.2.2)

Daher erschien ein "sherry-ähnliches" System als Ausgangspunkt zur Kultivierung verschiedener Wildhefen besonders geeignet. Dieses zeichnet sich durch einen besonders niedrigen pH-Wert und hohen Ethanol-Gehalt aus und unterscheidet sich damit wesentlich von den Bedingungen bei der Weinherstellung (siehe Abschnitt 3.2.2).

Es wurden Hefen gewählt, die im Florbelag des Sherrys vorkommen oder die aus Soja oder Sake isoliert wurden (siehe 4.1.1). Möglicherweise produzieren sie selber einen Teil der Aromastoffe dieser Lebensmittel und besitzen durch die - zum Teil Jahrhunderte lange - Adaption an diese Medien die dazu benötigte enzymatische Ausrüstung.

Ziel dieser Arbeit war es, durch Kultivierung dieser Hefen Biosyntheseprodukte zu gewinnen, die als chirale Intermediate in der organischen Chemie oder bei biotechnologischen Prozessen zur Aromastoffherstellung von Nutzen sein könnten, oder auch selber Aromawirkung haben.

2. Ergebnisse

2.1 Durchführung der Analyse

Das Ansetzen der Hefekulturen und das Monitoring des Kulturverlaufes erfolgte wie in den Kapiteln (4.6.3) und (4.6.4) beschrieben. Die Abfolge der Trenn- und Analyseschritte findet sich in Abschnitt (4.6.4.1). Bei allen Reaktionsmedien wurde ein Blindwert mitgeführt. Im Blindwert enthaltene Analyte werden in den nachfolgenden Tabellen nur erwähnt, wenn sie im Kulturextrakt in deutlich größeren Mengen vorkommen, so daß man neben einem chemischen Entstehungsweg auch von einem parallel beschrittenem, biochemischen ausgehen kann. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit bzw. Kovats-Index und der Massenspektren. In über 200 Fällen wurde dies anhand von Referenzsubstanzen verifiziert.

Angaben zur Retentionszeit, Kovats-Indices und Fit sind im Anhang zusammengestellt.

Eine Auflistung der verwendeten Hefen und der für sie verwendeten Abkürzungen findet sich in Abschnitt (4.1.1)

2.2 Standardmedium, SNLH

Zu Beginn der Untersuchung wurde von allen Hefen eine Analyse der Stoffwechselprodukte bei vollem Nährstoffangebot durchgeführt. Die Probenahme erfolgte am 1., 2., 3., 6., 9. und 12. Kulturtag. Die nach Abschnitt (4.5) gewonnenen Extrakte der flüchtigen Metabolite wurden vereinigt und mit GC-MS analysiert. Das verwendete Nährmedium war ein Komplexmedium mit Hefeextrakt und enthielt Glucose als C-Quelle

und Asparaginsäure als Stickstoffquelle bei einem pH-Wert von 6,0 (genaue Zusammensetzung siehe (4.6.1)) . Es handelte sich um ein im Institut bewährtes Standardmedium, in dem alle Hefen sehr gut gedeihen. (**Standard-Nährlösung-mit Hefeextrakt, SNLH**)

Inhaltsstoffe der Kulturextrakte

Tabelle 2-1 gibt eine erste Übersicht über die Metabolite von verschiedenen Hefen in SNLH, also bei vollem Nährstoffangebot. Es wurde ein breites Produktspektrum erhalten, daß als Ausgangspunkt für den Vergleich mit Produktspektren folgender Versuchsreihen diene.

2.3 Komplexmedien mit Hefeextrakt

Nach einer allgemeinen Übersicht über die gebildeten Produkte in Standardmedium, wurden erste Versuche mit Komplexmedien (alle enthielten Hefeextrakt) durchgeführt und die gebildeten Metabolite analysiert. Der Zeitpunkt der Probenahme ist der Abbildung 2-1 zu entnehmen. Da der Ethanolgehalt der Medien die Lag-Phase verlängerte, erfolgte die Probenahme später als bei Verwendung des Standard-Mediums. Die nach Abschnitt (4.5) gewonnenen Extrakte zur Analyse der flüchtigen Metabolite wurden vereinigt und mit GC-MS analysiert.

2.3.1 Zusatz von L-Threonin (EtOH, pH = 3,4, Hefe)

RM 1 enthielt als Stickstoffquelle die Aminosäure L-Threonin und als Kohlenstoffquelle Ethanol bei einem pH-Wert von 3,4. Genaue Zusammensetzung siehe Abschnitt (4.6.1)

Tab. 2-1 Identifizierte Inhaltstoffe der Kulturextrakte verschiedener Hefen in SNLH-Medium (Glucose, Asparaginsäure, pH = 6)

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Alkohole:											
2-Butoxyethanol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
1-Acetoxy-2-propanol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Acetoxy-1-propanol	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
1-Ethoxy-2-propanol		+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
3-Ethoxy-1-propanol		+	-	-	-	-	+	+++	-	+	-
2-Methyl-1-propanol	+++	++++	+++	++	++++	+++	+++	++	+++	++++	+++++
1-Methoxy-2-methyl-2-propanol		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1,2-Propandiol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Butanol	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
2-Methyl-1-butanol	+++++	+++	-	-	-	-	++++	++++	++++	+++++	+++++
3-Methyl-1-butanol	+	-	++++	++++	+++++	+++++	-	-	-	-	-
3-Methyl-2-buten-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3-Methyl-3-buten-1-ol	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+

1,3-Butandiol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Forts. Alkohole											
2,3-Butandiol cis	+++	+++	-	+++++	++++	+++	+++	++++	+	+++	+++
2,3-Butandiol trans	++	++	-	++++	+	+++	+++	+++	+	++	+++
1-Pentanol	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2-Methyl-3-pentanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3-Methyl-1-hexen-3-ol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Octanol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol (β -Citronellol)	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
(E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadienol (Geraniol)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)- 3,7-Dimethyl-2,6-octadienol (Nerol)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Nonanol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1-Dodecanol	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
2-Furanmethanol ^B	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
Phenylmethanol ^B	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
4-Ethylphenol	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2-Phenylethanol	++++	++++	++++	+++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++

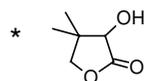
Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Forts. Alkohole											
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol		+	-	-	-	-	+	+	+	++	+
2-Phenoxyethanol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Thioverbindungen:											
2-(Methylthio)-ethanol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Methyltetrahydrothiophen-3-on	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3-(Methylthio)-1-propanol	-	+++	-	-	-	-	+	++	+	+	-
2-(Ethylthio)-1-butanol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aldehyde und Ketone:											
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	+	+	+++++	+	+++++	++++	++++	+	++++	+++++	+++++
4-Methoxy-2-butanon	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-
2-Hydroxy-3-pentanon	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-
2-Nonanon	-	-	+	-	-	-	-	+		-	+
Benzaldehyd	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
4-Hydroxybenzaldehyd	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Carbonsäuren:											
Ethansäure (Essigsäure)	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Propansäure	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
2-Methylpropansäure	++	+	+	++	++	+	-	+	-	-	+
Butansäure	+	-	+	+	++	+	+	+	-	+	-
2-Methylbutansäure	-	+	+	-	-	-	+	+	++	+	+
3-Hydroxybutansäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Hexansäure	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Octansäure	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Nonansäure	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Decansäure	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Dodecansäure	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Hexadecansäure	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
cis-9-Octadecensäure (Ölsäure)	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-
Phenyllessigsäure	-	++	-	-	-	-	-	-		-	-
3-Phenyl-2-propensäure (Zimtsäure)	-	-	+	-	-	-	-	-		-	-

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Ester:											
Essigsäure-2-ethylphenylester	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3-Hydroxypropansäureethylester	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3-Hydroxybutansäureethylester	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Hexansäureethylester	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Octansäureethylester	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Octansäure-2-phenylethylester	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Lactone:											
γ -Butyrolacton	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
2-Hydroxy-3,3-dimethyl- γ -butyrolacton (Pantolacton*)	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
γ -Decalacton	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
γ -Dodecalacton	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
δ -Dodecalacton	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Sonstige:											
N-Ethylacetamid	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2-Acetylpyrrol	-	+	+	-	-	-		-	-	-	-
2-Pyrrolidinon	-	-	+	-	-	-		-	-	-	-
1-H-Indol-3-ethanol	-	-	+	-	-	-		-	-	-	-

^B Substanz auch in Blindwert nachweisbar, aber in deutlich geringeren Mengen



+	≤ 0,5 mg L ⁻¹	++	0,5 - 1 mg L ⁻¹
+++	1 - 5 mg L ⁻¹	++++	5 - 10 mg L ⁻¹
+++++	> 10 mg L ⁻¹		- nicht nachweisbar

2.3.1.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte

Tab. 2-2 enthält die aus den Kulturextrakten identifizierten Metabolite. Sie wurden wie in Kapitel (2.1) beschrieben identifiziert.

2.3.1.2 Wachstum

Wie Abb. 2-1 zeigt, war das Wachstum der Hefekulturen in RM 1 sehr unterschiedlich. Drei der vier *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme (Sace 457, Sace 1250 und Sace 6203) zeigten das beste Wachstum aller Kulturen, gefolgt von *Saccharomyces bayanus*, einer der *Saccharomyces cerevisiae* nahe verwandten Species. *S. cerevisiae* 5155 zeigte dagegen nur ein moderates Wachstum.

2.3.1.3 Aminosäureverbrauch

Der Aminosäureverbrauch der Hefen war mit dem Wachstum der Kulturen verbunden. Hefen mit guten und sehr gutem Wachstum verbrauchten mehr Aminosäure, als Hefen mit schlechtem Wachstum. Zweierlei kausale Zusammenhänge sind denkbar:

- die Hefen wuchsen gut (schlecht), weil sie die angebotene Aminosäure gut (schlecht) als einzige Stickstoffquelle nutzen konnten
- die schlechtwachsenden Hefen benötigten noch einen anderen Medienzusatz, den sie nicht zur Verfügung hatten. Dies bedingte das schlechte Wachstum, was wiederum verminderte Aminosäureaufnahme zur Folge hatte.

Tab. 2-2 Identifizierte Inhaltstoffe der Kulturextrakte verschiedener Hefen in RM 1-Medium (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Alkohole:											
2-Butoxyethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2-Acetoxy-1-propanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1-Ethoxy-2-propanol	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
3-Ethoxy-1-propanol	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
2-Methyl-1-propanol	+++	+++	+	++++	+	+	+	+	+	+	+
1-Butanol	++	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1-Methyl-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2-Methyl-1-butanol	++++	++++	+	++++	+++	+++	+	+++	++	++++	+
3-Methyl-2-buten-1-ol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Methyl-3-buten-1-ol	+	+	+	+	+	-	+	+++	+	-	+
2,3-Butandiol cis	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
2,3-Butandiol trans	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
2,2-Dimethyl-3-pentanol	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-

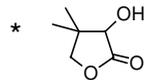
Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Forts. Alkohole											
3-Methyl-4-penten-2-ol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Methyl-3-pentanol	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
3,4-Dimethyl-2-hexanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
p-Menth-1-en-8-ol (α -Terpineol)	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
4-Octanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol (β -Citronellol)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadienol (Geraniol)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)- 3,7-Dimethyl-2,6-octadienol (Nerol)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Methyl-2,6-octadien-4,5-diol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5-Nonanol	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
1-Dodecanol	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
2-Furanmethanol ^B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Phenylmethanol ^B	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
2-Phenylethanol	+++	+++	+++	+++++	+++++	+++	+++++	++	++++	+++	+++
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol ^B	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
4-Methoxyphenylethanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Thioverbindungen:											
2-Methyltetrahydrothiophen-3-on	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3-(Methylthio)-1-propanol	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Aldehyde und Ketone:											
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	+	++	++	+++++	+++	+	++++	+++	+++	+++	+++
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Hydroxy-3-pentanon	++	-		+	++	+	+++	+	-	-	-
2-Hydroxy-3-hexanon	-	-	-	+++	+	-	+++	-	-	+	-
3,4-Hexandion	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Nonanon	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Benzaldehyd ^B	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
4-Hydroxybenzaldehyd	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Carbonsäuren:											
Ethansäure (Essigsäure)	+++	+	+	+	+	+	+	++++	+	+	+
Propansäure	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
2-Methylpropansäure	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Butansäure	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
2-Methylbutansäure	+	+	+	++++	++++	++	+++++	+	++	+	+++
3-Ethylbutansäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2-Methylpentansäure	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hexansäure ^B	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Octansäure	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Nonansäure	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Decansäure	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Dodecansäure	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Tetradecansäure	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hexadecansäure	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Benzoessäure	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Forts. Lactone											-
γ -Decalacton	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
2-Hydroxy-3,3-dimethyl- γ -butyrolacton (Pantolacton*)	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Sonstige:											
N-Ethylacetamid	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
2,5-Pyrrolidinon	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4-Methyl-1(3H)-dihydroindol-2-on	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
1-H-Indol-3-ethanol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

^B Substanz auch in Blindwert nachweisbar, aber in deutlich geringeren Mengen



+	$\leq 0,5 \text{ mg L}^{-1}$	++	$0,5 - 1 \text{ mg L}^{-1}$
+++	$1 - 5 \text{ mg L}^{-1}$	++++	$5 - 10 \text{ mg L}^{-1}$
+++++	$> 10 \text{ mg L}^{-1}$	-	nicht nachweisbar

2.3.1.4 pH-Verlauf

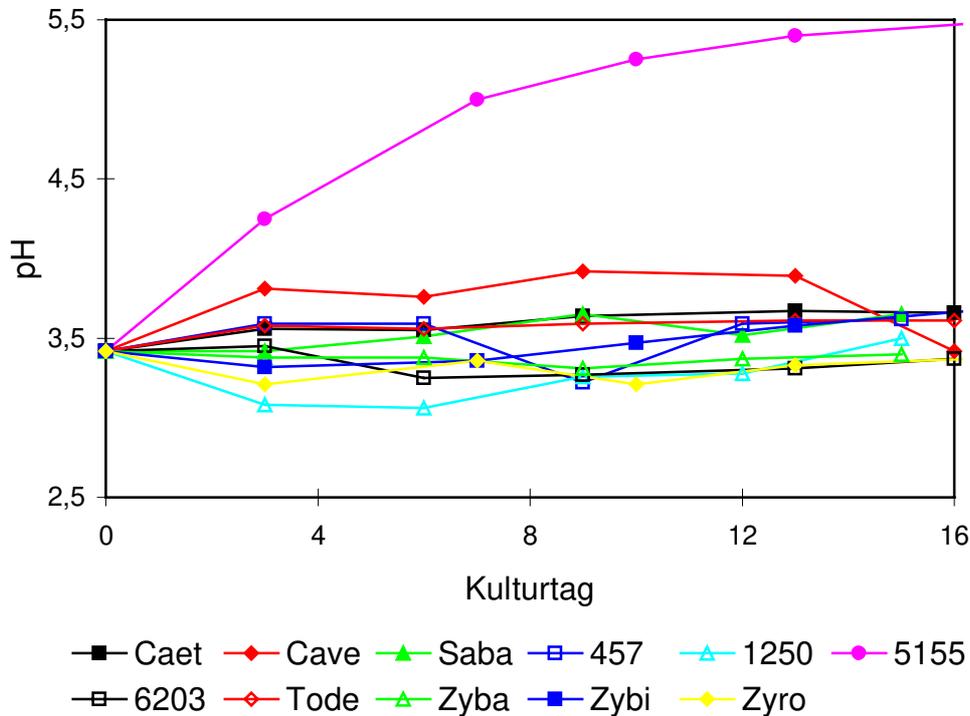


Abb. 2-3 pH-Werte der Kulturen in RM 1 (EtOH, Thr, pH = 3,4, Hefe)

Bis auf *S. cerevisiae* 5155 hielten alle Hefen den vorgegebenen pH-Wert von 3,4 mit geringer Schwankungsbreite. Der pH-Wert-Anstieg von *S. cerevisiae* 5155 in Verbindung mit dem geringen Wachstum dieser Kultur zeigte deutlich, daß diese Hefe im Vergleich zu anderen *S. cerevisiae*-Stämmen in diesem Medium nicht lebensfähig war.

2.3.2 Zusatz von L-Glutamin (Ethanol, pH = 3,4, Hefe)

RM 2 enthielt als Stickstoffquelle L-Glutamin und als Kohlenstoffquelle Ethanol. Genaue Zusammensetzung siehe Abschnitt (4.6.1).

2.3.2.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte

Eine Übersicht über die Metabolite von verschiedenen Hefen in RM 2 (EtOH, Gln, pH = 3,4; Hefe) findet sich in Tab. 2-3. Die Produkte wurden wie in Kapitel (2.1) beschrieben identifiziert.

2.3.2.2 Wachstum

Im Vergleich zu Medium 1 war das durchschnittliche Wachstum der Kulturen wesentlich besser (siehe Tab. 2-4). Dies ist im Hinblick auf die zentrale Rolle von L-Glutamin im Aminosäurestoffwechsel erklärlich.

L-Glutamin ist für jede Hefe sehr gut zugänglich.

Tab. 2-4 Vergleich der Trockenmassenmaxima der Kulturen in RM 1 (EtOH, Thr, pH = 3,4, Hefe) und RM 2 (EtOH, Gln, pH = 3,4, Hefe). In Klammern: Kulturtag

Hefe	TM max. RM 1 [g L ⁻¹] (Kulturtag)	TM max. RM 2 [g L ⁻¹] (Kulturtag)
Caet	0,5 (3)	11,4 (14)
Cave	3,5 (16)	4,0 (3)
Saba	4,0 (15)	9,3 (9)
Sace 457	6,2 (9)	3,1 (3)
Sace 1250	4,4 (9)	3,1 (9)
Sace 5155	2,0 (17)	6,1 (13)
Sace 6203	4,2 (13)	6,7 (15)
Tode	1,0 (9)	4,0 (14)
Zyba	1,4 (9)	12,5 (9)
Zybi	1,7 (10)	7,0 (6)
Zyro	2,6 (17)	8,4 (15)

Tab. 2-3 Identifizierte Inhaltstoffe der Kulturextrakte verschiedener Hefen in RM 2-Medium (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Alkohole:											
2-Butoxyethanol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2-Phenoxyethanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Acetoxy-1-propanol	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Ethoxy-2-propanol	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
3-Ethoxy-1-propanol	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2-Methyl-1-propanol	+	++	+	+	-	++	+	+	+	+	++
1-Butanol	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
2-Ethyl-1-butanol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Methyl-1-butanol	+++	++++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3-Methyl-2-buten-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
3-Methyl-3-buten-1-ol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
1-Methoxybutanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3-Butandiol cis	+	+	+	+	+	+++	+	+	++	+	+
2,3-Butandiol trans	+	-	+	+	+	++	+	+	++	+	+

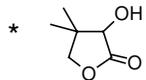
Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Forts. Alkohole											
2,2-Dimethyl-3-pentanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2-Methyl-3-pentanol	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4-Methyl-3-hexanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Menth-1-en-8-ol (α -Terpineol)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Octanol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol (β -Citronellol)	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
5-Nonanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1-Dodecanol	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3ol	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
2-Furanmethanol ^B	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Phenylmethanol ^B	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Phenylethanol	+++	+++	+	++	+++	++++	+++	+++	++++	+++	+++
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol ^B	+	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++
4-Phenyl-2,3-butandiol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Methoxyphenylethanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Thioverbindungen:											
2-Methyltetrahydrothiophen-3-on	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3-(Methylthio)-1-propanol	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
3-(Methylthio)-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Aldehyde und Ketone:											
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	+	+	+	+++	+++	++++	+++	++++	+	+++	+++
2-Hydroxy-3-pentanon	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2-Hydroxy-3-hexanon	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
2-Nonanon	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Benzaldehyd ^B	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
4-Hydroxybenzaldehyd	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
Carbonsäuren:											
Ethansäure (Essigsäure)	+	+	+	++	+	+	+	++	+	++	+

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Forts. Carbonsäuren											
Propansäure	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
2-Methylpropansäure	++	+	+	+	+	+++	+	+	+++	+	+++
Butansäure	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
2-Methylbutansäure	++	+++	+	++	+	+++	+	++	+++	+	+++
3-Ethylbutansäure	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2-Methylpentansäure	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hexansäure ^B	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Decansäure	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Dodecansäure	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Hexadecansäure	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoessäure	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Phenyllessigsäure	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	++
Ester:											
Essigsäure-2-ethylphenylester	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
3-Ethoxypropansäureethylester	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butandisäurediethylester	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Identifizierte Verbindungen	Caet	Cave	Saba	Sace 457	Sace 1250	Sace 5155	Sace 6203	Tode	Zyba	Zybi	Zyro
Sonstige:											
N-Ethylacetamid	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
2,5-Pyrrolidinon	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Piperidinon	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3-Dimethylphenylisocyanat	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-

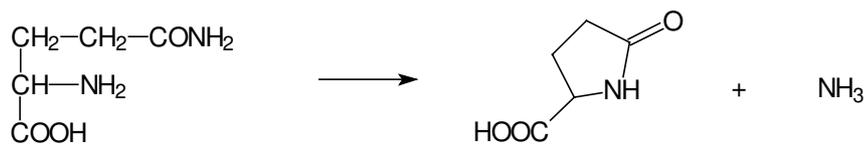
^B Substanz auch in Blindwert nachweisbar, aber in deutlich geringeren Mengen



+	≤ 0,5 mg L ⁻¹	++	0,5 - 1 mg L ⁻¹
+++	1 - 5 mg L ⁻¹	++++	5 - 10 mg L ⁻¹
+++++	> 10 mg L ⁻¹		- nicht nachweisbar

2.3.2.3 Aminosäureverbrauch

Probleme gab es mit dem Nachweis von L-Glutamin: weder im Blindwert noch in den Proben konnte es nachgewiesen werden. Da Glutamin nicht besonders hitzestabil ist, waren gewisse Verluste durch das Autoklavieren zu erwarten. Auch chemisch ist Glutamin nicht besonders beständig. In saurer wäßriger Lösung kommt es leicht zu einer Spaltung des Amids in Glutaminsäure und das Amin, NH_3 . Ein intramolekularer Angriff der Carbonylgruppe durch die γ -ständige Aminogruppe führt zur Lactambildung. Formal wandelt sich Glutamin also unter Verlust einer Aminogruppe in Pyrrolidoncarbonsäure um, die zwischen pH 2,2 und 4,0 beständig ist. Säuren oder Alkali spalten das Lactam zu Glutaminsäure.



[69]

Abb. 2-4 Umwandlung von Glutamin in Pyrrolidoncarbonsäure

Dennoch erschien es ungewöhnlich, daß L-Glutamin überhaupt nicht nachzuweisen war. Um die Stabilität von L-Glutamin in Vergleich zu L-Glutaminsäure zu testen, wurden eine Reihe von Lösungen in verschiedenen Lösungsmitteln angesetzt, die je zur Hälfte autoklaviert wurden, in der anderen Hälfte wurde der Aminosäuregehalt direkt untersucht. Es ergaben sich bei Glutamin tatsächlich hohe Wiederfindungsverluste nach dem Autoklavieren, bis hin zu 99,9% bei Glutamin gelöst in Fermentationslösung RM 2. Bei Glutaminsäure waren die Verluste weit weniger hoch, sie betragen maximal 9%.

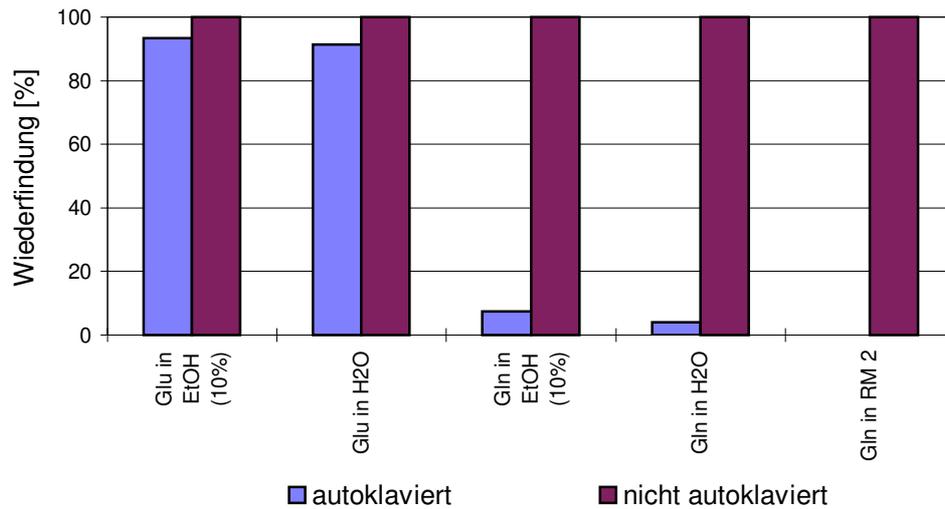


Abb.2-5 Wiederfindung von L-Glutamin und L-Glutaminsäure vor und nach Autoklavierung

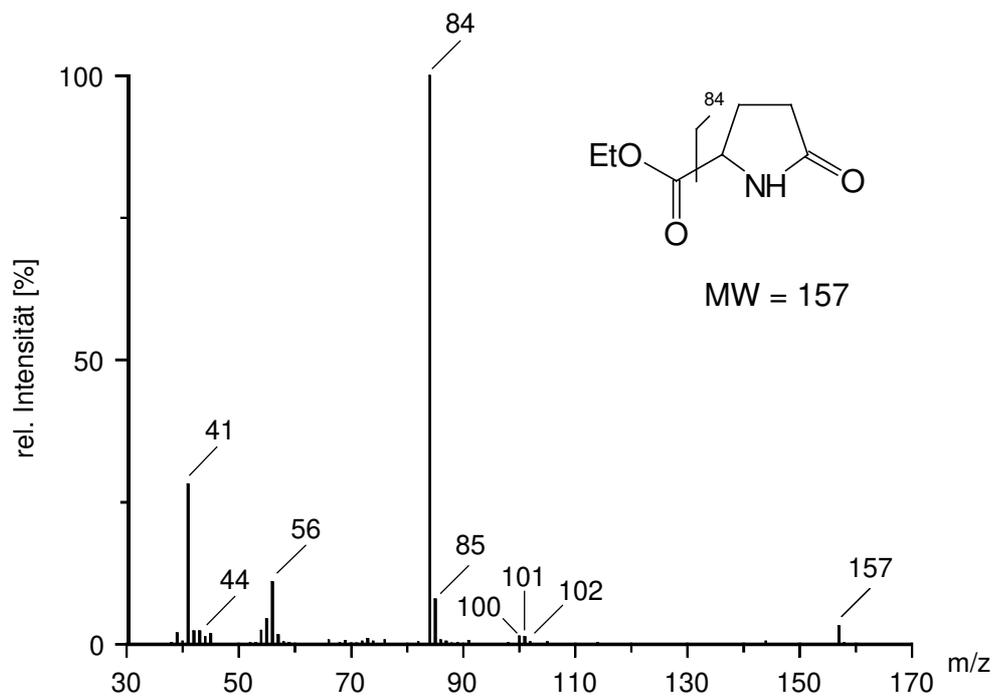


Abb. 2-6 Massenspektrum von Pyrrolidoncarbonsäureethylester

Untersuchungen über den Verbleib des zugesetzten Glutamins ergaben schließlich, daß es sich unter den gegebenen Bedingungen (pH-Wert des Mediums 3,4; 121 °C; 1 bar Überdruck) nahezu quantitativ in Pyrrolidoncarbonsäure und den Pyrrolidoncarbonsäureethylester umwandelte, die

auch mit GC-MS nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 2-5 und 2-6). Beide Reaktionsprodukte, der Ester, sowie die Pyrrolidoncarbonsäure scheinen den Hefen aber genau wie Glutaminsäure als Stickstoffquelle zugänglich zu sein, da sich im Wachstum wie in der Produktbildung im Vergleich zu RM 3 (siehe Abschnitt 2.3.3) kein Unterschied bemerkbar machte.

2.3.2.4 pH-Verlauf

Die pH-Wertänderungen verliefen, wie schon in RM 1 beobachtet, innerhalb geringer Schwankungsbreiten um den eingestellten Anfangs-pH. Durch die Synthese saurer Metabolite wird der pH zum Teil noch etwas gesenkt, z.B. von *Saccharomyces cerevesiae* 457 (Sace 457) bis auf einen Wert von 2,8. Nur *Torulaspora delbrueckii* (Tode) hebt den pH-Wert an und stabilisierte ihn bei ca 4,5.

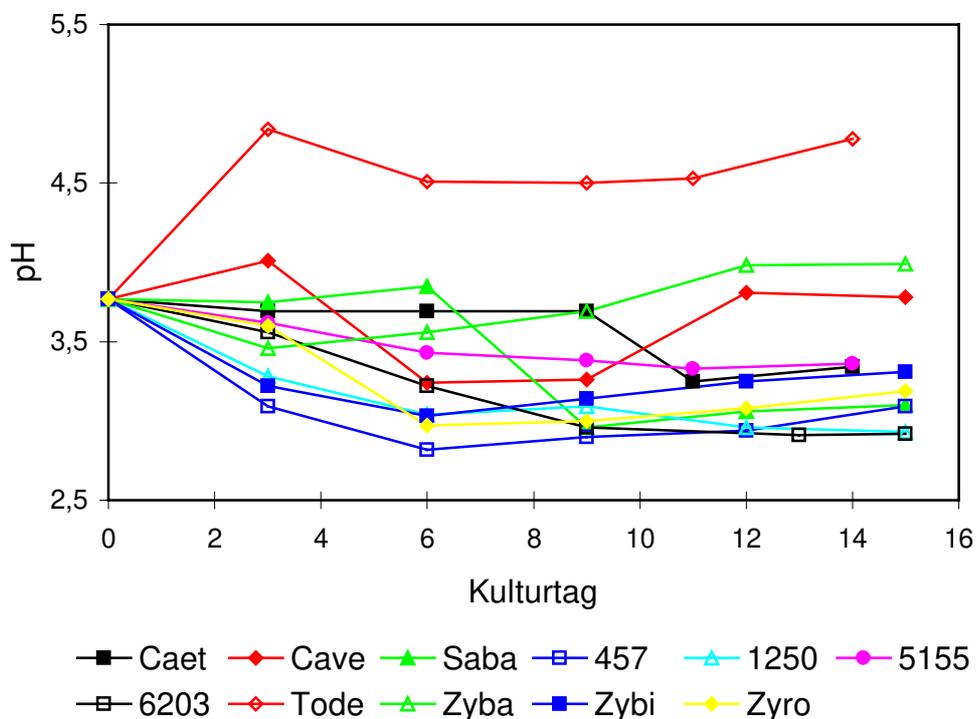


Abb. 2-7 pH-Werte der Kulturen in RM 2 (EtOH, Gln, pH = 3,4, Hefe)

2.3.3 Zusatz von Glutamat (EtOH, pH = 3,4, Hefe)

RM 3 enthielt Na-Glutamat als N-Quelle und Ethanol als C-Quelle bei einem pH von 3,4. Genaue Zusammensetzung siehe Abschnitt (4.6.1)

2.3.3.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte

Durch Zugabe von L-Glutaminsäure (als Natriumsalz) statt L-Glutamin konnte der Aminosäureverbrauch über den Kulturverlauf besser verfolgt werden. Ansonsten zeigten sich keine prinzipiellen Unterschiede zu RM 2. Auf eine Auflistung der gebildeten Metabolite wird hier deshalb verzichtet.

2.3.3.2 Wachstum

Ein Vergleich der Wachstumskurven der Kulturen in RM 2 (Glutamin) und RM 3 (Glutaminsäure) findet sich in Abb. 2-8. Die höchste Trockenmassebildung zeigten in beiden Medien *Zygosaccharomyces bailii* (Zyba) und *Candida etchellsii* (Caet). Mit Glutamin als Stickstoffquelle erreichten diese Hefen einen Trockenmassegehalt von ca 12 g L⁻¹ in RM 2 und mit Glutaminsäure einen Gehalt von 8 bzw 10 g L⁻¹ in RM 3.

Die augenscheinlichsten Unterschiede ergaben sich im Wachstum von *S. cerevisiae* 457, 1250 und 5155. Diese Stämme wuchsen mit Glutamin deutlich schlechter als mit Glutaminsäure. Das zeigte sich auch im Aminosäureverbrauch (siehe Abb. 2-9); schon bei der ersten Messung am 3. Kulturtag hatten diese Hefen bereits die gesamte verfügbare Aminosäure verbraucht.

Die stationäre Phase war bei fast allen Hefen am 6. Kulturtag erreicht. Eine etwas längere Lag-Phase zeigten bei diesem Versuch *Saccharomyces bayanus* (Saba), *Saccharomyces cerevisiae* (Sace) 6203 und *Zygosaccharomyces rouxii* (Zyro). *S. bayanus* fing erst am 6 Kulturtag

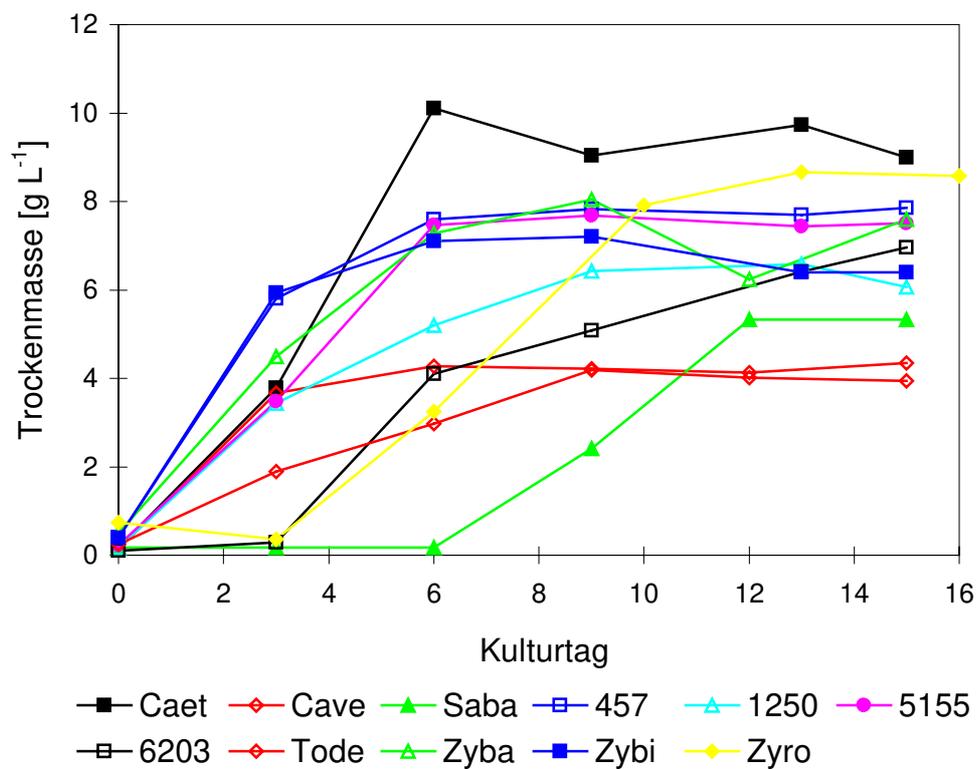
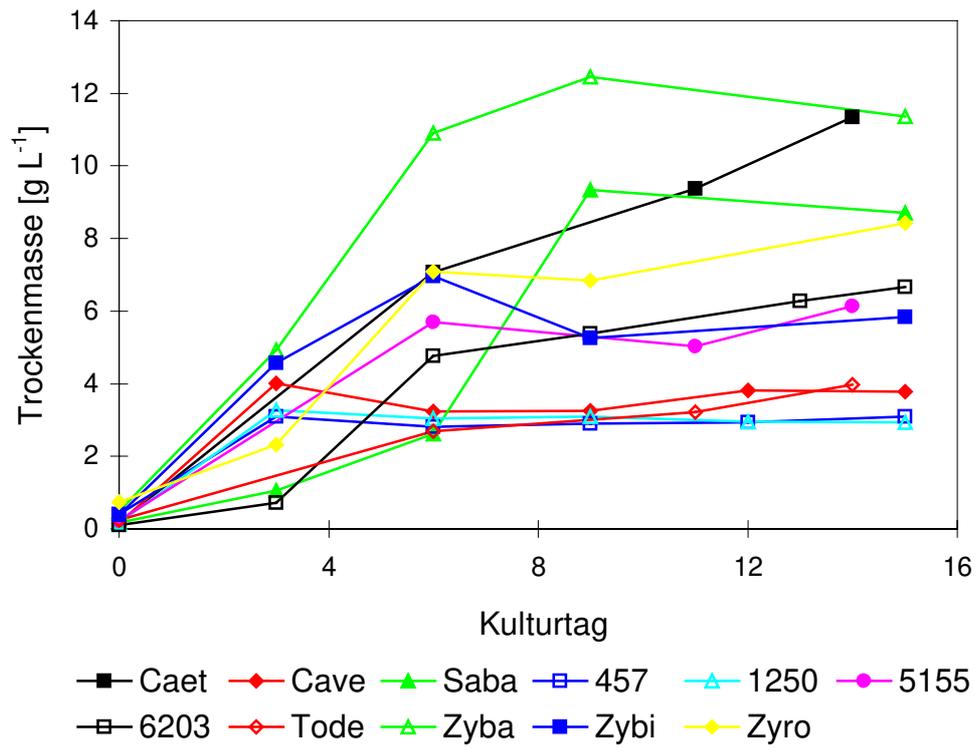


Abb. 2-8 Trockenmasse der Kulturen in RM 2 (EtOH, Gln, pH = 3,4, Hefe, oben) und RM 3 (EtOH, Glu, pH = 3,4, Hefe, unten)

2.3.3.3 Aminosäureverbrauch

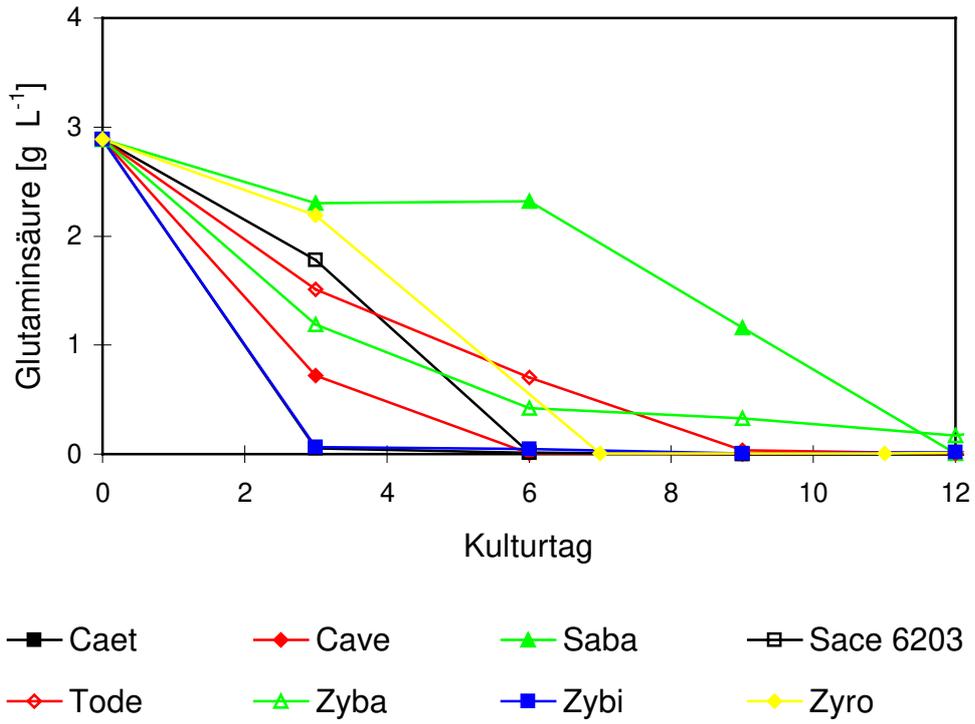


Abb. 2-9 Aminosäureverbrauch der Kulturen in RM 3 (EtOH, Glu, pH = 3,4, Hefe)

2.3.3.4 pH-Verlauf

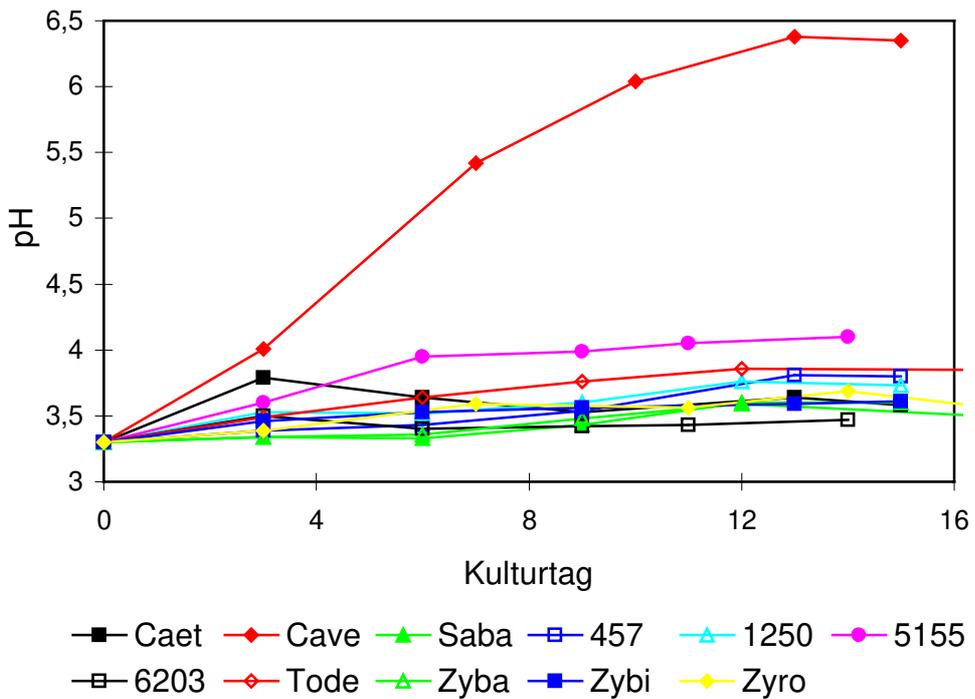


Abb. 2-10 pH-Werte der Kulturen in RM 3 (EtOH, Glu, pH = 3,4, Hefe)

an, Zellmasse aufzubauen und parallel dazu begann der Verbrauch an Glutaminsäure. In RM 2 lief das Wachstum ebenfalls erst verzögert an. Nach Beginn der exponentiellen Wachstumsphase war aber auch bei *S. bayanus* die stationäre Phase nach weiteren 6 Kulturtagen erreicht.

2.3.4 Interessante Verbindungen aus den Komplexmedien SNLH, RM 1 und RM 2

Die in den größten Konzentrationen gebildeten Stoffe waren 2-Methyl-1-propanol, 2-Methyl-1-butanol und 2-Phenylethanol, alles Metabolite des Aminosäurestoffwechsels und nach Webb typische Indikatoren für eine Proteinaufbautätigkeit von Hefen, die nach einem modifizierten Ehrlich-Mechanismus entstehen [70].

γ -Butyrolacton entsteht im Glutaminsäurestoffwechsel aus Ethyl-4-oxobutanoat [66] und ist damit ebenfalls ein Metabolit des Aminosäurestoffwechsels. Auch die Biogenese von Methylthiopropylalcohol aus Methionin ist vorstellbar. Die Anwesenheit der anderen identifizierten schwefelhaltigen Substanzen, 2-(Methylthio)-ethanol und 2-(Ethylthio)-1-butanol ist dagegen ungewöhnlich.

N-Ethylacetamid und 2,3-Dimethylphenylisocyanat wurden in einer ganzen Reihe von Kulturen identifiziert. Beide Substanzen sind cytotoxisch, 2,3-Dimethylphenylisocyanat sogar stark cytotoxisch und als Hefemetabolite ungewöhnlich. Da die Identifizierung in diesen Fällen eindeutig war und beide Substanzen im Blindwert nicht nachgewiesen werden konnten, wurden sie in die Tabellen mit aufgenommen. Beide Substanzen kamen in allen Fällen aber nur in Spuren vor, daher ist nicht hundertprozentig auszuschließen, daß es sich um Verunreinigungen handelte.

