

**Biotechnologie von Aromastoffen:
Transformation von α -Pinen mit *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671
und Trennverfahren mit Zeolithen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin

Elke Latza

geboren am 26. März 1969 in Heidelberg

Hannover 1999

Referent:	Prof. Dr. R. G. Berger
Korreferent:	Prof. Dr. P. Winterhalter
Tag der Promotion:	28. Juni 1999
Datum der Veröffentlichung:	Juli 1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1996 bis April 1999 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. G. Berger angefertigt.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. R. G. Berger für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit sowie für zahlreiche anregende wissenschaftliche Diskussionen. Besonders hervorheben möchte ich zudem die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut sowie den mir zur Bearbeitung der Aufgaben gewährten Freiraum.

Herrn Dr. Jens Onken danke ich für zahlreiche praktische Hilfestellungen im Umgang mit Gaschromatographen und Mikroorganismen sowie für die gute Kooperation im Rahmen des EU-Projekts.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie, insbesondere meinen beiden Labornachbarinnen Frau Dr. Ulla Richter und Frau Frauke Neuser möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, intensive Diskussionen, die Durchführung unzähliger Sniffing-Sitzungen sowie für viele gemeinsame fröhliche Abende danken.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön geht an Frau Sandra Pilawa von der GBF, Braunschweig für ihre schnelle und unkomplizierte Unterstützung zur Messung der NMR-Spektren.

Frau Prof. Dr. Treffenfeldt, Frau Dr. Andrea Preuß und Frau Dr. Helga Vollmer von der Degussa-Hüls AG gilt mein Dank für gewährte finanzielle Unterstützung, die Bereitstellung der Zeolithe sowie für hilfreiche praktische Tips.

Für die Durchführung der Molecular-Modelling-Berechnungen danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Behrens, Herrn Dr. Andreas Schneider und Herrn Ralph Jäger vom Institut für Anorganische Chemie der Universität Hannover.

Ein besonders liebevolles Dankeschön geht an meinen Mann Stefan, der mit seiner Geduld und seinem Verständnis, dem seelischen und geistigen Beistand und - nicht zu vergessen - der Messung der Partikelgrößen ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Zusammenfassung

Die biotechnologische Gewinnung von terpenoiden Aromastoffen wurde anhand der Transformation von α -Pinenoxid mit ruhenden Zellen von *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 untersucht. α -Pinenoxid unterlag zunächst dem zweifachen Ringbruch des Pinangerüsts, der durch eine α -Pinenoxid Lyase mit hoher Aktivität katalysiert wurde. Das Produkt war (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadienal (Isonovalal). Isonovalal wurde zur (*E*)-Verbindung isomerisiert und anschließend zur (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadiensäure (Novalsäure) oxidiert. Bei Sauerstoffmangel erfolgte eine teilweise Reduktion der Aldehyde zu den korrespondierenden Alkoholen. Novalsäure wurde über die Zwischenprodukte (*5S,2E*)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure, (*S*)-3,4-Dimethylpentensäure und 2-Methylpropansäure vollständig abgebaut.

Die Isolierung und Identifizierung der Intermediate aus dem α -Pinenkatabolismus ergab neben den bereits bekannten Zwischenprodukten zwei bislang unbekannte Naturstoffe: (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadienol (Isonovalol) und (*5S,2E*)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure.

Die isolierten Intermediate sowie synthetisch hergestellte Ester der Novalsäure und Acylderivate des Novalols wurden auf ihre Geruchsaktivität untersucht. Es dominierten citrus-blumige Noten. Die niedrigsten Schwellenwerte besaßen die Zitrus-Duftstoffe Isonovalal und Novalol.

Die Gewinnung von Isonovalal konnte durch kontinuierliche Dosierung von α -Pinenoxid auf bis zu 48 g L^{-1} bei einer Ausbeute von 63 % gesteigert werden. Durch *in situ* Adsorption an Lewatit OC 1064 wurden etwas höhere Aldehydausbeuten (66 %) erreicht, jedoch nahm auch das Ausmaß der (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung zum wenig geruchsaktiven Novalal zu. Die Bildung von Novalol aus α -Pinenoxid betrug unter Sauerstofflimitierung maximal $1,2 \text{ g L}^{-1}$ bei 32 % Ausbeute.

Die Adsorption von Aromastoffen an hydrophobe Zeolithe der DAY- und der ZSM-5-Reihe wurde aus wässrigen Lösungen untersucht. Während DAY eine allgemein hohe Affinität zu allen weitgehend unpolaren Aromastoffen einer Modellösung aufwies, zeigte ZSM-5 einen deutlichen Molekularsiebeffekt, der von der Polarität von Zeolith und Adsorptiv abhing und sich insbesondere für Moleküle mit mehrfach substituierter, zyklischer Struktur auswirkte. Zudem wurde für ZSM-5 mit fallendem Modul (Hydrophobizität) eine außergewöhnlich hohe Affinität zu kleinen polaren Heterozyklen (2-Methoxypyrazin) festgestellt. Eine Desorption der Zielkomponenten war mit Lösungsmitteln (z. B. Methanol) möglich.

Detailliertere Untersuchungen wurden mit einzelnen Terpenen und Terpenoiden sowie mit konstitutionsisomeren Methylbutansäuremethylestern an ZSM-5 Pulvern durchgeführt. Der Molekularsiebeffekt zeigte sich in den thermodynamischen und kinetischen Aspekten der Adsorptionsprozesse. Die erzielbaren Maximalbeladungen und Diffusionskoeffizienten fielen deutlich mit zunehmender Verzweigung bei acyclischen Verbindungen, mit zusätzlichen ortho- und meta-Substituenten bei cyclischen Molekülen sowie mit steigendem Modul des Zeolithen. Beladungen über etwa 100 mg g^{-1} wurden nicht erreicht. Die beobachteten Effekte konnten für (*S*)-(+)-Carvon und (*R*)-(+)-Limonen durch Molecular Modelling zum Teil nachvollzogen werden.

Aus den ermittelten Adsorptionseigenschaften an ZSM-5 wurden verschiedene potentielle Anwendungen abgeleitet und experimentell überprüft. Es gelang, die Fraktionierung von komplexen Aromastoffgemischen (z. B. etherische Öle) hinsichtlich der Molekülgestalt. Weiterhin war eine Trennung von binären Stoffpaaren, z. B. (*S*)-(+)-Carvon und (*R*)-(+)-Limonen an ZSM-5 1000, im Hinblick auf die Aufarbeitung von Biotransformationsmedien möglich. Als Alternative zu aufwendigen Destillationsverfahren wurde zudem die Trennung von 2- und 3-Methylbutansäuremethylester an ZSM-5 150 demonstriert.

Schlagworte: *Biotransformation, Pseudomonas, Terpene, Adsorption, Zeolith ZSM-5*

Summary

The biotechnological production of terpenoid aroma substances was investigated using resting cells of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 for the biotransformation of α -pinene epoxide. The first step of α -pinene epoxide conversion was the double ring cleavage of the pinan skeleton, which was catalysed by an α -pinene oxide lyase with high activity. The product was (*Z*)-2-methyl-5-isopropyl-2,5-hexadienal (isonovalal). Isonovalal was transferred into its (*E*)-isomer and subsequently oxidised to (*E*)-2-methyl-5-isopropyl-2,5-hexadienoic acid (novalic acid). Under oxygen limitation the aldehydes were partly reduced to their corresponding alcohols. (*5S,2E*)-2,5,6-trimethyl-2-heptenoic acid, (*S*)-3,4-dimethylpentanoic acid and 2-methylpropanoic acid were identified as intermediates of the complete degradation of novalic acid.

In addition to the known intermediates of α -pinene catabolism two new natural substances were isolated and identified: (*Z*)-2-methyl-5-isopropyl-2,5-hexadienol (isonovalol) and (*5S,2E*)-2,5,6-trimethyl-2-heptenoic acid.

The organoleptic properties of the isolated intermediates, synthetically produced esters of novalic acid and acylated novalol derivatives were investigated. Citrus-floral notes were dominating. Isonovalal and novalol which both possess a citrus-like flavour proved to have the lowest odour thresholds.

The production of isonovalal was increased to a maximum concentration of 48 g L⁻¹ (63 % yield) by continuous addition of α -pinene epoxide. A further improvement of the aldehyde yield to 66 % was achieved by *in situ* adsorption with Lewatit OC 1064. However, the extent of (*Z*)-(*E*)-isomerization to the sensorically less potent aldehyde novalal decreased also. For the bioconversion of α -pinene epoxide to novalol a maximum product concentration of 1,2 g L⁻¹ (32 % yield) was reached under oxygen limitation.

The adsorption of aroma compounds to hydrophobic zeolites DAY and ZSM-5 from aqueous solution was investigated. Adsorption on DAY showed generally high affinity to hydrophobic aroma compounds of a model solution. The molecular

sieving properties of ZSM-5 could clearly be seen especially for molecules with multiple substituted cyclic structure. They were influenced by the hydrophobic properties of zeolite and guest molecule. Additionally, a remarkably high affinity to small hydrophilic heterocyclic compounds (2-methoxypyrazine) was discovered with decreasing hydrophobic properties of ZSM-5. The target compounds could be desorbed with solvents (e. g. methanol).

Adsorption on ZSM-5 powder was investigated in more detail using single solutions of terpenes and terpenoids and of isomeric 2- and 3-methylbutanoic acid methyl-esters. The molecular sieving effect was demonstrated by the thermodynamic and kinetic adsorption properties. The maximum adsorption capacities and diffusion coefficients were decreasing with an increasing number of skeleton branches of acyclic molecules, with additional ortho- and meta-substitutes of cyclic molecules and with decreasing hydrophobic properties of the zeolite. Capacities of more than approximately 100 mg g^{-1} were not reached. Molecular modelling calculations confirmed some of the observed effects of (*S*)-(+)-carvone and (*R*)-(+)-limonene adsorption.

The established adsorption properties of ZSM-5 led to several potential uses in flavour separation, which were experimentally examined. Complex aroma mixtures (e. g. essential oils) could be fractionated by molecular shape. Binary systems such as (*S*)-(+)-carvone and (*R*)-(+)-limonene were representing ideal biotransformation media. Their separation was possible on zeolite ZSM-5 1000. Separating 2- and 3-methylbutanoic acid methylester on ZSM-5 150 could be an alternative to costly distillation processes.

Keywords: *biotransformation, Pseudomonas, terpenes, adsorption, zeolite ZSM-5*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Ergebnisse	5
2.1	Biotransformation mit <i>P. fluorescens</i> NCIMB 11671	5
2.1.1	Isolierung der Produkte aus der Transformation von (-)- α -Pinenoxid	5
2.1.1.1	Produktspektrum	5
2.1.1.1.1	Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid unter Sauerstofflimitierung	5
2.1.1.1.2	Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid in drei Transformationszyklen	6
2.1.1.1.3	Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid zur Säurebildung	7
2.1.1.2	Produktisolierung	9
2.1.2	Identifizierung der Produkte aus der (-)- α -Pinenoxid-Transformation und ihrer Derivate	12
2.1.2.1	NMR-Spektren	13
2.1.2.1.1	Novalol und Isonovalol	13
2.1.2.1.2	Novalsäure	15
2.1.2.1.3	Methylester	17
2.1.2.2	Massenspektren	20
2.1.2.2.1	Aldehyde	20
2.1.2.2.2	Alkohole	22
2.1.2.2.3	Säuren und Ester	25
2.1.2.2.4	Weitere Produkte	31
2.1.2.3	Kovats-Indices	32
2.1.2.4	UV-Spektren	32
2.1.2.5	Infrarot-Spektren	35
2.1.2.5.1	Novalol und Isonovalol	35
2.1.2.5.2	Novalsäure und Isonovalsäure	37
2.1.2.6	Polarimetrie und chirale Analyse	38
2.1.2.7	Teilzusammenfassung	39

2.1.3	Stabilität von Isonovalal	40
2.1.3.1	pH-Stabilität	41
2.1.3.2	Stabilität in Anwesenheit von Glycin	42
2.1.3.3	Stabilität in Transformationsmedien	44
2.1.3.3.1	Stabilität in autoklavierter Bakteriensuspension	44
2.1.3.3.2	Stabilität in zellfreiem Medium	45
2.1.3.4	Teilzusammenfassung	46
2.1.4	Kinetik der Produktbildung	47
2.1.4.1	Blindwert mit (-)- α -Pinenoxid	47
2.1.4.2	Kinetik der Transformation von (-)- α -Pinenoxid	48
2.1.4.2.1	Bildung neutraler Produkte aus (-)- α -Pinenoxid	48
2.1.4.2.2	Bildung saurer Produkte aus (-)- α -Pinenoxid	50
2.1.4.3	Kinetik der Transformation von Isonovalal	51
2.1.4.4	Kinetik der Transformation von Novalal und Novalol	52
2.1.4.5	Kinetik der Transformation von Novalal und Novalsäure mit NADH	53
2.1.4.6	Teilzusammenfassung	55
2.1.5	Versuche zur Optimierung der Produktbildung	56
2.1.5.1	Produktion von Isonovalal bei kontinuierlicher Substratdosierung	56
2.1.5.1.1	Einsatz von frischen Zellen	56
2.1.5.1.2	Einsatz von aufgetauten Zellen	58
2.1.5.1.3	Einsatz eines Zweiphasensystems mit Lewatit OC 1064	59
2.1.5.2	Produktion von Novalol	61
2.1.5.3	Teilzusammenfassung	62
2.1.6	Sensorische Eigenschaften der Produktisolate und ihrer Derivate	62
2.1.6.1	Geruchsqualität	63
2.1.6.2	Geruchsschwellen	64
2.2	Adsorption an Zeolithe	65
2.2.1	Partikelgrößen der Zeolith-Pulver	65

2.2.2	Überprüfung der Adsorptionseigenschaften der Zeolithe anhand einer Aromamodellösung	67
2.2.2.1	Adsorption an DAY-Pulver	69
2.2.2.2	Adsorption an ZSM-5-Pulver	70
2.2.2.3	Einfluß von Bindemitteln	72
2.2.2.4	Desorption und Wiederbeladung	74
2.2.2.5	Teilzusammenfassung	76
2.2.3	Adsorption von Monoterpenen und Estern aus wäßriger Lösung an ZSM-5	77
2.2.3.1	Isothermen an ZSM-5	78
2.2.3.1.1	Langmuir-Isothermen	78
2.2.3.1.2	Freundlich Isothermen	86
2.2.3.2	Adsorptionskinetik und Diffusionskoeffizienten in ZSM-5	88
2.2.3.2.1	Abhängigkeit von der Beladung	89
2.2.3.2.2	Abhängigkeit von der Struktur des Adsorptivs	91
2.2.3.2.3	Abhängigkeit vom Modul des Zeolithen	94
2.2.3.3	Teilzusammenfassung	95
2.2.4	Fraktionierung von etherischen Ölen	96
2.2.4.1	Spike-Lavendelöl	96
2.2.4.2	Orangenöl	98
3	Diskussion	100
3.1	Bedeutung und Vorkommen acyclischer Monoterpene	100
3.1.1	Bedeutung von Monoterpenen	100
3.1.2	Biosynthese von Monoterpenen	101
3.1.3	Vorkommen und Biosynthese von irregulären acyclischen Monoterpenen	103
3.2	Biotransformation von α-Pinen	107
3.2.1	Strategien des α -Pinen-Stoffwechsels bei Mikroorganismen	107
3.2.2	Einordnung und Bedeutung von Pseudomonaden	111

3.2.3	(-)- α -Pinen-Katabolismus bei <i>P. fluorescens</i> NCIMB 11671	113
3.2.4	Schritte im (-)- α -Pinen-Katabolismus bei <i>P. fluorescens</i> NCIMB 11671	114
3.2.4.1	Monooxygenase-vermittelte Oxidation von (-)- α -Pinen	114
3.2.4.2	Ringbruch des Pinangerüsts durch α -Pinenoxid Lyase	115
3.2.4.3	(Z)-(E)-Isomerisierung	118
3.2.4.4	Dehydrogenase-vermittelte Oxidation und Reduktionen	119
3.2.4.4.1	Aldehyd-Dehydrogenase	119
3.2.4.4.2	Alkohol-Dehydrogenase	120
3.2.4.4.3	Weitere Dehydrogenasen	121
3.2.4.5	β -Oxidation	123
3.2.4.5.1	β -Oxidation der (5S,2E)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure	124
3.2.4.5.2	β -Oxidation der (S)-(-)-3,4-Dimethylpentensäure	125
3.2.4.6	Bildung von weiteren Produkten	127
3.2.4.6.1	(+)- β -Thujon	127
3.2.4.6.2	Biotenside	128
3.3	Sensorische Eigenschaften der Produkte	130
3.3.1	Bedeutung acyclischer Monoterpene als Aromastoffe	130
3.3.2	Aromaeigenschaften acyclischer Monoterpene	132
3.3.2.1	Geruchsqualität	132
3.3.2.2	Geruchsschwellen	133
3.4	Optimierung der Produktbildung	135
3.4.1	Problematik von Terpententransformationen mit Bakterien	135
3.4.1.1	Löslichkeit der Terpenoide	135
3.4.1.2	Toxizität von Terpenoiden	136
3.4.1.3	Mikrobieller Produktabbau	138
3.4.1.4	Chemische Nebenreaktionen im Transformationsmedium	138
3.4.2	Optimierungsansätze für die Produktion von Isonovalal	139
3.4.3	Optimierungsansätze für die Produktion von Novalol	142

3.5	Zur <i>in situ</i> Adsorption: Struktur von Zeolithen	144
3.5.1	Faujasit-Gerüst	145
3.5.2	MFI-Gerüst	146
3.6	Herstellung und katalytische Eigenschaften der Zeolithe	146
3.6.1	Hydrothermalsynthese	146
3.6.2	Dealuminierung von Zeolithen	146
3.6.3	Katalytische Eigenschaften	147
3.7	Eignung und Bedeutung von Zeolithen als Adsorbentien	148
3.7.1	Eignung von Zeolithen als Adsorbentien	148
3.7.1.1	Molekularsiebeffekt	148
3.7.1.2	Adsorptive Wechselwirkungen	150
3.7.2	Anwendungen von Zeolithen in Adsorptionsprozessen aus flüssigen Phasen	151
3.7.2.1	Adsorption aus organischen Lösungen	151
3.7.2.2	Adsorption aus wäßrigen Lösungen	152
3.7.2.2.1	Ionenaustauschprozesse	152
3.7.2.2.2	Adsorption organischer Verbindungen	152
3.8	Trennung von Aromastoffen aus wäßriger Lösung an Zeolith ZSM-5	155
3.8.1	Thermodynamische Adsorptionseigenschaften	155
3.8.1.1	Molekülgröße und Maximalbeladung	155
3.8.1.2	Affinität	159
3.8.1.3	Co-Adsorptionsprozesse	162
3.8.2	Adsorptionskinetik	165
3.8.2.1	Transport in die Zeolithporen	166
3.8.2.2	Porendiffusion	169
3.8.2.2.1	Einfluß der Struktur des Adsorptivs	169
3.8.2.2.2	Einfluß des Moduls des Zeoliths	173
3.8.2.2.3	Synergistische Effekte	174

3.9 Gewinnung von Aromastoffen aus wäßriger Lösung mit Zeolith ZSM-5	175
3.9.1 Konventionelle Trennmethoden	175
3.9.1.1 Kristallisation	176
3.9.1.2 Destillative Verfahren	176
3.9.1.3 Zweiphasensysteme	176
3.9.2 Anforderungen an das Adsorbens	177
3.9.2.1 Abtrennung des Adsorbens	177
3.9.2.1.1 Festbettadsorber	178
3.9.2.1.2 Batch-Adsorption	180
3.9.2.1.3 Membranverfahren	181
3.9.1.2 Desorption und Wiederbeladung	182
3.9.2.3 Haltbarkeit und Regeneration	183
3.9.3 Trennung von Aromastoffgemischen mit Zeolith ZSM-5	184
3.9.3.1 Trennung von binären Gemischen mit ZSM-5	184
3.9.3.2 Fraktionierung von komplexen Gemischen mit ZSM-5	187
3.9.3.3 Gewinnung hydrophiler Aromastoffe	189
3.10 Ausblick	189
4 Material und Methoden	192
4.1 Material	192
4.1.1 Mikroorganismus	192
4.1.2 Etherische Öle	192
4.1.3 Chemikalien	193
4.1.3.1 Bestandteile der Kulturmedien	193
4.1.3.2 Substrate und Standards	194
4.1.3.3 Chemikalien für Synthesen und Derivatisierungen	195
4.1.3.4 Weitere Chemikalien	195

4.1.4	Lösungsmittel	196
4.1.5	Gase für die Gaschromatographie	196
4.1.6	Adsorbentien und Ionenaustauscher	197
4.1.6.1	Zeolithe	197
4.1.6.2	Weitere Adsorbentien und Ionenaustauscher	198
4.1.7	Weitere Hilfsmittel	198
4.1.8	Geräte	199
4.1	Methoden	200
4.2.1	Adsorption mit Zeolithen	200
4.2.1.1	Bestimmung der Partikelgrößen der Zeolithe	200
4.2.1.2	Vorbehandlung der Adsorbentien	200
4.2.1.2.1	Zeolithe	200
4.2.1.2.2	Polystyrenharze	200
4.2.1.3	Herstellung von Standardlösungen	201
4.2.1.4	Screening	201
4.2.1.5	Fraktionierung von etherischen Ölen	202
4.2.1.5.1	Fraktionierung von Spike-Lavendelöl	202
4.2.1.5.2	Fraktionierung von Orangenöl	203
4.2.1.6	Gleichgewichtsbeladung und Isothermen	203
4.2.1.6.1	Allgemeine Vorgehensweise	203
4.2.1.6.2	Berechnung der Isothermenparameter nach Langmuir und Freundlich	204
4.2.1.7	Adsorptionskinetik	205
4.2.1.7.1	Allgemeine Vorgehensweise	205
4.2.1.7.2	Berechnung der Diffusionskoeffizienten	205
4.2.1.8	Desorption	206
4.2.1.9	Festphasenmikroextraktion (SPME)	207
4.2.2	Kultivierung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB 11671	208
4.2.2.1	Stammhaltung	208
4.2.2.2	Kulturmedium	208
4.2.1.2.1	Zusammensetzung des Kulturmediums	208
4.2.2.2.2	Herstellung steriler Kulturmedien	209

4.2.2.2	Transformationsmedium	209
4.2.2.3	Anzucht von Biomasse in Minimalmedium	210
4.2.3	Biotransformation mit ruhenden Zellen	211
4.2.3.1	Isolierung und Identifizierung der Transformationsprodukte aus (-)- α -Pinenoxid	211
4.2.3.1.1	Transformation unter Sauerstoff-Limitierung	211
4.2.3.1.2	Mehrfache Transformation ohne Sauerstofflimitierung	211
4.2.3.1.3	Produktisolierung für die Gaschromatographie	212
4.2.3.1.4	Aufreinigung der Produkte	212
4.2.3.1.5	Probenvorbereitung für die HPLC	213
4.2.3.2	Kinetik der Produktbildung	213
4.2.3.2.1	Transformationskinetik bei einmaliger Substratzugabe	213
4.2.3.2.2	Transformationskinetik bei semi-kontinuierlicher Substratdosierung	214
4.2.3.2.3	Transformationskinetik im zwei-Phasen-System mit Lewatit OC 1064	215
4.2.3.2.4	Probenvorbereitung für die Gaschromatographie (Mikroextraktion)	216
4.2.3.3	Stabilität und Blindwerte	216
4.2.4	Berechnung von Kovats-Indices	217
4.2.5	Synthesen und Derivatisierungen	218
4.2.5.1	Reduktion von Isonovalal und Novalal zu den Alkoholen	218
4.2.5.2	Acylierung von Novalol	219
4.2.5.3	Methylierung der Säuren mit Diazomethan	219
4.2.5.4	Veresterung und Umesterung	220
4.2.6	Ermittlung von Geruchsschwellenwerten	220
4.2.7	Chromatographie	221
4.2.7.1	Säulenchromatographie	221
4.2.7.1.1	Fraktionierung von Terpenen an Kieselgel	221
4.2.7.1.2	Argentationschromatographie	221
4.2.7.2	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	222
4.2.7.3	Kapillargaschromatographie	222
4.2.7.3.1	Gaschromatographie mit Split-Splitless-Injektion und Flammenionisationsdetektor	222
4.2.7.3.2	Gaschromatographie mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektor	223
4.2.7.3.3	Gaschromatographie mit olfaktorischer Detektion	223
4.2.7.3.4	Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor	224

4.2.7.3.5	Gaschromatographie zur Enantiomerentrennung	224
4.2.7.3.6	Präparative Gaschromatographie	225
4.2.8	Spektroskopische Methoden	226
4.2.8.1	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	226
4.2.8.2	Infrarot-Spektroskopie (IR)	226
4.2.8.3	UV/VIS-Spektroskopie	226
4.2.9	Polarimetrie	227
5	Literatur	228
6	Anhang	243

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1	Produktbildung aus (-)- α -Pinenoxid unter Sauerstofflimitierung	6
Abb. 2-2	Bildung neutraler Produkte aus der Umsetzung von jeweils 1,2 g L ⁻¹ (-)- α -Pinenoxid in drei aufeinanderfolgenden Transformationszyklen (20 min)	7
Abb. 2-3	Säurebildung aus 1,2 g L ⁻¹ (-)- α -Pinenoxid nach vier Stunden	8
Abb. 2-4	Allgemeines Arbeitsschema zur Produktisolierung	10
Abb. 2-5	Chemische Verschiebungen (¹³ C-NMR) bei Novalol und 2,6-Dimethyl-octa-2,7-dienol	13
Abb. 2-6	MS-Spektrum von (<i>E</i>)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienal (Novalal)	20
Abb. 2-7	MS-Spektrum von (<i>Z</i>)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienal (Isonovalal)	21
Abb. 2-8	MS-Spektrum von (<i>Z</i>)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienol (Isonovalol)	23
Abb. 2-9	MS-Spektrum von (<i>E</i>)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienol (Novalol)	23
Abb. 2-10	Mögliche McLafferty-Umlagerungen bei einfach ungesättigten 2,5,6-Trimethyl-heptansäuremethylestern	24
Abb. 2-11	Vorschlag für die Bildung des Fragments <i>m/z</i> 136 durch Protonenshifts bei acylierten Novalolen	31
Abb. 2-12	IR-Spektrum von (<i>E</i>)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienol (Novalol) als KBr-Preßling	36
Abb. 2-13	IR-Spektrum von (<i>Z</i>)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienol (Isonovalol) als KBr-Preßling	36
Abb. 2-14	Stereochemie der Abbauprodukte der Novalsäure	38
Abb. 2-15	Mesomere Grenzstrukturen für die deprotonierte Form von Isonovalal.	40
Abb. 2-16	Bildung von Novalal in einer 400 mg L ⁻¹ wäßrigen Lösung von Novalal und Isonovalal (1:20) bei verschiedenen pH-Werten	41
Abb. 2-17	Mechanismus der (<i>Z</i>)/(<i>E</i>)-Isomerisierung von Isonovalal in saurer Lösung	42
Abb. 2-18	Stabilität von Novalal und Isonovalal in einer Lösung von 0,1 mol L ⁻¹ Glycin in Transformationspuffer (pH 7,3)	43
Abb. 2-19	Vorschlag zum Mechanismus der (<i>Z</i>)/(<i>E</i>)-Isomerisierung von Isonovalal in Anwesenheit von Glycin	43

Abb. 2-20	Stabilität von Isonovalal in autoklavierter Bakteriensuspension (pH 7,1)	44
Abb. 2-21	Stabilität von Isonovalal in zellfreiem Medium.	45
Abb. 2-22	Stabilität von (-)- α -Pinenoxid in autoklavierter Bakteriensuspension von <i>P. fluorescens</i> (pH 7,1)	47
Abb. 2-23	Mechanismus der säurekatalysierten Umlagerung von (-)- α -Pinenoxid	48
Abb. 2-24	Kinetik der Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit <i>P. fluorescens</i>	49
Abb. 2-25	Kinetik der Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit <i>P. fluorescens</i> im zweiten Transformationszyklus	49
Abb. 2-26	Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit <i>P. fluorescens</i>	51
Abb. 2-27	Transformation von Isonovalal mit <i>P. fluorescens</i>	52
Abb. 2-28	Transformation von Novalal und Novalol mit <i>P. fluorescens</i>	53
Abb. 2-29	Transformation von Novalal / NADH mit <i>P. fluorescens</i>	54
Abb. 2-30	Transformation von Novalsäure / NADH mit <i>P. fluorescens</i>	54
Abb. 2-31	Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit <i>P. fluorescens</i> bei kontinuierlicher Dosierung von 6 mL h ⁻¹ L ⁻¹ in zehnminütigen Intervallen	57
Abb. 2-32	Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit <i>P. fluorescens</i> bei kontinuierlicher Dosierung von 8 mL h ⁻¹ L ⁻¹ in fünfzehnminütigen Intervallen	58
Abb. 2-33	Transformation von (-)- α -Pinenoxid zu Novalol und Novalsäure innerhalb von 24 h mit <i>P. fluorescens</i> bei verschiedenen Substratkonzentrationen	61
Abb. 2-34	Partikelgrößenverteilung der ZSM-5 Pulver	66
Abb. 2-35	Nichtaromatische, cyclische Aromastoffe aus der Aromamodellösung	71
Abb. 2-36	Desorption und Wiederbeladung an ZSM-5 150 in drei aufeinanderfolgenden Zyklen bei 30 °C. Adsorptiv: Myrcenol, Desorptionsmittel: Methanol	75
Abb. 2-37	Aromastoffe zur Untersuchung thermodynamischer und kinetischer Aspekte der Adsorption an ZSM-5	77
Abb. 2-39	Wechselwirkungsenergien von (<i>R</i>)-(+)-Limonen in einem geraden Silicalite-Kanal	81
Abb. 2-40	Wechselwirkungsenergien von (<i>S</i>)-(+)-Carvon in einem geraden Silicalite-Kanal	81
Abb. 2-41	Experimentelle Werte und berechnete Langmuir-Einzelisothermen von 2- und 3-Methylbutansäuremethylester an ZSM-5 aus 50 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7,0	84

Abb. 2-42	Experimentelle Werte und berechnete Langmuir- und Freundlich Einzelisothermen von Myrcenol an ZSM-5 aus 50 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7,0	84
Abb. 2-43	Experimentelle Werte und berechnete Langmuir-Einzelisothermen von (<i>R</i>)-(+)-Limonen und (<i>S</i>)-(+)-Carvon an ZSM-5 aus 50 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7,0	85
Abb. 2-44	Experimentelle Werte für Gemischtisothermen von (<i>R</i>)-(+)-Limonen und (<i>S</i>)-(+)-Carvon an ZSM-5 aus 50 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7,0	85
Abb. 2-45	Beladungsabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten in ZSM-5	90
Abb. 2-46	Molecular Modelling Darstellung von (<i>R</i>)-(+)-Limonen und (<i>S</i>)-(+)-Carvon vor einem 10-Ring-Kanal im ZSM-5	91
Abb. 2-47	Adsorptionskinetik von 2- und 3-Methylbutansäuremethylester an ZSM-5 150 bei 21 °C	92
Abb. 2-48	Diffusionsweg von (<i>R</i>)-(+)-Limonen und (<i>S</i>)-(+)-Carvon zwischen zwei Energieminima in einem geraden Silicalite-Kanal	93
Abb. 2-49	Adsorptionskinetik von (<i>R</i>)-(+)-Limonen und (<i>S</i>)-(+)-Carvon an ZSM-5 1000 bei 21 °C (Gemischtadsorption)	94
Abb. 2-51	Hauptbestandteile und Identifizierung (KI) von Spik-Lavendelöl	97
Abb. 2-52	Gaschromatogramme aus der Fraktionierung von Orangenöl mit ZSM-5 1000	99
Abb. 3-1	Isopren-Struktur	101
Abb. 3-2	Biosynthese von Isopreneinheiten	102
Abb. 3-3	Biosynthese regulärer, linearer Monoterpene durch Kopf-Schwanz-Verknüpfung von Dimethylallylpyrophosphat und Isopentenylpyrophosphat	102
Abb. 3-4	Terpenbiosynthese: Cyclisierung am Beispiel α -Pinen	103
Abb. 3-5	Beispiele für Strukturen irregulärer acyclischer Monoterpene	103
Abb. 3-6	Biosynthese von Chrysanthemylpyrophosphat in Pflanzen als Vorläufer irregulärer linearer Monoterpene	102
Abb. 3-7	Bildung irregulärer acyclischer Monoterpene durch Spaltung des Cyclopropanrings im Chrysanthemol bei Pflanzen	105
Abb. 3-8	Oxyfunktionalisierte Monoterpene mit 2,3,6-Trimethyl-heptan-Struktur aus natürlicher Quelle	106
Abb. 3-9	Mikrobielle Transformationsprodukte aus α -Pinen und ihre möglichen Bildungswege.	108
Abb. 3-10	Ursprünglich postulierter Mechanismus zur Bildung von Isonovalsäure aus α -Pinen bei <i>P. NCIMB 10684</i> unter Baeyer-Villiger-Oxidation	111
Abb. 3-11	(-)- α -Pinen-Metabolismus bei <i>P. fluorescens</i> NCIMB 11671	113

Abb. 3-12	Oxidation von (-)- α -Pinen zu (-)- α -Pinenoxid durch eine NADH-abhängige Monooxygenase	114
Abb. 3-13	Mechanismus der Isonovalal-Bildung durch die Pinenoxid-Lyase (<i>Nocardia</i> sp. Strain P18.3)	116
Abb. 3-14	Mechanismus der säurekatalysierten Umlagerung von Thujenoxid zu Isonovalal	116
Abb. 3-15	Produktspektrum aus der Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid mit ruhenden Zellen von <i>P. fluorescens</i> unter Sauerstoff-Limitierung	119
Abb. 3-16	Hypothetisches Schema für den Abbau der Novalsäure auf Grundlage von Zwischenprodukten bei <i>P. fluorescens</i>	123
Abb. 3-17	β -Oxidationsschritte bei α -verzweigten Fettsäuren	124
Abb. 3-18	Hypothetisches Schema für den Abbau von 3,4-Dimethyl-pentansäure	126
Abb. 3-19	Hypothetischer Mechanismus zur Bildung von β -Thujon aus α -Pinenoxid	127
Abb. 3-20	Beispiele für Biotenside bei <i>Pseudomonas</i> sp.	128
Abb. 3-21	Dreidimensionale Porenstruktur von Faujasiten	144
Abb. 3-22	Struktur von ZSM-5	145
Abb. 3-23	Katalytisch aktive saure Zentren in Zeolithen	147
Abb. 3-24	Anordnung von (<i>S</i>)-(+)-Carvon und (<i>R</i>)-(+)-Limonen in einem Kanalkreuzungspunkt von Silicalite	157
Abb. 3-25	Schematische Darstellung der Oberflächenadsorption im Vergleich zur Porenadsorption bei Zeolithen	159
Abb. 3-26	Schematische Darstellung der Adsorption von 3-Methylbutansäuremethylester und 2-Methylbutansäuremethylester an ZSM-5	160
Abb. 3-27	Diffusionsprozeß an ZSM-5: (1) Oberflächenadsorption, (2) Übergang in die Pore (3) Diffusion im Zeolith-Kanal	166
Abb. 3-28	Schematische Darstellung des Diffusionsweges des Adsorptivs in einem geraden Kanal des ZSM-5	172
Abb 4-1	Arbeitsschema für die Anzucht von Biomasse in Minimalmedium	210
Abb 4-2	Arbeitsschema für die Transformationen unter Sauerstoff-Limitierung	211
Abb 6-1	^{13}C -NMR-Spektrum von Novalol	243
Abb 6-2	^{13}C -NMR-Spektrum von Isonovalol	244
Abb 6-3	^{13}C -NMR-Spektrum von Novalsäure	245

Abb 6-4	^1H -NMR-Spektrum von Novalol	245
Abb 6-5	^1H -NMR-Spektrum von Isonovalol	246
Abb 6-6	^1H -NMR-Spektrum von Novalsäure	246

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1	Fettsäuremuster bei <i>P. fluorescens</i>	9
Tabelle 2-2	^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von Novalol	14
Tabelle 2-3	^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von Isonovalol	14
Tabelle 2-4	^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von Novalsäure	16
Tabelle 2-5	^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von (<i>S</i>)-(-)-3,4-Dimethylpentansäure-methylester	18
Tabelle 2-6	^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von (<i>5S,2E</i>)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure-methylester	18
Tabelle 2-7	Wichtige Fragment-Ionen aus den Massenspektren der Aldehyde	22
Tabelle 2-8	Fragment-Ionen aus den Massenspektren der Alkohole	24
Tabelle 2-9	Fragment-Ionen aus den Massenspektren der 2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-diensäuren und -methylester	25
Tabelle 2-10	Fragment-Ionen aus den Massenspektren der einfach unge- sättigten 2,5,6-Trimethyl-heptensäuren und -methylester	27
Tabelle 2-11	Fragment-Ionen aus den Massenspektren der Abbauprodukte der Novalsäure.	28
Tabelle 2-12	Fragment-Ionen aus den Massenspektren der höheren Ester der Novalsäure	30
Tabelle 2-13	Massenspektren der Acylderivate von Novalol	31
Tabelle 2-14	Kovats-Indices	32
Tabelle 2-15	Kovats-Indices zur Produktidentifizierung	33
Tabelle 2-16	UV-Maxima der 2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dien- Verbindungen mittels HPLC-DAD	34
Tabelle 2-17	IR-Daten von Novalsäure, Novalsäuremethylester und Isonovalsäuremethylester als KBr-Preßling	37

Tabelle 2-18	Aldehydbildung bei kontinuierlicher Dosierung von (-)- α -Pinenoxid	60
Tabelle 2-19	Olfaktorische Eigenschaften der Transformationsprodukte aus (-)- α -Pinenoxid und ihrer Derivate	63
Tabelle 2-20	GC-O Geruchsschwellen	64
Tabelle 2-21	Partikelgrößen der Zeolith-Pulver	65
Tabelle 2-22	Aromakomponenten der Modellmischung	68
Tabelle 2-23	Adsorption an DAY Pulver	69
Tabelle 2-24	Adsorption an ZSM-5 Pulver	70
Tabelle 2-25	Vergleich der Adsorptionseigenschaften von Zeolith-Pulvern und -Formkörpern bei konstantem Modul.	72
Tabelle 2-26	Molekulargewicht und Zusammensetzung der Einheitszellen von wasserfreien ZSM-5 Zeolithen in der H-Form	78
Tabelle 2-27	Maximalbeladungen verschiedener Aromastoffe an ZSM-5 berechnet aus Langmuir-Isothermen bei 30 °C	80
Tabelle 2-28	Affinitätsparameter aus den Langmuir-Isothermen	83
Tabelle 2-29	Freundlich-Parameter	87
Tabelle 2-30	Mittlere Diffusionskoeffizienten von Aromastoffen in ZSM-5	89
Tabelle 2-31	Trennung der Hauptkomponenten von Spike-Lavendelöl an Zeolithen	98
Tabelle 3-1	Transformationsprodukte von α -Pinen aus Mikroorganismen	110
Tabelle 3-2	Beispiele für nutzbare Kohlenstoffquellen bei <i>Pseudomonas</i> sp.	112
Tabelle 3-3	Charakterisierung der Pinenoxid-Lyasen aus <i>P. putida</i> und <i>Nocardia</i> sp. strain P18.3	117
Tabelle 3-4	Acyclische monoterpenoide Riechstoffe aus natürlichen Quelle	131
Tabelle 3-5	GC-O Geruchsschwellen ausgewählter Monoterpene	134
Tabelle 3-6	Berechnete Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten, Membran/Wasser-Verteilungskoeffizienten und Wasser Löslichkeiten der Transformationsprodukte, -edukte und Lösungsmittel	136
Tabelle 3-7	Vergleich der Methoden zur Gewinnung von Isonovalal mit ruhenden Zellen von <i>P. fluorescens</i>	140
Tabelle 3-8	Strukturelevante Daten der Zeolithe A, Y und ZSM-5	149
Tabelle 3-9	Einsatz von Zeolithen zur Adsorption organischer Verbindungen aus wäßriger Lösung im Umweltschutz und für die Trinkwasseraufbereitung	153
Tabelle 3-10	Maximalbeladungen einiger Lösungsmittel an ZSM-5	155

Tabelle 3-11	Maximalbeladungen acyclischer Verbindungen an hydrophobem ZSM-5	156
Tabelle 3-12	Maximalbeladungen monocyclischer und dreifach verzweigter acyclischer Verbindungen an hydrophobem ZSM-5	158
Tabelle 3-13	Berechnete Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten und Wasserlöslichkeiten	162
Tabelle 3-14	Maximalbeladungen in Abhängigkeit vom Modul an ZSM-5 Zeolithen für verschiedene Adsorptive aus wäßriger Lösung	163
Tabelle 3-15	Diffusionskoeffizienten acyclischer Verbindungen an ZSM-5	170
Tabelle 3-16	Diffusionskoeffizienten cyclischer Aromaten an ZSM-5 mit unterschiedlichem Modul	173
Tabelle 4-1	Bestandteile der Kulturmedien	193
Tabelle 4-2	Substrate und Standards	194
Tabelle 4-3	Chemikalien für Synthesen und Derivatisierungen	195
Tabelle 4-4	Weitere Chemikalien	195
Tabelle 4-5	Verwendete Lösungsmittel	196
Tabelle 4-6	Gase für die Gaschromatographie	197
Tabelle 4-7	Verwendete Zeolithe	197
Tabelle 4-8	Weitere Adsorbentien und Ionenaustauscher	198
Tabelle 4-9	Weitere Hilfsmittel	198
Tabelle 4-10	Verwendete Geräte	199
Tabelle 4-11	Zusammensetzung der Spurenelementelösung	208
Tabelle 4-12	Zusammensetzung der Mineralsalzlösung pH 7,2	209

Abkürzungsverzeichnis

<i>b</i>	Langmuir-Affinitätsparameter [L mmol ⁻¹]
<i>C</i>	Adsorbatkonzentration in der flüssigen Phase [g L ⁻¹]
<i>C₀</i>	Adsorbatkonzentration in der flüssigen Phase bei <i>t</i> = 0 [g L ⁻¹]
<i>C_∞</i>	Adsorbatkonzentration in der flüssigen Phase bei <i>t</i> → ∞ [g L ⁻¹]
CoA	Coenzym A
CW	Carbowax
δ	Chemische Verschiebung [ppm] (NMR)
d	Dublett (¹ H-NMR)
<i>D_c</i>	Diffusionskoeffizient im Zeolithkristall [m ² s ⁻¹]
Da	Dalton, relative Masseneinheit
DAY	Dealuminierter Zeolith Y
dd	doppeltes Dublett (¹ H-NMR)
deion.	deionisiert
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Polarisationstransfer-Methode ¹³ C-NMR)
DM	Dimethyl
DVB	Divinylbenzen
ee	Enantiomeric Excess (Enantiomerenüberschuß)
EZ	Einheitszelle (kleinste sich wiederholende Einheit im Zeolithgerüst)
GA	Gemischtadsorption
GC-O	Gaschromatographie mit olfaktorischer Detektion
GC-MS	Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion
h	Stunden
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ID	Innendurchmesser
IR	Infrarot
² <i>J</i>	geminale Kopplung über zwei Bindungen (¹ H-NMR)
³ <i>J</i>	vicinale Kopplung über drei Bindungen (¹ H-NMR)
<i>k</i>	Freundlich-Parameter [L g ⁻¹]
k. A.	keine Angabe
KI	Kovats-Index

KW	Kohlenwasserstoff
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
m	Multipllett ($^1\text{H-NMR}$)
m_t	adsorbierte Masse zur Zeit t [g]
m_∞	maximal adsorbierbare Masse ($t \rightarrow \infty$) [g]
m_z	Masse des Zeoliths
MBM	Methylbutansäuremethylester
min	Minuten
n	Freundlich-Parameter
n. b.	nicht bestimmt
NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Scotland
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PDMS	Polydimethylsiloxan
ppm	parts per million (10^{-6})
PS	Polystyren
q_t	Beladung des Zeoliths mit dem Adsorbat zur Zeit t [g g^{-1}]
q_0	Beladung des Zeoliths bei $t = 0$ [g g^{-1}]
q_∞	Maximalbeladung [g g^{-1}]
r_c	mittlerer Radius eines Zeolithkristalls [m]
r	Diffusionsweg [m]
s	Singulett ($^1\text{H-NMR}$)
t	Triplett ($^1\text{H-NMR}$)
t	Zeit [s] (Adsorptionskinetik)
TM	Trimethyl
SPME	Solid Phase Microextraction (Festphasen-Mikroextraktion)
upm	Umdrehungen pro Minute
UOP	Universal Oil Products
USY	„ultrastabiler“ (dealuminierter) Zeolith Y
V	Volumen der wäßrigen Phase [m^3]
ZSM	Zeolite Scony Mobil

1 Einleitung

Die Wahrnehmung von Lebensmitteln ist ein komplexer Prozeß, an dem eine Vielzahl unterschiedlicher Sinne beteiligt ist [1]. Eine herausgehobene Position nimmt dabei der Geruchssinn ein. Es gibt kaum ein Lebensmittel, bei dessen Herstellung nicht sorgfältig auf die Erhaltung eines ansprechenden Aromas geachtet wird [2]. Dies läßt sich oft nur durch eine zusätzliche Aromatisierung erreichen. Der Verbraucher legt dabei großen Wert auf die Verwendung natürlicher Aromastoffe, so daß mittlerweile etwa drei Viertel aller in Deutschland vermarkteten Aromen natürliche Aromen sind [3].

Es werden drei Wege zur Herstellung natürlicher Aromastoffe unterschieden [4, 5]:

- **Physikalische Prozesse** beinhalten die Isolierung von Aromastoffen aus einer natürlichen Quelle durch Extraktion oder Destillation.
- **Biochemische Prozesse** umfassen die Fermentation und die Biotransformation. Bei der Fermentation erfolgt die Umsetzung mit ganzen lebenden, mikrobiellen Zellen, die den Aromastoff *de novo* aus einer billigen Kohlenstoffquelle synthetisieren. Die Biotransformation wird entweder mit vollständigen Zellen oder einem gegebenenfalls aufgereinigten Enzymextrakt durchgeführt und benötigt ein spezifisches, exogen zugegebenes Substrat für die Umsetzung zum Aromastoff.
- **Chemische Prozesse** beschränken sich auf Umsetzungen, die auch in der traditionellen Nahrungszubereitung angewendet werden (Reaktionsaromen und nach US-Recht auch Hydrolysate).

Mit Ausnahme der Reaktionsaromen und Hydrolysate sind alle natürlichen Aromastoffe Produkte biochemischer Reaktionen, die in Einzelzellen (Bakterien, Hefen, Pilzen) oder in höheren Organismen ablaufen. Diese Umsetzungen erfolgen überwiegend enzymkatalysiert und zeichnen sich deshalb durch hohe Selektivität, Regio- und Stereospezifität aus. Die lebende Zelle bildet dabei den idealen Bioreaktor [5, 6]. Während der letzten zehn bis fünfzehn Jahre haben sich biotechnologische Prozesse in der Aromaindustrie etabliert [7]. Damit wird nicht nur der zunehmenden Nachfrage nach natürlichen Produkten Rechnung getragen,

sondern auch einem aktuellen Trend entsprochen, der die Entwicklung von Verfahren zur Erzeugung einzelner Schlüsselkomponenten mit hoher Potenz zum Ziel hat [4].

Als Hauptbestandteile etherischer Öle gehören terpenoide Riechstoffe mit zu den wirksamsten und am weitesten verbreiteten Aromastoffen [5, 8, 9]. Dabei zeichnen sich insbesondere acyclische Monoterpenoide durch niedrige Geruchsschwellenwerte aus [10].

Die Biotransformation des Terpenkohlenwasserstoffs (-)- α -Pinen mit *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 führt über (-)- α -Pinenoxid zu acyclischen Aldehyden und Alkoholen [11, 12]. Hierbei liefert im ersten Schritt die durch eine Monooxygenase katalysierte Umsetzung von (-)- α -Pinen das Zwischenprodukt (-)- α -Pinenoxid. Im Rahmen des EU-Projekts „Terpene Biotransformations“ (EC BIO4-CT95-0049) sollte die Monooxygenase isoliert, die hierfür codierenden Gene identifiziert und in einem lösungsmittelresistenten *P. putida* Stamm exprimiert werden. Eine gezielte Kopplung mit weiteren enzymatischen Aktivitäten sollte dann die selektive Gewinnung natürlicher Aromastoffe, wie beispielsweise Borneol, ermöglichen.

Die Produkte aus dem zweiten Transformationsschritt von *P. fluorescens* sind ebenfalls als Aromastoffe von Interesse [12, 13]. Es handelt sich dabei um acyclische Terpenaldehyde und -alkohole mit 2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadien-Struktur. Sie besitzen das gleiche Kohlenstoffskelett wie der aus Lavendelöl (*Lavandula angustifolia* Mill) bekannte irreguläre Monoterpenalkohol (*R*)-(-)-Lavandulol [8]. Da sie aber bisher noch nicht aus Lebensmitteln isoliert wurden, gelten sie nicht als natürliche Aromastoffe im Sinne des Lebensmittelrechts [14].

Im idealen Bioprozeß wird der Aromastoff-Vorläufer (Precursor) zu genau einem geruchsaktiven Produkt umgesetzt. Die Toxizität der Zielsubstanz für den Mikroorganismus [9] limitiert jedoch in der Regel die erzielbaren Produktkonzentrationen und Ausbeuten, so daß zur optimalen Nutzung der Biomasse eine kontinuierliche Produktabtrennung notwendig ist. Da destillative Trennverfahren, die in der Aromenindustrie bevorzugt eingesetzt werden [5], aufgrund der thermischen Belastung des Mikroorganismus zu diesem Zweck nicht anwendbar sind, ist hier die Extraktion die Methode der Wahl. Die kontinuierliche flüssig-flüssig-Extraktion ist auf lösungsmittelresistente Mikroorganismen beschränkt [15].

Die flüssig-fest-Extraktion mit hydrophoben organischen Adsorberharzen hat sich

jedoch als universelle Methode zur Gewinnung von Aromastoffen aus wäßrigen Lösungen erwiesen [16] und erlaubte eine kontinuierliche Gewinnung unpolarer Substanzen aus Fermentationsmedien [17].

Auch anorganische Materialien besitzen hochporöse Oberflächen, die ihre Eignung als Adsorbentien begründen. Amorphe Materialien, wie beispielsweise Al_2O_3 , finden als feste Phase in chromatographischen Aromastofftrennungen Verwendung [5]. Es eignen sich aber auch kristalline Materialien, z. B. Zeolithe, für adsorptive Stofftrennungen [18].

Zeolithe sind Aluminosilikate und zeichnen sich durch eine hochporöse, kristalline Struktur mit einheitlichen, definierten Porenöffnungen aus [19]. Sie bieten damit ein zusätzliches Selektivitätskriterium für die Adsorption, das als Molekularsiebeffekt bekannt ist. Nur Moleküle, die klein genug sind, um in die Kanäle und Hohlräume des Zeoliths einzudringen, können in Wechselwirkung mit der inneren Adsorptionsoberfläche treten. Größere Moleküle werden ausgeschlossen.

Die Wahl des Kristalltyps und die Einstellung des Aluminiumgehalts des Kristallgitters erlaubt vielfältige Variationsmöglichkeiten hinsichtlich der Porengröße und hydrophoben Eigenschaften des Zeoliths.

Für den Bereich der Aromabiotechnologie ergeben sich daraus Anwendungsmöglichkeiten, die auf eine selektive Produkt-Precursor-Trennung von Fermentationsprodukten, möglichst im Sinne einer *in situ* Adsorption des Produkts aus dem Transformationsmedium zielen.

Problemstellung

Die Umsetzung von (-)- α -Pinen bzw. (-)- α -Pinenoxid zu geruchsaktiven acyclischen Aldehyden und Alkoholen mit *P. fluorescens* NCIMB 11671 wurde bereits mehrfach, darunter in zwei Patentanmeldungen, beschrieben. Als Primärprodukte wurden (*Z*)- und (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienal (Isovalal und Novalal) identifiziert, die jedoch durch den Mikroorganismus schnell oxidativ abgebaut wurden [11, 20]. Die Entstehung der durchkonjugierten Isomeren (Neonovalal und Neoisonovalal) [13] oder der korrespondierenden Alkohole [12] wurde nicht eindeutig durch spektroskopische Daten belegt. Zudem blieb unklar, welche Verbindungen die eigentlich geruchsaktiven Intermediate waren und welche Geruchseindrücke

dominierten.

Ziel der Arbeit war es, einen Bioprozeß mit *P. fluorescens* zu entwickeln, der zur Gewinnung geruchsaktiver Terpenoide führt. Schwerpunkte wurden deshalb auf folgende Aspekte gelegt:

- Die Isolierung und Identifizierung der Transformationsprodukte aus (-)- α -Pinenoxid bei *P. fluorescens* NCIMB 11671,
- die Untersuchung der kinetischen Aspekte der Produktbildung und des Produktabbaus durch den Mikroorganismus sowie der Stabilität der Produkte im Transformationsmedium,
- die Bestimmung der organoleptischen Eigenschaften der Produkte und ihrer Derivate,
- die Entwicklung eines Verfahrens zur Gewinnung geruchsaktiver Intermediate unter besonderer Berücksichtigung von *in situ* Adsorptionsverfahren.

Im Hinblick auf weitere Trennprobleme, die sich aus Biotransformationsprozessen oder anderen Stofftrennprozessen der Aromatechnologie ergaben, wurden die selektiven Adsorptionseigenschaften von Zeolithen der DAY- und der ZSM-5-Reihe für Aromastoffe aus wäßrigen Medien untersucht. Im einzelnen wurden folgende Punkte bearbeitet:

- Die Erfassung des Potentials hydrophober Zeolithe zur adsorptiven Trennung von Aromastoffen aus wäßriger Lösung,
- die thermodynamischen und kinetischen Aspekte der Adsorption an Zeolithe,
- die Umsetzung der Ergebnisse zu potentiellen Anwendungen in der Aromatechnologie unter besonderer Berücksichtigung der binären Stofftrennungen aus dem EU-Projekt „Terpene Biotransformations“ EC BIO4-CT95-0049.

2 Ergebnisse

2.1 Biotransformation mit *P. fluorescens* NCIMB 11671

2.1.1 Isolierung der Produkte aus der Transformation von (-)- α -Pinenoxid

2.1.1.1 Produktspektrum

2.1.1.1.1 Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid unter Sauerstofflimitierung

Zunächst wurden die neutralen Produkte aus der Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid durch ruhende Zellen bei Sauerstofflimitierung identifiziert. Um einen Abbau der Transformationsprodukte durch β -Oxidation im Vorfeld zu verhindern, wurde die Zufuhr von Sauerstoff durch die Durchführung der Umsetzung in gasdicht verschlossenen Zentrifugenbechern unterbunden. Im Medium vorhandener gelöster Sauerstoff wurde nicht entfernt.

Standardansätze enthielten 50 μ L (-)- α -Pinenoxid in 40 mL Bakteriensuspension ($1,2 \text{ g L}^{-1}$) bei pH 7,5, $\text{OD}_{600} = 10$. Die Ansätze wurden nach definierten Transformationszeiten aufgearbeitet und das Produktspektrum zunächst mittels GC-MS untersucht.

Nach 20 min war (-)- α -Pinenoxid bereits vollständig umgesetzt. Als Hauptprodukt entstand eine Säure, weiterhin wurden ein Aldehyd und ein Alkohol gefunden. Die Identifizierung ergab (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-diensäure (Novalsäure) als Hauptprodukt neben dem korrespondierenden Alkohol (Novalol) und dem Aldehyd (Novalal). Als Nebenprodukte entstanden das (*Z*)-Isomer Isonovalal und die durchkonjugierten Isomere von Novalal und Novalol.

Nach einstündiger Transformation verschob sich das Produktspektrum zu den neutralen Produkten.

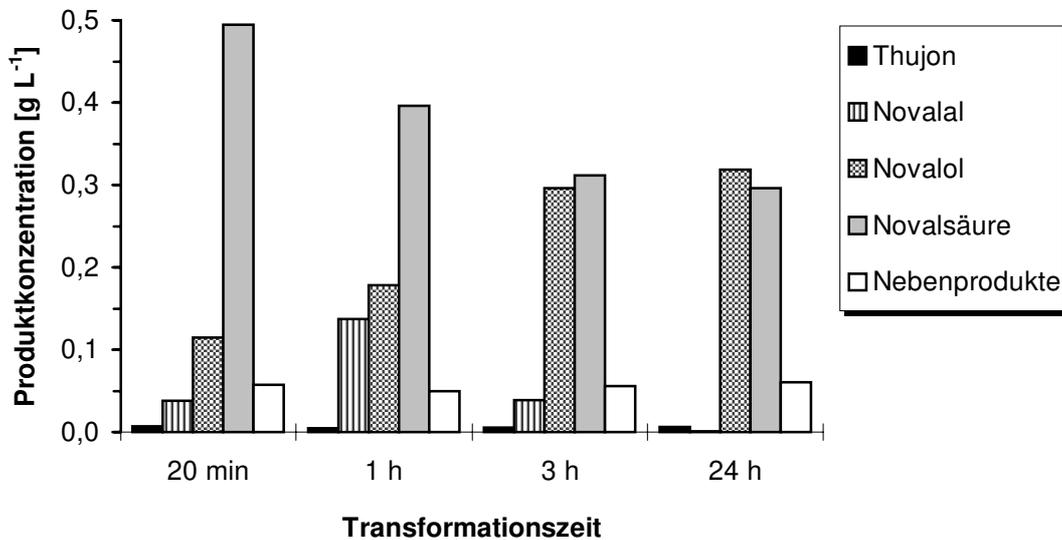


Abb. 2-1 Produktbildung aus (-)- α -Pinenoxid unter Sauerstofflimitierung

Nach drei und 24 Stunden enthielten die Isolate aus der (-)- α -Pinenoxid-Transformation als Hauptprodukte Novalol und Novalsäure in fast äquimolarem Verhältnis, sowie geringe Mengen an weiteren neutralen Substanzen. Die alkoholischen Nebenprodukte wurden im weiteren als Isonovalol und durchkonjugierte Isomere des Novalols identifiziert.

Ein darüberhinaus in allen Ansätzen gebildetes Keton konnte der Struktur (+)- β -Thujon zugeordnet werden (Abb. 2-1).

Die Produktbilanz ergab Gesamtausbeuten von 68 % bis 77 % der detektierten Transformationsprodukte bezogen auf das eingesetzte (-)- α -Pinenoxid.

2.1.1.1.2 Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid in drei Transformationszyklen

Da die Transformation von (-)- α -Pinenoxid vollständig verlief, wurde geprüft, ob die Bakterienzellen nach einem Waschschrift und der Umsetzung in frisches Medium die gleiche Umsetzung noch einmal durchführen. Für die mehrfache Umsetzung wurden die Transformationsbedingungen dahingehend verändert, daß kein Sauerstoffmangel bestand, der sonst zum Absterben der Zellen geführt hätte.

50 μ L (-)- α -Pinenoxid (1,2 g L⁻¹) wurden in drei aufeinanderfolgenden Trans-

formationszyklen jeweils vollständig umgesetzt. Das gebildete Produktspektrum variierte jedoch deutlich. Da saure Produkte bei der Aufarbeitung nicht quantitativ erfaßt wurden, sind sie in Abb. 2-2 nicht dargestellt.

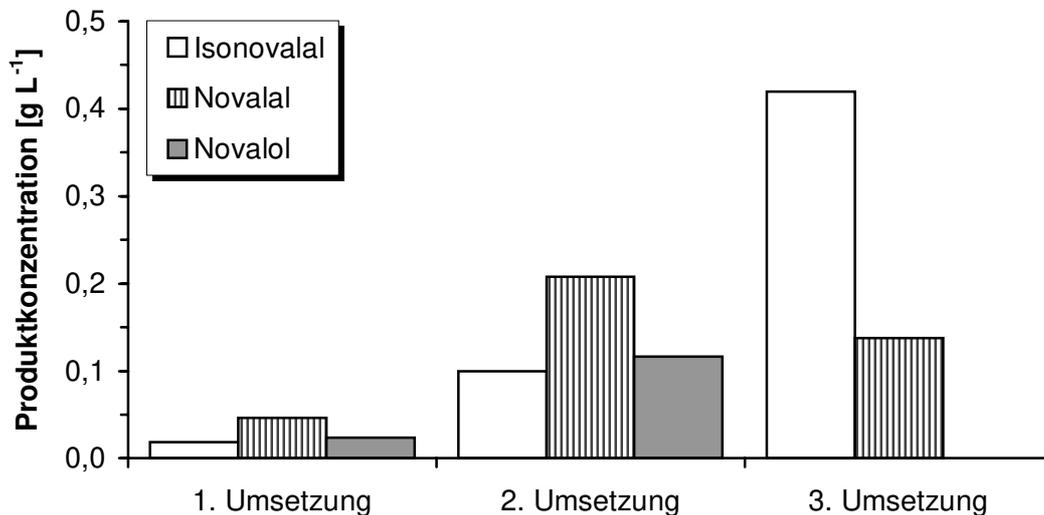


Abb. 2-2 Bildung neutraler Produkte aus der Umsetzung von jeweils 1,2 g L⁻¹ (-)- α -Pinenoxid in drei aufeinanderfolgenden Transformationszyklen (20 min)

Für Novalol, Novalal und Isonovalal wurden nach 20 min Transformationszeit im ersten Transformationszyklus jeweils Konzentrationen unter 0,05 g L⁻¹ ermittelt. Die neutralen Transformationsprodukte wurden fast vollständig zu sauren Metaboliten oxidiert. Im zweiten Transformationszyklus ergab sich ein ähnliches Produktspektrum, jedoch mit insgesamt deutlich höheren Konzentrationen der neutralen Verbindungen. Das neutrale Hauptprodukt war Novalal. Eine Oxidation der Produkte fand nur noch eingeschränkt statt. Im dritten Zyklus veränderte sich das Produktspektrum zugunsten der Aldehyde. Dominierend war nun das Isonovalal. Die Einstellung der oxidativen Transformationsprozesse zeigte auch die Einstellung der Zellatmung und damit den Zelltod an.

2.1.1.1.3 Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid zur Säurebildung

Die Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid zu den Säuren und ihren β -Oxidationsprodukten erforderte eine ausreichende Sauerstoffversorgung. Um die Synthese

von Co-Faktoren sicherzustellen, wurde in diesem Versuch den ruhenden Zellen die Stickstoffquelle und eine Mineralsalzlösung zugegeben (s. Abschnitt 4.2.3.2.1).

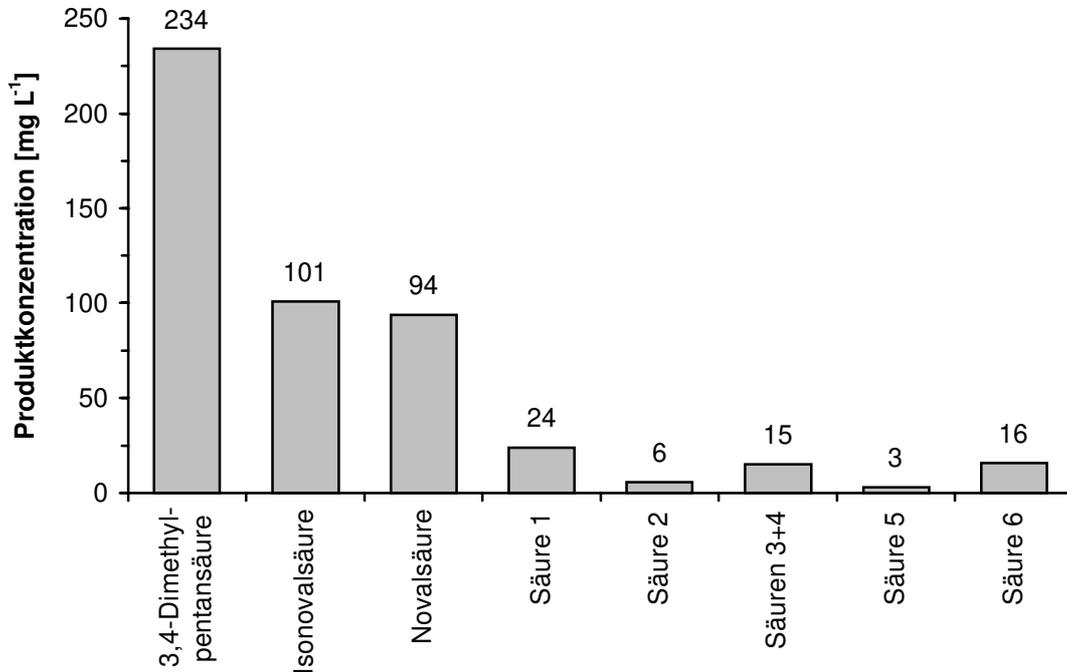


Abb. 2-3 Säurebildung aus 1,2 g L⁻¹ (-)- α -Pinenoxid nach vier Stunden

Nach vier Stunden Transformationszeit lag als Hauptmetabolit 3,4-Dimethylpentansäure in einer Konzentration von 234 mg L⁻¹ vor. Weiterhin wurden Novalsäure und Isonovalsäure detektiert. Bei den Säuren **(1)** – **(4)** handelt es sich um einfach ungesättigte 2,5,6-Trimethyl-heptansäuren (Reihenfolge und Identifizierung s. Tabelle 2-10). Eine vollständig hydrierte Form der Novalsäure, die ein Molekulargewicht von 172 Da besitzen müßte, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Säuren **(5)** und **(6)** hatten das gleiche Molekulargewicht wie die Novalsäure (168 Da). Sie wurden jedoch nicht weiter identifiziert (Abb. 2-3). 3,4-Dimethyl-2-pentansäure, 2-Methylbutansäure und Essigsäure (Tabelle 2-11) lagen in Konzentrationen unter 1 mg L⁻¹ vor. Nach Methylierung der Säurefraktionen der Produktisolate konnte zusätzlich ein β -Ketoester im Spurenbereich detektiert werden. Aufgrund der Strukturanalogien der detektierten Säuren mit Novalsäure konnte davon ausgegangen werden, daß sie als Intermediate des oxidativen Abbaus der

Novalsäure gebildet wurden. 2-Methylbutansäure und Essigsäure sind jedoch ubiquitär erscheinende Stoffwechselprodukte, die auch aus anderen biochemischen Prozessen resultieren könnten. Darum ist ohne eine Markierung der Edukte die Beteiligung dieser Säuren am Novalsäureabbau nicht beweisend.

Das mögliche Produkt aus einer α -Oxidation der 3,4-Dimethylpentansäure, 2,3-Dimethylbutansäure wurde nicht gefunden.

In der methylierten Fraktion wurde zudem 3-Hydroxydecansäuremethylester nachgewiesen (s. Tabelle 2-11). 3-Hydroxydecansäure (3-C₁₀) ist ein regulärer Bestandteil der Zellwände von *P. fluorescens* [21], ist aber auch als Fettsäurekomponente in Biotensiden vertreten [22, 23]. Damit bestand grundsätzlich auch die Möglichkeit, daß die Säure während der alkalischen Extraktion (s. Abschnitt 2.1.1.2) aus nicht abgetrenntem Zellmaterial durch Hydrolyse freigesetzt wurde. Weitere Säuren, die dem Fettsäuremuster von *P. fluorescens* (Tabelle 2-1) zuzuordnen waren, wurden jedoch nicht detektiert, so daß es wahrscheinlich war, daß die 3-Hydroxydecansäure aufgrund einer partiellen Hydrolyse der Tenside während der alkalischen Extraktion entstand.

Tabelle 2-1 Fettsäuremuster bei *P. fluorescens* [21] (Hauptbestandteile sind fett dargestellt)

Fettsäure	Kettenlänge
Ungesättigte FS	C ₁₆ , C₁₈
Gesättigte FS	C ₁₂ , C ₁₄ , C ₁₅ , C ₁₆ , C₁₈
Cyclopropan-FS	C ₁₇ , C ₁₉
Hydroxy-FS	3-C ₁₀ , 2-C ₁₂ , 3-C ₁₂

2.1.1.2 Produktisolierung

Bei der Isolierung der Transformationsprodukte für eine spektroskopische Identifizierung der Verbindungen kamen hauptsächlich Standardmethoden zum Einsatz. Eine Übersicht über die eingesetzten Methoden in Verbindung mit den analytischen Verfahren ist in Abb. 2-4 dargestellt.

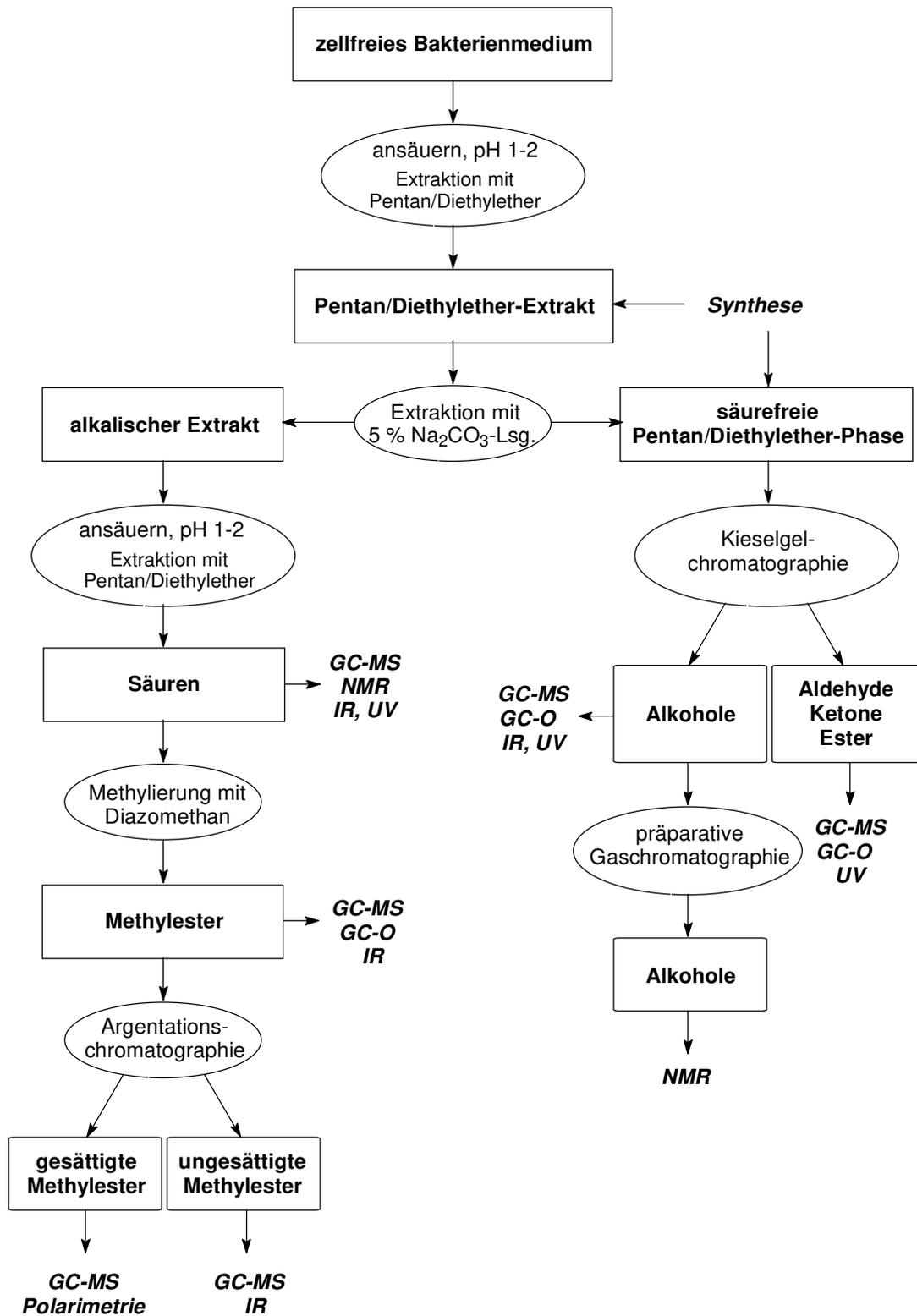


Abb. 2-4 Allgemeines Arbeitsschema zur Produktisolierung

Nach der Abtrennung der Bakterienzellen durch Zentrifugation wurde die **flüssig/flüssig-Extraktion** mit dem azeotropen Gemisch von Pentan und Diethylether durchgeführt (s. Abschnitt 4.2.3.1.3). Eine Phasentrennung war aufgrund von Tensidbildung nur nach Zentrifugation zu erreichen. Das Tensid verblieb in der wäßrigen Phase oder bildete nach dem Ansäuern ein Präzipitat, das sich zwischen den Phasen absetzte.

Der organische Extrakt aus dem angesäuerten Medium enthielt das gesamte Produktspektrum der jeweiligen Umsetzung, wobei sich jedoch (-)- α -Pinenoxid zu den in Abschnitt 2.1.4.1, Abb. 2-23 dargestellten Produkten umlagerte. Eine Isolierung der Säuren erfolgte dann durch Extraktion mit 5 %iger Na_2CO_3 -Lösung. Hinweise auf eine mögliche Isomerisierung der ungesättigten Säuren im alkalischen Extrakt wurden nicht gefunden.

Nach der extraktiven Entfernung der Säuren wurden die Alkohole von anderen neutralen Transformationsprodukten durch **Säulenchromatographie an Kieselgel** mit Diethylether als Laufmittel vollständig abgetrennt (s. Abschnitt 4.2.7.1.1).

Bei der Trennung der Novalsäure von ihren hydrierten Derivaten und β -Oxidationsprodukten kam die **Argentationschromatographie** [24] zum Einsatz (s. Abschnitt 4.2.7.1.2). Die Trennung beruht auf Wechselwirkungen von an einen Kationenaustauscher gebundenen Silber-Ionen mit olefinischen π -Bindungen der Analyte. Um eine bessere Löslichkeit der Säuren in unpolaren Lösungsmitteln zu erreichen und damit eine hohe Aufkonzentrierung der Produkte für die Säulenchromatographie zu ermöglichen, wurden sie vor der Trennung in die Methylester überführt (s. Abschnitt 4.2.5.3). Der Methylester der 3,4-Dimethylpentansäure konnte nicht mit reinem Pentan eluiert werden, da auch die Carbonylfunktion mit Silberionen wechselwirkte. Mit Pentan / Diethylether 98:2 (v/v) wurden jedoch zusammen mit dem gesättigten Ester auch die α,β -ungesättigten Ester eluiert. Es wurde aber eine vollständige Abtrennung dieser Fraktion von den zweifach ungesättigten Estern erreicht. Außerdem war eine Trennung der Methylester von (*E*)- und (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-diensäure (Novalsäure und Isonovalsäure) möglich.

Zur Erzielung von Reinheiten über 95 % für die NMR-Spektroskopie wurden die Produkte einem weiteren Reinigungsschritt durch **präparative Gaschromatographie** unterzogen (s. Abschnitt 4.2.7.3.6).

2.1.2 Identifizierung der Produkte aus der (-)- α -Pinenoxid-Transformation und ihrer Derivate

Die Identifizierung bekannter Verbindungen erfolgte zunächst über die Massenspektren (Abschnitt 4.2.7.3.4) und Kovats-Indices (Abschnitt 4.2.4) im Vergleich mit Literaturdaten. Sofern diese Informationen nicht eindeutig oder vollständig waren, wurden weitere spektroskopische Untersuchungen vorgenommen (UV, IR, NMR, Abschnitt 4.2.8). Chirale Isolate wurden auch polarimetrisch untersucht (Abschnitt 4.2.9). Die Identität eigener Syntheseprodukte wurde über MS- und UV-Spektren überprüft.

Die durchgeführten Arbeiten zur Produktidentifizierung führten zur Aufklärung der Strukturen von zwei neuen Naturstoffen (Isonovalol und (5*S*,2*E*)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure).

Ein zentraler Punkt bei der Strukturaufklärung der Verbindungen mit 2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadien-Struktur und verwandten Substanzen war die Bestimmung der (*Z*)/(*E*)-Konfiguration der Doppelbindung in Position C-2. Die sicherste Methode für eine eindeutige Zuordnung ist die ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Voraussetzung dafür ist jedoch eine hohe Probenreinheit. In der Regel unterscheiden sich die Massenspektren von (*Z*)/(*E*)-Isomeren nur geringfügig (z. B. Novalol und Isonovalol). In Einzelfällen ist die Aufklärung der (*Z*)/(*E*)-Konfiguration aus den Massenspektren (z. B. Novalol und Isonovalol) jedoch auch möglich. IR-Spektren sind nur dann aussagekräftig, wenn sich mindestens zwei Protonen an der Doppelbindung befinden.

Da für die 2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadien-Verbindungen eine hohe Tendenz zur Isomerisierung und Ausbildung eines konjugierten Systems angenommen wurde, stand auch die Bestimmung der Position der zweiten Doppelbindung mit im Vordergrund der Strukturaufklärung. Die Unterscheidung von konjugierten und isolierten Doppelbindungen war aufgrund der Lage des UV-Maximums möglich. Die Anwesenheit einer Methylidengruppe konnte darüberhinaus zweifelsfrei mit dem IR-Spektrum belegt werden. Im MS-Spektrum resultierten aus einem konjugierten System besonders stabile Fragmente von hoher Intensität.

2.1.2.1 NMR-Spektren

2.1.2.1.1 Novalol und Isonovalol

Während die NMR-Daten der (*Z*)/(*E*)-isomeren Säuren und Aldehyde mit 2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadien-Struktur bereits bekannt waren [25, 26], gab es für die korrespondierenden Alkohole keine verlässlichen Daten. Das ^{13}C -NMR-Spektrum eines der genannten Alkohole ist ohne Angabe der (*Z*)/(*E*)-Konfiguration in einer Patenschrift veröffentlicht [12].

Die ^1H -breitbandenkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren der Alkohole zeigten weitgehende Übereinstimmungen. Beide enthielten neben dem Lösungsmittelsignal insgesamt neun Signale. Vier davon waren aufgrund der Verschiebungen in den Tieffeldbereich olefinischen Kohlenstoffen zuzuordnen, weitere vier Signale erschienen im hohen Feld. Die Kohlenstoffatome C-8 und C-9 der Isopropylgruppe sind chemisch äquivalent und ergeben deswegen nur ein Signal doppelter Intensität bei 21,6 ppm. Die Zuordnung der anderen Banden erfolgte über eine Multiplizitätsselektion (DEPT-Sequenz, s. Abschnitt 6, Abb. 6-1 und Abb. 6-2). Die (*Z*)/(*E*)-Konfigurierung der Alkohole ließ sich aus den Resonanzverschiebungen der Methylgruppe (C-10) und der sauerstoffgebundenen Methylengruppe (C-1) ableiten. In der (*E*)-Konfiguration unterlag die vinyloge Methylgruppe einer Abschirmung durch den (*Z*)-ständigen Alkylrest und erschien deshalb hochfeldverschoben bei 12,1 ppm im Vergleich zu 21,4 ppm beim Isonovalol. Umgekehrt führte der (*Z*)-ständige Alkylrest im Isonovalol zu einer Hochfeldverschiebung der Resonanz der Methylengruppe (C-1) um 7,5 ppm von 69,0 ppm (Novalol) auf 61,5 ppm (Isonovalol). Der gleiche Effekt wurde auch für die korrespondierenden Säuren und Aldehyde beschrieben [25, 26].

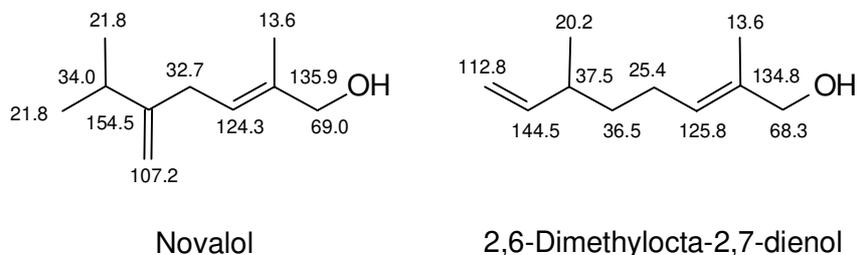


Abb. 2-5 Chemische Verschiebungen (^{13}C -NMR) bei Novalol und 2,6-Dimethylocta-2,7-dienol [27]

Tabelle 2-2 ^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von Novalol

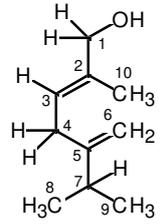
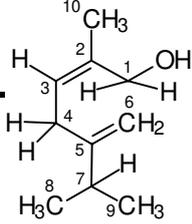
^{13}C -NMR		^1H -NMR		
		Chemische Verschiebung δ [ppm]	Chemische Verschiebung δ [ppm]	Proton
69,0	1	4,03	s (2H)	CH_2
135,9	2			C
124,3	3	5,47 ($^3J = 7,6$ Hz)	t (1H)	CH
32,7	4	2,76 ($^3J = 7,6$ Hz)	d (2H)	CH_2
154,5	5			C
107,2	6	4,75	s (1H)	CH_2
		4,68	s (1H)	CH_2
34,0	7	2,24 ($^3J = 6,8$ Hz)	m (1H)	CH
21,8	8 + 9	1,03 ($^3J = 6,8$ Hz)	d (6H)	CH_3
13,6	10	1,67	s (3H)	CH_3

Tabelle 2-3 ^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von Isonovalol

^{13}C -NMR		^1H -NMR		
		Chemische Verschiebung δ [ppm]	Chemische Verschiebung δ [ppm]	Proton
61,6	1	4,10	s (2H)	CH_2
135,8	2			C
126,0	3	5,36 ($^3J = 7,6$ Hz)	t (1H)	CH
32,4	4	2,77 ($^3J = 7,6$ Hz)	d (2H)	CH_2
155,3	5			C
107,3	6	4,75	s (1H)	CH_2
		4,65	s (1H)	CH_2
34,0	7	2,23 ($^3J = 6,8$ Hz)	m (1H)	CH
21,7	8 + 9	1,03 ($^3J = 6,8$ Hz)	d (6H)	CH_3
21,4	10	1,83	s (3H)	CH_3

Die Zuordnung zur (*Z*)- und (*E*)-Konfiguration konnte durch Spektrenvergleich mit dem Alkohol (*E*)-2,6-Dimethyl-octa-2,7-dienol bestätigt werden. Seine Alkoholfunktion ist ebenso konfiguriert wie die des Novalols. Die resultierenden Beträge der

Resonanzverschiebungen aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum ergaben sehr ähnliche Werte (s. Abb. 2-5).

Aufgrund der erhaltenen Daten konnte der in der Patentanmeldung [12] beschriebene Alkohol der (*E*)-Konfiguration (Novalol) zugeordnet werden. Das (*Z*)-Isomer (Isonovalol) wurde noch nicht spektroskopisch beschrieben.

Die ^1H -NMR-Spektren der Alkohole (Tabellen 2-2 und 2-3 bzw. Abschnitt 6, Abb. 6-4 und Abb. 6-5) enthielten ebenfalls weitgehende Übereinstimmungen. Die Isopropylgruppe war deutlich aufgrund der Kopplung des Methin-Protons am C-7 mit sechs äquivalenten Protonen der benachbarten Methylgruppen als Dublett bei 1,03 ppm zu erkennen. Das Signal für das Methin-Proton wurde zu einem Multipllett bei 2,24 ppm bzw. 2,23 ppm aufgespalten. Als Singulett erschienen die drei Protonen der Methylgruppe am C-10 (1,67 ppm bzw. 1,83 ppm) sowie jeweils ein Proton der Methylidengruppe (4,75 ppm und 4,65 ppm bzw. 4,75 ppm und 4,68 ppm). Die Protonen der allylischen Methylengruppe (C-4) koppelten mit dem benachbarten olefinischen Proton mit $J = 7,6$ Hz zu einem Dublett bei 2,76 ppm bzw. 2,77 ppm. Im Gegenzug ergibt sich das Triplet bei 5,47 ppm bzw. 5,36 ppm als Signal für das olefinische Proton (C-3). Das Signal bei 7,26 ppm war nichtdeutertem Lösungsmittel zuzuordnen.

Die (*Z*)/(*E*)-Konfigurierung der Alkohole wirkt sich hauptsächlich auf die chemische Verschiebung der Resonanz der Protonen an den allylischen C-Atomen (C-3, C-10) aus.

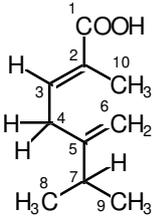
2.1.2.1.2 Novalsäure

Die Kernresonanzdaten von (*Z*)- und (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadiensäure (Isonovalsäure und Novalsäure) wurden bereits beschrieben [25, 26]. Die eigene Messung sollte aus Mangel an aussagekräftigen MS-Daten die Zuordnung der isolierten Säure zur (*Z*)-oder (*E*)-Konfiguration ermöglichen.

Das ^1H -breitbandenkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum der Novalsäure enthielt neun Signale. Das am weitesten tieffeldverschobene Signal bei 171,8 ppm fiel in den typischen Bereich der Kernresonanz von quartärem Kohlenstoff in einer Säurefunktion. Weiterhin ergaben sich Signale für vier olefinische Kohlenstoffe im Tieffeldbereich und vier gesättigte Kohlenstoffe im Hochfeldbereich. Die Signale für die Methylgruppen im Isopropylrest fielen zusammen und erschienen mit doppelter

Intensität bei 21,6 ppm. Die weiteren Signale zeigten eine hohe Übereinstimmung mit Referenzdaten für Novalsäure. Entscheidend für die Bestimmung der (*Z*)/(*E*)-Konfiguration war der Wert der chemischen Verschiebung der Resonanz für C-10. Für die (*Z*)-Verbindung (Isonovalsäure) wurde eine Resonanzverschiebung von 20,5 ppm ermittelt, wohingegen der Wert bei der (*E*)-Konfiguration aufgrund der Abschirmung der vinylogenen Methylgruppe zu 12,1 ppm hochfeldverschoben erschien [25]. Der gemessene Wert von 12,0 ppm entsprach dem der Novalsäure. Damit konnte eine eindeutige Zuordnung der isolierten Säure zur Struktur (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadiensäure erfolgen (Tabelle 2-4 und Abschnitt 6, Abb. 6-3).

Tabelle 2-4 ^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von Novalsäure

^{13}C -NMR		^1H -NMR		
		Chemische Verschiebung δ [ppm]	Chemische Verschiebung δ [ppm]	Proton
171,8	1	10,54	s (1H)	COOH
127,6	2			C
142,9	3	6,96	t (1H)	CH
29,7	4	3,08	d (2H)	CH ₂
152,3	5			C
108,7	6	4,89	s (1H)	CH ₂
		4,73	s (1H)	
33,6	7	2,28	m (1H)	CH
21,6	8 + 9	1,04	d (6H)	CH ₃
12,0	10	1,85	s (3H)	CH ₃

Die ermittelten ^1H -NMR-Daten (Tabelle 2-4 und Abschnitt 6, Abb. 6-6) bestätigten die Ergebnisse. Es wurde ein breites Signal für das Proton in der Säurefunktion bei 10,54 ppm erhalten. Die sechs chemisch äquivalenten Protonen der Isopropylgruppe erschienen als Dublett (1,04 ppm), da ihr Signal durch Wechselwirkung mit dem benachbarten Methin-Proton aufgespalten wurde. Das Protonensignal der Methingruppe selbst war entsprechend als Multiplett bei 2,28 ppm zu erkennen. Das Singulett bei 1,85 ppm war den Protonen der Methylgruppe (C-10) zuzuordnen. Die allylische Methylengruppe (C-4) erschien als Dublett bei 3,08 ppm. Die Protonen der Methylidengruppe waren nicht äquivalent und bildeten zwei Singuletts

bei 4,89 ppm und 4,73 ppm. Das Triplet bei 6,96 ppm (Protonen am C-3) entstand durch Kopplung mit den benachbarten Protonen der Methylengruppe.

2.1.2.1.3 Methylester

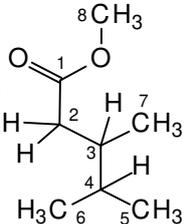
(S)-(-)-3,4-Dimethylpentansäuremethylester

Das ^1H -breitbandenkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum des 3,4-Dimethylpentansäuremethylesters enthielt mit Ausnahme der Carbonyl-Resonanz (173,4 ppm) ausschließlich Signale im hohen Feld. Sie zeigen die Anwesenheit von sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffen und damit ein gesättigtes Kohlenstoffgerüst an (Tabelle 2-5). Anhand von Inkrementberechnungen [28] konnte eine Zuordnung der Signale bei 35,9 ppm und 32,9 ppm zu den tertiären Kohlenstoffen C-3 und C-4 erfolgen. Die Anwesenheit eines sekundären Kohlenstoffs (39,5 ppm) ergab sich aus der DEPT-Sequenz. Eine eindeutige Zuordnung der Signale für die primären Kohlenstoffe (15,9 ppm, 18,3 ppm, 19,8 ppm und 51,4 ppm) war nur für die am weitesten tieffeldverschobene, sauerstoffgebundene Methylgruppe möglich. Im Gegensatz zu der Isopropylgruppe in der Novalsäure waren hier die Methylgruppen im Isopropylrest aufgrund der Nachbarschaft zu einem Chiralitätszentrum (C-3) nicht chemisch äquivalent und ergaben im Spektrum deshalb zwei Signale (wahrscheinlich 18,3 ppm und 19,8 ppm).

Im ^1H -NMR-Spektrum erschienen ebenfalls alle Signale im hohen Feld. Das einzige Singulett war im Zusammenhang mit seiner Resonanzverschiebung von 3,65 ppm den Methylprotonen in der Esterfunktion zuzuordnen. Das Chiralitätszentrum (C-3) bewirkt die Nichtäquivalenz der Methylenprotonen am C-2 und der jeweils drei Protonen beider Methylgruppen (C-5 und C-6) im Isopropylrest. Eine Zuordnung der Signale für die Methin-Protonen war aufgrund der Kopplungsmuster in den Multipletts möglich (C-4: Doppeltes Heptett bei 1,55 ppm, C-3: Triplet-Quartett-Dublett-Kopplungen bei 1,86 ppm). Eine eindeutige Zuordnung der Signale für Methylprotonen (0,87 ppm, 0,86 ppm, 0,83 ppm) konnte jedoch nicht getroffen werden.

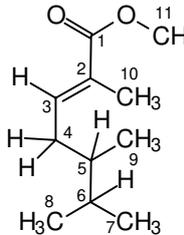
Alle erhaltenen NMR-Daten stimmten mit bekannten Literaturdaten überein [29].

Tabelle 2-5 ^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von (*S*)-(-)-3,4-Dimethylpentansäuremethylester

^{13}C -NMR		^1H -NMR		
		Chemische Verschiebung δ [ppm]	Chemische Verschiebung δ [ppm]	Proton
174,3	1	2,34 ($^2J = 14,6$ Hz) ($^3J = 5,2$ Hz)	dd (1H)	C
39,5	2	2,07 ($^2J = 14,6$ Hz) ($^3J = 9,2$ Hz)	dd (1H)	CH_2
35,9	3	1,86	m (1H)	CH
32,1	4	1,55	m (1H)	CH
19,8	5^{a)}	0,87 ($^3J = 6,8$ Hz)	d (3H)	CH_3
18,3	6^{a)}	0,86 ($^3J = 6,8$ Hz)	d (3H)	CH_3
15,9	7^{a)}	0,83 ($^3J = 6,8$ Hz)	d (3H)	CH_3
51,4	8	3,65	s (3H)	CH_3

^{a)} Keine eindeutige Zuordnung

Tabelle 2-6 ^{13}C -NMR und ^1H -NMR-Daten von (*5S,2E*)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure-methylester

^{13}C -NMR		^1H -NMR		
		Chemische Verschiebung δ [ppm]	Chemische Verschiebung δ [ppm]	Proton
168,8	1			C
127,9	2			C
142,4	3	6,78 ($^3J = 8,0$ Hz)	t (1H)	CH
33,4	4	2,20 2,00	m (1H) m (1H)	CH_2
38,9	5	1,48	m (1H)	CH
32,0	6	1,56	m (1H)	CH
20,3	7^{a)}	0,88 ($^3J = 6,8$ Hz)	d (3H)	CH_3
19,2	8^{a)}	0,82 ($^3J = 6,8$ Hz)	d (3H)	CH_3
15,7	9^{a)}	0,80 ($^3J = 6,8$ Hz)	d (3H)	CH_3
12,6	10	1,82	s (3H)	CH_3
51,7	11	3,72	s (3H)	CH_3

^{a)} Keine eindeutige Zuordnung

(5S,2E)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure-methylester

Der Methylester der 2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure vereinigt Strukturelemente der Novalsäure (C-1 bis C-4, C-10, s. Tabelle 2-6) und des 3,4-Dimethylpentansäuremethylesters (Alkylrest, s.o.). Aus diesem Grunde ergaben sich die in Tabelle 2-6 dargestellten Daten der unbekanntenen Verbindung bei einer Kombination der bekannten Spektren.

Das ^1H -breitbandenkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum des 2,5,6-Trimethyl-2-heptensäuremethylesters enthielt drei Signale im tiefen Feld sowie acht Signale im hohen Feld. Die tieffeldverschobenen Signale zeigten mit ähnlichen Resonanzverschiebungen wie im Novalsäure-Spektrum die drei sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatome (C-1, C-2, C-3) an. Zu diesem Strukturelement paßte das Singulett bei 12,6 ppm, das die (*E*)-konfigurierte Methylgruppe (C-10) anzeigte. Die gesättigten Kohlenstoffe ergaben im Hochfeldbereich ein analoges Muster wie im Spektrum der 3,4-Dimethylpentansäure. Die Anwesenheit des sekundären Kohlenstoffs (33,4 ppm) wurde über die DEPT-Sequenz bestätigt. Die Zuordnung der Signale für Methin-kohlenstoffe (C-5: 38,9 ppm, C-6: 32,0 ppm) konnte aufgrund von Inkrementberechnungen [28] getroffen werden.

Die Position der Doppelbindung am C-2 wurde mit diesem Spektrum eindeutig belegt. Die alternativen Möglichkeiten konnten aufgrund folgender Überlegungen ausgeschlossen werden: An der Position C-5 ergäben sich in Analogie zum Novalsäurespektrum Signale bei 152 ppm und 109 ppm (Tabelle 2-4). Läge die Doppelbindung zwischen C-4 und C-5, gäbe es kein Chiralitätszentrum am C-5. Damit wären die Methylgruppen im Isopropylrest chemisch äquivalent und würden nur ein Signal mit doppelter Intensität ergeben. Bei einer Doppelbindung in Position C-3 wäre kein sekundärer Kohlenstoff in der DEPT-Sequenz sichtbar.

Auch im ^1H -NMR-Spektrum konnten augenfällige Ähnlichkeiten mit den Spektren der Novalsäure und des 3,4-Dimethylpentansäuremethylesters festgestellt werden. Das einzige olefinisch gebundene Proton (C-3) koppelte mit den Protonen der benachbarten Methylengruppe (C-4) zu einem Triplett im tiefen Feld (6,78 ppm). Alle weiteren Signale befanden sich im hohen Feld und ergaben ein ähnliches Muster wie im Spektrum des 3,4-Dimethylpentansäuremethylesters (Tabelle 2-5). Die wesentlichen Unterschiede waren ein zusätzliches Singulett bei 1,82 ppm, das die allylische Methylgruppe (C-10) anzeigte, sowie eine zusätzliche Kopplung der

Methylenprotonen (C-4) mit dem benachbarten olefinischen Proton zu Multipletts bei 2,20 ppm und 2,00 ppm.

2.1.2.2 Massenspektren

2.1.2.2.1 Aldehyde

Die Massenspektren der (*Z*)/(*E*)-isomeren Aldehyde Isonovalal und Novalal unterschieden sich nur geringfügig in den Intensitäten der einzelnen Fragment-Ionen. Die Molekül-Ionen (m/z 152) waren hier, wie auch generell bei aliphatischen Aldehyden, intensitätsschwach [30]. Die Aldehydgruppe wurde durch die nach α -Spaltung an der Carbonylgruppe entstehenden Fragmente m/z 123 und m/z 151 erkennbar. Das stabilste Ion (m/z 109) entstand jedoch durch Abspaltung der Isopropylgruppe (Abb 2-6 und Abb. 2-7). Aus diesem Fragment ergab sich die Ionenserie m/z 109, 95, 81 durch Verlust von Methylengruppen (CH_2). Alternativ dazu fand die für Aldehyde typische Wasserabspaltung statt (m/z 91). Der Verlust eines Wassermoleküls war auch die Ursache für die Fragmentierung des Ions m/z 137 ($M^+ - \text{CH}_3$) zu m/z 119.

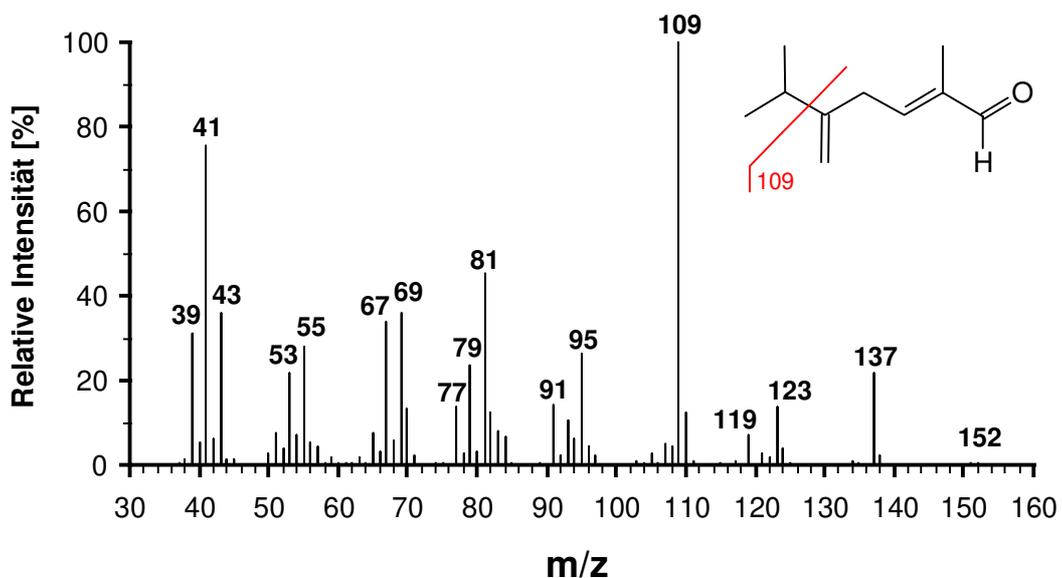


Abb. 2-6 MS-Spektrum von (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienal (Novalal)

Als zuverlässigstes Kriterium für die Unterscheidung dieser Aldehyde während der Routineanalytik erwies sich der Quotient der Intensitäten der Massen m/z 123 und m/z 119. Er war bei Novalal stets > 1 , bei Isonovalal < 1 . Vergleichsspektren waren verfügbar [11] und zeigten auch eine gute Übereinstimmung mit den hier ermittelten Werten, jedoch waren die Literaturdaten nicht ausreichend detailliert, um eine eindeutige Zuordnung zur (*Z*)- oder (*E*)-Konfiguration zu ermöglichen. Eine abschließende Identifizierung war deshalb erst nach Ermittlung der UV-Maxima (s. Abschnitt 2.1.2.4) möglich. Zusätzlich wurden die Aldehyde zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert (s. Abschnitt 4.2.5.1) und anschließend die Massenspektren verglichen.

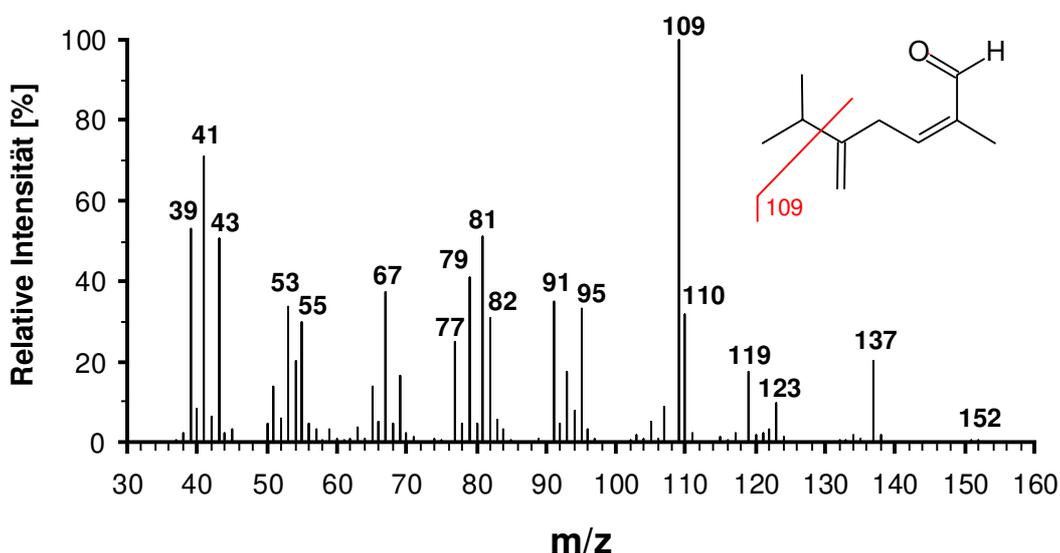


Abb. 2-7 MS-Spektrum von (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienal (Isonovalal)

Die Produktisolate enthielten in geringen Mengen zwei weitere Aldehyde mit einem Molekulargewicht von 152 Da und praktisch identischen MS-Spektren. Sie zeigten weitgehende Übereinstimmungen mit den Spektren von Novalal und Isonovalal. Auffallend war jedoch die größere Intensität des Molekülions (24 % bzw. 12 %) und eine geringere Tendenz zur α -Spaltung an der Carbonylgruppe (m/z 123 und m/z 151, s. Tabelle 2-7). Beides wies auf eine erhöhte Stabilität dieser Moleküle im Vergleich zu Novalal und Isonovalal hin. Damit lag der Schluß nahe, daß es sich hier um zwei durchkonjugierte Isomere des 2,5,6-Trimethylhepta-2,4-dienals handeln könnte [12].

Für diese Verbindung gibt es vier isomere Strukturen. Der (2*E*,4*Z*)- und der (2*Z*,4*Z*)-Aldehyd sind nicht literaturbekannt. Jedoch wurden der (2*E*,4*E*)- und der (2*Z*,4*E*)-Aldehyd bereits als Nebenprodukte der biotechnologischen Gewinnung von Isonovalal mit *P. fluorescens* beschrieben und als Neovalal und Neoisonovalal bezeichnet [13]. Die Identifizierung basierte allerdings allein auf ¹H-NMR-Daten. Die einzigen verfügbaren massenspektrometrischen Vergleichsdaten stammten aus einer chemischen Synthese des (2*E*,4*E*)-Isomers [31]. Für den Molekülpeak wurde hier die relative Intensität 21 % angegeben. Wahrscheinlich handelte es sich also bei Aldehyd 1 um (2*E*,4*Z*)-2,5,6-Trimethylhepta-2,4-dienal und bei Aldehyd 2 um das (2*E*,4*E*)-Isomer (s. Tabelle 2-7). Auf eine weitergehende Identifizierung dieser Aldehyde wurde verzichtet, da sie nur in geringen Mengen auf rein chemischem Weg entstanden (s. Abschnitt 2.1.3.3.1).

Tabelle 2-7 Wichtige Fragmentationen aus den Massenspektren der Aldehyde

Fragment-Ion <i>m/z</i>	Relative Intensität [%]			
	Novalal	Isonovalal	Aldehyd 1	Aldehyd 2
109	100	100	100	100
110	12	32	15	30
119	7,3	18	1,4	2,7
122	1,9	3,4	3,7	6,9
123	14	9,6	1,4	2,7
137	22	20	6,5	13
151	0,54	0,27	-	-
152	0,59	0,51	12	24

2.1.2.2.2 Alkohole

Im Gegensatz zu den korrespondierenden Aldehyden unterschieden sich die (Z)/(E)-isomeren Alkohole Isonovalol und Novalol eindeutig in ihren Massenspektren.

Aufgrund der (Z)-Konfiguration der Doppelbindung war beim Isonovalol (s. Abb. 2-8) die Wasserabspaltung aus dem Molekül-Ion sterisch begünstigt (*m/z* 136). Die anschließende Abspaltung eines Methyl- bzw. Isopropylrestes führte zu den gleichen Fragment-Ionen wie beim Novalol (*m/e* 121 bzw. *m/z* 93 und *m/z* 43),

jedoch mit deutlich höheren Intensitäten. Da der Sauerstoff durch Eliminierung von Wasser schnell verloren ging, erschienen sauerstoffhaltige Fragmente im Isonovalol-Spektrum nur mit geringen Intensitäten (m/z 81).

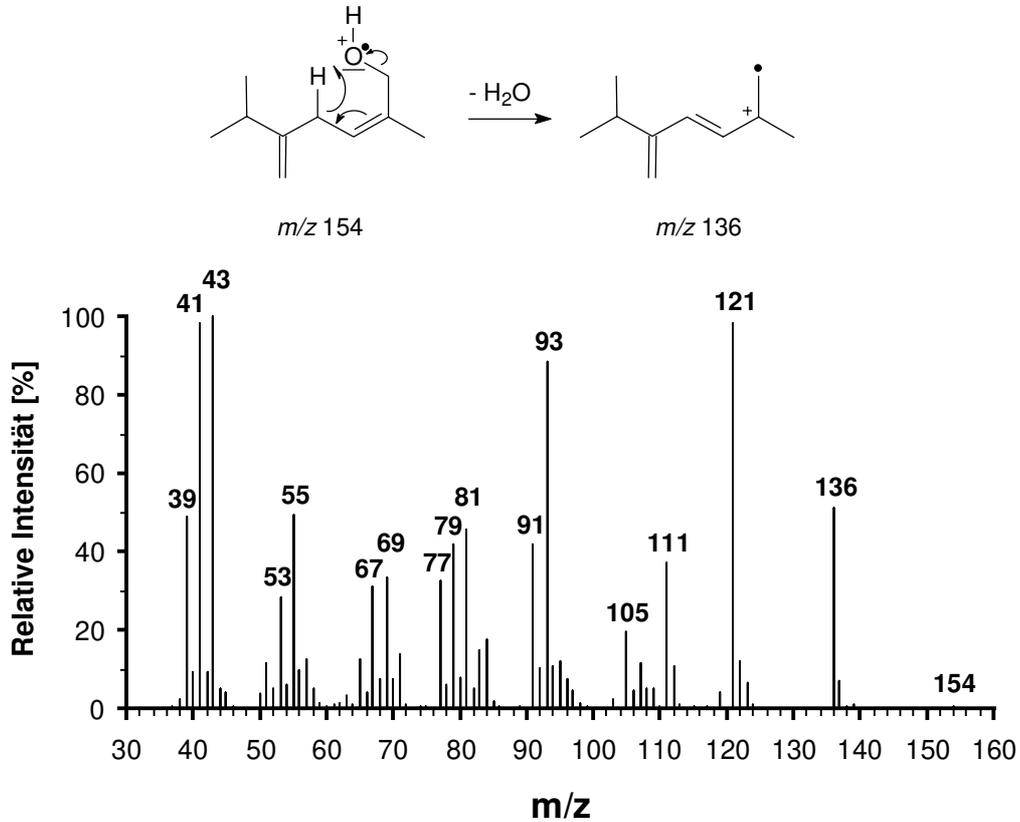


Abb. 2-8 MS-Spektrum von (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienol (Isonovalol)

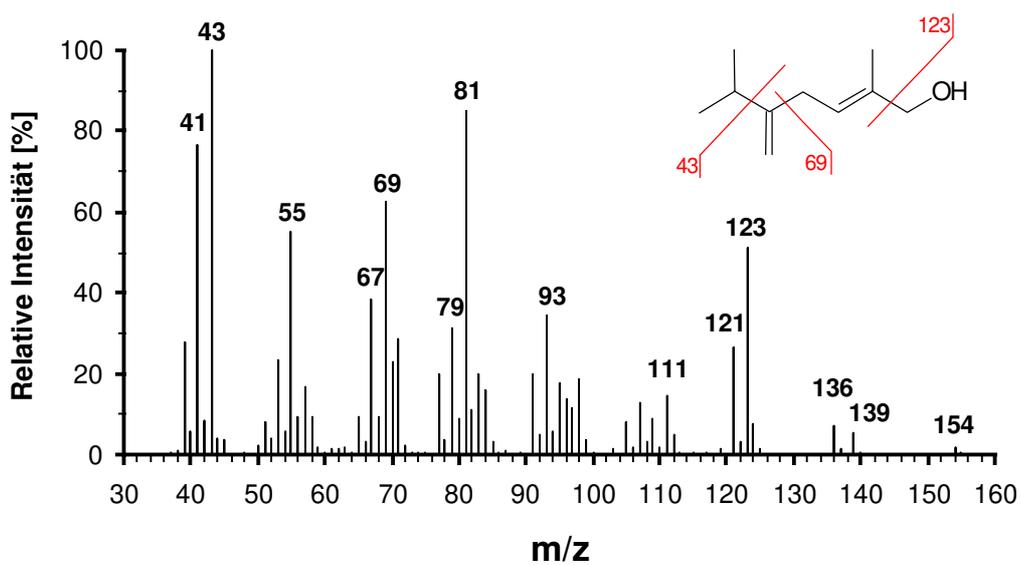


Abb. 2-9 MS-Spektrum von (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienol (Novalol)

Die direkte Eliminierung von Wasser aus dem Molekül-Ion (m/z 154 \rightarrow m/z 136) war beim (*E*)-konfigurierten Novalol stereochemisch nicht begünstigt. Die Wasserabspaltung spielt nur eine untergeordnete Rolle als Folgeschritt nach dem Verlust der Methyl- (m/z 139 \rightarrow m/z 121) oder Isopropylgruppe (m/z 111 \rightarrow m/z 93). Beim Novalol stand die α -Spaltung an der Alkoholfunktion im Vordergrund (m/z 123). Der Isopropylrest wurde als Ion (m/z 43) und weniger als beim korrespondierenden Aldehyd als neutrales Radikal (m/z 111) abgespalten. Das intensivste Ion entstand also erst nach der α -Spaltung. Der zweite Fragmentierungsweg führt nach dem Verlust des Isopropylradikals zu einem thermodynamisch stabilen, wahrscheinlich durchkonjugiertem cyclischen Fragment C_5H_5O (m/z 81).

Auch in der Alkoholfraktion wurden zwei weitere Substanzen mit dem Molekulargewicht 154 Da detektiert (MS-Spektren s. Tabelle 2-8). Aus den bereits in Abschnitt 2.1.2.2.1 dargelegten Überlegungen dürfte es sich auch hier um konjugierte Isomere des Novalols und des Isonovalols handeln (2,5,6-Trimethylhepta-2,4-dienole).

Tabelle 2-8 Fragment-Ionen aus den Massenspektren der Alkohole

Fragment-Ion <i>m/z</i>	Relative Intensität [%]	
	Alkohol 1	Alkohol 2
41	75	75
43	100	100
55	73	75
69	75	80
81	48	50
91	37	41
93	39	44
111	44	48
121	47	59
123	17	17
136	5,3	6,6
154	44	56

2.1.2.2.3 Säuren und Ester

Novalsäure und Isonovalsäure

Die Massenspektren von (*E*)- und (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-diensäure (Novalsäure und Isonovalsäure) und ihrer Methylester sind literaturbekannt [25, 26, 32], aber nicht ausreichend detailliert, um für sich eine zweifelsfreie Zuordnung zu den sauren Transformationsprodukten zu erlauben. Im Zusammenhang mit den NMR-Spektren der Novalsäure (Abschnitt 2.1.2.1.2) sowie den IR-Spektren (Abschnitt 2.1.2.5.2) konnten die in Tabelle 2-9 dargestellten MS-Spektren zweifelsfrei den genannten Verbindungen zugeordnet werden.

Tabelle 2-9 Fragment-Ionen aus den Massenspektren der 2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-diensäuren und -methylester

Fragment-Ion <i>m/z</i>	Relative Intensität [%]			
	Novalsäure	Isonovalsäure	Novalsäure- methylester	Isonovalsäure- methylester
41	100	100	84	34
69	42	17	45	8,4
79	29	36	49	23
81	31	27	74	19
91	20	26	29	19
107	24	28	70	51
123	18	7,1	51	11
125	65	92	20	10
139	0,71	0,46	100	100
151	0,60	0,15	16	1,5
153	3,7	2,8	1,0	0,32
167	-	-	6,8	3,0
168	2,2	1,7	0,82	0,03
182	-	-	6,0	0,06

Einfach ungesättigte 2,5,6-Trimethylheptansäuren

Aus dem Abbau der Novalsäure konnten insgesamt vier einfach ungesättigte Säuren mit einem Molekulargewicht von 170 Da ermittelt werden (Abschnitt 2.1.1.1.3). Eine Zuordnung der Strukturen **(1)**–**(4)** erfolgte aufgrund des Fragmentierungsmusters der korrespondierenden Methylester.

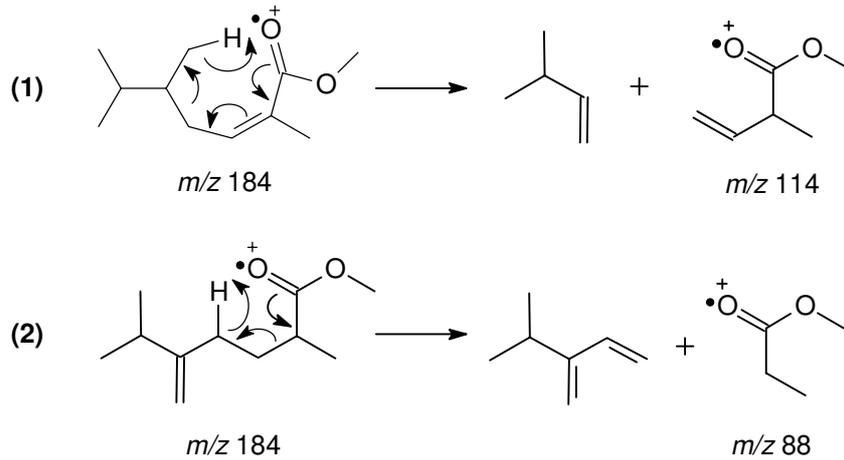
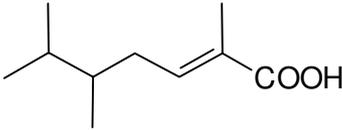
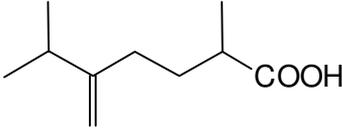
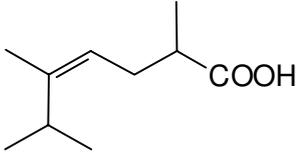
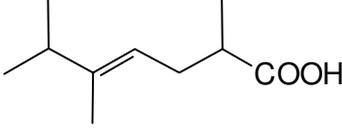


Abb. 2-10 Mögliche McLafferty-Umlagerungen bei einfach ungesättigten 2,5,6-Trimethyl-heptensäuremethylestern

Bei gesättigten Methylestern führte die Fragmentierung zunächst über eine McLafferty-Spaltung [30]. Aufgrund der detektierten Hauptfragmentierungsprodukte konnte eine Zuordnung der Strukturen **(1)** und **(2)** getroffen werden (Abb. 2-10). Struktur **(1)** wurde durch NMR-Spektren bestätigt (Tabelle 2-6).

Die Massenspektren der Methylester von Säure **(3)** und **(4)** waren fast identisch (Tabelle 2-10). Sie könnten entweder zu (*E*)/(*Z*)-Isomeren des 2,5,6-Trimethyl-4-heptensäuremethylesters oder (*E*)/(*Z*)-Isomeren bzw. Diastereomeren des 2,5,6-Trimethyl-3-heptensäuremethylesters gehören. Für einen 2,5,6-Trimethyl-3-heptensäuremethylester ist ein Vergleichsspektrum verfügbar [32]. Die Hauptfragmentierung führte hier zum Ion m/z 86. Dieses Ion war in den Spektren der hier beschriebenen Ester nicht zu finden. Damit war es wahrscheinlich, daß hier die (*E*)/(*Z*)-Isomeren der 2,5,6-Trimethyl-4-heptensäuremethylester vorlagen. Die korrespondierenden Säuren waren mit dem zur Verfügung stehenden gaschromatographischen System nicht trennbar.

Tabelle 2-10 Fragment-Ionen aus den Massenspektren der einfach ungesättigten 2,5,6-Trimethyl-heptensäuren und -methylester

Strukturvorschlag	MS Säure	MS Methylester
<p>(1) (<i>E</i>)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure</p> 	170 (1,8%), 152 (2,2 %), 113 (2,5 %), 109 (3,8 %), 100 (44 %), 84 (22 %), 71 (47 %), 69 (16 %), 55 (20 %), 43 (100 %), 41 (32 %)	184 (3,2 %) 153 (8,4 %), 141 (3,0 %), 127 (2,4 %), 114 (79 %), 109 (11 %), 101 (20 %), 99 (17 %), 84 (36 %), 82 (27 %), 71 (47 %), 69 (29 %), 55 (28 %), 43 (100 %), 41 (42 %).
<p>(2) 2-Methyl-5-isopropyl-5-hexensäure</p> 	170 (5,7 %), 152 (5,6 %), 137 (2,3 %), 109 (12 %), 97 (53 %), 96 (45 %), 84 (18 %), 83 (21 %), 81 (33 %), 74 (45 %), 69 (56 %), 67 (26 %), 55 (100 %), 45 (22 %), 43 (29 %), 41 (79 %)	184 (2,8 %) 153 (7,7 %), 124 (5,7 %), 109 (18 %), 97 (40 %), 96 (27 %), 88 (100 %), 81 (22 %), 69 (40 %), 57 (30 %), 55 (61 %), 41 (52 %).
<p>(3) (<i>Z</i>)-2,5,6-Trimethyl-4-heptensäure</p> 		184 (3,7 %) 152 (7,4 %), 141 (17 %), 125 (11 %), 109 (34 %), 97 (29 %), 88 (60 %), 85 (100 %), 81 (39 %), 70 (26 %), 69 (37 %), 67 (40 %), 59 (31 %), 55 (68 %), 41 (59 %).
<p>(4) (<i>E</i>)-2,5,6-Trimethyl-4-heptensäure</p> 		184 (4,6 %) 152 (8,6 %), 141 (19 %), 125 (13 %), 109 (36 %), 97 (30 %), 88 (61 %), 85 (100 %), 81 (38 %), 70 (26 %), 69 (36 %), 67 (39 %), 59 (29 %), 55 (64 %), 41 (53 %).

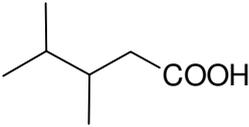
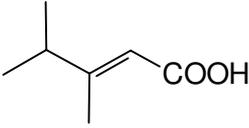
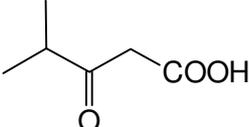
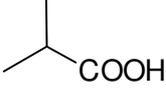
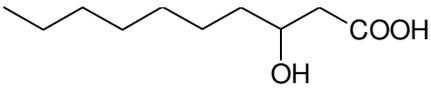
Abbauprodukte aus der β -Oxidation

Das mengenmäßig bedeutendste β -Oxidationsprodukt der Novalsäure war die 3,4-Dimethylpentansäure (Tabelle 2-11). Die Struktur konnte eindeutig anhand von Vergleichsspektren des Methylesters [29, 32] und der freien Säure [33] zugeordnet und über NMR (Tabelle 2-5) bestätigt werden.

Die 3,4-Dimethyl-2-pentensäure wurde nur in geringen Mengen gebildet, die nicht für eine Isolierung ausreichen. Sie ist jedoch als weiterer Metabolit des Säure-

abbaus von Bedeutung. MS-Spektren der (*E*)- und (*Z*)-3,4-Dimethyl-2-pentensäure-methylester sind literaturbekannt [24a] und stimmten gut mit den erhaltenen Daten überein. Eine Zuordnung zur (*E*)- oder (*Z*)-Konfiguration war aber allein aufgrund der Massenspektren nicht möglich. Die Position der Doppelbindung wurde mit Hilfe eines Vergleichsspektrums des strukturanalogen Methylesters der 3-Isopropyl-3-butensäure (Basispeak m/z 83) [25], der die Doppelbindung als Methylidenrest in Position 3 enthält, abgesichert.