Die Bildung von Terpenen durch Hefen hielt man lange Zeit für unmöglich und führte den Ursprung von Terpenen in Wein allein auf den Terpene

halt der Trauben zurück. 1981 konnten Fagan et al. aber die Bildung von Terpenen durch *Saccharomyces fermentati* (früher *S. beticus*) nachweisen, was später von anderen Arbeitsgruppen bestätigt wurde [64, 66, 71].

Eine weitere erwähnenswerte Substanz ist das Pantolacton, der innere Ester der Pantoinsäure. Pantoinsäure ist ein Bestandteil der Panthothensäure, die wiederum ein Bestandteil von Coenzym-A ist.

Da die Medienbedingungen den Verhältnissen im Sherry nachempfunden waren (siehe Einleitung und Kapitel 3.2.2) und auch die Precursoren Glutaminsäure und Threonin der bereits erwähnten Aromastoffe Soleron und Sotolon vorhanden waren, wurde nach diesen beiden Substanzen besonders aufmerksam gesucht.

Allerdings konnte weder in RM 2 noch in RM 3, die L-Glutamin, bzw. L-Glutaminsäure enthielten, eine Soleronbildung durch die verwendeten Hefekulturen beobachtet werden. Geringe Mengen ($> 1 \mu\text{g L}^{-1}$) von Sotolon im threoninhaltigen RM 1 konnten in einigen Hefekulturen, aber in gleichen Mengen auch im Blindwert festgestellt werden. Die Bildung erfolgte demnach auf rein chemische Weise, wahrscheinlich beim Erhitzen von Threonin im Autoklaven.

Dafür konnten andere Verbindungen identifiziert werden, die ebenfalls auf eine PDC-katalysierte Acyloinkondensation zurückzuführen sind:

- Teilweise in großen Mengen (bis zu 33 mg L^{-1} von *Zygosaccharomyces rouxii* (Zyro) in SNLH-Medium) wurde 3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin) gebildet. Es entsteht aus Acetaldehyd und Pyruvat und ist eine Schlüsselkomponente bei der Biosynthese von 2,3-Butandiol und Diacetyl und damit am Aroma von vielen alkoholischen Getränken beteiligt [72] (siehe auch 3.2.3).

- 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon und 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon konnten in RM 1 in drei *Saccharomyces cerevisiae*-Kulturen (Sace 457, 1250 und 6203), in RM 2 in Kulturen von *Candida etchelsii* (Gaet), *Saccharomyces cerevisiae* (Sace 457 und 6203), *Torulaspota delbrueckii* (Tode), *Zygosaccharomyces bisporus* (Zybi) und *Zygosaccharomyces bailii* (Zyba) nachgewiesen werden (Abb. 2-11 und 2-12). Das zugehörige Diol 4-Phenyl-2,3-butandiol fand sich ebenfalls in einer Kultur von *C. etchelsii* in RM 2 (siehe Abb.2-14).

Beide Massenspektren ähneln sich auf den ersten Blick, weisen jedoch einige charakteristische Unterschiede auf, die zur Postulierung der Strukturen geführt haben:

- Das Massen-Fragmentation ($m/z = 164$) läßt sich nur bei **3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (1-HPB)** detektieren. Im Gegensatz zum **3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (4-HPB)** ist hier die Wasserabspaltung, die zum Fragmentation $m/z 146$ führt, nicht begünstigt, da sich keine so ausgedehnte Konjugation der entstehenden Doppelbindung zum Aromaten ergibt. 4-HPB dagegen verliert die Hydroxygruppe so schnell, daß das Massen-Fragmentation nicht mehr detektierbar ist.
- Beide Spektren unterscheiden sich in den Verhältnissen der Massenfragmente $m/z 120/121$ und $91/92$. Bei 4-HPB dominieren $m/z 121$, das durch die Abspaltung der Acetylgruppe entsteht und $m/z 91$, das durch die Abspaltung des Phenylrings entsteht. Bei 1-HPB hat $m/z 120$ eine deutlich höhere Intensität als $m/z 121$ und die relative Intensität von $m/z 92$ hat deutlich zugenommen. Eine Erklärung für die Entstehung der Masse/Ladungsverhältnisse 120 und 92 zeigt Abb. 2-13.

Die Abspaltung der Acetylgruppe des 4-HPB führt zu einem Massenfragment mit einem Masse/Ladungsverhältnis von 43. 1-HPB weist statt dessen einen Peak bei $m/z 45$ auf, der von der Abspaltung des entsprechenden Alkohol-Teils stammt.

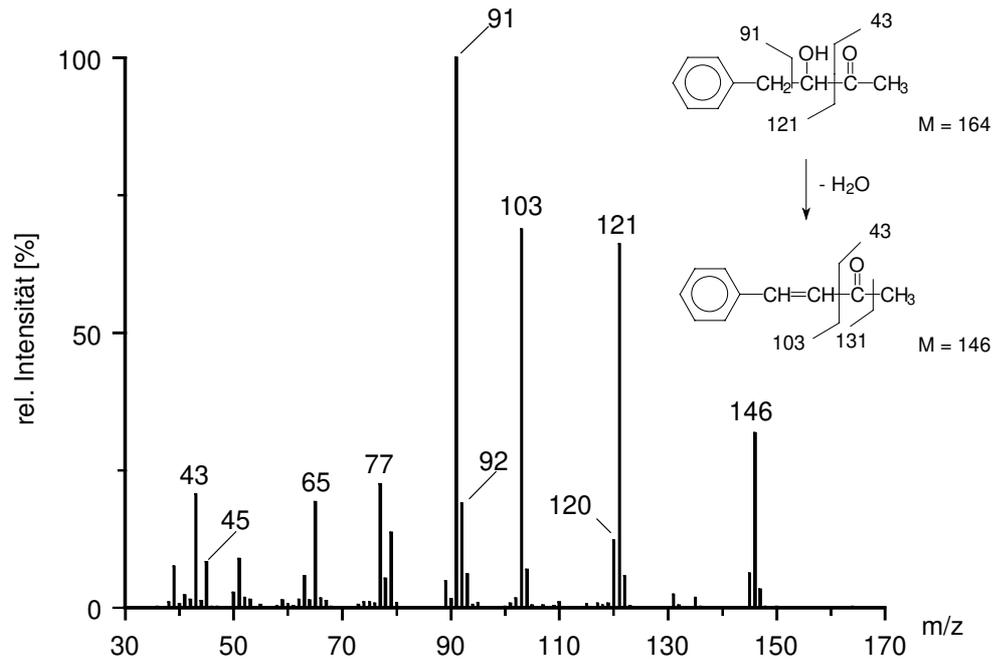


Abb. 2-11 Massenspektrum von 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (4-HPB)

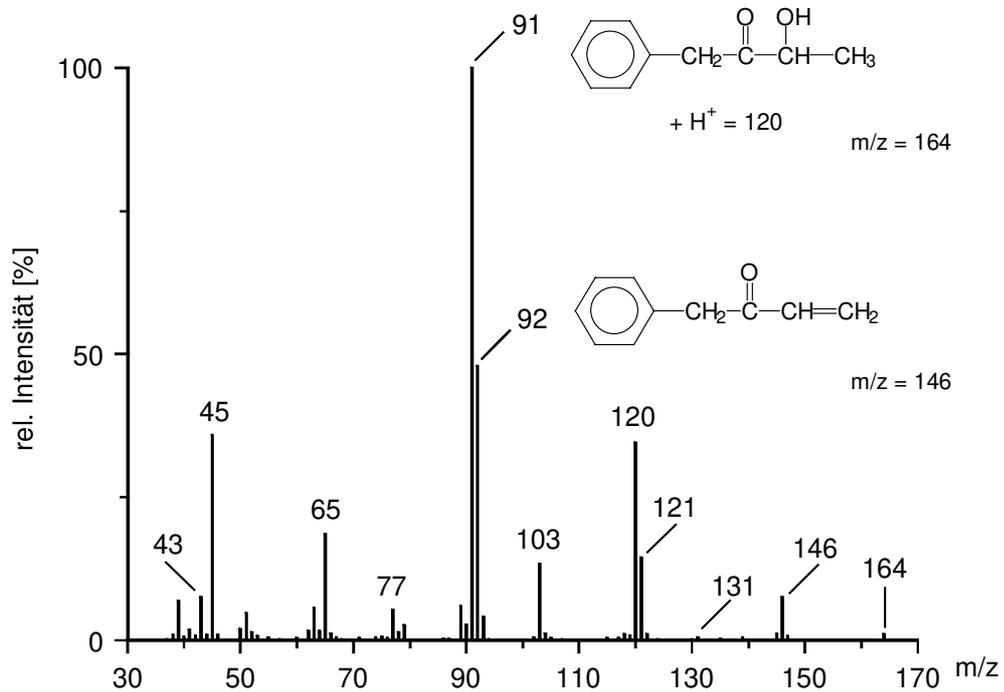


Abb. 2-12 Massenspektrum von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (1-HPB)

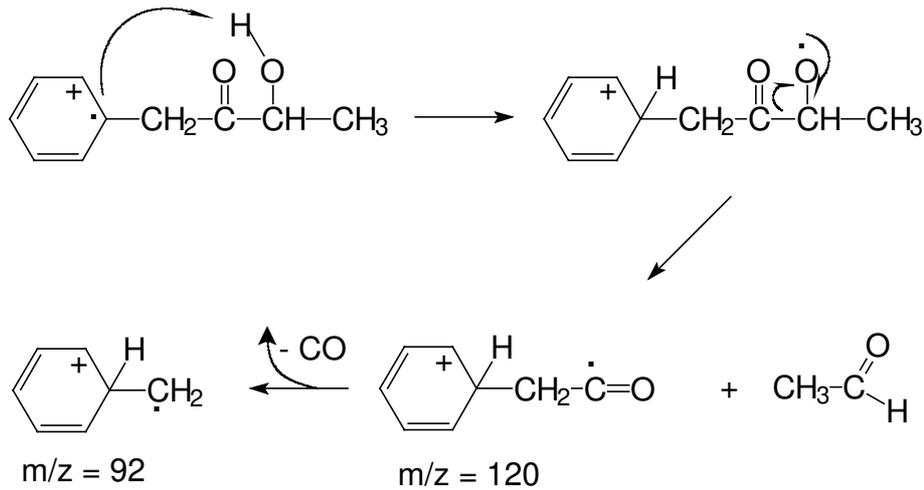


Abb. 2-14 Postulierter Entstehungsweg der Massenfragmentionen 120 und 92

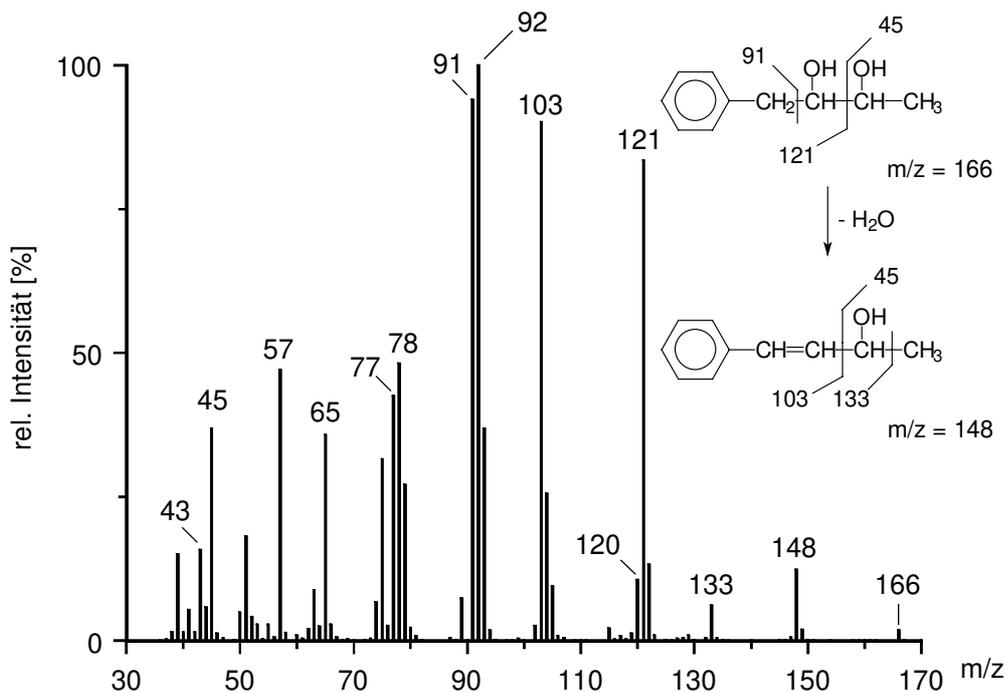


Abb. 2-15 Massenspektrum von 4-Phenyl-2,3-butanediol

HPB ist eine dem Phenylacetylcarbinol PAC (siehe 3.2.4) homologe Verbindung, die um eine CH_2 -Einheit länger ist. 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon hat ein intensiv blumigen Geruch und ist auch als Pflanzenhormon beschrieben worden. Industriell wird es als begehrter Geruchsstoff für Parfüms eingesetzt [73-80, 136, 137 siehe auch Kapitel 3.2.5].

Um eine Verifizierung vorzunehmen, mußte die Ausbeute erheblich gesteigert werden, da die Verbindung zum Teil nur in Spuren vorkam. Die besten HPB-Bildner und die Konzentration des gebildeten HPB [$\mu\text{g L}^{-1}$] in den verschiedenen Medien zeigt Tabelle 2-5 (Werte sind Summen des über den gesamten Kulturverlauf gebildeten HPB's).

Tab. 2-5 Gesamt-HPB-Gehalt (1-HPB und 4-HPB) in verschiedenen Hefekulturen in $\mu\text{g L}^{-1}$

Medium	Caet	Tode	Zybi	Sace 6203
SNLH (Gluc, Asp, pH = 6,0, Hefe)	n.n	n.n	n.n	n.n
RM 1 (EtOH,Thr, pH = 3,4, Hefe)	9	n.n	250	310
RM 2 (EtOH, Gln, pH = 3,4, Hefe)	56	18	27	50
RM 3 (EtOH, Glu, pH = 3,4, Hefe)	19	38	25	82

2.4 Medien ohne Hefeextrakt

Um die Aufnahme und Produktbildung aus Aminosäuren besser kontrollieren zu können, wurde in diesem und allen folgenden Medien auf die Zugabe von Hefeextrakt verzichtet. Da hiermit neben einer weiteren Stickstoffquelle auch eine wichtige Vitamin-B-Quelle wegfällt, wurde das Medium mit Thiamin und Biotin supplementiert.

Da bei diesen Stoffen, genau wie bei Ethanol und den Aminosäuren, im Autoklaven erhebliche Verluste auftreten können, die im Magermedium mehr ins Gewicht fallen als bei den vorher verwendeten Komplexmedien, wurden für alle weiteren Medien die hitzeempfindlichen Bestandteile sterilfiltriert und zu dem autoklavierten Anteil pipettiert (siehe Abschnitt 4.6.1).

Nach dem eine Übersicht der flüchtigen Metabolite in Komplexmedien gewonnen wurde, wurden drei Hefen ausgewählt, die entweder 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon und 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon bilden konnten oder die aus verschiedenen Gründen interessant erschienen:

- *Candida etchelsii* (Caet), diese Hefe zeigte ein schnelles Wachstum und einen aktiven Stoffwechsel.
- *Torulasporea delbrueckii* (Tode) fiel hauptsächlich durch ihren interessanten, an Zwiebeln und Würze erinnernden Geruch auf. Außerdem bildete sie große Mengen an Acetoin, was auf eine rege PDC-Tätigkeit schließen läßt.
- *Zygosaccharomyces bisporus* (Zybi) bildete die größten Mengen an 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon und 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon und zeigte auch unter schwierigen Bedingungen gutes Wachstum.

2.4.1 Zusatz von L-Threonin (EtOH, pH = 3,4)

RM 4 entspricht Medium 1 ohne Hefeextraktzusatz, dafür mit Thiamin und Biotin supplementiert. Als C-Quelle diente Ethanol, als N-Quelle L-Threonin bei einem pH von 3,4. Genaue Zusammensetzung siehe (4.6.1).

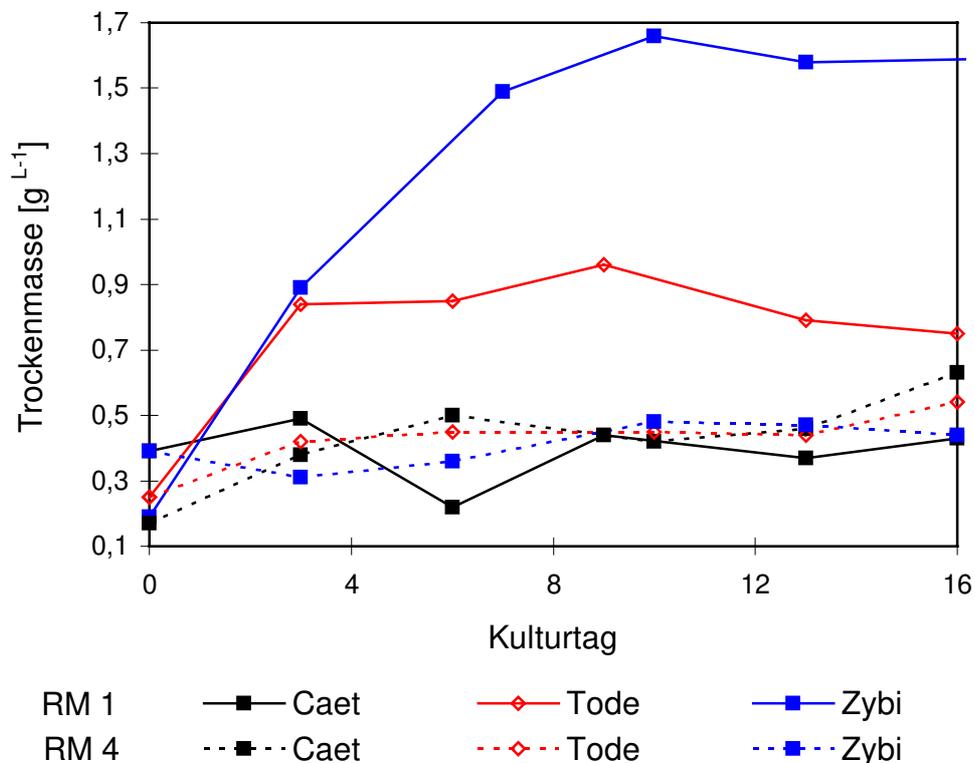


Abb. 2-15 Trockenmasse der Kulturen in RM 1 (EtOH, Thr, pH = 3,4, Hefeextrakt) und RM 4 (EtOH, Thr, pH = 3,4)

T. delbrueckii und *Z. bisporus* wuchsen in dem Medium ohne Hefeextraktzusatz deutlich schlechter, *C. etchellsii* konnte in keinem Medium Biomasse aufbauen. Trotz des schlechten Wachstums bildete *Z. bisporus* im Medium ohne Hefeextrakt mehr HPB als im Medium mit Hefeextrakt (siehe Tab. 2-6) Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Summe des über den ganzen Kulturverlauf gebildeten Gesamt-HPB (1- und 4-HPB).

Tab. 2-6 Gebildete Menge an Gesamt-HPB in $\mu\text{g L}^{-1}$ in Abhängigkeit vom Hefeextraktzusatz in den Medien

Medium	Caet	Tode	Zybi
RM 1 (EtOH, Thr, pH = 3,4, Hefe)	9	n.n	249
RM 4 (EtOH, Thr, pH = 3,4)	2	9	356

2.4.2 Zusatz von L-Glutaminsäure (EtOH, pH = 3,4)

RM 5 entspricht Medium 3 ohne Hefeextraktzusatz, dafür mit Thiamin und Biotin supplementiert. Als C-Quelle diente Ethanol, als N-Quelle L-Ma-Glutamat (in Form des Natriumsalzes), bei einem pH von 3,4. Genaue Zusammensetzung siehe Abschnitt (4.6.1).

2.4.2.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte

Unter den hier gewählten Bedingungen zeigte nur *Z. bisporus* ein moderates Wachstum. Qualitativ zeigten sich keine Unterschiede zum Produktspektrum des Komplexmediums, nur die Menge einiger gebildeter Substanzen variierte (siehe Tab. 2-7). Angegeben ist die Summe der über den gesamten Kulturverlauf gebildeten Mengen. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß diese Substanzen in deutlicher höherer Konzentration gebildet werden, obwohl die Kulturen ohne Hefezusatz deutlich geringere Zellkonzentrationen enthielten ($7,2 \text{ g}$ bzw $1,8 \text{ g TM L}^{-1}$, Abb. 2-16)

Tab. 2-7 Vergleich Produktkonzentrationen in Kulturen von *Z. bisporus* in Abhängigkeit vom Hefezusatz

Identifizierte Substanz	RM 3 (EtOH, Glu, pH = 3,4, Hefe)	RM 5 (EtOH, Glu, pH = 3,4)
	[mg L ⁻¹]	[mg L ⁻¹]
2-Methyl-1-butanol	1,9	4,0
Acetoin	1,3	3,9
Phenylmethanol	0,02	0,3
1-HPB	0,03	0,3

2.4.2.2 Wachstum

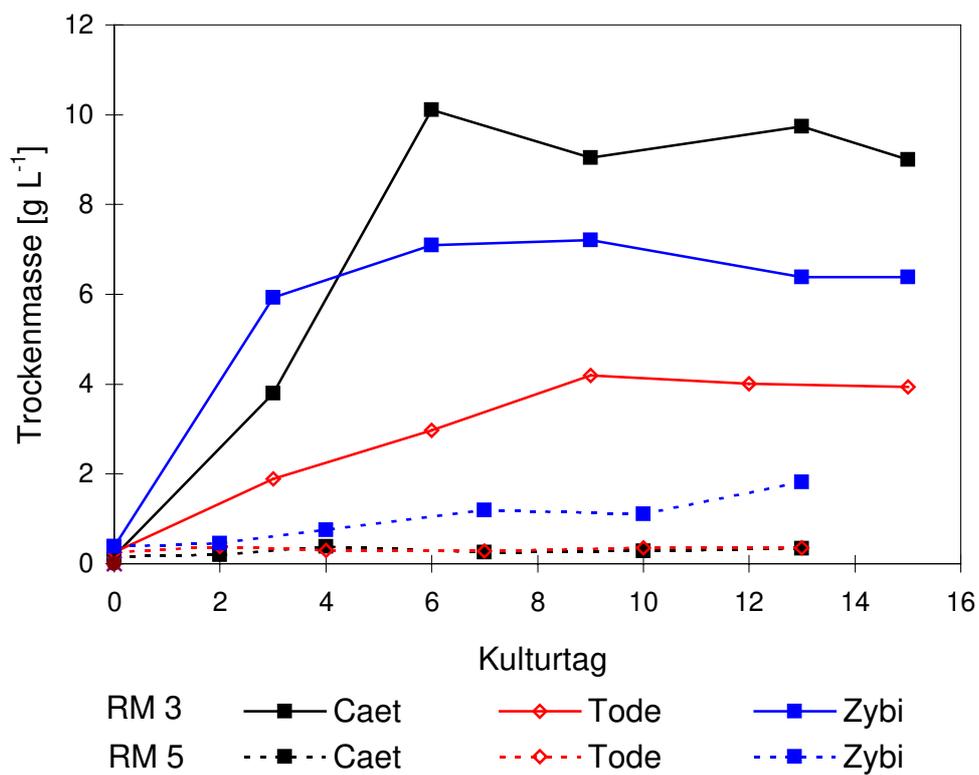


Abb. 2-16 Trockenmasse der Kulturen in RM 3 (EtOH, Glu, pH = 3,4, Hefe) und RM 5 (EtOH, Glu, pH = 3,4)

2.4.2.3 Aminosäureverbrauch

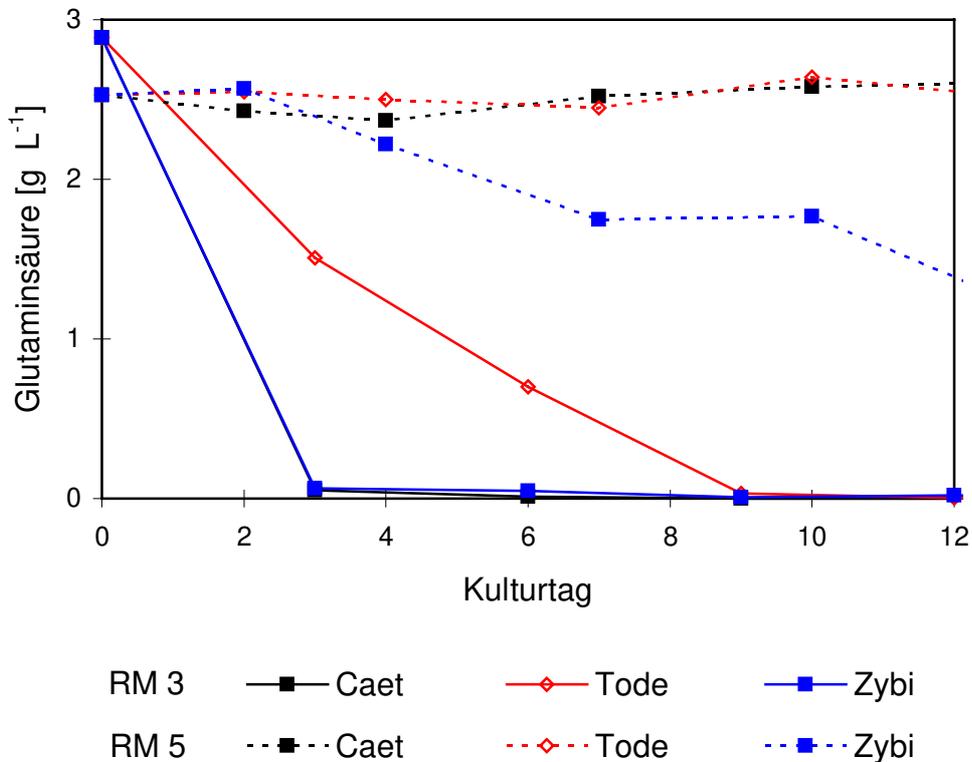


Abb. 2-17 Aminosäureverbrauch der Kulturen in RM 3 (EtOH, Glu, pH = 3,4, Hefe) und RM 5 (EtOH, Glu, pH = 3,4)

Das schwache Wachstum spiegelt sich auch im Aminosäureverbrauch wieder. In dem hefeextrakthaltigen Medium wurde die L-Glutaminsäure von *C. etchellsii* und *Z. bisporus* schon innerhalb der ersten drei Tage restlos verbraucht. Im Medium ohne Hefeextrakt wird nur von *Z. bisporus* etwas aufgenommen.

2.4.2.4 pH-Verlauf

Die pH-Werte blieben über den gesamten Kulturverlauf in einer Schwankungsbreite von $\pm 0,1$ des Anfangswertes konstant.

2.4.3 Zusatz von Phenylalanin (EtOH, pH = 3,4)

Die Versuche in RM 4 und RM 5 zeigten, daß trotz schlechten Wachstums zumindest bei *Z. bisporus* die Ausbeute an gebildetem HPB gesteigert werden konnte. Nach dem vermuteten Biosyntheseweg könnten Threonin und Glutamin nur indirekt mit der Biosynthese von HPB zu tun haben. L-Phenylalanin ist dem postulierten Biosyntheseweg wesentlich näher, da sowohl Phenylpyruvat wie auch Phenylacetaldehyd aus dieser Aminosäure entstehen können. Daher wurde RM 6 mit Phenylalanin als Stickstoffquelle und EtOH als C-Quelle bei einem pH-Wert von 3,4 angesetzt. Genaue Zusammensetzung siehe Abschnitt (4.6.1).

2.4.3.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte

Unter den gewählten Bedingungen zeigte von den drei ausgewählten Hefen wieder nur *Z. bisporus* ein moderates Wachstum mit einem Maximum von $1,3 \text{ g TM L}^{-1}$ am 11. Kulturtag (Abb. 2-18). Dennoch bildete sie $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon. Auch bei den anderen Hefen *C. etchellsii* und *T. delbrueckii* wurde die Bildung von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon und 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon beobachtet, obwohl diese Hefen keinerlei Wachstum zeigten (Tab. 2-8). Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Summe des über den ganzen Kulturverlauf gebildeten HPB's.

Tab. 2-8 Gebildete Menge an HPB [$\mu\text{g L}^{-1}$] in RM 6

Hefe	1-HPB	4-HPB
Caet	1191	17
Tode	35	31
Zybi	1343	7

2.4.3.2 Wachstum

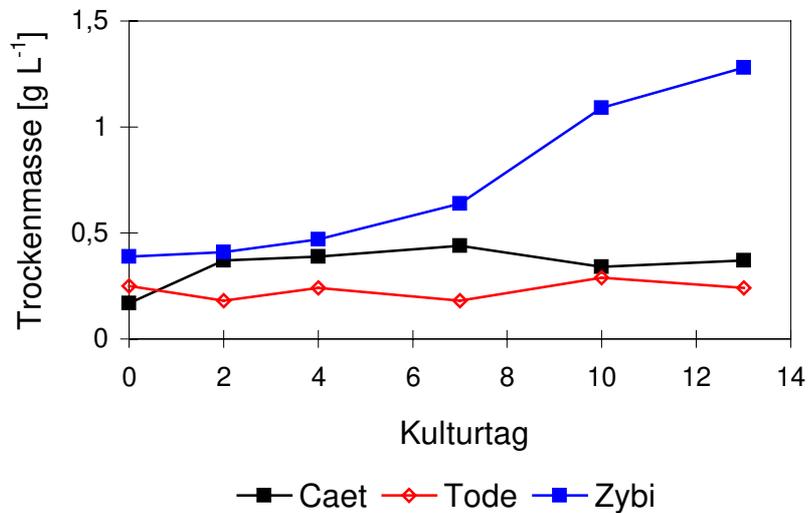


Abb. 2-18 Trockenmasse der Kulturen in RM 6 (EtOH, Phe, pH = 3,4)

2.4.3.3 Aminosäureverbrauch

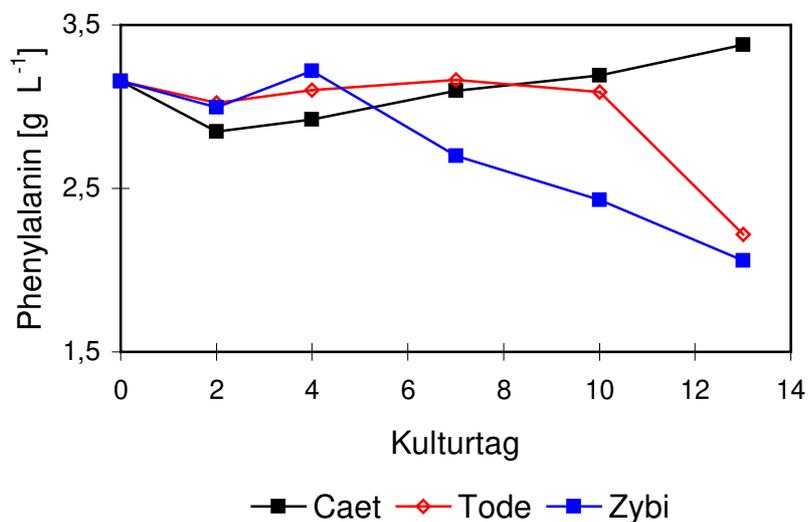


Abb. 2-19 Verbrauch an L-Phenylalanin in RM 6 (EtOH, Phe, pH = 3,4)

C. etchellsii zeigte neben sehr geringem Wachstum auch einen leichten Anstieg der Aminosäurekonzentration um $0,2 \text{ g L}^{-1}$. Dies lag im Bereich der Meßgenauigkeit der Bestimmungsmethode, die bei ca. 10% liegt. Der

Anstieg ist demnach eher auf eine Meßungenauigkeit oder auf einen Volumenfehler zurückzuführen, als auf eine Neubildung durch die Hefe.

Der Zusatz von L-Phenylalanin als Stickstoffquelle führte zu einer deutlich verbesserten HPB-Ausbeute, obwohl die Hefen in diesem Medium ohne Hefeextraktzusatz keine Biomasse bildeten.

2.5 Optimierung der Medienzusammensetzung

Weitere Optimierungsversuche im Hinblick auf die Bildung von HPB wurden zunächst nur mit *Z. bisporus* durchgeführt, da diese Hefe die aussichtsreichste Kultur im Hinblick auf die HPB-Bildung darstellte und als einzige auch unter ungünstigsten Bedingungen in der Lage war, Biomasse aufzubauen.

Die Probenahme wurde bis zum Beginn der stationären Phase geplant. In allen bisherigen Versuchen war bei guten Wachstumsbedingungen die stationäre Phase ungefähr am 5. Kulturtag erreicht. Um eventuelle Verzögerungen durch eine verlängerte Lag-Phase zu berücksichtigen, wurde die letzte Probe am 8. Kulturtag entnommen.

2.5.1 Zusatz von weiteren Stickstoffquellen

2.5.1.1 Ammoniumsulfat als zusätzliche Stickstoffquelle

Als zusätzliche N-Quelle wurde in RM 8 Ammoniumsulfat gewählt, die übrige Zusammensetzung entspricht RM 6 bis auf die Aminosäurekonzentration (Tab. 2-9). Der höhere Gehalt an L-Phenylalanin in RM 6 ist für den Vergleich dieser beiden Medien aber unbedeutend, da sich in RM 6 gezeigt hatte, daß weniger als 1 g L^{-1} verstoffwechselt worden war und damit der überwiegende Teil des Phenylalanins nicht benötigt worden war.

Tab. 2-9 Zusammensetzung der Reaktionsmedien RM 6 und RM 8

RM 6 (pH 3,4)		RM 8 (pH 3,4)	
Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Phenylalanin:	3,0 g L ⁻¹	Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
		(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹	Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹

Es ist bekannt, daß Ammonium die Aminosäurepermeasen hemmt, anscheinend durch die Herabsetzung der Transkriptionsrate ihrer m-RNA [81]. In einer Kultur, in der sich Aminosäuren und Ammoniumsulfat befinden, kann die Aminosäure also erst nach dem Verbrauch des Ammoniums verwertet werden. Das könnte sich in diesem Falle als ungünstig erweisen, da HPB aus der Aminosäure L-Phenylalanin gebildet werden sollte. Der Beweggrund, trotzdem Ammoniumsulfat als schnell verfügbare Stickstoffquelle einzusetzen, war ein schnelles Wachstum und somit den Erhalt einer hohen Zellzahl zu fördern. Nach dem Verbrauch des Ammoniums ständen somit viele aktive Zellen zur Umsetzung des Phenylalanins zur Verfügung.

Im Vergleich zum Medium ohne Ammoniumsulfat (RM 6) wurde hier deutlich mehr Trockenmasse gebildet (> 2 g L⁻¹ im Vergleich zu 1 g L⁻¹ bei RM 6 (Abb. 2-16)). Die Produktbildung lag mit über 10 mg L⁻¹ um ein Vielfaches über der gebildeten Durchschnittsmenge von RM 6, wo nur 1,3 mg L⁻¹ HPB gebildet wurden.

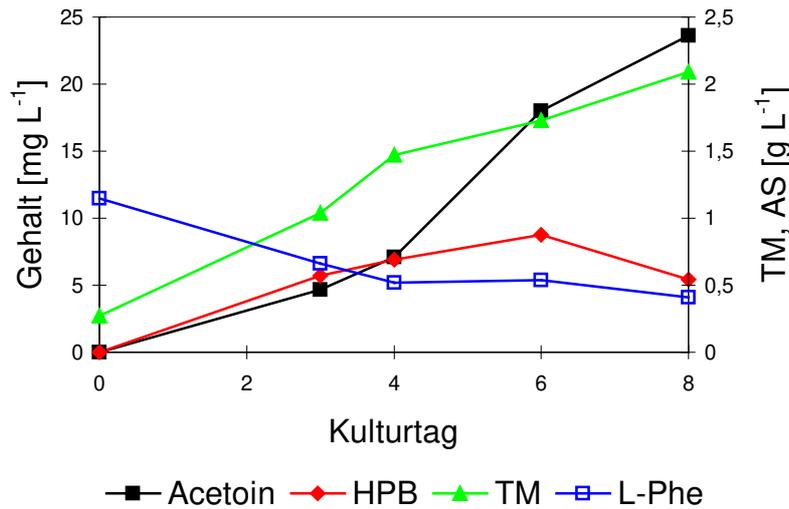


Abb. 2-20 Kulturverlauf von *Z. bisporus* in RM 8 (EtOH, Phe, (NH₄)₂SO₄, pH = 3,4)

Der Zusatz von Ammoniumsulfat förderte das Wachstum und hatte einen positiven Effekt auf die HPB-Bildung.

2.5.1.2 L-Alanin als zusätzliche Stickstoffquelle

RM 9 enthielt kein Ammoniumsulfat als zusätzliche Stickstoffquelle, sondern L-Alanin, das gleichzeitig auch als Pyruvatdonor dienen sollte.

Tab. 2-10 Zusammensetzung der Reaktionsmedien RM 6 und RM 9

RM 6 (pH 3,4)		RM 9 (pH 3,4)	
Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
L-Phenylalanin:	3,0 g L ⁻¹	L-Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
		L-Alanin:	1g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹	Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹

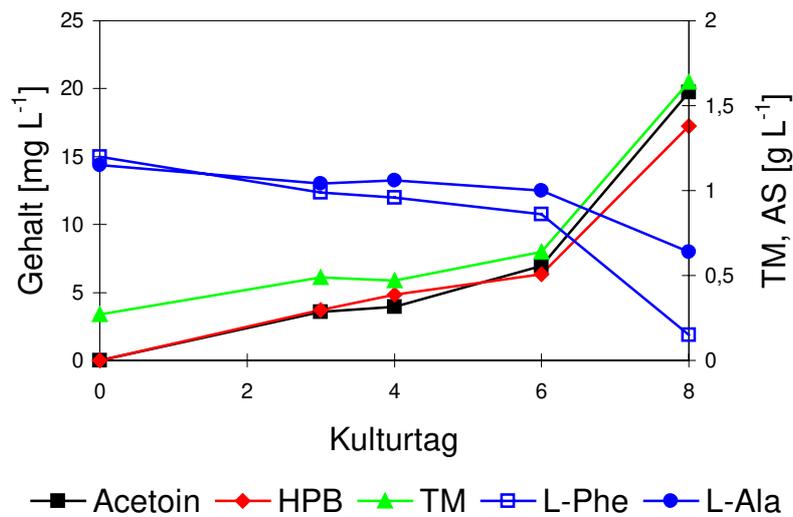


Abb. 2-21 Kulturverlauf von *Z. bisporus* in RM 9 (EtOH, Phe, Ala, pH = 3,4)

Wie aus Abb. 2-21 ersichtlich wird, wird das Wachstum durch L-Alanin nicht sehr gefördert (nur 1,7 g L⁻¹ im Vergleich zu ca 1 g L⁻¹ in RM 6), die Produktbildung aber von 1,3 mg auf über 18 mg gesteigert.

Der Zusatz von L-Alanin wirkte sich positiv auf die Produktbildung aus.

2.5.2 Zusatz von Glucose

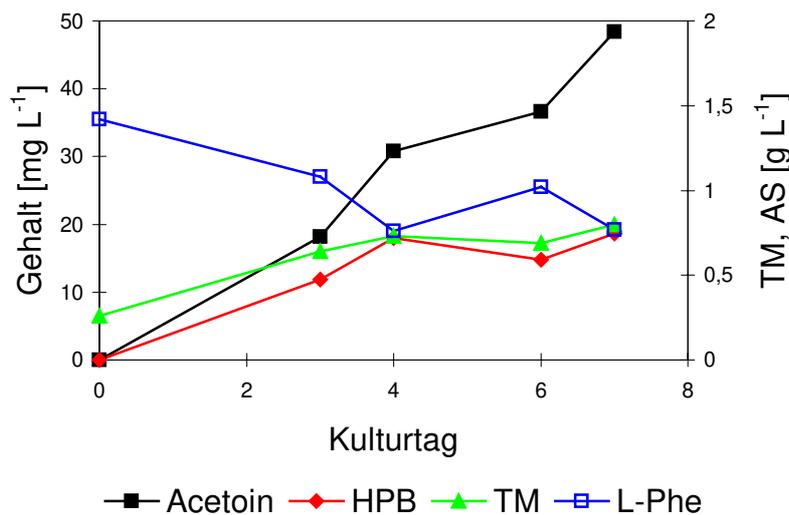
In den vorherigen Reaktionsmedien wurde Ethanol als einzige Kohlenstoffquelle angeboten. In RM 10 wurde noch zusätzlich 10 g L⁻¹ Glucose zugefügt. Die übrige Zusammensetzung entspricht RM 6.

Der HPB-Gehalt wurde von 1,3 mg L⁻¹ auf 18,7 mg L⁻¹ erhöht.

Der Zusatz von Glucose wirkte sich positiv auf die Produktbildung aus.

Tab. 2-11 Zusammensetzung der Reaktionsmedien RM 6 und RM 10

RM 6 (pH 3,4)		RM 10 (pH 3,4)	
Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
		Glucose Monohydrat:	10 g L ⁻¹
L-Phenylalanin:	3,0 g L ⁻¹	L-Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹	Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹

Abb. 2-22 Kulturverlauf von *Z. bisporus* in RM 10 (EtOH, Gluc, Phe, pH = 3,4)

2.5.3 Zusatz von Ammoniumsulfat und Glucose

Da sich sowohl Ammoniumsulfat als auch Glucose positiv auf die Produktbildung ausgewirkt hatten, wurden in den nächsten Optimierungsversuchen beide Substanzen zugesetzt. In RM 11 und RM 12 wurden die Auswirkung verschiedener Konzentrationen von Glucose bei gleichzeitiger Gabe von Ammoniumsulfat auf die Bildung von HPB getestet.

2.5.3.1 Gluc 5 g L⁻¹

RM 11 unterscheidet sich von RM 8 nur durch den Glucosegehalt:

Tab. 2-12 Zusammensetzung der Reaktionsmedien 8 und 11

RM 8 (pH 3,4)		RM 11 (pH 3,4)	
Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
		Glucose Monohydrat:	5 g L ⁻¹
Phenylalanin:	1,0 g L ⁻¹	Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1 g L ⁻¹	(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹	Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹

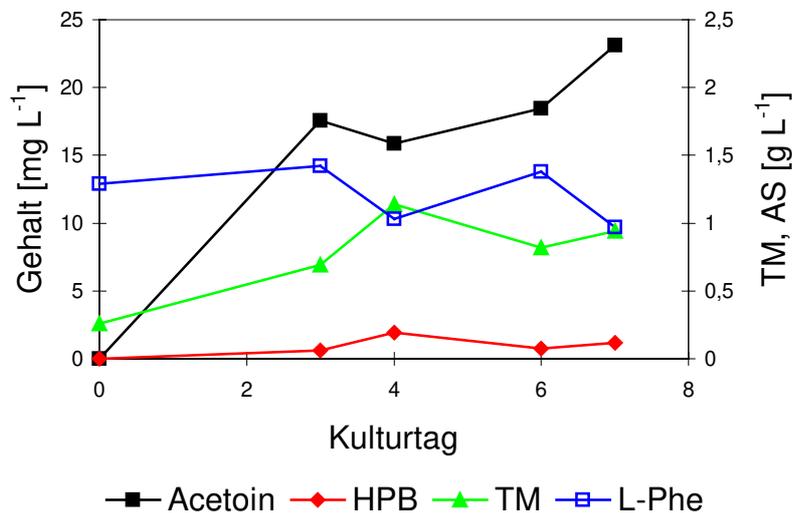


Abb. 2-23 Kulturverlauf von *Z. bisporus* in RM 11 (EtOH, Gluc, Phe, (NH₄)₂SO₄, pH = 3,4)

Die Produktausbeute wird im Vergleich zu RM 8 deutlich geringer. Bei alleiniger Gabe von Ammoniumsulfat wurden $8,9 \text{ mg L}^{-1}$ HPB gebildet, bei Gabe von Ammoniumsulfat und Glucose nur $1,9 \text{ mg L}^{-1}$.

2.5.3.2 Gluc 10 g L^{-1}

Die Zusammensetzung vom RM 12 und RM 10 unterscheidet sich nur durch den Ammoniumsulfatgehalt.

Tab. 2-13 Zusammensetzung der Reaktionsmedien RM 10 und RM 12

RM 10 (pH 3,4)		RM 12 (pH = 3,4)	
Ethanol, unvergällt:	8 \% (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 \% (v/v)
Glucose Monohydrat:	10 g L^{-1}	Glucose Monohydrat:	10 g L^{-1}
Phenylalanin:	1 g L^{-1}	Phenylalanin:	$1,0 \text{ g L}^{-1}$
		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:	1 g L^{-1}
Spurenelemente:	2 mL L^{-1}	Spurenelemente:	2 mL L^{-1}
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L^{-1}	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L^{-1}
KH_2PO_4 :	$0,5 \text{ g L}^{-1}$	KH_2PO_4 :	$0,5 \text{ g L}^{-1}$
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L^{-1}	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L^{-1}
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L^{-1}	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L^{-1}

Die gleichzeitige Gabe von Glucose und Ammoniumsulfat führt zu einem völligen Einstellen der Aminosäureaufnahme. Theoretisch ist dies erklärbar, da diese Bedingungen die die optimalen Voraussetzungen zur Aminosäureproduktion der Hefezellen erfüllen, so daß sie auf die Aufnahme weiterer Aminosäuren verzichten kann. Das wirkt sich negativ auf die Produktbildung aus. Der Gehalt an HPB ist mit 1 mg L^{-1} der niedrigste dieser Versuchsreihe, noch niedriger als beim ursprünglich zu optimierenden Ausgangsmedium RM 6, das weder Glucose noch Ammoniumsulfat enthielt ($1,3 \text{ mg L}^{-1}$) und deutlich niedriger als in RM 10,

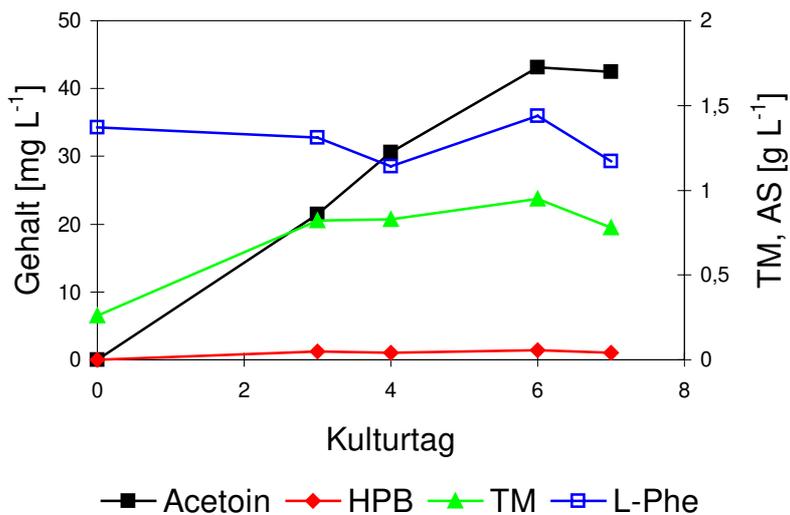


Abb. 2-24 Kulturverlauf von *Z. bisporus* in RM 12 (EtOH, Gluc, Phe, (NH₄)₂SO₄, pH = 3,4)

das ebenfalls 10 g L⁻¹ Glucose enthielt (19 mg L⁻¹). Sogar bei alleiniger Gabe von Ammoniumsulfat (RM 8) war die Produktausbeute noch deutlich höher (8,9 mg L⁻¹).

Sowohl der alleinige Zusatz von Ammoniumsulfat, sowie der alleinige Zusatz von Glucose bewirkte eine Steigerung der HPB-Bildung. Der gleichzeitige Zusatz von beiden Substanzen wirkte sich dagegen stark negativ auf die Bildung von HPB aus.

2.5.4 Änderung des pH-Wertes

Der pH-Wert der Medien wurde bis jetzt bewußt niedrig gewählt, um den Bedingungen von Wein (pH ca. 3,4) zu entsprechen. Durch die Bildung von sauren Metaboliten wurde der pH aber oft noch zusätzlich von den Hefen abgesenkt, so daß ein pH-Wert von 2,4 keine Seltenheit darstellte. Ein so niedriger pH-Wert stellt einen hohen Streßfaktor für jede Hefe dar. Viele Carriersysteme und Enzyme sind pH-abhängig, so daß eine Vielzahl verschiedener Stoffwechselwege beeinträchtigt sein können.

Als optimaler pH-Wert für die PAC-Bildung wurde 4,5 bei Zellkultur mit *S. cerevisiae* ermittelt [73, S.46]. Daher wurde der Anfangs-pH-Wert des Mediums auf 6,0 erhöht. Die Ansäuerung des Mediums durch saure Metabolite sollte so besser berücksichtigt werden. Ansonsten unterschied sich RM 13 nur durch den Phenylalanningehalt von RM 6, was den Vergleich dieser Medien aber nicht beeinträchtigte, da, wie bereits erwähnt, der überwiegende Teil des Phenylalanins (ca 2 g) in RM 6 nicht verstoffwechselt worden war.

Tab. 2-14 Zusammensetzung der Reaktionsmedien 6 und 13

RM 6 (pH 3,4)		RM 13 (pH 6, 0)	
Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Phenylalanin:	3,0 g L ⁻¹	Phenylalanin:	1,5 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹	Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹

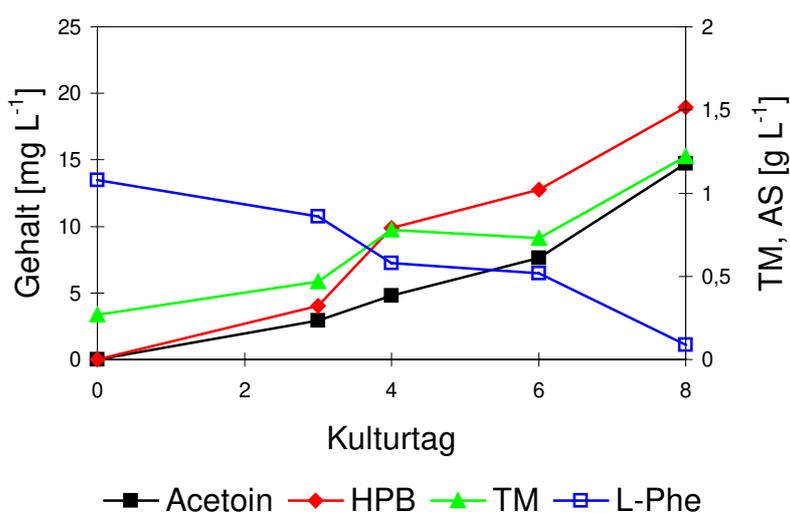


Abb. 2-25 Kulturverlauf von *Z. bisporus* in RM 13 (EtOH, Phe, pH = 6,0)

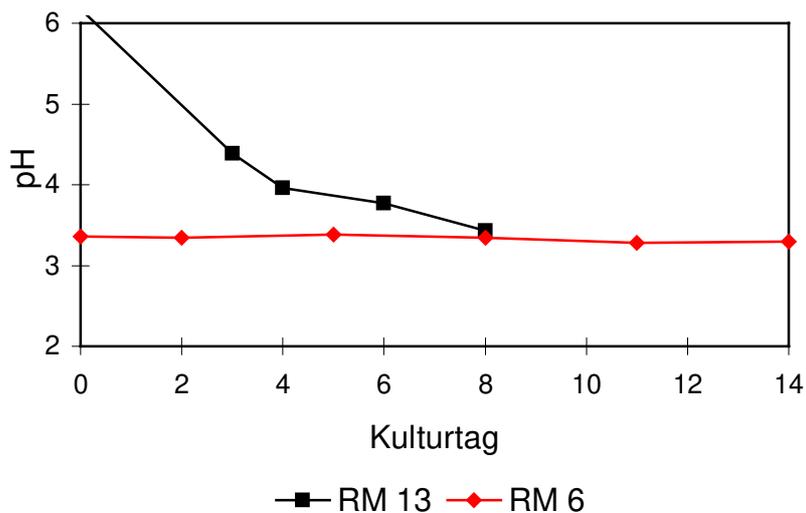


Abb. 2-26 pH-Verlauf der Kulturen in RM 13 (EtOH, Phe, pH = 6,0) und RM 6 (EtOH, Phe, pH = 3,4)

Nach 8 Kulturtagen hatte sich der pH im Medium 13 um 2,5 Einheiten auf 3,4 gesenkt, den pH-Wert von RM 6. Der HPB-Gehalt betrug zu diesem Zeitpunkt 19 mg L^{-1} , mehr als das 14-fache des Gehaltes von RM 6 ($1,3 \text{ mg L}^{-1}$)

Ein Anfangs-pH-Wert von 6 wirkte sich vorteilhaft auf die HPB-Bildung aus.

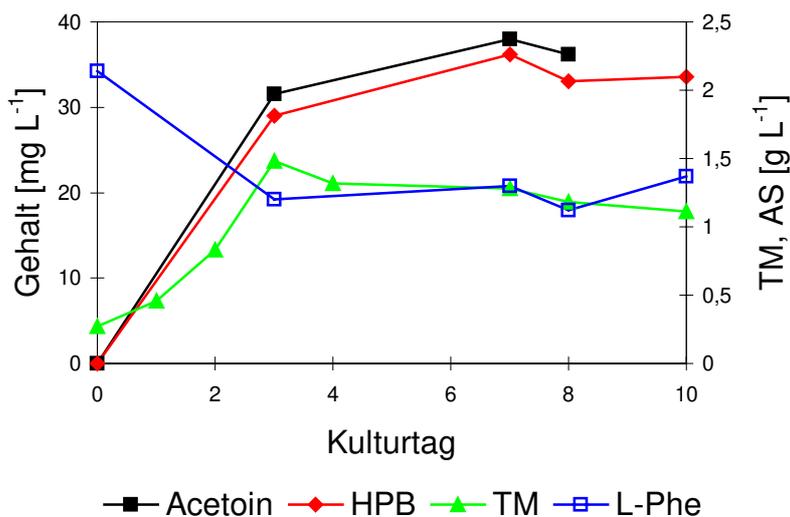
Die in den Medien 8-13 gewonnenen Erkenntnisse wurden verwendet, um drei weitere Medien zu konzipieren. Da sich ein pH-Wert von 6 als vorteilhaft für die Produktbildung erwiesen hatte, wurden die folgenden Medien auf diesen pH-Wert eingestellt.

2.5.5 Zusatz von EtOH, Gluc, Phe (pH = 6,0)

RM 14 entsprach im allgemeinen RM 10 bis auf den pH-Wert. Die Phenylalaninkonzentration wurde etwas erhöht, da in RM 10 fast die gesamte gebotene Aminosäure verbraucht worden war.

Tab. 2-15 Zusammensetzung der Reaktionsmedien 10 und 14

RM 10 (pH 3,4)		RM 14 (pH 6,0)	
Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat:	10 g L ⁻¹	Glucose Monohydrat:	10 g L ⁻¹
Phenylalanin:	1 g L ⁻¹	Phenylalanin:	2 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹	Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹

Abb. 2-27 Kulturverlauf von *Z. bisporus* in RM 14 (EtOH, Gluc, L-Phe, pH = 6,0)

Die Produktausbeute konnte auf 36 mg L⁻¹ gesteigert werden.

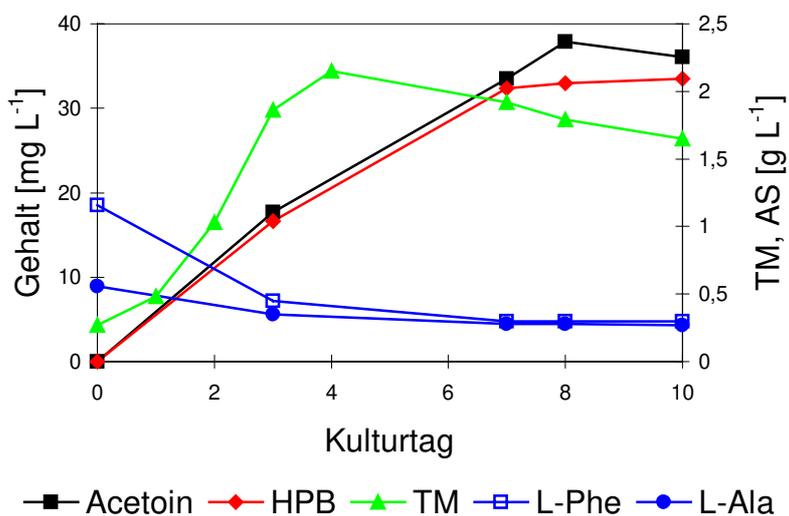
2.5.6 Zusatz von EtOH, Gluc, Phe, Ala (pH = 6,0)

Die Kombination von Ammoniumsulfat/Glucose hatte sich als ungünstig herausgestellt, der Zusatz von entweder Glucose oder zusätzlichem

Tab. 2-16 Zusammensetzung der Reaktionsmedien 9 und 15

RM 9 (pH 3,4)		RM 15 (pH 6,0)	
Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
		Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
Phenylalanin:	1 g L ⁻¹	Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
Alanin:	1 g L ⁻¹	Alanin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹	Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹

Stickstoff war der Produktbildung aber förderlich. Daher galt es zu testen, ob Glucose eventuell in Kombination mit einer anderen Stickstoffquelle eingesetzt werden könnte. RM 15 enthielt 10 g L⁻¹ Glucose und statt Ammoniumsulfat L-Alanin bei einem Anfangs-pH-Wert bei 6,0.

Abb. 2-28 Kulturverlauf von *Z. bisporus* in RM 15 (EtOH, Gluc, Phe, Ala, pH = 6,0)

Die Produktausbeute konnte von 18,7 mg L⁻¹ (RM 9) auf 33 mg L⁻¹ gesteigert werden.

Der höchste Gehalt an HPB von 36 mg L^{-1} wurde von *Z. bisporus* am 7. Kulturtag in RM 14 gebildet, nur geringfügig mehr als in RM 15, aber drei Kulturstage früher. Danach fällt der Gehalt wieder auf 33 mg ab und entspricht damit dem Wert von RM 15. Erklären läßt sich das mit der Annahme, daß in Medium 15 Alanin mit Phenylalanin um die Rolle als Stickstoffdonator konkurrierte. Dadurch wurde anfänglich weniger Phenylalanin von den Zellen aufgenommen und weniger Produkt gebildet. Gegen Ende des Kulturverlaufes war der Gehalt an Alanin weitgehend erschöpft, so daß die Hefe gezwungen war, auch auf L-Phenylalanin zurückzugreifen. Damit glichen sich die Endkonzentrationen an.

Abschließend galt noch zu klären, ob es zu einer Produktsteigerung führt, wenn man statt Ethanol nur Glucose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stellt.

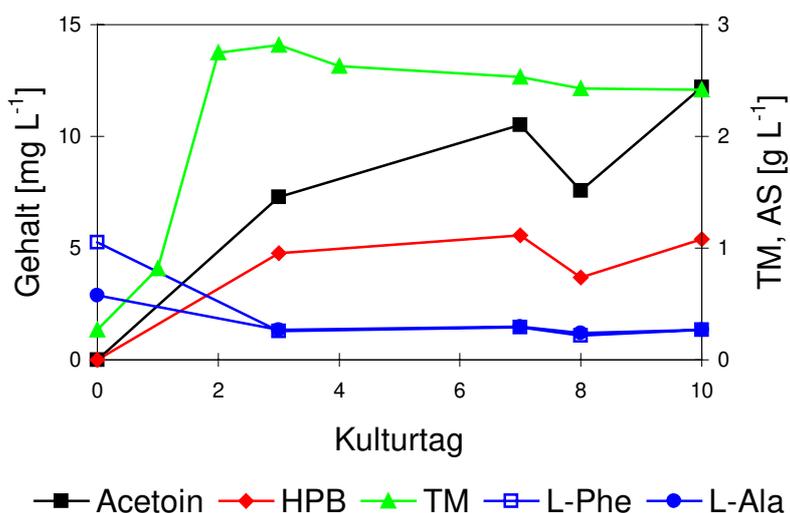


Abb. 2-29 Kulturverlauf von *Z. bisporus* in RM 16 (Gluc, Phe, Ala, pH = 6,0)

Der Kulturverlauf von RM 16 (Abb. 2-29) zeigte, daß das nicht der Fall war.

Die Abwesenheit von Ethanol war zwar für die Bildung von Biomasse und Acetoin förderlich, nicht aber für die Bildung von HPB.

Damit wurde RM 14 als das beste Medium in Bezug auf HPB-Bildung ermittelt. Auf weitere Mediumoptimierungen wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Nach beendeter Optimierung wurden dann noch einmal alle Hefen in RM 14 auf ihre Fähigkeit hin überprüft, HPB zu bilden. Das Ergebnis, daß *Z. bisporus* der beste HPB-Bildner ist, bestätigte sich (Abb. 2-30). Lediglich *S. cerevisiae* 457 und *Z. bailii* bildeten noch nennenswerte Mengen dieser Substanz.

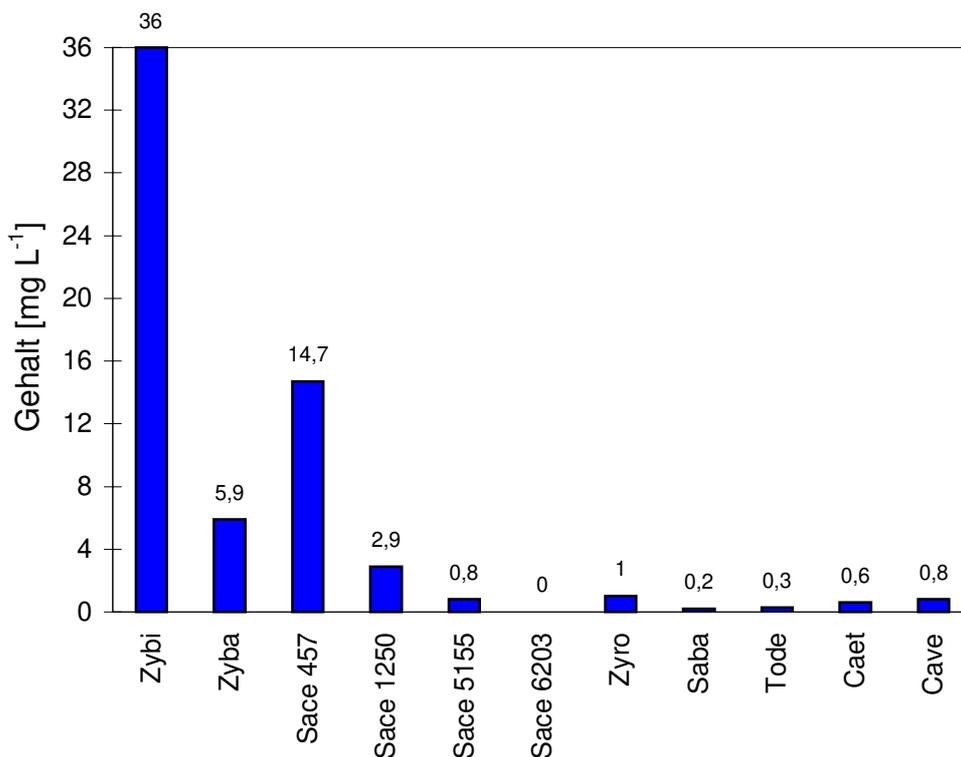


Abb. 2-30 Gebildete HPB-Menge [mg L⁻¹] in RM 14 (EtOH, Gluc, Phe, pH = 6,0)

Bemerkenswert war das unterschiedliche Bildungsvermögen bei den *Saccharomyces*-Stämmen. Während *Saccharomyces cerevisiae* 457 mit ca. 15 mg L⁻¹ der zweitbeste HPB-Bildner war, konnte *S. cerevisiae* 6203 unter den gleichen Bedingungen kein HPB bilden. Die in Medium 14 gebildete Menge reichte aus, um eine ausreichende Menge an HPB zu isolieren und zu verifizieren (siehe Kapitel 2.7)

2.6 Zusatz von anderen Aminosäuren

2.6.1 Zusatz von Tyrosin als Stickstoffquelle

In Analogie zur Acyloinkondensation aus Phenylalanin sollte bei Gabe von Tyrosin 3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanon (**Hyd-4HPB**) und 3-Hydroxy-1-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon (**Hyd-1-HPB**) entstehen.

Tab. 2-17 Zusammensetzung der Reaktionsmedien RM 7 und RM 17

RM 7 (pH 3,4)		RM 17 (pH 6,0)	
Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
		Glucose Monohydrat:	10 g L ⁻¹
L-Tyrosin	1,0 g L ⁻¹	L-Tyrosin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹	Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹

2.6.1.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte

Die Bildung von 3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanon und 3-Hydroxy-1-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon durch *Z. bisporus* wurde vor und nach der Medienoptimierung (siehe Kapitel 2.5) bei zwei verschiedenen pH-Werten nachgewiesen. Zusätzlich wurden in RM 17 *S. cerevisiae* 457 und *Z. bailii*, die sich bei den Optimierungsversuchen in RM 14 (Kapitel 2.5) als die besten HPB-Bildner erwiesen hatten, untersucht.

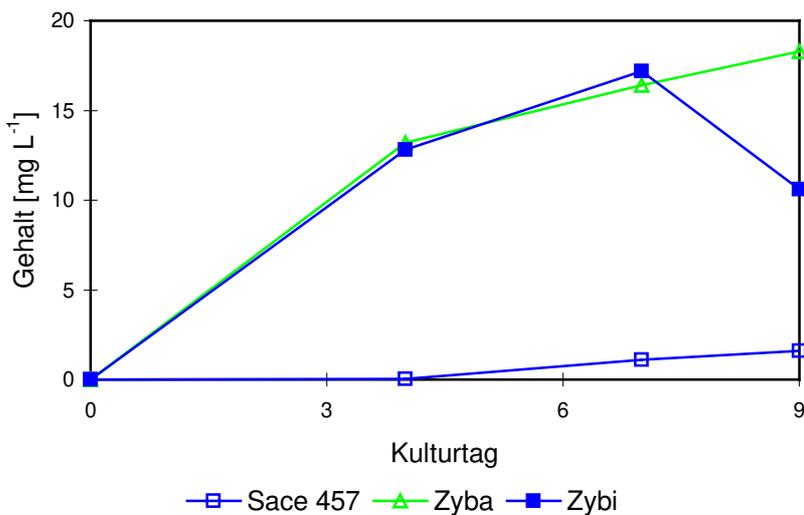


Abb.2-31 Bildung von Hydroxy-(4-hydroxyphenyl)-butanon in RM 17

Genau wie bei der Bildung von HPB erwies sich der höhere Anfangs-pH-Wert als vorteilhaft für die Produktbildung: in RM 7 konnten beide Substanzen nur in Spuren entdeckt werden, in RM 17 konnte in *Z. bisporus*-Kulturen der Gehalt auf $10,6 \text{ mg L}^{-1}$ erhöht werden (Abb. 2-31). *Z. bailii* bildete sogar mehr als 18 mg Hyd-HPB . Eine Trennung der beiden Tautomeren war gaschromatographisch möglich; sie zeigte ein Tautomerenverhältnis von ca. 1:1. Eine Identifizierung von Hyd-4-HPB und Hyd-1-HPB war aber nicht möglich, da am GC-MS-System beide Tautomeren coeluierten. Daher wurde die Summe der Konzentrationen als Gesamt-HydHPB-Gehalt angegeben.

Die charakteristischen Fragmentationen dieser Spektren entsprechen genau den charakteristischen Fragmenten der HPB-Spektren (siehe Kapitel 2.3.4), mit einem um den Wert 16 (OH ersetzt H) erhöhten m/z -Verhältnis derjenigen Fragmentationen, die den aromatischen Ring betreffen.

Durch die Wasserabspaltung entstehen in beiden Fällen konjugierte C-C-Doppelbindungen, deren mesomeres System aber unterschiedlich ausge

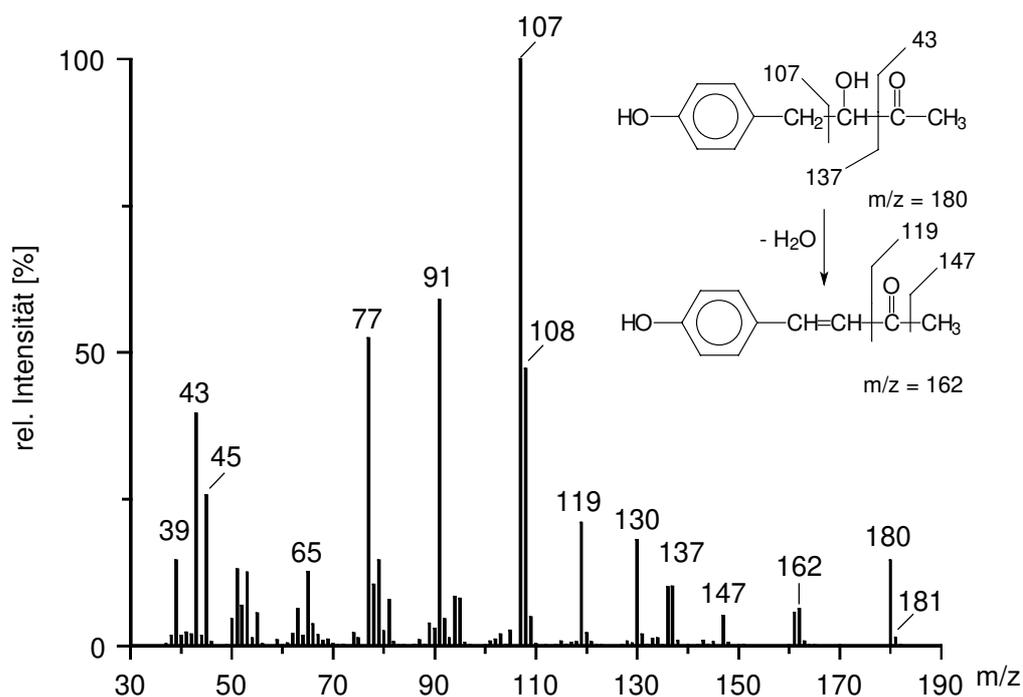


Abb. 2-32 Massenspektrum von 3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanon (Hyd-4-HPB)

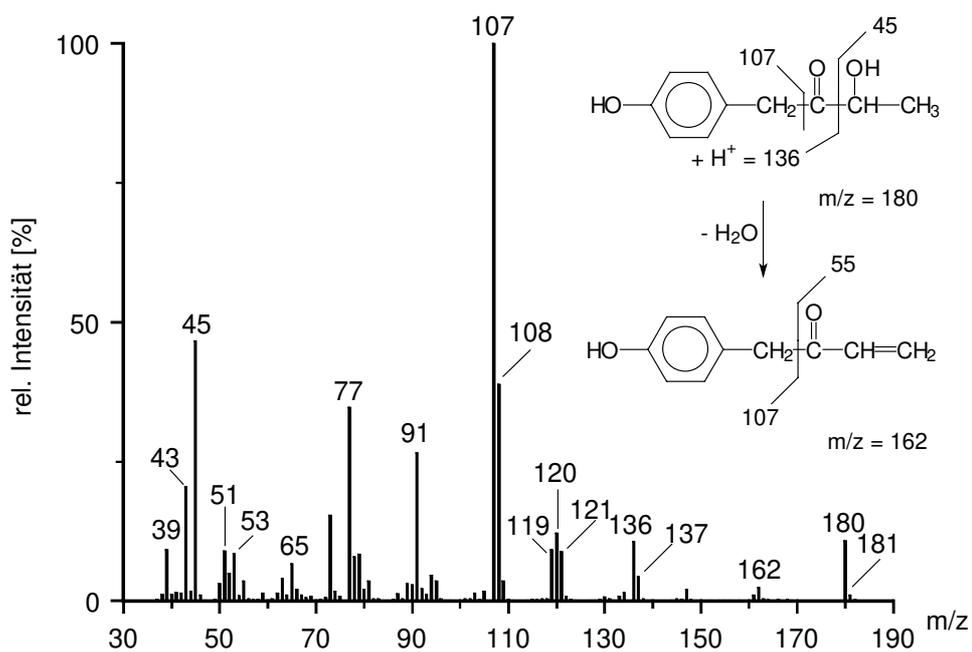


Abb. 2-33 Massenspektrum von 3-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-2-butanon (Hyd-1-HPB)

dehnt ist. Daher ergibt sich bei Hyd-4-HPB ein deutlich intensiveres Signal des Fragments 161/162. Daraus resultieren dann die Fragmentationen 119 (siehe Abb. 2-32) und 130/131 (siehe Abb.2-34).

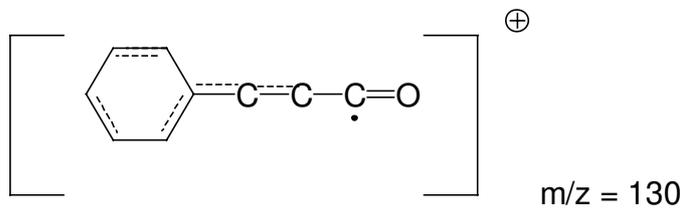


Abb. 2-32 Postulierter Entstehungsweg des Massenfragmentions 130

107/108 entspricht 91/92 und 136/137 den Peaks 120/121 (Erklärung dieser Massenspuren siehe Kapitel 2.3.4, Abb. 2-13)

In diesem Versuch scheint die Konkurrenzreaktion, die Reduktion durch Alkoholdehydrogenase, eine noch größere Rolle zu spielen als bei der Bildung von HPB: *Z. bisporus* bildet 122 mg L^{-1} 2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol (7. Kulturtag), *Z. ballii* sogar 210 mg L^{-1} (9. Kulturtag). Der medizinische, leicht unangenehme Geruch dieser Substanz trug zum allgemeinen Geruch dieser Kulturen bei.

2.6.1.2 Wachstum

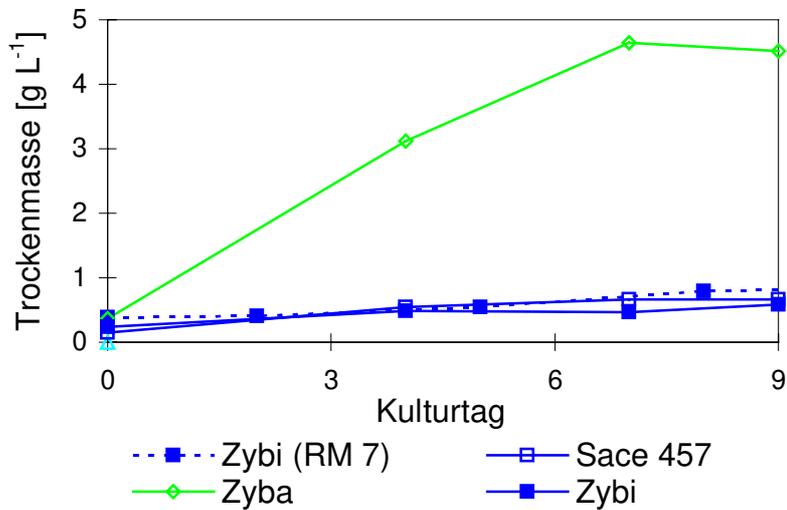


Abb. 2-35 Trockenmasse der Kulturen in RM 7 (EtOH, Tyr, pH = 3,4) und RM 17 (EtOH, Tyr, pH = 6,0)

Nur *Z. bailii* zeigte ein gutes Wachstum. Bei *Z. bisporus* konnte auch der Zusatz von Glucose und die Veränderung des pH-Wertes kein verbessertes Wachstum hervorrufen.

2.6.1.3 Aminosäureverbrauch

Der Aminosäureverbrauch ließ sich nicht messen, da L-Tyrosin im Medium nur wenig löslich war. Der Sättigungswert betrug ca. 0,5 g L⁻¹ und war bis zum letzten Kulturtag bei allen Fermentationen konstant, so daß ein Aminosäuremangel ausgeschlossen werden kann.

2.6.2 Zusatz von Leucin, Isoleucin und Valin

Kurzkettige Ketone und Hydroxyketone, die aus Acyloinkondensationen hervorgehen könnten, können hochaktive Aromastoffe oder Precursoren von hochaktiven Aromastoffen sein. Ihre Bildung könnte man nach dem gleichen Bildungsweg wie HPB formulieren (siehe Abschnitt 3.2.5), Ausgangsverbindungen wären in diesem Fall kurzkettige, aliphatische Aminosäuren. Um zu testen, ob diese Aminosäuren mit nicht-aromatischen Seitenketten in einer analogen Acyloinkondensation umgesetzt werden können, wurde eine Reihe von Nährmedien mit L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin angesetzt, d.h. mit kurzkettigen, aliphatischen Aminosäuren mit ungeladenen, unpolaren Seitenketten. L-Glutaminsäure als Vertreter einer Aminosäure mit geladener Seitenkette und Threonin mit ungeladener, polarer Seitenkette wurden bereits in RM 4 und RM 5 eingesetzt.

Auch hier wurde ein Ansatz in einem nur EtOH-haltigen Medium bei niedrigem pH und ein Ansatz mit EtOH und Glucose-haltigem Medium bei einem pH von 6,0 untersucht.

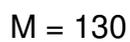
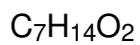
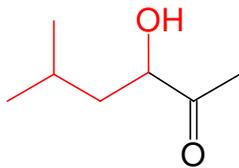
Tab. 2-18 Zusammensetzung der Reaktionsmedien 18 bis 23. Aminosäure: 18 und 21 = L-Leucin, 19 und 22 = L-Isoleucin und 20 und 23 = L-Valin.

RM 18-20 (pH 3,4)		RM 21-23 (pH 6,0)	
Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)	Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Aminosäure:	1 g L ⁻¹	Aminosäure:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹	Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹	Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹	Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹

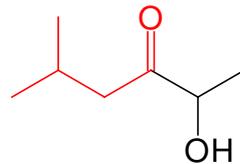
2.6.2.1 Inhaltsstoffe der Kulturextrakte

Analog zu dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Bildungsschema (Abb. 3-1) sind folgende Produkte zu erwarten:

aus **Leucin**:

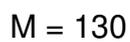
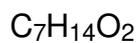
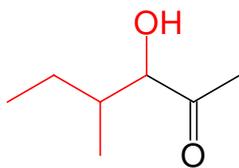


3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon

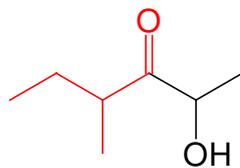


2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon

aus **Isoleucin**:

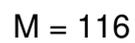
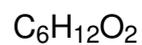
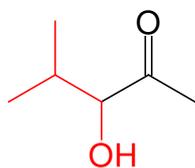


3-Hydroxy-4-methyl-2-hexanon

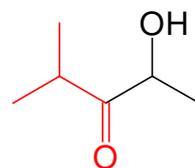


2-Hydroxy-4-methyl-3-hexanon

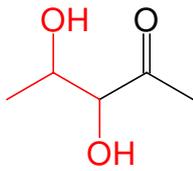
aus **Valin**:



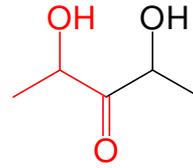
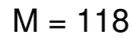
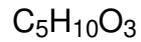
3-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon



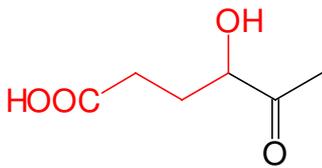
2-Hydroxy-4-methyl-3-pentanon

aus **Threonin**:

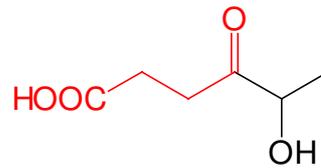
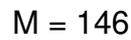
3,4-Dihydroxy-2-pentanon



2,4-Dihydroxy-3-pentanon

aus **Glutaminsäure**:

4-Hydroxy-5-oxo-hexansäure



5-Hydroxy-4-oxo-hexansäure

Abb. 2-36 Strukturen denkbarer Acyloinkondensationsprodukte aus aliphatischen Aminosäuren

In *Z. bisporus*-Kulturen fand sich bei Gabe von L-Leucin (RM 21) eine Spur einer Substanz, deren Spektrum auf das Acyloinkondensationsprodukt passen könnte:

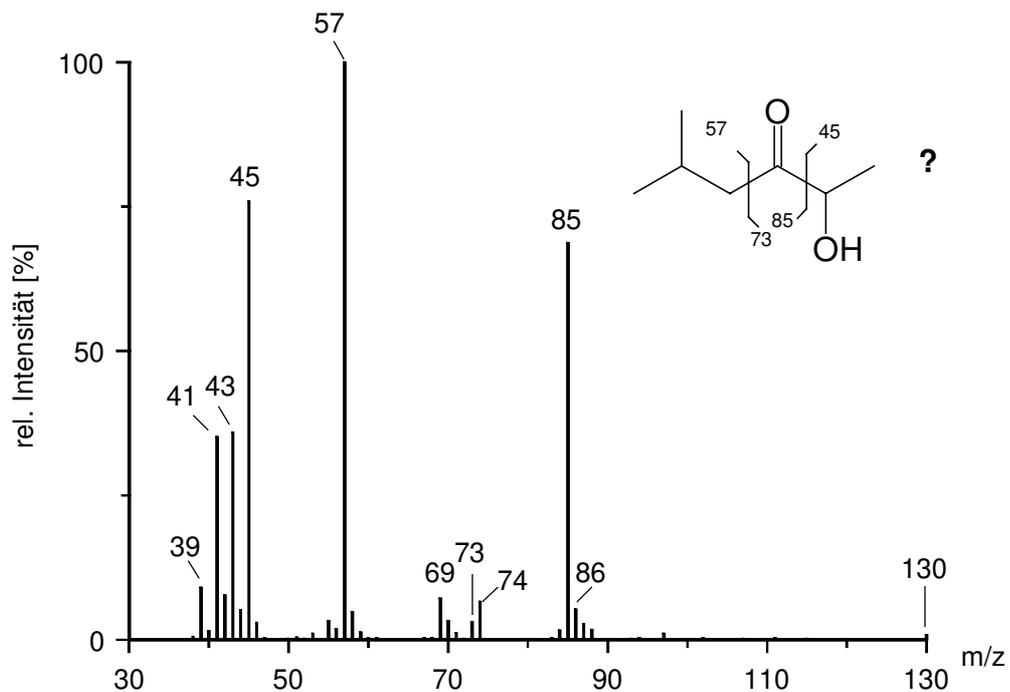


Abb. 2-37 Massenspektrum aus einer *Zygosaccharomyces bisporus* Kultur in RM 21

Auch in RM 23 fanden sich in den *Z. bisporus*-Kulturen Massenspektren, die auf die gesuchten Verbindungen hindeuten könnten (siehe Abb. 2-38). Da die Vergleichssubstanzen aber nicht im Handel erhältlich waren und auch nicht im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert werden konnten, war ein definitiver Beweis nicht zu erbringen.

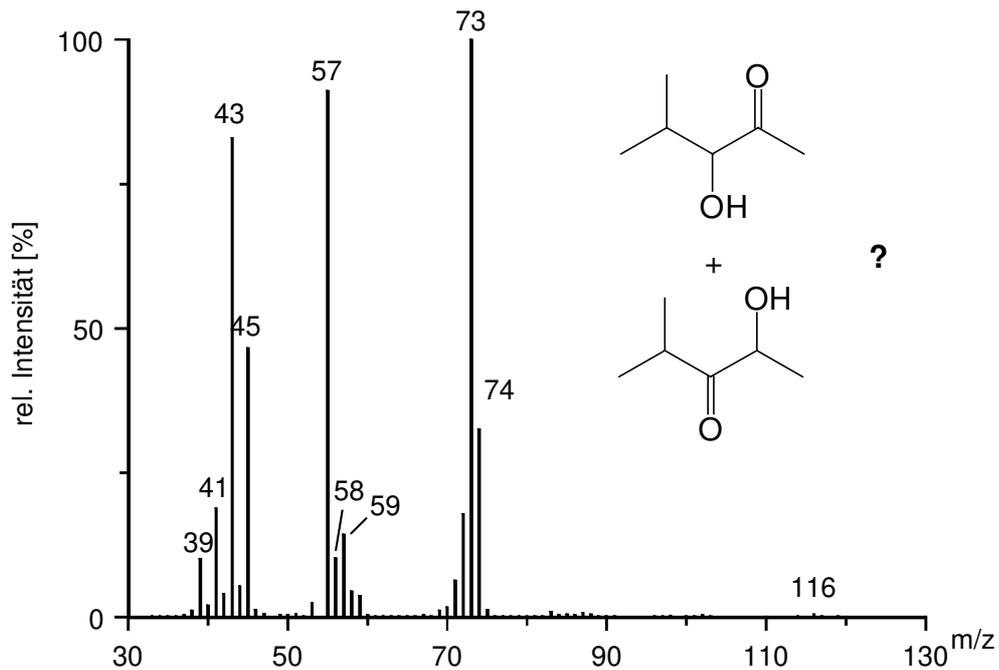


Abb. 2-38 Massenspektrum aus einer *Zygosaccharomyces bisporus* Kultur in RM 23

2.6.2.2 Wachstum

Nur *Z. bailii* zeigte ein herausragendes Wachstum, alle anderen Hefen konnten praktisch keine Biomasse aufbauen (Abb. 2-39). Obwohl sich in RM 5 und RM 2 zeigte, daß HPB auch bei geringer bis keiner Biomasseproduktion gebildet wurde, lassen sich diese Erkenntnisse nicht unbedingt verallgemeinern. Bei dem schlechten Wachstum der Kulturen ließ sich keine Aussage darüber treffen, ob die Abwesenheit von identifizierbaren Acyloinkondensationsprodukten darauf zurückzuführen war, daß generell

keine Acyloinkondensation mit Abbauprodukten aliphatischer Aminosäuren möglich ist, oder ob die Hefe unter diesen schlechten Kulturbedingungen nur einen eingeschränkten Stoffwechsel aufrecht erhalten kann.

2.6.2.3 Aminosäureverbrauch

Den Aminosäureverbrauch der Kulturen zeigt Abb. 2-40.

2.7 Identifizierung und Verifizierung der Strukturen von 1-HPB und 4-HPB

Die beiden Tautomere von HPB wurden mit Hilfe der präparativen GC aus einer Hefekultur von *Z. bisporus* isoliert (Kapitel 4.2.1.3). Die Massenspektren der underivatisierten Verbindung wiesen darauf hin, daß es sich bei dem großen Peak um 1-HPB handelte und 4-HPB nur zu einem sehr geringem Maß gebildet wurde.

2.7.1 Derivatisierungen

Durch Derivatisierungen der isolierten Substanzen ließ sich dies eindeutig bestätigen.

2.7.1.1 Derivatisierung zum Oxim

Um eine Enolisierung oder Tautomerisierung von 1- in 4-HPB zu verhindern, wird die Ketogruppe durch eine Oximbildung geschützt. Dadurch ergab sich ein eindeutig unterschiedliches Spektrum (siehe Abb. 2-41 und 2-42).