Tabelle 2-11 Fragment-Ionen aus den Massenspektren der Abbauprodukte der Novalsäure

Strukturvorschlag	MS Säure	MS Methylester
3,4-Dimethylpentansäure 	130 (0,06 %), 97 (4 %), 88 (30 %), 73 (100 %), 71 (72 %), 70 (37 %), 69 (29 %), 60 (20 %), 55 (27 %), 43 (73 %), 41 (65 %), 39 (28 %).	144 (0,1 %), 129 (2 %), 113 (29 %), 101 (45 %), 87 (82 %) 74 (100 %), 71 (63 %), 69 (60 %), 59 (70 %), 55 (43 %), 43 (79 %), 41 (71 %).
3,4-Dimethyl-2-pentensäure 	128 (36 %), 113 (55 %), 95 (41 %), 83 (74 %), 69 (30 %), 67 (69 %), 59 (45 %), 55 (77 %), 43 (73 %), 41 (100 %), 39 (74 %)	142 (44 %), 127 (52 %), 111 (55 %), 95 (61 %), 83 (95 %), 67 (81 %), 55 (100 %), 43 (53 %), 41 (94 %), 39 (68 %)
4-Methyl-3-ketopentansäure 		144 (14 %), 112 (6 %), 101 (61 %), 74 (13 %), 71 (36 %), 69 (25 %), 60 (11 %), 59 (29 %), 57 (16 %), 45 (29 %), 43 (100 %), 41 (27 %)
2-Methylpropansäure 	kein Molekülion 92, 88 (5,2 %) 73 (27 %), 55 (10 %), 45 (29 %), 43 (100 %), 41 (72 %), 39 (43 %)	
3-Hydroxydecan-säure 		Kein Molekülion 202, 153 (2,0 %), 152 (1,7 %), 103 (70%), 74 (28 %), 73 (16 %), 71 (46 %), 69 (20 %), 61 (19 %), 59 (14 %), 57 (18 %), 55 (30 %), 43 (100 %), 41 (71 %)

Die Chromatogramme der Methylester enthielten einen weiteren Ester, dessen Molekülion im Spektrum bei m/z 144 erschien. Die Fragmentierung zeigte ein analoges Muster wie bekannte β -Ketoester. Auch der vergleichsweise hohe Kovats-Index (s. Abschnitt 2.1.2.3) kann durch das Vorliegen der Substanz in der thermodynamisch bevorzugten Enol-Struktur begründet werden. Es handelte sich hier wahrscheinlich um den Methylester der 4-Methyl-3-ketopentansäure, die als Zwischenprodukt des Abbaus der 3,4-Dimethylpentansäure diskutiert wird (s. Abschnitt 3.2.4.5.2).

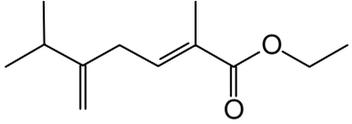
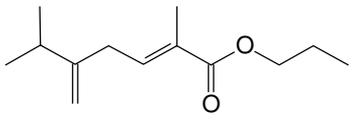
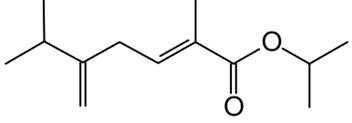
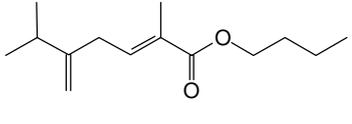
Für die kurzkettigen Säuren 2-Methylpropansäure und Essigsäure existierten ausführliche Daten in MS-Referenzdateien (s. Abschnitt 4.2.7.3.4) und Kovats-Index-Sammlungen (s. Abschnitt 2.1.2.3), so daß eine zweifelsfreie Identifizierung erfolgte.

Der Methylester der 3-Hydroxydecansäure war in geringen Mengen Bestandteil aller methylierter Säureextrakte. Obwohl er kein direktes β -Oxidationsprodukt der Novalsäure war, soll er in diesem Zusammenhang mit aufgeführt werden. Die Zuordnung der Struktur erfolgte über Vergleichsspektren aus den Referenzdateien (s. Abschnitt 4.2.7.3.4) und einem Literaturspektrum [22].

Höhere Ester der Novalsäure

Die Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, und Butylester der Novalsäure wurden durch Synthese erhalten (s. Abschnitt 4.2.5.4). Die Fragmentierung verlief prinzipiell wie die des Methylesters (s. o.). Bei höheren Estern gewann jedoch auch die McLafferty-Fragmentierung zur freien Säure (m/z 168) an Bedeutung (Tabelle 2-12).

Tabelle 2-12 Fragment-Ionen aus den Massenspektren der höheren Ester der Novalsäure

Verbindung	Struktur	Massenspektrum
Novalsäure-ethylester		196 (1,6 %), 153 (29 %), 151 (13 %), 125 (25 %), 123 (37 %), 107 (32 %), 95 (19 %), 81 (76 %), 79 (31 %), 70 (25 %), 69 (44 %), 67 (37 %), 55 (34 %), 53 (29 %), 43 (66 %), 41 (100 %), 39 (35 %)
Novalsäure-1-propylester		210 (6,9 %), 168 (10 %), 167 (52 %), 151 (44 %), 125 (100 %), 123 (82 %), 122 (33 %), 112 (23 %), 111 (23 %), 108 (12 %), 107 (42 %), 95 (26 %), 81 (80 %), 79 (30 %), 70 (29 %), 69 (47 %), 67 (32 %), 55 (27 %), 53 (22 %), 43 (95 %), 41 (93 %), 39 (25 %)
Novalsäure-2-propylester		210 (1,5 %), 168 (27 %), 167 (16 %), 151 (37 %), 125 (100 %), 123 (69 %), 112 (17 %), 111 (22 %), 109 (16 %), 107 (30 %), 95 (23 %), 81 (67 %), 79 (26 %), 70 (27 %), 69 (39 %), 67 (29 %), 55 (24 %), 43 (87 %), 41 (72 %), 39 (24 %)
Novalsäure-1-butylester		224 (1,7 %), 181 (15 %), 151 (14 %), 125 (70 %), 123 (51 %), 122 (19 %), 112 (13 %), 111 (15 %), 107 (25 %), 95 (20 %), 81 (58 %), 79 (22 %), 70 (26 %), 69 (40 %), 67 (26 %), 57 (32 %), 55 (33 %), 53 (19 %), 43 (45 %), 41 (100 %), 39 (24 %)

Acylderivate von Novalol

Die Novylester der Essigsäure, Propansäure und 2-Methylpropansäure wurden synthetisiert (s. Abschnitt 4.2.5.2). Die wichtigsten Fragment-Ionen (Tabelle 2-13) entstanden erwartungsgemäß bei der Abspaltung des Isopropylrests (m/z 43) oder des Acylrests (m/z 43 bzw. m/z 57 bzw. m/z 71). Weiterhin von Bedeutung war die Abspaltung der freien Säure im Zusammenhang mit Protonenshifts (Abb. 2-11).

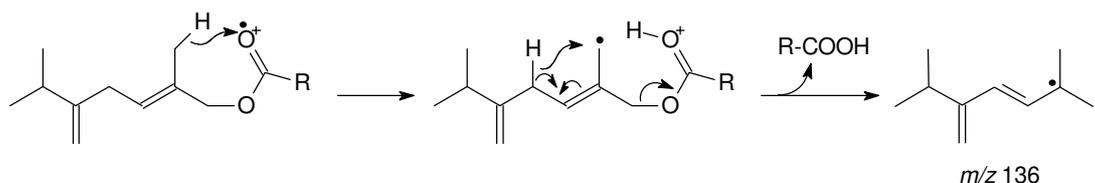


Abb. 2-11 Vorschlag für die Bildung des Fragments m/z 136 durch Protonenshifts bei acylierten Novalolen

Tabelle 2-13 Massenspektren der Acylderivate von Novalol

Verbindung	Struktur	Massenspektrum
Essigsäure-novylester		196 (0,1 %), 136 (45 %), 121 (68 %), 111 (14 %), 107 (10 %), 93 (60 %), 91 (17 %), 81 (16 %), 79 (22 %), 77 (14 %), 69 (15 %), 67 (14 %), 55 (13 %), 53 (14 %), 43 (100 %), 41 (29 %)
Propansäure-novylester		210 (0,1%), 167 (0,3 %), 154 (1,5 %), 136 (67 %), 122 (11 %), 121 (91 %), 111 (19 %), 107 (15 %), 93 (82 %), 91 (23 %), 81 (19 %), 79 (29 %), 77 (17 %), 69 (19 %), 67 (19 %), 57 (100 %), 55 (17 %), 53 (18 %), 43 (31 %), 41 (43 %)
2-Methyl-propansäure-novylester		224 (0,1%), 181 (0,4 %), 154 (1,2 %), 136 (54 %), 122 (11 %), 121 (91 %), 107 (14 %), 95 (11 %), 93 (80 %), 91 (19 %), 81 (19 %), 79 (27 %), 77 (16 %), 71 (72 %), 69 (20 %), 67 (17 %), 55 (17 %), 53 (18 %), 43 (100 %), 41 (58 %)

2.1.2.2.4 Weitere Produkte

Campholenaldehyd, (*E*)-Sobrerol, (*Z*)- und (*E*)-Carveol sind als Umlagerungsprodukte von (-)- α -Pinenoxid in saurer Lösung bekannt [20, 34]. Vergleichsspektren aus verschiedenen MS-Referenzdateien (s. Abschnitt 4.2.7.3.4) genügten im Zusammenhang mit den Kovats-Indices für eine eindeutige Identifizierung der Verbindungen.

Die Identifizierung von Thujon erfolgte ebenfalls aufgrund mehrerer Spektren der Referenzdateien. Da sich die Massenspektren von α - und β -Thujon nicht signifikant

unterscheiden, wurde zusätzlich eine authentische Probe untersucht, die α - und β -Thujon aus Zedernblätternölen enthielt. In Zusammenhang mit den Kovats-Indices (s. Abschnitt 2.1.2.3) konnte eine eindeutige Zuordnung des Transformationsprodukts zu der Struktur (*1S,4S,5R*)-(+)- β -Thujon (Isothujon) erfolgen.

2.1.2.3 Kovats-Indices

Tabelle 2-14 Kovats-Indices

Substanz	KI (CW 20M)	KI (SE 54)
3,4-Dimethylpentansäure	1861	-
3,4-Dimethylpentansäuremethylester	1212	965
3,4-Dimethyl-2-pentensäure	1889	-
3,4-Dimethyl-2-pentensäuremethylester	1267	-
Essigsäure-novylester	1651	-
3-Hydroxydecansäure-methylester	2052	-
Isonovalal	1483	1161
Isonovalol	1712	-
Isonovalsäure-methylester	1503	-
Isonovalsäure	2197	-
2-Methy-5-Isopropyl-5-hexensäure	2142	-
2-Methy-5-Isopropyl-5-hexensäuremethylester	1453	-
4-Methyl-3-ketopentansäure	1504	-
2-Methyl-propansäure-novylester	1715	-
Neonovalal	1677	-
Novalal	1501	1167
Novalol	1759	1191
Novalsäure	2269	1342
Novalsäure-1-butylester	1816	-
Novalsäure-ethylester	1663	-
Novalsäure-methylester	1605	1274
Novalsäure-1-propylester	1722	-
Novalsäure-2-propylester	1622	-
Propansäure-novylester	1710	-
(<i>E</i>)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure	2245	-
(<i>E</i>)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäuremethylester	1575	1291
(<i>E</i>)-2,5,6-Trimethyl-4-heptensäuremethylester	1416	-
(<i>Z</i>)-2,5,6-Trimethyl-4-heptensäuremethylester	1408	-

Für die während dieser Arbeit identifizierten und teilidentifizierten Substanzen wurden die Retentionsindices für CW 20M und zum Teil auch für SE 54 ermittelt

(Tabelle 2-14). Sie wurden zusammen mit dem Massenspektrum in der institutseigenen Referenzdatei abgelegt und im Verlauf dieser Arbeit zur routinemäßigen Identifizierung der Produktisolate verwendet.

Die in Tabelle 2-15 aufgeführten Kovats-Indices dienen zur Identifizierung bekannter Verbindungen. Als Referenzen wurde neben den publizierten Sammlungen [35, 36, 37] eine institutseigene Referenzdatei und authentische Proben verwendet.

Tabelle 2-15 Kovats-Indices zur Produktidentifizierung

Substanz	KI (CW 20M)	KI (CW 20 M) Referenz
Campholenaldehyd	1465	1465
(<i>E</i>)-Carveol	1810	1824
(<i>Z</i>)-Carveol	1818	1854
Essigsäure	1402	1410
2-Methyl-propansäure	1538	1535
(<i>E</i>)-Sobrerol	2278	2278
α -Thujon	-	1405
		1100 (SE 54)
β -Thujon	1419	1421
	1117 (SE 54)	1112 (SE 54)

2.1.2.4 UV-Spektren

Die UV-Spektroskopie lieferte für die Strukturanalyse der 2-Methyl-5-isopropylhexadien-Verbindungen wichtige Informationen über die Lage der Doppelbindungen. Die Analyse der Proben erfolgte nach der Vortrennung in die Säurefraktion, Alkoholfraktion und Aldehydfraktion mittels RP-HPLC und Diodenarray-Detektion (s. Abschnitte 4.2.3.1.5 und 4.2.7.2).

Ausgehend von publizierten Daten konnten die isolierten Aldehyde eindeutig der (*Z*)- bzw. (*E*)-Konfiguration zugeordnet werden. Das UV-Maximum von Novalal lag zwischen 229 nm in Ethanol und 235 nm in Wasser [26]. Isonovalal absorbierte im längerwelligen Bereich zwischen 235 nm in Ethanol und 242 nm in Wasser. Die ermittelten UV-Maxima der Aldehyde lagen bei 232 nm und 236 nm. Da beide

Spektren aufgrund der gleichen Retentionszeit während der HPLC-Trennung im gleichen Lösungsmittelgemisch (76 % Methanol) gemessen wurden, konnte der Aldehyd mit $\lambda_{\max} = 232$ nm als (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienal (Novalal) und sein Isomer mit $\lambda_{\max} = 236$ nm als (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienal (Isonovalal) identifiziert werden.

Für alle anderen in Tabelle 2-16 aufgeführten Substanzen sollte durch die UV-Analyse sichergestellt werden, daß während der Synthese bzw. Biosynthese oder Produktisolierung keine Isomerisierung der isolierten Doppelbindung zu einem konjugierten System aufgetreten war.

Tabelle 2-16 UV-Maxima der 2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dien-Verbindungen mittels HPLC-DAD (Lösungsmittel: Methanol/Wasser)

Substanz	Methanol [%] ^{a)}	λ_{\max} [nm]
Novalal	76	232
Isonovalal	76	236
Novalol	74	202
Isonovalol	77	199
Novalsäure	65	213
Novalsäure-methylester	82	219
Novalsäure-ethylester	87	219
Novalsäure-1-propylester	91	219
Novalsäure-2-propylester	90	219
Novalsäure-1-butylester	95	219

^{a)} berechnet aus der Retentionszeit unter Berücksichtigung des Gradienten (s. Abschnitt 4.2.7.2)

Als Anhaltspunkt für die zu erwartenden Absorptionsmaxima der Säuren und Ester diente das für Isonovalsäure ermittelte UV-Maximum von 215 nm [25]. Eine zusätzliche konjugierte Doppelbindung würde eine bathochrome Verschiebung des Maximums um etwa 30 nm bewirken [38]. Die gemessenen Werte lagen zwischen 215 nm und 219 nm, so daß die Anwesenheit zweifach konjugierter Säuren und Ester ausgeschlossen werden konnte.

Die UV-Maxima der Alkohole Novalol und Isonovalol lagen erwartungsgemäß bei 199 nm bzw. 202 nm, da hier ausschließlich isolierte Doppelbindungen vorhanden waren.

2.1.2.5 Infrarot-Spektren

2.1.2.5.1 Novalol und Isonovalol

Die wesentlichen Strukturelemente der (*Z*)/(*E*)-isomeren Alkohole Isonovalol und Novalol konnten auch IR-spektroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 2-12 und 2-13). Beide Alkohole zeigten eine breite Bande zwischen 3200 cm^{-1} und 3600 cm^{-1} , die typisch für O-H-Valenzschwingungen in intermolekularen Wasserstoffbrücken ist. Die entsprechende Bande für die O-H-Deformationsschwingung war bei 1379 cm^{-1} zu sehen. Die C-O Valenzschwingung wurde zwischen 1000 und 1100 cm^{-1} angeregt.

Gesättigte C-H-Bindungen absorbierten zwischen 2870 - 2970 cm^{-1} (C-H-Valenzschwingungen) und bei 1460 cm^{-1} (C-H-Deformationsschwingungen). Die typischen symmetrischen Deformationsschwingungen der Methylgruppen im Isopropylrest bei 1390 cm^{-1} und 1370 cm^{-1} waren aufgrund der Überlagerung mit der O-H-Deformationsschwingung nur schwach zu erkennen.

Die Methylidengruppe (C-6) wurde durch typische Banden der C-H-Valenzschwingung bei 3083 cm^{-1} und der out-of-plane-Schwingung bei 891 cm^{-1} angezeigt. Aufgrund der Lage der Bande für die C=C-Valenzschwingung bei 1643 cm^{-1} wurde auch aus dem IR-Spektrum deutlich, daß beide Doppelbindungen isoliert vorlagen. Eine Zuordnung zur (*Z*)- oder (*E*)-Konfiguration war jedoch nicht möglich.

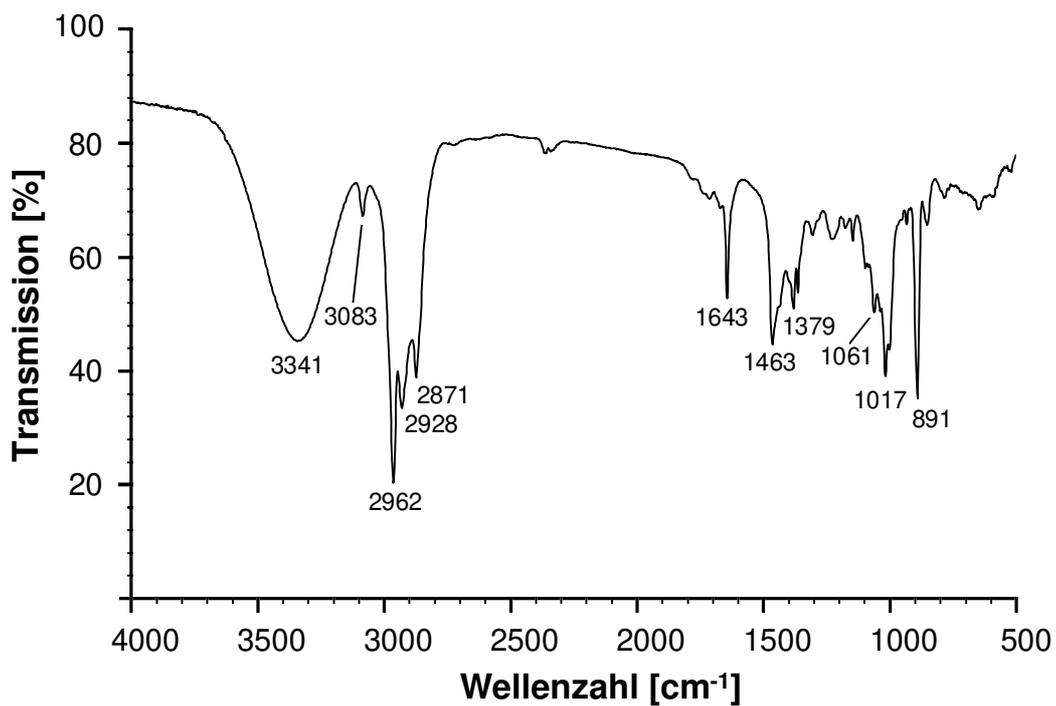


Abb. 2-12 IR-Spektrum von (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienol (Novalol) als KBr-Preßling

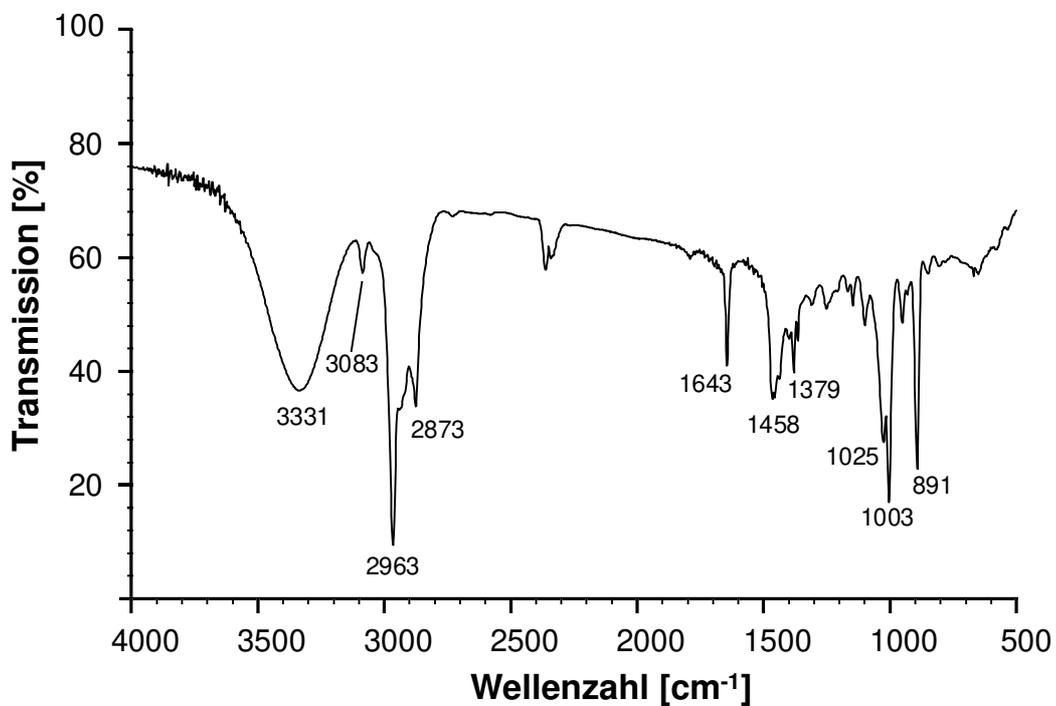


Abb. 2-13 IR-Spektrum von (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienol (Isonovalol) als KBr-Preßling

2.1.2.5.2 Novalsäure und Isonovalsäure

Bezogen auf das Kohlenwasserstoffgerüst zeigte das IR-Spektrum der (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-diensäure (Novalsäure) erwartungsgemäß die gleichen Banden wie die Alkohole (Tabelle 2-17). Die C=O-Valenzschwingung wurde in dem für α , β -ungesättigte Carbonsäuren typischen Bereich bei 1689 cm^{-1} angeregt. Die Banden für C-O-Valenzschwingungen waren bei 1284 cm^{-1} und 1136 cm^{-1} zu erkennen. Charakteristisch für Carbonsäuren war auch die breite Bande der dimeren Form um 3000 cm^{-1} , die durch Wasserstoffbrückenbindungen zweier Carbonylgruppen gebildet wird.

Tabelle 2-17 IR-Daten von Novalsäure, Novalsäuremethylester und Isonovalsäuremethylester als KBr-Preßling

Schwingung	Wellenzahl [cm^{-1}]		
	Novalsäure	Novalsäuremethylester	Isonovalsäuremethylester
(C-H)-Valenz (Methylidengruppe)	3085	3085	3085
(C-H)-Valenz (gesättigt)	2874-2964	2873-2962	2856-2959
(C=O)-Valenz (α , β -ungesätt.)	1689	1717	1721
(C=C)-Valenz	1644	1644	1641
(C-H)-Deformation	1421	1435	1423
C-O-Valenz	1284	1264	1259
	1136	1121	1127
(C-H) out-of-plane (Methylidengruppe)	895	894	893

Die IR-Spektren der Methylester wurden aufgenommen, um die Identität der (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-diensäure (Isonovalsäure) zu belegen. Dabei sollte insbesondere ausgeschlossen werden, daß es sich bei der Säure um eine konjugierte Form der Novalsäure handelte. Das Spektrum des (*Z*)-Methylesters zeigte, wie erwartet, weitgehende Übereinstimmungen mit dem des (*E*)-Methylesters. Die Anwesenheit der Methylidengruppe wurde in beiden Spektren deutlich durch Banden bei 3085 cm^{-1} und 894 bzw. 893 cm^{-1} angezeigt, so daß

sicher kein durchkonjugiertes Isomer vorlag. Im Zusammenhang mit dem MS-Spektrum und Literaturdaten [25, 32] wurde die korrespondierende Säure der Struktur (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-diensäure (Isonovalsäure) zugeordnet.

2.1.2.6 Polarimetrie und chirale Analyse

Die Methylester von 3,4-Dimethylpentansäure und 2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure wurden auf optische Aktivität untersucht (s. Abschnitt 4.2.9). Beide Ester erwiesen sich als optisch aktiv und verursachten eine Linksdrehung linear polarisierten Lichts. Aufgrund von Literaturdaten konnte die 3,4-Dimethylpentansäure damit der (*S*)-(-)-Struktur zugeordnet werden [29]. Da die 3,4-Dimethylpentansäure ein Produkt der β -Oxidation der (*E*)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure ist, war davon auszugehen, daß auch diese Säure in der (*S*)-(-)-Form vorlag (Abb. 2-14).

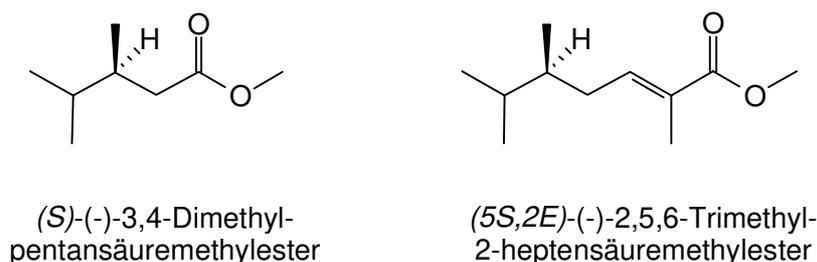


Abb. 2-14 Stereochemie der Abbauprodukte der Novalsäure

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurde versucht, die Ester auf einer chiralen Säule zu trennen (s. Abschnitt 4.2.7.3.5). Für beide Säuren wurde jeweils nur ein Peak erhalten. Zudem wurden die Methylester mit (-)-Menthol (99 % ee) umgeestert (s. Abschnitt 4.2.5.4) und sollten damit als diastereomere Menthylester auf einer nichtchiralen Phase zu trennen sein (s. Abschnitt 4.2.7.3.4). Auch mit dieser Methode wurde jeweils nur ein Peak erhalten.

Um nun auf eine 100 %-ige Enantiomerenreinheit zu schließen, ist es jedoch notwendig, die prinzipielle Durchführbarkeit der Trennung durch die genannten Methoden zu zeigen. Da jedoch kein Racemat erhältlich war oder synthetisiert wurde, war eine abschließende Bestimmung der Enantiomerenreinheit nicht möglich.

2.1.2.7 Teilzusammenfassung

Die aus der Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid mit ruhenden Zellen von *P. fluorescens* NCIMB 11671 primär entstehenden Produkte (*E*)- und (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienal (Novalal und Isonovalal) wurden aufgrund ihrer UV-Spektren und der MS-Spektren identifiziert. Die Konfiguration der korrespondierenden Säuren wurde mit NMR-, IR- und MS-Daten belegt.

Unter reduzierenden Bedingungen entstand der in einer Patentschrift [12] erwähnte Alkohol (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dienol (Novalol). Das (*Z*)-Isomer (Isonovalol) war noch nicht beschrieben. Die Entstehung beider Verbindungen wurde aufgrund von NMR-, IR-, UV- und MS-Daten gezeigt.

β -Oxidationsprodukte aus dem Abbau der Transformationsprodukte von (-)- α -Pinenoxid sind bisher noch nicht isoliert worden. Die Bildung von vier einfach ungesättigten Novalsäurederivaten konnte durch MS-Spektren belegt werden. Hiervon wurde die mengenmäßig bedeutendste Säure isoliert und aufgrund von NMR-Daten und polarimetrischen Untersuchungen als (*5S,2E*)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure identifiziert. Das Hauptprodukt der β -Oxidation war die (*S*)-(-)-3,4-Dimethylpentensäure. Die Identifizierung stützte sich auf NMR- und MS-Daten sowie auf polarimetrische Untersuchungen. Die Entstehung weiter Abbauprodukte wurde durch MS-Spektren gestützt.

Nebenprodukte der Transformation waren aufgrund von MS-Spektren wahrscheinlich (*Z*)- und (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,4-dienal (Neonovalal und Neoisonovalal) sowie die korrespondierenden Alkohole.

Die Bildung von β -Thujon konnte durch Vergleich mit MS-Daten und Kovats-Indices einer authentischen Probe nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden die Identität der synthetisch gewonnenen Ester der Novalsäure aufgrund der MS- und UV-Spektren überprüft. Die Synthese von Acylderivaten des Novalols wurde ebenfalls massenspektrometrisch belegt.

2.1.3 Stabilität von Isonovalal

Bei olfaktorischen Untersuchungen erwies sich Isonovalal als interessanter Aromastoff (s. Abschnitt 2.1.6). Im Hinblick auf eine biotechnologische Gewinnung von Isonovalal wurde zunächst seine Stabilität während eines Biotransformationsprozesses untersucht.

Isonovalal ist ein α,β -ungesättigter Aldehyd, der zugleich eine 1,4-Pentadien Struktur (C-2 - C-6) aufweist. Damit ist eine hohe C-H Acidität am C-4 gegeben, denn ein resultierendes Anion würde über vier mesomere Grenzstrukturen stabilisiert (s. Abb. 2-15).

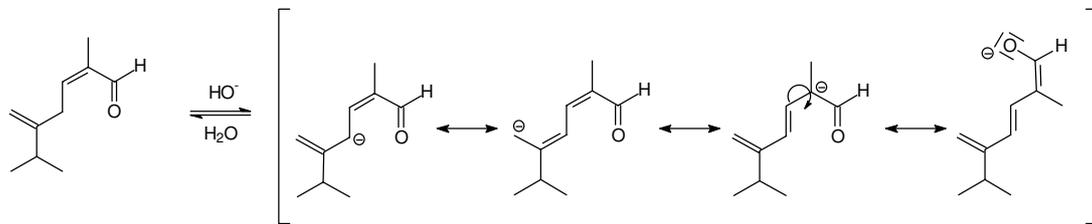


Abb. 2-15 Mesomere Grenzstrukturen für die deprotonierte Form von Isonovalal

Aus diesem Grunde wurde für diese Verbindung eine geringe Stabilität vor allem in alkalischer Lösung erwartet, die zur Isomerisierung in die thermodynamisch bevorzugte (*E*)-Konfiguration und zur Konjugation der isolierten Doppelbindung führen sollte.

Weiterhin bestand die Möglichkeit, daß die Aldehydfunktion mit freien primären Aminen aus Medienbestandteilen zu Schiffsbasen kondensierte oder mit Alkoholfunktionen Acetale bildete.

Schließlich sind α,β -ungesättigte Aldehyde für ihre Neigung zur Autoxidation und zur Disproportionierung bekannt.

2.1.3.1 pH-Stabilität

Ausgehend vom Transformationsmedium für die ruhenden Zellen, das aus 20 mmol L^{-1} Phosphatpuffer pH 7,5 bestand, wurde der mögliche Einfluß einer pH-Änderung des Mediums, hervorgerufen durch saure Metabolite, untersucht. Als Medien wurden dazu Phosphatpufferlösungen (20 mmol L^{-1}) auf pH 6,0 und pH 4,5 eingestellt. Um ein Gesamtbild zu erhalten, wurde außerdem eine Probe bei pH 9 untersucht. Alle Medien wurden mit 400 mg L^{-1} isoliertem Aldehyd (Novalal und Isonovalal im Verhältnis 1:20) versetzt und bei 30 °C unter Transformationsbedingungen geschüttelt. Als Ergebnis ist nur die Entwicklung der Novalalkonzentration dargestellt, da keine weiteren Produkte gefunden wurden.

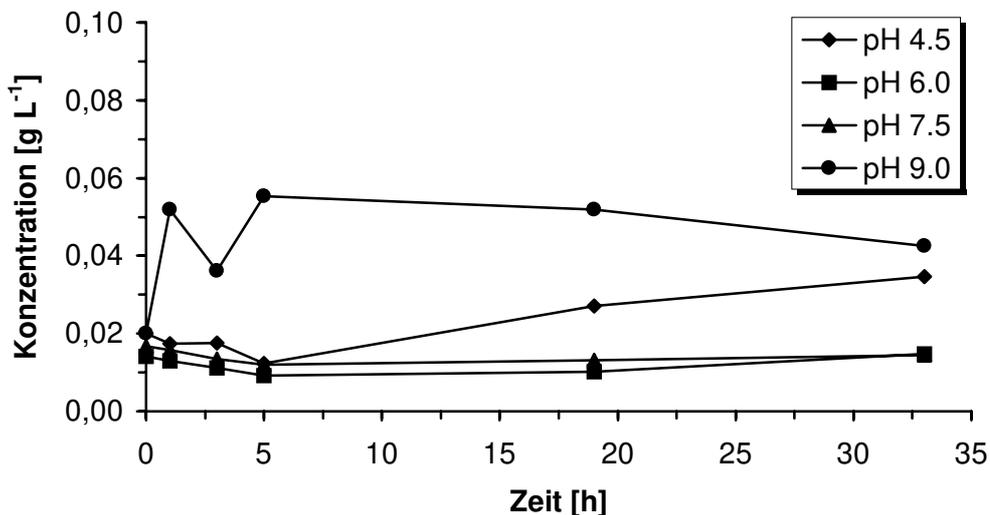


Abb. 2-16 Bildung von Novalal in einer 400 mg L^{-1} wäßrigen Lösung von Novalal und Isonovalal (1:20) bei verschiedenen pH-Werten

Bei pH 7,5 im Transformationspuffer war Isonovalal über den untersuchten Zeitraum hinweg stabil. Der im Hinblick auf die Stabilität von Pinenoxid gewählte pH-Wert des Mediums war also auch für die Produktstabilität optimal.

Eine leichte Säuerung (pH 6) führte erst nach 19 Stunden zu einer merkbaren (Z)/(E)-Isomerisierung. Jedoch wurde bei pH 4,5 eine deutliche Akkumulation von Novalal schon nach fünf Stunden sichtbar.

Die Protonierung von Isonovalal findet am Carbonyl-Sauerstoff statt. Durch die Konjugation der Carbonylgruppe ist eine positive Partiaalladung auch an den

Kohlenstoffatomen C-1 und C-3 lokalisiert. Die letzte Grenzstruktur zeigt eine freie Drehbarkeit um die C-2 – C-1-Bindung (s. Abb. 2-17), die bei der Rückreaktion eine Stabilisierung in der energetisch günstigeren (*E*)-Konfiguration bewirkt.

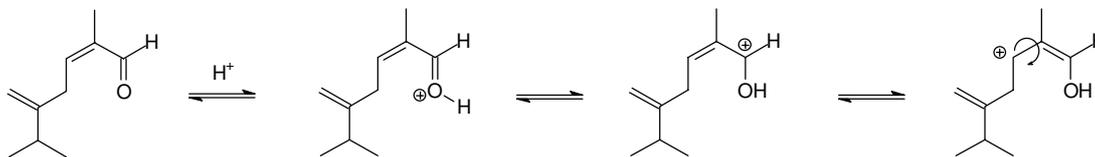


Abb. 2-17 Mechanismus der (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung von Isonovalal in saurer Lösung

Unter den hier eingestellten Bedingungen konnte eine vollständige Konjugation zum (*2E,4E*)-Aldehyd nicht beobachtet werden. Jedoch ist bekannt, daß in organischen Lösungsmitteln bei 130 °C in Anwesenheit von Säuren aus Isonovalal nur der (*2E,4E*)-Aldehyd entsteht [31].

Bei pH 9 wurde die schnelle Einstellung eines (*Z*)/(*E*)-Gleichgewichts beobachtet, das aber noch überwiegend auf der Seite des Isonovalals lag. Die erwartete vollständige Isomerisierung (s. o.) trat nicht ein.

2.1.3.2 Stabilität in Anwesenheit von Glycin

Bei Experimenten in 0,1 N Glycin-NaOH-Puffer pH 9 wurde eine vollständige Isomerisierung von Isonovalal zur (*E*)-Form Novalal beschrieben, gefolgt von einer langsamen Konjugation der Doppelbindung [26]. Da eigene Untersuchungen gezeigt hatten, daß der pH-Wert allein nicht die Ursache hierfür war (s. Abschnitt 2.1.3.1), wurde mit einem weiteren Experiment der Einfluß von Glycin auf die Stabilität von Isonovalal bei neutralem pH-Wert geklärt.

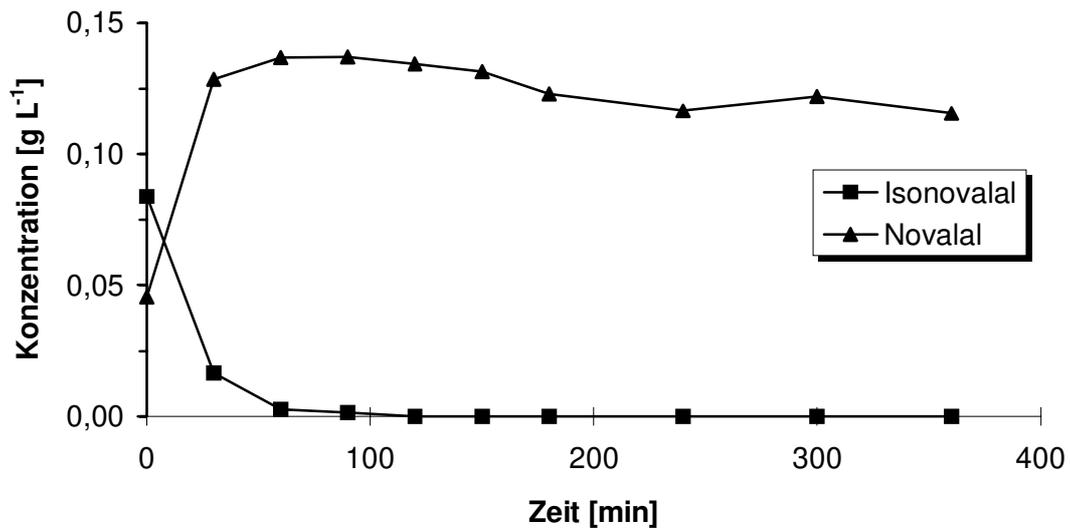


Abb. 2-18 Stabilität von Novalal und Isonovalal in einer Lösung von $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Glycin in Transformationspuffer (pH 7,3)

Isonovalal wurde in Anwesenheit von Glycin vollständig zu Novalal isomerisiert, wohingegen Novalal jedoch stabil blieb.

Der isoelektrische Punkt von Glycin liegt bei pH 6,0. Bei $\text{pH} > 6$ liegt die Aminogruppe überwiegend unprotoniert vor. Damit war eine maßgebliche Beteiligung der Aminogruppe an der Umsetzung wahrscheinlich. In Abb. 2-19 ist ein möglicher Mechanismus dargestellt, bei dem ein Angriff der Aminogruppe an der vinylogenen Carbonyl-Position (C-3) erfolgt. Dies führt zur freien Drehbarkeit der Bindung zwischen C-2 und C-3. Bei einer Rückreaktion würde sich die Doppelbindung in der thermodynamisch günstigeren (*E*)-Konfiguration stabilisieren. Die Addition desamins an die Doppelbindung konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch könnte eine Bildung dieser Produkte neben Schiffschen Basen (Angriff am C-1) die beobachteten Produktverluste verursachen.

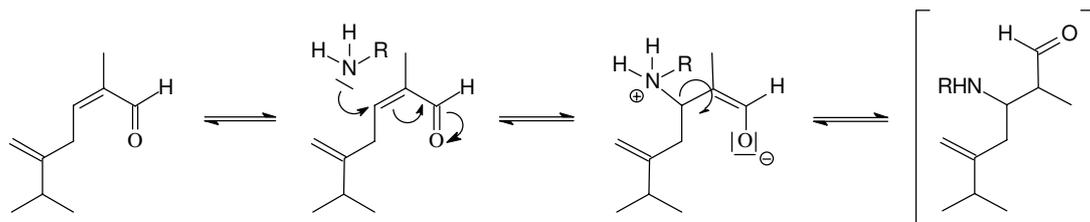


Abb. 2-19 Vorschlag zum Mechanismus der (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung von Isonovalal in Anwesenheit von Glycin

2.1.3.3 Stabilität in Transformationsmedien

2.1.3.3.1 Stabilität in autoklavierter Bakteriensuspension

Das Transformationsmedium für die Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid zu Isonovalal bestand aus 20 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH 7,5. In diesem Medium war Isonovalal hinreichend stabil (s. Abschnitt 2.1.3.1). Jedoch geben die Mikroorganismen auch Substanzen in das umgebende Medium ab, die die Stabilität von Isonovalal beeinflussen könnten. Hierzu zählen vor allem eine Reihe von Biotensiden, die für die Aufnahme der Terpene durch die Zelle notwendig sind. Außerdem können bei der Lysis von absterbenden Zellen komplette Zellinhalte mit dem gesamten darin befindlichen Substratspektrum (Mineralsalze, Kohlenhydrate, Proteine, Lipide) frei werden.

Um einen umfassenden chemischen Blindwert zu erhalten und enzymatische Transformationen auszuschließen, wurde ein Stabilitätsexperiment mit 280 mg L⁻¹ isolierten Aldehyden (Novalal und Isonovalal 1:15) in autoklavierter Bakteriensuspension unter Transformationsbedingungen durchgeführt. Der pH-Wert lag bei 7,1 und wurde nicht korrigiert.

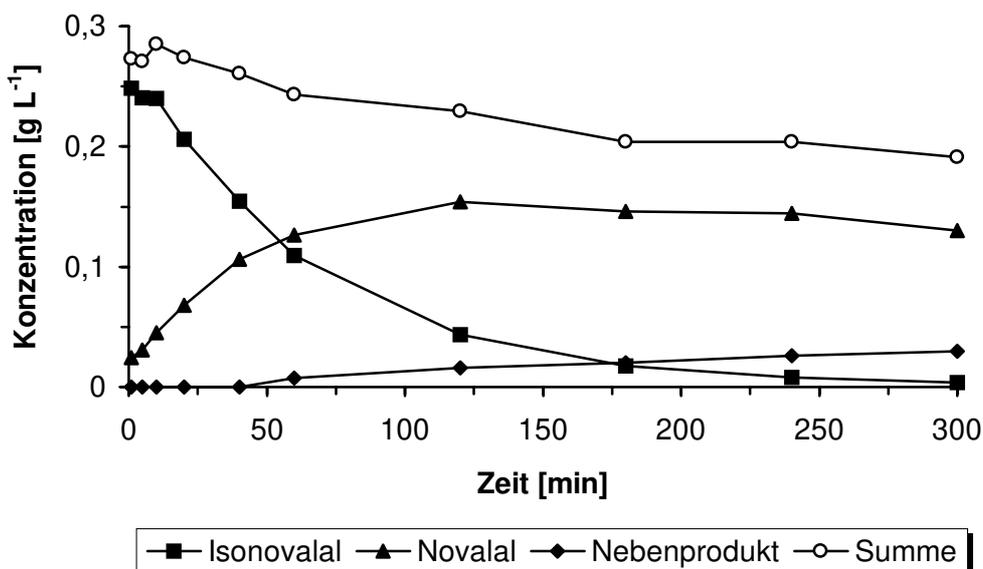


Abb. 2-20 Stabilität von Isonovalal in autoklavierter Bakteriensuspension (pH 7,1)

Isonovalal war in autoklavierter Bakteriensuspension nicht stabil (Abb. 2-20). Während der ersten 40 Minuten verlief der Abbau von Isonovalal fast linear mit $0,62 \mu\text{mol min}^{-1}$ und ging mit einer ebenfalls praktisch linearen Bildung von Novalal ($0,55 \mu\text{mol min}^{-1}$) einher. Nach 40 min begann die Akkummulation eines Nebenprodukts. Dabei handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die *(2E,4E)*-Form des Aldehyds (s. Abschnitt 2.1.2.2.1). Nach fünf Stunden war Isonovalal praktisch vollständig umgesetzt.

Die Bilanzierung der Aldehyde ergab konstante Substratverluste, die nicht allein auf Verluste über die Gasphase zurückgeführt werden konnten (s. Abschnitt 2.1.3.3.2). Daraus wurde gefolgert, daß die reaktiven Aldehyde mit anderen Bestandteilen des Mediums chemisch zu hochmolekularen oder hydrophilen Produkten reagierten (z. B. Bildung von Schiffsbasen mit freien primären Aminen), die mit den hier eingesetzten analytischen Methoden nicht erfaßt wurden.

Weitere Experimente mit anorganischen Bestandteilen des Minimalmediums (s. Abschnitt 4.2.3.3) zeigten, daß die Anwesenheit von Mineralsalzen oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ keinen Einfluß auf die Stabilität von Isonovalal hatte (Ergebnisse nicht dargestellt).

2.1.3.3.2 Stabilität in zellfreiem Medium

Die Biotransformation von (-)- α -Pinenoxid ergab im ersten Transformationszyklus eine rasche *(Z)-(E)*-Isomerisierung des gebildeten Isonovalals, die im zweiten Transformationszyklus abnahm und im dritten Zyklus praktisch nicht mehr auftrat (s. Abschnitt 2.1.1.1.2). Da pH-Schwankungen nicht als Ursache für die Isomerisierung in Frage kamen, sollte durch Abtrennung der Zellen geklärt werden, ob ein Medienbestandteil die Umsetzung katalysierte oder ob eine Enzymaktivität vorlag.

Hierzu wurde ein Blindversuch zum zweiten Transformationszyklus (Abschnitt 2.1.1.1.2) hergestellt. Aus einer Zellsuspension, die bereits einmal zur Umsetzung von $1,2 \text{ g L}^{-1}$ (-)- α -Pinenoxid eingesetzt worden war, wurden die Zellen abgetrennt und die Transformationsprodukte schonend durch Adsorption an Lewatit OC 1064 entfernt, da eine Lösungsmittelextraktion eventuelle Enzymaktivitäten zerstören würde. Das resultierende zellfreie Medium wurde mit Isonovalal versetzt.

Isonovalal wurde nach wie vor zu Novalal umgesetzt, jedoch verlief die Isomerisierung mit $0,14 \mu\text{mol min}^{-1}$ (Novalal-Bildung: $0,08 \mu\text{mol min}^{-1}$) deutlich langsamer als in autoklavierter Bakteriensuspension (Abb. 2-21). Der Katalysator ist also durch

die Abtrennung der Zellen oder die Lewatit-Adsorption zum Teil entfernt oder während der ersten Umsetzung verbraucht worden. Nur wenn keine keine Umsetzung stattgefunden hätte, könnte unter Umständen auf eine in den Zellen lokalisierte Enzymaktivität geschlossen werden. Eine abschließende Klärung der Fragestellung war deshalb nicht möglich.

Da keine weiteren Nebenprodukte detektiert wurden, dürften die in der Summe zu beobachtenden stetigen Produktverluste aufgrund der hohen Flüchtigkeit der Aldehyde auf Verluste über die Gasphase zurückzuführen sein.

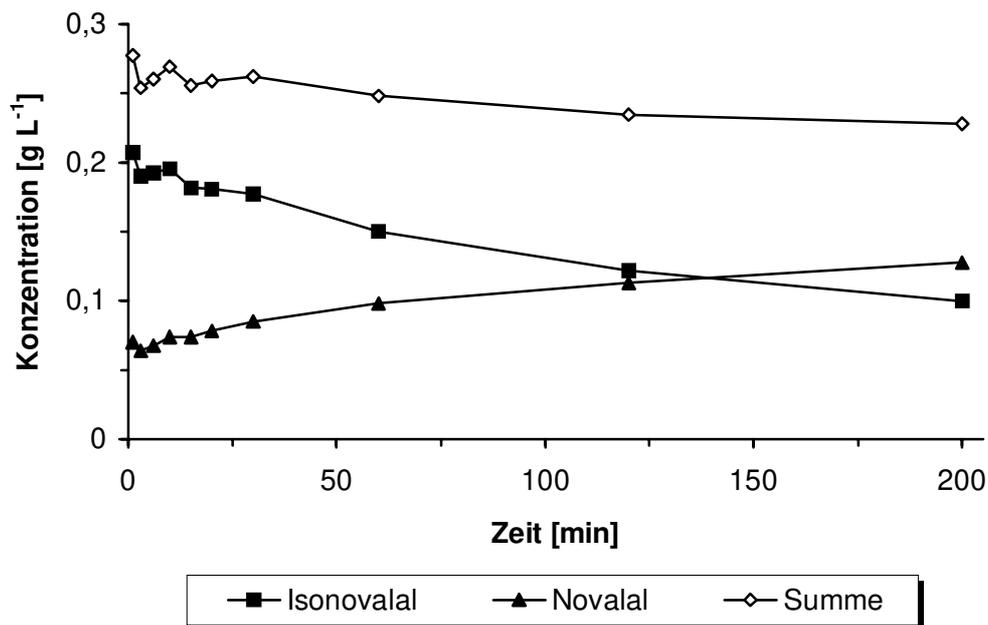


Abb. 2-21 Stabilität von Isonovalal in zellfreiem Medium

2.1.3.4 Teilzusammenfassung

Innerhalb der Transformationszeit war die pH-Stabilität von Isonovalal im Bereich pH 4,5 - 9,0 insgesamt gut. Im schwach sauren Bereich (pH 4,5) fand eine konstante, langsame (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung statt.

Eine vollständige (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung sowie eine langsame Konjugation der isolierten Doppelbindung im Isonovalal wurde jedoch durch andere Bestandteile der Bakteriensuspension katalysiert. Die (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung war auch bei Zugabe von 0,1 mol L⁻¹ Glycin zum Transformationspuffer zu beobachten, so daß auf die Beteiligung primärer Aminogruppen am Mechanismus geschlossen werden konnte. Mineralsalze oder (NH₄)₂SO₄ trugen nicht zur Isomerisierung bei.

2.1.4 Kinetik der Produktbildung

2.1.4.1 Blindwert mit (-)- α -Pinenoxid

Epoxide sind vor allem in saurer Lösung nicht stabil. Der säurekatalysierte Abbau von (-)- α -Pinenoxid führt zur Bildung von Campholenaldehyd, (Z)- und (E)-Carveol und (E)-Sobrerol [20, 34]. Die Entstehung dieser Verbindungen wurde auch im neutralen Bereich beobachtet (s. Abb. 2-22 und 2-23). Sie wurden aufgrund der Massenspektren und Kovats-Indices identifiziert (s. Abschnitte 2.1.2.2.4 und 2.1.2.3). Weitere Produkte wurden nicht detektiert.

Um eine hinreichende Stabilität von (-)- α -Pinenoxid während der mikrobiellen Umsetzung zu gewährleisten, wurden die Transformationen in einem schwach alkalischen Puffer (pH 7,5) Puffer durchgeführt.

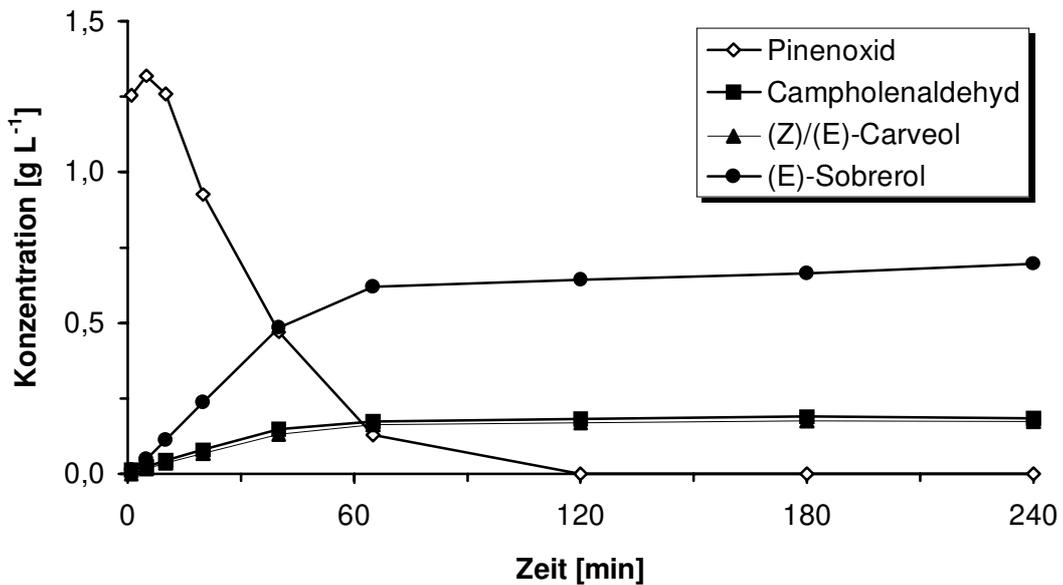


Abb. 2-22 Stabilität von (-)- α -Pinenoxid in autoklavierter Bakteriensuspension von *P. fluorescens* (pH 7,1)

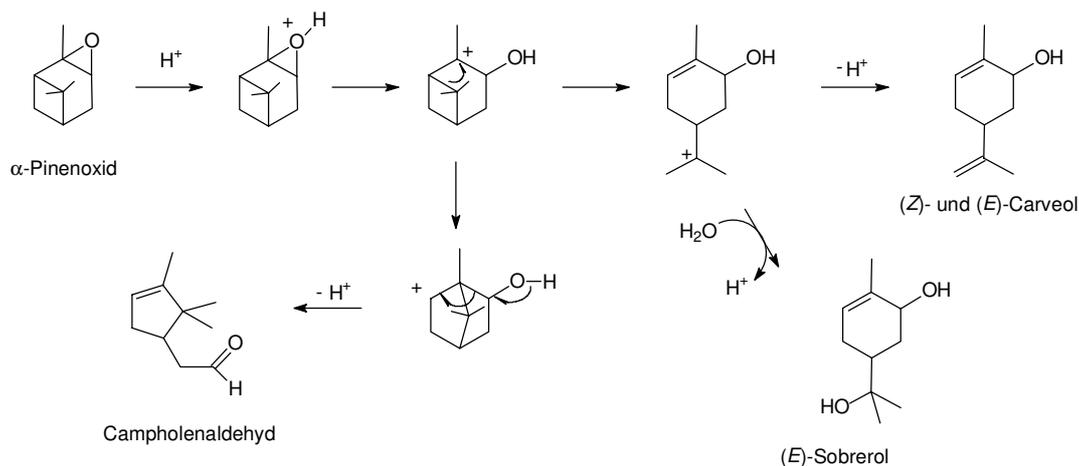


Abb. 2-23 Mechanismus der säurekatalysierten Umlagerung von (-)- α -Pinenoxid

2.1.4.2 Kinetik der Transformation von (-)- α -Pinenoxid

2.1.4.2.1 Bildung neutraler Produkte aus (-)- α -Pinenoxid

Aus den Versuchen zur Produktisolierung (Abschnitt 2.1.1.1) war bereits bekannt, daß (-)- α -Pinenoxid vollständig zu acyclischen Produkten umgesetzt wurde. Um die Reihenfolge der Produktbildung zu bestimmen, wurden aus einem Standardansatz ($1,2 \text{ g L}^{-1}$ α -Pinenoxid) während der ersten 20 min Proben in zwei- bis dreiminütigen Intervallen genommen und quantifiziert (s. Abschnitt 4.2.3.2.1). Im weiteren Verlauf der Umsetzung wurden die Probenahmeintervalle vergrößert. Die Proben wurden nicht sauer ausgeschüttelt, damit auch der Abbau von (-)- α -Pinenoxid im Medium erfaßt werden konnte. Dadurch war jedoch eine Quantifizierung der Säurebildung nicht möglich. In Abb. 2-24 und Abb. 2-25 sind jeweils die Mittelwerte zweier unabhängiger Transformationen dargestellt.

Der Verlauf der Umsetzung von α -Pinenoxid während des ersten Transformationszyklus wurde über sieben Stunden verfolgt (Abb. 2-24). (-)- α -Pinenoxid wurde innerhalb von 60 min vollständig umgesetzt. Das Hauptprodukt war zunächst Novalal. Nach fünf Stunden lag ausschließlich Novalol neben sauren Abbauprodukten vor. Isonovalal erschien intermediär zu Beginn der Transformation in geringen Konzentrationen ($< 50 \text{ mg L}^{-1}$).

Umlagerungsprodukte von (-)- α -Pinenoxid konnten über GC-MS nur als Spuren nachgewiesen werden.

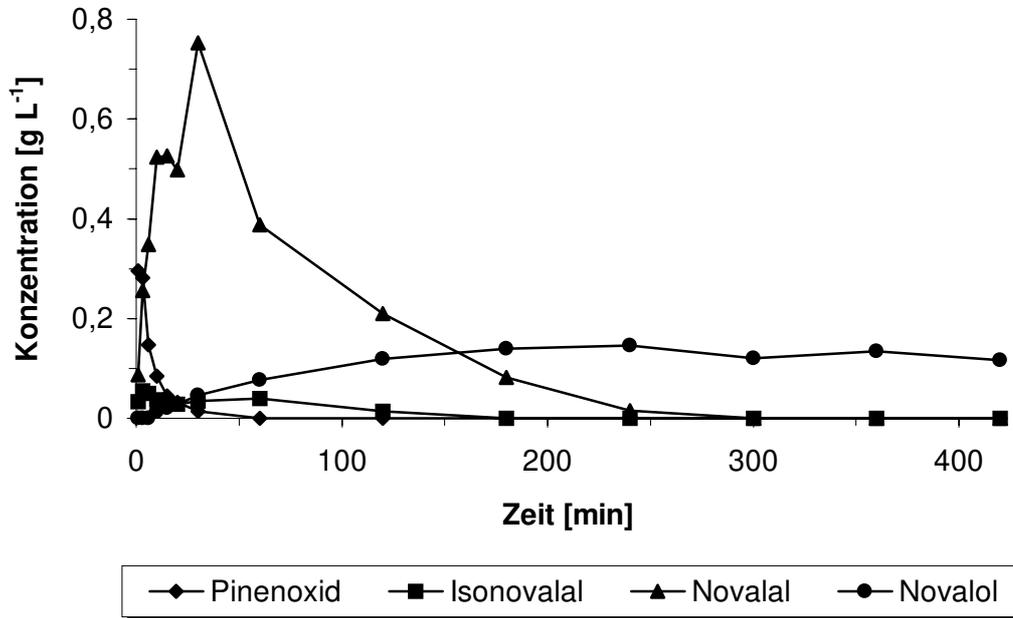


Abb. 2-24 Kinetik der Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit *P. fluorescens*

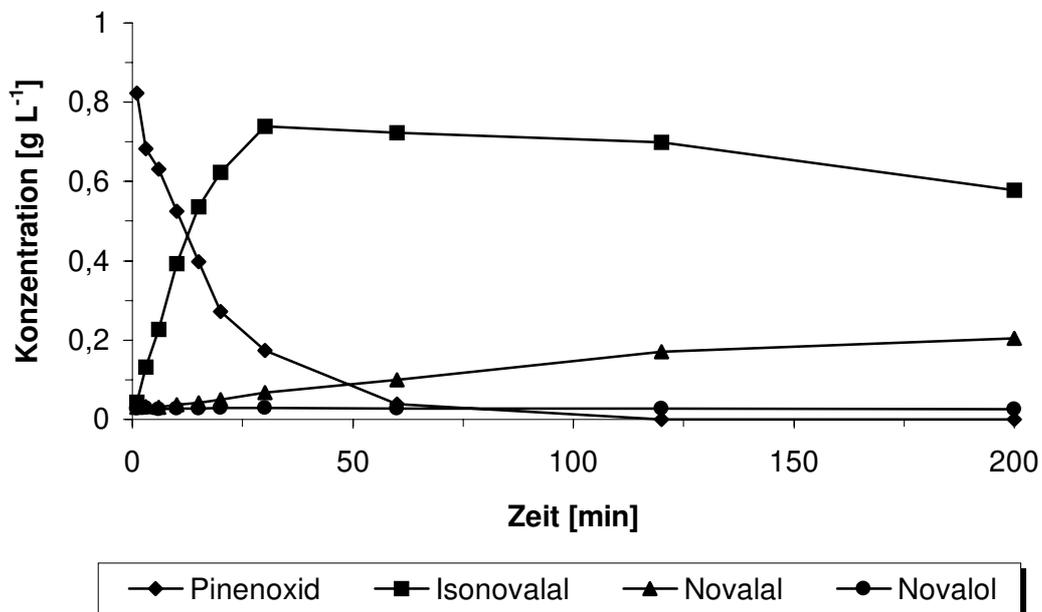


Abb. 2-25 Kinetik der Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit *P. fluorescens* im zweiten Transformationszyklus

Der Verlauf der Produktbildung im zweiten Transformationszyklus zeigte deutliche Unterschiede (Abb. 2-25). Die Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid verlief nur wenig langsamer als im ersten Zyklus. Als Hauptprodukt wurde jedoch zunächst Isonovalal gebildet, das langsam zu Novalal isomerisierte. Novalol entstand nur in geringen Konzentrationen ($< 30 \text{ mg L}^{-1}$).