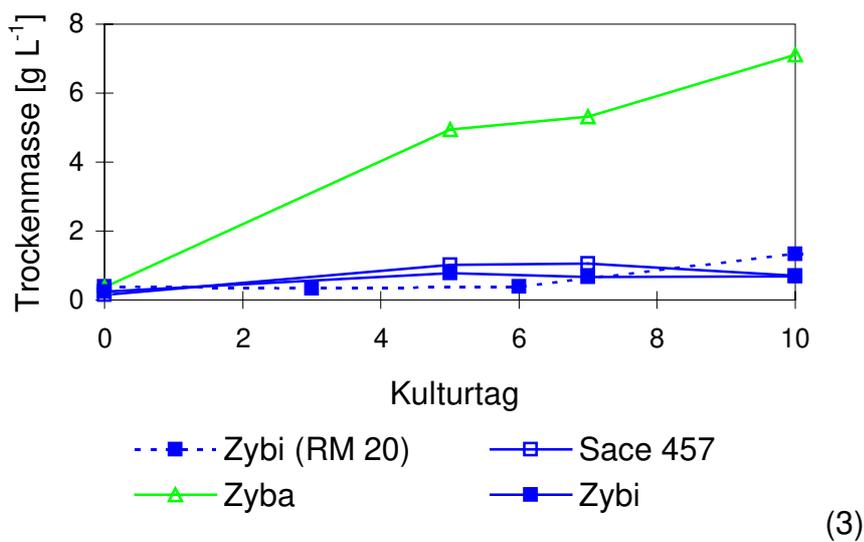
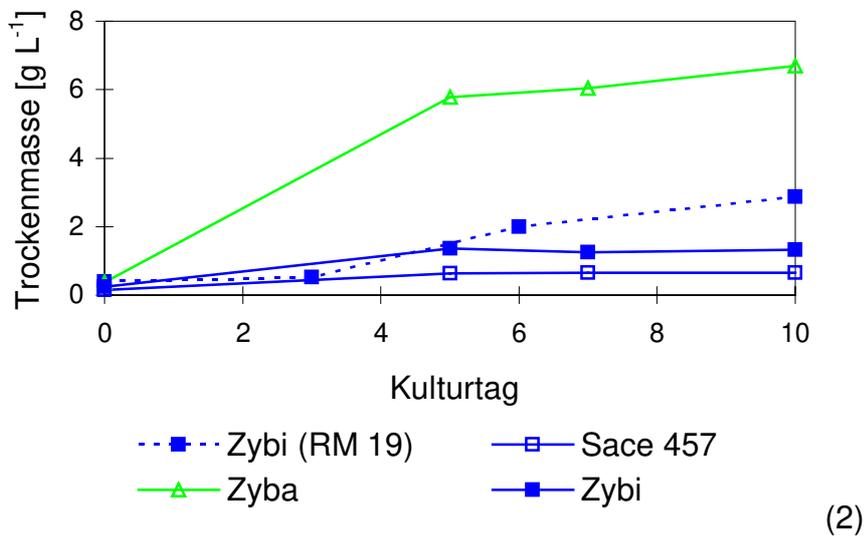
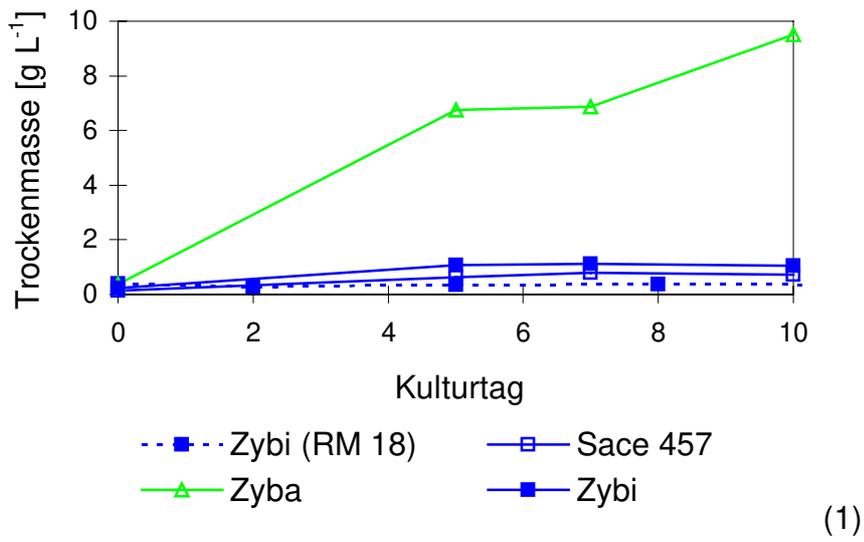


Abb. 2-39 Wachstum der Hefen in RM 18 und 21 (Leu) (1), RM 19 und 22 (Ile) (2) und RM 20 und 23 (Val) (3)

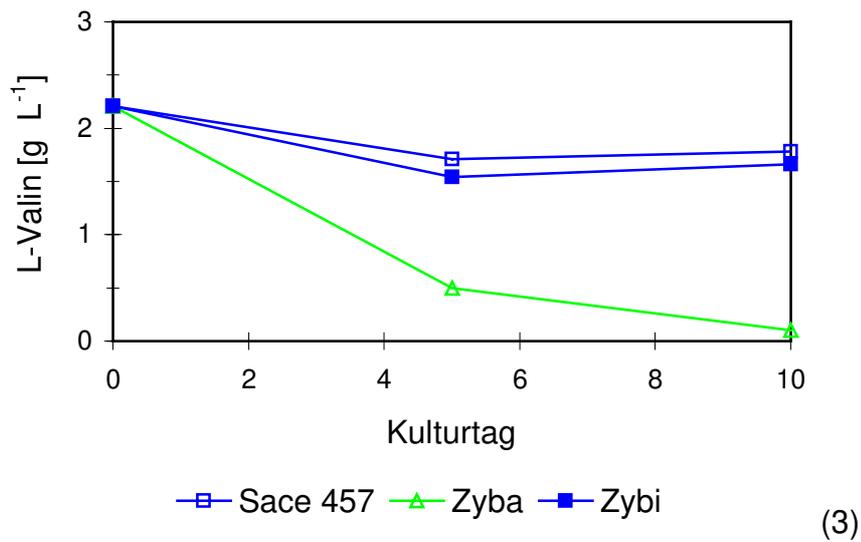
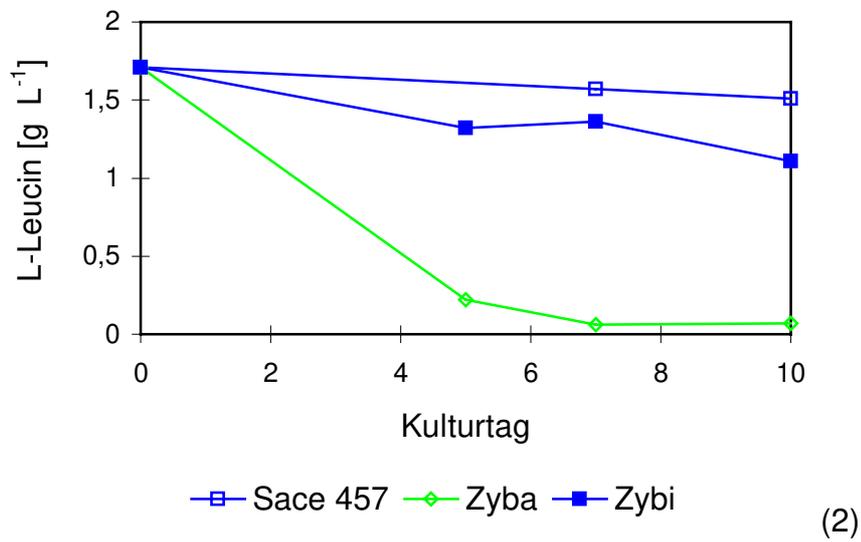
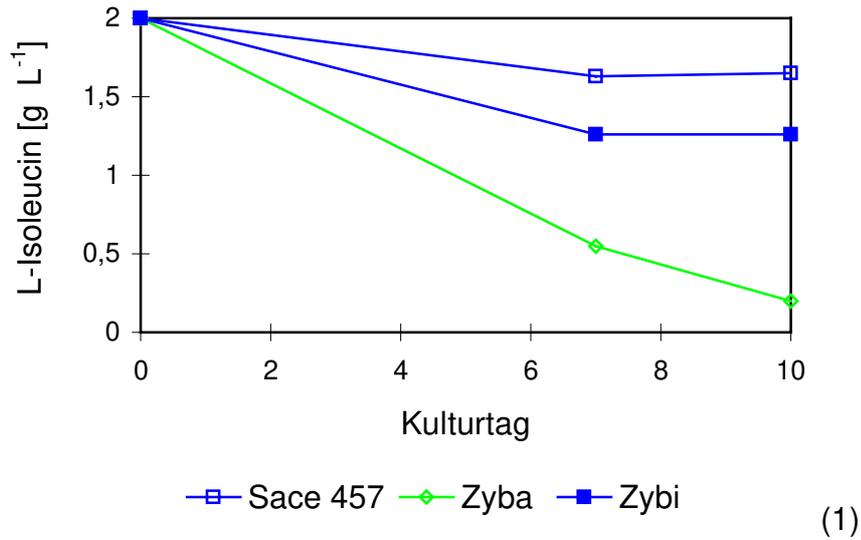


Abb. 2-40 Aminosäureverbrauch der Hefekulturen in RM 21 (Leu, 1), RM 22 (Ile, 2) und RM 23 (Val, 3)

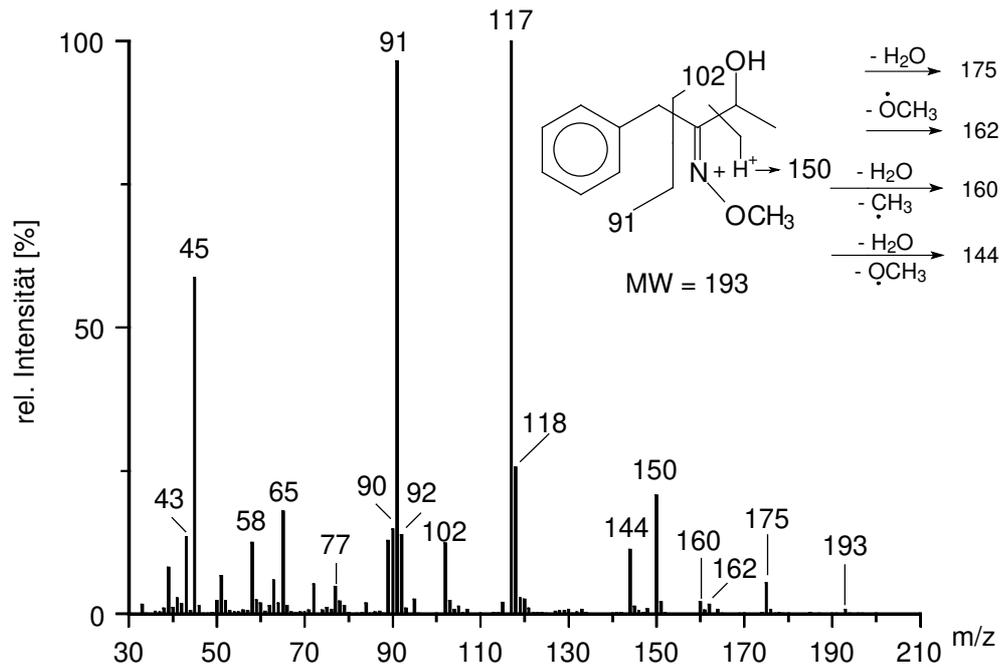


Abb. 2-41 Massenspektrum von 3-Hydroxy-1-phenylbutan-2-on-O-methyloxim

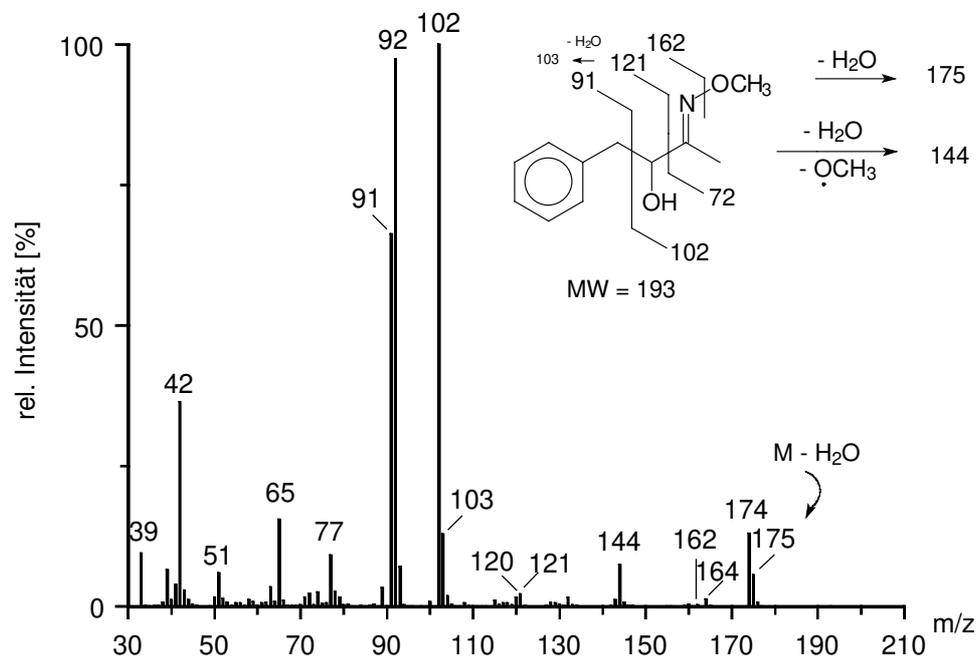


Abb. 2-42 Massenspektrum von 3-Hydroxy-4-phenylbutan-2-on-O-methyloxim

- Für die Entstehung des Massenfragments $m/z = 117$ ergeben sich zwei Möglichkeiten, die beide nur erklärbar sind, wenn die Methyloximgruppe β -ständig zum aromatischen Ring ist (siehe Abb. 2-43). Dieser Peak findet sich nur in einem Spektrum und zwar in dem des wesentlich größeren der beiden Tautomerenpeaks.
- Ein weiterer charakteristischer Peak ist der Peak $m/z 150$, auch er läßt sich nur für 1-HPB erklären und findet sich nur im Spektrum des großen GC-Peaks (siehe Abb. 2-41).
- Der Massenpeak ist wieder nur für 1-HPB detektierbar, da 4-HPB bevorzugt Wasser abspaltet. Hier ist nur M-18 zu sehen.

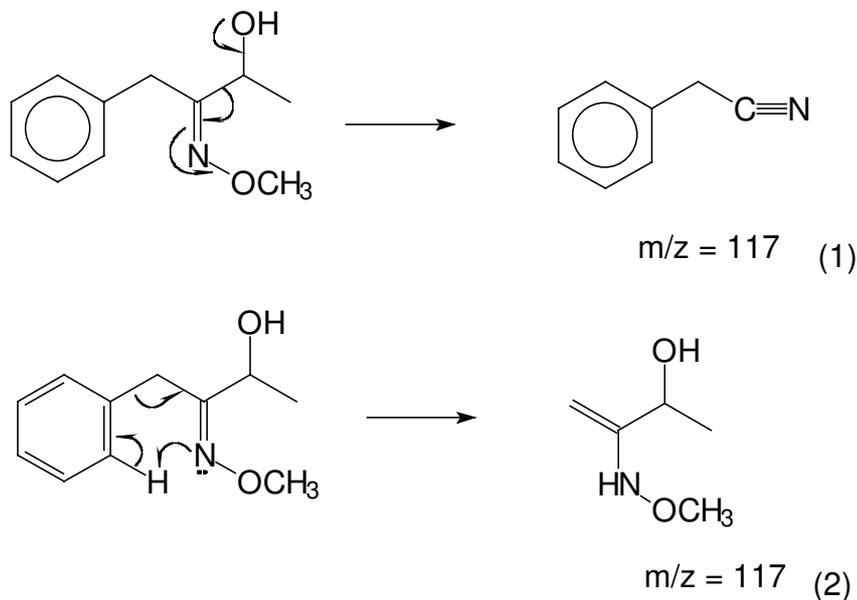
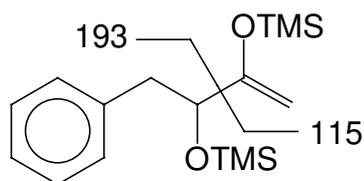


Abb. 2-43 Mögliche Entstehung des Massenfragments 117

2.7.1.2 Silylierung

Auch durch Silylierung ergaben sich eindeutige, interpretierbare Unterschiede in den Spektren. Es ist zu erwarten, daß HPB bei entsprechendem Zusatz von MSTFA nicht nur einmal, sondern, durch Keto-Enol-Tautomerie bedingt, zweimal silyliert wird.

Die zweifach silylierte Verbindung ist im Falle des 4-HPB sehr instabil, da die durch die Enolisierung entstandene terminale Doppelbindung nicht sehr begünstigt ist. Die TMS-Gruppe an Position 2 wird sofort wieder abgespalten, weshalb auch der Massenpeak der zweifachsilylierten Verbindung von 308 nicht zu sehen ist. Es ergibt sich im Spektrum praktisch kein Unterschied zur einfach silylierten Substanz.



MW = 308

Abb. 2-44 Zweifach trimethylsilyliertes 4-HPB

Tab. 2-19 Tabellarisches MS-Spektrum von 4-HPB

MW	m/z (% rel Intensität)
308	221 (3), 193 (67), 177 (8), 129 (3), 115 (3), 91 (21), 73 (100), 45 (15)

Ein anderes Bild ergab sich bei der zweifachen Silylierung von 1-HPB.

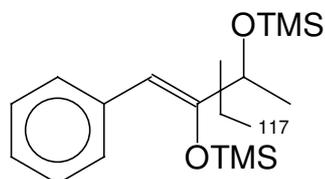


Abb. 2-45 Zweifach trimethylsilyliertes 1-HPB

Hier ist die durch die Enolisierung entstehende Doppelbindung durch Konjugation mit dem Aromaten stabilisiert. Die Verbindung ist damit wesentlich stabiler und der Massenpeak detektierbar.

Tab. 2-20 Tabellarisches MS-Spektrum von 1-HPB

MW	m/z (% rel Intensität)
308	308 (1), 236 (2), 221 (4), 177 (8), 129 (3), 118 (10), 117 (86), 91 (27), 73 (100), 45 (13)

2.7.1.3 Reduktion

Die beiden Tautomere 1- und 4-HPB sollten sich beide durch einfache Reduktion in 4-Phenyl-2,3-butandiol überführen lassen. Die Reduktion erfolgte mit NaBH₄ (Abschnitt 4.4.6)

Zu erwarten waren zwei Enantiomere, die erythro- und die threo-Form von 4-Phenyl-2,3-butandiol, die sich aber unter den gegebenen GC-Bedingungen nicht trennten.

Beide Peaks konnten durch Reduktion in *einen* Peak überführt werden, der zur gleichen Zeit von der Säule eluierte und das gleiche Massenspektrum aufwies wie das bereits erwähnte 4-Phenyl-2,3-butandiol (siehe auch Abb. 2-14).

Tab. 2-21 Tabellarisches MS-Spektrum von 4-Phenyl-2,3-butandiol

MW	m/z (% rel Intensität)
166	166 (1), 148 (6), 121 (29), 103 (32), 92 (100), 91 (57), 78 (17), 77 (12), 57 (15), 45 (7), 43 (6)

2.7.2 Synthese der Vergleichssubstanzen und Vergleich der NMR-Spektren

Die Synthesen (4.3.1.1) und (4.3.1.2) lieferten ein Gemisch von 1- und 4-HPB, die zur gleichen Zeit eluierten und das gleiche Spektrum aufwiesen wie die aus dem Hefeextrakt isolierten Substanzen.

2,12 g 1-HPB wurden nach der in (4.3.2) beschriebenen Synthesemethode hergestellt. Von dem synthetischen HPB wurde ein ^{13}C und ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen und mit den Spektren der aus dem Hefeextrakt isolierten Substanzen verglichen

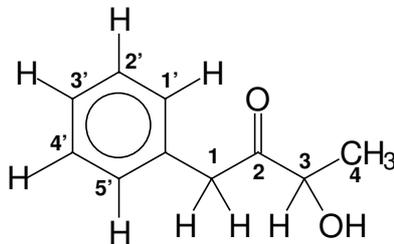


Abb. 2-46 1-HPB

NMR-Spektren von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (Abb 2-46) aus Hefe:

^1H -NMR (CD_3OD): 7,33-7,19 (*m*, 5H, C-1'-5'); 4,3-4,25 (*q*, 1 H, C-3, $^3J = 7$ Hz); 3,88 (*s*, 2 H, C-1); 1,34-1,32 (*d*, 3 H, C-4, $^3J = 7$ Hz)

^{13}C -NMR (CD_3OD): 135,77 (C-3, C-OH) [130,77; 130,52; 129,46; 129, 31, 127,79; (Aromat)]; 73,81 (C-3, C-H); 45,27 (C-1); 19,76 (C-4) Der Carbonylkohlenstoff (erwartete Verschiebung ca 210 ppm) war auf Grund der kleinen Stoffmenge (ca. 3 mg), mit der das Spektrum aufgenommen wurde, nicht zu sehen.

NMR-Spektren von synthetischem 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon
(Abb. 2-46 und Abb. 2-48 bis 2-51):

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): 7,24-7,04 (*m*, 5H, C-1'-5'); 4,28-4,16 (*q*, 1 H, C-3, $^3J = 7$ Hz); 3,82 (*s*, 2 H, C-1); 1,32-1,24 (*d*, 3 H, C-4, $^3J = 7$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): 212,55 (C-2) 135,75 (C-3, C-OH) [130,75; 130,50; 129,5; 129,1; 128,0; (Aromat)]; 73,50 (C-3, C-H); 45,25 (C-1); 19,75 (C-4)

NMR-Spektrum 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (Abb.2-47):

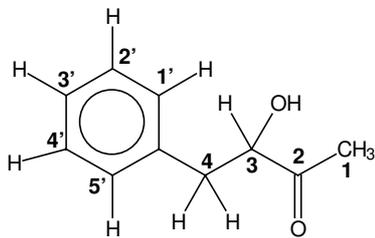


Abb. 2-47 4-HPB

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7,30 (*s*, 5H, C-1'-5'); 4,44 (*m* 1 H, C-3); 3,14 (*dd*, 2 H, C-4; $^2J = 14,15$ Hz, $^3J = 4,63$); 2,91 (*dd*, 2 H, C-4: $^2J = 14,13$ Hz, $^3J = 7,24$); 2,17 (*d*, 3H, C-1, $^4J = 2,83$ Hz)

Das Spektrum stimmte mit den veröffentlichten Daten überein [83-84].

Damit war der Beweis erbracht, daß es sich bei den im Hefeextrakt nachgewiesenen Substanzen tatsächlich um 1-HPB und 4-HPB handelte. Dabei wurde hauptsächlich das 1-HPB-Tautomer synthetisiert, das 4-HPB kam nur in geringer Menge vor.

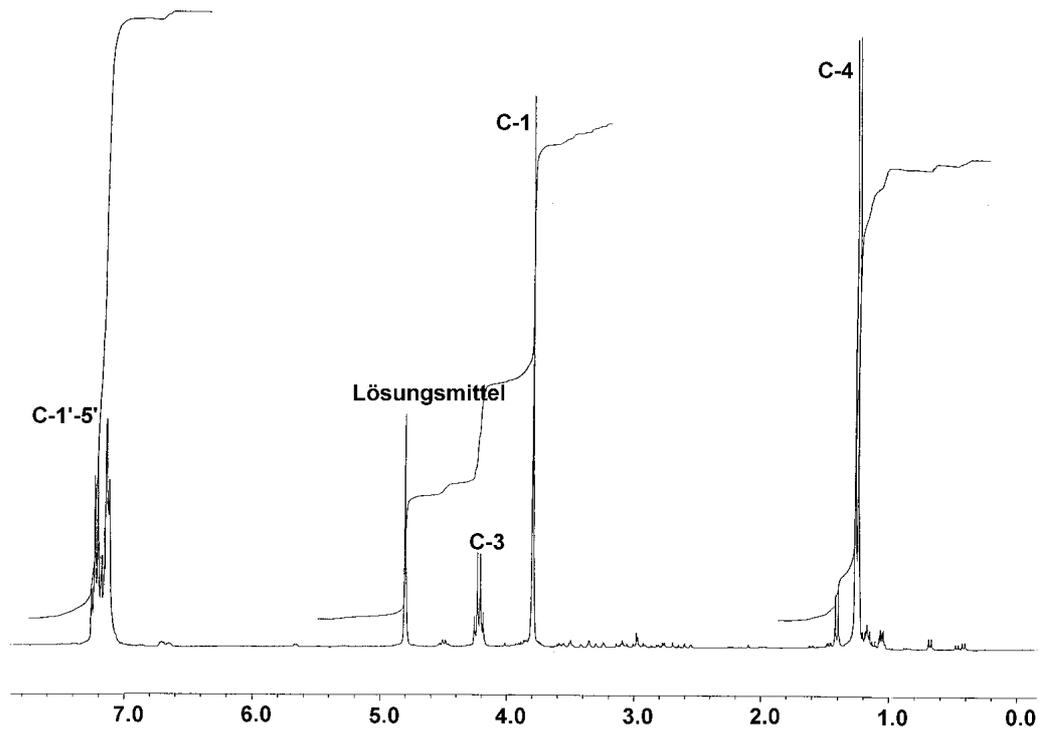


Abb. 2.48 ^1H -Spektrum von synthetischem 1-HPB in CD_3OD

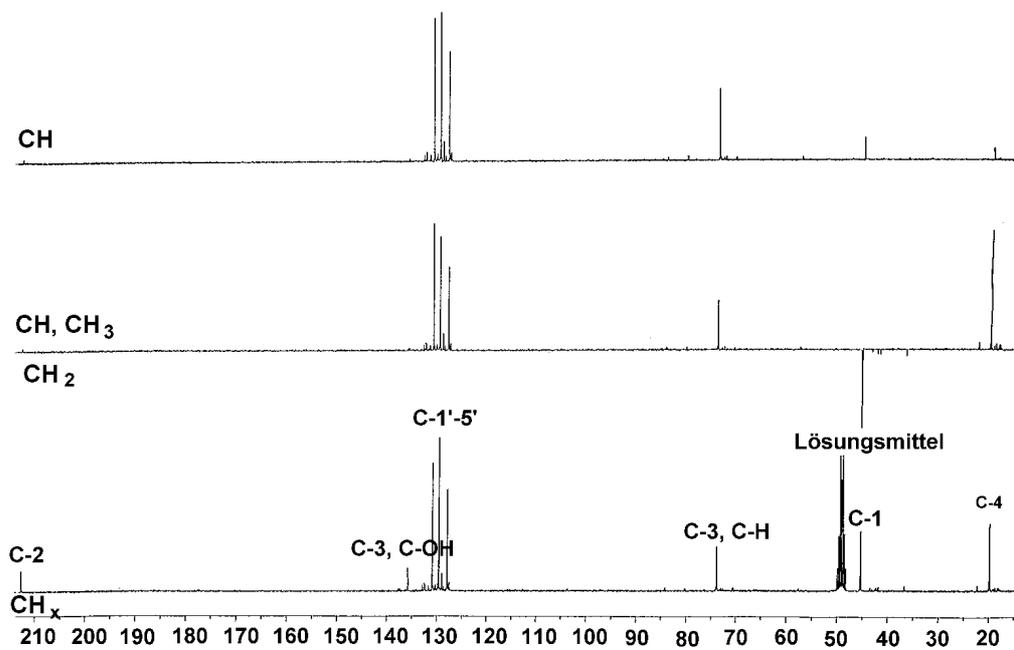


Abb. 2-49 ^{13}C -Spektrum (DEPT) von synthetischem 1-HPB in CD_3OD

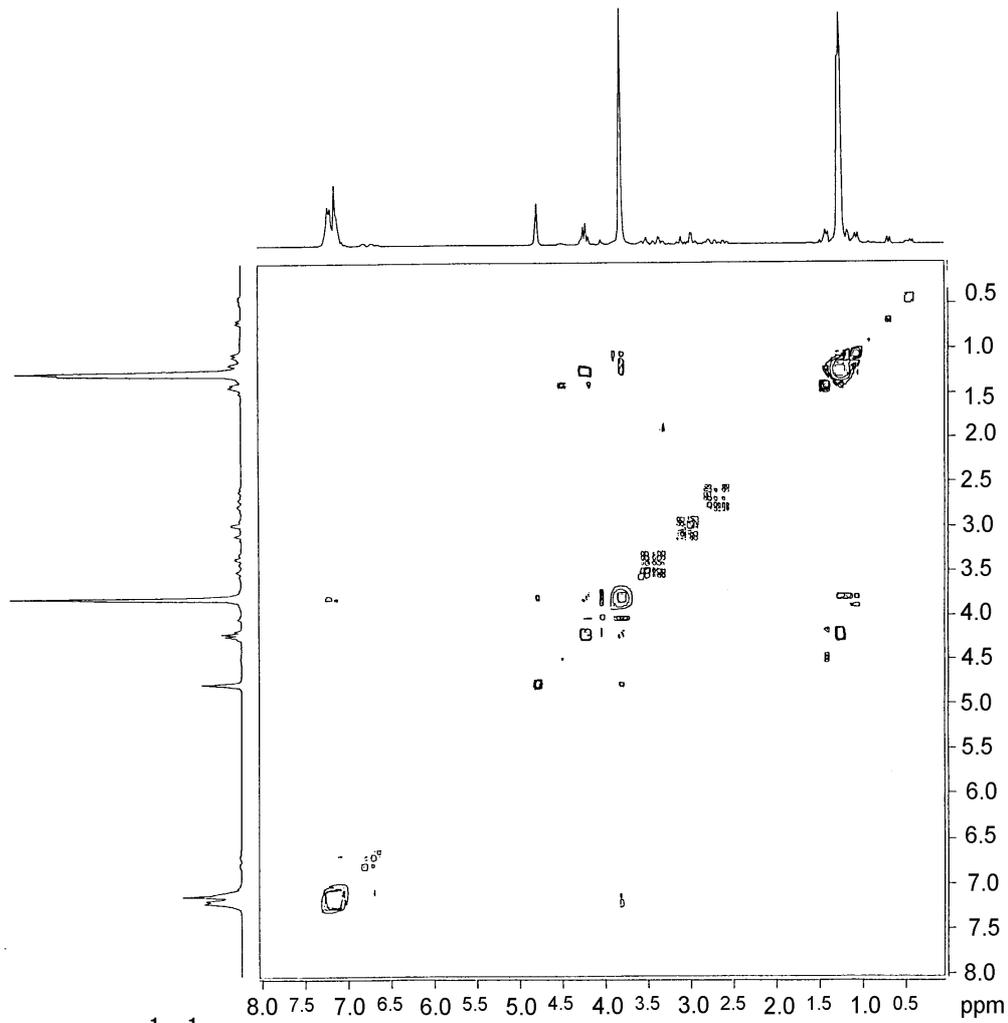


Abb. 2-50 2D- ^1H - ^1H -Kopplungsspektrum von synthetischem 1-HPB in CD_3OD

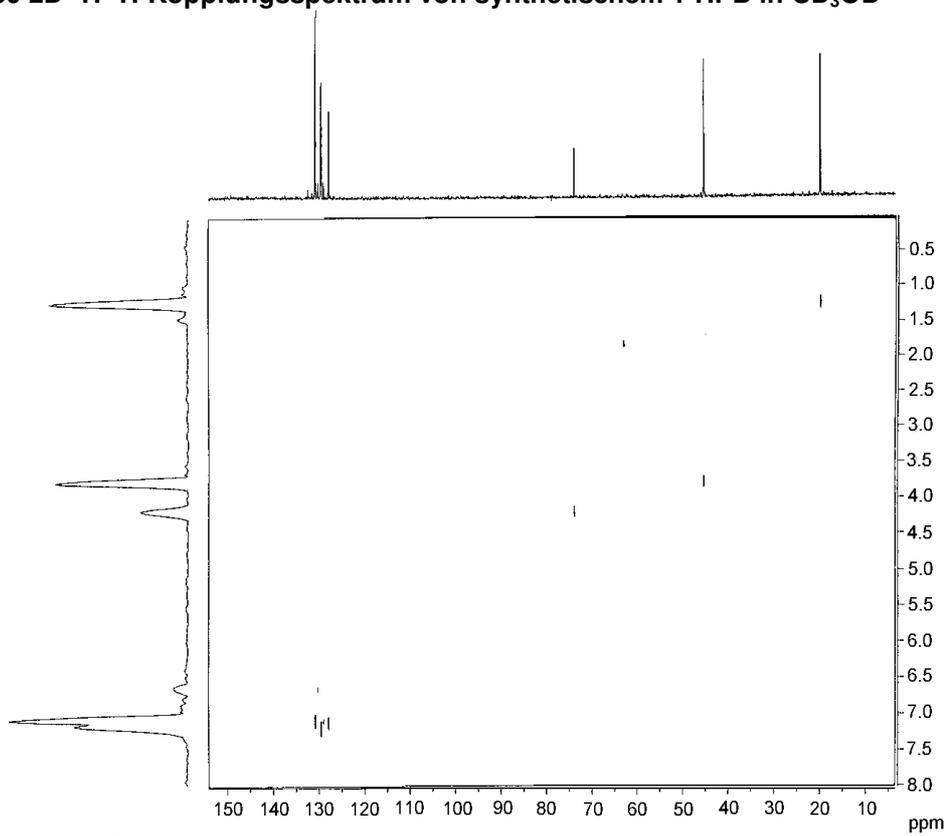


Abb. 2-51 2D- ^1H - ^{13}C -Kopplungsspektrum von synthetischem 1-HPB in CD_3OD

2.7.3 Stereochemische Untersuchungen

Synthetisches und natürliches 1-HPB wurden gaschromatographisch auf einer chiralen Säule in die Enantiomere getrennt (4.2.1.4 Säule B). Für die Trennung erwies es sich als vorteilhaft, die Hydroxygruppe als TFA-Ester zu schützen (Abschnitt 4.4.5).

Es ergab sich im natürlichen HPB ein Enantiomerenüberschuß von 87%, bei dem synthetisch hergestellten erwartungsgemäß ein Racemat. Literaturangaben über die Stereospezifität der PDC-katalysierten Kondensation ließen vermuten, daß es sich bei dem im Überschuß entstandenen Enantiomer um das R-Enantiomer handelte.

2.7.4 Stabilität von 1-HPB

Über die Stabilität von 4-HPB im Hinblick auf eventuelle Umwandlung in 1-HPB wurden bereits Untersuchungen durchgeführt [73]. Der Autor kam zu der Erkenntnis, daß keine Umlagerung während eines Kulturverlaufes (21,5 h, pH-Wert von 4,5, 28 °C, 110 U min⁻¹) stattfand.

Um zu überprüfen, ob umgekehrt sich 1-HPB eventuell in 4-HPB umlagert, wurde ein Stabilitätstest in RM 14 durchgeführt. Abweichend von der sonstigen Zusammensetzung wurde der pH-Wert des Mediums schon zu Beginn auf 4,5 eingestellt, da hier nicht mit einer pH-Wert-Absenkung durch saure Metabolite gerechnet werden konnte. Verwendet wurde die auch zur NMR-Messung eingesetzte Probe des natürlichen 1-HPB, das bereits einen 3%-igen Anteil an 4-HPB enthielt. Die übrigen Bedingungen entsprachen den bei den üblichen Standardbedingungen der Fermentation (24 °C, 130 U min⁻¹). Probenahme und Analyse der Tautomerenverhältnisse erfolgte nach 1 h und am 5., 7. Und 11. Kulturtag (siehe Abb. 2-53).

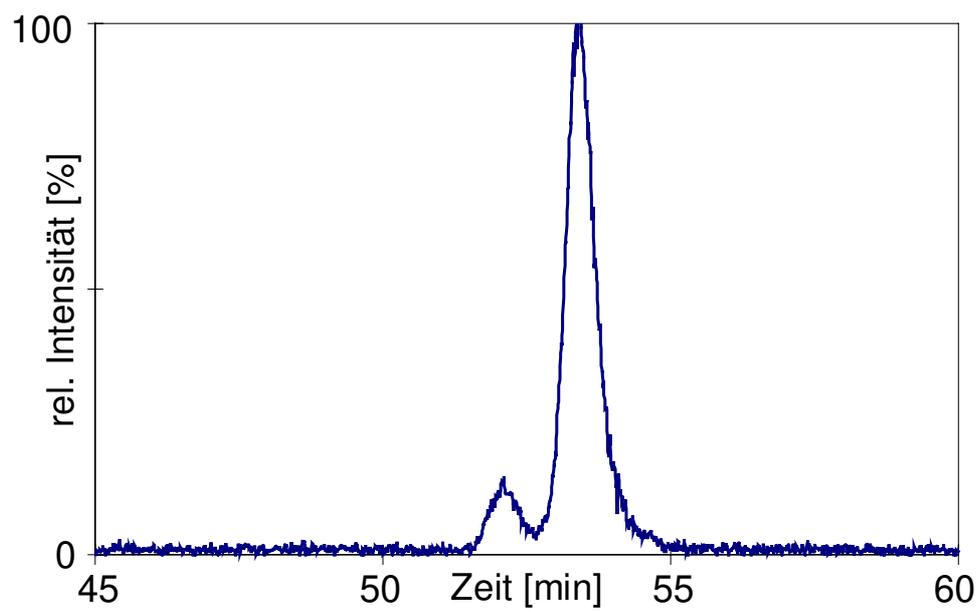
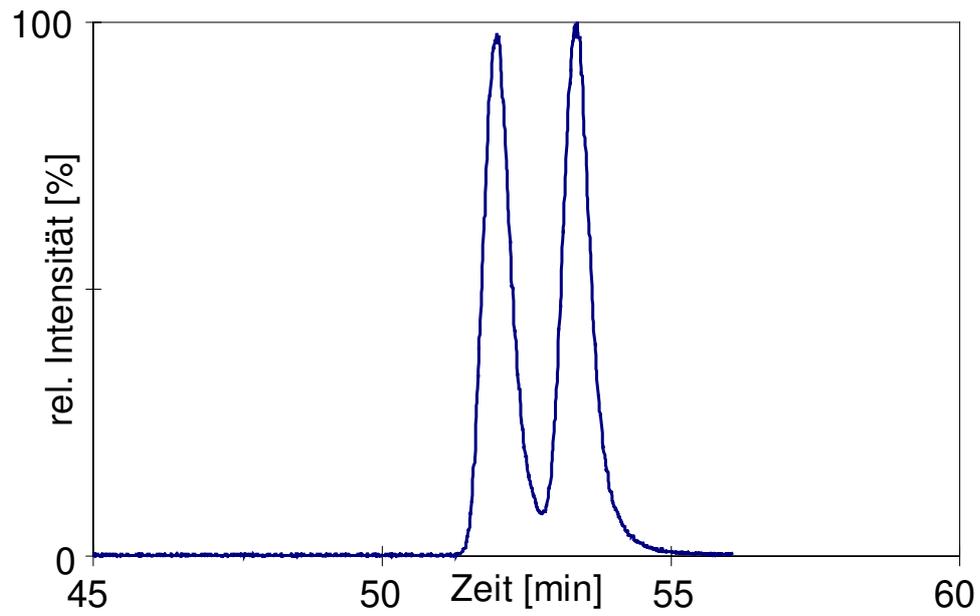


Abb. 2-52 Enantiomere von 1-HPB synthetisch (oben) und aus Hefe (unten)

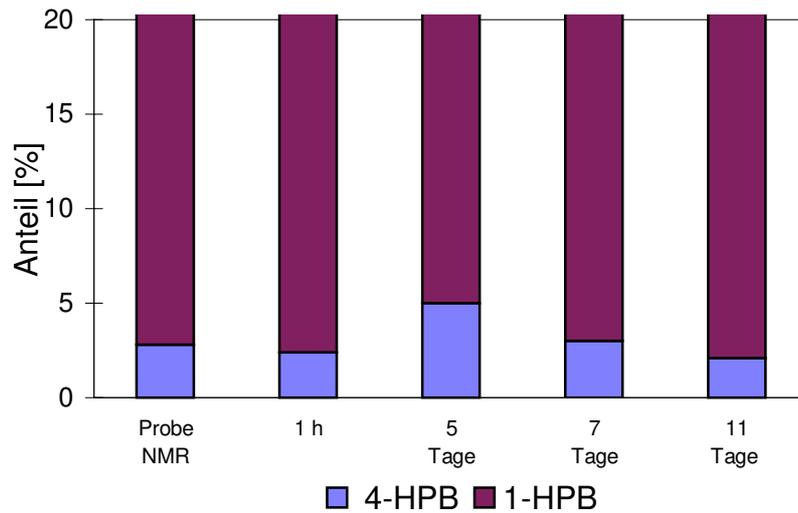


Abb. 2-53 Stabilität von 1-HPB in RM 14 (EtOH, Gluc, Phe, pH = 6,0)

Die Anteile von 4-HPB schwanken zwischen 2 und 5 %. Der Wert am 5. Tag erschien im Vergleich zu den anderen Werten etwas hoch, ansonsten liegen die Schwankungen im Bereich der Meßgenauigkeit. Es war also keine Umlagerung von 1-HPB in 4-HPB zu beobachten.

3. Diskussion

3.1 Enzyme mit Carboligaseaktivität

Von besonderem praktischen Interesse für die Biotechnologie sind enzymatische Reaktionen, die in der Lage sind, Kohlenstoffketten zu verlängern oder zu verknüpfen. Da das ganze organische Leben im Prinzip auf dem Aufbau von Kohlenstoffbindungen beruht, fing man schon früh an, intensiv nach Carboligaseaktivität zu suchen, in der Hoffnung, die gewonnenen Erkenntnisse technisch zur Synthese nutzen zu können [6-14].

Heute sind eine Reihe von C-C-kettenverlängernden Enzymen bekannt, von denen die wichtigsten hier ohne genauere Erläuterung genannt werden sollen [15-21]:

- **Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase**

Kohlenstoffassimilation von grünen Pflanzen und Photobakterien aus CO₂

- **Transketolase**

transferiert im Phosphogluconat-Weg Glycoaldehydgruppen von verschiedenen 2-Ketophosphaten auf C1-Atome verschiedener Aldosephosphate

- **Transaldolase**

überträgt im Phosphogluconat-Weg Dihydroxyacetongruppen von D-Sedoheptulose-7-P auf D-Glycerin-3-P

- **Fructose-1,6-diphosphat Aldolase**

Kondensationsreaktion der Glucogenese

Acyl-CoA Ligasen

- **Ketoacyl-(ACP)-Synthase**

Kondensationsreaktion im Fettsäuresynthase-Komplex. Substrat: Malonyl-CoA

- **Citrat-Synthase**

Substrate: Acetyl-CoA und Oxalessigsäure

Phosphoenolpyruvat-Carboxylierungen

- **PEP-Carboxylase**

in Bakterien und grünen Pflanzen

- **PEP-Carboxykinase**

in Hefen, Pflanzen und höheren Tieren

- **PEP-Carboxytransphosphorylase**

in *Propionibacterium shermanii*

- **Prenyl-Transferase**

- **Squalen-Transferase**

ATP und Biotin abhängige Carboxylasen

- **Pyruvat-Carboxylase**

- **Acetyl-CoA-Carboxylase**

- **Propanoyl-CoA-Carboxylase**

- **Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase**

- **Geranyl-CoA-Carboxylase**

Oxynitrilasen

Substrat: Blausäure und Aldehyde

- **(S)-Oxynitrilase aus Mohrenhirse**
- **(R)-Oxynitrilase aus Bittermandeln**

Anwendungstechnische Bedeutung in industriellen Prozessen haben vor allem die Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase, die vorwiegend aus Kaninchenmuskel gewonnen wird, sowie die Transketolasen und die Oxynitrilasen.

3.2 Kohlenstoffkettenverlängerung durch Pyruvatdecarboxylase

3.2.1 Pyruvatdecarboxylase

Acyloine werden von Hefen aus Pyruvat und Aldehyd durch die Katalyse von Pyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.1) synthetisiert [85, Abb. 3-1]. Dabei werden Aldehyde durch Anlagerung von Acetaldehyd um eine C₂-Einheit zu optisch aktiven α -Ketolen verlängert.

Als Cofaktoren werden Thiamin-Pyrophosphat (TPP) und Magnesium Mg²⁺ benötigt. Der erste Schritt der Decarboxylierung besteht im nucleophilen Angriff von TPP auf die Carbonylgruppe des Pyruvates. Nach Abspalten von Kohlendioxid wird das Intermediat hydrolysiert und Acetaldehyd abgespalten, wobei TPP regeneriert wird.