Die ermittelten Produktbildungskinetiken sind unter zwei Voraussetzungen erklärbar:

- Die Pinenoxid-Lyase, die die Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid zu Isonovalal katalysiert, wurde durch die Bakterienzellen ins Medium abgegeben.
- Im zweiten Transformationszyklus waren die Bakterienzellen bereits so stark geschädigt, daß kein aktiver Stoffwechsel mehr möglich war. Die Pinenoxid-Lyase blieb jedoch weiterhin aktiv.

Da im ersten Transformationszyklus alle Stoffwechselfunktionen der Zellen aktiv waren, wurde Isonovalal schnell zu Novalal isomerisiert, zur Säure oxidiert und diese weiter abgebaut. Für den Einsatz in einem zweiten Transformationszyklus wurden die Zellen gewaschen und mit frischem Puffer versetzt. Dabei wurde mehrfach zentrifugiert. Während dieser Prozedur wurde wahrscheinlich ein Großteil der Zellen zerstört, so daß die Stoffwechselfunktionen im zweiten Zyklus nicht mehr aufrecht erhalten werden konnten. Sobald bei der Zellysis aktive Pinenoxid-Lyase frei wurde, kam es im Produktspektrum zu der beobachteten Anreicherung von Isonovalal, das langsam, in Analogie zum Blindwert (s. Abschnitt 2.1.3.3.1) zu Novalal isomerisierte.

2.1.4.2.2 Bildung saurer Produkte aus (-)- α -Pinenoxid

Da in den oben beschriebenen Versuchen die Säuren nicht mit erfaßt wurden, wurde die Säurebildung aus (-)- α -Pinenoxid in einem eigenen Ansatz verfolgt. In diesem Versuch wurde besonderer Wert auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen gelegt. Außerdem wurde zur Sicherstellung der Synthese von Co-Faktoren den ruhenden Zellen die Stickstoffquelle und eine Mineralsalzlösung zugegeben (s. Abschnitt 4.2.3.2.1).

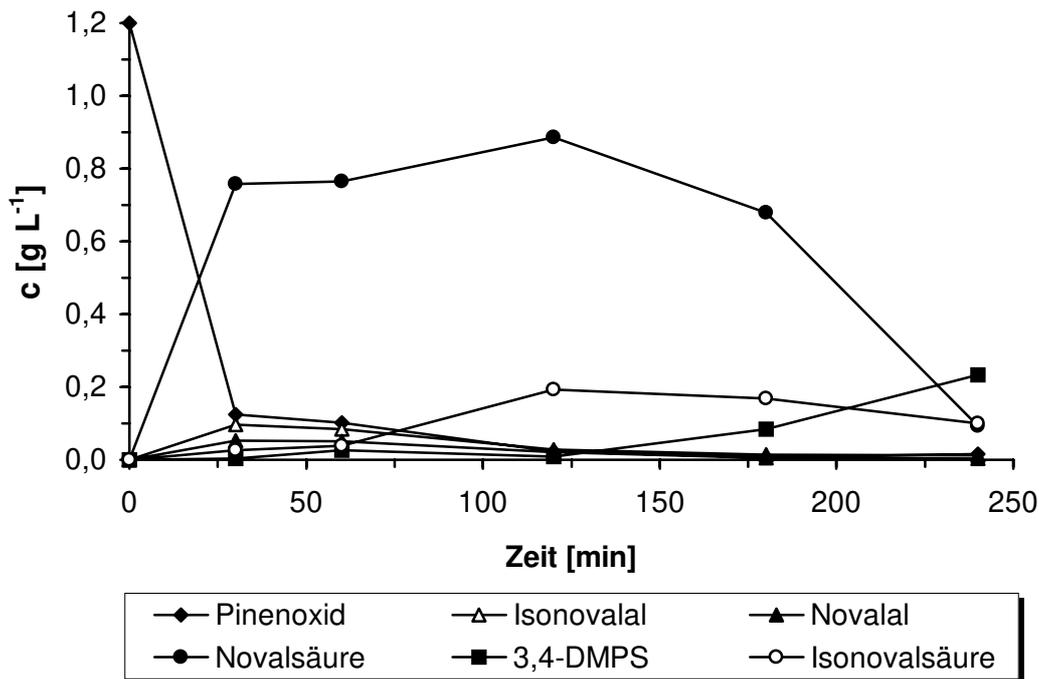


Abb. 2-26 Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit *P. fluorescens* (3,4-DMPS = 3,4-Dimethylpentansäure)

Die Säurebildung wurde über vier Stunden verfolgt (Abb. 2-26). Bei einer guten Sauerstoffversorgung traten die neutralen Transformationsprodukte aus α -Pinenoxid nur noch intermediär auf. Als Hauptprodukt entstand Novalsäure. Es wurde aber auch Isonovalal zur Isonovalsäure oxidiert. Nach zwei Stunden nahm die Konzentration der Novalsäure im Medium merklich zugunsten der Bildung des β -Oxidationsprodukts 3,4-Dimethylpentansäure ab. Da auch die Summe der gebildeten Säuren insgesamt abnahm, war von einem weiteren Abbau der 3,4-Dimethylpentansäure auszugehen.

Einfach ungesättigte 2,5,6-Trimethyl-heptansäuren und weitere saure Metabolite wurden in Konzentrationen unter 30 mg L^{-1} gebildet und sind in Abb. 2-26 nicht dargestellt (s. Abschnitt 2.1.1.1.3).

2.1.4.3 Kinetik der Transformation von Isonovalal

Um zu prüfen, ob Isonovalal tatsächlich das Primärprodukt aus der Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid war, wurde isoliertes Isonovalal ($1,2 \text{ g L}^{-1}$) als Substrat zur

Transformation eingesetzt. Gebildete Säuren wurden in diesem Versuch nicht erfaßt.

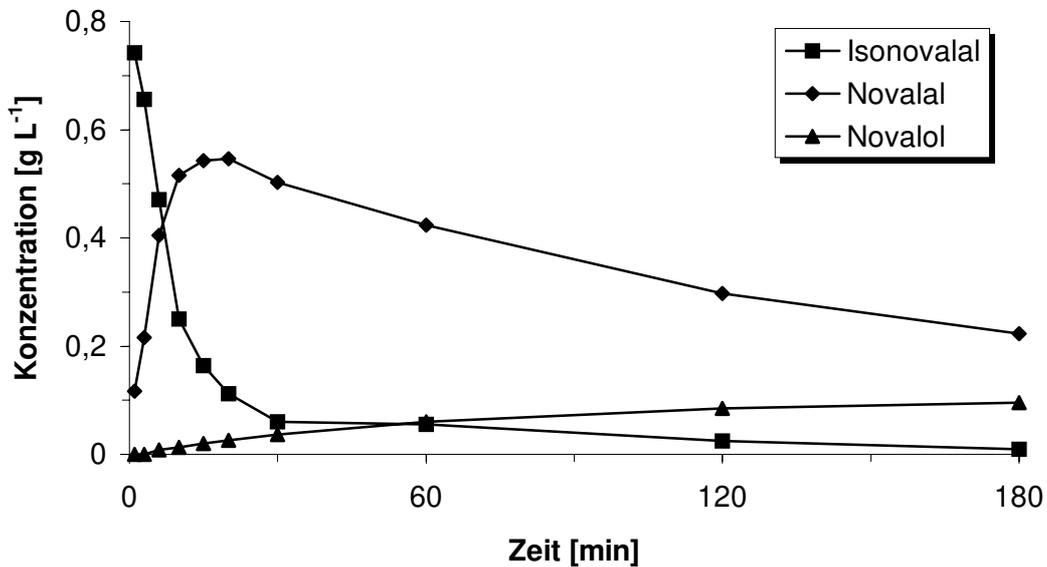


Abb. 2-27 Transformation von Isonovalal mit *P. fluorescens*

Isonovalal wurde schnell zu Novalal isomerisiert. Der weitere Verlauf der Transformation erfolgte in gleicher Weise wie bereits bei der Umsetzung von α -Pinenoxid beschrieben. Ebenso war eine langsame Reduktion von Novalal zu Novalol zu beobachten (Abb. 2-27). Die Bildung von Isonovalal als Primärprodukt des (-)- α -Pinenabbaus konnte damit bestätigt werden.

2.1.4.4 Kinetik der Transformation von Novalal und Novalol

Zur Vervollständigung des Bildes wurde eine weitere Umsetzung mit Novalal und Novalol als Substraten durchgeführt. Da Novalal nicht empfindlich gegenüber Säuren war (s. Abschnitt 2.1.3.1), konnten die Proben sauer ausgeschüttelt und die Bildung von Novalsäure mit erfaßt werden (Abb. 2-28).

Die Umsetzung von Novalal erfolgte während der ersten 10 min mit einer leichten Verzögerung unter Bildung von Novalol. Eine Isomerisierung von Novalal zu Isonovalal trat erwartungsgemäß nicht auf. Im weiteren Verlauf fand hauptsächlich die Oxidation zur Novalsäure statt. Auch Novalol wurde langsam oxidiert.

Nach zwei Stunden begann der Abbau der Novalsäure zu weiteren sauren Metaboliten.

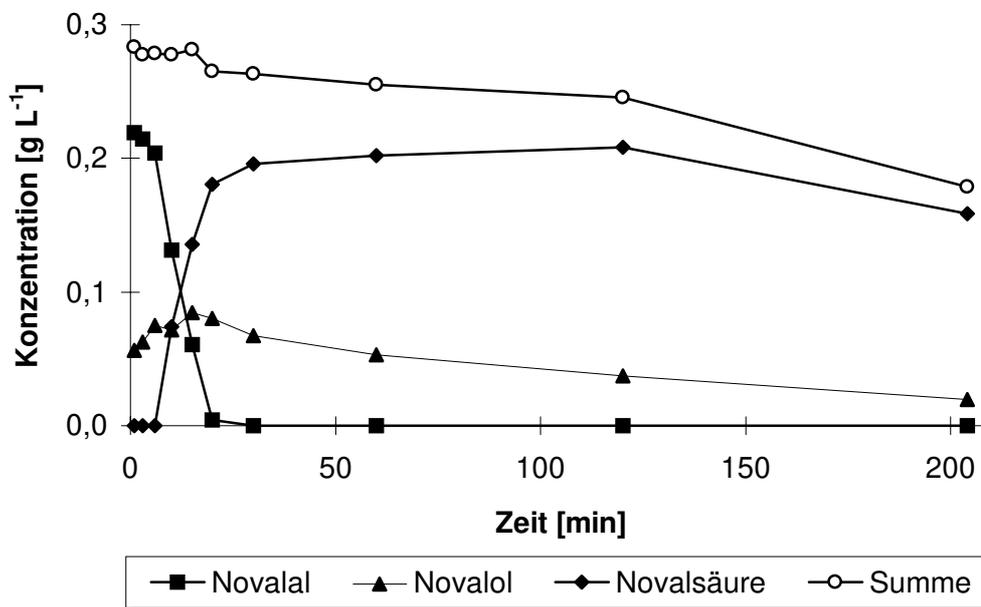


Abb. 2-28 Transformation von Novalal und Novalol mit *P. fluorescens*

Die Oxidationsstufe des C-1 der (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadien-Verbindungen (Novalol, Novalal, Novalsäure) unterliegt offenbar einer differenzierten Regulierung durch die Bakterienzellen. Sie ist wahrscheinlich von der Verfügbarkeit von Sauerstoff und NADH für den Organismus abhängig. Das Ziel der Transformation ist jedoch immer die Oxidation zur Säure, um damit einen nachfolgenden, mit Energiegewinn verbundenen Abbau zu ermöglichen.

2.1.4.5 Kinetik der Transformation von Novalal und Novalsäure mit NADH

Novalol hatte sich aus den olfaktorischen Untersuchungen als interessanter Aromastoff erwiesen (s. Abschnitt 2.1.6). In einer Patenschrift [12] wurde die Bildung von Novalol bei Zugabe von Novalal und NADH zu einem Enzymrohextrakt von *P. fluorescens* beschrieben. Es wurde nun geprüft, ob diese Umsetzung auch von ruhenden Zellen von *P. fluorescens* durchgeführt wird.

Die Bakteriensuspension wurde hierfür mit Novalal und einer äquimolaren Menge NADH versetzt (Abb. 2-29). Parallel hierzu wurde ein weiterer Ansatz mit

Novalsäure und NADH im molaren Verhältnis 1:2 untersucht (Abb. 2-30). Zur Quantifizierung der sauren Produkte wurden die Proben sauer ausgeschüttelt und anschließend methyliert (s. Abschnitt 4.2.5.3).

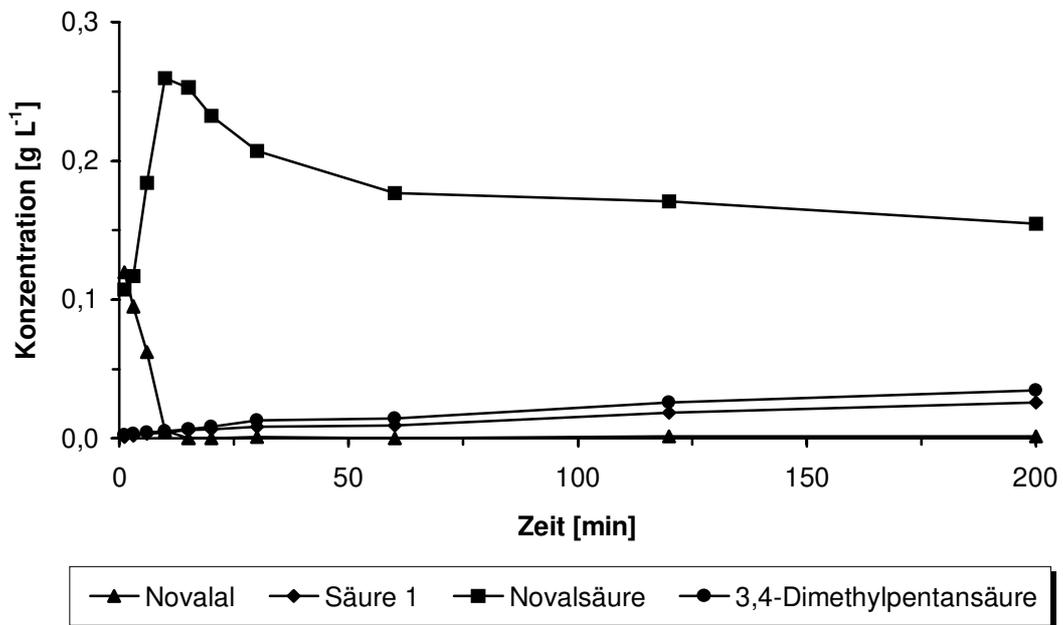


Abb. 2-29 Transformation von Novalal / NADH mit *P. fluorescens*

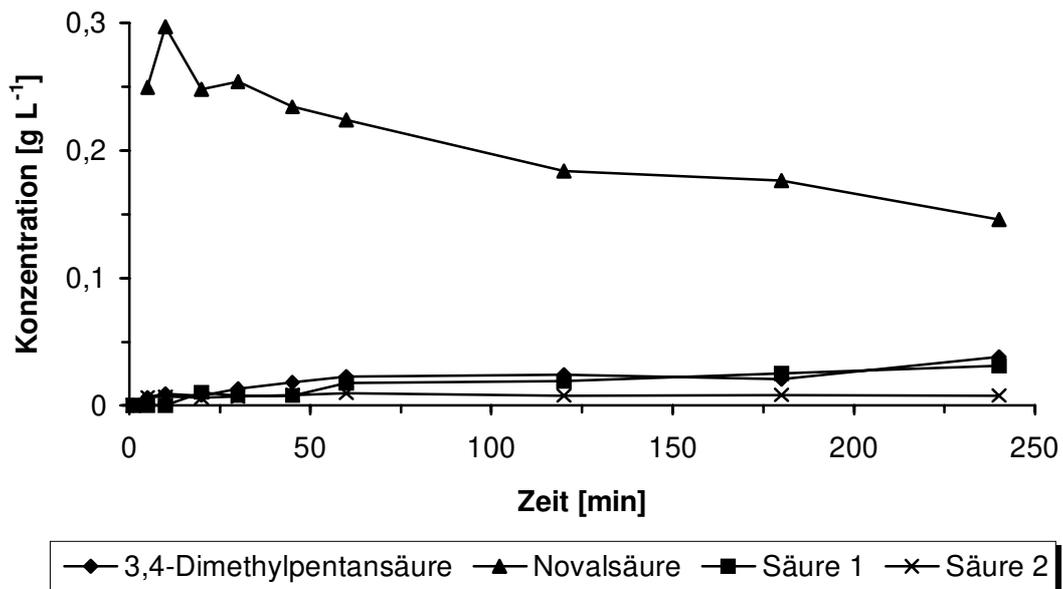


Abb. 2-30 Transformation von Novalsäure / NADH mit *P. fluorescens*

In keinem der beiden Ansätze konnte die Reduktion zu Novalol nachgewiesen werden. Nach 20 min war auch Novalal vollständig zu sauren Metaboliten umgesetzt. Die Novalsäure wurde hauptsächlich zu zwei Produkten abgebaut, die langsam auf jeweils über 30 mg L^{-1} akkumulierten. Sie wurden als 3,4-Dimethylpentansäure und 2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure (Säure **(1)**) identifiziert (s. Abschnitt 2.1.2). Auch die Entstehung weiterer einfach ungesättigter 2,5,6-Trimethyl-2-heptensäuren (Säuren **(2)** - **(4)**) konnte in geringen Konzentrationen ($< 10 \text{ mg L}^{-1}$) nachgewiesen werden (s. Abschnitt 2.1.2.2.3).

Um zu überprüfen, ob die identifizierten Säuren Zwischenprodukte einer vollständigen Katabolisierung der Novalsäure waren, wurden die Ansätze noch zwei weitere Tage im Schüttler belassen und dann komplett aufgearbeitet (s. Abschnitt 4.2.3.1.3). Es waren keine sauren oder neutralen Metabolite mehr nachweisbar.

2.1.4.6 Teilzusammenfassung

Aus den Versuchen zur Produktbildungskinetik konnte die Reihenfolge der Produktbildung abgesichert werden. (-)- α -Pinenoxid wurde zunächst zu Isonovalal umgesetzt. Dieses unterlag einer (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung zu Novalal, das dann weiter zur Novalsäure oxidiert wurde. Eine Oxidation von Isonovalal zu Isonovalsäure war ebenfalls möglich.

Der Abbau der Novalsäure erfolgte bei ausreichender Sauerstoffversorgung über einen Reduktionsschritt zu einfach ungesättigten 2,5,6-Trimethylheptensäuren, die dann durch β -Oxidation über das Zwischenprodukt 3,4-Dimethylpentansäure vollständig abgebaut wurden.

Unter Sauerstofflimitierung wurde Novalal langsam zu Novalol reduziert.

2.1.5 Versuche zur Optimierung der Produktbildung

Isonovalal und Novalol hatten sich als sensorisch interessante Intermediate aus der Transformation von (-)- α -Pinenoxid durch *P. fluorescens* erwiesen (s. Abschnitt 2.1.6) und wurden deshalb als Zielsubstanzen für eine Optimierung der Produktbildung ausgewählt.

2.1.5.1 Produktion von Isonovalal bei kontinuierlicher Substratdosierung

Aus den Untersuchungen der Transformation von (-)- α -Pinenoxid durch *P. fluorescens* ergab sich, daß $1,2 \text{ g L}^{-1}$ Substrat innerhalb von 20 min in drei aufeinanderfolgenden Zyklen vollständig umgesetzt wurde (s. Abschnitt 2.1.1.1.2). Es wurde nun geprüft, wie weit diese Umsetzung ohne Austausch des Mediums weitergeführt werden konnte. Aufgrund der geringen Stabilität von (-)- α -Pinenoxid wurden Methoden zur kontinuierlichen Substratzuführung angewendet. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluß einer Vorschädigung der Zellen durch Einfrieren untersucht.

2.1.5.1.1 Einsatz von frischen Zellen

100 mL frisch gewonnene Bakteriensuspension $\text{OD}_{600} = 10$ wurde über zwei Stunden in zehnmütigen Intervallen mit 0,1 mL (-)- α -Pinenoxid versetzt (jeweils $0,96 \text{ g L}^{-1}$) und die Produktbildung gaschromatographisch über zwei Stunden verfolgt (s. Abschnitt 4.2.3.2.2 und Abb. 2-31).

Während der ersten Dosierungsschritte wurde eine starke Tensidbildung beobachtet, die die Ausbildung einer organischen Phase verhinderte und die Extraktion der Produkte erheblich erschwerte. Die Bildung von Novalal und Novalol endete nach dem fünften Dosierungsschritt, während die Novalsäurekonzentration weiterhin langsam zunahm. Gleichzeitig setzte eine fast exponentielle Isonovalal-Bildung ein.

Nach zwei Stunden betrug die Ausbeute an Aldehyden bezogen auf das insgesamt eingesetzte (-)- α -Pinenoxid 23 %. Verluste über die Gasphase wurden nicht erfaßt.

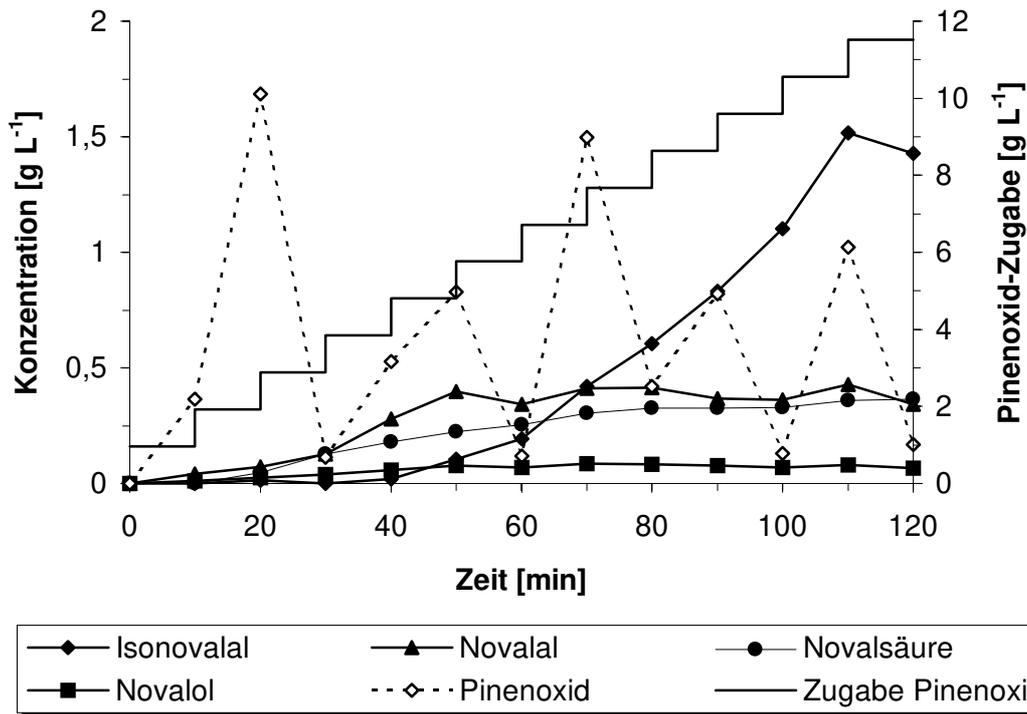


Abb. 2-31 Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit *P. fluorescens* bei kontinuierlicher Dosierung von $6 \text{ mL h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ in zehnminütigen Intervallen

Während der ersten 20 min begann die Transformation nur langsam. Dann trat ein rapider, vollständiger Abbau des (-)- α -Pinenoxids ein, der sich im weiteren Verlauf verlangsamte, so daß eine zunehmende Akkumulation der Intermediate auftrat. Terpene sind in hohen Konzentrationen zelltoxisch [9]. Nach dem fünften Dosierungsschritt machte sich die Zellschädigung durch einen Anstieg der Isonovalalkonzentration bemerkbar (vgl. auch Abschnitt 2.1.1.1.2). Die Gesamtkonzentration an Terpenen betrug zu diesem Zeitpunkt $2,7 \text{ g L}^{-1}$. Bei niedrigeren Terpenkonzentration war die Ausbeute an neutralen Produkten allerdings gering, da der Organismus bestrebt war, durch vollständige Katabolisierung der Terpene ihre Konzentration möglichst niedrig zu halten. Die in diesem Zusammenhang auftretende Biotensidbildung fördert einerseits die Aufnahme der Terpene in die Zelle, andererseits könnten Biotenside auch als Speicherform des durch den Abbau der Terpene erhaltenen Acetats dienen (s. Abschnitt 3.2.4.6.2).

2.1.5.1.2 Einsatz von aufgetauten Zellen

Da die ruhenden Zellen gewöhnlich nicht sofort für die Transformation eingesetzt, sondern bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren wurden (s. Abschnitt 4.2.2.3), wurde ein vergleichbarer Versuch mit aufgetauten Zellen durchgeführt. Das Dosier-
volumen wurde jedoch auf $0,2\text{ mL}$ (-)- α -Pinenoxid (jeweils $1,92\text{ g L}^{-1}$) in 15-
minütigen Intervallen erhöht und die Produktbildung über drei Stunden verfolgt (s.
Abschnitt 4.2.3.2.2 und Abb. 2-32).

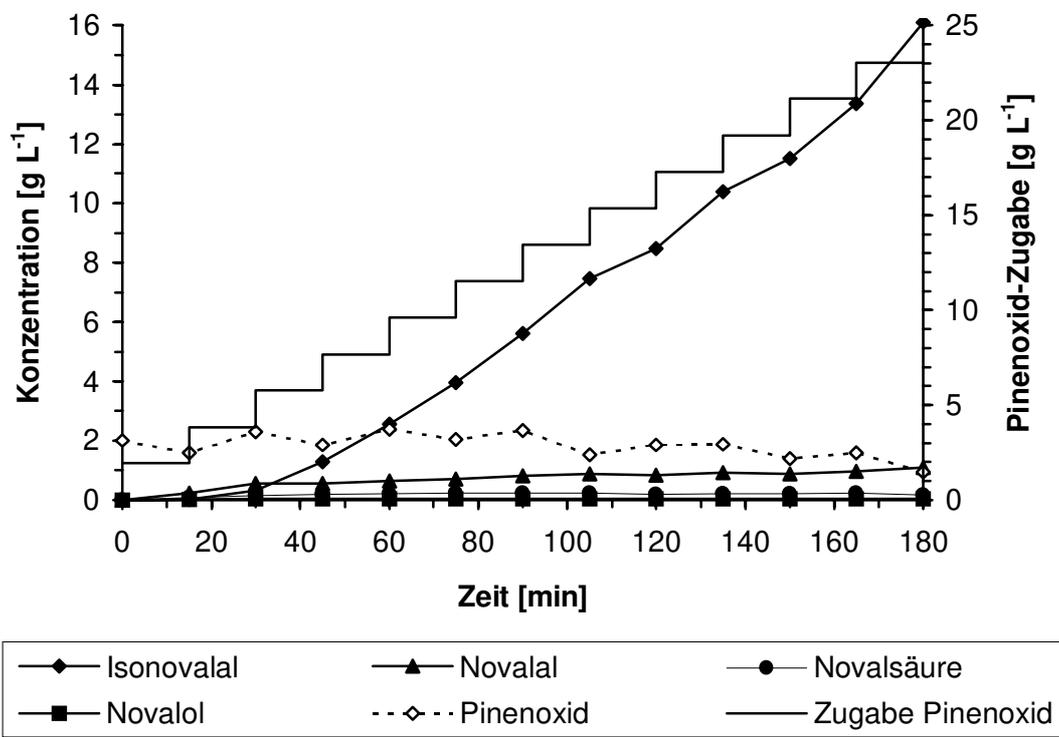


Abb. 2-32 Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit *P. fluorescens* bei kontinuierlicher Dosierung von $8\text{ mL h}^{-1}\text{ L}^{-1}$ in fünfzehnminütigen Intervallen

Auch in diesem Versuch wurde die Zellysis durch die Abgabe von aktiver Pinenoxid-Lyase ins Medium und einer damit verbundenen erhöhten Bildung von Isonovalal angezeigt. Das war aufgrund der höheren Dosierung nach dem zweiten Dosierungsschritt bei einer Terpenkonzentration von ca. 3 g L^{-1} der Fall.

Der Einfrier- und Auftau-Prozeß vor der Transformation bewirkte eine teilweise Schädigung der Zellen. Daraus resultierte wahrscheinlich ihre geringere

Stoffwechselaktivität, die sich in einer geringeren Säurebildung und β -Oxidation äußerte. Die Folge war eine insgesamt höhere Aldehydausbeute (56 %).

Bei dieser Umsetzung waren keine Anzeichen für eine Deaktivierung der Pinenoxid-Lyase absehbar.

Da die kritische Terpenoid-Konzentration für eine einsetzende Zellysis bei ca. 3 g L^{-1} lag, sollte dieser Umstand nun gezielt für eine Gewinnung von möglichst reinem Isonovalal ausgenutzt werden. Dafür wurde in einem weiteren Ansatz die Dosage auf 0,5 mL nach jeweils 20 min erhöht.

Ein Teil des gebildeten Aldehyds setzte sich in Form von Öltropfen an der Oberfläche ab, so daß keine repräsentative Probenahme mehr möglich war. (-)- α -Pinenoxid wurde wieder vollständig umgesetzt. Eine Deaktivierung der Pinenoxid-Lyase trat nicht auf. Die Gesamtausbeute an Aldehyden lag nach der Produktisolierung bei 63 %, entsprechend einer berechneten Konzentration von 48 g L^{-1} im Medium (s. Tabelle 2-18). Nebenprodukte wurden nur in geringem Ausmaß ($2,3 \text{ g L}^{-1}$) gebildet.

2.1.5.1.3 Einsatz eines Zweiphasensystems mit Lewatit OC 1064

Die Produktausbeute der Aldehyde bei direkter Substratdosierung lag trotz vollständiger Umsetzung von α -Pinenoxid nur bei maximal 63 % des eingesetzten Substrats. Hierfür sind mehrere Ursachen denkbar:

- Kataboler Abbau der Aldehyde
- Chemische Reaktion der Aldehyde mit anderen Bestandteilen des Mediums
- Verluste über die Gasphase
- Verluste während der Produktisolierung

Ziel des Versuchs war es, in einem Zweiphasensystem durch *in situ* Adsorption der Produkte aus der wäßrigen Phase Verluste über die Gasphase oder durch chemische Nebenreaktionen zu verhindern. Gleichzeitig konnte über die feste Phase auch eine kontinuierliche Dosierung des Substrats erfolgen.

Als zweite, feste Phase wurde das Polystyrenharz Lewatit OC 1064 ausgewählt, das sich bereits als geeignetes Adsorbens für Aromastoffe erwiesen hatte [39]. Der Einsatz von Zeolith ZSM-5 Pulver war aus zwei Gründen nicht möglich. Die

Adsorptionskinetik für verzweigte Terpene ist deutlich langsamer als die mikrobielle Produktbildung (s. Abschnitt 2.2.3.2). Eine Abtrennung von Zellen und Zeolithkristallen wäre zudem aufgrund ihrer ähnlichen Dimensionierung durch Filtration oder Zentrifugation nicht möglich gewesen (s. Abschnitt 3.8.2.1).

Die Adsorbensmenge wurde bei Zugrundelegung einer Gemischtadsorptionsisotherme von verschiedenen Aromastoffen [39] so bemessen, daß die Terpenkonzentration im Medium im Gleichgewichtszustand unter 2 g L^{-1} betragen sollte.

Tabelle 2-18 Aldehydbildung bei kontinuierlicher Dosierung von (-)- α -Pinenoxid

100 mL Zellsuspension	Zusatz Pinenoxid	Transformationsdauer	Ausbeute Aldehyde*	Verhältnis Isonovalal/Novalal
Frisch	1,2 mL (12 x 0,1 mL)	2 h	23 %	4:1
Aufgetaut	2,4 mL (12 x 0,2 mL)	3 h	56 %	18:1
Aufgetaut	2,4 mL + 12 g Lewatit	3 h	67 %	3:1
Aufgetaut	8,0 mL (16 x 0,5 mL)	5 h	63 %	27:1
Aufgetaut	9,0 mL + 20 g Lewatit	5 h	66 %	14:1

*bezogen auf die insgesamt zugesetzte Stoffmenge des Substrats (-)- α -Pinenoxid

Es wurden zwei Ansätze parallel zu den bereits beschriebenen geführt. Die tatsächlich gemessene Gesamtkonzentration von Edukt und Produkten lag nach 30 min konstant unter $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bzw. 2 g L^{-1} . Die Aldehydausbeute konnte im Vergleich zu den analogen Ansätzen ohne Lewatit-Zusatz um elf bzw. drei Prozentpunkte verbessert werden. Allerdings erhöhte sich auch das Ausmaß der nicht erwünschten (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung zum Novalal deutlich (s. Tabelle 2-18).

2.1.5.2 Produktion von Novalol

Unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen war es möglich $1,2 \text{ g L}^{-1}$ (-)- α -Pinenoxid fast vollständig zu Novalol und Novalsäure umzusetzen (s. Abschnitt 2.1.1.1.1). Die Zugabe von exogenem NADH zu ruhenden Zellen von *P. fluorescens* bewirkte jedoch keine Reduktion von Novalsäure oder Novalal zu Novalol (s. Abschnitt 2.1.4.5).

Es wurde untersucht, wie weit die Umsetzung zu Novalol unter Sauerstoffmangel bei einer erhöhten Substratdosis von bis zu $4,8 \text{ g L}^{-1}$ fortgeführt wird. Die Transformationsdauer betrug bei allen Umsetzungen 24 h (Abb. 2-33).

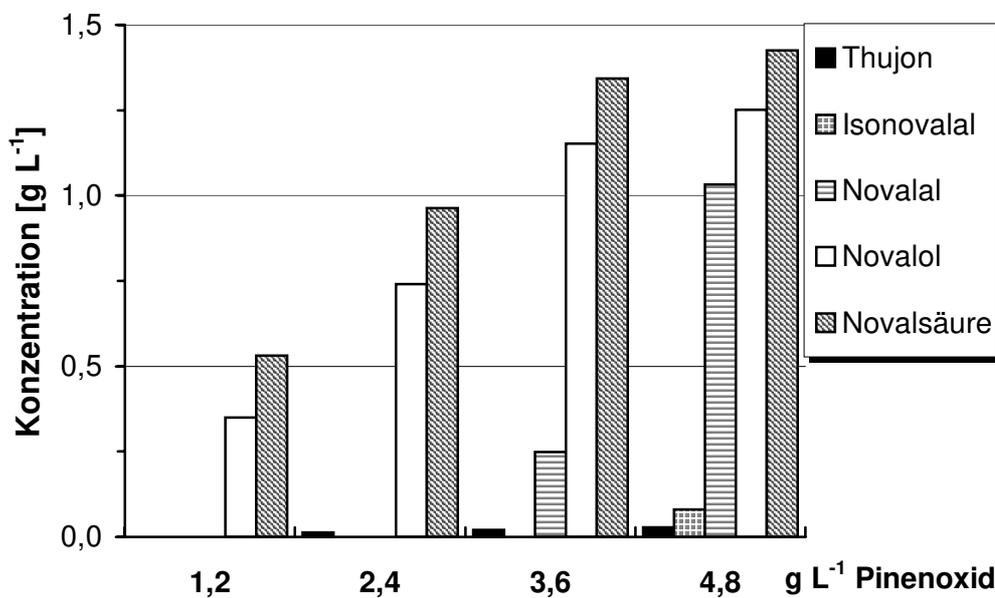


Abb. 2-33 Transformation von (-)- α -Pinenoxid zu Novalol und Novalsäure innerhalb von 24 h mit *P. fluorescens* bei verschiedenen Substratkonzentrationen

Die Bildung von Novalol konnte auf $1,2 \text{ g L}^{-1}$ gesteigert werden. Die höchste Ausbeute wurde bei einer Eingangskonzentration von $3,6 \text{ g L}^{-1}$ (-)- α -Pinenoxid mit 32 % erzielt (Abb. 2-21).

Auch bei der Umsetzung unter Sauerstofflimitierung wurde ab einer Substratkonzentration zwischen $2,4$ und $3,6 \text{ g L}^{-1}$ eine Veränderung des Substratspektrums hin zur Aldehydbildung beobachtet.

Als Nebenprodukt wurde auch β -Thujon in steigenden Mengen gebildet (maximal 11 mg L^{-1}). Der Säureüberschuß gegenüber dem Alkohol lag nach 24 Stunden Transformationszeit konstant bei $0,19 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ und könnte ein Maß für den im Medium gelösten Sauerstoff darstellen.

2.1.5.3 Teilzusammenfassung

Die Bildung von Isonovalal konnte durch kontinuierliche Substratdosierung auf 48 g L^{-1} bei einer Ausbeute von 63 % gesteigert werden. Der Einsatz eines Zweiphasensystems mit Lewatit OC 1064 ergab eine weitere Erhöhung der Aldehydausbeute auf 66 %, jedoch bei verstärkter (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung.

Ein Optimum für die Bildung von Novalol mit ruhenden Zellen unter Sauerstofflimitierung wurde bei einer Ausgangskonzentration von $3,6 \text{ g L}^{-1}$ (-)- α -Pinenoxid erreicht. Die Ausbeute betrug unter diesen Bedingungen 32 % ($1,2 \text{ g L}^{-1}$).

2.1.6 Sensorische Eigenschaften der Produktisolate und ihrer Derivate

Die Aldehyde Isonovalal und Novalal sind die einzigen Intermediate des α -Pinen-Stoffwechsels bei *P. fluorescens*, die bereits sensorisch beschrieben wurden [13]. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft mit bekannten und wirtschaftlich interessanten terpenoiden Duftstoffen wurden auch die korrespondierenden Alkohole auf ihre Geruchswirksamkeit geprüft und beschrieben. Zusätzlich wurden die Methylester der sauren Intermediate, höhere Ester der Novalsäure sowie Acylderivate des Novalols synthetisch hergestellt (s. Abschnitt 4.2.5) und mit in die Untersuchungen einbezogen.

2.1.6.1 Geruchsqualität

Die Geruchsqualität der Reinsubstanzen wurde mittels GC-O von mindestens drei Personen beschrieben (s. Abschnitt 4.2.6). Dafür wurden Absolutmengen von 250 – 300 ng eingesetzt. Sofern die Intensität nicht für eine Erkennung genügte, wurden die Absolutmengen auf bis zu 1000 ng erhöht. In diesem Zusammenhang konnten bereits Aussagen über die relative Intensität des Geruchseindrucks getroffen werden. Da die Bestimmung nicht durch sensorisch geschulte Personen erfolgte, wurde versucht, möglichst nur den Grundton des Geruchs zu erfassen (Tabellen 2-19 und 2-20).

Tabelle 2-19 Olfaktorische Eigenschaften der Transformationsprodukte aus (-)- α -Pinenoxid und ihrer Derivate

Substanz	Geruchsqualität
Essigsäure-novylester	citrus-blumig
Isonovalol	blumig, süß
Isonovalsäure-methylester	citrus-blumig
2-Methyl-propansäure-novylester	citrus-blumig
Novalsäure-1-butylester	frisch-citrus
Novalsäure-ethylester	citrus-blumig
Novalsäure-methylester	citrus-blumig
Novalsäure-1-propylester	frisch-citrus
Novalsäure-2-propylester	frisch-citrus
Propansäure-novylester	citrus-blumig
(E)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäuremethylester	blumig-fruchtig

Die sensorischen Eigenschaften der Aldehyde wurden in der Literatur mit citrus, holzig, würzig (Isonovalal) bzw. holzig-aldehydisch (Novalal) beschrieben [40]. Im Falle von Isonovalal bestätigten die eigenen Untersuchungen diesen Eindruck. Novalal besitzt jedoch keinen intensiven Geruch. Er konnte nicht eindeutig beschrieben werden und wurde von einigen Testpersonen in den angebotenen Konzentrationen nicht wahrgenommen.

Auch die (*Z*)-(*E*)-isomeren Alkohole Isonovalol und Novalol unterschieden sich deutlich in ihren sensorischen Eigenschaften. Das (*E*)-Isomer zeigte eine intensive Citrusnote während das (*Z*)-Isomer blumig süß roch.

Der Geruch der Novalsäureester sowie der acylierten Novalole wurde als citrusartig mit blumiger Note beschrieben. Mit höherer Molekülmasse nahm die Intensität des Geruchseindrucks erwartungsgemäß ab. Die C₃- und C₄-Ester der Novalsäure wurden nur noch von einer Testperson olfaktorisch wahrgenommen und als schwacher, citrusartiger Frischeeindruck beschrieben. Eine Ausnahme bildete der 2,5,6-Trimethyl-2-heptensäuremethylester. Sein Geruch wurde vornehmlich als blumig beschrieben. Der höhere Sättigungsgrad des Alkylrestes zeigt sich in einer fruchtigen Note, wie sie auch für den gesättigten Methylester der 3,4-Dimethylpentensäure festgestellt wurde und allgemein bei Fruchtestern bekannt ist.

2.1.6.2 Geruchsschwellen

Für die geruchsintensivsten Verbindungen wurde eine Schwellenwertbestimmung im Verdünnungsmedium Luft mittels GC-O durchgeführt (s. Abschnitt 4.2.6), die einen größenordnungmäßigen Vergleich mit Geruchsintensitäten regulärer Terpenoide ermöglichen sollte [10]. Hierfür wurden mindestens sieben Personen eingesetzt (Tabelle 2-20).

Tabelle 2-20 GC-O Geruchsschwellen

Substanz	Geruchsschwelle [ng]	Geruchsqualität
Isonovalal	13 – 19	Heu, Gras, Kräuter, citrus
Novalal	> 1000	holzig, muffig, fruchtig, citrus
Novalol	30 – 44	citrus
Novalsäuremethylester	580 – 860	citrus, blumig
(<i>S</i>)-(-)-3,4-Dimethylpentan- säuremethylester	2,3 – 3,4	fruchtig, blumig

Das geruchsintensivste Intermediat des α -Pinenstoffwechsels von *P. fluorescens* war Isonovalal mit einer Geruchschwelle von 13 - 19 ng. In diesem Bereich war jedoch nur noch der krautige Geruchseindruck erkennbar. Der Citruscharakter des Novalols blieb bis zur Geruchschwelle von 30 - 44 ng bestehen.

Für den synthetisch hergestellten Methylester der Novalsäure wurde ein deutlich höherer Schwellenwert von 580 – 860 ng ermittelt. Die geruchsintensivste Verbindung war jedoch der Methylester der (S)-(-)-3,4-Dimethylpentansäure mit 2,3 – 3,4 ng.

2.2 Adsorption an Zeolithe

Die adsorptive *in situ* Gewinnung von Biotransformationsprodukten hat sich als Mittel zur Ausbeutesteigerung bewährt (s. Tabelle 2-18). Während Festphasenadsorptionsprozesse aus wässrigen Medien an PS-DVB-Harze bereits gut untersucht sind [39], wurde anorganischen Adsorbentien bisher wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Aus dem Molekularsiebeffekt von Zeolithen waren jedoch Trenneffekte zu erwarten, die gerade im Hinblick eine selektive *in situ* Produktadsorption wertvolle Fortschritte versprachen.

2.2.1 Partikelgrößen der Zeolith-Pulver

Voraussetzung für Abtrennung von Wertstoffen aus wässrigen Lösungen über ein Festbett ist eine möglichst uniforme Partikelgröße des Adsorbens. Die Partikelgrößen herkömmlicher organischer Adsorberharze bewegen sich zwischen 0,1 mm und 1,2 mm [39]. Die Kenntnis der Partikelgrößen der Zeolithe ist zudem notwendig für die Berechnung von Diffusionskoeffizienten (s. Abschnitt 4.2.1.7.2).

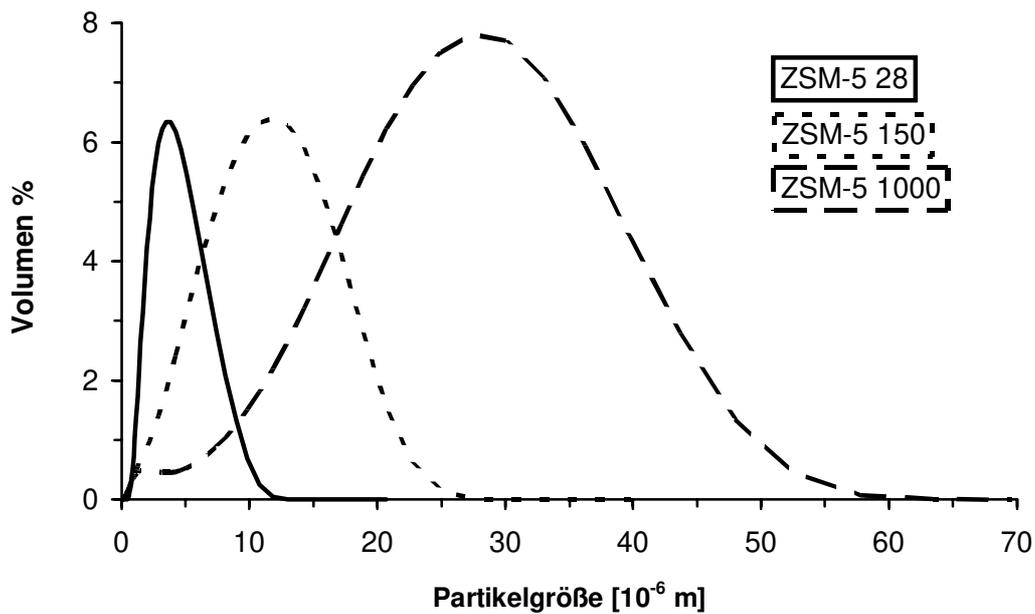


Abb. 2-34 Partikelgrößenverteilung der ZSM-5 Pulver

Tabelle 2-21 Partikelgrößen der Zeolith-Pulver (Mittelwert: arithmetischer Mittelwert, Median: „Mittelste“ Partikelgröße aus der 50 %-Volumen-Verteilung, Gipfelwert: Häufigst vorkommender Partikeldurchmesser)

Zeolith	Modul	Mittelwert [μm]	Median [μm]	Gipfelwert [μm]
DAY	200	< 1	n. b.	n. b.
DAY	k. A.	n. b.	n. b.	n. b.
DAY	15	< 1	n. b.	n. b.
ZSM-5	1000	23,1	23,4	28,7
ZSM-5	150	9,6	9,1	12,4
ZSM-5	28	3,9	3,5	3,7

Alle verfügbaren pulverförmigen ZSM-5 - Zeolithe zeigten eine unsymmetrische Partikelgrößenverteilung, die durch die Abweichung des Mittelwerts vom Median angezeigt wird (s. Tabelle 2-21 und Abb. 2-34). Die engste Verteilung, aber auch die kleinsten mittleren Durchmesser, wurden für ZSM-5 28 ermittelt. Die Verteilung der Partikelgrößen bei den Zeolithen ZSM-5 150 und ZSM-5 1000 war breiter als die Gauß'sche Normalverteilung. Die größten Kristalle mit einem mittleren Durch-

messer von 23,1 μm wurden für ZSM-5 1000 ermittelt. Der mittlere Partikeldurchmesser bei ZSM-5 150 betrug 9,6 μm . Die Partikelgrößen der DAY-Zeolithe lagen unter 1 μm [41].

Die mittleren Partikelgrößen der Zeolithpulver waren deutlich geringer als die handelsüblicher organischer Adsorbentharze. Eine Abtrennung der Pulver aus wässriger Suspension durch Filtration oder über eine Adsorptionssäule war bei Atmosphärendruck nicht möglich. Die Zeolithe der ZSM-5-Reihe konnten jedoch durch Zentrifugation oder Membranfiltration (0,45 μm) aus wässrigen Suspensionen abgetrennt werden. Eine vollständige Entfernung der DAY-Pulver war auch über einen hydrophilen Membranfilter nicht möglich. DAY-Pulver wurden deshalb über das Screening hinaus nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt.

2.2.2 Überprüfung der Adsorptionseigenschaften der Zeolithe anhand einer Aromamodelllösung

Der Zeolith wurde in wässriger Lösung mit einer Modellmischung von neun Aromastoffen in Kontakt gebracht. Die Aromastoffe unterschieden sich in ihren Molekülgrößen und -strukturen sowie in ihrer Wasserlöslichkeit (repräsentiert durch den $\log P_{OW}$) und sollten damit einen Querschnitt der verbreiteten chemischen Substanzklassen aus der Aromenchemie bilden (Tabelle 2-22).

Folgende Standardbedingungen wurden für die Adsorption festgelegt:

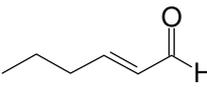
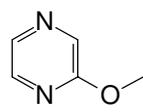
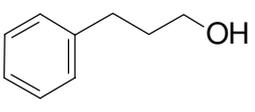
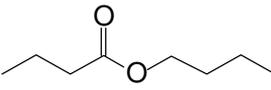
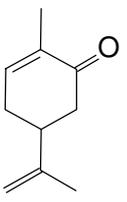
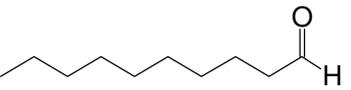
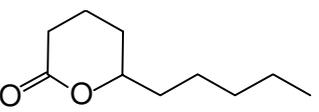
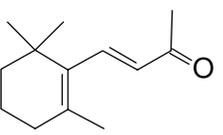
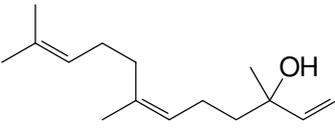
Volumen:	0,1 L
Zeolithmenge:	0,25 g
Temperatur:	20 °C
Adsorptionszeit:	16 h

Die Aromamodelllösung enthielt 33,4 mg L^{-1} jeder Aromakomponente in deion. Wasser mit 2 % (v/v) Methanol. Unter Zugrundelegung der Standardbedingungen war eine rechnerische Maximalbeladung von 121 mg g^{-1} (0,835 mmol g^{-1}) Aromastoffe möglich (s. Abschnitt 4.2.1.4).

Durch Vergleich der Adsorptivkonzentration in der wässrigen Phase vor und nach Erreichen des Adsorptionsgleichgewichts wurde die adsorbierte Aromastoffmenge in Prozent der eingesetzten Menge berechnet. Die Verluste über die Gasphase

oder durch Adsorption an die Glaswand des Kolbens lagen bei allen Komponenten unter 2 % der wäßrigen Modellösung.

Tabelle 2-22 Aromakomponenten der Modellmischung

Substanz	Struktur	Molekulargewicht [g mol ⁻¹]	Log P _{o/w} [42]
(2E)-Hexenal		98	1,58 ± 0,28
2-Methoxypyrazin		110	0,75 ± 0,34
3-Phenyl-1-propanol		136	1,88 ± 0,18
Butansäurebutylester		144	2,83 ± 0,21
(S)-(+)-Carvon		150	2,23 ± 0,25
1-Decanal		156	4,09 ± 0,22
(±)-δ-Decanolacton		170	2,42 ± 0,28
β-Ionon		192	3,85 ± 0,24
(Z)-Nerolidol		222	5,32 ± 0,36

2.2.2.1 Adsorption an DAY Pulver

Tabelle 2-23 Adsorption an DAY Pulver

Substanz	Adsorption [%]		
	DAY 15	DAY 200	DAY
2-Methoxypyrazin	17,1	20,7	3,1
(2E)-Hexenal	63,3	80,1	60,4
3-Phenyl-1-propanol	65,6	85,8	71,0
(S)-(+)-Carvon	88,2	96,5	94,9
(±)-δ-Decanolacton	96,9	98,4	96,2
Butansäurebutylester	84,3	97,9	96,9
β-Ionon	98,6	99,6	98,6
1-Decanal	95,6	98,9	98,2
(Z)-Nerolidol	99,5	99,9	99,6

Der hydrophobe Zeolith DAY 200 adsorbierte über 95 % der meisten Aromastoffe aus der Modellösung (Tabelle 2-23). (2E)-Hexenal und 3-Phenyl-1-propanol wurden zu über 80 % aus der Lösung entfernt. Vom polarsten Aromastoff der Mischung 2-Methoxypyrazin wurden verblieben jedoch fast 80 % in der Lösung. Auch die stärker hydrophilen Eigenschaften des Zeoliths DAY 15 beeinflussten die Affinität zu 2-Methoxypyrazin nicht im positiven Sinne. Dagegen verringerte sich die Adsorption der mittelpolaren Komponenten (2E)-Hexenal, 3-Phenyl-1-propanol, (S)-(+)-Carvon und Butansäurebutylester. Die Adsorptionseigenschaften eines weiteren DAY-Zeolithen unbekanntem Moduls entsprach dem von DAY 200 mit Ausnahme von 2-Methoxypyrazin, (2E)-Hexenal und 3-Phenyl-1-propanol, welche deutlich weniger adsorbiert wurden.

2.2.2.2 Adsorption an ZSM-5 Pulver

Tabelle 2-24 Adsorption an ZSM-5 Pulver

Substanz	Adsorption [%]		
	ZSM-5 28	ZSM-5 150	ZSM-5 1000
2-Methoxypyrazin	> 97	> 97	73,0
(2E)-Hexenal	92,4	> 99	> 99
3-Phenyl-1-propanol	40,0	96,5	97,1
(S)-(+)-Carvon	8,8	12,0	13,2
(±)-δ-Decanolacton	91,7	97,7	97,4
Butansäurebutylester	98,3	100,0	99,7
β-Ionon	23,1	42,8	23,3
1-Decanal	99,2	99,2	98,7
(Z)-Nerolidol	48,5	31,0	18,9

Acyclische Verbindungen

Die acyclischen Verbindungen (2E)-Hexenal, Butansäurebutylester und 1-Decanal wurden von allen ZSM-5 Zeolithen fast vollständig adsorbiert (Tabelle 2-24). Für den acyclischen Sesquiterpenalkohol (Z)-Nerolidol war aufgrund seiner geknickten (Z)-Konfiguration eine Hemmung der Diffusion zu erwarten, die sich auch in den geringen adsorbierten Mengen bei ZSM-5 1000 (18,9 %) ausdrückte. Eine Erklärung der beobachteten Zunahme der adsorbierten Stoffmenge mit abnehmendem Modul ist aufgrund der unpolaren Struktur von (Z)-Nerolidol über Adsorptiv-Adsorbens-Wechselwirkungen nicht möglich. Hier ist möglicherweise ein unerwünschter Effekt eingetreten. Die höhere Präsenz katalytischer saurer Zentren im ZSM-5 28 könnte eine Isomerisierung der Doppelbindung zu der gestreckten (E)-Form bewirkt haben [43]. Die Folge wäre eine erleichterte Diffusion in den Zeolithkanälen und damit die beobachtete vergleichsweise höhere Aufnahme gewesen.

Aromatische, cyclische Verbindungen

Der polarste Aromastoff der Modelllösung, 2-Methoxypyrazin, wurde von ZSM-5 28 und ZSM-5 150 nahezu vollständig adsorbiert. Bei Einsatz von ZSM-5 1000 wurden 73 % aus der Lösung entfernt. Hier wirkte sich eine erhöhte Hydrophilie des Adsorbens in einer Zunahme der Adsorptiv-Adsorbens-Wechselwirkungen aus. Die basischen Stickstoff-Atome im Pyrazin-Ring könnten darüberhinaus auch an Ionenaustauschprozessen beteiligt gewesen sein.

Die Adsorption von 3-Phenyl-1-propanol ist nur bei ZSM-5 28, dem polarsten Zeolithen der Reihe, eingeschränkt. Die erhöhte Polarität der Adsorbensoberfläche bewirkte in diesem Falle möglicherweise eine erhöhte Ausbildung von Wechselwirkungen des π -Elektronensystems des Aromaten mit den sauren Zentren der Kanalwände. Daraus ergaben sich wahrscheinlich Diffusionshemmnisse, die in der geringeren Gesamtbeladung bei konstanter Adsorptionszeit resultierten.

Nichtaromatische, cyclische Verbindungen

Für nichtaromatische, cyclische Verbindungen (Abb. 2-35) wurde der Molekularsiebeffekt von ZSM-5 in Abhängigkeit von Ringsubstituenten deutlich. Während δ -Decanolacton leicht in die Poren von ZSM-5 (91,7 - 97,7 %) diffundieren konnte, war die Adsorption der cyclischen Terpenoide (*S*)-(+)-Carvon (8,4 - 13,2 %) und β -Ionon (23,1 - 42,8 %) deutlich eingeschränkt.

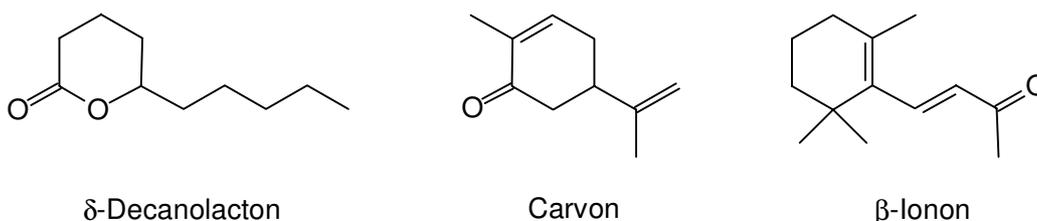


Abb. 2-35 Nichtaromatische, cyclische Aromastoffe aus der Aromamodelllösung

Die Grundgerüste dieser Moleküle bestehen aus einem cyclischen Sechsringsystem. Im δ -Decanolacton ist dabei eine Methylengruppe im Ring durch Sauerstoff ersetzt. Der Ringdurchmesser ist aufgrund der geringeren Länge der C-O-Bindung ($\sim 0,14$ nm) gegenüber der C-C-Bindung ($\sim 0,15$ nm) beim δ -Decanolacton kleiner als bei den Cyclohexenringen der Terpenoide. Als entscheidender Einfluß ist jedoch die Anzahl und Art der Ringsubstituenten anzusehen. Während δ -Decanolacton

zwei Substituenten (Carbonylgruppe und Alkylrest) besitzt, sind die Terpene mit drei ((*S*)-(+)-Carvon) bzw. vier (β -Ionon) Ringsubstituenten versehen, die die Diffusion im Zeolithkanal behindern.

Die erhöhte Adsorption von β -Ionon gegenüber (*S*)-(+)-Carvon ist wahrscheinlich auf die Polarität der Adsorptive zurückzuführen. Der polare Sauerstoff der Carbonylgruppe von (*S*)-(+)-Carvon befindet sich am Ring und steht damit ständig im unmittelbaren Kontakt zur hydrophoben Kanalwand des Zeolithen. Dieser Zustand ist insbesondere bei ZSM-5 1000 energetisch besonders ungünstig (s. Abb. 2-46). Im β -Ionon befindet sich die Carbonylfunktion in der Seitenkette und kann sich so möglicherweise flexibler an die Umgebungsverhältnisse anpassen.

2.2.2.3 Einfluß von Bindemitteln

Tabelle 2-25 Vergleich der Adsorptionseigenschaften von Zeolith-Pulvern und -Formkörpern bei konstantem Modul.

Substanz	Adsorption [%]				
	ZSM-5 28			DAY 200	
	Pulver	Si-FK	Al-FK	Pulver	Si-FK
2-Methoxypyrazin	> 97	69,4	47,5	20,7	30,0
(<i>E</i> 2)-Hexenal	92,4	64,9	52,9	80,1	60,1
3-Phenyl-1-propanol	40,0	38,8	26,1	85,8	59,2
(<i>S</i>)-(+)-Carvon	8,8	13,4	8,6	96,5	68,7
(\pm)- δ -Decanolacton	91,7	46,9	27,8	98,4	88,0
Butansäurebutylester	98,3	46,2	34,7	97,9	66,2
β -Ionon	23,1	n. B.	n. B.	99,6	86,0
1-Decanal	99,2	68,8	63,4	98,9	89,7
(<i>Z</i>)-Nerolidol	48,5	n. B.	n. B.	99,9	87,9

Aufgrund der geringen Partikelgrößen der Zeolithkristalle werden Zeolithe für Anwendungen in Festbettadsorbern in Formkörper gepreßt. Als Bindematerial wird oft amorphes Al_2O_3 oder SiO_2 eingesetzt. Die Zeolithe DAY 200 und ZSM-5 28

standen ebenfalls als Formkörper zur Verfügung und wurden in dieser Form wie die Pulver direkt zum Screening eingesetzt (Tabelle 2-25).

Während der Aufarbeitung zeigte sich jedoch, daß die Formkörper nicht ausreichend stabil für einem Einsatz im Batch-Verfahren waren. Nach 16-stündiger Agitation waren die Formkörper in allen Ansätzen zum Teil zerfallen.

Zeolith DAY 200

Die Beladung von DAY 200 reduzierte sich bei Verwendung von Formkörpern auf SiO₂-Basis anstelle von Pulver für die Einzelsubstanzen der Aromamodelllösung um 10 – 30 %. Grob überschlagen könnte die im Mittel um 20 % verringerte Adsorptionskapazität mit etwa 20 % Bindemittelanteil im Formkörper korrelieren. Jedoch wurde das theoretische Porenvolumen von DAY 200 (ca. 300 mg g⁻¹, Abschnitt 4.1.6.1) auch nach zwanzigprozentiger Reduktion durch die dargebotenen Aromastoffe (rechnerische Maximalbeladung 121 mg g⁻¹) nicht annähernd ausgefüllt, so daß dieser Umstand wahrscheinlich nicht die alleinige Ursache darstellte. Vielmehr ist wahrscheinlich, daß das polare, mesoporöse Bindermaterial selbst adsorptive Eigenschaften aufwies, die den erwünschten hydrophoben Eigenschaften des Zeolithen entgegenwirkten [44].

Eine Ausnahme bildete das 2-Methoxypyrazin. Die leichte Erhöhung des adsorbierten Anteils von 20 % auf 30 % der eingesetzten Menge könnte auf einer höheren Affinität von polaren Substanzen zum polaren Bindemittel zurückzuführen sein.

Zeolith ZSM-5 28

Der Zeolith ZSM-5 28 zeigt beim Einsatz von Formkörpern auf SiO₂ und Al₂O₃-Basis größere Einbrüche in der Beladung im Vergleich zum Pulver als DAY 200. Die Adsorption von Butansäurebutylester und δ -Decanolacton sank bei Verwendung von Si-Formkörpern auf die Hälfte und bei Al-Formkörpern auf ein Drittel des Wertes von ZSM-5-28-Pulver (Tabelle 2-25).

Die Adsorption an Zeolithen erfolgt im Sinne einer Porenfüllung im Inneren des Kristalls. Die Adsorptionskapazität sollte deshalb infolge einer Einbindung in ein makroporöses Bindematerial nicht leiden. Vielmehr ist davon auszugehen, daß das

Bindematerial selbst Adsorptionseigenschaften besitzt und einen kinetischen Effekt auf den Adsorptionsprozeß ausübt.

Der makroporöse Al₂O₃-Mantel ist hydrophil und dürfte auf dem Weg zu den Adsorptionsplätzen in den Zeolithporen ein zusätzliches Diffusionshemmnis für unpolare bis mittelpolare Adsorptive dargestellt haben. Außerdem bestand die Möglichkeit, daß Porenöffnungen während des Preßprozesses durch amorphes Kieselgel verstopft wurden und so nicht mehr für die Adsorptive zugänglich waren. Die reduzierte Oberfläche der in Formkörpern gebundenen Zeolithe im Vergleich zu den in Suspension feinverteilten Pulvern stellte einen zusätzlichen kinetischen Nachteil dar. Formkörper wurden deshalb für weitere Untersuchungen nicht eingesetzt.

2.2.2.4 Desorption und Wiederbeladung

Für die Desorption von Aromastoffen von hydrophoben Harzen werden bevorzugt organische Lösungsmittel verschiedener Polaritäten eingesetzt [39]. Die Auswahl der Lösungsmittel für die Desorption von Aromastoffen aus Zeolithen erfolgte unter vier Gesichtspunkten:

- Hohe Mobilität im Adsorbens (hoher Diffusionskoeffizient [45])
- Möglichst geringe Affinität zum Adsorbens
- Hohe Affinität zum Adsorptiv
- Lebensmittelrechtliche Zulassung

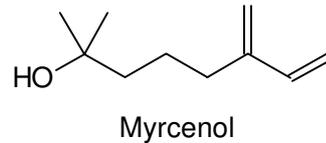
In Vorversuchen wurde zunächst sichergestellt, daß eine Adsorption der Zielsubstanzen aus organischen Lösungsmitteln an ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 nicht stattfand und somit eine prinzipielle Eignung der ausgewählten Lösungsmittel zur Desorption bestand. Als Stellvertreter für adsorbierbare Aromastoffe wurden hinsichtlich der Polarität und Struktur ein cyclischer Kohlenwasserstoff ((*R*)-(+)-Limonen) und ein acyclischer Terpenalkohol (Myrcenol) ausgewählt. Beide wurden aus Methanol und Aceton nicht adsorbiert (Ergebnisse nicht dargestellt).

(*R*)-(+)-Limonen) wurde aufgrund seiner schlechten Quantifizierbarkeit aus wäßrigen Lösungen (s. Abschnitt 4.2.1.9) jedoch nicht mehr in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen.

Da die Wahrscheinlichkeit für katalytische Umsetzungen mit fallendem Modul des Zeolithen, also mit steigender Anzahl der sauren Zentren zunimmt, wurde ZSM-5 150 als Adsorbens eingesetzt.

Aus den dargestellten Überlegungen ergab sich folgendes Modellsystem zur Untersuchung der Wiederverwendung von Zeolithen in drei aufeinanderfolgenden Adsorptions- und Desorptionszyklen:

Zeolith	ZSM-5 150
Adsorptiv	Myrcenol
Desorptionsmittel	Methanol



Die Adsorptionszeit betrug jeweils 24 h. Die desorbierte Menge war die Summe nach dreimal 60-minütiger Behandlung mit Methanol (s. Abb. 2-36, Abschnitte 4.2.1.6.1 und 4.2.1.8). Vorbehandlungen des Zeolithen mit Methanol oder durch Ionenaustausch mit K^+ ergaben keine signifikanten Veränderungen (Ergebnisse nicht dargestellt).

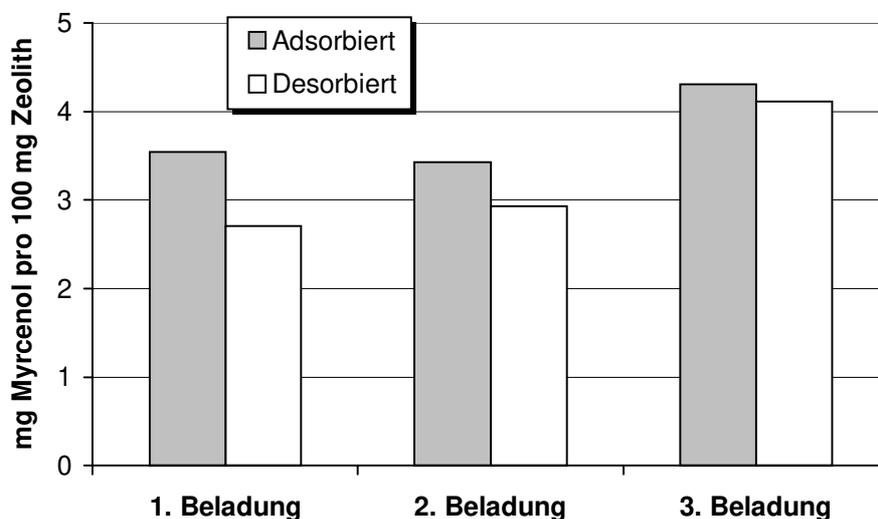


Abb. 2-36 Desorption und Wiederbeladung an ZSM-5 150 in drei aufeinanderfolgenden Zyklen bei 30 °C. Adsorptiv: Myrcenol, Desorptionsmittel: Methanol

Im ersten Zyklus konnten nur 77 % des adsorbierten Myrcenols durch Lösungsmittel-desorption gewonnen werden. Dieser Anteil stieg jedoch auf 86 % und 95 % in den

folgenden Adsorptions- und Desorptionszyklen. Da die Adsorptionszeit mit 24 h deutlich länger als die gesamte Desorptionszeit (3 h) war, ist die Differenz unter Zugrundelegung von gleichen kinetischen Verhältnissen für den Adsorptions- und Desorptionsprozeß nachvollziehbar. Da im zweiten und dritten Zyklus Myrcenol aus den vorhergehenden Adsorptionszyklen mit desorbiert wird, sind die erhöhten prozentualen Werte verständlich. Die Erhöhung der adsorbierten Menge im dritten Zyklus wird aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten (s. Abschnitt 2.2.3.2.1) deutlich. Da während der vorhergehenden Schritte keine vollständige Desorption erfolgte, waren bereits Myrcenol und Methanol in den Zeolithkanälen vorhanden, so daß eine erhöhte Diffusionsgeschwindigkeit und damit eine schnellere Adsorption weiterer Moleküle möglich war. Eine Vorbehandlung mit Methanol bewirkte diesen Effekt jedoch nicht.

Hinweise auf eine Deaktivierung des Adsorbens, Blockierung von Kanälen oder Kapazitätsverluste konnten nach drei Zyklen nicht festgestellt werden. Auch katalytische Umsetzungen des Adsorptivs wurden bei 30 °C nicht nachgewiesen.

2.2.2.5 Teilzusammenfassung

DAY-Zeolithe zeigten eine hohe Affinität zu Aromastoffen, die vergleichbar war mit der von Polystyren-Harzen. Kleine polare Moleküle wie 2-Methoxypyrazin wurden aber nur eingeschränkt adsorbiert. Die Adsorption der mittelpolaren Substanzen war abhängig vom Modul. Sie wurden vom hydrophoben DAY 200 fast quantitativ aus einer Modellösung entfernt.

Die Zeolithe der ZSM-5 Reihe adsorbierten bevorzugt kleine Moleküle (2-Methoxypyrazin, (*E2*)-Hexenal, Butansäurebutylester) oder solche, deren Struktur die Anordnung in einer linearen, möglichst "schlanken" Konformation zuließ (1-Decanal, 3-Phenyl-1-propanol, δ -Decanolacton). Der Zeolith ZSM-5 zeigte damit einen deutlichen Molekularsiebeffekt, der vom Modul mit beeinflußt wurde und sich insbesondere bei ringsubstituierten cyclischen Verbindungen (δ -Decanolacton, (*S*)-(+)-Carvon, β -Ionon) auswirkte.

Die Verwendung von Formkörpern basierend auf SiO₂- und Al₂O₃-Bindern bewirkte bei DAY 200 SiO₂-FK und insbesondere bei ZSM-5 28 Al₂O₃-FK negative Veränderungen hinsichtlich der Adsorptionskapazität, -selektivität und -kinetik. Als

Ursache sind unerwünschte adsorptive Eigenschaften des mesoporösen Bindematerials wahrscheinlich. Die Stabilität der Formkörper war für eine Anwendung im Batch-Verfahren nicht ausreichend.

Die Desorption von Myrcenol von ZSM-5 150 gelang mit Methanol, das eine hohe Beweglichkeit im Zeolithen und eine hohe Affinität zum Adsorptiv aufweist. Da die Mobilität des Adsorptivs im Zeolithen mit höherer Beladung zunahm, erwies sich die Anwendung des Zeolithen in drei Adsorptions- und Desorptionszyklen als vorteilhaft. Kapazitätseinbußen oder katalytische Umsetzungen des Adsorptivs waren nicht feststellbar.

2.2.3 Adsorption von Monoterpenen und Estern aus wässriger Lösung an ZSM-5

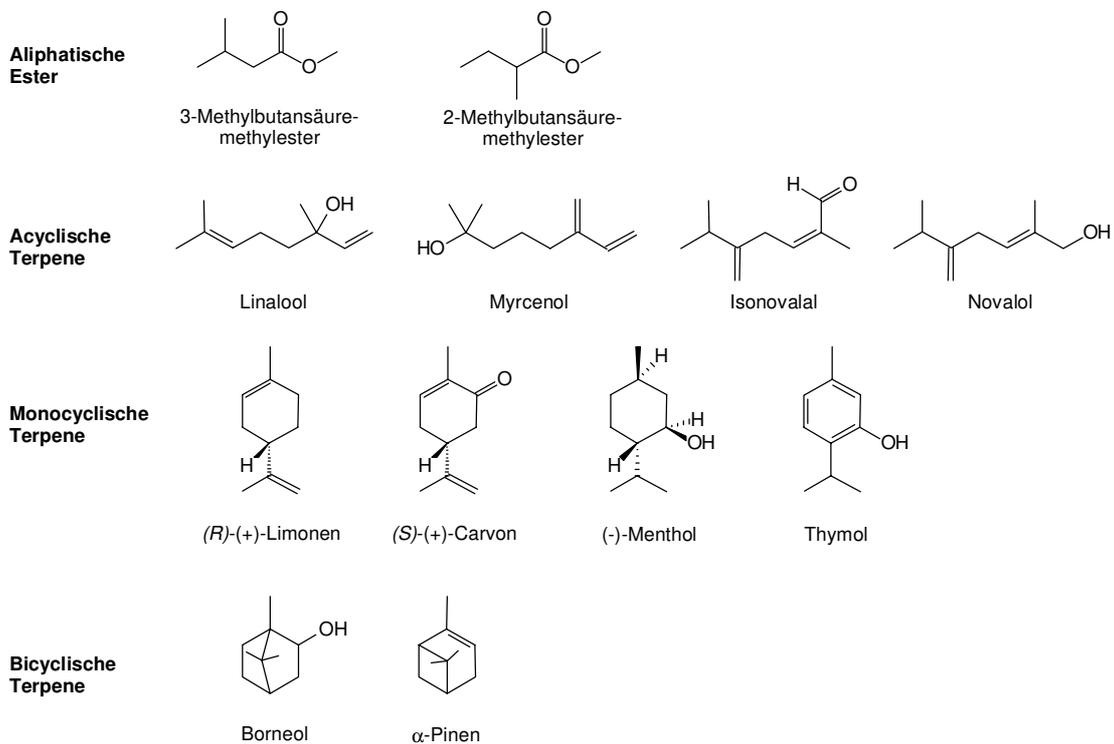


Abb. 2-37 Aromastoffe zur Untersuchung thermodynamischer und kinetischer Aspekte der Adsorption an ZSM-5 aus wässriger Lösung

Die Ergebnisse des Screenings eröffneten verschiedene Ansatzpunkte für mögliche Trennungen von Monoterpengemischen an ZSM-5 Zeolithen. Für detailliertere Untersuchungen der thermodynamischen und kinetischen Adsorptionseigenschaften der Zeolithe wurden Aromastoffe ausgewählt, die im Zusammenhang mit dem EU-Projekt EC BIO4-CT95-0049 mögliche Zielsubstanzen aus der biotechnologischen Produktion von Monoterpenen darstellten. Zusätzlich wurden weitere Verbindungen in die Untersuchungen mit einbezogen, die technologisch bedeutsame Trennprobleme repräsentierten (s. Abb 2-37).

2.2.3.1 Isothermen an ZSM-5

2.2.3.1.1 Langmuir-Isothermen

Das Adsorptionsmodell nach Langmuir beruht auf der Vorstellung, daß eine limitierte Anzahl energetisch homogener Adsorptionsplätze auf der Oberfläche des Adsorbens zur Verfügung stehen. Sie werden in Abhängigkeit von der Konzentration des Adsorptivs in der umgebenden Phase besetzt, bis bei der Maximalbeladung q_{∞} eine Sättigung stattgefunden hat (Formeln s. Abschnitt 4.2.1.6.2). Eventuelle Wechselwirkungen zwischen den Adsorptivmolekülen werden nicht berücksichtigt. Der Langmuir-Parameter b ist ein Maß für die Steigung der Adsorptionsisotherme vor Erreichen der Maximalbeladung, also bei geringen Adsorptivkonzentrationen. Je steiler diese Gerade verläuft, desto höher ist die Affinität zwischen Adsorptiv und Adsorbens.

Tabelle 2-26 Molekulargewicht und Zusammensetzung der Einheitszellen (EZ) von wasserfreien ZSM-5 Zeolithen in der H-Form $H_n Al_n Si_{96-n} O_{192}$ [46]

Zeolith	Molekulargewicht einer EZ [Da]	Theoretische Anzahl der sauren Zentren (Al) pro EZ
H-ZSM-5 28	5767,8	3,3
H-ZSM-5 150	5768,0	0,6
H-ZSM-5 1000	5768,1	0,1

Zeolithe besitzen aufgrund ihrer definierten Kristallstruktur ein limitiertes Porenvolumen. Eine homogene Oberfläche ist insbesondere im praktisch Aluminiumfreien Zeolith ZSM-5 1000 (Silicalite) gegeben. Hier ist nur in höchstens einer von zehn Einheitszellen eines von 96 Si-Atomen durch ein Al-Atom substituiert, das eine negative Ladung in das Gitter einführt (Tabelle 2-26). Das Porensystem von ZSM-5 150 enthält bei Zugrundelegung einer gleichmäßigen Verteilung der Aluminiumatome in zwei von drei Einheitszellen ein saures Zentrum, das die Hydrophobizität der Oberfläche stört. Beide Zeolithe können als energetisch weitgehend homogen angesehen werden. Die Gleichgewichtsadsorption an Zeolith ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 wurde deshalb gut durch das Langmuir-Modell beschrieben (s. Abb. 2-41 bis 2-43). Bei Zeolith ZSM-5 28 befinden sich im Mittel drei bis vier saure Zentren in jeder Einheitszelle, so daß keine homogene Oberfläche vorliegt. Zur Ermittlung von theoretischen Maximalbeladungen wurden trotzdem Langmuir-Isothermen berechnet (Tabelle 2-27).

Maximalbeladung

Betrachtet man alle in dieser Untersuchung eingesetzten Systeme, ergab sich eine maximale Beladung von $0,67 \text{ mmol L}^{-1}$ entsprechend 3,9 Molekülen pro Einheitszelle für 3-Methylbutansäuremethylester an ZSM-5 1000. Eine ähnlich hohe Maximalbeladung wurde auch für die deutlich größeren Terpenmoleküle (\pm)-Linalool und (*R*)-(+)-Limonen ermittelt (Tabelle 2-27).

Jede Einheitszelle im Zeolith ZSM-5 enthält genau vier Kanalkreuzungen. Es ist darum wahrscheinlich, daß die verzweigten Ester und die Terpenmoleküle in diesen ausgedehnten Hohlräumen bevorzugt Platz finden [47]. Die Differenz von 0,1-0,3 Molekülen pro Einheitszelle würde mit der theoretischen Anzahl an sauren Zentren im ZSM-5 1000 korrelieren (Tabelle 2-26). Mit abnehmendem Modul fiel die erzielbare Maximalbeladung für alle Adsorptive mit Ausnahme des (*S*)-(+)-Carvons (Tabelle 2-27). Hierfür dürften Co-Adsorptionsprozesse verantwortlich sein, die bei einer Erhöhung der Hydrophilie des Adsorbens an Bedeutung gewinnen. Ein saures Si-OH-Al-Zentrum in Zeolithen kann Kationen und Wasser binden [48, 49] und so Adsorptionsplätze für organische Adsorptive blockieren. Neben Wasser und Kalium-Ionen war auch Methanol als potentielles Adsorptiv in der Modellösung vorhanden. Die Affinität von Methanol zu ZSM-5 wächst mit abnehmendem Modul [50] und damit auch seine Bedeutung als Konkurrent um Adsorptionsplätze.

Tabelle 2-27 Maximalbeladungen verschiedener Aromastoffe an ZSM-5 berechnet aus Langmuir-Isothermen bei 30 °C (MBM = Methylbutansäuremethylester)

Substanz	Maximalbeladung [mmol g ⁻¹] / [Moleküle EZ ⁻¹]					
	ZSM-5 1000		ZSM-5 150		ZSM-5 28	
Borneol	0	0	0	0	n. B.	
(S)-(+)-Carvon	0,11	0,6	0,30	1,7	n. B.	
Isonovalal	0,49	2,8	0,33	1,9	n. B.	
(R)-(+)-Limonen	0,65	3,7	0,41	2,4	n. B.	
(±)-Linalool	0,66	3,8	0,49	2,8	n. B.	
(-)-Menthol	0	0	0	0	n. B.	
2-MBM	0,66	3,8	0,63	3,6	0,17	1,0
3-MBM	0,67	3,9	0,63	3,6	0,17	1,0
Myrcenol	0,56	3,2	0,46	2,7	0,13	0,75
Novalol	0,30	1,7	n. B.		n. B.	
Thymol	0,07	0,4	0,05	0,3	n. B.	

Der Molekularsiebeffekt von ZSM-5 wurde anhand der ermittelten Maximalbeladungen für Monoterpenalkohole an ZSM-5 1000 deutlich. Während von den zweifach methylverzweigten Alkoholen Linalool und Myrcenol noch mehr als drei Moleküle EZ⁻¹ adsorbiert wurden, sank die Beladung für den dreifach verzweigten Alkohol Novalol auf etwa die Hälfte (1,7 Moleküle EZ⁻¹). Eine Alkoholfunktion am aromatischen System (Thymol) bewirkte eine weitere Reduktion auf 0,4 Moleküle EZ⁻¹. Befand sich die Hydroxylgruppe am Cyclohexanring ((-)-Menthol) oder an einem bicyclischen System (Borneol), so war bei 30 °C keine Aufnahme in das Porensystem von ZSM-5 mehr möglich. Für α -Pinen war aufgrund der hohen Flüchtigkeit und der geringen Wasserlöslichkeit eine sichere Quantifizierung aus der wäßrigen Lösung nicht möglich. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche (s. Abschnitt 4.2.1.7.1) sprachen jedoch nicht für eine Adsorption von α -Pinen durch ZSM-5.

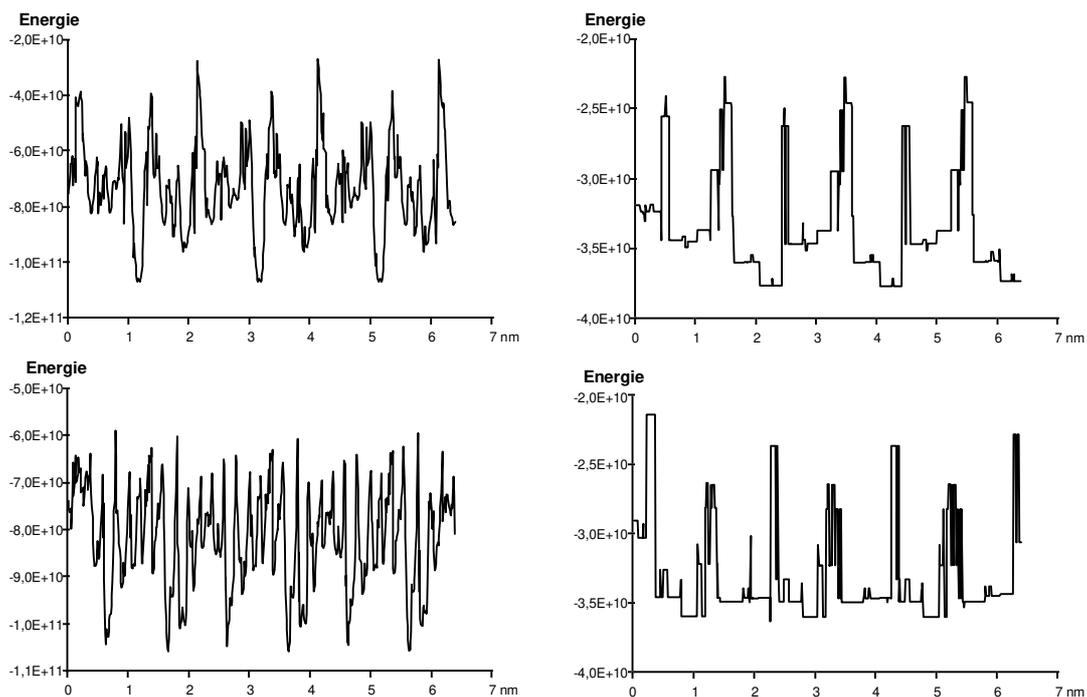


Abb. 2-39 Wechselwirkungsenergien von (*R*)-(+)-Limonen in einem geraden Silicalite-Kanal (oben C-1, unten C-8)

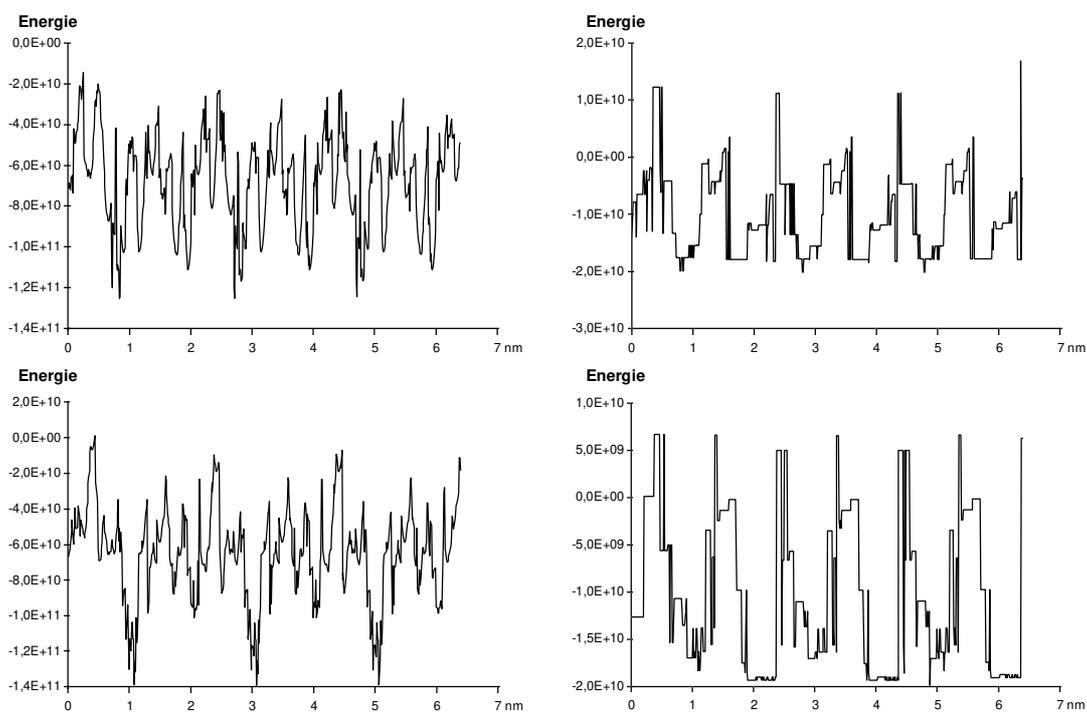


Abb. 2-40 Wechselwirkungsenergien von (*S*)-(+)-Carvon in einem geraden Silicalite-Kanal (oben: C-1, unten C-8)

Am Institut für Anorganische Chemie der Universität Hannover, Arbeitsgruppe P. Behrens, wurde für (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon durch **Molecular Modelling** eine Berechnung der Wechselwirkungsenergien in 0,01 nm Schritten entlang des geraden Kanals im Silicalite durchgeführt. Dabei wurde das Molekül am C-1 (Darstellung oben) bzw. am C-8 (Darstellung unten) durch den Kanal bewegt (Abb. 2-39 und Abb. 2-40). Für die rechte Darstellung wurde jeder einzelne Schritt nochmals minimiert.

Die Länge des geraden Kanals in ZSM-5 beträgt 1,99 nm EZ⁻¹ [46]. Darin sind zwei Kanalkreuzungen enthalten. Tatsächlich wiederholen sich auch die berechneten Energiewerte in 2 nm-Intervallen. Jedoch wird zum Teil nur in jeder zweiten Kanalkreuzung ein absolutes Energieminimum erreicht. Die Lage der absoluten Minima unterscheidet sich beim (*R*)-(+)-Limonen in Abhängigkeit von der Raumorientierung des Moleküls (Abb. 2-39, obere Darstellung im Vergleich zur unteren Darstellung). Auch für das (*S*)-(+)-Carvon (Abb. 2-40) wird dieser Unterschied deutlich. Wenn nur jede zweite Kanalkreuzung geeignet ist, ein lokales Energieminimum für (*S*)-(+)-Carvon zu bieten, ließe sich daraus eine etwa um die Hälfte reduzierte Maximalbeladung gegenüber (*R*)-(+)-Limonen erklären.

Die ermittelte Maximalbeladung von (*S*)-(+)-Carvon an ZSM-5 1000 beträgt aber nur 0,6 Moleküle EZ⁻¹. Jedoch konnten an ZSM-5 150 in Übereinstimmung mit dieser Vorstellung 1,7 Moleküle EZ⁻¹ adsorbiert werden (Tabelle 2-27 und Abb. 2-43). Bei der Adsorption von (*S*)-(+)-Carvon ist also ein zusätzlicher positiver Einfluß durch polare Wechselwirkungen notwendig, um die theoretische Maximalbeladung zu erreichen.

Ein vergleichbares Experiment zur Adsorption von (*S*)-(+)-Carvon an das PS-DVB-Harz Lewatit OC 1064 ergab aus der Langmuir-Isotherme eine theoretische Maximalbeladung von 3,5 mmol g⁻¹ (Ergebnisse nicht dargestellt).

Affinität

Der Parameter *b* aus der Langmuir-Isotherme bietet eine Möglichkeit, Aussagen über die Affinität zwischen Adsorptiv und Adsorbens zu treffen. Mit Ausnahme von (*S*)-(+)-Carvon zeigten alle untersuchten Adsorptive eine Zunahme der Affinität zu Zeolithen mit steigendem Modul. Der Unterschied wurde insbesondere beim Übergang vom Modul 28 zum Modul 150 deutlich. Der Affinitätsparameter erhöhte sich bei allen untersuchten Aromastoffen mindestens um das Zehnfache. Zwischen

Modul 150 und Modul 1000 waren die Unterschiede nicht mehr so deutlich (Tabelle 2-28). Der Affinitätsparameter aus einer vergleichbaren Langmuir-Isotherme von (*S*)-(+)-Carvon an Lewatit OC 1064 lag mit $1,9 \text{ L mmol}^{-1}$ noch deutlich unter den Werten für den polarsten Zeolith ZSM-5 28 (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tabelle 2-28 Affinitätsparameter aus den Langmuir-Isothermen (MBM = Methylbutansäuremethylester)

Substanz	Affinitätsparameter b [L mmol^{-1}]		
	ZSM-5 1000	ZSM-5 150	ZSM-5 28
(<i>S</i>)-(+)-Carvon	500	2400	n. B.
(<i>R</i>)-(+)-Limonen	2600	1400	n. B.
(\pm)-Linalool	740	770	n. B.
2-MBM	770	200	9,9
3-MBM	320	160	18
Myrcenol	1100	270	14
Novalol	660	n. B.	n. B.

Die ermittelten Werte stehen mit den oben getroffenen Aussagen über die Homogenität der hydrophoben Oberfläche im Einklang. Generell konnte gefolgert werden, daß eine Erhöhung der Hydrophobizität der Zeolithoberfläche auch eine Erhöhung der Affinität zu den Terpenoiden und Methylestern bewirkte. Einzelne Extremfälle ((*S*)-(+)-Carvon, Linalool und Myrcenol) könnten auf der Position der sauren Zentren im Zeolithgitter beruhen, die individuell mehr oder weniger günstig mit Polaritäten im Adsorptiv wechselwirkten.

Die thermodynamischen Adsorptionseigenschaften der konstitutionsisomeren Methylbutansäuremethylester unterschieden sich nur wenig voneinander (Abb. 2-41). Für 2-MBM wurden jedoch höhere Affinitätsparameter aus den Langmuir-Isothermen an ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 ermittelt (Tabelle 2-28). In diesem Fall sind wahrscheinlich die Wechselwirkungsenergien im Energieminimum unterschiedlich.

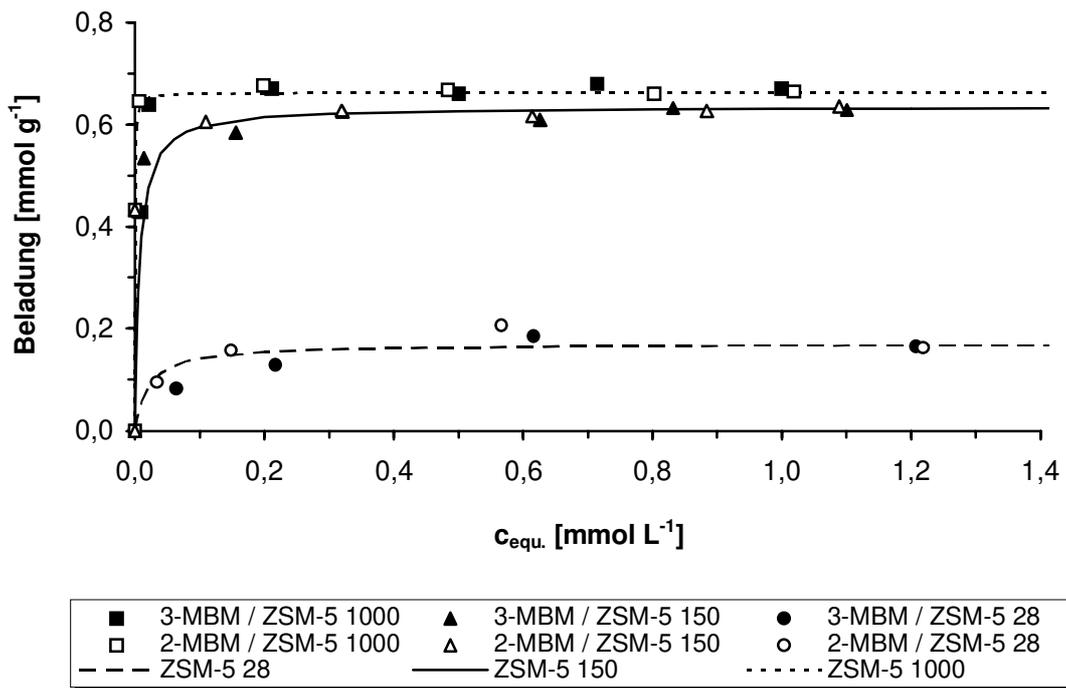


Abb. 2-41 Experimentelle Werte und berechnete Langmuir-Einzelisothermen von 2- und 3-Methylbutansäuremethylester (MBM) an ZSM-5 aus 50 mmol L^{-1} Phosphatpuffer pH 7,0 bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 4 Tage Adsorptionszeit

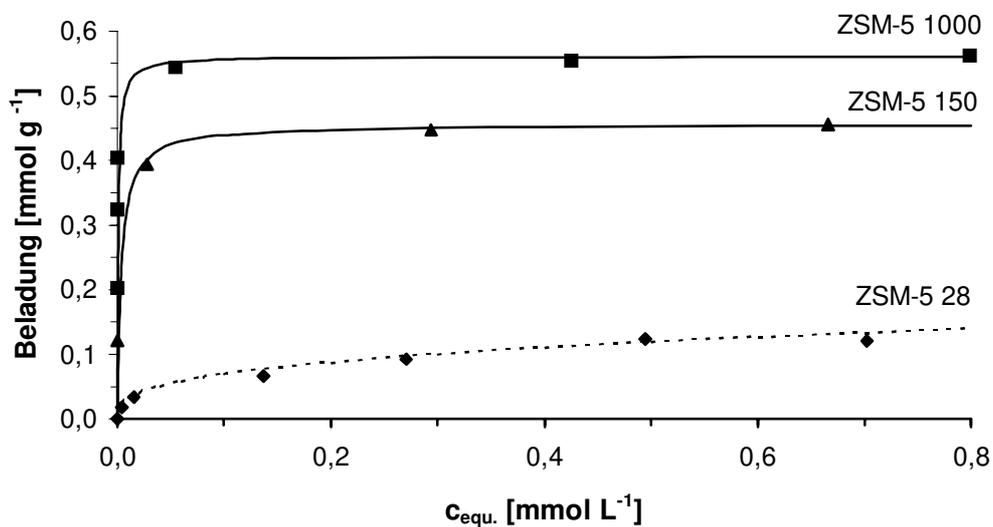


Abb. 2-42 Experimentelle Werte und berechnete Langmuir- (ZSM-5 1000 und ZSM-5 150) und Freundlich (ZSM-5 28) Einzelisothermen von Myrcenol an ZSM-5 aus 50 mmol L^{-1} Phosphatpuffer pH 7,0 bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 Tage Adsorptionszeit.

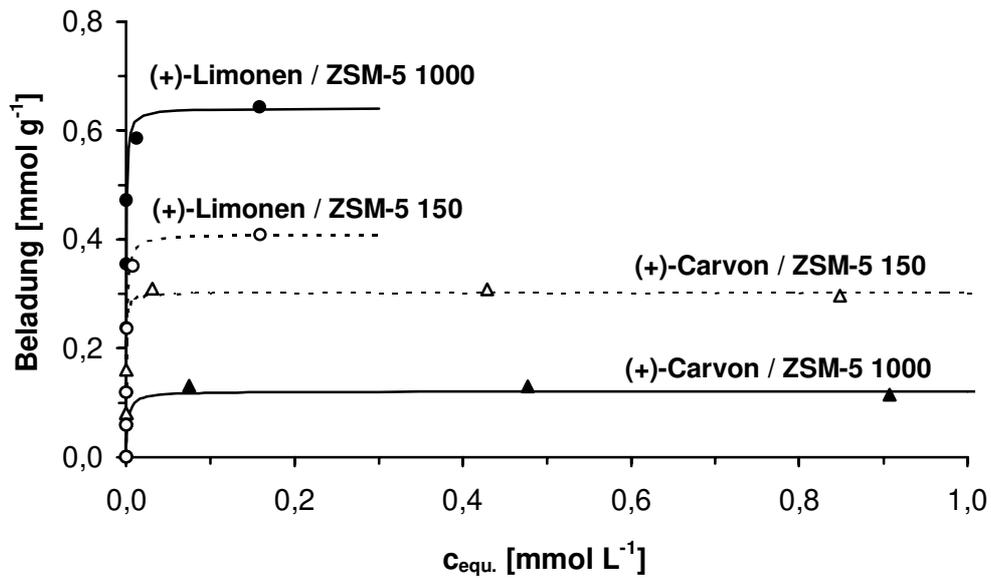


Abb. 2-43 Experimentelle Werte und berechnete Langmuir-Einzelisothermen von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon an ZSM-5 aus 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH 7,0 bei 24 °C, 5 Tage Adsorptionszeit.

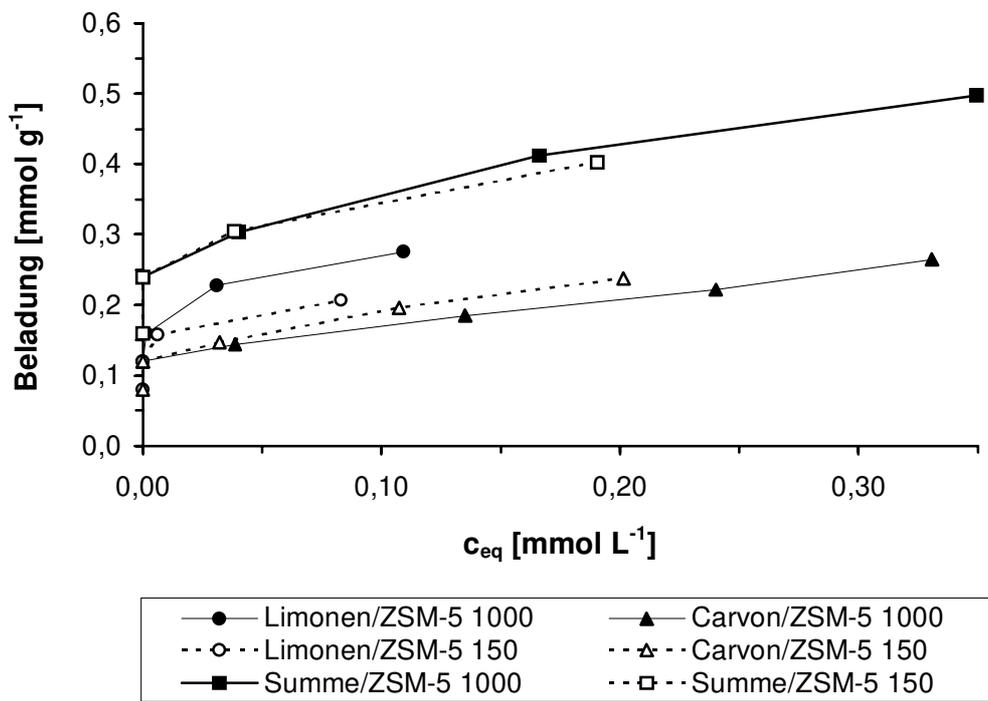


Abb. 2-44 Experimentelle Werte für Gemischtisothermen von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon an ZSM-5 aus 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH 7,0 bei 24 °C, 5 Tage Adsorptionszeit.

Die Adsorptionsenergie von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon wurde durch Molecular Modelling für einen Kanalkreuzungspunkt (Energiminimum) in Silicalite bestimmt. Die freiwerdende Energie aus den Wechselwirkungen zwischen Silicalite und dem Adsorptiv war für (*S*)-(+)-Carvon mit $84,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ sogar etwas höher als für (*R*)-(+)-Limonen ($76,9 \text{ kJ mol}^{-1}$). Auf einen niedrigeren Affinitätsparameter (Tabelle 2-28) konnte daraus nicht geschlossen werden.

2.2.3.1.2 Freundlich Isothermen

Die meisten Adsorbentien besitzen energetisch heterogene Oberflächen. Der Adsorptionsprozeß verläuft in diesem Falle so, daß zunächst schnell die energetisch attraktivsten Plätze durch Adsorptivmoleküle besetzt werden. Dann folgen die energieärmeren Positionen. Wenn die Oberfläche weitgehend belegt ist, erlauben Wechselwirkungen zwischen den Adsorptivmolekülen auch einen Aufbau mehrerer Adsorptionsschichten. Aus dieser Vorstellung ergibt sich eine exponentielle Form der Adsorptionsisotherme, die als Freundlich- oder Vollmer-Isotherme bekannt ist (Formeln s. Abschnitt 4.2.1.6.2). Der Parameter n im Exponenten ist i. a. < 1 . Für $n = 1$ ergibt sich die lineare Henry-Isotherme, mit der Adsorptionsprozesse aus sehr verdünnten Lösungen oft schon ausreichend beschrieben werden können. Die Größe des Freundlich-Exponenten n ist umgekehrt proportional zur Affinität zwischen Adsorptiv und Adsorbens in verdünnten Lösungen.

ZSM-5 ist aufgrund der Präsenz von drei bis vier sauren Zentren pro EZ in der sonst hydrophoben Oberfläche als heterogenes Adsorbens einzuordnen (s. Tabelle 2-26). An diesen Zentren kann Wasser adsorbiert werden. Die gemessenen Isothermenpunkte können deshalb nicht mehr näherungsweise wie Einzelisothermen behandelt werden, sondern müssen als Gemischtadsorptionsisothermen betrachtet werden. Die Freundlich-Isotherme beschreibt Gemischtadsorptionen in der Regel besser als die Langmuir-Isotherme [39], da hier auch Wechselwirkungen zwischen den Adsorptiven mit eingeschlossen werden.

Tabelle 2-29 Freundlich-Parameter (MBM = Methylbutansäuremethylester, GA = Gemischtadsorption von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon)

Substanz	Zeolith	Freundlich-Parameter	
		k [L g ⁻¹]	n
(<i>S</i>)-(+)-Carvon (GA)	ZSM-5 1000	0,30	0,23
(<i>R</i>)-(+)-Limonen (GA)	ZSM-5 1000	0,36	0,13
Summe (GA)	ZSM-5 1000	0,63	0,23
(<i>S</i>)-(+)-Carvon (GA)	ZSM-5 150	0,36	0,26
(<i>R</i>)-(+)-Limonen (GA)	ZSM-5 150	0,35	0,16
Summe (GA)	ZSM-5 150	0,63	0,23
2-MBM	ZSM-5 28	0,19	0,18
3-MBM	ZSM-5 28	0,18	0,26
Myrcenol	ZSM-5 28	0,15	0,34

Alle Isothermen, die als Gemischtadsorptionsprozeß einzuordnen waren, wurden tatsächlich besser durch die Freundlich-Isotherme beschrieben. Hierzu gehörten alle Adsorptionsprozesse an ZSM-5 28 (Abb. 2-41 und Abb. 2-42) sowie die Gemischtadsorptionen von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon an ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 (Abb. 2-44). Aussagen über die Affinität des Adsorptivs bei geringen Adsorptivkonzentrationen in der wäßrigen Lösung können über die Größe des Freundlich-Exponenten n getroffen werden. Je kleiner der Wert ist, desto steiler verläuft die Isotherme bei geringen Adsorptivkonzentrationen und desto größer deshalb seine Affinität zum Adsorbens. Für (*R*)-(+)-Limonen ergab sich im Vergleich zu (*S*)-(+)-Carvon eine höhere Affinität zu beiden Zeolithen (Tabelle 2-29). Dieses Ergebnis steht für ZSM-5 1000 im Einklang mit den für die Langmuir-Einzelisothermen getroffenen Aussagen.

Im Gemischtadsorptionsprozeß konnte zudem für (*S*)-(+)-Carvon eine insgesamt höhere Beladung in ZSM-5 1000 erreicht werden, die mit einer geringeren Ausprägung des aus den Einzeladsorptionsisothermen zu erwartenden Trenneffekts verbunden war.

2.2.3.2 Adsorptionskinetik und Diffusionskoeffizienten in ZSM-5

Die aufgrund der Einzelisothermen voraussehbare Trennbarkeit von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon an ZSM-5 1000 war bei Durchführung einer Gemischtadsorption im thermodynamischen Gleichgewicht nicht mehr mit gleicher Deutlichkeit nachvollziehbar (Abb. 2-43 im Vergleich zu Abb. 2-44). Um ein besseres Verständnis dieser Beobachtungen zu erreichen, wurden kinetische Untersuchungen der Adsorptionsprozesse durchgeführt.

Bei der Messung der Adsorptionskinetiken der Aromastoffe wurde die Beladung der Zeolithe in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Die resultierenden Kurven repräsentieren jedoch nicht die tatsächliche Diffusionsgeschwindigkeit des Adsorptivs in den Mikroporen des Zeoliths. Die meßbare Adsorptivaufnahme ist von der Oberfläche des Adsorbens und damit von seiner Partikelgröße abhängig. Aus dem Verhältnis der Beladung zum Zeitpunkt t zur Maximalbeladung konnten unter Berücksichtigung des Partikelradius' die Diffusionskoeffizienten berechnet werden (s. Abschnitt 4.2.1.7.2). Dafür waren zwei Näherungen notwendig:

- Alle Partikel sind kugelförmig.
- Alle Partikel sind gleich groß. Der Partikelradius wurde aus dem Mittelwert der jeweils gemessenen Partikelgrößenverteilung berechnet (Abschnitt 2.2.1).

Die Bestimmung der Einzelstoffkinetiken erfolgte nur an den Zeolithen ZSM-5 1000 und ZSM-5 150, deren Adsorptionsisothermen durch das Langmuir-Modell beschrieben und daraus Maximalbeladungen bestimmt werden konnten. Außerdem konnten Co-Adsorptionsprozesse und gegenseitige Beeinflussungen der Adsorptive vernachlässigt werden (Tabelle 2-30).

Tabelle 2-30 Mittlere Diffusionskoeffizienten von Aromastoffen bei 21 °C und einer Beladung zwischen 0,1 - 0,5 mmol g⁻¹ (GA = Gemischtadsorption)

Substanz	Diffusionskoeffizient [m ² s ⁻¹]	
	ZSM-5 1000	ZSM-5 150
(S)-(+)-Carvon	1,1·10 ⁻¹⁷	5,5·10 ⁻¹⁸
(S)-(+)-Carvon (GA)	5,2·10 ⁻¹⁷	n. B.
Isonovalal	1,4·10 ⁻¹⁷	1,0·10 ⁻¹⁸
(R)-(+)-Limonen	1,1·10 ⁻¹⁶	n. B.
(±)-Linalool	9,5·10 ⁻¹⁷	2,4·10 ⁻¹⁸
Myrcenol	7,1·10 ⁻¹⁷	2,9·10 ⁻¹⁸
Thymol	< 10 ⁻¹⁸	-
2-Methyl-butansäure-methylester	7,8·10 ⁻¹⁴	1,1·10 ⁻¹⁵
3-Methyl-butansäure-methylester	2,5·10 ⁻¹³	2,6·10 ⁻¹⁴

Während die Methylester innerhalb von wenigen Minuten (3-MBM an ZSM-5 1000) bis etwa einer Stunde (2-MBM an ZSM-5 150) ihre Maximalbeladung in ZSM-5 Pulvern erreichten, war bei den Terpenalkoholen die Kapazität der ZSM-5 Zeolithe erst nach über 24 Stunden ausgeschöpft. Für die Adsorption von Isonovalal, (S)-(+)-Carvon und Thymol vergingen mehrere Tage bis zur Einstellung des Gleichgewichts.

2.2.3.2.1 Abhängigkeit von der Beladung

Die Diffusionskoeffizienten wurden für jeden Zeitpunkt der Probenahme aus der gemessenen Adsorptionskinetik berechnet und repräsentierten damit die kinetischen Verhältnisse für den jeweiligen Beladungszustand des Zeolithen. Der überwiegenden Anteil der ermittelten Diffusionskoeffizienten für ein System war nicht konstant (s. Abb. 2-45). Es wurden drei Tendenzen festgestellt:

- Die Diffusionskoeffizienten stiegen im Bereich geringer Beladungen (z. B. (S)-(+)-Carvon). Die eigentliche Diffusionsbarriere ist in einem frühen Stadium der Adsorptionskinetik zu suchen, also wahrscheinlich beim Eintritt in die Zeolithpore

(s. Abb. 2-46). Der Eintritt weiterer Moleküle könnte erleichtert stattfinden, wenn bereits adsorbierte Moleküle eine Anpassung der Kanalform an das Molekül bewirkt haben.

- Die Diffusionskoeffizienten fielen rapide im Bereich geringer Beladungen (z. B. (*R*)-(+)-Limonen). Ein früher Adsorptionsschritt führt schon zu einem hohen Energiegewinn. Im Fall von (*R*)-(+)-Limonen ist das wahrscheinlich die Oberflächenadsorption, da der Kohlenwasserstoff extrem schlecht wasserlöslich ist. Die Diffusionsbarriere besteht dann in der eigentlichen Porendiffusion.
- Die Diffusionskoeffizienten fielen langsam kurz vor Erreichen der Maximalbeladung (z. B. 2-MBM). Die von außen meßbare Diffusion nimmt mehr und mehr ab, da das System ein Gleichgewicht von Adsorption und Desorption erreicht. Darüber hinaus kann die zunehmende Beladung zu einer gegenseitigen Behinderung der adsorbierten Moleküle beim Wechsel von einem Adsorptionsplatz zum nächsten führen.

Beim Myrcenol waren die Diffusionskoeffizienten weitgehend konstant. Hier könnten sich die beiden erstgenannten Effekte etwa aufheben. In Abhängigkeit vom Modul des Zeolithen wurde eine leichte Tendenz zum einen wie zum anderen Diffusionsverlauf festgestellt.

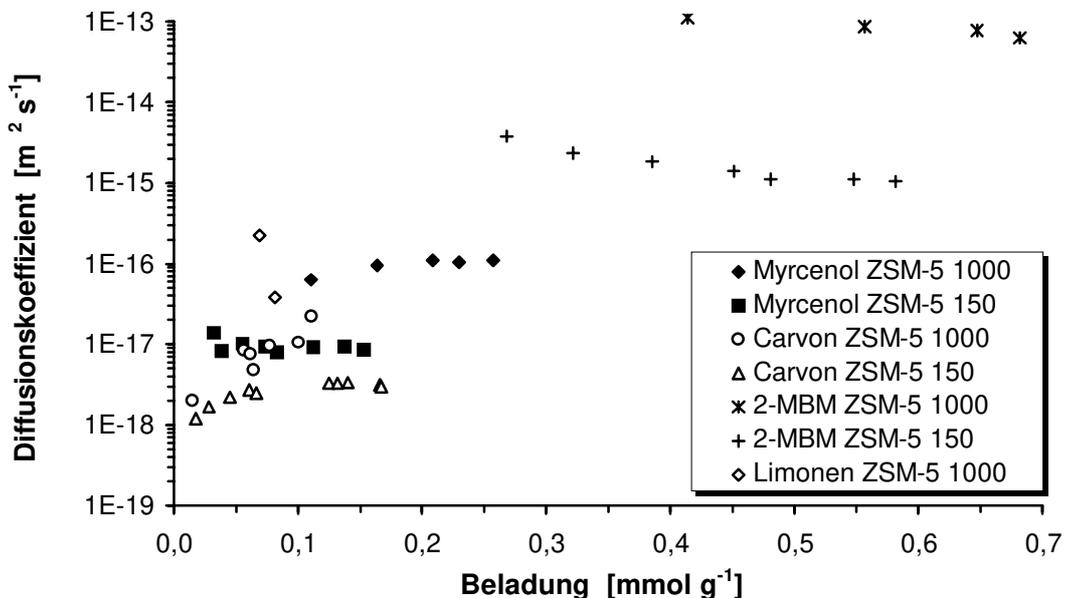


Abb. 2-45 Beladungsabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten in ZSM-5

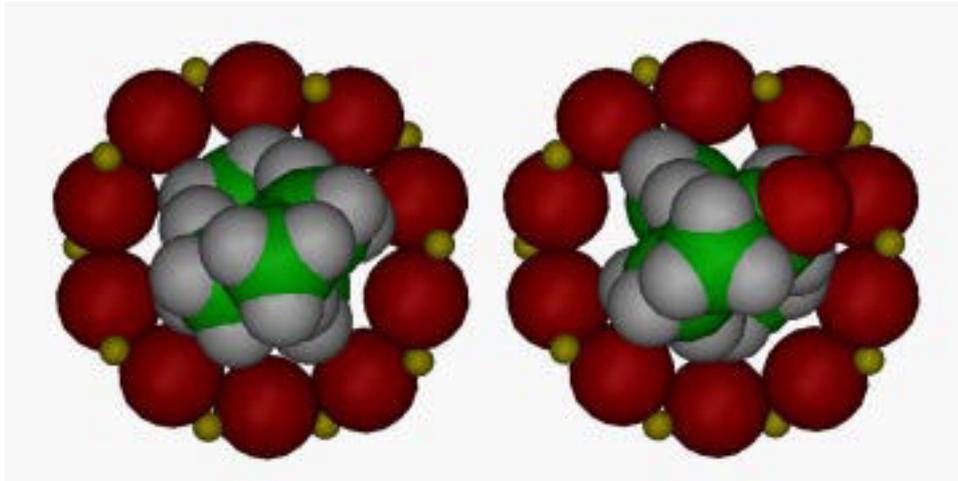


Abb. 2-46 Molecular Modelling Darstellung von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon vor einem 10-Ring-Kanal im ZSM-5 (Silicalite) mit Blick auf das C-7

2.2.3.2.2 Abhängigkeit von der Struktur des Adsorptivs

Acyclische Monoterpene

Die zweifach verzweigten acyclischen Monoterpenalkohole Linalool und Myrcenol, die sich in den Positionen der Doppelbindungen und der Hydroxylgruppe unterscheiden, wiesen in ZSM-5 fast gleich große Diffusionskoeffizienten auf. Mit zunehmender Molekülgröße wirkten sich Positionsänderungen einzelner Gruppen im Verhältnis zum Gesamtmolekül wahrscheinlich nicht mehr so gravierend auf Wechselwirkungsenergien im Zeolithen aus wie bei den kleinen Estern (s. u.).

Eine weitere Verzweigung des Kohlenstoffgerüsts beim Isonovalal führte jedoch zu einer deutlichen Verlangsamung der Diffusion (Tabelle 2-30).

2- und 3-Methylbutansäuremethylester

Obwohl sich 2-MBM und 3-MBM sich nur in der Position der Methylverzweigung unterscheiden, waren deutliche Unterschiede ihrer Mobilität in ZSM-5 meßbar (s. Abb. 2-47). Die Diffusionsgeschwindigkeit von 3-MBM war im Vergleich zu 2-MBM in ZSM-5 1000 etwa dreimal größer, in ZSM-5 150 wurde für 3-MBM ein 24-fach höherer Diffusionskoeffizient ermittelt als für 2-MBM. Die Art der Verzweigung, die bereits die Affinität zwischen Adsorptiv und Adsorbens beeinflusste, wirkte sich auch auf die Mobilität im Kanalsystem aus. Mit der höheren Affinität von 2-MBM zu ZSM-

5 1000 und ZSM-5 150 wuchsen also auch die Anziehungskräfte im Adsorptionsminimum.

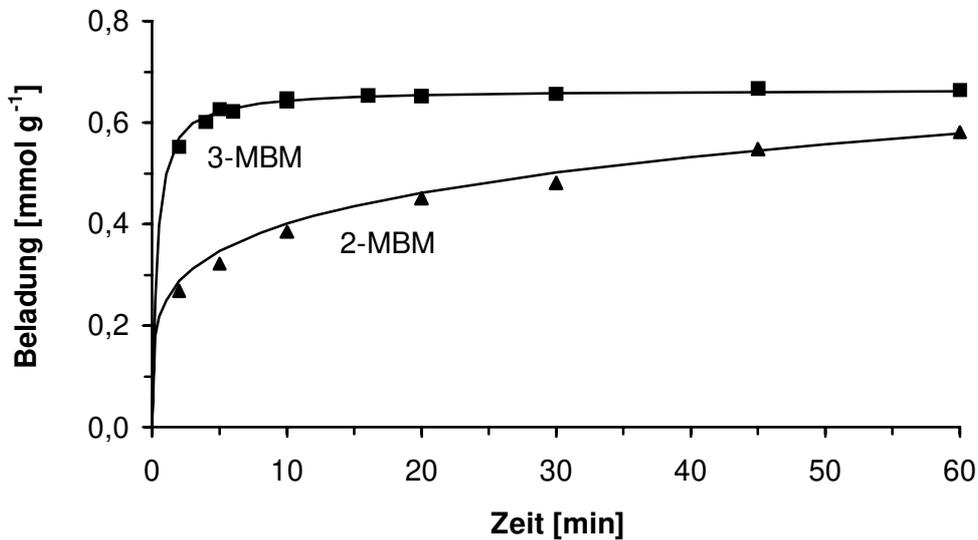


Abb. 2-47 Adsorptionskinetik von 2- und 3-Methylbutansäuremethylester (MBM) an ZSM-5 150 bei 21 °C (Einzeladsorptionen)

Molecular Modelling der Diffusion von (R)-(+)-Limonen und (S)-(+)-Carvon

(R)-(+)-Limonen wird an ZSM-5 1000 deutlich schneller adsorbiert als (S)-(+)-Carvon. Die Diffusion von (R)-(+)-Limonen und (S)-(+)-Carvon in einem geraden Silicalite-Kanal wurde mittels Molecular Modelling nachvollzogen. Die Darstellung des Diffusionsweges im Zeolithkanal zwischen zwei Minima (Abb. 2-48) zeigt, daß die Diffusion von (R)-(+)-Limonen relativ geradlinig durch den Kanal verläuft, während (S)-(+)-Carvon größere Ausweichbewegungen zum nächsten lokalen Energieminimum ausführen muß. Die seitlich aus dem Molekül herausragende polare Carbonylgruppe von (S)-(+)-Carvon wird also merkbar von der hydrophoben -Si-O-Si-O- Kanalwand im Silicalite-Kanal abgestoßen. Außerdem könnten Deformationen von Molekül und Kanal die Diffusion behindern.