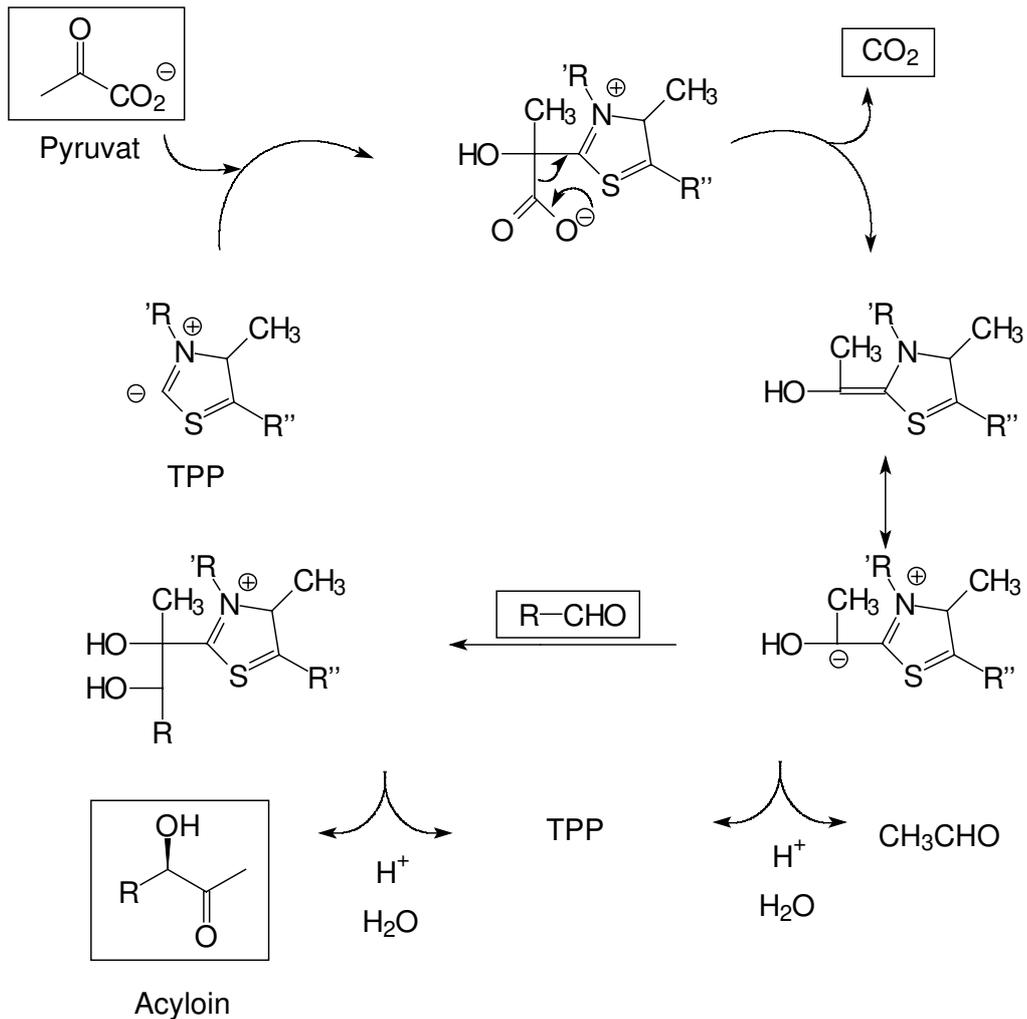


Abb. 3-1 Mechanismus der Acyloinkondensation durch PDC-Katalyse (nach [85])

Die Intermediate fungieren in Anwesenheit von anderen Aldehyden als sogenannte "umpoled synthons". Solche Reagenzien sind in der organischen Synthese von großer Bedeutung, weil in ihnen ein ursprünglich elektrophiler Kohlenstoff (hier: der elektrophile Kohlenstoff der Carbonylgruppe) einen nucleophilen Charakter erhält. Dieser Vorgang, den man als "Umpolung" bezeichnet, ermöglicht durch die Änderung der Reaktivität des entsprechenden Kohlenstoffs die Acyloinkondensation durch nucleophile Addition an die Carbonylgruppe. Diese Addition wird bei Thiamin-abhängigen Enzymen, wie der Pyruvatdecarboxylase

(EC 4.1.1.1) [86], Pyruvatoxidase (EC 1.2.3.3) [87] oder der Transketolase (EC 2.2.1.1) [88], allgemein beobachtet und ist auf das Interesse der organischen Chemiker gestoßen [86, 88]. Ein entsprechender Reaktionsmechanismus ist von der ebenfalls TPP abhängigen und zum Teil sehr ähnlichen Acetolactatsynthase (EC 4.1.3.18) bekannt [119]. Dieses Enzym bindet am ersten Zentrum Pyruvat, das nach Decarboxylierung mit einem weiteren, am zweiten Zentrum gebundenen Pyruvatmolekül kondensiert.

Thiamin-Pyrophosphat (TPP) abhängige Enzyme finden sich in beinahe allen wichtigen Stoffwechselwegen. Thiamin (Vitamin B₁) liegt im Organismus hauptsächlich in Form von TPP vor und fungiert als Cofaktor von Enzymen, die sich hauptsächlich mit der Decarboxylierung von α -Ketosäuren beschäftigen. Bemerkenswert an den TPP-abhängigen Enzymen im allgemeinen und bei der PDC im besonderen ist, daß der Cofaktor alleine schon in der Lage ist, die Decarboxylierung durchzuführen, wenn auch über eine Million ($>10^6$) mal langsamer als das Holoenzym.

Die Pyruvatdecarboxylase (PDC) ist wohl das einfachste dieser Enzyme und katalysiert die irreversible, nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat, wobei Acetaldehyd entsteht. Unter anaeroben Bedingungen entsteht aus Acetaldehyd durch Katalyse der Alkoholdehydrogenase Ethanol. Damit ist PDC das Schlüsselenzym bei der alkoholischen Fermentation von Hefen und dementsprechend sehr gründlich untersucht [89-97, 116, 118].

Die Kristallstruktur von PDC aus *S. cerevisiae* und *S. uvarum* sind mit einer Auflösung von 2,3 Å, bzw. 2,4 Å aufgeklärt [96, 91]. Es handelt sich in beiden Fällen um ein tetrameres Enzym, genauer ein $\alpha_2\beta_2$ Tetramer, das als asymmetrische Einheit aus zwei Untereinheiten auskristallisiert. Es enthält mehrere, sehr fest gebundene Wassermoleküle an struk-

turellen Schlüsselpositionen. Sechs Wassermoleküle befinden sich am Bindungsort der Cofaktoren; eines davon dient zur Bindung des benötigten Mg^{2+} - Ions. Ein anderes könnte an dem katalytischen Reaktionsmechanismus beteiligt sein.

Über die Enantioselektivität der PDC sind mit der Arbeit von Wanner [73] einige Zweifel aufgekommen. Während Fuganti [109] in *S. cerevisiae*-Kulturen fermentativ gebildetes Phenylacetylcarbinol mit 95% (R) -Enantiomerenüberschuß fand, konnte Wanner nur einen 24%-igen Enantiomerenüberschuß feststellen, 2-Hydroxypropiophenon fand er sogar racemisch vor, was ihn eine Keto-Enol-Tautomerie als Entstehungsweg vermuten ließ. Generell hält Wanner die Enantioselektivität der PDC zumindest bei *S. cerevisiae* für überschätzt. Er isolierte zwei Enon-Reduktasen, die er für die Bildung von optisch aktiven Produkten aus racemischen Diolvorstufen verantwortlich machte. Bei Fermentation mit dem Substrat Phenylacetaldehyd dagegen entstand 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon mit 64% (R)-Enantiomerenüberschuß, ein Ergebnis, das, wie er meint, eher auf eine chirale Induktion der PDC hinweisen könnte.

Bis jetzt ist die Acyloinkondensation eine der wenigen technisch nutzbaren Biosynthesen, die durch die Verlängerung von Substraten den Aufbau von chiralen Verbindungen ermöglicht. Ursprünglich war als katalysierendes Enzym eine Carboligase vermutet worden, deren Existenz aber Dirschel schon 1930 [12-14] anzweifelte. Er postulierte die Acyloinbildung bereits als eine Nebenreaktion der Pyruvatdecarboxylase (PDC).

3.2.2 PDC-katalysierte Biosynthese einiger Aromastoffe

Bei einigen Aromastoffen vermutet man ebenfalls die Entstehung durch eine PDC-katalysierte Aldolkondensation.

Ein Beispiel ist das Sotolon (4,5-Dimethyl-3hydroxy-2(5H)-furanon), ein Aromastoff mit extrem niedrigem Schwellenwert ($10 \mu\text{L L}^{-1}$ Wein [43]) und einem Geruch, der in niedrigen Konzentrationen als "nussig", in höheren Konzentrationen als "curry-artig" oder "maggi-artig" beschrieben wird. Da Sotolon ursprünglich nur in thermisch behandelten Lebensmitteln wie Rohrzuckermelasse [44], Sojasauce, Sake [45] oder Maggi-Würze nachgewiesen wurde, führte man seine Entstehung zunächst auf eine rein chemische Degradationsreaktion zurück. Später wurde es aber auch in Lebensmitteln, Pflanzen und Samen entdeckt, die keiner thermischen Behandlung unterzogen worden waren, so daß man einen biochemischen Entstehungsweg formulierte. Als Ausgangsprodukt der Biosynthese von Sotolon wird Threonin vermutet (siehe Abb. 3-2).

Sotolon ist die "character-impact"-Komponente von Liebstöckel [46] (im Volksmund auch "Maggikraut" genannt) und eine wichtige Aromakomponente von Bockshornkleesamen [47], einem Hauptbestandteil von Curry. Ausführlich untersucht ist auch ihr Beitrag zum Aroma von Flor-Sherry und botrytisierem Wein [48-59, 43].

Soleron (5-Oxo-4-hexanolid), ist ein weiterer bekannter Inhaltsstoff von Wein [60] und im besonderen von Flor-Sherry [Augustyn et al, 61]. Lange Zeit galt es als "Impact"-Komponente von Solera-Sherry [138, 139], von dem sein Name abgeleitet wurde. Neuere Veröffentlichungen [62] lassen an seiner Bedeutung als Aromastoff zweifeln; wahrscheinlich ist das von Augustyn beschriebene Aroma auf eine Verunreinigung oder postcolumn-Derivatisierung zurückzuführen. Zur Entstehung von Soleron wird aber

allgemein angenommen, daß es enzymatisch von Mikroorganismen des Flor-Sherrys unter oxidativen Fermentationsbedingungen hergestellt wird. Als Precursor wird Glutaminsäure vermutet [63-67, siehe Abb. 3-4].

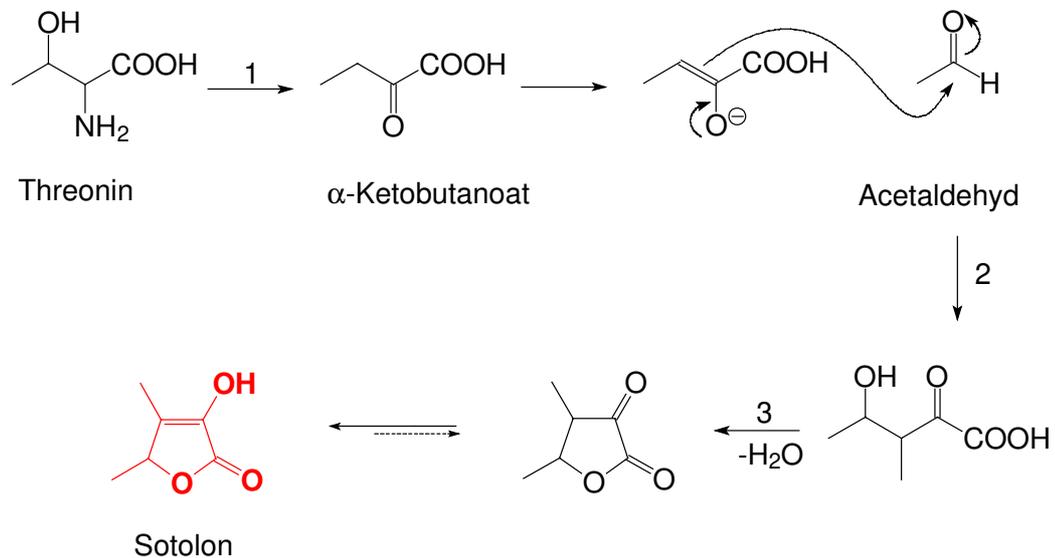


Abb. 3-2 Postulierter Biosyntheseweg von Sotolon

¹ Threonin-Desaminase, Serin-Dehydrogenase

² PDC

³ Lactonisierung

Das Acetaldehyd entsteht durch Decarboxylierung von Pyruvat durch PDC. Diese Reaktion ist von Thiaminpyrophosphat (TPP) abhängig, das als Coenzym der Pyruvatdecarboxylase fungiert:

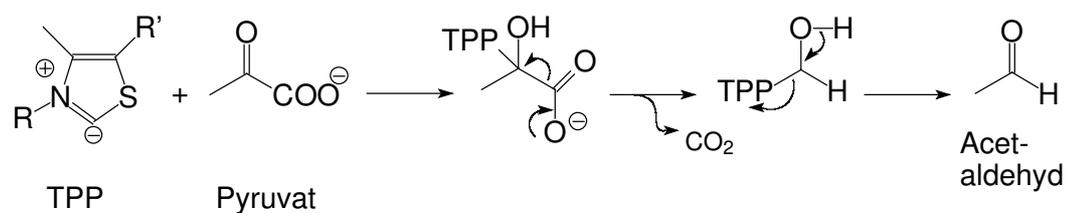


Abb. 3-3 Bildung von Acetaldehyd aus Pyruvat

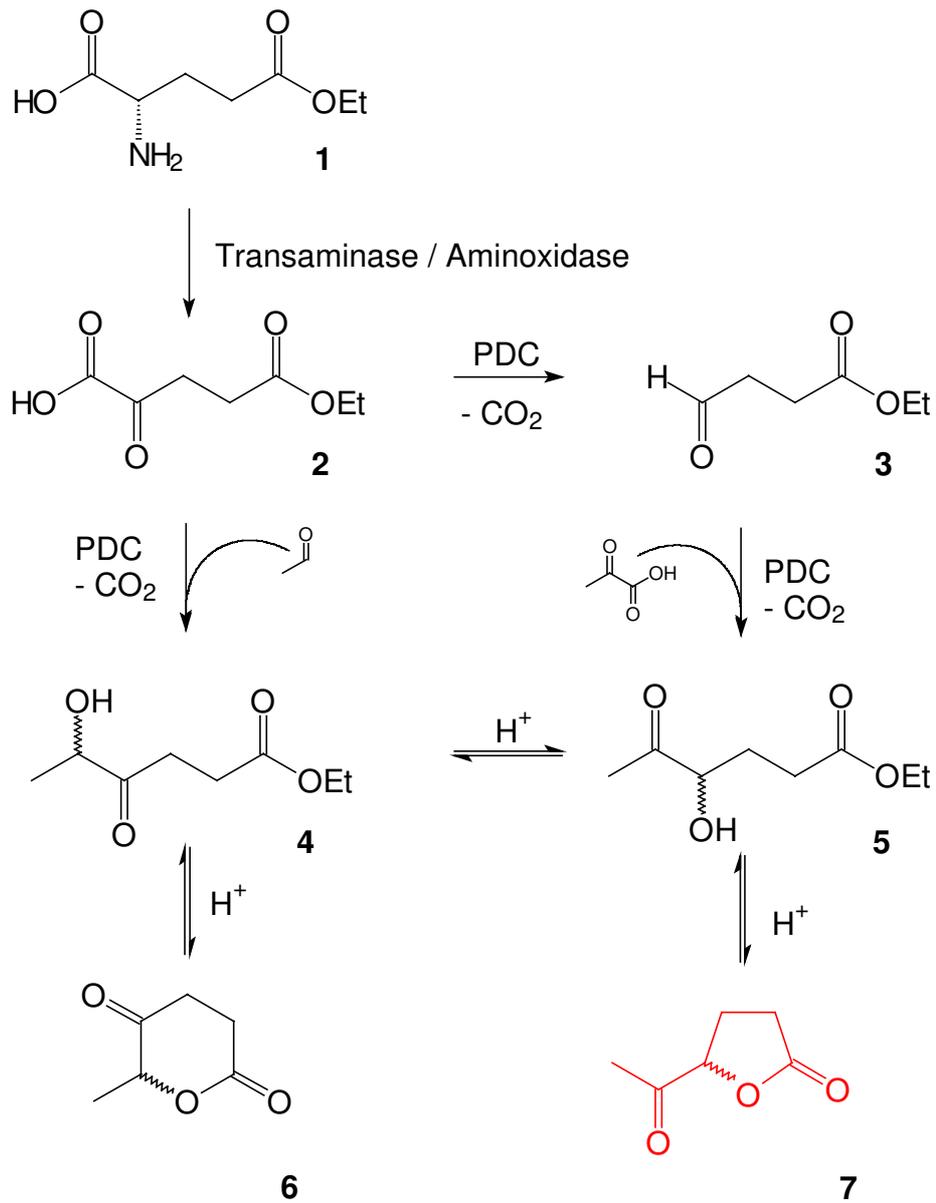


Abb. 3-4 Postulierter Biosyntheseweg von Soleron (7) [63]

¹ Glutaminsäure-5-ethylester

² 2-Oxoglutarinsäure-5-ethylester

³ Ethyl-4-oxobutanoat

⁴ Ethyl-4-hydroxy-5-oxohexanoat

⁵ Ethyl-5-hydroxy-4-oxohexanoat

⁶ 4-Oxo-5-hexanolid

Bei der Sherryherstellung wird Wein einer zweiten, oxidativen Fermentation* unterzogen. Dabei wird er von einer wachsenden Schicht von Florhefen überzogen. Die Hefen metabolisieren die Inhaltsstoffe des Weines und produzieren neue, die das charakteristische Aroma des "Flor-Sherrys" ausmachen [68].

Diese Fermentation unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von der ersten Fermentation, die zur Herstellung des Weines führte. Die wichtigsten Unterschiede sind:

- Während die alkoholische Fermentation anaerob stattfindet, steht den Florhefen bei der zweiten Fermentation Sauerstoff zur Verfügung.
- Die Substrate der Hefen sind völlig unterschiedlich. Bei der alkoholischen Fermentation wird Glucose als leicht zugängliche C-Quelle genutzt. Der Verbrauch des Glucosevorrates sowie die Akkumulation des Gärungsendproduktes Ethanol führt zum Absterben der *S. cerevisiae*-Kulturen. Die einzige den Florhefen zur Verfügung stehende C-Quelle ist Ethanol. Ethanol hat einen zelltoxischen und enzyminhibierenden Effekt, den die Florhefen tolerieren müssen.
- Aufgrund des hohen Gehaltes an entstandenen Säuren liegt der pH-Wert des Weines sehr niedrig, durchschnittlich bei pH 3,4.

Dieses Beispiel zeigt das hohe Potential von Wildhefen, chirale und interessante Biosyntheseprodukte unter Bedingungen zu bilden, die für *S. cerevisiae* nicht mehr tolerabel sind. Allerdings konnte unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen keine Soleron- oder Sotolonbildung beobachtet werden.

* An dieser Stelle scheint eine klärende Definition des Begriffes "Fermentation" angebracht. Während man sich im allgemeinen Sprachgut unter Fermentation, ein Begriff der noch auf die alte Vorstellung von "Fermenten" zurückgeht, normalerweise die alkoholische Gärung vorstellt, wird dieser Begriff in der Biotechnologie viel weitläufiger verwendet. Auch in dieser Arbeit wird unter unter Fermentation allgemein ein Umsatz von Substraten durch lebende, metabolisierende Mikroorganismen verstanden.

3.2.3 Acetoin synthese

Die Verknüpfung zweier Acetaldehydmoleküle, bzw. Pyruvat und Acetaldehyd zu Acetoin ist die *in vivo* vorkommende Konkurrenzreaktion zur Acetaldehydsynthese der PDC. Acetaldehyd wird bei Hefen als nicht-kompetitiver Inhibitor der PDC beschrieben, die Inhibition ist aber durch Entfernung des Acetaldehyds reversibel. Eine Beeinträchtigung der Acetoin synthese findet nicht statt. Die Sättigungskonzentration des Acetaldehyds für die Acetoin synthese liegt bei Hefen bei 20 mM, der K_M -Wert für Acetaldehyd liegt bei 5,2 mM [Juni, 120]. Als Erklärung für diese kinetischen Eigenschaften dient wie bei der Acetolactatsynthase ein Zwei-Zentren-Mechanismus, wobei das zweite, kosubstratbindende Zentrum keinem Einfluß durch Acetaldehyd unterliegt. Dagegen wird die PDC aus *Zymomonas mobilis* durch Acetaldehyd irreversibel gehemmt. Wahrscheinlich werden hier für die Katalyse essentielle Aminosäurereste durch kovalente Bindung von Acetaldehyd modifiziert [121].

Acetoin und 2,3-Butandiol spielen eine wichtige Rolle im Weinaroma, obwohl man ihre Wirkungsweise nicht genau erklären kann. Beide Substanzen haben einen hohen Schwellenwert (ca. 150 mg L⁻¹ in Wein [108]). Diacetyl dagegen ist als ein "Off-Flavor" von Bier und anderen alkoholischen Getränken bekannt und hat einen niedrigen Schwellenwert in Wein (8 mg L⁻¹). Alle drei Substanzen sind eng miteinander verwandt, im Prinzip handelt es sich um eine Substanz in drei verschiedenen Oxidationsstufen. Antoniani [101] verwendete das Verhältnis Acetoin/2,3-Butandiol zu einer Einteilung von Weinhefen bezüglich ihres Fermentationsvermögens. Er unterschied stark fermentierende Hefen, die fast ausschließlich 2,3-Butandiol als Fermentationsendprodukt bilden, mittelstark fermentierende Hefen, die sowohl 2,3-Butandiol als auch Acetoin bilden, sowie schwach fermentierende Hefen, die fast nur Acetoin bilden. *Saccharomyces cerevisiae* als Vertreter der stark fermentierenden

Hefen, bildet Acetoin normalerweise in sehr geringen Mengen von 0 - 12 mg L⁻¹ in den ersten Stadien der Fermentation. Nach einem Maximum nach etwa der halben Fermentationzeit wird es zu 2,3-Butandiol reduziert. In 4 Fällen hat man allerdings Stämme von *S. cerevisiae* entdeckt, die abnorm große Mengen von Acetoin (bis zu 200 mg L⁻¹) herstellen, so daß größere Mengen von Acetoin, die man früher auf eine Kontamination durch Bakterien zurückführte [106], durchaus Stoffwechselprodukte dieser Hefen sein können.

Der Acetoingehalt von Rotwein kann bis zu 46 mg L⁻¹ betragen, in Weißwein bis zu 12 mg L⁻¹ [102-104]. In Sherry liegt er deutlich darüber, bis zu 450 mg L⁻¹ Acetoin wurden gefunden [105]. Hier wird der Einfluß der Wildhefen, i.a. schwach fermentierende Hefen, deutlich. In den hier durchgeführten Versuchsreihen produzierten einige Hefen zum Teil große Mengen an Acetoin. Die Hefe *Zygosaccharomyces bisporus* bildete in RM 10 (EtOH, Gluc, Phe, pH = 3,4) ca 50 mg L⁻¹, in RM 12 (EtOH, Gluc, Phe, (NH₄)₂SO₄, pH = 3,4) 45 mg L⁻¹. Offensichtlich ist die Synthese gerade bei niedrigem pH bevorzugt, so daß ein Teil des Acetoin in Wein und Sherry auf diese Hefe zurückgehen könnte.

3.2.4 Synthese von Phenylacetylcarbinol

In großtechnischem Maßstab wird die Acyloinkondensation bei der Kondensation von Benzaldehyd mit Pyruvat zu L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC) angewandt. Obwohl schon 1921 von Neuberg und Liebermann beschrieben [6], wurde ihr großer industrieller Nutzen erst nach der Patentierung der Ephedrinsynthese erkannt [22-23]: L-PAC stellt ein chirales Intermediat bei der Synthese von L-Ephedrin dar:

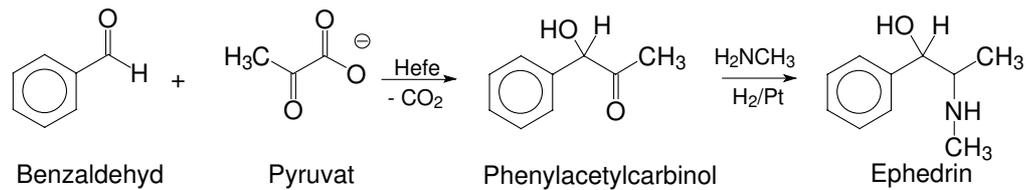


Abb. 3-5 Ephedrinsynthese nach dem Knoll-Verfahren [24-25]

(-)-Ephedrin, (1R,2S)-2-Methylamino-1-phenyl-1-propanol, ist das Hauptalkaloid aus Pflanzen der Art *Ephedra*, aus denen es früher durch Extraktion gewonnen wurde. Es wird seit Jahrhunderten als Pharmazeutikum benutzt. Es ist ein Sympathikometikum, d.h. ein auf das ZNS wirkendes Arzneimittel, von schwächerer, jedoch länger anhaltender Wirkung als Adrenalin. Es wirkt blutdrucksteigernd, herzstimulierend, bronchien-erweiternd und appetithemmend und findet einen entsprechenden Anwendungsbereich. Bei chemischen Synthesen entstehen racemische Gemische von geringerer Wirksamkeit, die sich unter anderen Handelsnamen auf dem Pharmamarkt befinden.

Diese Biosynthese ist Gegenstand ausführlicher Untersuchungen gewesen [26-41]. Durch Optimierungsversuche mit verschiedenen Mikroorganismen, Rohextrakten und Enzymen konnte die Ausbeute von L-PAC bis auf 28,6 g L⁻¹ gesteigert werden (immobilisierte PDC von *Candida utilis* [42])

Das bei der Acyloinkondensation ebenfalls entstehende Tautomere des PAC, 2-Hydroxypropiophenon (Abb. 3-3), wird bei Wanner [73] nur in sehr untergeordnetem Maße zu ca. 6% gebildet. Dies deckt sich mit Werten, die Bruhn [121] in *Z. mobilis*-Kulturen entdeckt hatte. Sie beobachtete außerdem keine Veränderung des Verhältnisses der Signale der Tautomeren im zeitlichen Verlauf der Synthese, so daß sie von einer enzymatischen Synthese ausging und nicht von einer nichtenzymatischen zeitabhängigen Tautomerisierung. Crout et al. [111] dagegen sehen diese

Reaktion eher als nichtenzymatisch an, da die Instabilität des PAC gegenüber Tautomerisierung bekannt ist.

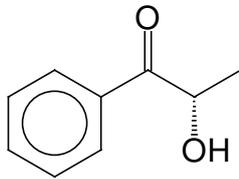


Abb. 3-6 "2-Hydroxypropiophenon", das Tautomer des Phenylacetylcarbinols

3.2.5 HPB-Synthese

Ein weiteres Acyloinkondensationsprodukt, 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (4-HPB), wurde 1966 von van Wyk aus Riesling Wein isoliert, aber nicht identifiziert [74]. Die zweifelsfreie Identifizierung gelang dann Sakato et al. aus "Carignan"-Wein [75]; danach wurde es von weiteren Arbeitsgruppen in Wein gefunden [79-80]. Später wurde es als "Impact"-Komponente in *Mimusops elengi* L. Blüten entdeckt [136, 137]. Der stark blumige Geruch dieses Baumes wird hauptsächlich durch 4-HPB verursacht. Außerdem kommt 4-HPB in Eucalyptushonig [76] und in "Leatherwood"-Honig vor, der aus der hauptsächlich in Tasmanien vorkommenden Blume *Eucryphia lucida* gewonnen wird [77]. In der zuletzt genannten Untersuchung war 4-HPB auch in "un-reifem" Honig zu finden, d.h. in Honig, den man schon nach einer Woche den Waben wieder entnommen hatte. Der Gehalt an 4-HPB war dort etwa doppelt so hoch wie in vollständig gereiftem Honig. In dem Pflanzenextrakt von *Eucryphia lucida* war diese Substanz dagegen nicht nachzuweisen. Demnach wäre es möglich, daß 4-HPB durch Enzymwirkung im Honigmagen der Biene gebildet wird und im Laufe der Honigreifung zum Teil weiter metabolisiert wird.

Auf rein chemischem Wege wurde 4-HPB aus Phenylalanin von Kuhnert-Kirchhoff et al. [78] hergestellt. In Modellversuchen wurden Glucose und

Phenylalanin im Autoklaven bei verschiedenen Temperaturen erhitzt und die Reaktionsprodukte analysiert. Neben 4-HPB entstanden noch eine Reihe verwandter Strukturen, wie 1-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon, vermutlich aus Phenylacetaldehyd und Glycolaldehyd, sowie die um einen CH₂-Einheit verlängerten Analoga zu 1- und 4-HPB, 3-Hydroxy-5-phenyl-2-pentanon und 2-Hydroxy-5-phenyl-3-pentanon.

Als Produkt einer Hefefermentation wird 4-HPB bei Wanner [73] beschrieben. Bei Umsetzung von Phenylacetaldehyd und Acetaldehyd durch *Saccharomyces cerevisiae* im Batch-Verfahren (250 mL Medium, 28 °C, 110 U min⁻¹, pH 4,5) mit mehrmaliger Gabe der Substrate konnte er eine Höchstkonzentration von 60 mg L⁻¹ 4-HPB mit einem 64% igem (R)-Enantiomerenüberschuß erzielen.

Literatur über das Tautomere 1-HPB ist überraschend rar und beschränkt sich auf rein chemische Synthesen [114, 115]. Obwohl bei Untersuchungen über Acyloinkondensationen immer wieder erwähnt wird, daß sich im allgemeinen Tautomerengemische der Ketole in veränderlichen Anteilen bilden, ist 1-HPB als Biosyntheseprodukt einer Hefefermentation oder überhaupt als natürlich vorkommender Stoff noch nicht beschrieben. Auch Wanner konnte das Tautomer 1-HPB nicht detektieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich hier erheblich. In Kulturen von *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces bailii* und *Saccharomyces cerevisiae* 457 konnte zu 96-98 % das 1-HPB identifiziert werden. 4-HPB kam nur in untergeordnetem Maße von 2-4% vor. Untersuchungen über die Stabilität des HPB's in dieser Arbeit und bei Wanner [73] bewiesen, daß Tautomerisierungen vom einen in das andere Isomer nicht vorkommen. Dies spricht für einen enzymatischen Ent-

stehungsweg des 1-HPB, wofür auch die Enantiomerenverhältnisse sprechen: das im Rahmen dieser Arbeit von *Z. bisporus* gebildete 1-HPB lag in einem 88%igen Enantiomerenüberschuß vor.

Analog zur Bildung von Acetoin (3-Hydroxy-2-butanon) könnte man sich die Entstehung von HPB durch eine Acyloinkondensation auf zwei Weisen vorstellen: die Kondensation von Phenylacetaldehyd mit Pyruvat führt zu 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon. Die Reaktion von Phenylpyruvat mit Acetaldehyd führt zu 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (siehe Abb. 3-8 und 3-9).

Diese Reaktionen stehen in Konkurrenz zu der von der Alkoholdehydrogenase katalysierten Reduktion des Aldehyds zum Alkohol. So entsteht aus Phenylpyruvat 2-Phenylethanol, aus Acetaldehyd Ethanol:

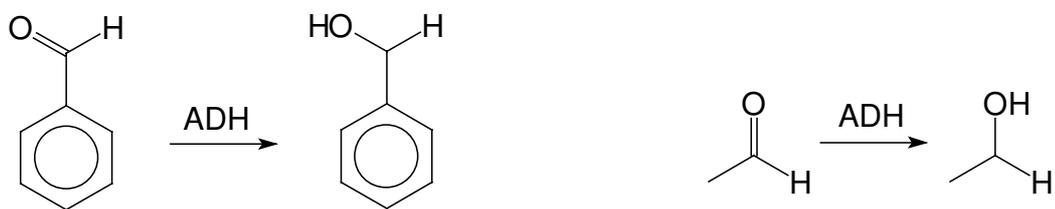
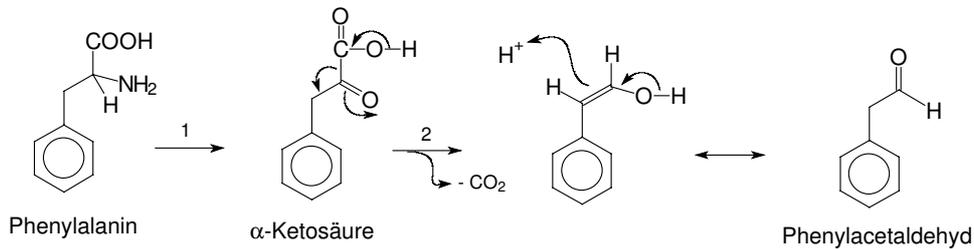


Abb. 3-7 Konkurrenzreaktion zur Acyloinkondensation: Reduktion durch Alkoholdehydrogenase (ADH)

Diese Konkurrenzreaktion führten zur Entstehung der Fermentationshauptprodukte. 2-Phenylethanol war mengenmäßig in jeder Fermentation das meist gebildete Produkt. Auch Wanner [73] beobachtete bei Fütterungsversuchen mit Phenylacetaldehyd eine fast vollständige Umsetzung zu 2-Phenylethanol.

1. Acyloinkondensation von Phenylacetaldehyd und Pyruvat:

1. Schritt:



1) Transaminierung 2) Oxidative Desaminierung

2. Schritt

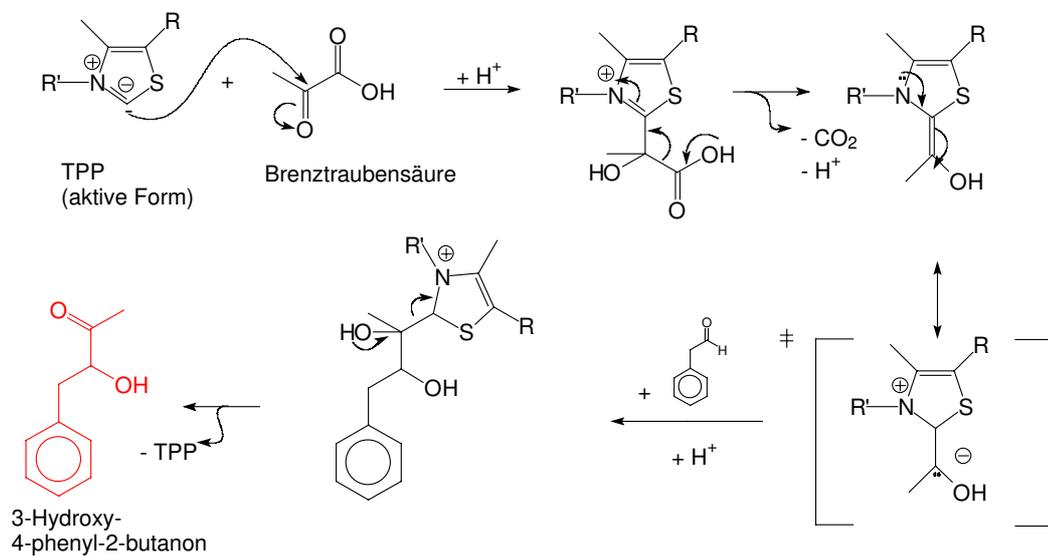


Abb 3-8 Vermuteter Biosyntheseweg von 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (4-HPB)

Über die Ursache für die völlige Umkehrung der bisher berichteten Tautomerenzverhältnisse kann nur spekuliert werden. Die Tatsache, daß nicht nur die bisher wenig untersuchte Wildhefe *Z. bisporus*, sondern auch die getesteten Stämme von *S. cerevisiae* diese ungewöhnliche Verhalten zeigten, läßt vermuten, daß nicht prinzipielle Unterschiede der *Z. bisporus*-PDC für die Bildung des 1-HPB verantwortlich sind. Vielmehr scheint sich die PDC allgemein unter den hier gewählten Bedingungen anders zu verhalten. Von den beiden in Abb. 3-8 und 3-9 formulierte Reaktionswegen scheint nur der zweite Weg, die Reaktion von Acetaldehyd und

2. Acyloinkondensation von Phenylpyruvat mit Acetaldehyd

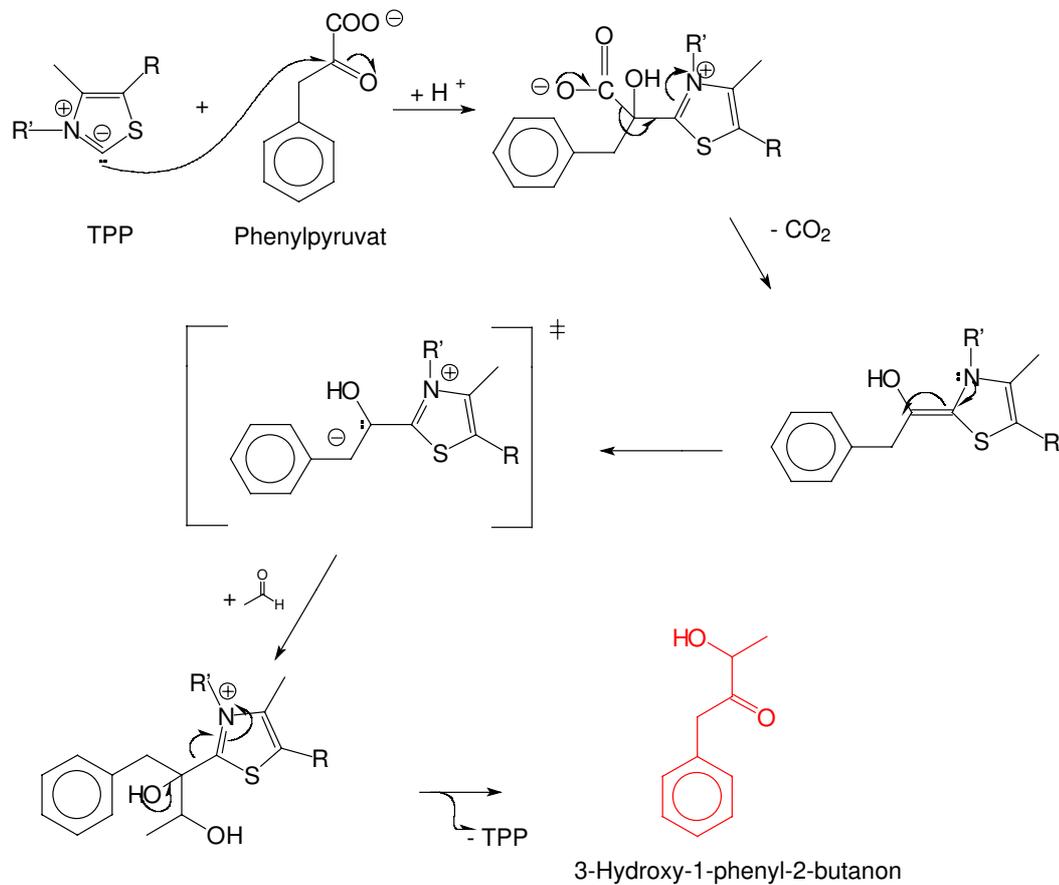


Abb. 3-9 Vermuteter Biosyntheseweg von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (1-HPB)

Phenylpyruvat eingeschlagen zu werden. Da ein Gleichgewicht zwischen Acetaldehyd und Ethanol besteht, könnte man vermuten, daß ein Überschuß an Ethanol die Reaktion in Richtung Acetaldehyd drängt. Da Acetaldehyd noch zelltoxischer ist als Ethanol, könnte die Hefe die Bildung von 1-HPB als "Entgiftungsmechanismus" forcieren. Die Ergebnisse der Medienoptimierung (Abschnitt 2.5.2) lassen einen Einfluß des Ethanols vermuten: in dem Versuchsansatz, der kein Ethanol enthielt, wurden die geringsten Mengen an HPB festgestellt.

Eine mögliche Erklärung wäre, daß in Abwesenheit von Ethanol das aus Glucose gebildete Pyruvat nahezu ausschließlich in den Zitronensäure-Zyklus eingeht, was sich negativ auf die HPB-Bildung auswirken würde, dafür aber in einem hervorragenden Wachstum resultiert.

Die Synthese aller größeren Biopolymere (mit Ausnahme der Fettsäuren, die direkt aus Acetyl-CoA synthetisiert werden) benötigt bei einem Wachstum auf Ethanolbasis die Aktivität des Glyoxylat-Zyklus. Die Adaption an Ethanol bewirkt bei Hefen eine Induzierung verschiedener Enzyme, u.a. die des Glyoxylat-Zyklus (Isocitratlyase und Malatsynthase) und der Gluconeogenese (Phospho-Enol-Pyruvat (PEP)-carboxykinase und Fructose-1,6-bisphosphatase) [128]. Die Regulierung der Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP) ist intensiv untersucht worden. Die Aktivität wird hier durch einen vielschichtigen Kontrollmechanismus geregelt, der vermuten läßt, daß sich verschiedene Mechanismen entwickelt haben, um die gleichzeitige Aktivität von FBP und des glycolytischen Enzyms Phosphofruktokinase zu begrenzen [129]. In *S. cerevisiae* wird die Synthese der FBP durch Glucose gehemmt [130], und die Zugabe von Glucose zu ethanolischen Medien führt zu einer raschen Desaktivierung des vorhandenen Enzyms [131]. Ebenfalls bekannt sind inhibitorische Effekte von Glucose auf die PEP-carboxykinase und die Isocitratlyase [132-133].

Die Regulierung des Kohlenstoffmetabolismus in Kulturen, die sowohl Glucose als auch Ethanol enthalten, ist jedoch ziemlich komplex und noch nicht vollständig erforscht [134]. Während nämlich die katabolische Inhibierung der Enzyme dafür zu sprechen scheint, daß eine gleichzeitige Nutzung von Ethanol und Glucose nicht möglich ist, ist es eine allgemein bekannte Tatsache, daß *in vivo* eine gleichzeitige Nutzung beider Kohlenstoffquellen stattfindet.

Im Hinblick auf die 1-HPB-Bildung wirkte sich die Zugabe von EtOH und Glucose jedenfalls positiv aus, wobei sich Ethanol als unverzichtbarer

Anteil erwies. Letztendlich ist jedoch unklar, ob der Einfluß des Ethanols im Kohlenhydratstoffwechsel zu suchen ist. Denkbar ist auch eine allgemeine Beeinträchtigung durch die Lösungsmittleigenschaften des Ethanols. Ethanol kann die Zellwand ungehindert durchdringen und damit die Energiebarriere der Zelle verringern: die Polarität der wäßrigen Umgebung wird herabgesetzt, die des hydrophoben Kerns erhöht. Damit steigt die Durchlässigkeit der Membran für geladene und polare Moleküle. Die Zellen versuchen sich dem ethanolinduzierten "Streß" durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Zellwand zu entziehen [135]. Dadurch könnte es zu Beeinträchtigungen membrangebundener Enzyme oder Carriersysteme kommen, was eine Vielzahl von Kettenreaktionen auslösen könnte.

Die Aldolkondensation von Pyruvat und Acetaldehyd zu Acetoin konkurriert mit der Reaktion von Pyruvat und Phenylacetaldehyd zu HPB. Dennoch ist auf den ersten Blick kein offensichtlicher Zusammenhang der gebildeten HPB-Menge zur gebildeten Acetoinmenge zu erkennen. In einigen Versuchsreihen scheint die Bildung von HPB der Bildung von Acetoin entgegenzuwirken (siehe Abb. 2-23 und 2-24). In einigen Fällen verläuft die Bildung nahezu parallel (siehe Abb. 2-21). Die Synthese von Acyloinkondensationsprodukten scheint somit von mehreren Faktoren abzuhängen. Eine hohe Pyruvatdecarboxylaseaktivität muß nicht mit erhöhter Produktbildung einhergehen. Bringer-Meyer et al. [100] fanden im Vergleich zwischen dem Bakterium *Zymomonas mobilis* und der Hefe *Saccharomyces carlsbergensis* eine fünffach höhere PDC-Aktivität des Bakterienenzym, aber nur ein Viertel der Menge an Phenylacetylcarbinol, was sie auf eine niedrigere Affinität der Bakterien-PDC zu Aldehyden zurückführten.

Die Acetoin synthese wird nach Crout [111] in Hefen durch Zugabe von anderen Aldehyden kompetitiv inhibiert. Bei Zugabe von Benzaldehyd ist nach Bringer-Meyer et al. [100] keine Acetoinbildung mehr zu be

obachten. Wenn man von einer Substrat- und Kosubstratbindung an zwei verschiedenen Stellen ausgeht, würde dies für das Hefeenzym eine höhere Affinität zum Benzaldehyd gegenüber dem Acetaldehyd bedeuten. Übertragen auf die Bildung von HPB sollte sich eine Bevorzugung des Phenylacetaldehyds (aus Phenylalanin) zum Acetaldehyd ergeben.