Die berechnete maximale Energiebarriere zwischen zwei Minima (Kanalkreuzungen) beträgt für (R)-(+)-Limonen 67 kJ mol⁻¹ und ist für (S)-(+)-Carvon mit 154 kJ mol⁻¹ mehr als doppelt so hoch.

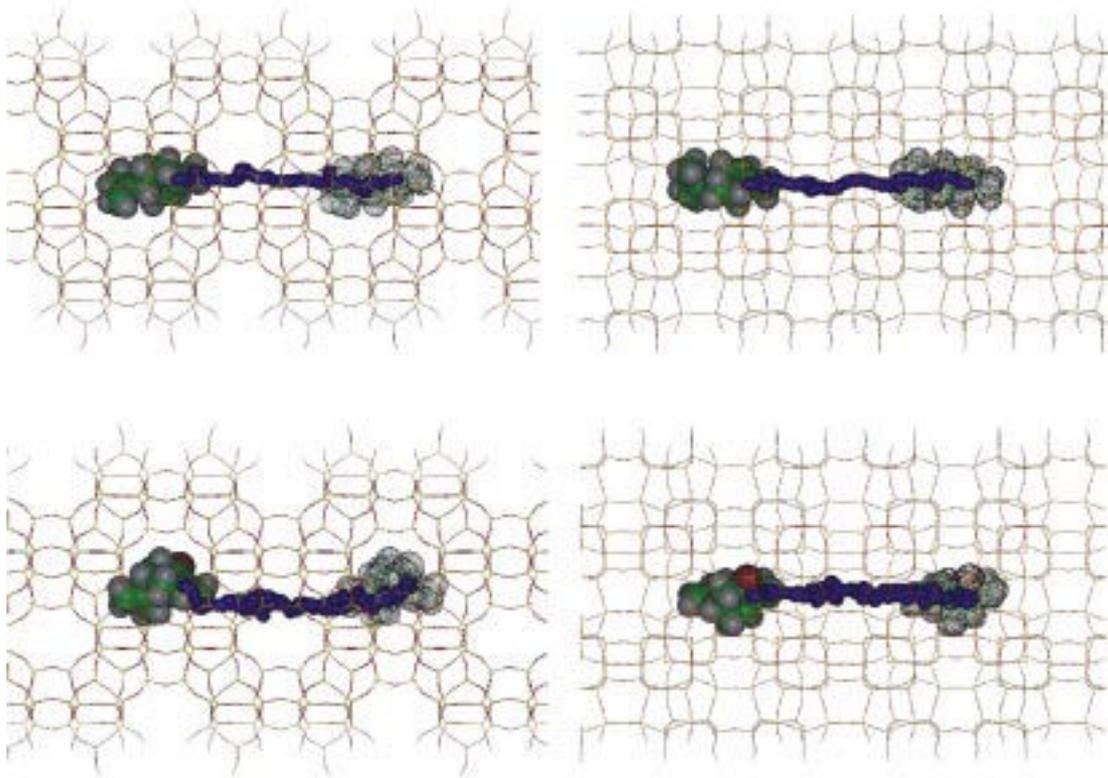


Abb. 2-48 Diffusionsweg von *(R)*-(+)-Limonen (oben) und *(S)*-(+)-Carvon (unten) zwischen zwei Energieminima in einem geraden Silicalite-Kanal

Die Ursache für die geringe Maximalbeladung *(S)*-(+)-Carvon an ZSM-5 1000 ist damit wahrscheinlich auch in der erschwerten Diffusion zu suchen. Möglicherweise genügt ab einer Beladung von 0,6 Molekülen EZ¹ die gewonnene Wechselwirkungsenergie nicht mehr, um die Diffusionsbarriere weiterhin zu überwinden. Damit würde die Adsorption weiterer Moleküle blockiert.

Sobald *(R)*-(+)-Limonen und *(S)*-(+)-Carvon gleichzeitig als Adsorptive für ZSM-5 1000 zur Verfügung standen, zeigte sich eine beschleunigte Adsorption von *(S)*-(+)-Carvon (Abb. 2-49 und Tabelle 2-30).

Die Berechnung der Diffusionskoeffizienten von *(S)*-(+)-Carvon aus der Gemischtadsorption mit *(R)*-(+)-Limonen ergab schon bei geringen Beladungen deutlich höhere Werte, die sonst nur bei höheren Beladungen (s. o.) erreicht wurden. Der Energiegewinn aus der *(R)*-(+)-Limonen-Adsorption könnte hier für eine erleichterte Diffusion des *(S)*-(+)-Carvons gesorgt haben.

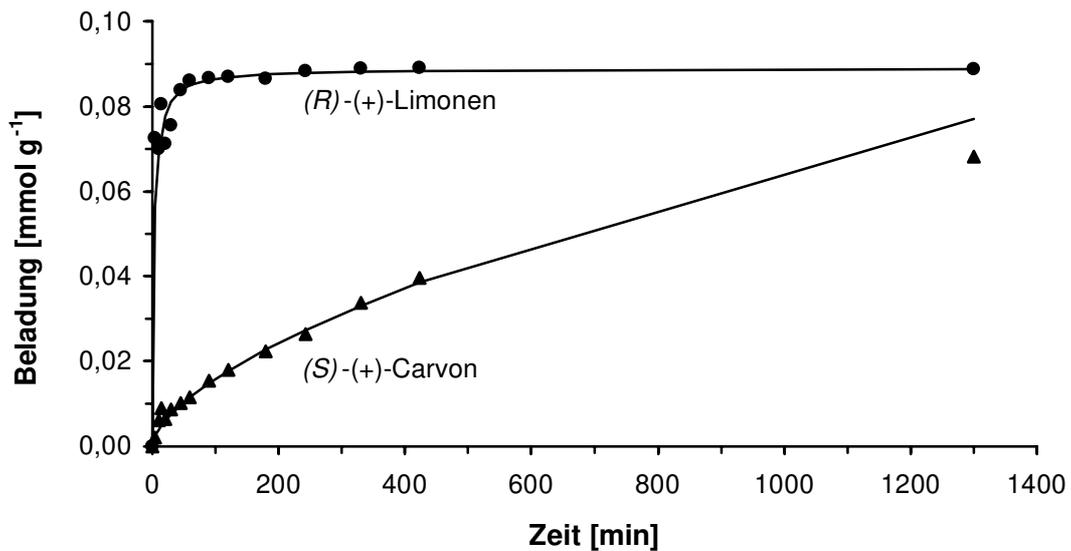


Abb. 2-49 Adsorptionskinetik von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon an ZSM-5 1000 bei 21 °C (Gemischtadsorption)

2.2.3.2.3 Abhängigkeit vom Modul des Zeolithen

Für alle Adsorptive waren die berechneten Diffusionskoeffizienten in ZSM-5 1000 mindestens um das zehnfache höher als in ZSM-5 150 (s. Tabelle 2-30).

Mit fallendem Modul und steigender Polarität des Adsorbens befinden sich mehr negativ geladene Aluminium-Atome im Zeolithgitter, die ein elektrostatisches Feld induzieren. Daraus resultieren zusätzliche Wechselwirkungen auf polarisierbare Bindungen und π -Elektronen im Adsorptiv. Die Folge ist eine langsamere Diffusion im Zeolithkanal [51].

Zudem besteht die Möglichkeit, daß aufgrund der negativen Gitterladung Kationen (K^+ aus dem Puffer) und Wassermoleküle adsorbiert werden, die die Mobilität unpolarer Adsorptive einschränken oder Kanäle für die Diffusion blockieren.

Besonders deutlich wirkte sich der Wechsel von ZSM-5 1000 zu ZSM-5 150 auf die Diffusion von 2-MBM aus. Während der strukturisomere Ester 3-MBM in ZSM-5 150 etwa zehnmals langsamer diffundiert, war der mittlere Diffusionskoeffizient von 2-MBM in ZSM-5 150 um den Faktor 70 reduziert.

Für (*S*)-(+)-Carvon zeigte der Wechsel zum polareren Adsorbens einen weiteren Effekt. Der mittlere Diffusionskoeffizient reduzierte sich zwar um den Faktor 2,

jedoch ergab sich mit 1,7 Molekülen EZ^{-1} in ZSM-5 150 eine deutlich höhere Maximalbeladung als in ZSM-5 1000. Aufgrund der höheren Polarität des Adsorbens werden sich hier wahrscheinlich höhere Wechselwirkungsenergien frei, die eine kontinuierliche Überwindung der Diffusionsbarriere erlauben.

2.2.3.3 Teilzusammenfassung

Zur Untersuchung der thermodynamischen und kinetischen Adsorptionseigenschaften von Aromastoffen aus wäßriger Lösung wurden an Zeolithe der ZSM-5 Reihe Einzeladsorptionsexperimente mit verschiedenen Monoterpenen und zwei konstitutionsisomeren Fruchtestern durchgeführt.

Zeolithe zeigten insgesamt im Vergleich zu PS-DVB-Harzen eine außergewöhnlich hohe Affinität zu den untersuchten Aromastoffen, die mit fallendem Modul, also mit steigender Hydrophilie des Adsorbens, stetig abnahm. Die Maximalbeladung an ZSM-5 war bei keinem der untersuchten Systeme größer als vier Moleküle pro Einheitszelle, entsprechend etwa 100 mg g^{-1} für oxyfunktionalisierte Monoterpene, z. B. Linalool. Die Kapazität nahm für dreifach verzweigte acyclische Adsorptive (z. B. Novalol) und für ortho- oder meta-substituierte cyclische Verbindungen (z. B. Carvon) weiter ab. Bicyclische Terpenoide wie Borneol aber auch das monocyclische (-)-Menthol wurden nicht adsorbiert.

Die wichtigsten Einflußfaktoren für die Adsorptionskinetik waren neben der Molekülgestalt des Adsorptivs das Modul und die Beladung des Zeoliths. Generell fiel die Diffusionsgeschwindigkeit mit steigendem Modul. 2- und 3-Methylbutansäuremethylester unterschieden sich deutlich in ihrer Diffusionsgeschwindigkeit in ZSM-5 150. Bei (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon wurden die größten kinetischen Unterschiede für die Adsorption an ZSM-5 1000 ermittelt. Der Effekt der Molekülgestalt war vergleichbar mit den für die Kapazität getroffenen Aussagen. Eine Vorbeladung des Zeolithen konnte positive und negative Effekte auf die Adsorptionskinetik zeigen. Insgesamt verlief die Adsorption der Monoterpene bei Raumtemperatur vergleichsweise langsam, so daß bis zur Gleichgewichtseinstellung mehrere Tage vergehen konnten.

Durch Molecular Modelling Berechnungen konnten die thermodynamischen und kinetischen Aspekte der Adsorption von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon an Silicalite (vergleichbar mit ZSM-5 1000) zum Teil nachvollzogen werden.

2.2.4 Fraktionierung von etherischen Ölen

Die Gewinnung von Einzelkomponenten oder Aromakonzentraten aus komplexen Naturstoffisolaten wird von der Aromaindustrie im großtechnischen Maßstab durchgeführt [5]. Sie stellt ein potentielles Einsatzgebiet für die selektiven Adsorptionseigenschaften von Zeolithen dar. Die Eignung von Zeolith ZSM-5 für eine Fraktionierung der Komponenten wurde anhand eines kohlenwasserstoffreichen (Orangenöl) und eines kohlenwasserstoffarmen (Spike-Lavendelöl) etherischen Öls geprüft.

2.2.4.1 Spike-Lavendelöl

Zusammensetzung

Die Hauptkomponenten des untersuchten Spike-Lavendelöls waren 1,8-Cineol, (+)-Campher und (-)-Linalool. Sie bildeten zusammen 81,3 % des etherischen Öls. Die Identifizierung erfolgte anhand der Massenspektren und der Kovats-Indices [35, 36]. Eine Zuordnung der Stereokonfigurationen wurde aufgrund von bekannten Literaturdaten [8] getroffen (s. Abb. 2-51 und Abschnitt 4.2.1.5.1).

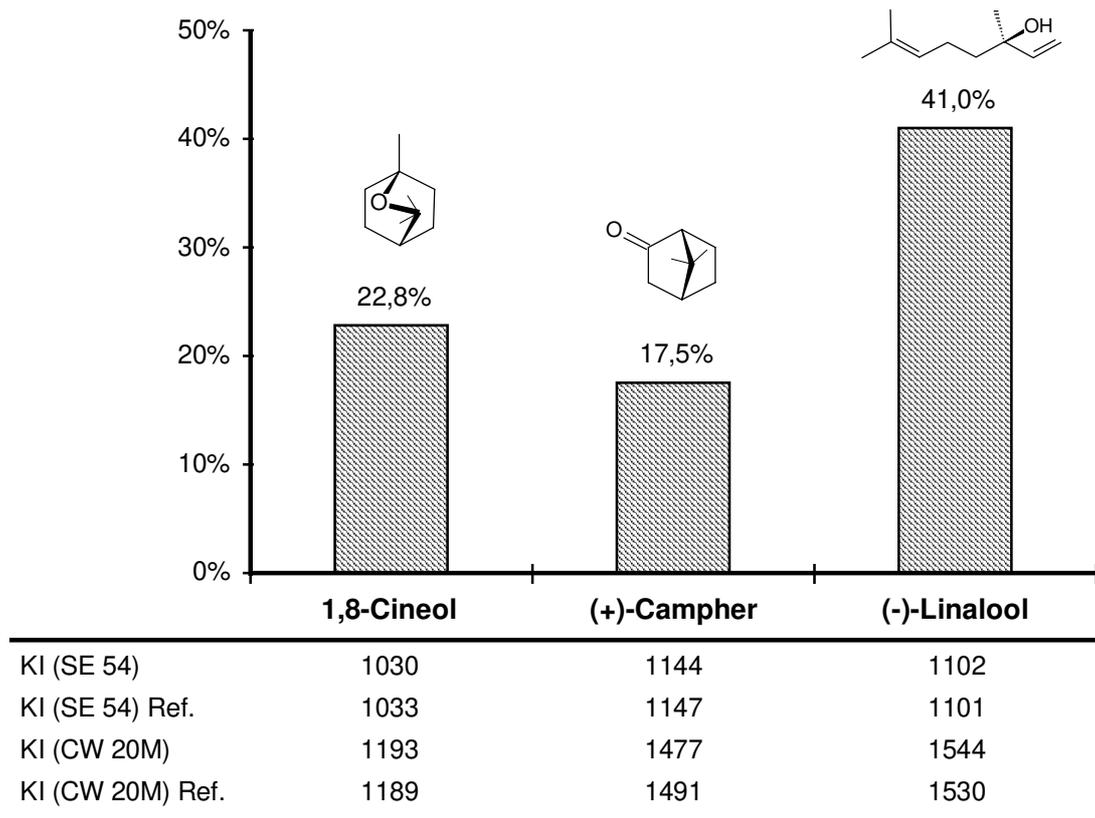


Abb. 2-51 Hauptbestandteile und Identifizierung (KI) von Spik-Lavendelöl

Fraktionierung

Zur Fraktionierung von Spik-Lavendelöl wurden die Zeolithe ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 eingesetzt. Als Vergleich wurde zusätzlich eine Probe mit DAY 200 Si-Formkörpern untersucht. Aus einer wässrigen Lösung mit $0,1 \text{ g L}^{-1}$ etherischem Öl konnte nach Zugabe von $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ZSM-5 1000 nach 2 h Adsorptionszeit (-)-Linalool vollständig adsorbiert werden. Die bicyclischen Terpenoide 1,8-Cineol und (+)-Campher verblieben weitgehend in der Lösung. Bei ZSM-5 150 ergab sich der gleiche Trenneffekt, jedoch wurde (-)-Linalool nicht vollständig aus der Lösung entfernt. Mit DAY 200 wurden erwartungsgemäß alle Hauptprodukte fast vollständig adsorbiert (Tabelle 2-31).

Die Desorption erfolgte mit Methanol. Die Eluate aus der ZSM-5 Adsorption enthielten nur (-)-Linalool neben geringen Anteilen weiterer Nebenkomponten. Die Wiederfindungen lagen dabei bei 92 % für ZSM-5 1000 und 82 % für ZSM-5 150 bezogen auf die eingesetzte Menge im etherischen Öl. Die von ZSM-5 adsorbierten Anteile von 1,8-Cineol und (+)-Campher wurden nicht mit eluiert. Bei

DAY 200 konnte eine praktisch vollständige Elution der drei Hauptkomponenten erreicht werden.

Tabelle 2-31 Trennung der Hauptkomponenten von Spike-Lavendelöl an Zeolithen (Prozentangaben beziehen sich auf die Menge im eingesetzten ätherischen Öl)

Substanz	Adsorption [%] / Desorption [%]					
	ZSM-5 1000		ZSM-5 150		DAY 200 FK	
1,8-Cineol	7,3	0	6,2	0	97,8	101,6
(+)-Campher	11,9	0	10,1	0	97,6	99,8
(-)-Linalool	100,0	91,9	95,0	82,1	100,0	97,8

2.2.4.2 Orangenöl

Das verbreitetste Verfahren zur Gewinnung von Orangenöl aus Orangenschalen ist die Wasserdampfdestillation [5]. Eine selektive Trennung mit ZSM-5 1000 sollte nun direkt an den Gewinnungsprozeß gekoppelt werden. Dazu wurde ZSM-5 1000 als Suspension in einem neutralen Puffer vorgelegt, so daß die Adsorption simultan mit dem Destillationsprozeß verlief (s. Abschnitt 4.2.1.5.2).

Die Untersuchung der wäßrigen Destillate mit und ohne simultane Zeolithadsorption ergab, daß ZSM-5 innerhalb von einer Stunde selektiv einen Großteil der aromarelevanten Komponenten des Orangenöls aus dem Wasserdampfdestillat entfernte (Abb. 2-52). Hierzu zählen insbesondere die linearen Aldehyde (1-Octanal und 1-Decanal) sowie acyclische Terpenoide (Linalool, α - und β -Sinensal). Eine Desorption wurde jedoch nicht durchgeführt.

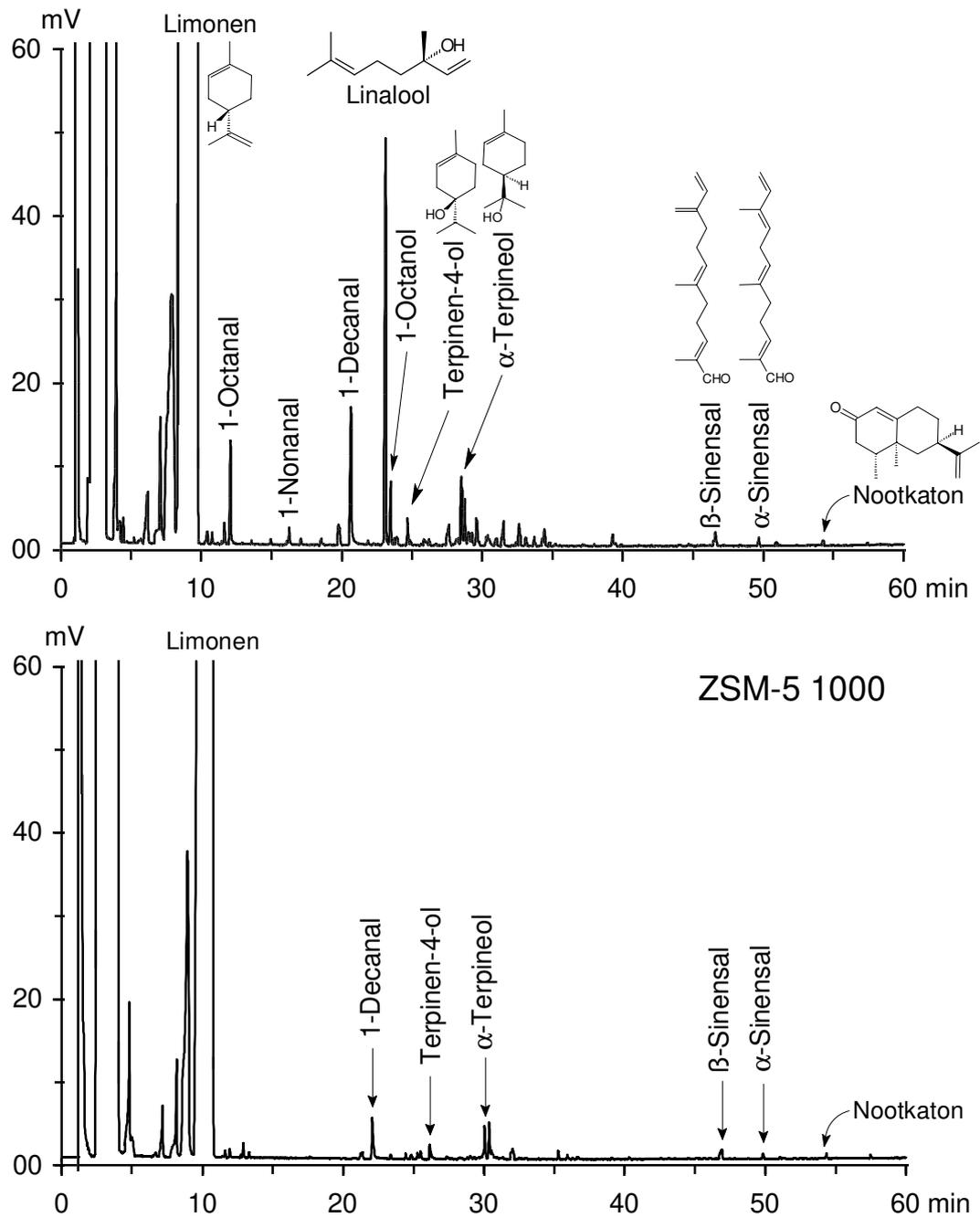


Abb. 2-52 Gaschromatogramme aus der Fraktionierung von Orangenöl mit ZSM-5 1000. Oben: Wasserdampfdestillat, unten: Wasserdampfdestillat nach Adsorption an ZSM-5 1000

3 Diskussion

3.1 Bedeutung und Vorkommen acyclischer Monoterpene

3.1.1 Bedeutung von Monoterpenen

Monoterpene werden weitverbreitet in der Natur produziert. Sie entstehen aus dem Sekundärstoffwechsel vieler Pflanzen und einiger Insekten. Jährlich werden schätzungsweise $4,4 \times 10^8$ t monoterpene Verbindungen in die Atmosphäre emittiert [8].

Die etherischen Öle von Pflanzen bestehen vielfach hauptsächlich aus Monoterpenen. Sie dienen ihnen einerseits als Lockmittel für Insekten, die dann die Befruchtung und räumliche Verbreitung der Art sicherstellen. Andererseits sind beispielsweise Pyrethroide als wirksame Insektizide bekannt und bieten somit der Pflanze Schutz vor Insektenfraß [52].

Auch die Insekten selbst nutzen die physiologischen Eigenschaften der Monoterpene in ähnlicher Weise. Terpenoide Verbindungen werden zur Abwehr anderer Insektenarten sezerniert oder sind als Sexualpheromone notwendig für die Fortpflanzung. Die räumliche Orientierung bei Bienen und Ameisen wird durch monoterpene Spurpheromone ermöglicht [52].

Die bemerkenswerten sensorischen Eigenschaften der Monoterpene werden schon seit Jahrtausenden vom Menschen genutzt und haben bis heute nicht an Attraktivität verloren [5]. Ein hoher Bedarf an etherischen Ölen besteht vor allem zum Einsatz in der Parfümerie, aber auch zur Aromatisierung von Bedarfsgegenständen, Kosmetika und Lebensmitteln, und kann nicht allein durch Naturstoffe gedeckt werden. Monoterpene Verbindungen können einfach und billig im industriellen Maßstab synthetisiert werden. Auf chemischem Wege ist zudem eine Erweiterung des Produktspektrums möglich.

Für die Rückführung von Monoterpenen in den Kohlenstoffkreislauf der Natur

sorgen Mikroorganismen. Sie weisen hochspezialisierte Enzymsysteme auf, die den Abbau zu Kohlendioxid und Wasser bewirken.

3.1.2 Biosynthese von Monoterpenen

Die Terpensynthese gehört zu den wichtigsten Biosynthesewegen, über die alle lebenden Organismen verfügen. Formell werden dabei zwei Isopreneinheiten (C_5) durch Kopf-Schwanz-Verknüpfung (Abb. 3-1) miteinander zu einem C_{10} -Körper verbunden.

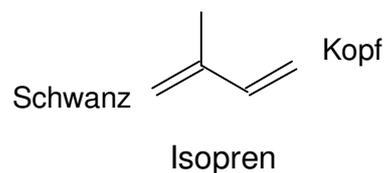


Abb. 3-1 Isopren-Struktur

Alle Kohlenstoffatome der Isopreneinheiten stammen aus Acetat. Zwei Moleküle Acetyl-CoA reagieren zu Acetoacetyl-CoA. Dieses wird mit einem weiteren Acetyl-CoA zu Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) verknüpft. Die Thioesterfunktion von HMG-CoA wird über das Thiohalbacetal und unter Abspaltung von CoA-SH NADPH-abhängig zur (*R*)-Mevalonsäure reduziert. Nach der Aktivierung der terminalen Hydroxylgruppe durch Phosphorylierung decarboxyliert die (*R*)-Mevalonsäure unter Abspaltung eines Wassermoleküls. Es entsteht Isopentenylpyrophosphat, das im enzymatischen Gleichgewicht mit Dimethylallylpyrophosphat steht (Abb. 3-2).

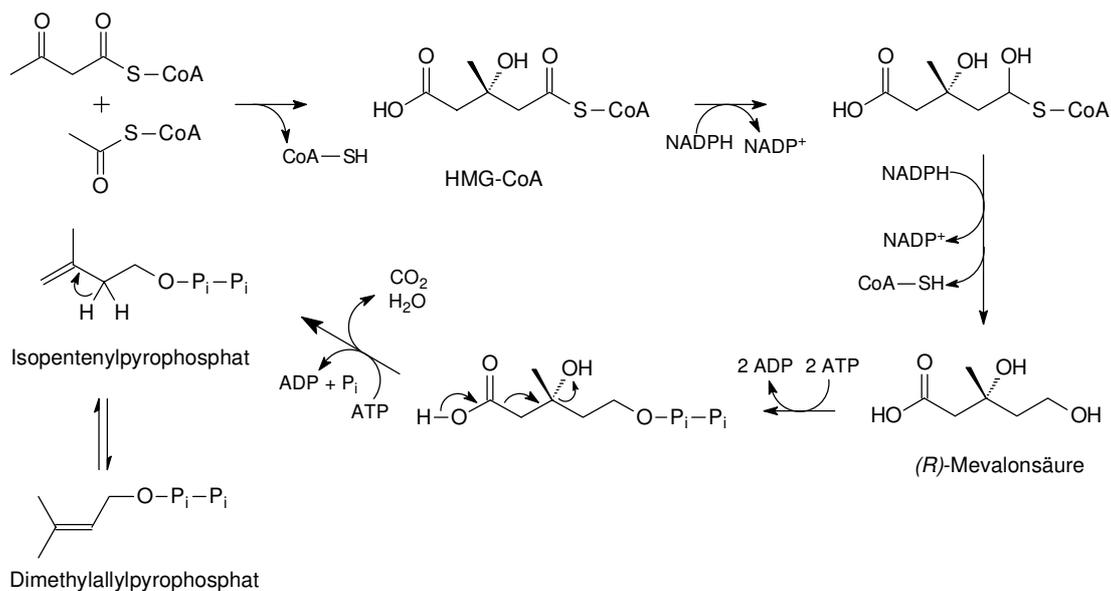


Abb. 3-2 Biosynthese von Isopreneinheiten (nach [53])

Geraniolpyrophosphat entsteht bei der Kopf-Schwanz Kondensation von Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat (Abb. 3-3). Der Mechanismus ist nach der Abspaltung von Phosphat als elektrophile Addition an eine Doppelbindung im Markownikow-Sinn zu verstehen und steht damit im Einklang mit bekannten Mechanismen der organischen Chemie.

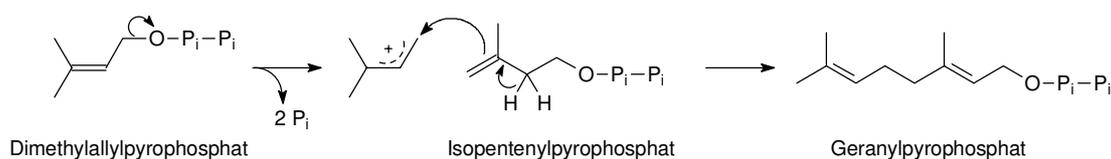


Abb. 3-3 Biosynthese regulärer, linearer Monoterpene durch Kopf-Schwanz-Verknüpfung von Dimethylallylpyrophosphat und Isopentenylpyrophosphat

Geranylpyrophosphat zeigt die für lineare Monoterpene typische 2,6-Dimethyloctan-Struktur und ist die Vorstufe praktisch aller bekannten terpenoiden Verbindungen. Die Hydrolyse führt zu den acyclischen Monoterpenen. Weitere Cyclisierungsreaktionen und Umlagerungen beinhalten kationische Zwischenstufen und führen zu den mono- und bicyclischen Terpenen (Abb. 3-4), die auch durch zusätzliche Oxidations- und Reduktionsreaktionen modifiziert werden können.

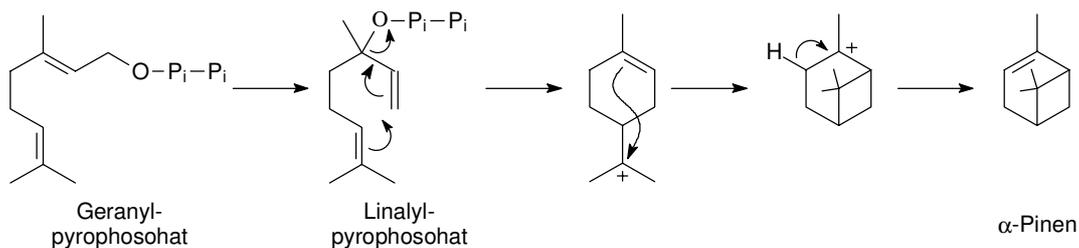


Abb. 3-4 Terpenbiosynthese: Cyclisierung am Beispiel α -Pinen [54]

Monoterpene können um weitere Isopreneinheiten zu Sesquiterpenen (C_{15}) und Diterpenen (C_{20}) verlängert werden. Die Dimerisierung dieser Strukturen ergibt dann Triterpene (C_{30}) und Tetraterpene (C_{40}), die als Vorläufer von Steroiden und Vitaminen von Bedeutung sind. Polyterpene (z. B. Kautschuk) können aus > 500 Isopreneinheiten bestehen.

Die Beteiligung spezifischer Enzymreaktionen bewirkt den für biologische Systeme charakteristisch hohen Grad an Stereo- und Enantioselektivität der Verbindungen.

3.1.3 Vorkommen und Biosynthese von irregulären acyclischen Monoterpenen

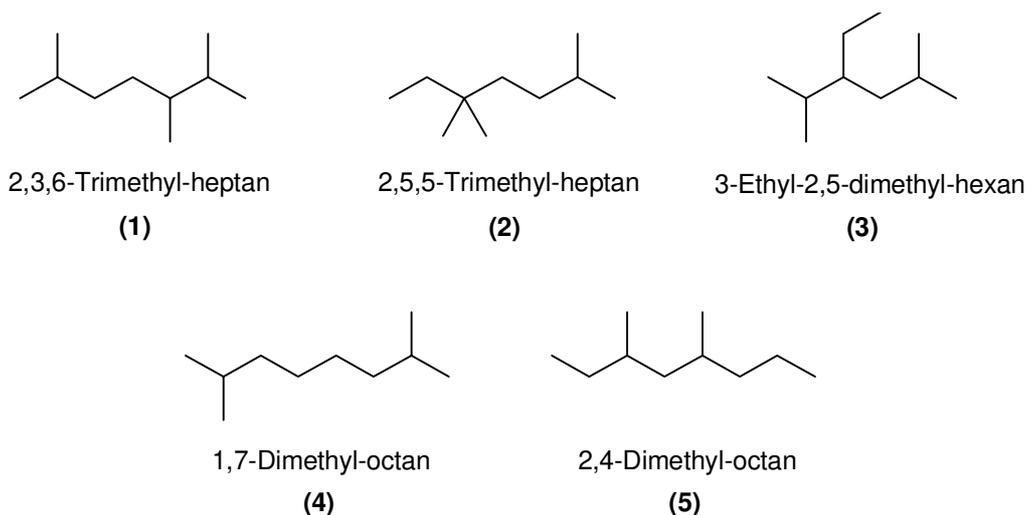


Abb. 3-5 Beispiele für Strukturen irregulärer acyclischer Monoterpene [55]

Die Struktur der meisten Monoterpene läßt sich vom 2,6-Dimethyloctan-Gerüst ableiten. Selten findet man jedoch auch andere Strukturen terpenoider C₁₀-Körper. Diese Verbindungen werden als irreguläre Monoterpene bezeichnet. Ihre Bildung erfolgt entweder im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel auf einem alternativen Verknüpfungsweg der Isopreneinheiten oder durch mikrobiellen Abbau regulärer Monoterpene. Der Biosyntheseweg irregulärer Monoterpene bei Insekten wurde noch nicht untersucht. Die Entstehung der in Abb. 3-5 dargestellten Strukturen soll, soweit bekannt, kurz anhand von Beispielen erläutert werden.

Bei einer formalen Kopf-Kopf-Verknüpfung von Isopreneinheiten entstehen Monoterpene mit 1,7-Dimethyl-octan Struktur (**4**) (s. Abb. 3-5). Ein Beispiel hierfür ist das **Marmelolacton A** ((2*R*,4*S*,*E*)-Tetrahydro-4-methyl-2-(3-methyl-1,3-butadienyl)furan), das zuerst aus Quittenfrüchten (*Cydonia oblonga* Mill.) isoliert [56] wurde und auch in Pfirsichen (*Prunus persica* L.) nachgewiesen werden konnte [57].

Monoterpene mit 2,4-Dimethyl-octan Gerüst (**5**) (s. Abb. 3-5) sind als Pheromone bei Insekten bekannt. So wurde aus dem Mandibeldrüsensekret von Ameisen der Gattung *Manica* (**6*S*-(+)-Manicon** ((*E*)-4,6-Dimethyl-4-octen-3-on) isoliert, das eine wichtige Rolle deren Alarm- und Verteidigungsverhalten spielt [58].

Die bedeutendste Quelle der Monoterpene mit den Kohlenstoff-Gerüsten (**1**) - (**3**) sind etherische Öle von Pflanzen der Familien Compositae, Labiatae und Umbelliferae.

Ihre Biosynthese ist nahe verwandt der Pyrethrinsynthese bei *Chrysanthemum cinerarianefolium*. Da Pyrethrum (Ester der Chrysanthemumsäure und der Pyrethrinsäure) als hochwirksames, natürliches Insektizid Anwendung findet, war die Biogenese bereits Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Obwohl noch nicht alle in diesem Zusammenhang aufgestellten Hypothesen endgültig bewiesen wurden [52], sollen die wesentlichen Schritte im folgenden kurz dargestellt werden. *In vitro* Studien an *Artemisia annua* und *Santolina chamaecyparissus* mit ¹⁴C-markierten Isoprenvorstufen haben gezeigt, daß die Zugabe reduzierender Agenzien eine verminderte Umsetzung der Isoprenvorstufen bewirkt. Damit wurde auf die Beteiligung eines Sulfhydryl-Enzymsystems an der Biosynthese dieser

irregulären Terpene geschlossen. Unter Berücksichtigung des Produktspektrums wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, der zu einer andersartigen Verknüpfung der C₅-Einheiten führt. Dimethylallylpyrophosphat wird an das Enzym gebunden und liegt dort dann als Ylid vor. Damit kann eine nukleophile Addition an die Doppelbindung eines weiteren Moleküls Dimethylallylpyrophosphat in *anti*-Markownikow-Position erfolgen. Die Abspaltung des Enzyms führt zur Entstehung des typischen Cyclopropangerüsts im Chrysanthemol (s. Abb. 3-6).

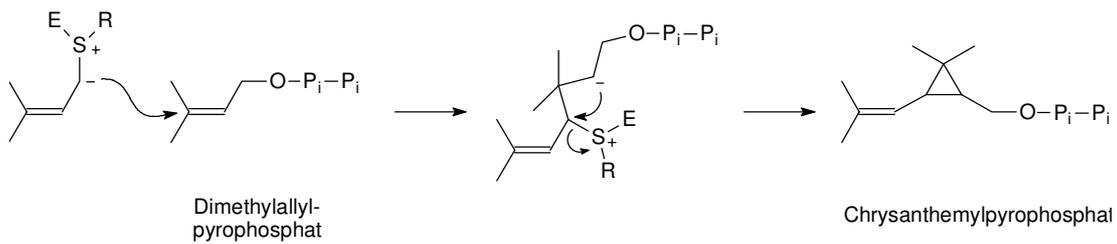


Abb. 3-6 Biosynthese von Chrysanthemylpyrophosphat in Pflanzen als Vorläufer irregulärer linearer Monoterpene (E = Enzym, R = Alkyl) [59]

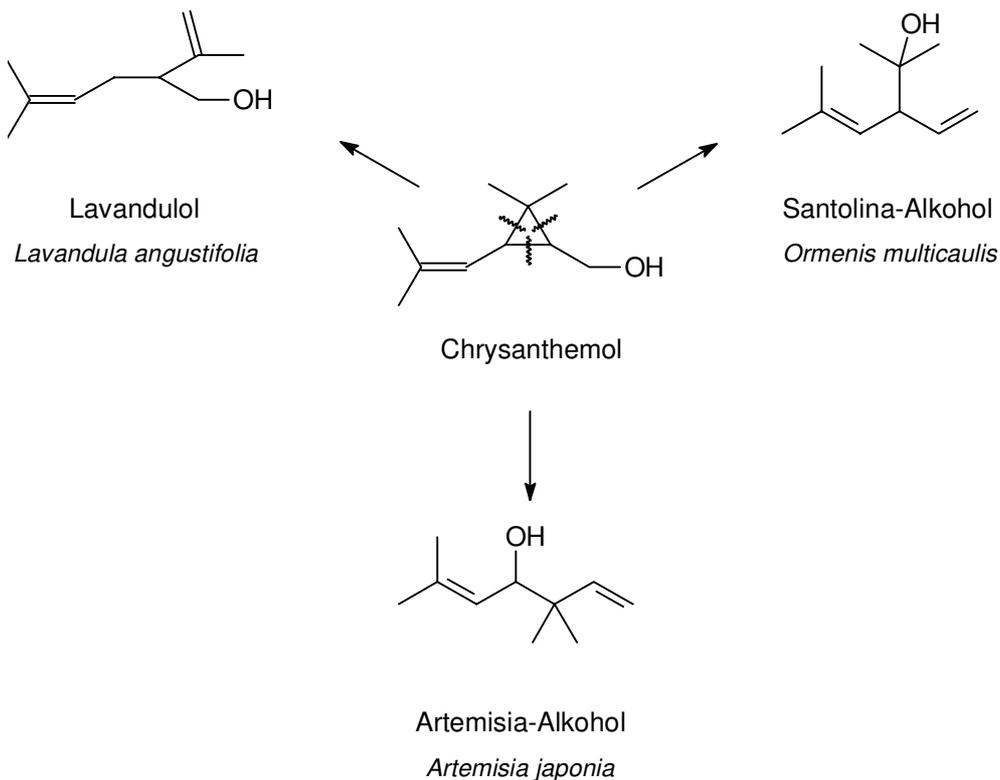


Abb. 3-7 Bildung irregulärer acyclischer Monoterpene durch Spaltung des Cyclopropanrings im Chrysanthemol bei Pflanzen [59]

Die acyclischen Gerüste des Lavandulols, Santolina-Alkohols und Artemisia-

Alkohols ergeben sich in Folge der drei möglichen Spaltungen des Cyclopropanrings im Chrysanthemol (Abb. 3-7).

(R)-(-)-Lavandulol (s. Abb. 3-8) und sein Acetat sind die bekanntesten Vertreter der Terpenoide mit 2,3,6-Trimethylheptan-Struktur. Sie bilden zusammen 4 % der Bestandteile des französischen Lavendelöls (*Lavandula angustifolia* Mill). Lavendelöl findet breite Anwendung in der Parfümerie zur Erzeugung von Chypre- und Fougère-Noten [8].

Lasiol (*erythro*-2,3,6-Trimethyl-6-heptenol, s. Abb. 3-8) ist ein Monoterpenalkohol mit 2,3,6-Trimethyl-heptan-Struktur tierischen Ursprungs. Er wurde aus dem Mandibeldrüsensekret männlicher Ameisen der Gattung *Lasius meridionalis* isoliert und erfüllt wahrscheinlich eine Funktion als Sexualhormon [60].

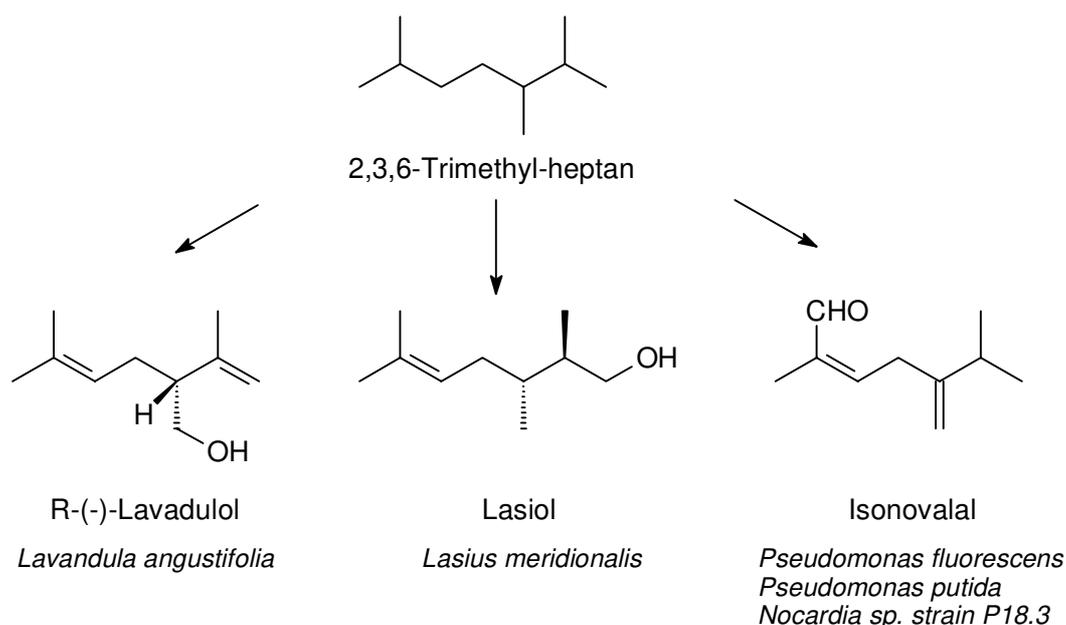


Abb. 3-8 Oxyfunktionalisierte Monoterpene mit 2,3,6-Trimethyl-heptan-Struktur aus natürlicher Quelle

Isonovalal ((*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadienal) konnte als Zwischenprodukt des mikrobiellen α -Pinen-Katabolismus nachgewiesen werden. Bisher wurden vier Organismen isoliert, die über diesen Abbauweg verfügen und zur Energiegewinnung nutzen können (s. Abschnitt 3.2.1). Die sensorischen Eigenschaften von Isonovalal haben zur Patentierung dieser Umsetzung als Verfahren zur Gewinnung

von Aromastoffen geführt [13]. Die Biotransformation von α -Pinen zu Monoterpenoiden mit 2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadien-Struktur soll im weiteren näher erläutert werden.

3.2 Biotransformation von α -Pinen

3.2.1 Strategien des α -Pinen-Stoffwechsels bei Mikroorganismen

α -Pinen ist als Rohstoff in großen Mengen verfügbar. Es wird als Produkt des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels bei Pinus-Arten in die Umwelt emittiert, aber auch für die industrielle Verwertung gewonnen. Die Destillation von Kiefernrohharz liefert jährlich über 200 000 t Terpentinöl. Das sind etwa 80 % der weltweiten Produktion etherischer Öle. Französisches Terpentinöl (*Pinus pinaster* Ait.) enthält bis zu 75 % (-)- α -Pinen. Die Gewinnung von α -Pinen beläuft sich auf etwa 16 000 t jährlich, wovon etwa ein Viertel für die Riechstoffproduktion eingesetzt wird [8].

Das biologische Recycling dieser Form organischen Kohlenstoffs stellt die Natur vor eine Reihe von interessanten Problemen hinsichtlich der Aktivierung und des Bruchs von Kohlenstoffringsystemen, der Beseitigung von Seitenketten und der Bereitstellung von Zwischenprodukten für die zentralen metabolischen Wege der beteiligten Organismen.

Pilze und viele Bakterien können α -Pinen nicht bis zu Kohlendioxid und Wasser oxidieren. Bei ihnen ist der Terpenmetabolismus im Sinne einer Entgiftungsreaktion zu verstehen, die zu einer besseren Wasserlöslichkeit der hydrophoben Moleküle führt und damit ihre Ausscheidung erleichtert. Dieser Co-Metabolismus ist nur in energiereichen Medien möglich [34].

Nach bisherigem Kenntnisstand sind Bakterien nicht in der Lage, Monoterpene *de novo* zu produzieren. Zur Nutzung von Monoterpenen als einziger Kohlenstoffquelle sind Bakterien jedoch befähigt. Ein vollständiger α -Pinen-Katabolismus ist für das Gram-positive Bakterium *Nocardia* sp strain P18.3 [26] sowie für verschiedene

Pseudomonas sp. (*P.* NCIMB 12693 [61, 62], *P. fluorescens* NCIMB 11671 [20], *P. putida* PIN11 [25]) nachgewiesen worden. Voraussetzung dafür ist eine Enzymausstattung, die den Bruch beider Ringe des bicyclischen Pinangerüsts bewirkt und somit acyclische Substrate für eine nachfolgende β -Oxidation bereitstellt.

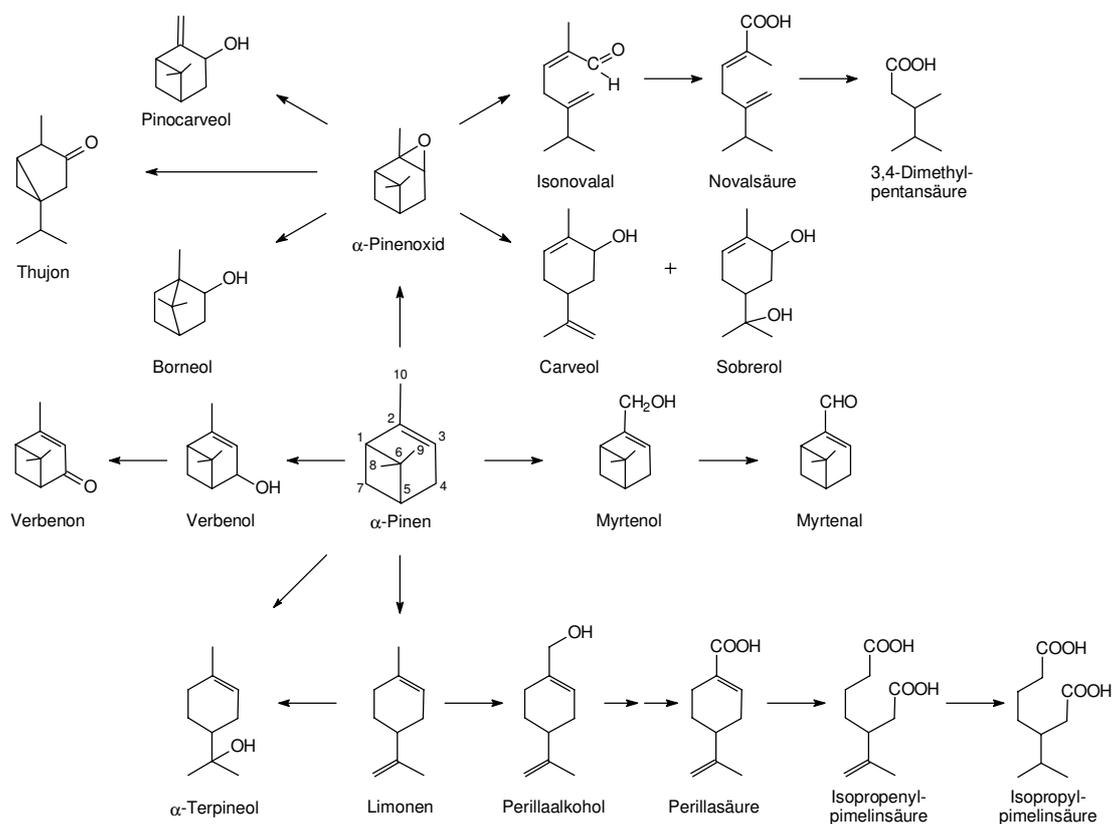


Abb. 3-9 Mikrobielle Transformationsprodukte aus α -Pinen und ihre möglichen Bildungswege

Der entscheidende Schritt im mikrobiellen Abbau von α -Pinen ist die Einführung einer Oxofunktionalität in das Molekül. Bei der Umsetzung von Monoterpenen sind daran meistens Cytochrom-P450-abhängige Monoxygenasen beteiligt. Sie führen ein Atom aus molekularem Sauerstoff in eine σ -Bindung (C-H oder C-C) oder eine π -Bindung (C=C) ein, während das andere Atom unter NAD(P)H-Verbrauch zu Wasser reduziert wird (s. auch Abschnitt 3.2.3.1). Der Angriff erfolgt vorzugsweise an aktivierten, elektronenreichen Zentren [63, 64]. Im Falle von α -Pinen sind das neben der Doppelbindung zwischen C-1 und C-2 die beiden allylischen Positionen am C-4 und C-10 (s. Abb. 3-9).

Die Einführung von Sauerstoff in eine C-H Bindung des allylischen C-4 von α -Pinen

führt zur Entstehung des sekundären Alkohols Verbenol, der weiter zu Verbenon oxidiert wird. Dieser Metabolisierungsweg wurde bei verschiedenen Basidiomyceten [65, 34], bei *Aspergillus niger* NCIM 612 [67] und bei *Serratia marcescens* [66] nachgewiesen.

Eine zweite aktivierte allylische Position im α -Pinenmolekül befindet sich am C-10. Bei der Einführung von Sauerstoff in eine C-H Bindung entsteht der primäre Alkohol Myrtenol, der zum korrespondierenden Aldehyd und der Säure oxidiert werden kann. Auch diese Umsetzung wird hauptsächlich von Basidiomyceten durchgeführt [65, 34], konnte aber auch bei *Pseudomonas* sp. als Alternativweg nachgewiesen werden. Pseudomonaden schalten der allylischen Oxidation von α -Pinen einen Umlagerungsschritt vor, der den Bruch des Cyclobutanrings beinhaltet und zu Limonen führt. Die allylische Oxidation am primären Kohlenstoff ergibt dann Perillaalkohol. Nach der Oxidation zur korrespondierenden Säure kann diese durch β -Oxidation vollständig abgebaut werden [20, 62].

Die Einführung von atomarem Sauerstoff in die π -Bindung ergibt ein Epoxid. α -Pinenoxid ist in wässrigen Lösungen vor allem bei pH < 7 äußerst instabil und lagert sich schnell zu Campholenaldehyd, (*E*)-Sobrerol, (*Z*)- und (*E*)-Carveol um (s. Abschnitt 2.1.4.1). Die enzymatische Bildung von (*E*)-Sobrerol wurde unter Berücksichtigung von Blindwerten für *Aspergillus niger* NCIM 612 [67] und *Serratia marcescens* [66] gezeigt. Carveol und die oxidierte Form Carvon konnten als Transformationsprodukte von Pseudomonaden identifiziert werden [68, 69].

Der Bruch beider Ringe im Pinengerüst des α -Pinenoxids wird bei verschiedenen Pseudomonaden und *Nocardia* sp. durch eine Lyase katalysiert [11, 25, 26, 68]. Die acyclischen Produkte stehen nach der Oxidation zur Novalsäure für die β -Oxidation zur Verfügung.

Bicyclische Umlagerungsprodukte von α -Pinenoxid bei *Pseudomonas* sp. sind Thujon (s. Abschnitt 3.2.2.6.1) und Borneol [62]. Die für Basidiomyceten berichtete Transformation von α -Pinen zu (*E*)-Pinocarveol [65] führt möglicherweise auch über die Zwischenstufe α -Pinenoxid.

Tabelle 3-1 Transformationsprodukte von α -Pinen aus Mikroorganismen

Produkte	Mikroorganismus	Ref.
Myrtenol (\rightarrow Myrtensäure)	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 11671	[20]
	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 12693	[62]
	Basidiomyceten	[65]
Verbenol, Verbenon	<i>Serratia marcescens</i>	[66]
	<i>Aspergillus niger</i> NCIM 612	[67]
	Basidiomyceten	[65]
Limonen (\rightarrow Isopropylpimelinsäure)	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 12693	[62]
	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 11671	[20]
α -Terpineol	<i>Serratia marcescens</i>	[66]
	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 12693	[63]
Carveol, Carvon	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 10684	[68]
	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 11671	[69]
(E)-Sobrerol	<i>Serratia marcescens</i>	[66]
	<i>Aspergillus niger</i> NCIM 612	[67]
(E)-Pinocarveol	Basidiomyceten	[65]
Borneol	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 12693	[62]
Thujon	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 10684	[70]
	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 11671	*
Novalsäure (\rightarrow 3,4-Dimethylpentansäure)	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 10684	[68]
	<i>Pseudomonas</i> NCIMB 11671	[9]
	<i>Pseudomonas putida</i> PIN11	[25]
	<i>Nocardia</i> sp strain P18.3	[26]

* Abschnitt 3.2.4.6.1

Die Einführung von Sauerstoff in eine C-C Bindung im Sinne einer Baeyer-Villiger-Oxidation ist als Transformationsschritt im Abbau von 1,8-Cineol bei *P. flava* bekannt [71]. Im Zusammenhang mit den ersten Untersuchungen des mikrobiellen α -Pinen-Katabolismus an *P.* NCIMB 10684 wurde zunächst ein analoger Mechanismus postuliert (Abb. 3-10). Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, daß auch bei diesem Organismus eine α -Pinenoxid-Lyase die zweifache Ringspaltung katalysiert [26].

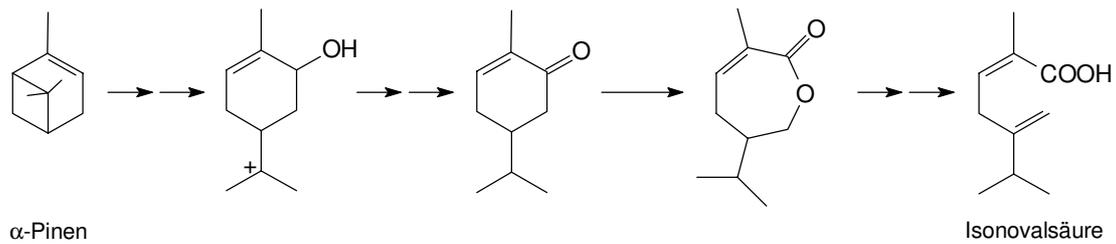


Abb. 3-10 Ursprünglich postulierter Mechanismus zur Bildung von Isonovalsäure aus α -Pinen bei *P. NCIMB 10684* unter Baeyer-Villiger-Oxidation [32]

Die in Abb. 3-9 dargestellten mikrobiellen Transformationswege für α -Pinen führen nur in zwei Fällen zu acyclischen Produkten, die als Substrate für die β -Oxidation zur Verfügung stehen und damit zur Gewinnung von Energie und von Substraten für weitere Biosynthesewege durch den Organismus genutzt werden können. Die Mehrzahl der dazu befähigten Mikroorganismen gehören zur Familie der Pseudomonadaceae.

3.2.2 Einordnung und Bedeutung von Pseudomonaden

Die Familie der Pseudomonadaceae umfaßt Gram-negative, polar begeißelte Stäbchenbakterien, die keine Sporen bilden und aerob wachsen. Die Energiegewinnung erfolgt durch aerobe und zum Teil auch durch anaerobe Atmung. Dabei werden Sauerstoff oder Nitrat als Elektronen-Akzeptor genutzt. Zur Gärung sind sie nicht befähigt.

Pseudomonaden findet man im Boden und auf Pflanzen sowie in Gewässern, Abwässern und in der Luft. Ihre weite Verbreitung ist in ihrem geringen Anspruch an Nahrungsquellen begründet. Insbesondere *P. fluorescens* und *P. putida* können die verschiedensten Kohlenstoffquellen verwerten (Tabelle 3-2).

Aufgrund ihrer charakteristischen Fähigkeit zur Verstoffwechselung dieser Vielfalt von Substraten sind Pseudomonaden von großer Bedeutung für den Kohlenstoffkreislauf der Natur [72, 73].

Diese Vielseitigkeit beschränkt sich jedoch nicht allein auf natürliche Substrate. Häufig wurden Pseudomonaden isoliert, wenn die biologische Mineralisierung von Xenobiotika Gegenstand der Forschung war. Als Kohlenstoffquellen wurden unter

anderem Atrazin, Nitroaromaten, chlorierte und bromierte Aromaten umgesetzt, die als Pestizide und Herbizide angewendet werden [74, 75]. Auch Styren und Azofarbstoffe, deren Emission während der industriellen Fertigung nie vollständig verhindert werden kann, können durch Pseudomonaden abgebaut werden [76, 77]. Der biologische Umweltschutz gewinnt gerade im Hinblick auf eine stetig steigende Bevölkerungszahl mit entsprechend wachsendem Bedarf an Nahrungsmitteln aktuell an Bedeutung.

Tabelle 3-2 Beispiele für nutzbare Kohlenstoffquellen bei *Pseudomonas sp.*

Kohlenstoffquelle	Referenzen
Alkane	[23,71]
Aromatische Kohlenwasserstoffe (z. B. Naphthalin, Toluol)	[78 - 80]
Lignin und aromatische Säuren (z. B. Mandelsäure, Ferulasäure)	[72, 81 - 83]
Kohlenhydrate (z. B. Glucose, Saccharose, Stärke)	[71, 72, 81]
Mono- und Dicarbonsäuren	[72]
Proteine und Aminosäuren	[72, 81]
Terpene (z. B. α -Pinen, Geraniol, Citronellal)	[62, 68, 71, 84 - 86]
Triglyceride und Fettsäuren	[81]

Auch im Bereich der biotechnologischen Gewinnung von Aromastoffen wurden Prozesse unter Beteiligung von Pseudomonaden entwickelt [87]. Pseudomonaden sind einerseits zur *de novo* Synthese mancher Aromastoffe in der Lage. Butansäure-ethylester oder 3-Methylbutansäure-ethylester, die als Fruchtaromen von Bedeutung sind, werden von *P. fragi* synthetisiert. *P. perolens* und *P. taetrolens* produzieren 2-Methoxy-3-isopropyl-pyrazin, das kartoffelartig riecht.

Viel weitreichender sind jedoch die Transformationsprozesse, vor allem im Bereich der Terpene. Neben der bereits beschriebenen oxidativen Decyclisierung oder Umlagerung von α -Pinen sind hier beispielsweise die Reduktion von (-)-Menthon zu (-)-Menthol mit *P. putida* YK-2 und die Oxidation von Limonen zu (+)- α -Terpineol und (+)-Perillasäure mit *P. gladioli*, aber auch Cyclisierungen acyclischer Monoterpene mit *P. incognita* zu nennen [87].

3.2.3 (-)- α -Pinen-Katabolismus bei *P. fluorescens* NCIMB 11671

P. fluorescens NCIMB 11671 wurde Anfang der achtziger Jahre aus einer Bodenprobe durch Selektion mit (-)- α -Pinen isoliert und für die Einordnung in die National Collection of Marine and Industrial Bacteria (NCIMB) charakterisiert. Neben (-)- α -Pinen kann *P. fluorescens* unter anderem Glucose, Fructose, Rhamnose, Saccharose, Cellulose, Lactat, Acetat, Propanoat, Butanoat, Ethanol, β -Alanin, (+)- α -Pinen und (-)- β -Pinen als Kohlenstoffquellen verwerten. Antibiotika-Resistenzen bestehen gegen Streptomycin, Chloramphenicol und Tetracyclin [11, 69].

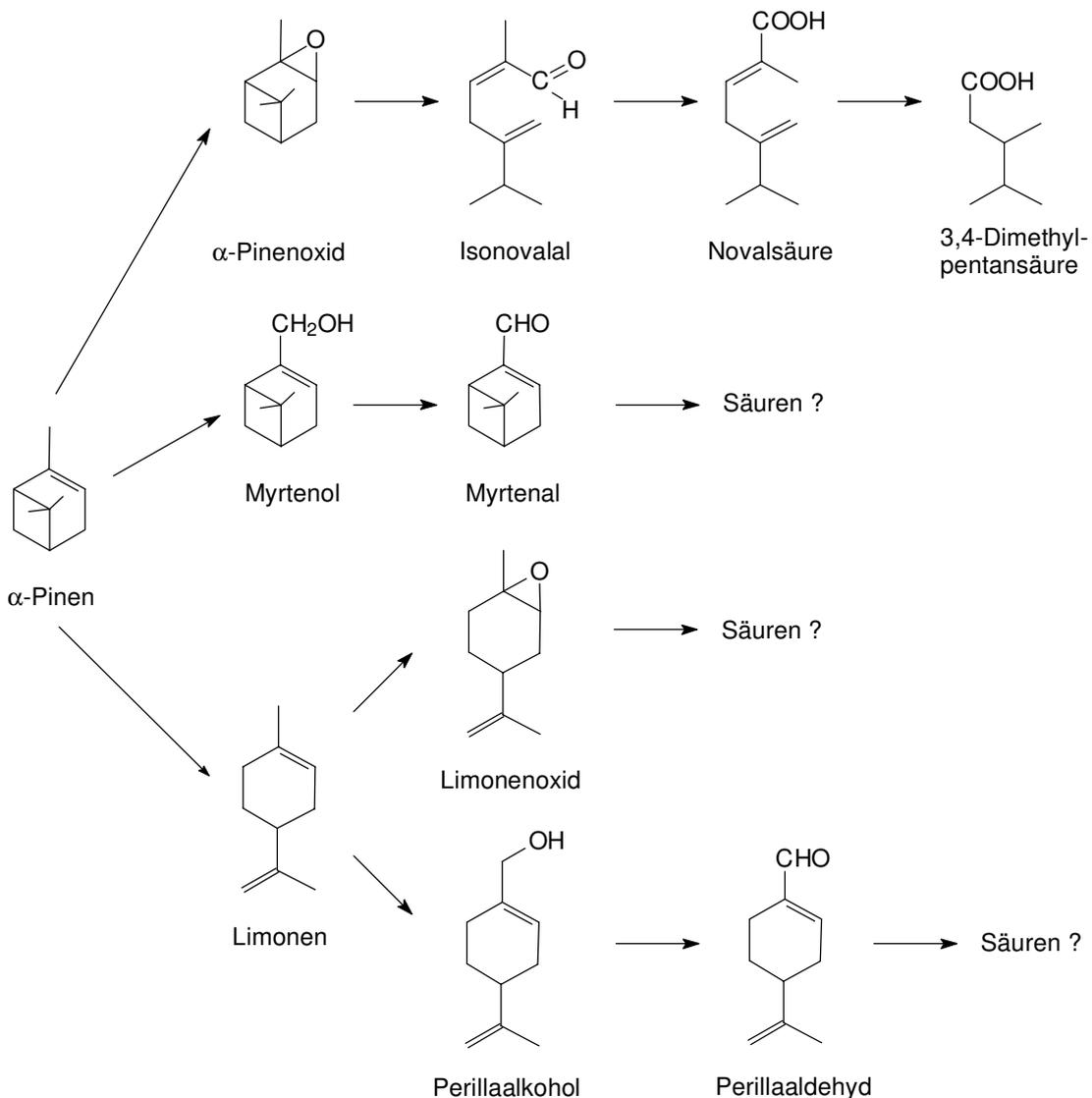


Abb. 3-11 (-)- α -Pinen-Metabolismus bei *P. fluorescens* NCIMB 11671 (nach [20])

Der (-)- α -Pinen-Katabolismus bei *P. fluorescens* NCIMB 1167 erfolgt hauptsächlich über eine Monooxygenase-abhängige Epoxidierung der Doppelbindung zu (-)- α -Pinenoxid und nachfolgender Spaltung beider Ringe des bicyclischen Systems. Die hierfür notwendigen Enzyme sind nicht Teil der regulären Enzymausstattung dieses Stammes. Ihre Bildung wird erst durch Anzucht der Biomasse in Gegenwart von (-)- α -Pinen induziert [11].

Dieser Organismus kann aber auch auf alternative Metabolisierungswege für (-)- α -Pinen zurückgreifen. Durch Behandlung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin konnten Mutanten erzeugt werden, die zwar (-)- α -Pinen aber nicht (-)- α -Pinenoxid verwerteten. Die Mutation erfolgte also in den für die Monooxygenase codierenden Genen. Die neutralen Produkte aus diesen Umsetzungen wurden identifiziert und sind in Abb. 3-11 dargestellt. Saure Metabolite wurden in dieser Arbeit nicht erfaßt [20].

P. fluorescens NCIMB 11671 verfügt über eine zweite Monooxygenase-Aktivität, die eine allylische Oxidation am C-10 des α -Pinenmoleküls bewirkt. Der Angriff erfolgt entweder vor oder nach einer Umlagerung zum Limonen und führt, wie bereits in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, zu den Produkten Myrtenol oder Perillaalkohol und den entsprechenden oxidierten Verbindungen.

3.2.4 Schritte im (-)- α -Pinen-Katabolismus bei *P. fluorescens* NCIMB 11671

3.2.4.1 Monooxygenase-vermittelte Oxidation von (-)- α -Pinen

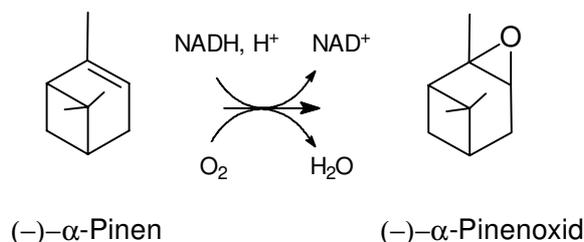


Abb. 3-12 Oxidation von (-)- α -Pinen zu (-)- α -Pinenoxid durch eine NADH-abhängige Monooxygenase

Der erste Schritt des regulären Abbaus von (-)- α -Pinen bei *P. fluorescens* NCIMB 11671 ist die durch eine Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase vermittelte Epoxidierung der Doppelbindung. Das Produkt ist (-)- α -Pinenoxid (Abb. 3-12).

Im Rahmen des EU-Projektes EC BIO4-CT95-0049 sollte das für diese Monooxygenase codierende Gen isoliert und in einem anderen Organismus exprimiert werden. Das Ziel war die biotechnologische Produktion von α -Pinenoxid mit einer Option zur gezielten Kopplung dieser Umsetzung mit weiteren enzymatischen Prozessen, die eine selektive Produktion von Aromastoffen ermöglichen sollten. Die Versuche zur Expression der entsprechenden Gene aus *P. fluorescens* waren bisher noch nicht erfolgreich [88].

Die Oxidation mit Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen ist an eine Flavin-haltige NAD(P)H-Cytochrom-P450 Reduktase gebunden, die das Fe^{3+} im aktiven Zentrum der Monooxygenase reduziert und damit die Bindung von molekularem Sauerstoff erst ermöglicht [63]. Dieser Enzymkomplex ist labil. Die Isolierung eines funktionsfähigen Enzymsystems ist deshalb oft nicht möglich [26].

Die Monooxygenase-Aktivität bei *P. fluorescens* blieb bei der Herstellung zellfreier Extrakte erhalten und wurde deshalb näher charakterisiert [11]. Das Temperatur-Optimum lag bei 35 °C. Ein pH-Optimum wurde bei pH 7,8 ermittelt. Als Co-Faktor wurde nur NADH akzeptiert, nicht jedoch NADPH. Das Substratspektrum umfaßte auch β -Pinen und R-(+)-Limonen, jedoch waren die Umsatzraten geringer als für (-)- α -Pinen. p-Menthan und p-Cymen wurden nicht oxidiert [11].

3.2.4.2 Ringbruch des Pinangerüsts durch α -Pinenoxid Lyase

Das Schlüsselenzym des (-)- α -Pinen-Katabolismus bei *P. fluorescens* ist die α -Pinenoxid Lyase. Sie katalysiert die Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid zu Isonovalal (s. Abschnitt 2.1.4.2). Bemerkenswert dabei ist, daß beide Ringe des Pinangerüsts durch eine enzymatische Aktivität geöffnet werden, die weder Energie noch Co-Faktoren benötigt [11]. Damit wird eine effektive Bereitstellung von acyclischen Verbindungen für den weiteren oxidativen Abbau ermöglicht.

Aus dem Gram-positiven Bakterium *Nocardia sp.* strain P18.3 wurde eine Lyase isoliert, die die gleiche Umsetzung katalysiert [89]. Da keine stabilen Intermediate identifiziert werden konnten, wurde ein Mechanismus entwickelt, der eine

Säurefunktion im aktiven Zentrum des Enzyms voraussetzt. Nach einer einleitenden Protonierung des Sauerstoffs im Oxiranring werden eine Reihe von Elektronenshifts vorgeschlagen, wie sie zunächst auch aus der säurekatalysierten Umlagerung von α -Pinenoxid zu Carveol bekannt sind (Abb. 2-23). Entscheidend ist der Hydrid-Shift zum C-7, wodurch das Carbokation in das Ringsystem wandert und die Spaltung des Cyclohexenrings vorbereitet (Abb. 3-13).

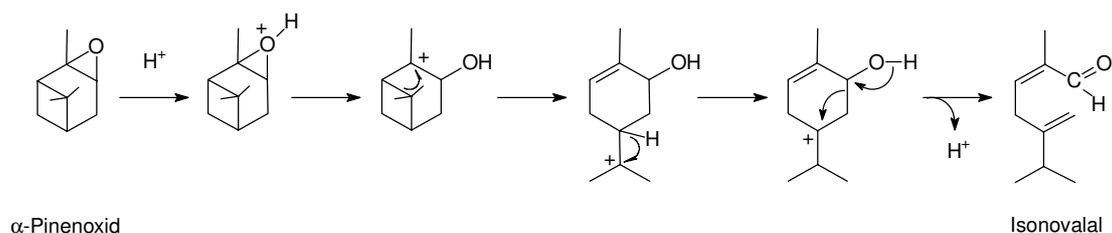


Abb. 3-13 Mechanismus der Isovalal-Bildung durch die Pinenoxid-Lyase (*Nocardia sp.* Strain P18.3 [89])

Neuere Untersuchungen zur Ringfragmentierung von bicyclischen Epoxiden aus der Synthesechemie ergaben, daß auch die zweite Ringöffnung auf rein chemischem Wege möglich ist. Bei der säurekatalysierten Umlagerung von Thujenoxid in protischen Lösungsmitteln erhält man in geringer Ausbeute (8 %) das gleiche Umlagerungsprodukt (Abb 3-14). Um die Spaltung des Cyclohexenrings zu erreichen sind jedoch drastische Bedingungen notwendig (135°C, 8 h), die sofort zur Bildung des thermodynamisch stabileren durchkonjugierten (2*E*,4*E*)-Aldehyds führen [31].

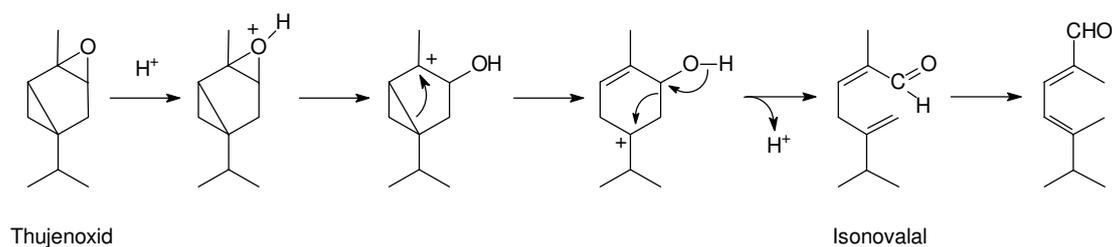


Abb. 3-14 Mechanismus der säurekatalysierten Umlagerung von Thujenoxid zu Isovalal [31]

Damit wurde indirekt die Plausibilität des oben beschriebenen Mechanismus für die (-)- α -Pinenoxid-Lyase bestätigt und die hohe Effektivität und Selektivität einer

enzymatischen Reaktion im Vergleich zu organisch-chemischen Synthesen demonstriert.

Die (-)- α -Pinenoxid-Lyasen aus *P. putida* PX1 NCIMB 10684 und *Nocardia* sp. strain P18.3 wurden bereits isoliert und charakterisiert. Beide sind, wie auch die Lyase aus *P. fluorescens* [11], wasserlösliche Flavoproteine und benötigen weder Co-Faktoren noch Sauerstoff. Weitere enzymespezifische Daten sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

Tabelle 3-3 Charakterisierung der Pinenoxid-Lyasen aus *P. putida* und *Nocardia* sp. strain P18.3

	<i>P. putida</i> NCIMB 10684 [71]	<i>Nocardia</i> sp. strain P18.3 [89]
Anteil im löslichen Zellprotein	6 %	6 – 7 %
M_r (Ultrazentrifugation)	42 kDa	50 kDa
Untereinheiten	Homodimer	Heterodimer 17000 Da und 22000 Da
IEP		4,0 (UE: 3,9 und 4,5)
K_m	210 μ M	9 μ M
Turnover Rate		15.000
Aktivität		10-12 U/mg Protein
Cofaktoren	Keine	Keine
Inhibitoren	Atebrin (K _i = 0,6 μ M) Chlorpromazin Promethazin	S-H reaktive Substanzen Terpen-Epoxide Pinan-Derivate mit Funktionalisierung am C-3

Aus den eigenen Untersuchungen der Biotransformation von (-)- α -Pinenoxid mit ruhenden Zellen von *P. fluorescens* konnten weitere Rückschlüsse auf Enzymeigenschaften der α -Pinenoxid-Lyase gezogen werden.

Die Lyase befindet sich nicht nur im Cytosol der Zellen, sondern wird von *P. fluorescens* auch ins Medium abgegeben. Ob das Enzym aktiv sezerniert wird, konnte nicht festgestellt werden. Jedoch ergaben alle Prozeduren, die typischerweise zu Membranschädigungen führen, wie die Zentrifugation, das Einfrieren oder hohe Terpenkonzentrationen im Medium, einen deutlichen Anstieg der Isonovalal-

konzentration im Verhältnis zu anderen Transformationsprodukten aus α -Pinenoxid (s. Abschnitte 2.1.1.1.2 und 2.1.5.1). Daraus war zu schließen, daß bei jeder Zellysis die aktive Lyase frei wird.

Wie bei *Nocardia sp.* wurden sehr hohe Umsatzraten erzielt. Ruhende Zellen ($OD_{600} = 10$) setzten innerhalb von 10 min $1,2 \text{ g L}^{-1}$ α -Pinenoxid vollständig um. Der Umsatz von 90 g L^{-1} α -Pinenoxid gelang innerhalb von fünf Stunden, ohne daß Anzeichen für eine mögliche Produkthemmung oder den Verlust der Enzymaktivität festgestellt werden konnten (s. Abschnitt 2.1.5.1).

Während der Transformation von α -Pinen mit ruhenden Zellen von *P. fluorescens* ist α -Pinenoxid nicht als Zwischenprodukt nachweisbar [20]. Die Aktivität der Lyase übertrifft offenbar die aller am α -Pinen-Katabolismus beteiligten Enzyme. Die Notwendigkeit dieser außergewöhnlich schnellen Umsetzung von α -Pinenoxid ergibt sich aus der geringen Stabilität des Epoxids bei $\text{pH} < 7$ und kann als evolutionäre Anpassung an die chemischen Eigenschaften des Substrats angesehen werden.

3.2.4.3 (Z)-(E)-Isomerisierung

Entscheidend für das zu beobachtende Produktspektrum aus der Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid war das Ausmaß der (Z)-(E)-Isomerisierung der Doppelbindung im Isonovalal zu Novalal (s. Abb. 3-15). Geringe pH-Wertschwankungen im physiologischen Bereich ($\text{pH} 4,5 - 9,0$) waren für diese Umsetzung nicht verantwortlich (s. Abschnitt 2.1.3.1). Jedoch konnte in einem Blindversuch mit autoklavierter Bakteriensuspension gezeigt werden, daß die Isomerisierung zumindest zum Teil nichtenzymatisch durch Bestandteile des Bakterienmediums katalysiert wird (s. Abschnitt 2.1.3.3.1). Eine (Z)-(E)-Isomerisierung wurde auch in Anwesenheit von $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Glycin beobachtet, so daß auf eine Beteiligung freier Aminogruppen an der Umsetzung geschlossen wurde (s. Abschnitt 2.1.3.3.3). Freie Aminogruppen sind auch in einigen Biotensiden vorhanden, die gerade zu Beginn der Biotransformation verstärkt gebildet werden (s. Abschnitte 2.1.1.1 und 3.2.4.6.2) und damit möglicherweise für die Isomerisierung im Blindwert verantwortlich sind.

Bei der Umsetzung von Isonovalal mit ruhenden Zellen war eine etwa 20-fach schnellere (Z)-(E)-Isomerisierung als im Blindwert zu beobachten (s. Abschnitt

2.1.4.3). Da freie Aminogruppen beim Autoklavieren jedoch mit Kohlenhydraten leicht Maillard-Reaktionen eingehen, könnte dies auch eine Ursache für geringere Umsatzraten im Blindwert sein. Die Beteiligung einer Isomerase war aber nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen.

3.2.4.4 Dehydrogenase-vermittelte Oxidation und Reduktionen

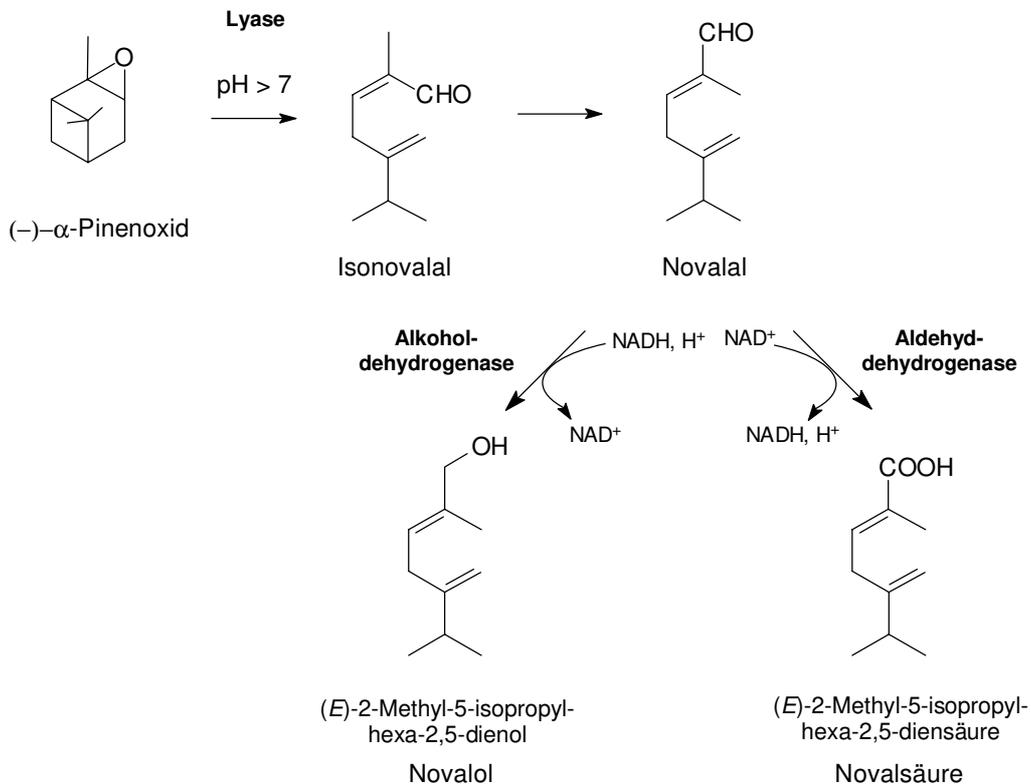


Abb. 3-15 Produktspektrum aus der Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid mit ruhenden Zellen von *P. fluorescens* unter Sauerstoff-Limitierung

3.2.4.4.1 Aldehyd-Dehydrogenase

Um den Aldehyd in eine für den Stoffwechsel verfügbare Form zu bringen, ist eine Oxidation zur Säure erforderlich. Diese Umsetzung wird bei *P. fluorescens* durch eine NAD-abhängige Aldehyd-Dehydrogenase katalysiert und führt zur Bildung von Novalsäure (Abb. 3-15, [20]). Eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß die Aldehyd-Dehydrogenase als Substrat neben Novalal auch Isonovalal akzeptiert (s.

Abschnitt 2.1.4.2.2) und zur Isonovalsäure umsetzen kann. Isonovalsäure wurde jedoch entweder gar nicht oder nur in vergleichsweise geringen Konzentrationen gebildet. Die Ursache dafür dürfte in der schnellen Isomerisierung des Isonovalals zu Novalal liegen (s. Abb. 2-24). Jedoch ist auch eine höhere Substratspezifität des Enzyms für Novalal denkbar, wie es auch bei *Nocardia sp.* der Fall ist [26].

3.2.4.4.2 Alkohol-Dehydrogenase

Novalal wird bei Abwesenheit von Sauerstoff zum korrespondierenden Alkohol Novalol reduziert (s. Abschnitt 2.1.1.1.1). Das hierfür verantwortliche Enzym ist wahrscheinlich eine Alkohol-Dehydrogenase. Alkohol-Dehydrogenasen sind an vielen Terpen-Metabolisierungen beteiligt und katalysieren gewöhnlich die NAD(P)-abhängige Oxidation von Alkoholen zu den korrespondierenden Aldehyden [63]. Daß hier die Rückreaktion stattfindet, könnte dem Umstand zu verdanken sein, daß unter Sauerstofflimitierung eine Regeneration des durch die Aldehyd-Dehydrogenase gebildeten reduzierten Co-Faktor NADH über die Atmungskette nicht möglich ist. Die Regeneration über die Atmungskette ist für die Zelle mit einem Energiegewinn verbunden, der bei einer alternativen Regeneration durch Reduktion von Novalal nicht stattfindet. Die Zellen sterben unter diesen Umständen ab.

Versuche, die Novalol-Bildung aus Novalal oder Novalsäure durch NADH-Zusatz zu fördern, waren nicht erfolgreich (Abschnitt 2.1.4.5). Da der Co-Faktor NADH für vielfältige enzymatische Prozesse benötigt wird, stellt dieses Ergebnis die oben aufgestellte Hypothese nicht unbedingt in Frage. Eine bevorzugte Regeneration durch Reduktion des Aldehyds könnte auch auf einer räumlich nahen Anordnung der Dehydrogenasen beruhen.

Das Produktspektrum nach dreistündiger Umsetzung von $1,2 \text{ g L}^{-1}$ (-)- α -Pinenoxid beinhaltete hauptsächlich zwei Produkte, Novalsäure und Novalol. Nebenprodukte waren die konjugierten Alkohole sowie geringe Mengen des (Z)-Isomers Isonovalol. Die Aldehyde waren nicht nachweisbar (s. Abschnitt 2.1.1.1.1). Blindwerte haben gezeigt, daß eine spontane Disproportionierung der Aldehyde zu den korrespondierenden Alkoholen und Säuren unter den untersuchten Bedingungen nicht stattfand (s. Abschnitt 2.1.3).

(*Z*)- und (*E*)-2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadienol (Isonovalol und Novalol) waren in der Literatur noch nicht eindeutig beschrieben und wurden deshalb ausführlich spektroskopisch charakterisiert (s. Abschnitt 2.1.2). Der in der Patentliteratur [12] im Zusammenhang mit dieser Umsetzung bereits beschriebene Alkohol konnte damit der Struktur des (*E*)-konfigurierten Alkohols Novalol zugeordnet werden.

3.2.4.4.3 Weitere Dehydrogenasen

Unter Wachstumsbedingungen, d. h. bei guter Sauerstoffversorgung im Minimalmedium, wurde die aus der Umsetzung von (-)- α -Pinenoxid gebildete Novalsäure innerhalb von zwei Tagen vollständig abgebaut (s. Abschnitt 2.1.4.5). Dabei konnten verschiedene Zwischenprodukte (s. Abb. 3-16) mittels GC-MS detektiert und als freie Säuren und Methylester teilidentifiziert werden (s. Abschnitt 2.1.2.2.3).

Obwohl eine Reduktion von Doppelbindungen prinzipiell keine Voraussetzung für die β -Oxidation ungesättigter Fettsäuren ist [54], wird der Abbau der Novalsäure bei *P. fluorescens* durch einen Reduktionsschritt in der Kohlenstoffkette eingeleitet.

Insgesamt konnten vier einfach ungesättigte C₁₀-Säuren detektiert werden, deren MS-Spektren auf die Strukturen **(1)** - **(4)** (Abb. 3-16) hindeuteten. Während die Säuren **(2)** - **(4)** nur in geringen Mengen (< 8 mg L⁻¹) gebildet wurden, erfolgte intermediär eine Anreicherung der Säure **(1)** auf über 30 mg L⁻¹ innerhalb von vier Stunden. Auf die Bildung einer vollständig hydrierten Form der Novalsäure gab es keinen Hinweis (s. Abschnitt 2.1.4.5).

Auch aus dem Abbau der Isonovalsäure bei *P. NCIMB 10684* und *P. putida* PIN11 wurde ein reduziertes Zwischenprodukt isoliert und als 2,5,6-Trimethyl-3-heptensäure identifiziert [25, 32]. Diese Säure konnte als Zwischenprodukt des Novalsäureabbaus bei *P. fluorescens* nicht nachgewiesen werden (s. Abschnitt 2.1.2.2.3). In diesem Zusammenhang wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem zunächst eine Isomerisierung der isolierten Doppelbindung zum durchkonjugierten System **(5)** stattfindet. Dann erfolgt die Hydrierung zur 2,5,6-Trimethyl-3-heptensäure (in Abb. 3-16 nicht dargestellt). In einem weiteren Isomerisierungsschritt wird die α,β -ungesättigte Säure **(1)** gebildet und steht als Substrat für die β -Oxidation zur Verfügung [32].

Eine enzymatische Reduktion von C=C-Bindungen erfolgt gewöhnlich nur dann, wenn diese polarisiert sind. Das ist beispielsweise bei α,β -ungesättigten Aldehyden, Ketonen und Carbonsäuren der Fall. NADH-abhängige Enoat-Reduktasen aus *Clostridium* sp. zeigen eine geringe Substratspezifität und reduzieren spezifisch die C-2 – C-3-Doppelbindung zu enantiomerenreinen Produkten [63]. Die Bildung der Säuren **(2)** - **(4)** könnte damit auf die Aktivität einer ähnlichen Enoat-Reduktase bei *P. fluorescens* hinweisen, die keinen Einfluß auf weitere C=C-Bindungen im Kohlenstoffgerüst hat. Für die Entstehung der α,β -ungesättigten Säure **(1)** aus den *(Z)/(E)*-isomeren Säuren **(3)** oder **(4)** müßten damit weitere Umlagerungsreaktionen formuliert werden, auf die jedoch im Rahmen des Produktspektrums dieser Umsetzung keine Hinweise vorlagen (s. Abschnitt 2.1.1.1.3).

Enzymkatalysierte Reduktionen nichtaktivierter Doppelbindungen sind nur wenige bekannt. Die Biosynthese von Cholesterin aus Lanosterin umfaßt jedoch eine ganze Reihe derartiger Schritte, wobei die letzte Stufe die Reduktion einer nichtaktivierten Doppelbindung in der acyclischen Seitenkette beinhaltet [90]. Somit ist im Rahmen der biochemischen Möglichkeiten prinzipiell auch eine direkte Reduktion der Methylidengruppe der Novalsäure denkbar. NADH-abhängige Reduktasen sind bekannt für die hohe Enantioselektivität der Hydrierung [63]. Darum würde auch die Stereoselektivität der Umsetzung zur Säure **(1)**, die sich auch in ihrem β -Oxidationsprodukt (*S*)-(-)-3,4-Dimethylpentansäure spiegelt (s. Abschnitt 2.1.2.5), für eine direkte Reduktion der Novalsäure zur (*5S,2E*)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure **(1)** sprechen. Eine Klärung kann hier nur auf proteinchemischem Weg erfolgen.

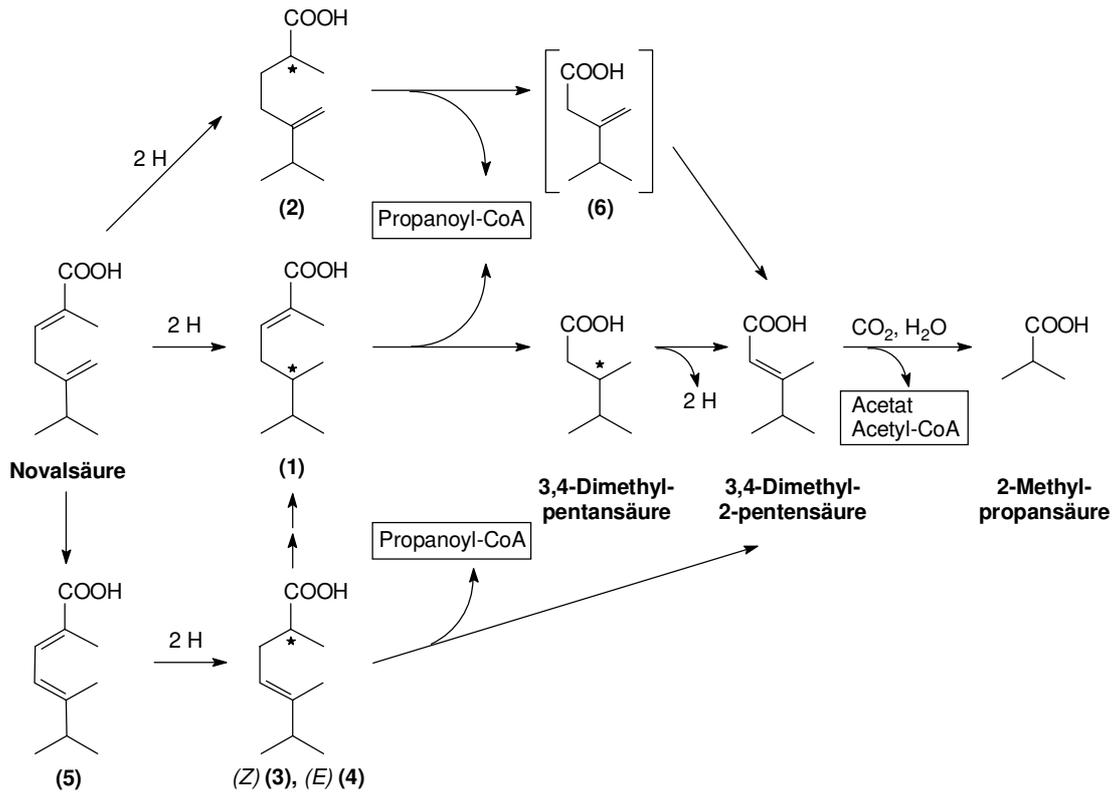


Abb. 3-16 Hypothetisches Schema für den Abbau der Novalsäure auf Grundlage von Zwischenprodukten bei *P. fluorescens* (β -Oxidationsschritte als CoA-Ester)

3.2.4.5 β -Oxidation

Der oxidative Abbau von Fettsäuren durch den Mikroorganismus ist die Voraussetzung für eine Nutzung des Substrats zum Energiegewinn. Bevor Fettsäuren oxidiert werden können, müssen sie durch eine ATP-abhängige Acylierungsreaktion zum Fettsäure-Acyl-CoA-Ester aktiviert werden. Der erste Schritt der β -Oxidation ist dann die Einführung einer (*E*)-konfigurierten Doppelbindung in α,β -Position durch das Flavoprotein Acyl-CoA-Dehydrogenase. Nach der Addition von Wasser an die Doppelbindung folgt ein NAD-abhängiger Oxidationsschritt zu β -Ketoacyl-CoA. Die Spaltung der C-2 - C-3-Bindung erfolgt durch Thiolysen mit einem weiteren Molekül CoA-SH (Abb. 3-17). Die Co-Enzyme werden in der Atmungskette durch Übertragung des Wasserstoffs auf O₂ regeneriert [90].

Die im Transformationsmedium von *P. fluorescens* nachgewiesenen Säuren (s. Abschnitt 2.1.1.1.3) ergaben Hinweise darauf, daß das 2,5,6-Trimethylpentangerüst der Transformationsprodukte über zwei β -Oxidationsschritte abgebaut wird.

3.2.4.5.1 β -Oxidation der (5*S*,2*E*)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure

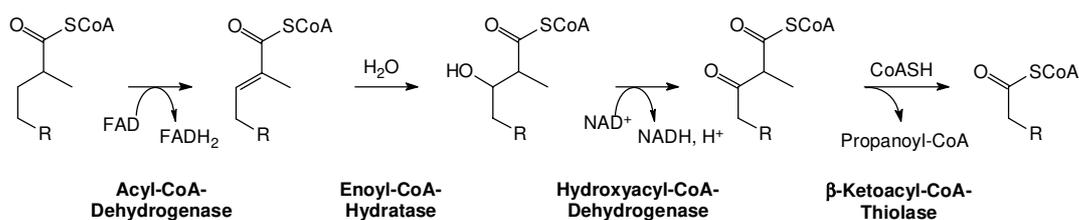


Abb. 3-17 β -Oxidationsschritte bei α -verzweigten Fettsäuren

Da die Entstehung einer vollständig hydrierten Form der Novalsäure nicht nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 2.1.1.1.3), ist es wahrscheinlich, daß die α,β -ungesättigte Carbonsäure (5*S*,2*E*)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure (**1**) das Substrat für die Acyl-CoA-Synthetase ist. Sofern α,β -ungesättigte Säuren in der (*E*)-Form vorliegen, können sie auch direkt in den zweiten Schritt der β -Oxidation eintreten.

Eine Verzweigung in der α -Position stellt kein Hindernis für die β -Oxidation dar. Die Spaltung der intermediär entstehenden β -Ketoacyl-CoA-Derivate führt dann zu Propanoyl-CoA anstelle von Acetyl-CoA. Propanoyl-CoA entsteht auch beim Abbau ungeradzahlicher Fettsäuren oder im Aminosäurestoffwechsel während des Isoleucinabbaus und wird im weiteren durch Carboxylierung über Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA umgesetzt, das dann im Citronensäurecyclus zu Malat oxidiert und in einem Folgeschritt oxidativ zu Pyruvat decarboxyliert wird [90]. Bei *E. coli* konnte auch ein direkter Abbauweg nachgewiesen werden. Dabei wird Propanoyl-CoA zu Acrylyl-CoA reduziert. Die Addition von Wasser führt zu Lactyl-CoA, das unter Abspaltung von CoA zu Pyruvat reduziert wird [91].

Als Produkt der β -Oxidation der (5*S*,2*E*)-(-)-2,5,6-Trimethyl-2-heptensäure (**1**) durch *P. fluorescens* entstand demzufolge der CoA-Ester von (*S*)-(-)-3,4-Dimethylpentansäure. Aufgrund der Methylverzweigung in der β -Position konnte kein zweiter β -

Oxidationszyklus sofort anschließen (s. u.), so daß die freie Säure ins Medium abgegeben wurde und aus diesem isoliert und identifiziert werden konnte (s. Abschnitt 2.1.2).

Ein Nebenprodukt wurde aufgrund des Massenspektrums als 3,4-Dimethyl-2-pentensäure identifiziert (s. Abschnitt 2.1.1.1.3 und Tabelle 2-11). Es ist möglich, daß diese Säure als β -Oxidationsprodukt der Säuren **(3)** oder **(4)** gebildet wurde. In diesem Falle erschien es jedoch wahrscheinlicher, daß sie ein Zwischenprodukt des weiteren Abbaus der 3,4-Dimethylpentensäure darstellte (s. Abschnitt 3.2.2.5.2).

Das hypothetische β -Oxidationsprodukt aus Säure **(2)**, 3-Isopropyl-3-butensäure **(6)**, wurde nicht gefunden (s. Abschnitt 2.1.2.2.3). Die Entstehung dieser Säure als Hauptmetabolit des α -Pinenabbaus konnte jedoch bei *P. putida* PIN11 nach chemisch induzierter Mutation gezeigt werden [25].

Die in Abb. 3-17 dargestellten Zwischenprodukte der β -Oxidation lassen sich in der Regel nicht als freie Säuren isolieren, da die beteiligten Enzyme in einer Kaskade angeordnet sind, die eine sofortige Übertragung des jeweils freiwerdenden CoA-Esters zum nachgeschalteten aktiven Zentrum erlaubt.

3.2.4.5.2 β -Oxidation der (S)-(-)-3,4-Dimethylpentensäure

Eine 3-Methylverzweigung blockiert zunächst die β -Oxidation von Fettsäuren. Da aber auch die (S)-(-)-3,4-Dimethylpentensäure im Medium nur intermediär auftrat (Abschnitt 2.1.4.2.2), muß *P. fluorescens* über zusätzliche metabolische Schritte verfügen, die für einen vollständigen Abbau 3-methylverzweigter Substrate sorgen. Ein typischer Abbauweg in tierischen Organismen ist die α -Oxidation. Dabei wird die freie Fettsäure zunächst in α -Position hydroxyliert und unterliegt dann einer oxidativen Decarboxylierung, die zu einer um einen Kohlenstoff verkürzten Fettsäure führt [90].

Aus dem Katabolismus regulärer acyclischer Monoterpene (Geraniol und Citronellol) bei *Pseudomonas citronellolis* kennt man einen alternativen Abbauweg [85, 92]. Der Enoyl-CoA-Ester ist das Substrat für eine ATP- und Biotin-abhängige Carboxylase, die eine Säurefunktion an die Methylgruppe anfügt. Dann erfolgt eine Hydratisierung der Doppelbindung zu β -Hydroxy-Acyl-CoA. Eine Lyase katalysiert die Abspaltung von Acetat. Es entsteht der β -Keto-Acyl-CoA-Ester, der direkt in den

β -Oxidationsweg eingeschleust wird. Dort erfolgt die Thiolyse unter Abspaltung von Acetyl-CoA (Abb. 3-18).

Acetyl-CoA kann dann im Zitronensäurezyklus zu CO_2 und H_2O oxidiert werden oder dient als Substrat für weitere Biosynthesen (s. Abschnitt 3.2.4.6.1).

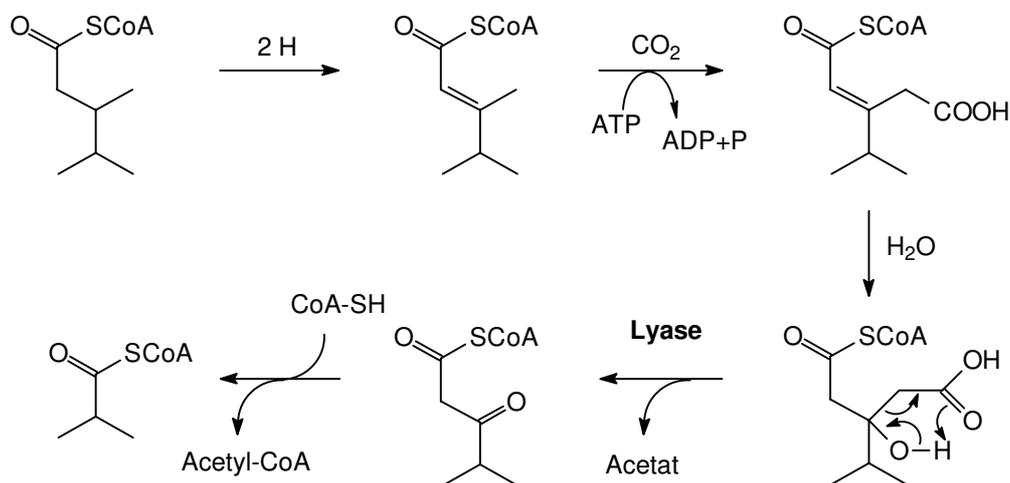


Abb. 3-18 Hypothetisches Schema für den Abbau von 3,4-Dimethylpentansäure

Im Zusammenhang mit dem Abbau von (*S*)-(-)-3,4-Dimethylpentansäure durch *P. fluorescens* konnten keine Hinweise auf den α -Oxidationsweg, wie etwa die Akkumulation des mutmaßlichen Oxidationsprodukts 2,3-Dimethylbutansäure, gefunden werden.

Eine detaillierte Auswertung der Massenspektren aus den Säurefraktionen ergab jedoch mehrere Hinweise auf einen ähnlichen Abbauweg, wie er auch beim Geraniol- und Citronellol-Katabolismus von *P. citronellolis* beschrieben wird. Regelmäßig wurde neben 3,4-Dimethylpentansäure auch die α - β -ungesättigte 3,4-Dimethyl-2-pentensäure gefunden. Die Produkte 2-Methylpropansäure und freie Essigsäure konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurde ein Massenspektrum erhalten, das zu der intermediär gebildeten β -Ketosäure gehören könnte (s. Abschnitt 2.1.1.1.3, Tabelle 2-11 und 2-15).

Für den Abbau der 3,4-Dimethylpentansäure bei *P. fluorescens* können daraus folgende hypothetische Schritte abgeleitet werden: Die durch einen einleitenden Dehydrierungsschritt aus 3,4-Dimethylpentansäure entstehende 3,4-Dimethyl-2-pentensäure könnte als CoA-Ester carboxyliert, hydratisiert und unter Abspaltung von Acetat und Acetyl-CoA zu 2-Methylpropyl-CoA umgesetzt werden (Abb. 3-18).

2-Methylpropyl-CoA entsteht auch aus Valin als Zwischenprodukt im Aminosäurestoffwechsel und wird dort zu Propanoyl-CoA abgebaut [90].

3.2.4.6 Bildung von weiteren Produkten

3.2.4.6.1 (+)- β -Thujon

Bei allen Umsetzungen mit (-)- α -Pinenoxid wurden etwa 0,5 % des eingesetzten Substrats zu einem Keton umgesetzt (s. Abschnitt 2.1.1.1.1). Das Produkt konnte als (1*S*,4*S*,5*R*)-(+)- β -Thujon (Isothujon) identifiziert werden (s. Abschnitte 2.1.2.2.4 und 2.1.2.3).

Die Entstehung von β -Thujon aus α -Pinenoxid konnte in keinem Blindwert nachgewiesen werden. Eine spontane Bildung des gespannten Cyclopropangerüsts ist auch aus thermodynamischen Gesichtspunkten wenig wahrscheinlich. *P. fluorescens* verfügt also über ein weiteres Enzymsystem, das die Umlagerung von α -Pinenoxid zu β -Thujon und möglicherweise auch weitere Transformationsschritte katalysiert. Ein möglicher Mechanismus muß den Bruch des Cyclobutanrings im Pinangerüst mit anschließender Cyclisierung zum Cyclopropan beinhalten. Ein Vorschlag hierzu ist in Abb. 3-19 dargestellt.

Die Bildung von (+)- β -Thujon konnte auch im α -Pinenstoffwechsel von *Pseudomonas* NCIMB 10684 nachgewiesen werden [70].

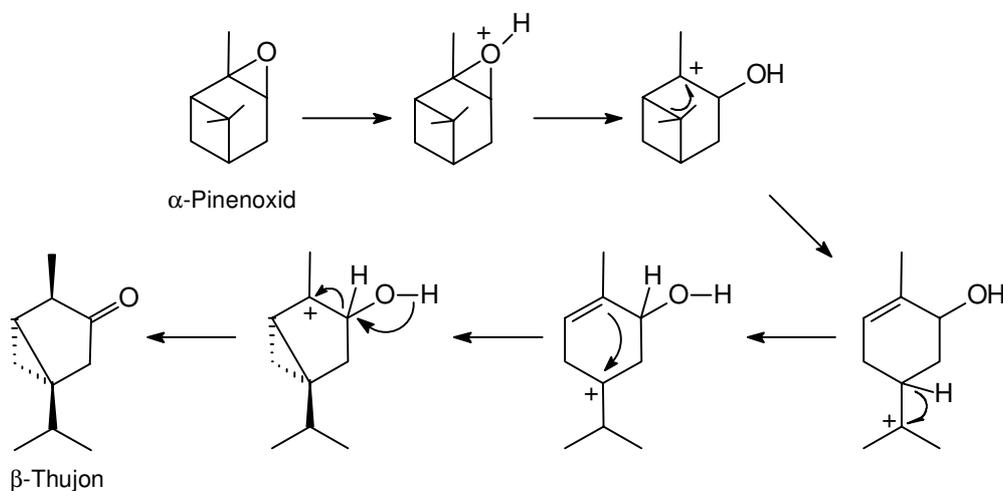


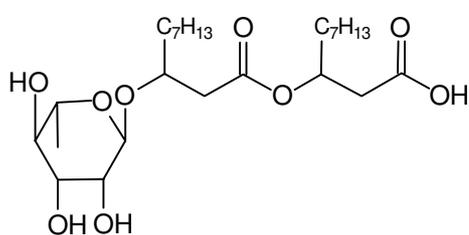
Abb. 3-19 Hypothetischer Mechanismus zur Bildung von β -Thujon aus α -Pinenoxid

In der Natur kommen nur die C-4-epimeren Formen (-)- α - und (+)- β -Thujon vor, da die (Z)-Konfiguration eine sterische Voraussetzung für die Entstehung des bicyclischen Thujangerüsts ist. α - und β -Thujon sind in etherischen Ölen der Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae und Pinaceae verbreitet und als starke Nervengifte bekannt [93].

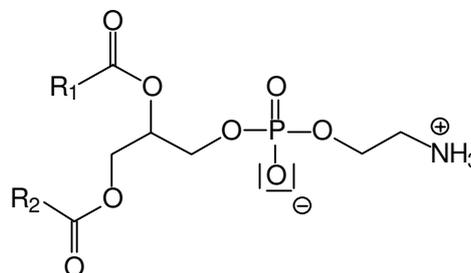
3.2.4.6.2 Biotenside

Pseudomonaden sind bekannt für die Produktion einer Reihe von hochwirksamen oberflächenaktiven Substanzen, die in das Medium abgegeben werden [94 - 97]. Folgende Substanzklassen wurden bereits bei *Pseudomonas sp.* nachgewiesen (Abb. 3-20):

- Glycolipide (z.B. Rhamnolipide [23])
- Lipopeptide und Lipoproteine (z.B. Viscosin [22])
- Peptidoglycolipide [94]
- Phospholipide (z.B. Phosphatidylethanolamin [98])



Rhamnolipid R1



Phosphatidylethanolamin

Abb. 3-20 Beispiele für Biotenside bei *Pseudomonas sp.*, R₁, R₂: Alkyl-Reste [23, 985]

Diesen sog. Biotensiden wird eine maßgebliche Beteiligung an der Aufnahme von Kohlenwasserstoffen durch Mikroorganismen beigemessen. Im Hinblick auf den Katabolismus von Alkanen wurden hierfür drei Mechanismen vorgeschlagen, die im Prinzip auch auf Terpenkohlenwasserstoffe übertragbar sein dürften.

- Biotenside erniedrigen die Oberflächenspannung von Wasser und vergrößern damit die Grenzfläche zwischen organischer und wäßriger Phase, an der sich die Zellen anlagern können.
- Biotenside haften an der Zelloberfläche und vermitteln dadurch eine Adhäsion der Zelle an großen Öltropfen der organischen Phase.
- Biotenside bilden Micellen zur Pseudosolubilisierung der Alkane (Mikroemulsionen), die dann an die Zelloberfläche gelangen.

Im Einzelfall findet man meistens eine Beteiligung mehrerer Tenside mit verschiedenen Mechanismen an der Kohlenwasserstoff-Aufnahme, die synergistisch wirken. Der genaue Mechanismus des Substrattransfers durch die Zellwand ist nicht geklärt. Man diskutiert hydrophobe Kanäle in der Zellwand, und auch die Hydrophobizität der Zelloberfläche spielt offenbar eine entscheidende Rolle [95]. Die hohen Spezifität einzelner Biotenside für die Substrataufnahme des sie synthetisierenden Mikroorganismus läßt auch eine Beteiligung an weiteren Vorgängen wahrscheinlich erscheinen [34]. Interessant ist aber auch die oft zu beobachtende Spezifität des Emulgators bezüglich des aufzunehmenden Kohlenwasserstoffs [99].

Die Biosynthese der Tenside findet im geringen Umfang während der Wachstumsphase statt. Jedoch konnte eine Überproduktion während der stationären Phase festgestellt werden. Sie beruht auf einer Induktion der Biosynthese sobald ein Mangel der Stickstoffquelle und/oder multivalenter Kationen (z. B. Fe^{2+}) auftritt und gleichzeitig ein Überangebot der Kohlenstoffquelle besteht. Beides ist bei der Umsetzung von Alkanen durch ruhende oder immobilisierte Zellen der Fall und hat zur Entwicklung von Bioprocessen zur Gewinnung der Tenside in hohen Ausbeuten geführt [100, 101].

Für die Biosynthese von Rhamnolipiden wurde gezeigt, daß der Kohlenwasserstoff zunächst zur Säure oxidiert und durch β -Oxidation vollständig abgebaut wird. Erst dann werden die Komponenten der Biotenside *de novo* aus Acetat synthetisiert (Gluconeogenese, Fettsäuresynthese) und miteinander verknüpft [95].

Auf diesen Erkenntnissen beruht auch die Hypothese, daß die Funktion der Biotenside als extrazelluläres Fettsäuredepot anzusehen ist, das angelegt wird, wenn die Zelle die aus dem Alkanabbau resultierenden Fettsäuren nicht anders verwerten kann.

Alle eigenen Untersuchungen wurden mit ruhenden Zellen durchgeführt. Damit waren prinzipiell die oben beschriebenen Voraussetzungen für eine Synthese von Tensiden gegeben. Insbesondere in der Anfangsphase der Umsetzung von α -Pinenoxid konnte die Abgabe oberflächenaktiver Substanzen durch die Zellen ins Medium beobachtet werden, die die Phasentrennung während der Lösungsmittel-extraktion erschwerten (s. Abschnitt 2.1.5.1.1). Außerdem konnten in den Säure-isolaten regelmäßig geringe Mengen 3-Hydroxydecansäure nachgewiesen werden (s. Abschnitt 2.1.1.1.3), eine typische Lipidkomponente von Rhamnolipiden und Peptidolipiden [22, 23]. Damit ist plausibel, daß die in der Bilanz der Terpene auftretenden Defizite (s. Abschnitt 2.1.5.1) zum Teil durch eine sofort einsetzende Biotensidproduktion verursacht werden.

Bei *P. fluorescens* NCIMB 11671 konnten Biotenside isoliert und die Produktion während der logarithmischen Wachstumsphase verfolgt und quantifiziert werden. Die elementare Zusammensetzung ($\text{CH}_{1,54}\text{O}_{0,42}\text{N}_{0,21}$) wurde ermittelt [102]. Die Anwesenheit von Stickstoff zeigt an, daß eine Proteinkomponente oder Phosphatidylethanolamin vorhanden ist und damit freie Aminogruppen enthalten sein dürften. Da Biotenside gewöhnlich gegen Autoklavieren stabil sind [94], wäre auch eine Katalyse der (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung von Isonovalal in autoklavierten Zellen prinzipiell vorstellbar (s. Abschnitt 2.1.4.3.1).

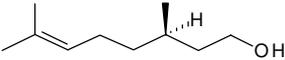
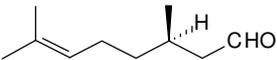
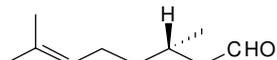
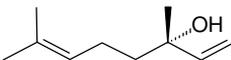
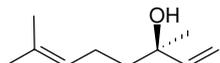
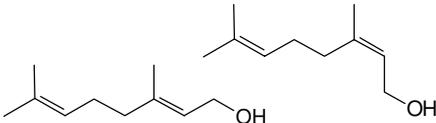
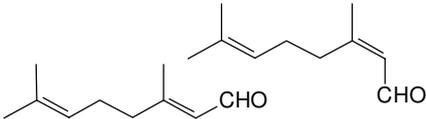
3.3 Sensorische Eigenschaften der Produkte

3.3.1 Bedeutung acyclischer Monoterpene als Aromastoffe

Acyclische Monoterpene und ihre Derivate sind Bestandteile fast aller Parfüm-kompositionen. Der Marktanteil acyclischer Monoterpene beträgt 30 % der natürlichen Duftstoffe [8]. Viele sind als natürliche Aromastoffe in hoher Reinheit kommerziell erhältlich (Tabelle 3-4). Hierzu zählen Aldehyde (Citral und Citronellal), Alkohole (Citronellol, Geraniol, Linalool) und die korrespondierenden Ester der Essigsäure (Citronellylacetat, Geranylacetat, Linalylacetat) [103]. Obwohl die Ester

häufig eine deutlich geringere Geruchsintensität als die freien Alkohole aufweisen, so zeigen sie doch signifikante Unterschiede in der Geruchsqualität, so daß sie aufgrund ihrer weiten Verbreitung in der Natur zur Rekonstruktion etherischer Öle unverzichtbar sind [104].

Tabelle 3-4 Acyclische monoterpene Riechstoffe aus natürlichen Quellen [8]

Terpen	Struktur	Rohstoffquelle	Gehalt
(R)-(+)-Citronellol		Öl von <i>Boromia citriodora</i> Gum	< 80 %
(R)-(+)-Citronellal		Java-Citronellöl <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt	< 55 %
(S)-(-)-Citronellal		Öl von <i>Backhousia citriodora</i> F.v.M.	< 80 %
(S)-(+)-Linalool		Ho-Scho-Öl (Schiu-Öl) <i>Cinnamomum camphora</i> Sieb	< 90 %
(R)-(-)-Linalool		Brasil. Rosenholzöl (Linaloeöl) <i>Aniba risaeodora</i> var. <i>amazonica</i> Ducke	< 85 %
Geraniol / Nerol		Palmarosaöl <i>Cymbopogon martini</i> Stapf.	< 95 % (4:1)
Geranial / Neral (Citral)		Lemongrasöl <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.	< 85 % (4:1)

Der hohe Bedarf an diesen Verbindungen kann nicht allein durch Naturstoffe gedeckt werden. Sie werden darum auch in großem Maßstab synthetisch hergestellt. Um das Attribut des Naturstoffs zu erhalten, wurden für die

Estersynthese enzymatische Methoden entwickelt, die eine Veresterung durch unspezifische Lipasen in organischen Lösungsmitteln ermöglichen [105 - 107].

3.3.2 Aromaeigenschaften acyclischer Monoterpene

3.3.2.1 Geruchsqualität

Terpenalkohole mit 2,6-Dimethyloctangerüst weisen durchwegs blumige Geruchsnoten auf. Die zusätzliche Verzweigung in der Kohlenstoffkette im 2,3,6-Trimethylheptangerüst wirkte sich zum Teil deutlich auf die menschliche Geruchswahrnehmung der Verbindungen aus. Der Geruchseindruck von (*Z*)-2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadienol (Isonovalol) wurde zwar ebenfalls als blumig beschrieben, jedoch wies das (*E*)-Isomere Novalol einen kräftigen Zitrusgeruch auf, wie er sonst nur von regulären Terpenaldehyden bekannt ist (s. Abschnitt 2.1.6.2 und Tabelle 3-4).

Auch die sensorischen Eigenschaften der korrespondierenden Aldehyde Novalal und Isonovalal unterschieden sich deutlich voneinander. Während der (*E*)-Aldehyd wahrscheinlich aufgrund seiner insgesamt geringen Geruchsaktivität von den Testpersonen nicht einheitlich wahrgenommen wurde, zeigte das (*Z*)-Isomer Isonovalal in hohen Konzentrationen den bereits beschriebenen [13] und auch von regulären Terpenaldehyden bekannten Zitrusgeruch (s. Abschnitt 2.1.6.2). Im Bereich der Geruchschwelle verlor sich dieser Eindruck und veränderte sich zu einer würzig-krautigen Note. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß auch der Geruch des Alkohols (*R*)-(-)-Lavandulol, der das gleiche Kohlenstoffgerüst aufweist, als würzig-krautig, jedoch mit blumiger Note, beschrieben wurde [108].

Die Essigsäureester der acyclischen Terpenalkohole sind weitverbreitete natürliche Duftstoffe [8]. Ihr Geruchseindruck ist meistens ähnlich dem des freien Alkohols, jedoch mit variierendem Unterton. So wird der Rosengeruch des Citronellols beim Acetyl-Derivat um eine citrusfruchtige Note bereichert. Der blumige Duft des Linalools verändert sich beim Linalylacetat hin zu einer herben Bergamot-Lavendel-Note [109]. Ähnliches galt für die synthetisch hergestellten Acylderivate des Novalols, die als Ester eine blumige Note gewannen (s. Abschnitt 2.1.6.1).

Bis auf das Methylgeraniat finden Ester der Monoterpensäuren nur selten Verwendung in Parfümkompositionen [104]. Die synthetisch gewonnenen Methyl- und Ethylester der Novalsäure zeigten angenehme citrus-blumige Geruchsnoten und sind damit ebenfalls als Aromastoffe interessant.

3.2.2.2 Geruchsschwellen

Der Schwellenwert ist die schwächste noch wahrnehmbare Duftkonzentration eines Stoffes. Er ist stark lösungsmittelabhängig, wobei in Luft meist um Zehnerpotenzen niedrigere Schwellenkonzentrationen als in Wasser gefunden werden [8].

Messungen im Verdünnungsmedium Luft mit Hilfe von standardisierten Sniffing-Tests am Gaschromatographen haben sich für den Laborbereich als praktikable und aussagekräftige Methode bewährt, da eine aufwendige Probenreinigung nicht notwendig ist und eine simultane Quantifizierung erfolgen kann. Für Terpene und Ester sind mit dieser Methode bereits ausführliche Untersuchungen durchgeführt worden, die hier als Diskussionsgrundlage dienen [10].

Die quantitative Geruchswahrnehmung einzelner Individuen unterliegt hohen Schwankungen, die nicht nur von temporären Faktoren (psychologischer und pathologischer Zustand) beeinflusst werden, sondern auch generell vom Alter und Geschlecht der Personen abhängen [8]. Für eine statistisch akzeptable und reproduzierbare Bestimmung von Geruchsschwellenwerten ist deshalb ein hoher personeller und zeitlicher Aufwand erforderlich.

Die in Tabelle 3-5 aufgeführten Vergleichswerte wurden nur durch eine Testperson ermittelt. Auch die eigenen Untersuchungen sind nicht statistisch abgesichert. Unter diesen Umständen ist deshalb nur eine größenordnungsmäßige Diskussion der Ergebnisse möglich.

Die acyclischen Monoterpene bilden die geruchsaktivsten terpenoiden Verbindungen. Allein bei den Kohlenwasserstoffen ist eine Zunahme des Schwellenwerts um etwa eine Größenordnung für jedes zusätzliche Ringsystem festzustellen.

Tabelle 3-5 GC-O Geruchsschwellen ausgewählter Monoterpene [10]

Komponente	Schwellenwert [ng Geruchsreiz ⁻¹]	Geruchsqualität
<u>Terpen-Kohlenwasserstoffe:</u>		
α -Pinen	2500 – 2900	terpenig-muffig
(R)-(+)-Limonen	220 – 230	süßlich-terpenig, schwach an Orangen erinnernd
Myrcen	13 – 15	Hopfenblüten, heuartig
<u>Terpen-Aldehyde und –Ketone:</u>		
Citronellal	5,0 – 6,5	aldehydisch, „Kernseife“
Neral	3 – 5	Zitrone, typisch
Geranial	5,5 – 7,0	Zitrone, typisch
Perillaldehyd	26 – 34	citrus-fruchtig
(S)-(+)-Carvon	30 – 40	Kümmel
<u>Terpen-Alkohole:</u>		
Citronellol	80 – 100	blumig, nach Rosen
Nerol	320 – 370	blumig-fruchtige Note
Geraniol	15 – 20	blumig-geranienartig
(R)-(-)-Linalool	0,9 – 1,1	blumig
(S)-(+)-Linalool	3,5 – 4,0	blumig, citrus-fruchtige Note
Terpinen-4-ol	1170 – 1220	terpenig
<u>Terpen-Ester:</u>		
Citronellylacetat	100 – 110	citrusfruchtig
Nerylacetat	2000 – 2500	fruchtig, blumige Note
Geranylacetat	1200 – 1800	citrus-fruchtig
Linalylacetat	400 – 600	blumig

Von besonderem Interesse zur Aromatisierung von Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen und Kosmetika sind jedoch die oxyfunktionalisierten Terpene. Die irregulären 2-Methyl-5-isopropyl-2,5-hexadien-Verbindungen Isonovalal und Novalol weisen mit 13 - 19 ng bzw. 30 - 44 ng Schwellenwerte auf, die im Bereich der regulären Monoterpenalkohole und -aldehyde liegen. Die (*E*)-Verbindung Novalal hingegen ist aufgrund ihres hohen Schwellenwerts (> 1000 ng) kaum als Aromastoff interessant (Tabelle 2-20).