In den fermentierenden Hefekulturen von *Zygosaccharomyces bisporus* scheint die Acetoinbildung aber bevorzugt zu sein. Geringe HPB-Bildung bei gleichzeitig hoher Acetoin synthese rate, wie in den Versuchen in RM 10 und RM 12 läßt sich durch die schlechte Aminosäureaufnahme (= Precursor des HPB) erklären. Ansonsten liegt die Syntheserate von Acetoin immer deutlich über der von HPB (vgl. Abb. 2-20 bis 2-24). Dies wird besonders deutlich, wenn man sich das deutlich höhere Molekulargewicht von HPB (MW = 164) im Vergleich zu dem des Acetoin (MW = 88) vor Augen führt.

3.2.6 Synthese von Hyd-HPB

4-HPB ist, wie bereits erwähnt (siehe 2.3.4 und 3.2.5), eine sehr wohlriechende Substanz. Strukturell ist sie dem "Himbeerketon", 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon, sehr nahe. Himbeerketon ist die "Character-Impact"-Komponente von Himbeeraroma, ein begehrter und - aus natürlicher Quelle stammend - hochbezahlter Aromastoff mit extrem niedriger Geruchsschwelle [0,1 ppm, 82]. Durch Acyloinkondensation mit Metaboliten des **Tyrosin** entstanden 3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanon und 3-Hydroxy-1-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon. Diese Substanzen sind dem Himbeerketon strukturell noch ähnlicher und könnten selber als Aromastoff interessant sein. Da bis jetzt aber nur Spuren dieser Substanz nachgewiesen werden konnten, konnte die Frage der Aromawirksamkeit noch nicht geklärt werden.

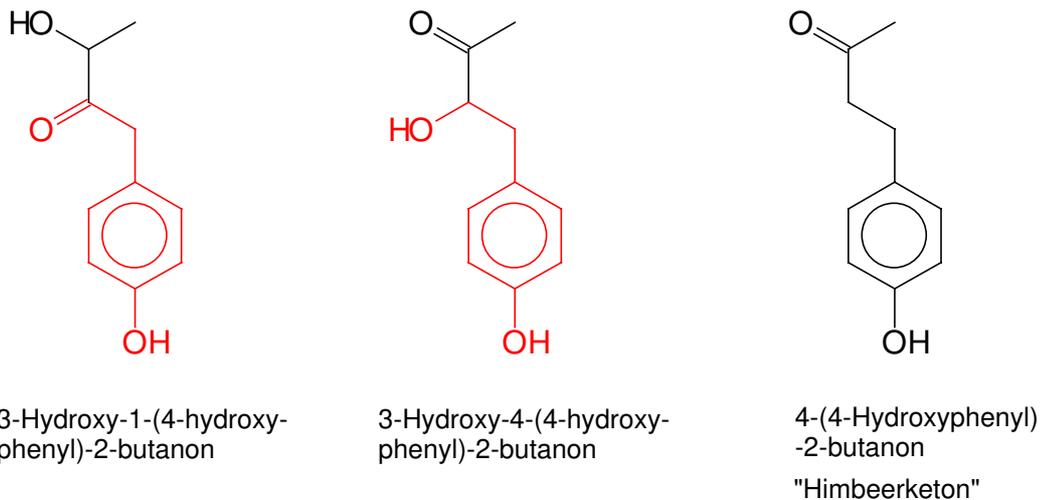


Abb. 3-10 Strukturen von 3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanon, 3-Hydroxy-1-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon und "Himbeerketon", 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon

3.3 Auf Acyloinkondensation untersuchte Organismen

Viele Organismen sind bereits auf ihre Fähigkeit, Acyloinkondensationen durchzuführen, getestet worden. Der Schwerpunkt lag dabei wiederum auf der Biosynthese von Phenylacetylcarbinol (PAC) aus Benzaldehyd (siehe Einleitung). In einer Studie von Gupta et al. [98] erwiesen sich *S. cerevisiae* [99] und *S. carlsbergensis* [98-100] mit einer Produktbildung von 5,2 g L⁻¹ PAC als die produktivsten Stämme; *S. fragilis*, *S. rouxii*, *S. lactis*, *S. veronae* und *S. microellipsoides* erschienen weniger interessant.

Ebenfalls untersucht wurden *Zymomonas mobilis* [100, 37-41], *Candida utilis* [36] und *Aerobacter aerogenes* [33]; *S. fermentati* und *S. delbrueckii* (= *Torulaspora delbrueckii*), *Sporobolomyces salmonicolor*, *Aspergillus niger*, *Hansenula anomala*, *Bacillus subtilis*, *Hyphopichia burtoni*, *Pichia etchelsii*, *Kluyveromyces lactis* und *Pichia pastoris* [99]

Im Hinblick auf ihre Acetoinproduktion wurden verschiedene andere *Saccharomyces*-Arten, wie *Saccharomyces sake* und *S. carlsbergensis* [107], 96 verschiedene Stämme von *Kloeckera apiculata* und *Hansenio spora guilliermondi* [72], 70 Stämme von *Zygosaccharomyces* [108]; *Candida stellata*, *Torulaspota delbrueckii* und *Saccharomycodes ludwigii* [72] betrachtet. Dabei stellte sich heraus, daß auch zwischen eng verwandten Arten große Unterschiede in der Produktbildung auftraten. Während die meisten *Zygosaccharomyces bailii*-Stämme mehr als 25 mg L⁻¹ Acetoin bildeten, produzierte *Zygosaccharomyces fermentati* gerade detektierbare Mengen.

Die Substratspezifität der PDC ist Gegenstand ausführlicher Untersuchungen gewesen. Dabei beziehen sich die gewonnenen Daten wie in dieser Arbeit meist auf Langzeitsynthesen ohne Berücksichtigung von kinetischen Aspekten. Als Substrat akzeptiert werden u.a. einige längere α -Ketosäuren [109, 122], α,β -ungesättigte aliphatische [109], aromatische und heterocyclische [111] sowie substituierte aromatische Aldehyde [86 f]. Hierbei werden meistens beide tautomeren Produkte erhalten [111]. Cardillo et al. [99] konnten diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen. Sie versuchten eine Reihe von ungesättigten Aldehyden mit verschiedenen Mikroorganismen umzusetzen. Gute Ausbeute an Acyloinkondensationsprodukten fanden sie nur bei den Substraten Benzaldehyd und Pyruvat. Ansonsten gaben noch α -Methylzimaldehyd und Furylacrolein geringe Mengen an Kondensationsprodukt. Zimaldehyd und Furylaldehyd wurde nur in Spuren umgesetzt. Eine Umsetzung von aliphatischen Aldehyden fand nicht statt. Dies macht deutlich, daß eine ganze Reihe zum Teil widersprüchlicher Untersuchungen bezüglich der Acyloinkondensationsreaktionen verschiedener Mikroorganismen im allgemeinen und der Substratspezifität und Enantioselektivität im besonderen veröffentlicht worden sind.

Dies gilt insbesondere für *S. cerevisiae*. Die Enantioselektivität ihrer PDC ist widersprüchlich beschrieben. Neben den bereits genannten Unterschieden bei der PAC und HPB-Bildung (vgl Kapitel 3.1) sind weitere Unterschiede bekannt. Aus Oxoisophoron entstand bei Wanner [73] durch Reduktion von fermentierenden *S. cerevisiae* ein racemisches Produkt, während Leuenberger et al. [110] (6R)-2,2,6-Trimethyl-1,4-cyclohexandion fanden.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuche zeigten, daß von vier getesteten *S. cerevisiae* Stämmen ein Stamm hervorragend zur Acyloinkondensation befähigt war, zwei Stämme mäßig viel 1-HPB herstellten und ein Stamm augenscheinlich überhaupt nicht zur HPB-Bildung durch Acyloinkondensation in der Lage war.

Offensichtlich bestehen doch erhebliche Differenzen in den Enzymsystemen unterschiedlicher Stämme. Daher erscheint eine Angabe von "brewer's yeast", "baker's yeast" oder "wine yeast", die häufig als Synonym für *S.cerevisiae* genannt werden, nicht ausreichend, um allgemeingültige Aussagen über *S.cerevisiae* abzuleiten. Die genannten Beispiele [73] und [110], wo zwei Bierhefen verglichen wurden, und Ergebnisse dieser Arbeit, in der Weinhefen unterschiedliche Ergebnisse lieferten, machen dies deutlich.

3.4 Ausblick

Im Verlaufe dieser Arbeit konnten einige aromatische Acyloinkondensationsprodukte aus Hefekulturen gewonnen werden. Während das Tautomere 4-HPB als potenter Aromastoff und Pflanzenhormon beschrieben worden ist, ist 1-HPB völlig geruchlos. Damit ist es als Aromastoff unbrauchbar, die Bildung selber wirft aber einige interessante Fragen auf. Warum unter den hier gewählten Bedingungen 1-HPB und nicht das in

der Literatur gelegentlich erwähnte 4-HPB gebildet wurde, ist letztendlich ungeklärt. Einige Denkansätze finden sich in Kapitel (3.2.5). Hier verdeutlicht sich aber auch die Komplexibilität der Struktur-Rezeptor-Beziehung bei der olfaktorischen Wahrnehmung. Die Tatsache, daß 1-HPB nicht, 4-HPB dagegen intensiv blumig riecht, ist angesichts des geringen strukturellen Unterschiedes interessant. Die ebenfalls identifizierten Produkte Hyd-1-HPB und Hyd-4-HPB sind in der gleichen Hinsicht bemerkenswert. Bei der sensorischen Bewertung mittels GC-Sniff waren beide Substanzen eher unauffällig. Das strukturell nah verwandte Himbeerketon dagegen gehört zu den intensivsten Aromastoffen überhaupt. Hyd-4-HPB könnte bei entsprechender Ausbeutesteigerung als Precursor in einem neuen biotechnologischen Verfahren zur Himbeerketonbiosynthese eingesetzt werden.

Eine Produktmaximierung von 1-HPB konnte über ein Erlenmeyer-Batch-Verfahren hinaus im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Im Hinblick auf eine technologische Anwendung wäre es interessant zu erfahren, ob durch Inkubierung mit Phenylalanin entweder des immobilisierten Enzyms oder der immobilisierten Hefe die Produktausbeute im Reaktor an die veröffentlichten Werte für PAC und 4-HPB angenähert werden können. In diesem Falle ließe sich ein Zusatz von Aldehyden zu den Medien vermeiden. Das hätte erhebliche technologische Vorteile: Zum einen ließe sich eine bessere Precursor-Sättigung des Mediums erreichen, was bisher, bedingt durch die mangelnde Löslichkeit der Aldehyde und ihre zelltoxische und inhibitorische Wirkung auf Zellen und Enzyme nicht möglich ist. Zum anderen hätte eine "natürliche" Aminosäure als Vorstufe für ein fermentativ gewonnenes Produkt eventuell einen höheren Stellenwert in der Verbraucherakzeptanz als eine "chemische" Vorstufe. Da Aldehyde zum Teil teuer und relativ instabil sind, könnten auch wirtschaftliche Aspekte eine Rolle spielen.

Nachfolgearbeiten zur Isolierung und Charakterisierung der PDC aus *Z. bisporus* sind mittlerweile fortgeschritten. Damit wird sich auch die Frage nach der Enantioselektivität und der Substratspezifität der PDC im Bezug auf aliphatische Aminosäuren klären lassen. Die bisher akzeptierten Substrate lassen zwar darauf schließen, daß die PDC cyclische Substrate mit 5 oder 6 Ringgliedern bevorzugt. Eine Umsetzung aliphatischer Amino

säuren zu kurzkettigen, chiralen Hydroxyketonen wäre aber ebenfalls sehr interessant. Diese Substanzen sind durch chemische Synthese nur schwierig zu erhalten, vor allem in enantiomerenreiner Form. Eventuell besitzen sie auch Aromawirksamkeit, wie viele kurzkettigen Alkohole, die besonders in Form der Ester mit kurzkettigen Fettsäuren (z.B. Essigsäure, Buttersäure, 2-Methylbutansäure) ein hohes Aromapotential haben.

4. Experimenteller Teil

4.1 Materialien

4.1.1 Hefen

Alle Hefen wurden bei CBS (Centralbureau voor Schimmelcultures), Yeast Division, bestellt (Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands). Die Stammhaltung erfolgte in mit atmungsaktiven Silikonstopfen verschlossenen Schrägagarröhrchen auf GYP, bei 4 °C.

Tab. 4-1 Verwendete Hefen

Hefen	Best. Nr.		Abkürzung
<i>Candida etchelsii</i>	5008	ex sugar	Caet
<i>Candida versatilis</i>	5007	ex sugar	Cave
<i>Saccharomyces bayanus</i>	3008	wine yeast	Saba
<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	457	ex grape must	Sace 457
<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	1250	ex sherry	Sace 1250
<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	5155	ex fermenting grape must	Sace 5155
<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	6203	ex wine	Sace 6203
<i>Torulospora delbrueckii</i>	1090	ex raw cane sugar	Tode
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	680	ex sake	Zyba
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	702	ex soja	Zybi
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	681	ex soja	Zyro

4.1.2 Lösungsmittel

Es werden nur die häufig verwendeten Lösungsmittel genannt. Selten benutzte Lösungsmittel und Chemikalien werden bei der jeweiligen Anwendung spezifiziert. Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Gebrauch rückdestilliert und ebenso wie Faßware über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt. Die Redestillate wurden nach einer Reinheitskontrolle wieder eingesetzt. Ether wurde vor Gebrauch frisch destilliert.

Tab. 4-2 Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Herkunft	Reinheit	Verwendung
Aceton	Hoechst	redest.	HPLC, Reinigung
CH ₂ Cl ₂	Hoechst	redest.	Extraktion, Synthese
Diethylether	Kraemer &M	redest.	Synthese
Ethanol, unvergällt	Kraul und Wilkening	98%	in Nährmedien
n-Hexan	Roth	HPLC	analyt. und präp. HPLC
Methanol	Baker	HPLC	analyt. und präp. HPLC
Methanol	Bayer	redest.	Synthese
2-Propanol	Fluka	HPLC	analyt. und präp. HPLC

4.1.3 Sonstige Chemikalien

Hier werden nur häufig verwendete Substanzen aufgeführt. Die meisten Chemikalien sind bei ihren Anwendungen beschrieben.

Tab. 4-3 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Herkunft	Reinheit	Verwendung
Agar Agar	Merck	Mikrobiol.	Nährmedium
L-Asparagin, Monohydrat	Merck	reinst	Nährmedium
L-Asparaginsäure	ICN	Biochem.	Nährmedium
D-(+)-Glucose, Monohydrat	Merck	Mikrobiol.	Nährmedium
L-Glutamin	ICN	Biochem.	Nährmedium
L-Glutaminsäure, Mononatrium Monohydrat	Fluka	Biochem.	Nährmedium
HCl (37%)	Riedel-d-H	reinst	pH-Einstellung
Hefeextrakt, gepulvert	Merck	Mikrobiol.	Nährmedium
L-Isoleucin	Merck	Biochem.	Nährmedium
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Biochem.	Nährmedium
L-Leucin	ICN	Biochem.	Nährmedium
Magnesiumsulfat	Riedel-d-H	reinst	Nährmedium
Natriumchlorid	Riedel-d-H	puriss.	Turbidimetrie
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-d-H	reinst	Synthese
Natriumhydroxid	Riedel-d-H	98,5%	Synthese, pH
Natriumsulfat	Riedel-d-H	reinst	Trocknungsmittel
L-Phenylalanin	Sigma	Biochem.	Nährmedium
1-Phenylethanol	Riedel-d-H	99%	înt. Standard
L-Threonin	Aldrich	98%	Nährmedium
Universalpepton M66	Merck	Mikrobiol.	Nährmedium

4.1.4 Gase für die Gaschromatographie

Die Luft für die Gaschromatographie wurde mit einem Kompressor durch einen Staubfilter dem Raum entnommen und nach der Kompression zur Trockung durch eine 5 × 30 cm Silicagelsäule geleitet.

Tab. 4-4 Gase für die Gaschromatographie

Gas	Herkunft	Qualität	Verwendung
Druckluft	Kompressor	getrocknet	Detektorgas
H ₂	Linde	5.0	Trägergas/Detektorgas
He	Linde	5.0	Trägergas (GC/MS)
N ₂	Linde	5.0	Trägergas, Methylierung

4.1.5 Sonstige Hilfsmittel

Tab. 4-5 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Gefriertrocknungsanlage	WKF L2	Kälte Roter
Gefrierschrank	VX 350 Series 2	Jouan
KPG-Rührer	RE 18	IDL
Multi-Elektronikrührer	Multipoint HP	Variomag
Hochtemperaturofen	L5/S	Nabertherm
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Magnetrührer	Ikamag RH	Janke & Kunkel
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134	Büchi
Schüttler	KL2	Edmund Bühler
Schüttler	Infors HT	Infors
Trockenschrank	UM 500	Memmert
Umlaufkühler	Frigomix U	B. Braun
Umwälzapparatur		Rettberg
Vakuumpumpe	Two Stage Nr. 3	Edwards
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus Sepatech

4.2 Chromatographie

4.2.1 Kapillargaschromatographie (HRGC)

4.2.1.1 HRGC mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID)

GC I

Gaschromatograph:	Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series
Injektor:	Cold-on-column,
Vorsäule:	CS Fused Silica Vorsäule FS-CW- desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID
Trennsäule:	CW 20 M, Leupold, 30 m × 0,32 mm ID
Detektor:	FID, 270 °C
Trägergas:	H ₂
Fluß:	3,6 mL
Detektorgase:	H ₂ 50 kPa/Luft 100 kPa
Elektrometer:	EL 480
Datenaufnahme:	Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19
Temperaturprogramm:	40 °C, 3 min halten, mit 3 °C min ⁻¹ auf 230 °C, 15 min halten

GC II

Gaschromatograph:	Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series
Injektor:	Cold-on-column,
Vorsäule:	CS Fused Silica Vorsäule FS-CW- desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID

Trennsäule:	CW 20 M, Leupold, 30 m × 0,32 mm ID
Detektor:	FID, 270 °C
Trägergas:	H ₂
Fluß:	3,6 mL
Detektorgase:	H ₂ 50 kPa/Luft 100 kPa
Elektrometer:	EL 480
Datenaufnahme:	Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19
Temperaturprogramm:	40 °C, 3 min halten, mit 3 °C min ⁻¹ auf 230 °C, 15 min halten

4.2.1.2 HRGC mit On-Column-Injektion, Flammenionisationsdetektion und olfaktorischer Detektion (GCO)

Gaschromatograph:	Satochrom, Sato
Injektor:	Cold-on-column
Vorsäule:	CS Fused Silica Vorsäule FS-CW- desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID
Trennsäule:	CW 20 M, Leupold, ca. 30 m × 0,32 mm ID
Detektor:	FID, 270 °C; Sniff-Port, 230 °C
Trägergas:	H ₂
Fluß:	3,8 mL min ⁻¹
Detektorgase:	H ₂ 50 kPa/Luft 100 kPa
Elektrometer:	EL
Datenaufnahme:	Shimadzu C-R5A Chromatopac
Temperaturprogramm:	40 °C, 3 min halten, mit 3 °C min ⁻¹ auf 230 °C, 15 min halten

4.2.1.3 Präparative HRGC mit Flammenionisationsdetektion

Gerät:	MCS Gerstel mit Hewlett Packard GC 5890 Series II
--------	--

Injektor:	Gerstel KAS-3 Kaltaufgabesystem
Autosampler:	Hewlett Packard 7673, Aufgabemenge 10 μL
Fraktionensammler:	Gerstel PFS
Detektor 1:	FID, 250°C
Detektor 2:	FID, 250°C
Detektorgase 1:	H ₂ 50 kPa, Luft 100 kPa
Detektorgase 2:	H ₂ 50 kPa, Luft 100 kPa
Trennsäule 1:	Leupold OV 1 Fused Silica, 3m \times 0,53 μm ID, 2 mm Filmdicke
Trennsäule 2:	Leupold BC CW 20 M Fused Silica, 25 m \times 0,53 μm ID, 1 μm Filmdicke
Schnitt:	20,52 min bis 30,29 min
Falle 1:	40,44 min bis 41,04 min
Falle 2:	41,27 min bis 43,11 min
Temperaturen:	Transferleitung 185°C; Verteiler 185 °C, Fallen 0 °C, KAS 40 °C
Gase und Strömungen:	Trärgas (H ₂): 5 mL min ⁻¹ Gegengas 1 (H ₂): 10 mL min ⁻¹ Gegengas 2 (H ₂): 10 mL min ⁻¹ Hilfsgas 1 (H ₂): 1 mL min ⁻¹ Hilfsgas 2 (H ₂): 1 mL min ⁻¹
Temperaturprogramm:	60 °C mit 2,5 °C min ⁻¹ auf 190 °C, 1 min halten
Datenaufnahme:	Hewlett Packard Vectra QS/16S mit MCS 1.15 Software von Gerstel

4.2.1.4 HRGC-Kopplung mit Massenspektroskopie (MS)

MS I

Gaschromatograph:	Fisons GC 8000
Massenspektrometer:	Fisons MD 800

Injektor:	Cold-on-column
Vorsäule:	CS Fused Silica Vorsäule FS-CW- desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID
Trennsäule A:	J & W, CW M, 25 m × 0,32 mm ID × 0,4 µm
Trennsäule B:	MN, Hydrodex β-3P, 25 m × 0,25 mm ID
Trärgas:	He
Fluß:	3,0 mL/min
Temperaturen:	Quelle 200 °C, Interface 230 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Datenaufnahme:	Fisons Masslab
Massenbereich:	33-400 m/z
Temperaturprogramm:	40 °C, 3 min halten, mit 3 °C min ⁻¹ auf 230 °C, 15 min halten

MS II

Gaschromatograph:	Hewlett-Packard HP 5890
Massenspektrometer:	Hewlett Packard Mass Spectrometer 5989 A (Quadrupol)
Injektor:	Cold-on-column
Vorsäule:	CS-Phenyl-Sil; 3 m × 0,32 mm ID
Trennsäule:	Leupold 25 m × 0,32 mm ID, BC SE 54 fused silica, Filmdicke 0,4 µm
Trärgas:	He
Fluß:	3,0 mL/min
Temperaturen:	Ionenquelle: 250 °C, Interface: 250 °C, Quadrupol: 100 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Datenaufnahme:	MS HP-UX Chem Station, B06.01 Software
Massenbereich:	33-300 m/z

4.2.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

4.2.2.1 Analytische HPLC

HPLC I

Pumpen:	2 Gynkothek High Precision Pumps Modell 300 verbunden mit Hochdruckmischkammer
Gradientenformer:	Techlab Instruments Graphic Gradient Controller
Injektionsventil:	Rheodyne RH 7725i mit 20 µL Probeschleife
Detektor:	Pye Unicam PU 4020 UV Detektor
Trennsäule:	Merck Lichrosorb Diol, 7 µm, 250 × 4 mm
Datenaufnahme:	Shimadzu C-R3A Integrator
Flußrate:	1 mL min ⁻¹
Fließmittel A:	Hexan/2-Propanol 99:1
Fließmittel B:	2-Propanol
Gradient:	A:B 100:0 ⇒ 98:2 in 30 min, 10 min halten, in 5 min zurück auf Anfangsbedingung

HPLC II

Zur Aminosäurenbestimmung. Vorsäulenderivatisierung mit Orthophtalaldehyd (OPA). 5 µL einer OPA-Reagenzlösung werden mit 5 µL Probe vom Autosampler vermischt und nach 1,5 min injiziert.

Herstellung der OPA-Reagenzlösung:

270 mg OPA in 5 mL Ethanol + 200 µL Mercaptoethanol mit 0,4 M Boratlösung (pH 9,5) auf 50 mL auffüllen, 24 h altern lassen

Pumpe:	SFD Pumpe SDS 9404
Gradientenformer:	Autochrom CIM
Injektion:	Spark Autosampler Promis II
Detektor:	Shimadzu Fluoreszenzdetektor RF 535, λ -Ex.: 330 nm, λ -Em.: 420 nm
Trennsäule:	Nucleosil 120-5-C ₁₈ , 5 μ m, temperiert auf 30 °C mit ERC Säulenofen
Datenaufnahme:	Autochrom CIS mit Apex Software
Flußrate:	0,9 mL min ⁻¹
Fließmittel A:	Puffer/THF/Methanol 96:2:2 (v/v/v) Puffer aus 0,05 mol/L Natriumacetat und 0,05 mol/L NaH ₂ PO ₄ , pH = 7 mit NaOH
Fließmittel B:	Methanol/Wasser 54:46 (v/v)
Gradient:	100 % A \Rightarrow 100 % B in 50 min, 5 min halten, in 5 min zurück auf Anfangsbedingung

4.2.2.2 Semipräparative HPLC

Pumpen (Master):	Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Pumpen (Slave):	Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Gradientenformer:	Jasco Dynamischer Hochdruckmischer
Degasser:	Shodex On-Line-3-Kanal-Degasser
Injektionsventil:	Rheodyne RH 7125 mit 2 mL Probenschleife
Detektor:	Pye Unicam LC-UV-Detektor mit präparativer Meßzelle, λ = 280 nm
Trennsäule:	Merck Hibar Lichrosorb Diol 7 μ , 250 mm \times 25 mm
Fraktionensammler:	Isco Instrumentation, Foxy Fraction Collector Modell 2200, 20 mL Fraktionen

Datenaufnahme: Gynkotek C-R3A Integrator
Flußrate: 10 mL min⁻¹
Fließmittel A: Hexan/2-Propanol 99:1
Fließmittel B: 2-Propanol
Gradient: A:B 100:0 ⇒ 98:2 in 80 min

4.2.3 Spektroskopische Methoden

4.2.3.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektrometer: Bruker AN-300 (300 MHz)
Lösungsmittel: CD₃OD 100% D, CD₂Cl₂ 99,9% D
Kalibrierung: Normierung auf Lösungsmittelsignale aus
Resten von nicht deuteriertem CH₃OH, bzw
CH₂Cl₂

4.2.3.2 UV/VIS-Spektroskopie

Photometer: Pye Unicam SP8-500 UV/VIS
Spektrometer

4.3 Synthesen

4.3.1 Synthese von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon und 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon

4.3.1.1 Synthese I

Hydroxylierung von Benzylacetone unter intermediärer Bildung eines Silyl-Enol-Ethers

Die Synthese erfolgte nach der Methode von Hassner et al. [112] und Ohba et al. [113]:

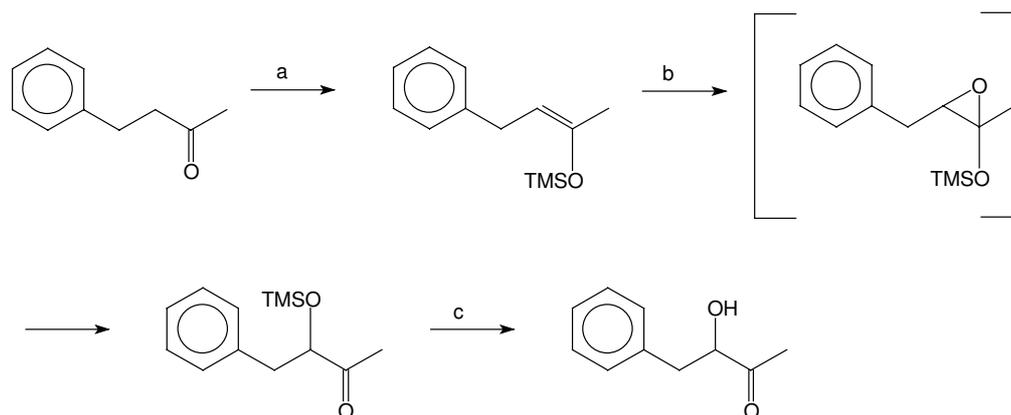


Abb. 4-1 Synthese von 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon und 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (nach [113]) (a) TMSCl, NEt₃, DMF; (b) MCPBA, NaHCO₃, CH₂Cl₂ (c) 2N HCl

Diese Methode ist beschrieben zur Synthese von 3-Hydroxy-4-Phenyl-2-butanon. Da die Ringöffnung des Epoxids aber nicht regioselektiv abläuft, wurde ein Gemisch aus 3-Hydroxy-4-phenyl- und 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon erhalten:

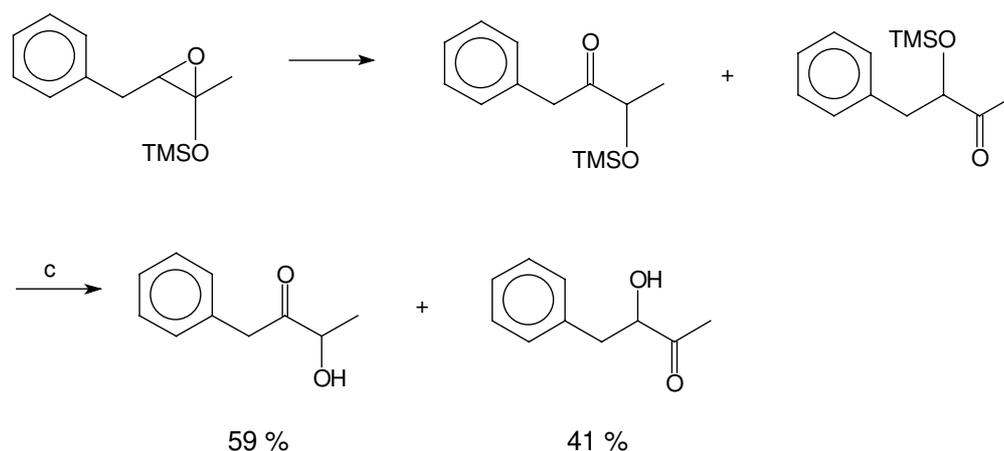


Abb. 4-2 Synthese von 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon und 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (nach [113]) (c) 2N HCl

4.4.1.2 Synthese 2

Palladium(0)-katalysierte Isomerisation des 3,4-Epoxyalkohols zu 3-Hydroxy-4-phenyl- und 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon

1.) Darstellung von trans-4-Phenyl-3-buten-2-ol (1)

0,02 mol (3 g) Benzylidenaceton (Merck, z. Synthese) wurden in 150 mL MeOH gelöst, bei Raumtemperatur unter Rühren mit 0,04 g NaBH₄ versetzt (1,5 g) und 15,5 h gerührt. Überschüssiges Borhydrid wurde mit Wasser entfernt, die organische Phase abgetrennt und mehrfach mit MeOAc und Kochsalz ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Kochsalzlösung und Wasser gewaschen, am Rotationsverdampfer eingeeengt und über Na₂SO₄ getrocknet.

2.) Darstellung von 3,4-Epoxy-4-phenylbuten-2-ol (2)

5,45 g m-Chlorperbenzoesäure (Sigma, 60-70%, Rest Wasser) wurde mit etwas Wasser versetzt und mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die organische

Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und unter Rühren und Eiskühlung portionsweise zu einer Lösung von (1) in CH_2Cl_2 gegeben. Danach wurde das Eisbad entfernt und über Nacht unter Rühren belassen. Die org. Phase wurde mit NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet.

Es entstanden die beiden Isomere im Verhältnis 2:1

3.) Darstellung von 3-Hydroxy-4-phenyl- und 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon

Die Öffnung des Epoxides erfolgte nach Vankar et al. [114]. Ein Aliquot der organischen Lösung von (2) (ca. 500 mg \approx 3 mmol) wurde mit 4 mL Toluol und einer Spatelspitze $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (Fluka, purum >97% Pd) versetzt, mit Ar begast und im verschlossenen Gefäß lichtgeschützt 50 h bei 146 °C im Trockenschrank belassen.

Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung über eine Sinterfritte mit einer dünnen Schicht Kieselgel abfiltriert und mit Ether gewaschen. Das Rohprodukt wurde über DC (Kieselgel, Fließmittel CH_2Cl_2) gereinigt.

Es entstanden 3-Hydroxy-4-phenyl- und 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon im Verhältnis 2,2 :1.

4.3.2 Synthese von (R,S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon

Nach Gill et al. [115]

1.) Silylierung von Milchsäurenitril (2-Hydroxypropionsäurenitril, Aldrich, 98%)

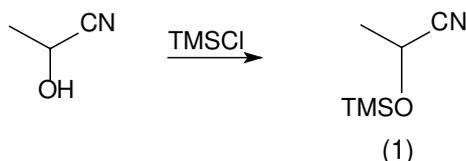


Abb. 4-3 Silylierung von Milchsäurenitril

Zu einer Mischung von 0,2 mol (14,2 g) Milchsäurenitril und 0,2 mol Pyridin (15,8 g) und 100 mL trockenem Ether in einen Dreihalskolben mit Kühler, Tropftrichter und Trockenrohr wurden in 20 -30 min 0,2 mol (21,7g) TMSCl zugegeben und über Nacht stehen gelassen. Danach wurde abgesaugt, der Rückstand mit 30 mL Lösungsmittel gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* abgezogen.

2.) Darstellung von Benzylmagnesylochlord (2)

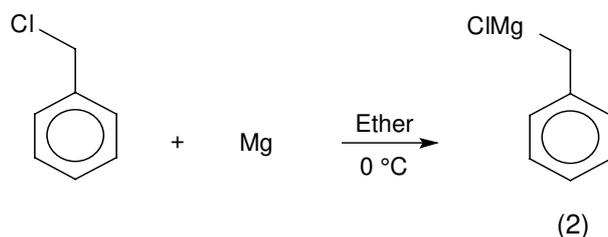


Abb. 4-4 Darstellung von Benzylmagnesylochlord

In einem 500 mL Dreihalskolben mit Tropftrichter, Rührer und Rückflußkühler mit Trockenrohr wurden 0,2 mol (4,9 g) Magnesiumspäne mit 25 mL abs. Ether übergossen und mit etwa 1/20 von insgesamt 0,2 mol Benzylchlorid (25,3 g; Merck, 99%) unter Rühren versetzt. Nach dem Anspringen der Reaktion wurde das restliche Benzylchlorid, gelöst in 75 mL abs. Ether, so zugetropft, daß der Ether leicht siedete. Nach Beendigung der Zugabe wurde noch 30 min zum Sieden erhitzt bis sich alles Magnesium gelöst hatte.

3.) Umsatz der gebildeten Grignard-Verbindung (2) mit (1) und anschließende Säurehydrolyse

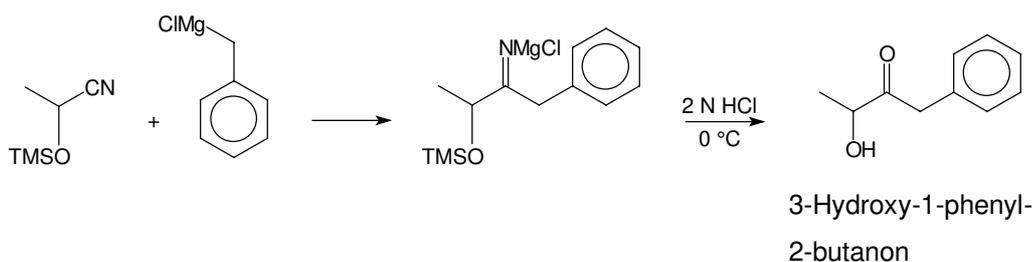


Abb. 4-5 Synthese von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon

In die Grignard-Reagens-Lösung wurde 0,16 mol silyliertes Lactonitril (1) in 75 mL Ether getropft. Nach beendeter Zugabe wurde zum Sieden erhitzt und unter Eiskühlung soviel 2 N HCl hinzugegeben, bis sich der entstandene Niederschlag gerade löste. Die etherische Schicht wurde abgetrennt und die wäßrige Phase noch zweimal mit Ether extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit gesättigter NaHSO₃-Lösung, NaHCO₃-Lösung und wenig Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde der Ether *in vacuo* abgezogen. Das Rohprodukt wurde mit semi-präparativer HPLC (siehe Abschnitt 4.2.2.2) gereinigt. Von der gereinigten Substanz wurde ein NMR-Spektrum (siehe Abschnitt 4.2.3.1) aufgenommen.

4.4 Derivatisierungen

4.4.1 Acetylierung (mit Pyridin)

100 µl der extrahierten, auf ca. 1 mL eingeeengten und getrockneten Proben wurden in 100 µL Pyridin/Acetanhydrid 1:1 (v/v) gelöst und 12 h bei Raumtemperatur stehen gelassen.

4.4.2 Acetylierung (ohne Pyridin)

100 µL der extrahierten, auf ca. 1 mL eingeeengten und getrockneten Proben wurden mit 50 µL Acetanhydrid versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gelassen.

4.4.3 Silylierung

10 µL der extrahierten, auf ca. 1 mL eingeeengten und getrockneten Proben wurden mit 10 µL N-Methyl-N-Trimethylsilyl-trifluor(o)acetamid (MSTFA, Macherey und Nagel) versetzt und 12 h bei Raumtemperatur

stehen gelassen. Durch Zugabe von trockenem Methanol wurde der Überschuß an Silylierungsmittel beseitigt.

4.4.4 Derivatisierung zu Oximen

150 µL der extrahierten, auf ca. 1 mL eingeeengten und getrockneten Probe wurde mit 200 µL einer Mischung aus gesättigter O-Methylhydroxylaminhydrochlorid-Lösung und Pyridin (1:1) versetzt und über Nacht stehen gelassen. Nach Zugabe von wenig Wasser wird mit 1 mL Ether extrahiert und der Extrakt getrocknet.

4.4.5 Bildung von TFA-Estern

100 µL der extrahierten, auf ca. 1 mL eingeeengten und getrockneten Probe wurden mit 100 µL Trifluoressigsäureanhydrid (Fluka, > 99%) versetzt und über Nacht stehen gelassen. Nach Zugabe von wenig gesättigter NaHCO₃-Lösung wurden die Probe mit 1 mL Ether extrahiert und der Extrakt getrocknet.

4.4.6 Reduktion mit NaBH₄

Ca. 100 µL der gereinigten und getrockneten Probe wurden mit ca. 500 µL MeOH und NaBH₄ im Überschuß versetzt. Nach Stehenlassen über Nacht wurde der Überschuß an NaBH₄ mit etwas MeOH zerstört.

4.5. Isolierung mittelpolarer Verbindungen aus Hefeextrakten

Flüssig/Flüssig-Extraktion von Hefeextrakten

Die Kolben mit je 100 mL Fermentationslösung wurden dem Schüttler entnommen, sensorisch bewertet ("abgesniff"), der pH-Wert vermessen und

1 mL der homogenen Flüssigkeit zur Trockenmassebestimmung entnommen. Der Rest wurde in Zentrifugenbecher gefüllt, mit 1 mL internem Standard (1-Phenylethanol in Ethanol) versehen und bei 6900 U min^{-1} und 5 °C 40 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Schütteltrichter dreimal mit CH_2Cl_2 ausgeschüttelt (50, 40, 40 mL) Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und an einer Vigreux-Kolonne (Wasserbad 40 °C) auf ca. 1 mL eingeeengt. Der entstandene organische Extrakt wurde gaschromatographisch, gaschromatographisch-olfaktorisch und gegebenenfalls mit GC-MS analysiert.

4.6 Hefekulturen

4.6.1 Zusammensetzung der Nährmedien

Standard-Nährmedium mit Hefeextrakt (SNLH):

Glucose Monohydrat:	30 g L^{-1}
Asparagin Monohydrat:	$4,5 \text{ g L}^{-1}$
Kaliumdihydrogenphosphat:	$1,5 \text{ g L}^{-1}$
Magnesiumsulfat wasserfrei:	1 g L^{-1}
Hefeextrakt:	3 g L^{-1}
Spurenelemente-Lösung:	1 mL L^{-1}

Spurenelemente-Lösung:

$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	$0,08 \text{ g L}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	$0,09 \text{ g L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$0,03 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	$0,005 \text{ g L}^{-1}$
EDTA	$0,4 \text{ g L}^{-1}$
pH 6 eingestellt mit NaOH	

Reaktionsmedium 1

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
L-Threonin:	3 g L ⁻¹
Hefeextrakt:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	1 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	1,5 g L ⁻¹
pH 3,4 mit Äpfelsäure	

Reaktionsmedium 2

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
L-Glutamin:	3 g L ⁻¹
Hefeextrakt:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	1 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	1,5 g L ⁻¹
pH 3,4 mit Äpfelsäure	

Reaktionsmedium 3

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Natriumglutamat Monohydrat:	3 g L ⁻¹
Hefeextrakt:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	1 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	1,5 g L ⁻¹
pH 3,4 mit Äpfelsäure	

Um den Verlust an wichtigen und empfindlichen Inhaltsstoffen so gering wie möglich zu halten wurde ab Reaktionsmedium 4 so verfahren:

Ethanol, die Aminosäure, Vitamin B₁ (Thiamin) und Vitamin B₇ (Biotin) und gegebenenfalls Glucose Monohydrat wurden in einer getrennten Lösung angesetzt, der pH eingestellt und sterilfiltriert. 25 mL dieser Lösung wurden steril zu 75 mL der pH-eingestellten, autoklavierten, wäßrigen Lösung mit den übrigen Inhaltsstoffen pipettiert. Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen.

Reaktionsmedium 4

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Threonin:	3,0 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit HCl	

Reaktionsmedium 5

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Natriumglutamat Monohydrat:	2,5 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit Äpfelsäure	

Reaktionsmedium 6

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Phenylalanin:	3,0 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit Äpfelsäure	

Reaktionsmedium 7

Da L-Tyrosin so gut wie unlöslich in Wasser oder Ethanol ist, wurde die Aminosäure einzeln in die Kolben eingewogen und trocken autoklaviert. Das restliche Medium wurde sterilfiltriert und jeweils 100 mL steril zur Aminosäure zugegeben.

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
L-Tyrosin	3g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit HCl	

Reaktionsmedium 8

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit HCl	

Reaktionsmedium 9

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
Alanin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit HCl	

Reaktionsmedium 10

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat:	10 g L ⁻¹
Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit HCl	

Reaktionsmedium 11

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat	15 g L ⁻¹
Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit HCl	

Reaktionsmedium 12

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit HCl	

Reaktionsmedium 13

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Phenylalanin:	1,5 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 6,0 mit NaOH	

Reaktionsmedium 14

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
L-Phenylalanin:	2 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 6,0 mit NaOH	

Reaktionsmedium 15

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
L-Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
L-Alanin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 6,0 mit NaOH	

Reaktionsmedium 16

Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
L-Phenylalanin:	1 g L ⁻¹
L-Alanin:	1 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 6,0 mit NaOH	

Reaktionsmedium 17

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
L-Tyrosin:	2 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 6,0 mit NaOH	

Reaktionsmedium 18

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Isoleucin:	3 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit HCl	

Reaktionsmedium 19

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
L-Leucin:	2,5 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit HCl	

Reaktionsmedium 20

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
L-Valin:	3 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 3,4 mit Äpfelsäure:	

Reaktionsmedium 21

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
L-Isoleucin:	2 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 6,0 mit NaOH	

Reaktionsmedium 22

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
L-Leucin:	2 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 6,0 mit NaOH	

Reaktionsmedium 23

Ethanol, unvergällt:	8 % (v/v)
Glucose Monohydrat	10 g L ⁻¹
L-Valin:	2 g L ⁻¹
Spurenelemente:	2 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat, wasserfrei:	1 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g L ⁻¹
Vitamin B ₁ (Thiamin)	2 mg L ⁻¹
Vitamin B ₇ (Biotin)	2 mg L ⁻¹
pH 6,0 mit NaOH	

4.6.2 Vorkulturen

Von den Stammkulturen der Hefen auf Schrägagar wurden mit einer Platinöse die Hefen in SNLH Medium überimpft. Nach zweitägiger Anwachszeit wurden 5 mL der Submerskultur in das Reaktionsmedium pipettiert. Der Gehalt an Hefetrockenmasse in diesen 5 mL wurde turbidimetrisch bestimmt (Abschnitt 4.6.4.3).

4.6.3 Ansetzen der Hefekulturen

Nach dem Anziehen der Vorkulturen (Abschnitt 4.6.2) wurden von jeder Hefe mehrere Kolben (je nach Versuchsansatz zwischen 3 und 10), die 100 mL Reaktionsmedium enthielten (Zusammensetzung siehe 4.6.1) mit 5 mL Vorkultur beimpft.

Die Inkubation erfolgte bei 24°C und 130 U min⁻¹ (Infors-Schüttler)

4.6.4 Monitoring des Kulturverlaufes.

4.6.4.1 Abfolge der Trenn- und Analysenschritte

Der Kulturverlauf wurde durch die Analyse von pH-Wert, Aminosäuregehalt, Trockenmasse und Inhaltsstoffen an verschiedenen Kulturtagen überwacht. Dazu wurde jeweils 1 Kolben mit Fermentationslösung dem Schüttler entnommen und analysiert.

Untersuchungen im Hause [117] erwiesen, daß der Reaktionsverlauf bei Kulturen aus der gleichen Vorkultur im gleichem Reaktionsmedium auch in getrennten Reaktionsbehältern identisch verläuft, so daß dieses Verfahren reproduzierbare Ergebnisse liefert und gleichzeitig leichter zu handhaben ist, als die sterile Entnahme von 100 mL aus einem großen, gemeinsamen Reaktionsgefäß.

4.6.4.2 Qualitative und quantitative Analyse der Metabolite

Ein Kolben mit 100 mL Submerskultur wurde dem Schüttler entnommen, der Geruchseindruck notiert und der pH-Wert vermessen.

1 mL der Fermentationslösung wurde zur Trockenmassebestimmung abgenommen (siehe Abschnitt 4.6.4.3)

Die verbleibende Lösung wurde mit internem Standard (1-Phenylethanol) versetzt, zentrifugiert, vom Überstand 0,5 mL zur Aminosäurebestimmung entnommen (Abschnitt 4.6.5) und der Rest extrahiert (Abschnitt 4.6.2)

4.6.4.3 Bestimmung des Trockenmassegehaltes der Submerskulturen

4.6.4.3.1 Bestimmung im Trockenschrank

Ein aliquoter Teil einer Fermentationslösung wurde durch ein Cellulose-Acetat-Membranfilter (Sartorius; 0,2 µm) filtriert, im Trockenschrank 12 h bei 102 °C getrocknet und gewogen. Da die Filter sich beim Trocknen verformten und spröde wurden konnte das Eigengewicht der Filter nur indirekt bestimmt werden. Dazu wurden 5 Membranfilter getrocknet und ihr Gewicht bestimmt. Der Mittelwert wurde als Leerwert verwendet.

Da die Filtration der dichten Hefelösung durch ein Membranfilter zeitaufwendig und mühsam ist, wurde diese Methode nur zur Erstellung einer Eichreihe verwendet.

4.6.4.3.2 Bestimmung durch Turbidimetrie

Als Maß für die Konzentration von Hefeorganismen in Kulturlösung diene die durch sie verursachte Trübung. Die Korrelation zwischen Trübung und der Dichte ist grundsätzlich nur bei ganz runden Teilchen korrekt. Da Hefen nicht ganz rund sind, sondern eine Längenausdehnung haben, die

je nach Art der Hefe verschieden sein kann, wurde für jede Hefe eine eigene Eichreihe aufgenommen, die die Extinktion mit der Trockenmasse korrelierte.

Dazu wurden 10 mL Hefefermentationslösung auf 250 mL mit isotonischer Kochsalzlösung ($0,9 \text{ g L}^{-1}$) aufgefüllt und aus dieser Stammlösung 5 Verdünnungen hergestellt, deren Extinktion gemessen wurde (UV-VIS Spektrometer, $\lambda = 580 \text{ nm}$, Messung gegen verdünnte Nährmedienlösung) Zweimal 25 mL der Stammlösung wurden durch ein Membranfilter filtriert und der Rückstand getrocknet (siehe Abschnitt 4.7.3.1). Nach Bestimmung der Trockenmasse kann die Konzentration der Eichgeradenlösung berechnet und eine Regressionsgerade erstellt werden.

Mit Hilfe dieser Eichkurven konnte dann der Trockenmassegehalt einer mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnten Fermentationslösung durch einfache Extinktionsmessung bestimmt werden.

Ermittelte Regressionsgeraden:

Y = Extinktion
X = Trockenmasse

***Candida etchelsii* (Caet)**

$$x = (y - 0,00822) \div 3,478744 \quad r = 0,9991$$

***Candida versatilis* (Cave)**

$$x = (y - 0,01089) \div 4,818714 \quad r = 0,9967$$

***Saccharomyces bayanus* (Saba)**

$$x = (y - 0,004376) \div 3,222302 \quad r = 0,9997$$

***Saccharomyces cerevesiae* 457 (Sace 457)**

$$x = (y + 0,010903) \div 3,959651 \quad r = 0,9986$$

***Saccharomyces cerevesiae* 1250 (Sace 1250)**

$$x = (y + 0,001817) \div 3,743454 \quad r = 0,9991$$

***Saccharomyces cerevesiae* 5155 (Sace 5155)**

$$x = (y + 6,354 \times 10^{-4}) \div 5,26548 \quad r = 0,9999$$

***Saccharomyces cerevesiae* 6203 (Sace 6203)**

$$x = (y + 8,063 \times 10^{-4}) \div 3,542588 \quad r = 0,9985$$

***Torulospora delbrueckii* (Tode)**

$$x = (y - 0,028259) \div 4,309162 \quad r = 0,9955$$

***Zygosaccharomyces baillii* (Zyba)**

$$x = (y + 6,932 \times 10^{-4}) \div 0,966414 \quad r = 0,9991$$

***Zygosaccharomyces bisporus* (Zybi)**

$$x = (y - 0,002368) \div 5,516080 \quad r = 0,9998$$

***Zygosaccharomyces rouxii* (Zyro)**

$$x = (y + 0,002429) \div 3,303595 \quad r = 0,9997$$

4.6.4.4 Bestimmung des Aminosäuregehaltes der Submerskulturen

0,5 mL des Zentrifugates wurden zur Proteinfällung mit 0,5 mL Methanol (HPLC) versetzt und mit OPA-Vorsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion an der HPLC vermessen (siehe 4.2.2.1).

5. Literatur:

[1] Goffeau, A.; Barrell, B.G.; Bussey, H. et al. Life with 6000 genes. *Science*, **1996**, *274*, 562-657

[2] Johnston, M. Genome Sequencing: The complete code for a eukaryotic cell. *Curr. Biol.*, **1996**, *6*, 500-503

[3] Dujon, B. The yeast genome project - what did we learn? *Trends Genet.*, **1996**, *12*, 263-270

[4] Hieter, P; Basset, D.E. Jr.; Valle, D. The yeast genome - a common currency. *Nature Genet.*; **1996**, *13*, 253-255

[5] Wolf, K. (ed.) Nonconventional Yeasts in Biotechnology. Springer Verlag, Berlin, **1996**

[6] Neuberg, C.; Liebermann, L. Zur Kenntnis der Carboligase. II. Mitteilung. *Biochem.Z.*, **1921**, *121*, 311-325

[7] Neuberg, C.; Hirsch, J. An enzyme which brings about union into carbon chains (carboligase). *Biochem Z.*, **1921**, *115*, 282

[8] Neuberg, C.; Ohle, H. Zur Kenntnis der Carboligase. III. Mitteilung. Der Bau der biosynthetisch verknüpften mehrgliedrigen Kohlenstoffketten. *Biochem. Z.*, **1922**, *127*, 327-339

[9] Neuberg, C.; Hirsch, J. Classification of Carboligases. *Biochem. Z.*, **1922**, *128*, 608-609

- [10] Neuberg, C.; Nord, F. *Biochem. Z.*, **1920**, 2248-2254
- [11] Neuberg, C.; Karczag, L. Über zuckerfreie Hefegärungen. IV. Carboxylase, ein neues Enzym der Hefe. *Biochem. Z.*, 68-75
- [12] Dirscherl, W. Acyloins. II. The formation of acetoin from acetaldehyd and from pyruvic acid by irradiation with ultra-violet light. *Hoppe Seylers' Z. f. physiol. Chem.*, **1930**, 188, 225-246
- [13] Dirscherl, W.; Braun, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1930**, 63, 416-422
- [14] Dirscherl, W.; Nahm, H. Acyloin IX. Nonenzymatic decarboxylation of pyruvic acid and acetoin formation. *Hoppe Seylers' Z. f. physiol. Chem.* **1940**, 264, 41-46
- [15] Walsmann, H. Enzymatische C-C-Verknüpfungen. *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1991**, 39, 1408-1414
- [16] Mulzer, H. Enzym-unterstützte Wirkstoffsynthese II. *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1984**, 32, 589-595
- [17] Csuk, R.; Glänzer, B. Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry. *Chem. Reviews*, **1991**, 91, 49-97
- [18] Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Manzocchi, A. A biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1071-1140
- [19] Roberts, S.M.; Turner, N.J. Some recent developments in the use of enzyme catalyzed reactions in organic synthesis. *J. Biotech.*, **1992**, 22, 227-244

- [20] Whitesides, G.M.; Wong, C.-H. Enzymes in Organic Chemistry. *Angew.Chem.*, **1985**, *8*, 617-638
- [21] Walsh, C.; Enzymatic Reaktion Mechanisms, W.H.Freeman and Company, N.Y., **1979**
- [22] Hildebrand, G.; Klaveshn, W. Us Patent 1. 956, 950; **1934**
- [23] Hildebrandt, G.; Klavehn, W., **1930**, D.R.P. 548459 ; A.P. 1956950
- [24] Knoll-Verfahren, DT 548549, **1930**
- [25] Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, 4.Auflage, **1972**, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- [26] Mahmoud, W.M.; El-Sayed, A-H.M.M.; Coughlin R.W. Production of L-Phenylacetyl Carbinol by Immobilized Yeast Cells: I. Batch Fermentation. *Biotechn. Bioeng.*, **1990**, *36*, 47-54
- [27] Mahmoud, W.M.; El-Sayed, A-H.M.M.; Coughlin R.W. Production of L-Phenylacetyl Carbinol by Immobilized Yeast Cells: II. Semicontinuous Fermentation. *Biotechn. Bioeng.*, **1990**, *36*, 55-63
- [28] Mahmoud, W.M.; El-Sayed, A-H.M.M.; Coughlin R.W. Effect of β -Cyclodextrin on the Production of L-Phenylacetyl Carbinol by Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechn. Bioeng.*, **1990**, *36*, 256-262
- [29] Shin, H.S.; Rogers, P.L. Kinetic Evaluation of Biotransformation of Benzaldehyde to L-Phenylacetylcarbinol by Immobilized Pyruvate Decarboxylase from *Candida utilis*. *Biotechn. Bioeng.*, **1996**, *49*, 429-436

- [30] Shin, H.S.; Rogers, P.L. Production of the L-Phenylacetylcarbinol (L-Pac) from Benzaldehyde Using Partially Purified Pyruvate Decarboxylase (PDC). *Biotechn. Bioeng.*, **1996**, 49, 52-62
- [31] Chow, Y.S.; Shin, H.S.; Adesina, A.A.; Rogers, P.L. A Kinetic Model for the Deactivation of Pyruvate Decarboxylase (PDC) by Benzaldehyde. *Biotechn. Letters*, **1995**, 17, 1201-1206
- [32] Agarwal, S.C.; Vora, V.C.; Mason, J.R.; Pirt, S.J. Studies on the Production of L-Acetyl Phenyl Carbinol by Yeast Employing Benzaldehyde as Precursor. *Biotech. Bioeng.*, **1987**, 29, 783-785
- [33] Long, A.; James, P.; Ward, O.P. Aromatic Aldehydes as Substrates for Yeast and Yeast Alcohol Dehydrogenase. *J. Biotech. Bioeng.*, **1989**, 33, 657-660
- [34] Nikolova, P.; Ward, O.P. Whole cell yeast biotransformations in two-phase systems: effect of solvent on product formation and cell structure. *J. Ind. Microbiol.*, **1992**, 10, 169-177
- [35] Nikolova, P.; Ward, O.P. Production of phenylacetyl carbinol by biotransformation using baker's yeast in two-phase systems. In: *Biocatalysts in Non-Conventional Media*, Tamper et al. (Eds), Elsevier Science Publishers B.V. **1992**, 675-680
- [36] Liew, M.K.H.; Fane, A.G.; Rogers, P.L. Applicability of Continuous Membrane Bioreactor in Production of Phenylacetylcarbinol. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **1995**, 64, 200-206
- [37] Hoppner, T.C.; Doelle, H.W. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1983**, 17, 152-157

- [38] Bringer-Meyer, S.; Schimz, K.-L.; Sahm, H. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, **1986**, *146*, 105-110
- [39] Bräu, B.; Sahm, H., Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escheria coli*. *Arch. Microbiol.*, **1986**, *144*, 296-301
- [40] Neale, A.D.; Scopes, R.K.; Wettenhall, R.E.H.; Hoogenraad, N.J. Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis*. *Nucleic Acids Res.*, **1987**, *15?*, 1753-1761
- [41] Neale, A.D.; Scopes, R.K.; Wettenhall, R.E.H.; Hoogenraad, N.J. Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*, isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **1987**, *169*, 1024-1028
- [42] Shin, H.S.; Rogers, P.L. Biotransformation of benzaldehyde to L-phenylacetylcarbinol, an intermediate in L-ephedrin production, by immobilized *Candida utilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1995**, *44*, 7-11
- [43] Pham, T.T.; Guichrad, E.; Schlich, P.; Charpentier, C. Optimal Conditions for the Formation of Sotolon from α -Ketobutyric Acid in the French "Vin Jaune". *J Agric. Food Chem.*, **1995**, *43*, 2616-2619
- [44] Kobayahi, A. Sotolon: Identification, Formation, & Flavor Effect. In: Flavor Chemistry: Trends and Developments, *ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc.*, Washington, D.C.: The Society, **1989**, *388*, 49-59
- [45] Takahashi, K.; Tadenuma, M.; Sato, S. 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone, a Burnt Flavoring Compound from Aged Sake. *Agric. Biol. Chem.*, **1976**, *40*, 325

- [46] Blank, I; Schieberle, P. Analysis of the Seasoning-like Flavour Substances of a Commercial Lovage Extract (*Levisticum officinale* Koch.). *Flavour and Fragrances Journal*, **1993**, *8*, 191-195
- [47] Lerch, K.; Ambühl, M. Biotechnological production of 4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone, *Bioflavour 95*, Dijon (France), February 14-17, **1995**, Ed. INRA, Paris 1995 (Les Colloques, n° 75)
- [48] Dubois, P.; Rigaud, J.; Dekimpe, J. Identification de la Diméthyl-4,5-Tétrahydrofuranedione-2,3 dans le Vin Jaune du Jura. *Lebensm. Wiss. Technol*, **1976**, *9*, 366-368
- [49] Etiévant, P.X. Wine. In: *Volatile Compounds in foods and beverages*; Maarse, H. (ed) Dekker, N.Y. **1991**
- [50] Martin, B. *Thesis*, University of Paris-sud, Orsay, **1989**, 227 pp
- [51] Martin, B.; Etiévant, P. Quantitative Determination of Solerone and Sotolon in Flor Sherries by Two-Dimensional-Capillary GC. *J. HRC*, **1991**, *14*, 133-135
- [52] Martin, B.; Etiévant, P.; Henry, R. The Chemistry of Sotolon: A Key Parameter for the Study of a Key Component of Flor Sherry Wines. In: *Flavour Science and Technology*, Bessière, Y.; Thomas, A. (eds), Wiley, Chichester, UK, **1990**
- [53] Martin, B.; Etiévant, P.X.; LeQuéré, J.L.; Schlich, P More Clues about Sensory Impact of Sotolon in Some Flor Sherry Wines. *J.Agric. Food Chem.*, **1992**, *40*, 475-478

[54] Masuda, M.; Okawa, E.; Nishimura, K. Identification of 4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone (Sotolon) and Ethyl-9-Hydroxynonanoate in Bortrytized Wine and Evaluation of the Roles of Compounds Characteristic of It. *Agric. Biol. Chem.*, **1984**, *48*, 2707-2710

[55] Spohnholz, W.R.; Hühn, T. 4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanon (Sotolon), ein Borytisindikator? *Vitic. Enol. Sci.*, *49*, 37-39

[56] Guichard, E.; Etiévant, P.; Henry, R.; Mosandl, A. Enantiomeric ratios of pantolactone, solerone, 4-carboethoxy-4-hydroxy-butylolcatone and of sotolon, a flavour impact compound of flor-sherry and bortyitized wines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1992**, *195*, 540-544

[57] Guichard, E.; Pham, T.T.; Etiévant, P. Quantitative Determination of Sotolon in Wines by High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*, **1993**, *37*, 539-542

[58] Pham, T.T.; Guichard, E.; Charpentier, C. Quantification of sotolon in French "Vins Jaunes" during aging under the yeast film. *Sci. Aliments*, **1996**, *16*, 282-287

[59] Blank, I.; Lin, J.; Fumeaux, R.; Welti, D.H.; Fay, L.B. Formation of 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (Sotolone) from 4-Hydroxy-L-isoleucine and 3-Amino-4,5-dimethyl-3,4-dihydro-2(5H)-furanone. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 1851-1856

[60] Schreier, P. The role of microorganisms in flavor formation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1979**, *12*, 59-71

[61] Augustyn, O.P.H.; Van Wyk, C.J.; Freeman, B.M.; Muller, C.J.; Kepner, R.E.; Webb, A.D. The Structure of Solerone (5-Acetyldihydro-

2(3H)-furanone), a Substituted γ -Lactone Involved in Wine Aroma. *J. Agric. Food Chem.*, **1971**, *19*, 1128-1130

[62] Martin, B; Etiévant, P.; Le Quéré, J.-L. More Clues of the Occurrence and Flavor Impact of Solerone in Wine. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, *39*, 1501-1503

[63] Häring, D.; Schreier, P.; Herderich, M. Rationalizing the Origin of Solerone (5-Oxo-hexanolide): Biomimetic Synthesis and Identification of Key Metabolites in Sherry Wine. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 369-372

[64] Wurz, R.E.M.; Kepner, R.E.; Webb, A.D. The Biosynthesis of Certain Gamma-Lactones from Glutamic Acid by Film Yeast Activity on the Surface of Flor Sherry. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1988**, *39*, 234-238

[65] Fagan, G.L.; Kepner, R.E.; Webb, A.D. Additional Volatile Components of Palomino Film Sherry. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1982**, *33*, 47-50

[66] Fagan, G.L.; Kepner, R.E.; Webb, A.D. Biosynthesis of Certain Gamma-Substituted-Gamma-Butyrolactones Present in Film Sherries. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1981**, *32*, 163-167

[67] Muller, C.J.; Kepner, R.E.; Webb, A.D. Lactones in Wines - a Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1973**, *24*, 5-9

[68] Webb, A.D.; Noble, A.C. Aroma of Sherry Wines. *Biotechn. Bioeng.*, **1976**, *18*, 939-952

[69] Belitz, H.D.; Grosch, W. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 3. Auflage, **1987**, Springer Verlag Berlin, S. 10

[70] Webb, A.D; Ingraham, J.L. Fusel oils. In: Advances in Applied Microbiology, W.W. Umbreit (ed), Vol. 5, p. 317-353, **1963**

[71] Fagan, G.L.; Kepner, R.E.; Webb, A.D. Production of linalool, cis- and trans-nerolidol, and trans, trans-farnesol by *Saccharomyces fermentati* growing as a film on simulated wine. *Vitis*, **1981**, *20*, 36-42

[72] Romano, P.; Suzzi, G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl. Environm. Microbiol.*, **1996**, *62*, 309-315

[73] Wanner, P. Enantioselektive Biotransformationen mit Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Charakterisierung beteiligter Enzyme. *Dissertation*, Technische Universität Berlin, **1996**

[74] van Wyk, C.J. *Ph.D. dissertation*, Univ. Calif. Davis Library, **1966**

[75] Sakato, K.H.; Hoekman, M.; Kepner, R.E.; Webb, A.D.; Muller, C. Some Neutral Aroma Components of Wines of *Vitis Vinifera* Variety Carignane. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1975**, *26*, 70-74

[76] Bouseta, A.; Scheirman, V. Collin, S. Flavor and Free Amino Acid Composition of Lavender and Eucalyptus Honeys. *J. Food Sci.*, **1996**, *61*, 683-687, 694

[77] Rowland, C.Y.; Blackman, A.J.; D'Arcy, B.R.; Rintoul, G.B. Comparison of Organic Extractives Found in Leatherwood (*Eucryphia lucida*) Honey and Leatherwood Flowers and Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, *43*, 753-763

[78] Kuhnert-Kirchhoff, J; Baltés, W. Model reactions on roast aroma formation. a) VII. Specific products of phenylalanine after cooking L-

phenylalanine with D-Glucose in a laboratory autoclave. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1990**, *190*, 9-13

b) VII. Volatile reaction products from the reaction of phenylalanin with 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-furanone (Furaneol) by cooking in a laboratory autoclave. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1990**, *190*, 14-16

[79] Lübke, M.; LeQuéré, J.-L. Retention behaviour of volatile compounds in normal-phase high-performance liquid chromatography on a diol column. *J. Chromatogr.*, **1993**, *646*, 307-316

[80] Razungles, A.; Tarhi, E.H.; Baumes, R.; Gunata, Z.; Tapiero, C.; Bayonove, C. Analyse rapide des composés volatils du raisin et du vin par extraction aux micro-ondes, *Sci. Aliments*, **1996**, *14*, 725-739

[81] Schulze, U.; Lidén, G.; Villadsen, J. Dynamics of ammonia uptake in nitrogen limited anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechn.*, **1996**, *46*, 33-42

[82] G. Eisenbrand, P. Schreier (eds.), *Römpp Lexikon Lebensmittelchemie*, Thieme-Verlag, Stuttgart, **1995**

[83] Awano, K.; Yanai, T.; Watanabe, Y.T.; Kitahara, T.; Mori, K. Synthesis of All Four Possible Stereoisomers of 1-Phenyl-2,3-butandiol and both Enantiomers of 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanone to Determine the Absolute Configuration of the Natural Constituents. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1995**, *59*, 1251-1254

[84] Watanabe, I.; Yanai, T.; Awano, K-I; Kogami, K.; Hayashi, K. Volatile Components of Wisteria Flower. In: *Flavors and Fragrances: A World Perspective*. Proceedings of the 10 th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavors; Washington, DC, USA, 16.-20 Nov. 1986,

Brian M. Lawrence, Braja D. Mookherje, Brian J. Willis (eds.), Elsevier, Amsterdam, **1988**

[85] Mochizuki, N.; Hiramatsu, S.; Sugai, T.; Ohta, H.; Moriat, H.; Itokawa, H. Improved Conditions for the production and Characterization of 1-Arylpropane-1,2-diols and related compounds. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1995**, *59*, 2282-2291

[86] a) Fronza, G.; Fuganti, C.; Grasselli, P.; Majori, L.; Pedrocchi-Fantoni, G.; Spreafico, F. Synthesis of enantiomerically pure forms of N-acyl derivatives of C-methyl analogs of the aminodeoxysugar L-acosamine from noncarbohydrate precursors. *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 3289-3296

b) Netrval, J.; Vojtisek, V., Production of phenylacetylcarbinol in various yeast species. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1982**, *16*, 35-38

c) Crout, D.H. G.; Littlechild, J.; Morrey, S. Acetoin metabolism: stereochemistry of the acetoin produced by the pyruvate decarboxylase of wheat germ and by the α -acetolactate decarboxylase of *Klebsiella aerogenes*. *J. Chem. Soc. Perk. Trans. I*, **1986**, 105-108

d) Montville, T.J.; Hsu, A. H.-M.; Meyer, H.M. High efficiency conversion of pyruvate to acetoin by *Lactobacillus plantarum* during pH-controlled and fed batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1987**, *53*, 1798-1802

e) Long, A.; Ward, O.P. Biotransformation of aromatic aldehydes by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.*, **1989**, *4*, 49-53

f) Kren, V.; Crout, D.H.G.; Dalton, H.; Hutchinson, D.W.; König, W.; Turner, M.M.; Dean, G.; Thomson, N. Pyruvate decarboxylase: a new enzyme for the production of acylolins by biotransformation. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1993**, *4*, 341-343

- [87] a) Muller, Y.A.; Lindquist, Y.; Furey, W.; Schulz, G.E.; Jordan, F.; Schneider, G. A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure*, **1993**, *1*, 95-103
- b) Muller, Y.A.; Schulz, G.E. Structure of thiamin- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science*, **1993**, *259*, 965-967
- c) Muller, Y.A.; Schuhmacher, G.; Rudolph, R.; Schulz, G.E. The refined structures of a stabilized mutant and of wild-type pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *237*, 315-335
- [88] a) Myles, D.C.; Andrusis, P.J., III.; Whitesides, G.M. A Transketolase-based synthesis of (+)-exo-brevicomine. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 4835-4838
- b) Demuynck, C.; Bolte, J.; Hecquet, L.; Dalmas, V. Enzyme catalyzed synthesis of carbohydrates: synthetic potential of transketolase. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 5085-5088
- c) Draths, K.M.; Pompliano, D.L.; Conley, D.L.; Frost, J.W.; Berry, A.; Disbrow, G.L.; Stavarsky, R.J.; Lievense, J.C. Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: the role of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 3956-3962
- d) Kobori, Y.; Myles, D.C.; Whitesides, G.M. Substrate specificity and carbohydrate synthesis using transketolase. *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 5899-5907
- e) Effenberger, F.; Null, V. Enzyme-catalysed reactions. 13. A new, efficient synthesis of fagomine. *Liebigs Ann. Chem.*, **1992**, 1211-1212
- f) Effenberger, F.; Null, V.; Ziegler, T. Enzyme catalysed reactions. 13. Preparation of optically pure L-2-hydroxy aldehydes with yeast transketolase. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 5157-5160
- g) Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuynck, C. New assays for transketolase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1993**, *57*, 2174-2176

- h) Hobbs, G.R.; Lilly, M.D.; Turner, N.J.; Ward, J.M.; Willets, A.J.; Woodley, J.M. Enzyme-catalyzed carbon-carbon bond formation: use of transketolase from *Escherichia coli*. *J. Chem. Soc. Perk. Trans. I*, **1993**, 165-166
- i) Dalmas, V.; Demuynck, C. An efficient synthesis of seduheptulose catalyzed by spinach transketolase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 1169-1172
- j) Dalmas, V.; Demuynck, C. Study on the specificity of a spinach transketolase on achiral substrates. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 2383-2388
- k) Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuynck, C. Chemoenzymic synthesis of 6-deoxy-D-fructose and 6-deoxy-L-sorbose using transketolase. *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 8677-8684
- l) Hecquet, L.; Lemaire, M.; Bolte, J.; Demuynck, C. Chemo-enzymic synthesis of precursors of fagomine and 1,4-dideoxy-1,4 imino-D-arabinitol. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 8791-8794

[89] Reviews: a) Krampitz, L.O. Catalytic functions of thiamin diphosphate. *Annu. Rev. Biochem.*, **1969**, *38*, 213-240

b) Sable, H.Z.; Gubler, C.J. (eds) Thiamin: 20 Years of Progress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1982**, *378*, 7-122

c) Kluger, R. Thiamin diphosphate: a mechanistic update on enzymic and nonenzymic catalysis of decarboxylation. *Chem. Rev.*, **1987**, *87*, 863-876

d) Schellenberger, A.; Schowen, R.L. (eds.) *Thiamine Pyrophosphate Chemistry*. CRC Press, Boca Raton, FL, Vols. 1-2, **1988**

e) Bisswanger, H.; Ulrich, J. (eds.) *Biochemistry and Physiology of Thiamin Diphosphate Enzymes*. VCH Publishers, N.Y., **1991**, pp 1-453.

[90] Boles, E.; Zimmermann, F.K. Induction of pyruvate decarboxylase in glycolysis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the con-

centrations of three-carbon glycolytic metabolites. *Arch. Microbiol.* **1993**, *160*, 324-328

[91] Dyda, F.; Furey, W.; Swaminathan, S.; Sax, M.; Farrenkopf, B.; Jordan, F. Catalytic Centers in the Thiamin Diphosphate Dependent Enzyme Pyruvate Decarboxylase at 2,4-Å Resolution. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 6165-6170

[92] Baburina, I.; Gao, Y.; Hu, Z.; Jordan, F.; Hohmann, S.; Furey, W. Substrate Activation of Brewers' Yeast Pyruvate Decarboxylase is Abolished by Mutation of Cystein 221 to Serin. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 5630-5635

[93] Vaccaro, J.A.; Crane, E.J., III.; Harris, T.K.; Washabaugh, M.W. Mechanism of the Reconstitution of Brewers' Yeast Pyruvate Decarboxylase with Thiamin Diphosphate and Magnesium. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 12636-12644

[94] Baburina, I.; Moore, D.J.; Volkov, A.; Kahyaoglu, F.J.; Mendelsohn, R. Three of Four Cysteines, Including That Responsible for Substrate Activation, Are Ionized at pH 6.0 in Yeast Decarboxylase: Evidence from Fourier Transform Infrared and Isoelectric Focusing Studies. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 10249-10255

[95] Killenberg-Jabs, M.; König, S.; Hohmann, S.; Hübner, G. Purification and Characterisation of the Pyruvate Decarboxylase from a Haploid Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1996**, *377*, 313-317

[96] Arjunan, P.; Umland, T.; Dyda, F.; Swaminathan, S.; Furey, W.; Sax, M.; Farrenkopf, B.; Gao, Y.; Zhang, D.; Jordan, F. Crystal Structure of the

Thiamin Diphosphate-dependent Enzyme Pyruvate Decarboxylase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2,3 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, **1996**, *256*, 590-600

[97] Stivers, J.T.; Washabaugh, M.W. Catalysis of Acetoin Formation by Brewer's Yeast Pyruvate Decarboxylase Isozymes. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 13472-13482

[98] Gupta, K.G.; Singh, J.; Sahni, G.; Dhawan, S. Production of R-Phenyl Acetyl Carbinol by Yeasts. *Biotechn. Bioeng.*, **1979**, *21*, 1085-1089

[99] Cardillo, R.; Servi, S.; Tinti, C. Biotransformations of unsaturated aldehydes by microorganisms with pyruvate decarboxylase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1991**, *36*, 300-303

[100] Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. Acetoin and Phenylacetylcarbinol Formation by the Pyruvate Decarboxylases of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biocatalysts*, **1988**, *1*, 321-331

[101] Antoniani, C. Acetonic condensation and "fermenting power" of alcoholic yeast, *Ann. chim. applicata*, **1948**, *38*, 39-46

[102] Peynaud, E.; Lafon, M. Presence and significance of diacetyl, acetoin and 2,3-butandiol in alcoholic beverages. *Ann. Falsif. Fraudes*, **1951**, *44*, 264-283

[103] Postel, W.; Güvenc, U. Gaschromatographische Bestimmung von Diacetyl, Acetoin und 2,3-Pentandion in Wein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1976**, *161*, 35-44

- [104] Ribéreau-Gayon, P.; Peynaud, E. In : Analyse et controle des vins; Ribéreau-Gayon, J.; Peynaud, E. (eds.); Librairie Polytechnique Ch. Béranger, Paris, **1958**
- [105] Crowell, E.A.; Guymon, J.F. Influence of aeration and suspended material on higher alcohols, acetoin and diacetyl during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1963**, *14*, 2124-222
- [106] Guymon, J.F.; Crowell, E.A. The formation of acetoin and diacetyl during fermentation, and the levels found in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1965**, *16*, 85-91
- [107] Haukeli, A.D.; Lie, S. Production of diacetyl, 2-acetolactate and acetoin by yeast during fermentation. *J. Inst. Brew.*, **1972**, *78*, 229-232
- [108] Romano, P.; Suzzi, G. Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.*, **1993**, *74*, 541-545
- [109] Fuganti, C.; Grasselli, P.; Poli, G.; Servi, S.; Zorella, A. Decarboxylative Incorporation of α -oxobutyrate and α -oxovalerate into (R)- α -hydroxy-ethyl- and propyl ketones on reaction with aromatic and α,β unsaturated aldehydes in baker's yeast. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, 1619-1621
- [110] Leuenberger, H.G.W.; Boguth, W. Synthesis of optically active natural carotenoids and structurally related compounds. I. Synthesis of the chiral key compound (4R,6R)-4-hydroxy-2,2,6-trimethylcyclohexanone. *Helv. Chim. Acta*, **1976**, *59*, 1832-1847

[111] Crout, D.H.G.; Dalton, H.; Hutchinson, D.W.; Miyagoshii, M. Studies on pyruvate decarboxylase: acyloin formation from aliphatic, aromatic and heterocyclic aldehydes. *J. Chem. Soc. Perk. Trans.* **1991**, *1*, 1329-1334

[112] Hassner, A.; Reuss, R.H.; Pinnick, H.W. Hydroxylation of Carbonyl Compounds via Silyl Enol Ethers. *J. Org. Chem.*, **1975**, *40*, 3427-3729

[113] Ohba, T.; Wakayam, J.; Ikeda, E.; Takei, H. Studies on Irreversible Inhibition of Serin Proteases by α -Sulfonyloxyketone Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **1996**, *6*, 1127-1132

[114] Vankar, Y.D.; Chaudhuri, N.C.; Singh, S.P. Palladium(0) Catalysed Isomerisation of 2,3-Epoxy Alcohols to α and β -Hydroxy Ketones. *Synth. Comm.*, **1986**, *16*, 1621-1626

[115] Gill, M.; Kiefel, M.J.; Lally, D.A. Addition of Organomagnesium Reagents to Cyanohydrin-O-Silyl-Ethers: An Efficient and Flexible Synthesis of Unsymmetrically Substituted Acyloins. *Tetrahedron Letters*, **1986**, *27*, 1933-1934

[116] Harris, T.K.; Washabaugh, M.W. Distribution of the Thiamin Diphosphate C(2)-Proton during Catalysis of Acetaldehyde Formation by Brewers' Yeast Pyruvate Decarboxylase. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 13994-14000

[117] Abraham, B. Flüchtige Metabolite in Submerskulturen ligninolytischer Pilze (Klasse *Basidiomycetes*), *Dissertation*, Universität Hannover, **1994**

[118] Ullrich, J. In: *Methods of Enzymology*, Vol. 18, Part A; D.B McCormick; Wright, L.D. (eds.) Academic Press, N.Y. **1970**, pp 109-115

- [119] Green, J.B.A. Pyruvate decarboxylase is like acetolactat synthase (ILV2) and not like the pyruvate dehydrogenase E1 subunit. *FEBS Lett.*, **1989**, *246*, 1-5
- [120] Juni, E. Evidence for a two site mechanism for decarboxylation of α -keto acids by α -carboxylase. *J.Biol. Chem.*, **1961**, *236*, 2302-2308
- [121] Bruhn, H., Verbesserung der Acyloinkondensationsfähigkeit der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* - eine strukturell-funktionale Analyse, *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **1995**
- [122] Lehmann, H.; Fischer, G.; Hübner, G; Kohnert, K.-D.; Schellenberger, A. Influence of steric and electronic parameters on the substrate behavior of α -oxo acids to yeast pyruvate decarboxylase. *Eur. J. Biochem.*, **1973**, *32*, 83-87
- [123] Feron, G.; Bonnarme, P.; Durand, A. Prospects for the microbial production of food flavors. *Trends Food Sci. Technol.*, **1996**, *7*, 285-293
- [124] Vollhard, K.P.C. Organische Chemie, VCH Verlag Weinheim, **1988**, S. 145
- [125] Berger, R.G. Aroma Biotechnology, Springer Verlag, Berlin, **1995**
- [126] Krings, U; Berger, R.G. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press
- [127] Gabelmann, A. (ed) Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients, John Wiley, N.Y., **1994**

- [128] Haarasilta, S.; Oura, E. Activity and regulation of anapleurotic and gluconeogenic enzymes during the growth process of baker's yeast. *Eur. J. Biochem.*, **1975**, *52*, 1-7
- [129] Navas, M.A.; Cerdan, S.; Gancedo, J.M. Futile cycles in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 1290-1294
- [130] Gancedo, C.; Gancedo, J.M.; Sols, A. Metabolite repression of fructose-1,6-diphosphatase in yeast. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **1967**, *26*, 528-531
- [131] Lenz, A.G.; Holzer, H. Rapid reversible inactivation of fructose-1-6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose. *FEBS Letters*, **1980**, *137*, 134
- [132] Gancedo, C.; Schwerzmann, K. Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, **1976**, *109*, 221-225
- [133] Lopez-Boado, Y.S.; Herrero, P.S.; Gascon, S.; Moreno, F. Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, **1987**, *147*, 231-234
- [134] De Jong-Gubbels, P.; Vanrolleghem, P.; Heijnen, S.; Van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. Regulation of Carbon Metabolism in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* Grown on Mixtures of Glucose and Ethanol. *Yeast*, **1995**, *11*, 407-418

[135] Ciesarová, Z.; Sajbidor, J.; Smogrovicová, D.; Bafrncová, P. Effect of Ethanol on Fermentation and Lipid Composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Biotechn.*, **1996**, *10*, 1-12

[136] Wong, K.C.; Teng, Y.E. Volatile Components of *Mimusops elengi* L. Flowers. *J. Essent. Oil Res.*, **1994**, *6*, 453-458

[137] Misra, G.; Mitra, C.R. Constituents of Leaves, Heartwood and Root of *Mimusops elengi*. *Phytochemistry*, **1968**, *7*, 501-502

[138] Brock, M.L.; Kepner, R.E.; Webb, A.D. Comparison of Volatiles in a Palomino Wine and a Submerged Culture Flor Sherry. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1984**, *35*, 151-155

[139] Hollnagel, A.; Menzel, E.; Mosandl, A. Chiral aroma compounds of sherry. II. Direct enantiomer separation of solerone and solerole, Z. *Lebensm. Unters. Forsch.*, **1991**, *193*, 234-236

6. Anhang

6.1 Übersicht über die aus SNLH-Medium isolierten Substanzen

Candida etchelsii

Tab. 6-1 Identifizierte Inhaltsstoffe eines Kulturextraktes von *Candida etchelsii*, SNLH-Medium

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Methyl-1-propanol	5,81	1121	1091	100
2-Methyl-1-butanol	9,68	1220	1213	100
2,3-Butandiol cis	23,57	1549	1552	62
2-Phenylethanol	37,22	1897	1903	100
3,7-Dimethyl 6-octen-1-ol (β-Citronellol)	32,44	1764	1768	100
3,7-Dimethyl-2,6-octadienol, (Geraniol)	35,37	1844		89
Dodecanol	39,59	1964	1972	100
Carbonsäuren:				
Essigsäure	19,61	1447	1449	100
2-Methylpropansäure	24,55	1573	1569	100
Butansäure	26,93	1628	1629	100
Octansäure	42,57	2052	2053	100
Decansäure	49,35	2266	2263	100

Candida versatilis**Tab. 6-2** Identifizierte Inhaltsstoffe eines Kulturextraktes von *Candida versatilis*, SNLH-Medium

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
1-Ethoxy-2-propanol	8,82	1171		92
3-Ethoxy-1-propanol	17,45	1379		97
2-Methyl-1-propanol	6,35	1103	1091	89
1-Methoxy-2-methyl-2-propanol	16,60	1355		88
1-Butanol	8,15	1156	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,71	1220	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,10	1252	1252	100
3-Methyl-2-buten-1-ol	15,30	1327	1320	100
2,3-Butandiol cis	24,79	1559	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,43	1594	1589	100
1-Dodecanol	40,75	1968	1972	100
2-Furanmethanol ^b	29,36	1659	1656	100
Benzylalkohol ^b	37,21	1868	1866	100
2-Phenylethanol	38,49	1903	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,91	>2800		100
4-Ethylphenol	47,27	2167		90
Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,22	1277	1280	100
Thioverbindungen:				
3-(Methylthio)-1-Propanol	31,43	1714	1753 ^l	97
2-(Ethylthio)-1-butanol	33,12	1756		85
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,61	1447	1449	100
2-Methylpropansäure	25,60	1574	1569	100
2-Methylbutansäure	29,66	1666	1666	100
Propansäure	24,70	1552	1551	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Carbonsäuren				
Hexansäure	36,29	1843	1846	100
Hexadecansäure	67,91	>2800		100
Phenyllessigsäure	58,50	2544	2569 ^L	95
Ester:				
2-Hydroxypropansäureethylester	16,00	1343		90
3-Hydroxybutansäureethylester	23,88	1532	1519	100
Lactone:				
γ-Decalacton	45,57	2114	2127	100
Pantolacton ^b	42,39	2017	2022	100
Sonstige:				
2-Acetylpyrrol	40,42	1959		93

Saccharomyces bayanus

Tab. 6-3 Identifizierte Inhaltsstoffe eines Kulturextraktes von *Saccharomyces bayanus*, SNLH-Medium

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
1-Acetoxy-2-propanol	25,99	1584		88
2-Acetoxy-1-propanol	32,36	1738		75
2-Methyl-1-propanol	6,40	1103	1091	89
1,2-Propandiol	26,80	1602		
1-Butanol	8,20	1157	1146	100
3-Methyl-1-butanol	10,69	1220	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,15	1253	1252	100
1,3-Butandiol	16,0	1343		75
4-Octanol	19,61	1425		89
1-Dodecanol	40,72	1968	1972	100
1-Phenylethanol (int Std.)	34,99	1807	1808	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Alkohole				
2-Phenylethanol	38,43	1903	1903	100
2-Furanmethanol ^b	29,37	1659	1656	100
Benzylalkohol ^b	37,23	1868	1866	100
2-(1,1-Dimethylethyl)-cyclohexanol	29,5	1662		62
2-Methyl-5-(1-methylethyl)-cyclohexanol	33,28	1760		62
3-Methyl-1-hexen-3-ol	41,34	1987		83
2-Phenoxyethanol	46,18	2133		88
Thioverbindungen:				
2-(Methylthio)-Ethanol	23,72	1527		90
2-Methyltetrahydrothiophen-3-on	23,30	1517		81
3-(Methylthio)-1-Propanol	31,43	1714	1753 ^l	100
Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,65	1288	1280	100
2-Nonanon	17,92	1386		100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,65	1449	1449	100
2-Methyl-propansäure	25,59	1574	1569	100
2-Methyl-butansäure	29,66	1666	1666	100
Butansäure	27,95	1629	1629	100
Hexansäure	36,29	1843	1846	100
Nonansäure	47,23	2166	2165	100
Decansäure	50,54	2274	2273	100
Dodecansäure	56,76	2486	2485	100
3-Phenyl-2-propensäure (Zimtsäure)	66,50	>2800		93
Ester:				
3-Hydroxy-butansäureethylester	23,88	1532	1519	95
Sonstige:				
2-Acetylpyrrol	40,44	1959		92
2-Pyrrolidinon	42,66	2025		81
1-H-Indol-3-ethanol	64,57	>2800		91

Saccharomyces cerevisiae* 457, 1250 und 5155*Tab. 6-4** Identifizierte Inhaltsstoffe der Kulturextrakte von *Saccharomyces cerevisiae* 457, 1250 und 5155, SNLH-Medium

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Methyl-1-propanol	6,07	1096	1091	100
3-Methyl-1-butanol	10,20	1208	1209	100
1-Pentanol	12,32	1257	1257	100
2,3-Butandiol cis	23,62	1550	1552	100
2-Phenylethanol	37,02	1891	1903	100
Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,21	1276	1280	100
Carbonsäuren:				
Essigsäure	19,59	1447	1449	100
2-Methylpropansäure	24,44	1570	1569	100
Butansäure	26,89	1626	1629	100
Octansäure	42,58	2052	2053	93
Decansäure	49,20	2261	2263	87
Ester:				
2-Ethylphenylacetat	33,41	1792		84
Hexansäureethylester	9,76	1223	1218	100
Octansäureethylester	18,39	1420	1413	100
Octansäure-2-phenylethylester	51,95	2319		70
Lactone:				
γ-Dodecalacton	51,62	2342		89
δ-Dodecalacton	53,08	2392		92

Saccharomyces cerevisiae* 6203*Tab. 6-5** Identifizierte Inhaltsstoffe eines Kulturextraktes von *Saccharomyces cerevisiae* 6203, SNLH-Medium

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Butoxyethanol	18,60	1402		92
3-Ethoxy-propanol	17,52	1375	1389	97
2-Methyl-1-propanol	6,47	1104	1091	100
1-Butanol	8,16	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,63	1218	1213	100
2,3-Butandiol cis	24,87	1557	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,35	1593	1589	100
2-Nonanol	25,30	1566		85
Dodecanol	40,43	1959	1968	100
2-Phenylethanol	38,53	1900	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol	70,85	>2800		100
Benzylalkohol ^b	37,27	1868	1873	100
2-Furanmethanol ^b	29,35	1655	1656	100
1-(H)-Indol-3-ethanol	64,50	>2800		85
Thioverbindungen:				
3-Methylthio-propanol	31,33	1709	1753 ^L	97
Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,79	1292	1280	100
4-Methoxy-2-butanon	15,55	1332		88
2-Hydroxy-3-pentanon	16,39	1350		88
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,23	1439	1449	100
2-Methylbutansäure	29,72	1659	1666	100
3-Hydroxybutansäure	49,51	2236	2244	100
Propansäure	24,37	1543	1545	100
Butansäure	27,95	1628	1629	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Carbonsäuren				
Hexansäure	36,45	1846	1846	100
Octansäure	43,79	2057	2053	100
Decansäure	50,58	2272	2263	100
Dodecansäure	56,80	2486	2485	100
Hexadecansäure	68,12	>2800		100
cis -9-Octadecansäure (Ölsäure)	52,50	2336		87
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,35	1518	1519	96

Torulospora delbrueckii

Tab. 6-6 Identifizierte Inhaltsstoffe eines Kulturextraktes von *Torulasporea delbrueckii*, SNLH-Medium

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Acetoxy-1-propanol	32,33	1738		92
1-Ethoxy-2-propanol	8,81	1171		92
3-Ethoxy-1-propanol	17,63	1379		96
2-Methyl-1-propanol	6,38	1103	1091	89
1-Methoxy-2-methyl-2-propanol	16,60	1355		88
1-Butanol	8,15	1156	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,61	1219	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,10	1252	1252	100
3-Methyl-2-buten-1-ol	15,30	1327	1320	100
2,3-Butandiol cis	24,94	1559	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,43	1594	1589	100
3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol (β-Citronellol)	33,57	1768	1768	100
1-Dodecanol	40,72	1968	1972	100
2-Furanmethanol ^b	29,37	1659	1656	100
Benzylalkohol ^b	37,21	1868	1866	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts.				
2-Phenylethanol	38,46	1903	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,92	>2800		100
Thioverbindungen:				
3-(Methylthio)-1-Propanol	31,43	1714	1753 ¹	97
Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,24	1277	1280	100
2-Nonanon	17,92	1386		100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,60	1447	1449	100
2-Methylpropansäure	25,60	1574	1569	100
2-Methylbutansäure	29,66	1666	1666	100
Propansäure	24,70	1552	1551	100
Butansäure	27,95	1629	1629	100
Hexansäure	36,29	1843	1846	100
Hexadecansäure	67,88	>2800		100
Ester:				
2-Hydroxypropansäureethylester	16,00	1343		90
3-Hydroxybutansäureethylester	23,88	1532	1519	100
Sonstige:				
N-Ethylacetamid	28,71	1644		100

Zygosaccharomyces bailii

Tab. 6-7 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Zygosaccharomyces bailii*, SNLH-Medium

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Acetoxy-1-propanol	32,22	1733		92

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Alkohole				
1-Ethoxy-2-propanol	8,71	1168		96
2-Methyl-1-propanol	6,28	1103	1091	100
1-Butanol	8,16	1155	1145	100
2-Methyl-1-butanol	10,50	1216	1213	100
3-Methyl-3-Buten-1-ol	12,20	1254	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,61	1552	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,20	1589	1589	100
2-Methyl-3-pentanol	15,26	1326	1358	85
1-Dodecanol	40,73	1969	1968	100
2-Phenylethanol	38,34	1900	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,72	>2800		100
Benzylalkohol ^b	37,27	1870	1866	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,35	1280	1280	100
2-Nonanon	17,43	1373	1386	100
Benzaldehyd	23,05	1511	1511	100
4-Hydroxybenzaldehyd	68,40	>2800		87
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,20	1439	1449	100
Propansäure	24,38	1545	1545	100
2-Methylbutansäure	29,78	1660	1666	100
Hexansäure	36,29	1843	1846	100
Dodecansäure	56,85	2486	2485	100
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,48	1521	1519	100
Lactone:				
γ-Butyrolacton	27,21	1612	1612	100
γ-Decalacton	45,78	2127	2127	100
Pantolacton	42,30	2022	2022	100

Zygosaccharomyces bisporus**Tab. 6-8 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von Zygosaccharomyces bisporus, SNLH-Medium**

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Butoxy-ethanol	18,60	1402		92
3-Ethoxy-1-propanol	17,57	1375	1389	97
2-Methyl-1-propanol	6,37	1102	1091	100
1-Butanol	8,16	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,63	1218	1213	100
2,3-Butandiol cis	24,66	1550	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,21	1587	1589	100
2-Phenylethanol	38,38	1900	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,73	>2800		100
Benzylalkohol ^b	37,27	1870	1866	100
2-Furanmethanol ^b	29,27	1655		100
Thioverbindungen:				
3-Methylthio-propanol	31,29	1708	1753 ^L	97
Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,37	1277	1280	100
Carbonsäuren				
Ethansäure, Essigsäure	20,23	1439	1449	100
2-Methyl-butansäure	29,72	1659	1666	100
3-Hydroxybutansäure	49,51	2236	2244	100
Propansäure	24,37	1543	1545	100
Butansäure	27,95	1628	1629	100
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,35	1518	1519	100
Lactone:				
γ-Butyrolacton	27,07	1607	1612	100
γ-Decalacton	45,96	2124	2127	100
Pantolacton ^b	42,46	2018	2022	100

Zygosaccharomyces rouxii**Tab. 6-9 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Zygosaccharomyces rouxii*, SNLH-Medium**

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Acetoxy-1-propanol	32,25	1752		92
1-Ethoxy-2-propanol	8,71	1168		96
2-Methyl-1-propanol	6,28	1103	1091	100
1-Butanol	8,16	1155	1145	100
2-Methyl-1-butanol	10,50	1216	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,24	1255	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,61	1552	1552	100
1-Dodecanol	40,73	1969	1968	100
1-Phenylethanol (int Std.)	34,89	1804	1808	100
2-Phenylethanol	38,34	1900	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,72	>2800		81
Benzylalkohol ^b	37,27	1870	1866	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,35	1280	1280	100
Benzaldehyd ^b	23,07	1511	1511	100
4-Hydroxybenzaldehyd	68,37	>2800		92
2-Nonanon	17,45	1374	1386	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,20	1439	1449	100
2-Methylpropansäure	25,60	1574	1569	100
2-Methylbutansäure	29,78	1660	1666	100
Hexansäure	36,29	1843	1846	100
Dodecansäure	56,85	2486	2485	100

6.2 Übersicht über die aus RM 1-Medium isolierten Substanzen

Candida etchelsii

Tab. 6-10 Identifizierte Inhaltsstoffe eines Kulturextraktes von *Candida etchelsii*, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best	Fit [%]
Alkohole:				
2-Methyl-1-propanol	6,30	1102	1091	100
1-Butanol	8,16	1156	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,70	1220	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,10	1252	1252	100
3-Methyl-2-buten-1-ol	15,31	1318	1320	100
2-Phenylethanol	38,43	1901	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,87	>2800		100
2-Furanmethanol ^b	29,34	1658	1656	100
Benzylalkohol ^b	37,20	1868	1866	100
3,7-Dimethyl-1,6-octadien-1-ol (Linalool)	24,90	1548		100
(E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol (Geraniol)	35,30	1847		86
3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol (β-Citronellol)	33,50	1766	1768	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,25	1278	1280	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,41	1352		94
Benzaldehyd ^b	23,05	1506	1511	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,25	1433	1449	100
2-Methylpropansäure	25,56	1563	1569	100
2-Methylbutansäure	29,66	1660	1666	100
Phenyllessigsäure	58,56	2546	2569 ^L	95

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts.				
Benzoessäure	54,98	2424	2409	95
Ester:				
Essigsäurebutylester	23,87	1562		
3-Hydroxybutansäureethylester	23,47	1552	1513	86
Ölsäureethylester	56,28	2529		84
Sonstige:				
4-Methyl-2(3H)-Dihydrofuranon	33,9	1821		74

Candida versatilis

Tab. 6-11 Identifizierte Inhaltsstoffe eines Kulturextraktes von *Candida versatilis*, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
3-Ethoxy-1-propanol	17,45		1389	97
2-Methyl-1-propanol	6,35	1103	1091	100
1-Butanol	8,18	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,58	1218	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,05	1253	1252	100
3-Methyl-4-penten-2-ol	17,80	1383		78
2,3-Butandiol cis	24,70	1551	1552	100
?	15,59	1334	1352	93
2-Phenylethanol	38,43	1901	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,83	>2800		81
2-Furanmethanol ^b	29,42	1658	1656	100
Benzylalkohol	37,21	1868	1873	100
Thioverbindungen:				
3-(Methylthio)-1-propanol	31,38	1713	1753 ^L	98
2-(Ethylthio)-1-butanol	33,08	1755		85

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts.				
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,25	1277	1280	100
Benzaldehyd	22,97	1508	1505	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,66	1448	1449	100
2-Methylpropansäure	25,53	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,62	1660	1666	100
Propansäure	24,24	1541	1551	100
Hexansäure	36,29	1843	1846	100
Phenyllessigsäure	58,50	2544	2569 ^L	87
Lactone:				
Pantolacton	42,39	2017	2022	100
Sonstige:				
N-Ethylacetamid	28,95	1650		92

Saccharomyces bayanus

Tab. 6-12 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces bayanus*, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
3-Ethoxy-1-propanol	17,4	1373	1641	96
2-Methyl-1-propanol	6,37	1106	1091	100
1-Butanol	8,15	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,87	1225	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,13	1253	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,72	1545	1552	100
2-Methyl-2,3-pentandiol	32,15	1730		77
2-Phenylethanol	38,11	1894	1903	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts.. Alkohole				
1-Dodecanol	40,77	1970	1972	100
p-Menth-1-en-8-ol (α -Terpineol)	30,63	1689	1690	100
3,7-Dimethyl-6-Octen-1-ol (β -Citronellol)	33,54	1767	1768	100
2-Furanmethanol ^b	29,39	1659	1656	100
Benzylalkohol ^b	37,25	1869	1866	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol,	70,0	>2800		100
Thioverbindungen:				
3-(Methylthio)-1-propanol	31,43	1712		100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,1	1273	1280	100
2-Pentanon, 4-hydroxy, 4-methyl	46,2	2134		81
3-Hydroxy-3,5-dimethyl-2-hexanon	15,62	1335		76
3,4-Hexandion	7,65	1142	1136	100
Carbonsäure:				
Essigsäure	20,63	1448	1449	100
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569	100
Butansäure	27,96	1625	1627	100
2-Methylbutansäure	29,6	1660	1666	100
Hexansäure ^b	36,31	1843	1846	100
Octansäure	43,7	2056	2056	100
Nonansäure	47,23	2165	2165	100
Phenylelessigsäure	58,66	2547	2569 ^L	95
Ester:				
Butandisäurediethylester	29,89	1669	1673	90
Butansäure-2-phenylethylester	34,8	1802		67
5-Acetylpentansäuremethylester	33	1753		77
3-Hydroxybutansäureethylester	23,79	1523	1513	100
9-Hexadecensäureethylester (Palmitoileinsäureethylester)	50,51	2271		90

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Lactone:				
9-Octadecensäureethylester (Ölsäureethylester)	56,3	2470	2471	98
δ-Octalacton	38,9	1916	1929	90
γ-Decalacton	45,9	2125	2107	100
Sonstige:				
N-Ethylacetamid	28,7	1643		94
4-Methyl-1(3H)-dihydroindol-2-on	63,79	>2800		90

***Saccharomyces cerevisiae* 457**

Tab. 6-13 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces cerevisiae* 457, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
1-Ethoxy-2-propanol	8,89	1165		96
3-(Methoxy-methyl)-1-propen	45,77	2114		85
2-Methyl-1-propanol	6,42	1107	1091	100
2-Methyl-1-butanol	10,99	1218	1221	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,20	1253	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,86	1557	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,40	1594	1589	100
	14,45	1309		
2-Methyl-3-pentanol	15,40	1352	1358	90
4-Methyl-2,6-octadien-4,5-diol	47,98	2190		85
5-Nonanol	21,25	1462	1462	100
2-Phenylethanol	38,67	1901	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol ^b	70,96	>2800		81
Benzylalkohol ^b	37,27	1670	1666	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,56	1278	1280	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Aldehyde und Ketone				
2-Nonanon	17,92	1384	1387	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,39	1351		92
2-Hydroxy-3-hexanon	19,35	1420		92
4-Hydroxybenzaldehyd	68,79	>2800		89
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	49,67	2243	2253	95
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,65	1449	1449	100
2-Methylpropansäure	25,47	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,48	1661	1666	100
Butansäure	27,99	1628	1629	100
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,53	1521	1521	100
Lactone:				
γ-Butyrolacton	27,20	1612	1612	100
γ-Decalacton	46,04	2127	2127	100
Pantolacton ^b	42,49	2022	2022	100

***Saccharomyces cerevisiae* 1250**

Tab. 6-14 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces cerevisiae* 1250, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
1-Ethoxy-2-propanol	9,01	1176		93
1-Propanol-2-methyl	6,41	1107	1091	100
2-Methyl-1-butanol	10,81	1224	1221	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,25	1256	1252	100
2-Methyl-3-pentanol	15,69	1360	1358	95
2,2-Dimethyl-3-pentanol	18,76	1401		85

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts.. Alkohole				
2-Phenylethanol	38,84	1915	1903	100
Benzylalkohol ^b	37,19	1867	1866	100
4-Methoxyphenylethanol	51,99	2321		95
Thioverbindungen:				
3-(Methylthio)-1-propanol	31,44	1714	1753	95
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,50	1284	1280	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,50	1353		92
2-Hydroxy-3-hexanon	19,45	1422		92
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	50,14	2256	2253	95
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,60	1447	1449	100
Propansäure	24,31	1543	1545	100
2-Methylpropansäure	25,56	1573	1569	100
Butansäure	27,99	1629	1629	100
2-Methylbutansäure	29,26	1656	1666	100
Benzoessäure	54,97	2424	2409	95
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,50	1521	1521	100
4-Ethylphenylacetat	33,78	1774		88
Lactone:				
Pantolacton	42,47	2019	2022	100
Sonstige:				
2,5-Pyrrolidinon	55,95	2457		84

Saccharomyces cerevisiae* 5155*Tab. 6-15 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces cerevisiae* 5155, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)**

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
1-Ethoxy-2-propanol	8,86	1172		96
1-Propanol-2-methyl	6,41	1107	1091	100
2-Methyl-1-butanol	10,81	1224	1221	100
2,3-Butandiol cis	24,73	1553	1552	100
2-Methyl-3-pentanol	15,66	1336		85
2-Phenylethanol	38,68	1910	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol ^b	70,85	>2800		100
Benzylalkohol ^b	37,19	1867	1866	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,24	1277	1280	100
2-Hydroxy-3-Pentanon	16,43	1352		95
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,60	1447	1449	100
Propansäure	24,31	1543	1545	100
2-Methylbutansäure	29,68	1667	1666	100
Lactone:				
γ-Decalacton	45,60	2115	2127	100
Pantolacton ^b	42,43	2018	2022	100
Sonstige:				
1-Methyl-(2H)- 1,3-dihydroindol-2-on,	63,76	>2800		78
3-Ethanol-(1H)-Indol	64,64	>2800		84

Saccharomyces cerevisiae* 6203*Tab. 6-16 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces cerevisiae* 6203, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)**

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
1-Ethoxy-2-propanol	8,86	1172		96
1-Propanol-2-methyl	6,31	1104	1091	100
2-Methyl-1-butanol	10,95	1227	1221	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,20	1255	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,84	1554	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,48	1595	1589	100
2,2-Dimethyl-3-pentanol	18,52	1400		85
2-Methyl-3-pentanol	15,51	1332	1358 ^L	85
1-Dodecanol	40,58	1964	1972	100
2-Phenylethanol	38,55	1906	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	77,70	>2800		100
p-Menth-1-en-8-ol (α -Terpineol)	30,50	1688	1690	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,50	1284	1280	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,34	1352		95
2-Hydroxy-3-hexanon	19,25	1418		92
4-Hydroxybenzaldehyd	68,64	>2800		100
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	49,47	2237	2237	100
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	49,91	2251	2253	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,52	1445	1449	100
Propansäure	24,26	1541	1545	100
2-Methylpropansäure	25,48	1572	1569	100
Butansäure	27,89	1627	1629	100
2-Methylbutansäure	29,26	1656	1666	100
Octansäure	43,13	2039	2052	100
Hexadecansäure	67,88	>2800		100
Ester:				
4-Ethylphenylacetat	33,80	1775		88

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Lactone:				
γ-Decalacton	45,62	2116	2127	100
Pantolacton	42,26	2014	2022	100
Sonstige:				
N-Ethylacetamid	28,80	1646		100

Torulaspota delbrueckii

Tab. 6-17 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Torulaspota delbrueckii*, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
3-Ethoxy-1-propanol	17,52	1380		98
2-Methyl-1-propanol	6,37	1106	1091	100
1-Butanol	8,16	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,61	1217	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,13	1253	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,76	1546	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,86	1604	1589	100
1-Phenylethanol (int Std.)	35,03	1808	1808	100
2-Phenylethanol	38,48	1901	1903	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,40	1278	1280	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,40	1351		90
2-Nonanon	17,92	1386		100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,66	1432	1449	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Carbonsäuren				
Propansäure	24,28	1542	1551	100
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,66	1666	1666	100
Butansäure	27,95	1628	1629	100
Hexansäure ^b	36,29	1843	1846	100
Nonansäure	47,23	2166	2165	100
Decansäure	50,54	2274	2273	100
Dodecansäure	56,76	2486	2485	100
Phenyllessigsäure	58,59	2546	2569 ^L	95
Ester:				
4-Ethylphenylacetat	33,70	1772		90
3-Hydroxybutansäureethylester	23,45	1520	1519	100
Lactone:				
γ-Decalacton	45,98	2126	2127	100
Pantolacton	42,46	2019	2022	100

Zygosaccharomyces bailii

Tab. 6-18 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Zygosaccharomyces bailii*, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Acetoxy-1-propanol	32,39	1738		92
2-Methyl-1-propanol	6,35	1105	1091	100
1-Butanol	8,17	1155	1146	100
1-Methyl-1-butanol	7,86			90
2-Methyl-1-butanol	10,59	1218	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,09	1253	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,71	1546	1552	100
2-Methyl-1-pentanol	14,45	1308		84

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Alkohole				
2-Methyl-3-pentanol	15,37	1330	1358 ^L	92
4-Octanol	19,61	1426		89
5-Nonanol	21,25	1462		100
2-Phenylethanol	38,68	1901	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol ^b	70,89	>2800		100
Thioverbindungen:				
2-Methyltetrahydrothiophen-3-on	23,30	1517		81
3-(Methylthio)-1-Propanol	31,42	1714	1753 ^L	90
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,40	1278	1280	100
Benzaldehyd ^b	23,03	1511	1511	100
4-Hydroxybenzaldehyd	68,86	>2800		92
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,60	1433	1449	100
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,61	1666	1666	100
2-Methylpentansäure	33,44	1765		85
Butansäure	27,21	1612	1629	100
Tetradecansäure	63,59	>2800		100
Phenylelessigsäure	58,60	2546	2569 ^L	95
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,5	1529	1519	100
Lactone:				
γ-Butyrolacton	27,21	1612	1612	100
γ-Decalacton	45,98	2127	2147	100

Zygosaccharomyces bisporus**Tab. 6-19** Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Zygosaccharomyces bisporus*, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Butoxyethanol	18,50	1400		92
2-Methyl-1-propanol	6,37	1106	1091	100
3-Ethoxy-1-propanol	17,57	1377	1389	97
1-Butanol	8,16	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,81	1218	1213	100
3,4-Dimethyl-2-hexanol	20,39	1426		78
1-Dodecanol	40,74	1969	1968	100
1-Phenylethanol (int Std.)	35,03	1808	1808	100
2-Phenylethanol	38,81	1901	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol ^b	70,94	>2800		100
Benzylalkohol ^b	37,27	1870	1873	100
2-Furanmethanol ^b	29,38	1656	1656	100
Thioverbindungen:				
3-(Methylthio)-1-propanol	31,43	1714	1753 ^L	97
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,41	1278	1280	100
2-Hydroxy-2-hexanon	19,40	1421		93
2-Nonanon	17,92	1386	1387	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,62	1432	1449	100
2-Methylpropansäure	25,51	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,65	1660	1666	100
3-Ethylbutansäure	33,12	1756		75
Propansäure	24,38	1545	1551	100
Butansäure	27,95	1629	1639	100
Hexansäure ^b	36,29	1843	1846	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Carbonsäuren				
Dodecansäure	56,72	2485	2485	100
Phenylelessigsäure	58,53	2545	2569 ^L	97
Ester:				
4-Ethylphenylacetat	33,74	1773	1781	98
3-Hydroxy-butansäureethylester	23,50	1521	1519	100
Butandisäurediethylester	53,80	2383		85
Lactone:				
γ-Butyrolacton	27,23	1612	1612	100
γ-Decalacton	45,90	2125	2127	100
Pantolacton ^b	42,46	2019	2022	100

Zygosaccharomyces rouxii

Tab. 6-20 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Zygosaccharomyces rouxii*, RM 1 (Ethanol, Threonin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Methyl-1-propanol	6,28	1103	1091	100
1-Butanol	8,16	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	11,19	1218	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,24	1253	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,61	1557	1552	100
2,3 Butandiol trans	26,50	1599	1589	100
1-Dodecanol	40,73	1969	1969	100
2-Phenylethanol	38,34	1901	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol ^b	70,72	>2800		100
Benzylalkohol ^b	37,27	1870	1869	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,53	1278	1280	100
Benzaldehyd ^b	23,05	1512	1505	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Aldehyde und Ketone				
4-Hydroxybenzaldehyd	68,40	>2800		100
2-Nonanon	17,43	1383	1387	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,20	1439	1449	100
2-Methylpropansäure	25,60	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,78	1670	1666	100

6.3 Übersicht über die aus RM 2-Medium isolierten Substanzen

Candida etchelsii

Tab. 6-21 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Candida etchelsii*, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Phenoxy-ethanol	46,26	2136		91
1-Ethoxy-2-propanol	8,86	1171		97
2-Methyl-1-propanol	6,39	1107	1091	100
2-Methyl-1-butanol	10,73	1220	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,13	1253	1252	100
1-Methoxy-2-butanol	27,24	1612		92
2,3-Butandiol cis	24,84	1554	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,39	1594	1589	100
4-Methyl-3-hexanol	18,77	1406		85
3,7-Dimethyl-6-Octen-1-ol (β-Citronellol)	33,59	1768	1768	100
2-Furanmethanol ^b	29,44	1658	1656	100
Benzylalkohol ^b	37,25	1869	1869	100
2-Phenylethanol	38,56	1906	1903	100
4-Phenyl-2,3-butandiol	56,85	2490	2491	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,99	>2800		100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Aldehyde und Ketone				
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,40	1282	1280	100
2-Nonanon	17,92	1386	1386	100
2-Hydroxy-2-pentanon	16,47	1352		92
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	49,68	2244	2249	100
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	50,16	2259	2259	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,70	1450	1449	100
2-Methylpropansäure	25,66	1576	1569	100
2-Methylbutansäure	29,66	1664	1666	100
Hexadecansäure	67,95	>2800		
Phenyllessigsäure	58,58	2546	2569 ^L	95
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,55	1523	1519	100
Lactone:				
Pantolacton ^b	42,49	2020	2022	100
Sonstige:				
2,3-Dimethylphenylisocyanat	63,88	>2800		89
Piperidinon	45,86			94

Candida versatilis

Tab. 6-22 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Candida versatilis*, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Butoxy-ethanol	18,56	1401		92
2-Acetoxy-1-propanol	32,39	1738		92
3-Ethoxy-1-propanol	17,45	1374	1361	98

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Alkohole				
2-Methyl-1-propanol	6,39	1107	1091	100
1-Butanol	8,15	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,61	1219	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,05	1251	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,76	1554	1552	100
3,4-Dimethyl-1-pentanol	19,58	1425		96
1-Phenylethanol (int Std.)	34,97	1808	1808	100
2-Phenylethanol	38,43	1903	1903	100
2-Furanmethanol ^b	29,35	1656	1656	100
3-Cyclohexen-1-methanol, α,α -4 trimethyl (α -Terpineol)	30,63	1693		100
Aldehyde und Ketone:				
2-Nonanon	17,92	1386	1386	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,66	1450	1449	100
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,66	1664	1666	100
Hexansäure	36,29	1843	1846	100
Decansäure	50,54	2274	2273	100
Phenyllessigsäure	58,59	2546	2569 ^L	95
Ester:				
3-Ethoxypropansäureethylester	15,59			93
2-Methylbutansäure-2-methylbutylester	13,16			92
4-Ethylphenylacetat	33,73		1781	95
Thioverbindungen:				
3-(Methylthio)-1-Propanol	31,41	1712	1753 ^L	90
Lactone:				
γ -Decalacton	45,98	2127	2127	100
Pantolacton ^b	42,46	2019	2022	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Sonstige:				
N-Ethylacetamid	28,75			100
2,6-Dimethylphenylisocyanat	63,77			85

Saccharomyces bayanus

Tab. 6-23 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces bayanus*, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Acetoxy-1-propanol	32,39	1739		92
1-Ethoxy-2-propanol	8,83	1170		96
2-Methyl-1-propanol	6,39	1107	1091	100
1-Butanol	8,15	1155	1146	100
2-Ethyl-1-butanol	14,79	1315	1306	100
2-Methyl-1-butanol	10,61	1217	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,13	1253	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,76	1546	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,33	1592	1589	100
2-Methyl-3-pentanol	15,66	1332		93
1-Dodecanol	40,77	1970	1972	100
1-Phenylethanol (int Std.)	35,03	1808	1807	100
2-Phenylethanol	38,48	1904	1903	100
3,7-Dimethyl-6-Octen-1-ol (β-Citronellol)	33,57	1767	1768	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,40	1278	1280	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,43	1352		93
2-Hydroxy-3-hexanon	19,62	1460		91
2-Nonanon	17,92	1386		100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,66	1450	1449	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Carbonsäuren				
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,66	1666	1666	100
Butansäure	28,00	1630	1629	100
Hexansäure ^b	36,29	1843	1846	100
Decansäure	50,54	2274	2273	100
Dodecansäure	56,76	2485	2485	100
Phenyllessigsäure	58,59	2546	2569 ^L	95
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,53	1523	1519	100
Thioverbindungen:				
3(2H) 2-Methyldihydrothiophenone	23,34	1518		92
3-(Methylthio)-1-Propanol	31,43	1714	1753 ^L	98
Lactone:				
	43,32	2045		75
γ-Decalacton	45,98	2126	2127	100
Pantolacton	42,46	2019	2022	100

***Saccharomyces cerevisiae* 457**

Tab. 6-24 Identifizierte Inhaltstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces cerevisiae* 457, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Methyl-1-propanol	6,42	1107	1091	100
2-Propanol-1-ethoxy	8,89	1165		96
2-Methyl-1-butanol	10,99	1218	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,20	1253	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,83	1556	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,40	1594	1589	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Alkohol				
5-Methyl-2-Hexanol	15,69	1336	1341 ^L	95
Dodecanol	40,49	1961	1972	100
Benzylalkohol ^b	37,27	1670	1666	100
2-Phenylethanol	38,74	1902	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,96	>2800		100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,69	1282	1280	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,48	1352		92
2-Hydroxy-3-hexanon	19,43	1422		92
4-Hydroxybenzaldehyd	68,86	>2800		89
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	49,84	2249	2249	100
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	50,13	2259	2259	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,65	1450	1449	100
2-Methylpropansäure	25,47	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,48	1666	1666	100
Butansäure	27,99	1629	1629	100
Phenylelessigsäure	58,64	2547	2569 ^L	95
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,53	1558	1558	100
Lactone:				
γ-Butyrolacton	27,20	1651	1652	100
γ-Decalacton	46,04	2178	2178	100
Pantolacton	42,49	2071	2071	100

Saccharomyces cerevisiae* 1250*Tab. 6-25** Identifizierte Inhaltstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces cerevisiae* 1250, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
1-Ethoxy-2-propanol	8,81	1170		96
2-Methyl-1-Butanol	10,60	1219	1213	100
2,3-Butandiol cis	24,75	1548	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,40	1594	1589	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,15	1252	1252	100
2-Methyl-1-pentanol	15,64	1335	1341	95
3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol	43,05	2037		99
Benzylalkohol ^b	37,19	1866	1866	100
1-Phenylethanol (int Std.)	34,97	1808	1808	100
2-Phenylethanol	38,60	1908	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,83	>2800		100
4-Methoxyphenylethanol	57,25	2504		95
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,43	1282	1280	100
2-Hydroxy-3-Pentanon	16,42	1353		95
2-Hydroxy-3-Hexanon	19,40	1420		92
4-Hydroxyphenylethanol	68,80	>2800		100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,49	1445	1449	100
2-Methylpropansäure	25,59	1574	1569	100
Butansäure	27,90	1627	1629	100
2-Methylbutansäure	29,65	1665	1666	100
Phenylessigsäure	58,57	2544	2569 ^L	95
Benzoessäure	54,94	2421	2409	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts.				
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,50	1558	1558	100
4-Ethylphenylacetat	33,73	1773	1781 ^L	95
Thioverbindungen:				
3-(Methylthio)-1-Propanol	31,43	1714	1753 ^L	98
Lactone:				
γ-Decalacton	45,99	2127	2127	100
Pantolacton ^b	42,45	2017	2022	100
Sonstige:				
N-Ethylacetamid	28,75	1645		100
2,5-Pyrrolidindion	56,05	2461		95
2,6-Dimethylphenylisocyanat	63,80	>2800		88

***Saccharomyces cerevisiae* 5155**

Tab. 6-26 Identifizierte Inhaltstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces cerevisiae* 5155, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
1-Ethoxy-2-propanol	8,77	1169		96
2-Methyl-1-Butanol	10,58	1218	1213	100
2,3-Butandiol cis	24,82	1548	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,40	1594	1589	100
3-Pentanol-2-methyl	15,60	1334		85
Benzylalkohol ^b	37,19	1866	1866	100
1-Phenylethanol (int Std.)	34,97	1808	1808	100
2-Phenylethanol	38,60	1908	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,85	>2800		100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,51	1284	1280	100
2-Hydroxy-3-Pentanon	16,38	1353		95
2-Hydroxy-3-Hexanon	19,37	1420		92
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,60	1447	1449	100
2-Methylpropansäure	25,59	1574	1569	100
2-Methylbutansäure	29,58	1664	1666	100
Phenylessigsäure	58,48	2544	2569 ^L	95
Benzoessäure	54,87	2420	2409	100
Lactone:				
γ-Decalacton	45,57	2114	2127	100
Pantolacton ^b	42,40	2017	2022	100
Sonstige:				
2,5-Pyrrolidindion	56,04	2461		87
2,6-Dimethylphenylisocyanat	63,76	>2800		88

***Saccharomyces cerevisiae* 6203**

Tab. 6-27 Identifizierte Inhaltstoffe des Kulturextraktes von *Saccharomyces cerevisiae* 6203, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Methyl-1-propanol	6,35	1105	1091	100
2-Propanol-1-ethoxy	8,74	1163		96
2-Methyl-1-butanol	10,53	1217	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,15	1252	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,61	1550	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,21	1589	1589	100
2-Methyl-3-pentanol	15,52	1336	1341 ^L	95

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol	43,05	2037		99
Benzylalkohol ^b	37,27	1670	1666	100
2-Phenylethanol	38,39	1902	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,36	>2800		100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,41	1282	1280	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,28	1349		95
2-Hydroxy-3-hexanon	19,25	1418		92
4-Hydroxybenzaldehyd	68,27	>2800		100
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	49,46	2237	2249	100
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	49,92	2261	2259	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,65	1467	1466	100
2-Methylpropansäure	25,47	1602	1602	100
2-Methylbutansäure	29,65	1666	1666	100
Butansäure	28,04	1630	1629	100
Phenylelessigsäure	58,64	2547	2569 ^L	95
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,53	1558	1558	100
2-Ethylphenylacetat	33,73	1773	1781 ^L	95
Lactone:				
γ-Decalacton	46,04	2178	2178	100
Pantolacton	42,49	2071	2071	100

Torulaspota delbrueckii**Tab. 6-28** Identifizierte Inhaltstoffe des Kulturextraktes von *Torulaspota delbrueckii*, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Methyl-1-propanol	6,37	1106	1091	100
1-Propanol-3-ethoxy	17,57	1377	1361	97
1-Butanol	8,16	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,61	1218	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,09	1252	1252	100
3-Methyl-2-buten-1-ol	15,55	1333	1325	100
2,3-Butandiol cis	24,76	1554	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,25	1590	1589	100
4-Octanol	19,61	1426		89
1-Dodecanol	40,77	1969	1972	100
2-Phenylethanol	38,48	1904	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,92	>2800		100
3,7-Dimethyl-6-Octen-1-ol (β-Citronellol)	33,57	1768	1768	100
Geraniol ^b	36,54	1849	1824 ^L	100
Benzylalkohol ^b	37,27	1870	1873 ^L	100
2-Furanmethanol ^b	29,38	1659	1656	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,40	1278	1280	100
Benzaldehyd ^b	23,05	1511	1511	100
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	49,61	2241	2249	100
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	50,08	2257	2259	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,40	1352		93
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,23	1439	1449	100
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,67	1664	1666	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Carbonsäuren				
3-Ethylbutansäure	33,12	1756		86
Propansäure	24,31	1543	1545	100
Butansäure	27,95	1627	1629	100
Hexansäure	36,29	1842	1846	100
Dodecansäure	56,76	2486	2485	100
Phenylelessigsäure	58,53	2545	2569 ^L	95
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,48	1520	1521	100
2-Ethylphenylacetat	33,74	1773	1781 ^L	95
Thioverbindungen:				
3-Methylthiobutanol	34,98	1808		98
Lactone:				
	43,32			
γ-Decalacton	45,92	2125	2127	100
Pantolacton	42,46	2019	2022	100
Sonstige:				
N-Ethylacetamid,	28,68	1643		100

Zygosaccharomyces bailii

Tab. 6-29 Identifizierte Inhaltstoffe des Kulturextraktes von *Zygosaccharomyces bailii*, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Methyl-1-propanol	6,40	1107	1091	100
2-Propanol-1-ethoxy	8,83	1166		96
1-Butanol	8,16	1155	1146	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
2-Methyl-1-butanol	10,62	1218	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,14	1253	1252	100
3-Methyl-2-buten-1-ol	15,40	1330	1325	100
2,3-Butandiol cis	24,86	1557	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,40	1594	1589	100
2-Methyl-1-pentanol	14,45	1308	1341	83
2,2-Dimethyl-3-pentanol	18,69	1404		88
5-Nonanol	21,25	1462	1478	95
2-Phenylethanol	38,67	1910	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,96	>2800		100
Benzylalkohol ^b	37,27	1870	1873	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,56	1286	1280	100
2-Hydroxy-3-pentanon	15,60	1334		92
2-Hydroxy-3-hexanon	19,42	1422		92
Benzaldehyd ^b	23,05	1510	1511	100
4-Hydroxybenzaldehyd	68,85	>2800		100
2-Nonanon	17,82	1384	1387	100
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	49,36	2234	2249	100
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	49,67	2243	2259	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,67	1450	1449	100
Propansäure	24,38	1545	1545	100
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569	100
Butansäure	27,95	1629	1629	100
2-Methylbutansäure	29,56	1664	1666	100
2-Methylpentansäure	33,44	1764		92
Hexansäure ^b	36,29	1843	1846	100
Dodecansäure	56,76	2486	2485	100
Phenylessigsäure	58,54	2546	2569 ^L	95
Benzoessäure	55,05	2426	2426	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,53	1521	1521	100
Butandisäurediethylether	53,81	2383		80
Lactone:				
γ-Butyrolacton	27,21	1612	1612	100
γ-Decalacton	45,98	2127	2127	100
Pantolacton ^b	42,46	2022	2022	100
Sonstige:				
2,3-Dimethylphenylisocyanat	63,85	>2800		85

Zygosaccharomyces bisporus

Tab. 6-30 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Zygosaccharomyces bisporus*, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
2-Butoxyethanol	18,50	1400		92
2-Methyl-1-propanol	6,39	1107	1091	100
1-Butanol	8,16	1155	1146	100
2-Methyl-1-butanol	10,83	1218	1213	100
2,3-Butandiol cis	25,40	1570	1552	100
2,3-Butandiol trans	26,38	1593	1589	100
2-Phenylethanol	38,77	1904	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	71,02	>2800		81
Benzylalkohol ^b	37,27	1868	1873	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,38	1278	1280	100
2-Hydroxy-2-hexanon	19,40	1421		92

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Forts. Aldehyde und Ketone				
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	50,14	2258	2259	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,67	1450	1449	100
2-Methylpropansäure	25,40	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,64	1664	1666	100
Hexansäure ^b	36,29	1887	1866	100
Phenyllessigsäure	58,53	2545	2569 ^L	95
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,55	1523	1519	100
Butandisäurediethylester	53,78	2382		80
Thioverbindungen:				
3-(Methylthio)-1-propanol	31,43	1714	1753 ^L	97
Lactone:				
γ-Butyrolacton	27,29	1614	1612	100
γ-Decalacton	45,97	2127	2127	100
Pantolacton ^b	42,47	2019	2022	100

Zygosaccharomyces rouxii

Tab. 6-31 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Zygosaccharomyces rouxii*, RM 2 (Ethanol, Glutamin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
Alkohole:				
1-Ethoxy-2-propanol	8,72	1168		96
2-Methyl-1-propanol	6,40	1107	1091	100
2-Methyl-1-butanol	10,61	1219	1213	100
3-Methyl-3-buten-1-ol	12,01	1251	1252	100
2,3-Butandiol cis	24,69	1552	1552	100

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit o. best.	Fit [%]
2,3-Butandiol trans	26,41	1594	1589	100
1-Phenylethanol (int Std.)	34,88	1808	1808	100
2-Phenylethanol	38,43	1903	1903	100
2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol	70,73	>2800		81
Benzylalkohol ^b	37,27	1869	1873	100
Aldehyde und Ketone:				
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	13,23	1277	1280	100
Benzaldehyd ^b	23,05	1510	1511	100
2-Nonanon	17,92	1386	1387	100
Carbonsäuren:				
Ethansäure, Essigsäure	20,67	1450	1449	100
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569	100
2-Methylbutansäure	29,56	1664	1666	100
Propansäure	24,38	1545	1551	100
Butansäure	28,08	1630	1629	100
Phenylelessigsäure	58,54	2546	2569 ^L	95
Ester:				
3-Hydroxybutansäureethylester	23,38	1519	1521	100
Lactone:				
γ-Decalacton	45,98	2127	2127	100
Pantolacton ^b	42,46	2022	2021	100
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	55,9	2457	2454	100

6.4 Übersicht über die aus RM 6 isolierten Substanzen

Candida etchelsii

Tab. 6-32 Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Candida etchelsii*, RM 6 (Ethanol, Phenylalanin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit. o. best.	c [µg L ⁻¹]	Fit [%]
Alkohole:					
1-Ethoxy-2-propanol	7,93	1173		21	97
1-Butanol	7,45	1163	1146	5	100
2-Methyl-1-butanol	10,45	1215	1213	263	100
2-Furanmethanol	29,22	1655	1656	7	100
Benzylalkohol	37,10	1864	1869	221	100
1-Phenylethanol (int Std.)	34,84	1804	1808		100
2-Phenylethanol	38,55	1906	1903		100
Aldehyde und Ketone:					
2-Hydroxy-3-butanon, (Acetoin)	12,67	1288	1280	253	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,01	1343	1323 ^L		95
2-Nonanon	17,56	1377	1386		100
Benzaldehyd	22,80	1503	1505	56	100
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	49,47	2237	2249	17	100
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	49,94	2253	2259	1191	100
Carbonsäuren:					
Phenyllessigsäure	59,35	2560	2569	13	100
α-Hydroxyphenylpropansäure	57,80	2523		17	87
Ester:					
3-Hydroxybutansäureethylester	22,95	1508			94
Phenyllessigsäureethylester	33,5	1767	1781	9	95
Lactone:					
γ-Decalacton	45,75	2120	2127		100

Torulaspora delbrueckii**Tab. 6-33** Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Torulaspora delbrueckii*, RM 6 (Ethanol, Phenylalanin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit. o. best.	c [µg L ⁻¹]	Fit [%]
Alkohole:					
1-Ehoxy-2-propanol	8,75	1169		39	97
2-Methyl-1-propanol	6,35	1108	1091	181	100
1-Butanol	8,35	1160	1146	71	100
1-Pentanol	12,35	1264	1277		100
2-Methyl-1-butanol	10,63	1219	1209	675	100
1-Phenylethanol (int Std.)	34,90	1806	1808		100
2-Phenylethanol	38,67	1910	1903	1729	100
Benzylalkohol	37,10	1864	1869	13	100
2-Furanmethanol	29,22	1655	1656	14	100
Aldehyde und Ketone:					
2-Hydroxy-3-butanon, (Acetoin)	13,25	1277	1280	882	100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,41	1352	1323 ^L		95
Benzaldehyd	22,98	1508	1505	4	100
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	49,47	2237	2249	31	100
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	49,94	2253	2259	35	100
Carbonsäuren:					
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569	20	100
2-Methylbutansäure	29,66	1666	1666	15	100
Phenylelessigsäure	59,35	2560	2569 ^L	8	97
Lactone:					
γ-Decalacton	45,75	2121	2127	7	100

Zygosaccharomyces bisporus**Tab. 6-34** Identifizierte Inhaltsstoffe des Kulturextraktes von *Zygosaccharomyces bisporus*, RM 6 (Ethanol, Phenylalanin, pH = 3,4)

Identifizierte Verbindungen	R _t [min]	KI	KI Lit. o. best.	c [µg L ⁻¹]	Fit [%]
Alkohole:					
1-Ethoxy-2-propanol	8,75	1169			97
2-Methyl-1-propanol	6,35	1108	1091	183	100
1-Butanol	8,35	1160	1146	3	100
1-Pentanol	12,35	1264	1277		100
2-Methyl-1-butanol	10,63	1219	1209	440	100
Benzylalkohol	37,10	1864	1869	38	100
2-Furanmethanol	29,22	1655	1656		100
1-Phenylethanol (int Std.)	34,90	1806	1808	68	100
2-Phenylethanol	38,67	1910	1903	>10 mg	100
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol	70,78	>2800		60	100
Aldehyde und Ketone:					
2-Hydroxy-3-butanon, (Acetoin)	13,25	1277	1280		100
2-Hydroxy-3-pentanon	16,41	1352	1323 ^L		95
Benzaldehyd	22,98	1508	1505		100
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	49,47	2237	2249	7	100
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	49,94	2253	2259	1343	100
Carbonsäuren:					
2-Methylpropansäure	25,59	1564	1569		100
2-Methylbutansäure	29,66	1666	1666		100
Phenylelessigsäure	59,35	2560	2569 ^L		97
Ester:					
3-Hydroxybutansäureethylester	23,35	1518			94
Phenylelessigsäureethylester	34,69	1799	1781 ^L	9	95
Lactone:					
γ-Decalacton	45,75	2121	2127	2	100

Lebenslauf

Ulla Richter, geboren am 9. Januar 1968 in Berlin-Wilmersdorf

Schulische Ausbildung:

September 1974 - August 1978	Besuch der Volksschule Johannesburg
September 1978 - Juli 1987	Besuch des Kronberg-Gymnasiums Aschaffenburg mit Abschluß Abitur

Akademische Ausbildung:

April 1988	Beginn des Studium der Lebensmittelchemie an der Johann-Wolfgang-v.-Goethe-Universität Frankfurt
04. April 1991	Vordiplom an der Johann-Wolfgang-v.-Goethe- Universität Frankfurt
16. April 1993	1. Staatsexamen an der Johann-Wolfgang-v.- Goethe-Universität Frankfurt
26. Mai 1994	2. Staatsexamen an der Johann-Wolfgang-v.- Goethe-Universität Frankfurt
01. Oktober 1994	Beginn der Promotion im Fachbereich Lebensmittelchemie an der Universität Hannover