Die Ester der Novalsäure und die Acylester des Novalols sind deutlich weniger geruchsaktiv als der freie Alkohol. Das ist auch bei den Acetaten der regulären

Monoterpene Nerol, Geraniol und Linalool der Fall. Ihre Bedeutung für Parfümkompositionen ist vorrangig in ihrer außergewöhnlichen Geruchsqualität zu sehen (s. o.).

3.4 Optimierung der Produktbildung

3.4.1 Problematik von Terpentransformationen mit Bakterien

3.4.1.1 Löslichkeit der Terpene

Während bei der Terpentransformation mit Basidiomyceten die Substratzuführung aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit der Kohlenwasserstoffterpene einen limitierenden Faktor darstellt [34], haben die meisten Terpen-metabolisierenden Bakterien bereits Strategien hierfür entwickelt. Sie sind zur Synthese von Biotensiden befähigt, die eine Solubilisierung der Substrate und damit ihre effektive Aufnahme durch die Zelle ermöglichen (s. Abschnitt 3.2.4.6.2). Die Solubilisierungsmechanismen greifen auch für die Produkte der Biotransformation. Aufgrund der guten Solubilisierung können um ein vielfaches höhere Terpenkonzentrationen im Medium erreicht werden, als sie aufgrund von berechneten Werten für die Wasserlöslichkeit zu erwarten gewesen wären (Tabelle 3-6). So wurden während der Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit *P. fluorescens* 16 g L⁻¹ Terpene im Medium ohne sichtbare Ausbildung einer organischen Phase suspendiert (s. Abb. 2-31). Da die Toxizität hydrophober Substanzen eng mit ihrer Wasserlöslichkeit zusammenhängt (Abschnitt 3.4.1.2), ist davon auszugehen, daß aufgrund der besseren Verfügbarkeit bei hoher Solubilisierung auch toxische Effekte der Terpene beschleunigt auftreten.

3.4.1.2 Toxizität von Terpenoiden

Die Toxizität hydrophober Verbindungen beruht auf ihrer Löslichkeit in der Cytoplasmamembran und den daraus resultierenden Veränderungen bezüglich der Membranfluidität und Hydrophobizität. Dadurch wird zunächst die Protonenpermeabilität der Membran beeinflusst. Als Grenzwert für eine vollständige Auflösung der Zellwand und damit verbundene Zellysis wurde eine kritische Membrankonzentration von 200 mmol L^{-1} ermittelt [110].

Tabelle 3-6 Berechnete Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (LogP_{OW}), Membran/Wasser-Verteilungskoeffizienten (LogP_{MW}) und Wasserlöslichkeiten der Transformationsprodukte, -edukte und Lösungsmittel [15, 111, 112]

Substanz	LogP_{OW}	LogP_{MW}	Löslichkeit [mg L^{-1}]
Hexadecan	8,8	7,9	-
(-)- α -Pinen	4,27	3,50	5
(-)- α -Pinenoxid	2,87	2,14	674
Isonovalal / Novalal	3,39	2,65	948
Isonovalol / Novalol	3,42	2,68	1948

Als Maß für die Hydrophobizität wird oft der dekadische Logarithmus des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP_{OW}) einer Substanz angegeben. Entscheidend für die aktuelle Membrankonzentration ist jedoch der Verteilungskoeffizient zwischen wässriger Phase und Biomembranen (logP_{MW}). Er kann aus dem logP_{OW} ermittelt werden [15]:

$$\text{logP}_{\text{MW}} = 0,97 \times \text{logP}_{\text{OW}} - 0,64$$

Lipophile Verbindungen mit $\text{logP}_{\text{OW}} > 4$ (Terpenkohlenwasserstoffe) haben einen hohen logP_{MW} und akkumulieren bevorzugt in der Membran. Aufgrund ihrer sehr geringen Wasserlöslichkeit wird auch trotz kontinuierlichem Nachlösen aus der organische Phase keine hohe Membrankonzentration erreicht. Verbindungen mit logP_{OW} zwischen 1 und 4 (oxyfunktionalisierte Terpene) sind erheblich besser wasserlöslich (Tabelle 3-6), aber dennoch ausreichend hydrophob, um sich gut in der Membran zu verteilen. Die aktuelle Membrankonzentration dieser Substanzen wird also relativ hoch sein.

Im Zusammenhang mit der Isolierung lösungsmittelresistenter Bakterien für Biotransformationen in organisch/wäßrigen Zweiphasensystemen wurden verschiedene Faktoren nachgewiesen und diskutiert, die zu einer Resistenz gegen hydrophobe Verbindungen beitragen.

- Eine Isomerase katalysiert die (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung von Fettsäureresten der Phospholipide in der Cytoplasmamembran. Die Änderung von der gebogenen (*Z*)-Form zur linearen (*E*)-Form bewirkt eine dichtere Packung der Membran dadurch eine Anpassung der Fluidität. Die Isomerase ist nicht energieabhängig und wahrscheinlich in der Cytoplasmamembran oder im periplasmatischen Raum lokalisiert. Damit ist eine schnelle Reaktion auf eintretende Veränderungen möglich [15, 113].
- Bei *P. putida* wurde die Ausschleusung von Toluol durch energieabhängigen, aktiven Transport nachgewiesen. Ein enger Zusammenhang mit Antibiotika-Resistenzen konnte gezeigt werden, so daß es wahrscheinlich ist, daß nur eine einziges Multi-Drug-System für beide Prozesse verantwortlich ist [114].
- Der Transfer von hydrophoben Molekülen durch die äußere Membran wird durch eine Erhöhung der Hydrophilie ihrer Lipopolysaccharid-Zusammensetzung gebremst [15].

P. fluorescens NCIMB 11671 kann (-)- α -Pinenoxid in einem wäßrig-organischen Zweiphasensystem mit 50 % Hexadecan transformieren [115]. Die aus den eigenen Transformationsexperimenten ermittelte kritische Terpenoid-Konzentration von ca. 3 g L^{-1} (Abschnitt 2.1.5) liegt in einem ähnlichen Bereich wie die maximale Produktkonzentration aus einer vergleichbaren Transformation von Limonen zu Perillasäure mit lösungsmittelresistentem *P. putida* [116]. Außerdem wurden für *P. fluorescens* eine Reihe von Antibiotika-Resistenzen nachgewiesen [69]. *P. fluorescens* ist damit ebenfalls als lösungsmittelresistentes Bakterium einzustufen und verfügt wahrscheinlich über einen oder mehrere der genannten Mechanismen.

3.4.1.3 Mikrobieller Produktabbau

α -Pinen-transformierende Bakterien sind vielfach in der Lage, ihr Substrat als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen und zu Kohlendioxid und Wasser zu oxidieren. (s. Abschnitt 3.2.1). Auch *P. fluorescens* baute Novalal innerhalb von zwei Tagen vollständig ab (s. Abschnitt 2.1.4.5). Die Produktion von Intermediaten in hohen Ausbeuten erfordert deshalb Maßnahmen, die den Katabolismus verlangsamen oder ganz verhindern. Hierzu gibt es verschiedene Möglichkeiten:

- Durch **Variation der Wachstums- bzw. Transformationsbedingungen** kann beispielsweise die Induktion bestimmter Enzymsysteme unterdrückt werden [20]. Die Addition eines leicht metabolisierbaren Co-Substrats kann den Abbau des Produkts verlangsamen [116].
- Die Addition von **Inhibitoren** ermöglicht eine gezielte Blockierung bestimmter Enzyme [9].
- Durch **Mutation** kann die Biosynthese von Enzymen auf genetischer Ebene verhindert werden [20].
- Die Herstellung eines **Enzymextrakts** kann zur Zerstörung komplexer Enzymsysteme führen (z. B. Monooxygenasen, Enzyme der β -Oxidation) [13, 89].
- Durch **in situ Adsorption/Extraktion** kann das Produkt direkt nach der Entstehung aus dem Transformationsmedium entfernt werden (s. Abschnitt 3.4.2).

3.4.1.3 Chemische Nebenreaktionen im Transformationsmedium

Terpene und Terpenoide sind in wässrigen Lösungen oft nicht stabil. Sie reagieren mit Wasser oder mit Luftsauerstoff. Angriffspunkte werden durch Doppelbindungen und Oxyfunktionalitäten gebildet. Es entstehen hydratisierte Produkte, (*Z*)/(*E*)-Isomere, Polymere, Umlagerungs- und Oxidationsprodukte. Diese Nebenreaktionen werden durch saure oder alkalische Medien gefördert und können oft schon durch pH-Regulierung in den neutralen Bereich kontrolliert werden.

Epoxide gehören mit zu den labilsten Terpenoiden. Die hohe Ringspannung im Oxiranring sorgt für eine beschleunigte Ringöffnung im sauren Milieu. Bei (β)- α -

Pinenoxid entstehen schon bei pH 7,1 die Umlagerungsprodukte Campholenaldehyd, (*E*)-Sobrerol (*Z*)- und (*E*)-Carveol (s. Abschnitt 2.1.4.1). Aufgrund der hohen Umsatzrate der Pinenoxid-Lyase spielten diese Produkte während der Transformation mit *P. fluorescens* bei pH 7,5 jedoch keine Rolle.

Abhängig von den funktionellen Gruppen von Terpenoiden sind vor allem in komplexen Medien weitere chemische Nebenreaktionen denkbar. Gerade Aldehyde sind reaktive Substanzen, die zur Disproportionierung und zur Bildung von Schiff'sche Basen oder Acetalen mit weiteren Medienbestandteilen neigen.

Das Primärprodukt aus der Transformation von (-)- α -Pinenoxid Isonovalal ist in neutralen wäßrigen Lösungen stabil. Mit zunehmender Acidität oder Alkalität des Mediums trat jedoch eine (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung der α,β -Doppelbindung auf. Diese Isomerisierung war in komplexen Medien auch bei neutralem pH-Wert zu beobachten und wurde von der Konjugation der zweiten Doppelbindung und einem Produktverlust begleitet. Ohne die dabei entstehenden Substanzen zu kennen, konnte davon ausgegangen werden, daß mindestens eine der oben genannten Reaktionen hierfür verantwortlich war (s. Abschnitt 2.1.3).

3.4.2 Optimierungsansätze für die Produktion von Isonovalal

Die Bildung von Isonovalal aus (-)- α -Pinenoxid wird durch eine Pinenoxid-Lyase katalysiert, die keine Energie oder Co-Faktoren benötigt (s. Abschnitt 3.2.4.2). Die Pinenoxid-Lyase von *P. fluorescens* befindet sich im Cytoplasma [11]. Limitierender Faktor für die Umsetzung ist damit der Transfer des Substrats durch die Cytoplasmamembran. Außerdem muß die Oxidation zu den weiteren Transformationsprodukten verhindert werden.

Die einfachste Möglichkeit, beide Probleme zu umgehen, ist die Durchführung der Umsetzung mit einem **Enzymrohextrat** aus *P. fluorescens*. Diese Methode wurde in einer Patentanmeldung beschrieben [12]. Dabei wurden 150 mg L^{-1} (-)- α -Pinenoxid zu Novalal umgesetzt. Die Ausbeute war nicht angegeben. Der Umsatz liegt hier weit unter den in den eigenen Versuchen erzielten Werten (Tabelle 3-7). Ursachen hierfür waren möglicherweise eine teilweise Zerstörung des Enzyms bei

der Gewinnung des Rohextrakts oder die Bildung der Umlagerungsprodukte aus (-)- α -Pinenoxid bei höherer Substratdosierung.

Tabelle 3-7 Vergleich der Methoden zur Gewinnung von Isonovalal mit ruhenden Zellen von *P. fluorescens*

	Zweiphasen- system Hexadecan [115]	Zweiphasen- system Lewatit	Kontinuierliche Substrat- dosierung
Pinenoxid-Umsatz	55 g L ⁻¹	90 g L ⁻¹	80 g L ⁻¹
Ausbeute Aldehyde	57 %	66 %	63 %
Verhältnis Isonovalal/Novalal	2:1	14:1	27:1
Transformationszeit	24 h	5 h	5 h

Eine hohe Substratdosierung ohne die Gefahr der säurekatalysierten Umlagerung von (-)- α -Pinenoxid und gleichzeitiger *in situ* Extraktion des Produkts war in einem **Zweiphasensystem mit Hexadecan** und ruhenden Zellen von *P. fluorescens* (OD₆₀₀ = 10) im Verhältnis 1:1 (v/v) möglich [115]. Dabei konnten 30 g L⁻¹ Aldehyde gewonnen werden. Das hierfür eingesetzte (-)- α -Pinenoxid (80 g L⁻¹ in der Hexadecan-Phase) wurde jedoch innerhalb von 24 h nicht vollständig umgesetzt (s. Tabelle 3-7). Außerdem war das Ausmaß der (*Z*)-(*E*)-Isomerisierung relativ hoch. Die Aldehyd-Ausbeute belief sich auf 57 % bezogen auf das umgesetzte (-)- α -Pinenoxid. Da hier ruhende, stoffwechselaktive Zellen eingesetzt wurden, war mit einem bedeutenden Verlust durch katabolen Abbau der Aldehyde zu rechnen. Den Hauptteil des Verlusts dürften jedoch Nebenprodukte aus der Reaktion mit Medienbestandteilen ausgemacht haben. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Bildung neuer Nebenprodukte durch Metabolisierung von Hexadecan [23].

Ein **Zweiphasensystem mit einer festen Phase** bietet mehrere Vorteile. Die feste Phase (PS-DVB) unterliegt keinem bakteriellen Abbau. Die Abtrennung der Phase ist zudem einfach durch Filtration möglich. Die gebundenen Metabolite können mit einem leicht flüchtigen Lösungsmittel eluiert und mit vergleichsweise geringem Energieaufwand destillativ gewonnen werden. Die Vorteile des flüssig/flüssig-Systems bleiben dabei erhalten. Durch Einsatz eines Zweiphasensystems, das in der Bakteriensuspension (OD₆₀₀ = 10) 20 % (w/v) Lewatit OC 1064 enthielt, konnten

90 g L⁻¹ (-)- α -Pinenoxid innerhalb von fünf Stunden vollständig zu Isonovalal und Novalal im Verhältnis 14:1 umgesetzt werden. Die Ausbeute wurde auf 66 % gesteigert.

Einen weiteren Ansatz zur Vermeidung der Entstehung von Umlagerungsprodukten aus (-)- α -Pinenoxid bietet eine **kontinuierliche Substratzuführung**, die möglichst in gleicher Geschwindigkeit wie die Umsetzung erfolgen sollte. Bei der Dosierung von 15 mL L⁻¹ h⁻¹ (-)- α -Pinenoxid in 20-minütigen Intervallen konnte nach fünf Stunden die Bildung von Isonovalal und Novalal im Verhältnis 27:1 in einer Ausbeute von 63 % erreicht werden. Die etwas geringere Ausbeute im Vergleich zum Zweiphasensystem könnte in erhöhten Verlusten über die Gasphase und Reaktionen mit Medienbestandteilen begründet sein (s. Abschnitt 2.1.3.3.1), da hier keine *in situ* Abtrennung erfolgte.

Die hohen Produktausbeuten sind als direkte Folge der Schädigung der Cytoplasmambran der Zellen anzusehen (s. Abschnitt 2.1.5.1.2). Bei der folgenden Zellysis wurde einerseits Pinenoxid-Lyase ins Medium freigesetzt, die (-)- α -Pinenoxid zu Isonovalal umsetzte. Andererseits war der bakterielle Abbau der Aldehyde nicht mehr möglich. Die Auflösung der Cytoplasmamembran wird durch hohe Terpenoid-Konzentrationen verursacht [110]. Durch die zusätzliche Schädigung der Membranen durch einen vorgeschalteten Einfrier- und Auftau-Prozeß (s. Abschnitt 2.1.5.2) lag in den Versuchen wahrscheinlich bereits ein Teil der Zellen lysiert vor. Dadurch wurde das unmittelbare Einsetzen der Transformation bei kontinuierlicher Substratdosierung und im Zweiphasensystem mit Lewatit möglich. Durch sukzessive Steigerung der Terpenoid-Konzentration stieg in der Folge auch der Anteil lysierter Zellen schnell weiter. Die dadurch erreichte hohe Konzentration aktiver Pinenoxid-Lyase im Medium könnte dann für die außergewöhnlich schnelle Umsetzung großer Volumina (-)- α -Pinenoxid verantwortlich gewesen sein. Eine Vorschädigung der Zellen hätte sicherlich auch im flüssig/flüssig-Zweiphasensystem zu einer beschleunigten und effektiveren Produktbildung geführt.

3.4.3 Optimierungsansätze für die Produktion von Novalol

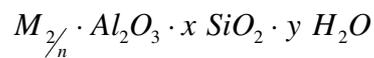
Für die Bildung von Novalol aus (-)- α -Pinenoxid sind neben einer aktiven Pinenoxid-Lyase zwei weitere Transformationsschritte erforderlich. Die (Z)-(E)-Isomerisierung von Isonovalal zu Novalal erfolgt zumindest teilweise durch chemische Katalyse (s. Abschnitt 2.1.3). Für die Reduktion von Novalal zu Novalol ist NADH als Co-Faktor erforderlich [12].

Es wurde gezeigt, daß Sauerstoffmangel die Voraussetzung für eine Akkumulation von Novalol durch ruhende Zellen von *P. fluorescens* ist (s. Abschnitte 2.1.4.5 und 2.1.5.2), da eine endogene Addition von NADH zur Zellsuspension allein nicht genügte, um die Reduktion von Novalal zu Novalol zu erreichen. Die Aufrechterhaltung des Biosystems und möglicher darin enthaltenen Kontrollmechanismen ist damit für die Entstehung von Novalol essentiell.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Optimum der Novalol-Bildung unter Sauerstoffmangel bei einer Substratdosis von $3,6 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt (s. Abschnitt 2.1.5.2). Die Ausbeute lag bei maximal 32 % des eingesetzten (-)- α -Pinenoxids ($1,2 \text{ g L}^{-1}$ Novalol). Eine Umsatzsteigerung sowie eine Erhöhung der Ausbeute dürfte hier durch *in-situ* Adsorption und/oder NADH-Zusatz unter Sauerstoffmangel noch möglich sein. Die Bildung von Novalol als einziges Produkt ist wahrscheinlich nur nach Isolierung der Alkohol-Dehydrogenase zu erreichen und erfordert dann die Addition von NADH [12].

3.5 Zur *in situ* Adsorption: Struktur von Zeolithen

Zeolithe sind poröse, kristalline Aluminosilicate. Ihre Primärstruktur wird aus SiO_4 - und AlO_4 -Tetraedern gebildet, die zu definierten dreidimensionalen Raumnetzstrukturen zusammengesetzt sind [117]. Zeolithe lassen sich repräsentativ mit der folgenden empirischen Formel beschreiben [19]:



M: Kation aus Gruppe I oder II des PSE

n: Valenz des Kations

Jedes Aluminium bringt eine negative Ladung in das Kristallgitter ein, die durch ein relativ leicht bewegliches, austauschbares Kation ausgeglichen wird. Das Modul des Zeolithen beschreibt das Verhältnis von Silicium und Aluminium und ist somit ein Maß für seine hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften. Mit steigendem Aluminiumgehalt (abnehmendes Modul) wächst die Anzahl der negativen Ladungen im Kristallgitter und damit steigt die Hydrophilie des Zeolithen. Das Modul von Zeolithen wird jedoch niemals kleiner als eins, da zwei AlO_4 -Tetraeder aufgrund einer zu hohen negativen Ladungsdichte nie benachbart auftreten können (Löwenstein-Regel) [118]. Ab einem Modul von etwa 8–10 spricht man von hydrophoben Zeolithen [117].

Bis 1992 wurden mindestens 34 natürliche und 85 synthetische Zeolithe identifiziert und klassifiziert [46]. Die für diese Arbeit relevanten Strukturen werden im folgenden näher beschrieben.

3.5.1 Faujasit-Gerüst

Faujasite sind natürliche Zeolithe, werden aber auch synthetisch hergestellt. Die Kristallstruktur der Faujasite wird durch eine kubooktaedrischen Verknüpfung der T-Atome (Si oder Al) geprägt, die über die eine Hälfte ihrer Sechsringe eine Diamantstruktur bilden [119, 120] (Abb. 3-21). Diese Anordnung läßt zwischen den Kubooktaedern große Hohlräume von 0,13 nm Durchmesser frei. Die Porenöffnungen werden aus 12-gliedrigen Sauerstoff-Ringen mit einem Durchmesser von 0,74 nm gebildet [46, 121]. Die Einheitszelle des Faujasits besteht aus 192 TO_4 -Einheiten. Faujasite haben mit 53 % das größte freie Volumen aller Zeolithe.

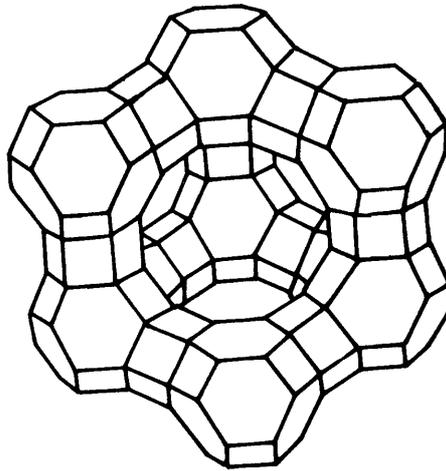


Abb. 3-21 Dreidimensionale Porenstruktur von Faujasiten: T-Atome (Si oder Al) befinden sich an den Kreuzungspunkten, Sauerstoffatome sind etwa in der Mitte zwischen zwei T-Atomen lokalisiert [122]

Zur Gruppe der Faujasite gehören die synthetischen Zeolithe X und Y. Sie unterscheiden sich nur in ihrem Aluminiumgehalt. Module $< 1,5$ werden als Zeolith X und Module von $1,5 - 3,0$ als Zeolith Y bezeichnet [117]. Durch Dealuminierung sind höhere Module von Zeolith Y erhältlich, die auch eine höhere thermische Stabilität aufweisen. Daher resultieren die Bezeichnungen DAY (dealuminiert) oder USY (ultrastable).

3.5.2 MFI-Gerüst

Der Zeolith ZSM-5 ist ein synthetischer Zeolith [123] und gehört zur Gruppe der Pentasile. Seine Kristallstruktur wird unter dem Kürzel MFI klassifiziert [46]. Der kleinste Baustein des MFI-Netzwerks ist ein Polyeder aus 5 T-Ringen, den Pentasileinheiten (Abb. 3-22 (1)). Durch Verknüpfung dieser Einheiten entsteht ein System aus parallel verlaufenden Kanälen mit nahezu rundem Querschnitt (0,56 x 0,53 nm), die durch 10-gliedrige Sauerstoffringe begrenzt sind. Diese werden von sinusförmig verlaufenden, elliptischen 10-Ring-Kanälen mit den Abmessungen 0,55 x 0,51 nm geschnitten und so zu einem zweidimensionalen System verbunden [46, 124, 125] (Abb. 3-22 (2)).

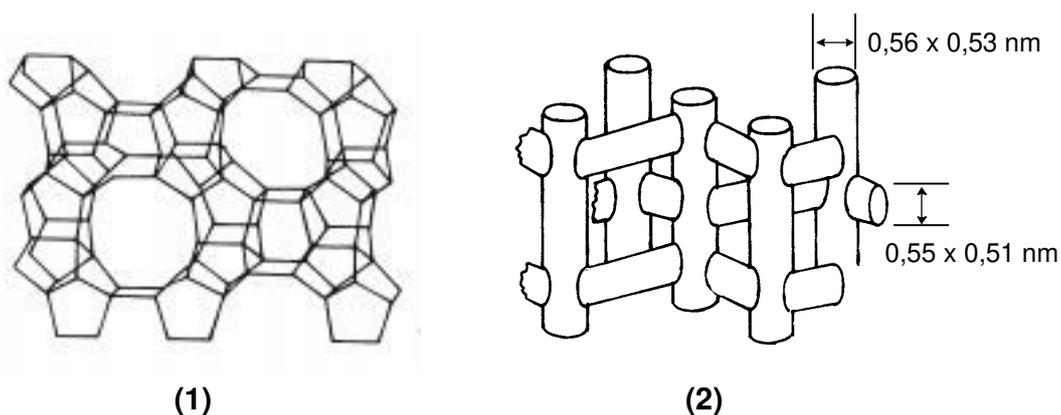


Abb. 3-22 Struktur von ZSM-5: (1) Verknüpfte Pentasileinheiten (Blick in die geraden Kanäle), (2) Zweidimensionales Kanalsystem

Eine Elementarzelle besteht aus 96 TO_4 -Einheiten. Die Zusammensetzung der wasserfreien Elementarzelle in der H-Form ist $\text{H}_n \text{Al}_n \text{Si}_{96-n} \text{O}_{192}$ mit $n \leq 27$ [46]. Das freie Volumen beträgt 32 %.

Handelsübliche ZSM-5 Zeolithe sind durch ihren Siliciumreichtum gekennzeichnet (Module ≥ 27). Als Silicalite bezeichnet man die Siliciumdioxid-Modifikation gleicher Struktur, die Aluminium nur noch als Verunreinigung enthält.

3.6 Herstellung und katalytische Eigenschaften der Zeolithe

3.6.1 Hydrothermalsynthese

Natürliche Zeolithe sind vor allem in Sedimentgesteinen vulkanischen Ursprungs zu finden. Die geologischen Entstehungsbedingungen sind durch hohe Temperaturen und Drücke gekennzeichnet [118]. Die Synthese im Labormaßstab kann als Simulation der natürlichen Bedingungen verstanden werden. Hierfür werden aus alkalischen Aluminat- und Silicat-haltigen Lösungen Gele erzeugt und hydrothermalen Bedingungen ausgesetzt. Die Wahl der Parameter entscheidet, welcher Zeolithtyp kristallisiert [126]. Da die Variationsmöglichkeiten im Labor nicht durch geologische Faktoren begrenzt sind, konnte eine Vielzahl neuer synthetischer Zeolithstrukturen erzeugt werden. Zudem wurden durch Addition von Schablonenverbindungen (Templaten) neue strukturdirigierende Effekte erzielt. Ein bedeutendes Beispiel hierfür ist die Synthese von ZSM-5 in Anwesenheit von organischen Kationen (z. B. Tetrapropylammonium) [122].

3.6.2 Dealuminierung von Zeolithen

Während ZSM-5 Zeolithe in einem breiten Modulbereich synthetisiert werden können [127], ist für Herstellung hydrophober Y-Zeolithe eine postsynthetischer Dealuminierungsschritt erforderlich.

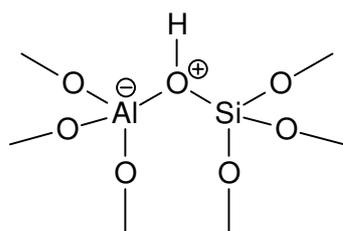
Aluminium kann durch Behandlung mit Wasserdampf bei 350 - 850 °C („steaming“) aus dem Zeolithgitter herausgelöst werden. Dabei entstehen zunächst Silanol-ester, die aber zum Teil durch Si-Atome aus amorpher Kieselsäure ersetzt werden. Das aus dem Gerüst entfernte Aluminium lagert sich in den Poren als amorphes Aluminiumoxid ab und kann in größeren Mengen zur Blockierung von Kanälen führen. Eine teilweise Entfernung ist durch milde Säurebehandlung möglich.

Eine schonendere Methode ist die Dealuminierung mit SiCl_4 . Dabei wird herausgelöstes Al sofort durch Si ersetzt [128].

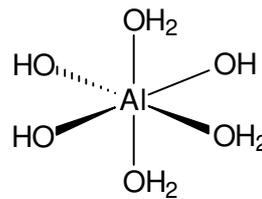
Alternative Verfahren beruhen auf dem Einsatz von $(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6$, verdünnten Säuren oder Komplexbildnern wie EDTA [129].

3.6.3 Katalytische Eigenschaften

Zeolithen kommt eine große Bedeutung in weiten Bereichen der chemischen Katalyse zu. Ihre besonderen katalytischen Eigenschaften verdanken sie ihrem definierten Gerüstaufbau und ihrer hohen Acidität, welche bei vergleichbaren amorphen Substanzen nicht zu finden ist.



Brønsted-acides Zentrum



Lewis-acides Zentrum

Abb. 3-23 Katalytisch aktive saure Zentren in Zeolithen

In Zeolithen konnten zwei verschiedene katalytisch aktive saure Zentren nachgewiesen werden (Abb. 3-23). Das tetraedrisch koordinierte Gerüstaluminium bildet ein Brønsted-aktives Zentrum. Nicht-Gerüstaluminium in oktaedrischer Koordination bildet Lewis-acide Zentren. Sie entstehen bei Dealuminierungsprozessen (s. o.).

Zeolithkatalysatoren finden auch für Terpententransformationen Verwendung.

Die selektive Gewinnung von Campholenaldehyd aus α -Pinenoxid konnte durch heterogene Katalyse mit DAY (Modul > 70) schon bei Temperaturen unter 0 °C erreicht werden. Verantwortlich hierfür sind Lewis-acide Zentren. Das Produkt wird für die Synthese von Duftstoffen des Sandelholztyps benötigt [129].

Die Behandlung von Anis-Öl mit Zeolith Y bei 60 °C und 90 °C führte zur Isomerisierung von Doppelbindungen und Dimerisierungen beim Anethol [43].

ZSM-5 wurde für einen Einsatz als Katalysator bei Crack-Prozessen für die Benzinherstellung aus Methanol entwickelt (MTG-Prozeß) [121, 123]. Ebenso gelangen Crack-Reaktionen aus Biomasse [130]. Die katalytische Transformation des sesquiterpenhaltigen Copaiba-Öls über ZSM-5 im Sinne eines Crack-Prozesses bei 325 °C wurde im Hinblick auf eine Gewinnung von Treibstoff aus nachwachsenden Rohstoffen untersucht [131].

3.7 Eignung und Bedeutung von Zeolithen als Adsorbentien

3.7.1 Eignung von Zeolithen als Adsorbentien

Die Adsorption der Reaktanten und ihre Diffusion zu den katalytisch wirksamen Zentren ist die Voraussetzung für den Einsatz von Zeolithen als Katalysatoren. Sie führte zu weitreichenden Untersuchungen der Adsorptionskapazität, -selektivität und -kinetik in Zeolithen [129, 132]. Durch neue Entwicklungen in der Zeolithsynthese oder geeignete postsynthetische Maßnahmen (Dealuminierung, Säurebehandlung, Ionenaustausch, s. Abschnitt 3.6.2) ist es möglich, den katalytischen Eigenschaften der Zeolithe entgegenzuwirken und damit ihre Nutzung als Adsorbentien zu ermöglichen [133].

3.7.1.1 Molekularsiebeffekt

Ebenso wie für die chemische Katalyse verdanken Zeolithe ihre charakteristischen Eigenschaften als Adsorbentien ihrer definierten Raumstruktur. Die Größe und Form der Porenöffnungen entscheidet, ob ein potentiell adsorptives Molekül Zutritt zu den im Inneren des Kristalls befindlichen Adsorptionsplätzen erhält. So wird über die bei mesoporösen Materialien entscheidende Affinität zwischen Adsorptiv und

Adsorbens hinaus ein zusätzliches Selektionskriterium geschaffen, das als Molekularsiebeffekt bekannt ist.

Tabelle 3-8 Strukturrelevante Daten der Zeolithe A, Y und ZSM-5 [46, 118, 122]

	Zeolith A	ZSM-5	Zeolith Y
Relatives Porenvolumen [cm ³ (H ₂ O) cm ⁻³ (Kristall)]	0,47	0,32	0,53
Netzwerkdichte [nm ⁻³]	12,9 T	17,9 T	12,7 T
Ringgröße (Sauerstoff)	8	10	12
Porendurchmesser [nm]	0,41	0,54 x 0,56 0,51 x 0,55	0,74
Dimensionalität des Porensystems	3	2	3

Die Form und der Durchmesser der Porenöffnungen werden von fünf Faktoren bestimmt:

- Konfiguration der T- und O-Atome zueinander
- Modul (Si/Al-Verhältnis)
- Größe des Kations
- Position des Kations im Hohlraum
- Temperatur

Prinzipiell besteht durch Variation dieser Faktoren die Möglichkeit, die Größe des Porendurchmessers gezielt zu beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist Zeolith A, der nach Austausch des Kations als Molekularsieb 3Å (K⁺), 4Å (Na⁺) und 5Å (Ca²⁺) erhältlich ist [134]. Bei den Zeolithen ZSM-5 und DAY ist eine relativ große Strukturflexibilität gegeben, die sich auch auf die Größe der Porenöffnungen auswirkt. Bei ZSM-5 ist eine Erweiterung der theoretischen Porendurchmesser (s. Tabelle 3-8) auf bis zu 0,63 nm möglich, bei DAY können bis zu 0,80 nm erreicht werden [122].

3.7.1.2 Adsorptive Wechselwirkungen

Adsorptionsphänomene werden entscheidend von den besonderen Eigenschaften der Grenzfläche und der sie bildenden Teilchen bestimmt. Diese Grenzflächen enthalten aktive, energiereiche Zentren, die aufgrund ihrer elektronischen und räumlichen Eigenschaften Wechselwirkungen mit den Inhaltsstoffen benachbarter flüssiger oder gasförmiger Phasen (Adsorptive) eingehen. So können beträchtliche Anreicherungseffekte erzielt werden [135].

Da die Adsorption an eine Feststoffoberfläche ein spontan ablaufender Vorgang ist, trägt die Freie Gibbs-Enthalpie ΔG des Systems ein negatives Vorzeichen.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

Adsorptionsprozesse aus der Gasphase werden in der Regel von einem Entropieverlust begleitet, da durch den Adsorptionsvorgang ein Zustand höherer Ordnung erreicht wird.

Für alle Adsorptionsprozesse aus flüssigen Phasen bildet die Solvatationsenergie, die beim Lösen des Adsorptivs im Lösungsmittel frei wurde, in der Regel einen positiven Energiebeitrag. Die Adsorption organischer Verbindungen aus der wäßrigen Phase bildet jedoch eine Ausnahme. Die Lösung weitgehend unpolarer Moleküle in Wasser erfordert eine hohe Ordnung der das Molekül umgebenden Wassermoleküle. Dieser Zustand niedriger Entropie wird bei einer Adsorption des organischen Moleküls an eine unpolare Phase aufgehoben und trägt damit zu einer Erhöhung des Betrags der Freien Enthalpie bei [136].

Der eigentliche Gewinn von Adsorptionsenergie ist in der Ausbildung von Adsorptiv-Adsorbens-Wechselwirkungen begründet. Bei der Entstehung von ionischen und kovalenten Bindungen spricht man von Chemisorption. Dabei werden Energien $> 50 \text{ kJ mol}^{-1}$ frei. Die bei der Physisorption freiwerdenden Adsorptionswärmen liegen im Bereich von $\sim 20 \text{ kJ mol}^{-1}$ und sind auf van-der-Waals-Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen. Auf diesen Wechselwirkungen beruht die Affinität eines Adsorptivs zu einem Adsorbens. Die Adsorption ist somit in jedem Fall ein exothermer Prozeß [136].

Bei vielen Zeolithen ist der Grad der Hydrophobizität während der Synthese oder durch einen nachfolgenden Dealuminierungsprozeß in einem weiten Bereich einstellbar. Während siliciumreiche, hydrophobe Zeolithe van-der-Waals-Wechselwirkungen mit unpolaren Adsorptiven ausbilden, sind aluminiumreiche Zeolithe aufgrund der Einführung einer negativen Ladung in das Kristallgerüst zur Ausbildung von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und ionischen Bindungen befähigt. Damit ist eine individuelle Anpassung der zu erwartenden Wechselwirkungen an das bestehende Trennproblem grundsätzlich möglich.

Die meisten Adsorptionsprozesse mit Zeolithen aus flüssigen Phasen beruhen deshalb auf einem der drei folgenden Systeme:

- Aluminiumreiche Zeolithe in einer kationischen Form für Adsorptionsprozesse aus organischer Lösung
- Aluminiumreiche Zeolithe in der H-Form für Ionenaustauschprozesse aus wäßriger Lösung
- Siliciumreiche, hydrophobe Zeolithe für die Adsorption unpolarer Verbindungen aus wäßriger Lösung

3.7.2 Anwendungen von Zeolithen in Adsorptionsprozessen aus flüssigen Phasen

3.7.2.1 Adsorption aus organischen Lösungen

Zur Trennung von Lösungsmittelgemischen an Zeolithen wurden bereits eine Reihe von Verfahren für den großtechnischen Maßstab entwickelt. Unter dem Überbegriff „UOP Sorbex“ wurden mehrere Trennprozesse patentiert. Hierzu zählt die Trennung von Olefinen und Paraffinen („Olex“) an Zeolith CaX, die durch Wechselwirkungen der π -Elektronen mit Ca^{2+} bewirkt wird [137]. Die Adsorption von Benzen aus Heptan an NaY beruht auf dem gleichen Prinzip [138].

Die Trennungen von linearen Alkanen von verzweigten Alkanen und Cycloalkanen an Zeolith A („Molex“) sowie von ortho- para- und meta-substituierten Cresolen („Cresex“), Cymenen („Cymex“), Xylenen („Parex“) und Diethylbenzenen („Debex“) an Zeolith X oder Y [137] sind hauptsächlich auf Molekularsiebeffekte zurückzuführen.

Die Fraktionierung der substituierten, aromatischen Kohlenwasserstoffe gelingt auch an NaZSM-5. Hohe Trennfaktoren wurden vor allem für die Abtrennung von ortho- und meta-Xylen von mono- und para-substituierten Benzolen erreicht [139].

Die aus dem Laborbereich bekannteste Anwendung zeolithischer Molekularsiebe ist die Trocknung von Lösungsmitteln mit Zeolith A in der K- oder Na-Form [140].

Weiterhin wurden vereinzelte Anwendungsmöglichkeiten für die Trennung von Lipiden untersucht. Hierzu gehörte die Entfernung von Fettsäuren aus Pflanzenölen mit Zeolith Y [141]. Darüber hinaus konnten Fettsäuremethylester von Harzsäuren an Zeolith X aus verschiedenen Lösungsmitteln abgetrennt werden [142].

3.7.2.2 Adsorption aus wäßrigen Lösungen

3.7.2.2.1 Ionenaustauschprozesse

Aluminiumreiche Zeolithe sind als Kationenaustauscher wirksam. Die Austauschkapazität steigt dabei mit zunehmender Anzahl von Gerüstaluminium, also mit abnehmendem Modul.

Der aluminiumreiche Zeolith A besitzt eine besonders hohe Affinität zu Ca^{2+} -Ionen, die mit steigender Temperatur zunimmt [121]. Daraus entstand der wirtschaftlich bedeutendste Einsatzbereich für Zeolithe mit einem Produktionsumfang von mehreren hunderttausend Tonnen jährlich. Aufgrund der zunehmenden Eutrophierung der Gewässer wurde Phosphat, das zur Komplexierung zweiwertiger Metallionen Waschmitteln zugesetzt wurde, durch Zeolith A ersetzt und ist inzwischen in praktisch allen Waschmitteln enthalten.

In fermentativen Prozessen konnten Zeolithe erfolgreich für die adsorptive Gewinnung von Aminosäuren eingesetzt werden [143, 144]. Die Adsorption beruht ebenfalls auf Ionenaustauschprozessen. Sie gelingt nur unterhalb des

isoelektrischen Punktes der jeweiligen Aminosäure, wenn die Säure- und Aminofunktion überwiegend protoniert vorliegen. Die Desorption ist durch Erhöhung des pH-Wertes möglich. Einwertige Kationen besetzen Ionenaustauschplätze und zeigen damit einen negativen Einfluß auf die Adsorptionskapazität vor allem bei niedermolekularen Aminosäuren. An ZSM-5 45 konnte die Trennung der konstitutionsisomeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin erreicht werden. Tryptophan wurde an ZSM-5 28 von Phenylalanin und Tyrosin getrennt.

Eine weitere Anwendung in einem fermentativen Prozeß stellt die Kontrolle der Ammoniumionenkonzentration durch Ionenaustausch an Zeolith NaY während der Gewinnung von α -Amylase mit *Bacillus amyloliquefaciens* dar [145].

3.7.2.2.2 Adsorption organischer Verbindungen

Umweltschutz und Trinkwasseraufbereitung

Obwohl bereits eine Vielzahl hydrophober Zeolithe als Adsorbentien kommerziell erhältlich sind, finden sie im Vergleich zu Polystyrenharzen oder Aktivkohlen zur adsorptiven Wasserreinigung nur wenig Verwendung. Die Ursache ist darin zu suchen, daß hier häufig möglichst breite Selektivitäten und hohe Kapazitäten gefordert sind, die Zeolithe naturgemäß nicht in vergleichbarem Maße besitzen. Die Tabelle 3-9 sind einige richtungsweisende Untersuchungen zusammengefaßt.

Tabelle 3-9 Einsatz von Zeolithen zur Adsorption organischer Verbindungen aus wäßriger Lösung im Umweltschutz und bei der Trinkwasseraufbereitung

Adsorptiv	Zeolith	Referenz
Aldehyde und Ketone (C ₁ bis C ₆)	Silicalite	[145]
Atrazin	ZSM-5, Zeolith Y	[147]
Butylacetat und Herbizide	TSVK-XIa 58	[148]
Geosmin und Methylisoborneol	USY	[149]
Natriumdodecylsulfat	ZSM-5, DAY	[150]
Phenol, Cresole, Benzylalkohol	Silicalite, ZSM-5 38	[151]
Trihalomethane	Silicalite	[152, 153]

Biotechnologie

Die biotechnologische Gewinnung von organischen Wertstoffen bietet ein weiteres breites Feld möglicher Anwendungen für hydrophobe Adsorbentien. Unter den Gesichtspunkten der *in situ* Adsorption der Produkte und der selektiven Edukt-Produkt-Trennung mit Zeolithen sind bisher aber nur wenige Prozesse betrachtet worden.

Sehr ausführlich und erfolgreich untersucht wurde der Einsatz von Zeolith ZSM-5 für die fermentative Gewinnung von Ethanol [154 - 157]. Hier stand eine *in situ* Abtrennung des für die Hefen in hohen Konzentrationen toxischen Produkts und damit eine Erhöhung der Ausbeute im Vordergrund. Das Porensystem von hydrophobem ZSM-5 ist für das Edukt Glucose nicht zugänglich [158].

Ein weiterer fermentativer Prozeß ist die Gewinnung von Propan-1,3-diol aus Glycerol. Aus wäßriger Lösung können Produkt und Edukt an Zeolith CaNaY getrennt werden. Jedoch wird das Edukt (Glycerol) adsorbiert, so daß keine *in situ* Adsorption möglich ist [159].

Die Trennung von Invertzucker in die Bestandteile Glucose und Fructose ist aufgrund der unterschiedlichen Süßkraft der Monosaccharide von wirtschaftlicher Bedeutung. Die Adsorption von Monosacchariden und Polyolen aus wäßrigen Lösungen an die Zeolite X und Y ist systematisch in Abhängigkeit von verschiedenen Kationen untersucht worden. Es wurden starke Wechselwirkungen von D-Fructose mit Zeolith-gebundenen Ca^{2+} -Ionen festgestellt, die bei D-Glucose nicht bestanden [160 - 165]. Dieser Trenneffekt wurde für eine technische Anwendung („UOP Sarex“) weiterentwickelt [137].

Die Anwendung von Zeolith Y zur adsorptiven Gewinnung von Aromastoffen aus Fermentationslösungen wurde bisher erst einmal im Zuge einer breit angelegten Untersuchung hydrophober Adsorbentien [16] in Betracht gezogen. Die allgemeine Eignung von DAY 200 als hydrophobes Adsorbens konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden (Tabelle 2-23). Selektive Trenneigenschaften waren für Aromastoffe (Tabelle 2-22) aufgrund des großen Porendurchmessers (0,74 nm) jedoch nicht erzielbar.

Die Adsorption von Aromastoffen aus einer Modellmischung an Zeolith ZSM-5 ergab jedoch deutliche Trenneffekte hinsichtlich der Molekülgestalt der Adsorptive (Tabelle 2-24), auf die im weiteren im Detail eingegangen wird.

3.8 Trennung von Aromastoffen aus wäßriger Lösung an Zeolith ZSM-5

3.8.1 Thermodynamische Adsorptionseigenschaften

3.8.1.1 Molekülgröße und Maximalbeladung

Kapazität

Die Kapazität von ZSM-5 ist durch seine definierte Hohlraumstruktur limitiert. Sein Porenvolumen kann über eine Stickstoff-Isotherme bestimmt werden und beträgt für Silicalite $0,19 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ [123, 166]. Die Adsorption ist als Porenfüllprozeß zu verstehen [167]. Stellt man sich nun dieses Porenvolumen als einen unverzweigten Hohlraum, z. B. als Kugel vor, so ergibt sich eine maximal mögliche Beladung von 190 mg g^{-1} für eine Flüssigkeit der Dichte 1 g cm^{-3} . Die theoretische Kapazität ist damit im Vergleich zu hochporösen organischen Adsorbentien (bis zu 1000 mg g^{-1}) und Zeolith DAY (bis zu 300 mg g^{-1}) relativ gering.

Die theoretische Maximalbeladung wird jedoch auch bei der Adsorption von Lösungsmitteln mit kleinen molekularen Abmessungen (z.B. Methanol) bei Normaldruck und Raumtemperatur nicht erreicht (Tabelle 3-10). Der Grund liegt in der verzweigten Kanalstruktur des Hohlraums, die eine optimale dichte Packung der Moleküle nicht erlaubt.

Tabelle 3-10 Maximalbeladungen einiger Lösungsmittel an ZSM-5

Substanz	Maximalbeladung [mmol g ⁻¹]/[cm ³ g ⁻¹]		Zeolith	Temp. [°C]	Referenz
Ethanol	2,82	0,16	ZSM-5 13	20	[168]
Ethylacetat	1,33	0,13	ZSM-5 1000	k. A.	[169]
1-Butanol	1,62	0,15	Silicalite	21	[50]
Methanol	2,77	0,11	NaZSM-5 66	30	[170]

Mit zunehmender Verzweigung linearer Adsorptive sinkt die erzielbare Maximalbeladung weiter. Dieser Effekt wurde aus den Adsorptionsisothermen verschiedener Butanolisomeren aus wäßriger Lösung an Silicalite deutlich [50]. Für tert.-Butanol wurde nur noch eine Maximalbeladung von 0,76 mmol L⁻¹ entsprechend 4,4 Molekülen pro ZSM-5 Einheitszelle ermittelt. Eine weitere Erhöhung der Molekülgröße (3-Methylbutansäuremethylester und Linalool) bewirkte jedoch nur noch geringe Kapazitätseinbußen (Tabelle 3-11), so daß das zur Verfügung stehende Adsorptionsvolumen wieder effektiver genutzt wurde.

Tabelle 3-11 Maximalbeladungen acyclischer Verbindungen an hydrophobem ZSM-5 (MBM = Methylbutansäuremethylester)

Substanz	Maximalbeladung [mmol g ⁻¹]/[Moleküle EZ ⁻¹]		Zeolith	Temp. [°C]	Referenz
1-Butanol	1,62	9,4	Silicalite	21	[50]
2-Butanol	1,35	7,8	Silicalite	21	[50]
Isobutanol	0,82	4,8	Silicalite	21	[50]
tert.-Butanol	0,76	4,4	Silicalite	21	[50]
3-MBM	0,67	3,9	ZSM-5 1000	30	*
Linalool	0,66	3,8	ZSM-5 1000	30	*

* Abschnitt 2.2.3.1.1

Eine Einheitszelle des ZSM-5 Gerüsts beinhaltet genau vier Kanalkreuzungen. Jede Kanalkreuzung bildet eine Pore mit ca. 0,87 nm Durchmesser [171], die verzweigten und cyclischen Molekülen erlaubt, sich in einem energetischen Minimum anzuordnen, da sterisch anspruchsvolle Gruppierungen in Richtung des Querkanals plaziert werden können. In dieser Anordnung konnte aufgrund von Molecular Modelling Berechnungen auch ein relatives Energieminimum für die cyclischen Monoterpene (*S*)-(+)-Carvon und (*R*)-(+)-Limonen in Silicalite (Abb. 3-24 und Abschnitt 2.2.3.1.1) ermittelt werden.

Eine Maximalbeladung von vier Molekülen EZ⁻¹ in ZSM-5 wurde auch für viele monocyclische Adsorptive erhalten, die mindestens einen Ringsubstituenten besaßen. Für Adsorptive mit mehr als zwei Ringsubstituenten oder Verzweigungen im Molekül sank die erzielbare Maximalbeladung jedoch weiter (s. Tabelle 3-12). Hier ist mit einer Anordnung mindestens eines Substituenten im linearen Kanal zu

rechnen (s. Abb. 3-24, Schemazeichnung Carvon), die Einfluß auf die Belegung einer benachbarten Pore nimmt. Auch die Raumorientierung des Moleküls kann entscheidend sein, ob ein Energieminimum erreicht wird oder nicht (s. Abb. 2-39 und 2-40).

Bei Adsorptiven, deren Maximalbeladung an ZSM-5 unter 2 Molekülen EZ^{-1} lag (Thymol, (*S*)-(+)-Carvon, Tabelle 3-12), war die Adsorptionskinetik jedoch so langsam (s. Abschnitt 3.8.2), daß nicht immer mit letzter Sicherheit von einer Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts innerhalb des gewählten Zeitraums (1 Woche) ausgegangen werden konnte.

Eine Maximalbeladung von einem Molekül pro Kanalkreuzung ($0,69 \text{ mmol g}^{-1}$), entsprechend etwa 100 mg g^{-1} bei Monoterpenoiden, ist für eine Abschätzung der Adsorptionskapazität von ZSM-5 für viele Aromastoffe gut geeignet. Aus diesem Wert kann eine Dimensionierung der einzusetzenden Zeolithmenge in einem Trennverfahren vorgenommen werden.

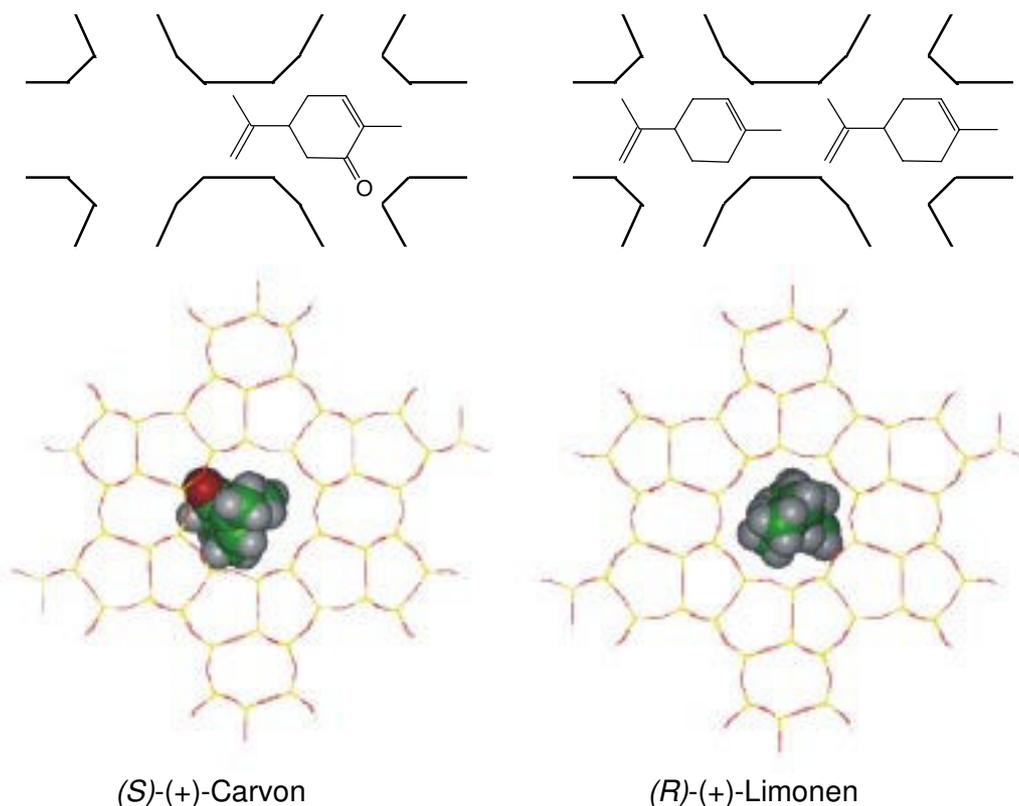


Abb. 3-24 Anordnung von (*S*)-(+)-Carvon und (*R*)-(+)-Limonen in einem Kanalkreuzungspunkt von Silicalite, oben: Schematische Darstellung (nicht maßstabsgerecht), unten: Molecular-Modelling-Darstellung der Moleküle mit Blick auf das C-7 entlang des geraden Kanals (vgl. im Schema: Blick von rechts)

Tabelle 3-12 Maximalbeladungen monocyclischer und dreifach verzweigter acyclischer Verbindungen an hydrophobem ZSM-5

Substanz	Maximalbeladung [mmol g ⁻¹]/[Moleküle EZ ⁻¹]		Zeolith	Temp. [°C]	Referenz
Benzen	1,42	8,2	Silicalite	20	[167]
p-Xylen	1,06	6,1	Silicalite	20	[167]
m-Xylen	0,69	4,0	Silicalite	20	[167]
(R)-(+)-Limonen	0,65	3,7	ZSM-5 1000	24	*
o-Xylen	0,51	2,9	Silicalite	20	[167]
Isonovalal	0,49	2,8	ZSM-5 1000	24	*
(S)-(+)-Carvon	0,30	1,7	ZSM-5 150	24	*
Thymol	0,07	0,4	ZSM-5 1000	24	*

* Abschnitt 2.2.3.1.1

Molekularsiebeffekt

Die Struktur organischer Moleküle [172] und auch des anorganischen Zeolithgitters sind bis zu einem gewissen Grad flexibel. Die allgemeine Gerüstflexibilität wird bei ZSM-5 durch einen möglichen Übergang der Konformation der geraden Kanäle von der fast circulären orthorhombischen Form (0,56 x 0,53 nm) in eine ellipsoide monocline Form (0,58 x 0,52 nm) noch verstärkt. Diese Konformationsänderung wird durch Energiezufuhr ausgelöst. Sie erfolgt in der Regel ab einer Temperatur von etwa 80 °C. In der ellipsoiden Form finden selbst bicyclische Moleküle wie Naphthalin mit den kinetischen Dimensionen von 0,38 x 0,74 nm in den Zeolithporen von ZSM-5 Platz [173].

Der effektive Molekularsiebcharakter von Zeolith ZSM-5 ist damit nicht so eindeutig festlegbar, wie es die definierte Porenstruktur zunächst vermuten läßt. Es besteht vielmehr eine Abhängigkeit von den energetischen Umgebungsverhältnissen.

Unter den hier eingesetzten Versuchsbedingungen, also für Adsorptionsprozesse aus der wäßrigen Phase bei 20 – 30 °C wurde ein vollständiger Ausschluß aus dem Porensystem von ZSM-5 für den bicyclischen Alkohol Borneol und den monocyclischen Alkohol (-)-Menthol festgestellt. Es ist jedoch zu vermuten, daß die geringen Beladungen, die für Thymol, (S)-(+)-Carvon und β -Ionen erzielt wurden (s. Abschnitte 2.2.2.1 und 2.2.3.1), auf dem beschriebenen Effekt beruhen. Hier sind die Attraktionskräfte des Adsorptivs und der Porenwand wahrscheinlich höher als

die Energie, die aufgewendet werden muß, um die Zeolithstruktur dem Adsorptiv anzupassen [173].

3.8.1.2 Affinität

Nest-Effekt

Die gewonnenen Adsorptionsenergien in Zeolithporen können bis zu achtmal größer sein als bei Adsorptionsprozessen an vergleichbaren flachen Oberflächen. Die Ursache hierfür liegt in der Krümmung der Adsorptionsoberfläche in Zeolithen. Zur Maximierung der Van-der-Waals-Wechselwirkungen ist ein direkter Kontakt der Oberflächen von Adsorptiv und Adsorbens erforderlich. Bei einem typischen Oberflächenadsorptionsprozeß, wie er beispielsweise der Adsorption von Aromastoffen an mesoporösen PS-DVB-Harzen zugrunde liegt, ist die Kontaktfläche zwischen Adsorptiv und Adsorbens begrenzt. In einem Kanal von ZSM-5 wird das Adsorptiv jedoch von allen Seiten von der zylindrischen Porenwand umgeben (s. Abb. 3-25). Je besser der innere Porendurchmesser und der Moleküldurchmesser übereinstimmen, desto höher ist die freiwerdende Van-der-Waals-Energie [47, 174]. Aus diesem Grund ordnen sich unverzweigte Moleküle und einfach substituierte Aromaten bevorzugt in den Zeolithkanälen an und ergeben so insgesamt höhere Maximalbeladungen, während verzweigte Moleküle intensivere Wechselwirkungen in einer Kanalkreuzung ausbilden können (s. o.).

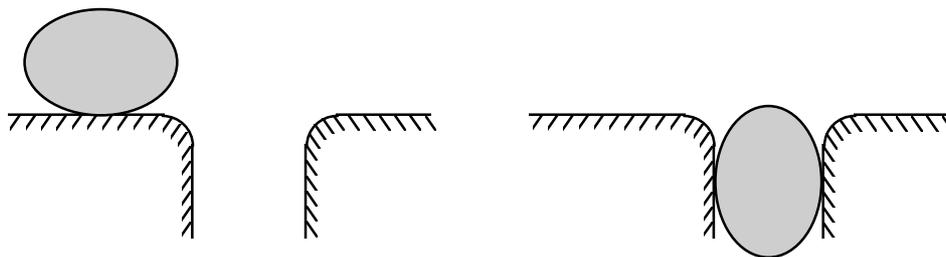


Abb. 3-25 Schematische Darstellung der Oberflächenadsorption (links) im Vergleich zur Porenadsorption (rechts) bei Zeolithen

Die hohe freiwerdende Adsorptionsenthalpie drückte sich in hohen Affinitätsparametern aus den Langmuir-Isothermen aus (s. Abschnitt 2.2.3.1.1, Tabelle 2-28). Aus diesen großen Beiträgen resultierte die für Adsorptionsprozesse an

Zeolithen typische Rechteckisotherme (s. Abb. 2-41 bis 2-43). Sie beschreibt Adsorptionsgleichgewichte, die unabhängig von der Adsorptivkonzentration in der wäßrigen Lösung bis zur Sättigung des Adsorbens praktisch vollständig auf der Seite der festen Phase liegen. Eine besonders starke Ausprägung dieses Effekts zeigte sich für die Adsorption von (*R*)-(+)-Limonen an ZSM-5 1000 und (*S*)-(+)-Carvon an ZSM-5 150 (Abb. 2-43). Bei allen anderen untersuchten Systemen lagen die Affinitätsparameter für die hydrophoben Zeolithe ZSM-5 150 und ZSM-5 1000 zwischen 100 L mmol^{-1} und 1100 L mmol^{-1} . Sie waren damit um zwei bis drei Größenordnungen höher als bei vergleichbaren PS-DVB-Harzen (s. Abschnitt 2.2.3.1.1).

Die freiwerdende Adsorptionsenthalpie beruht nicht allein auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Weitere Beiträge resultieren aus der Wasserlöslichkeit der Adsorptive und polaren Wechselwirkungen mit dem Zeolithgitter. Da die durch Molecular Modelling berechneten Wechselwirkungsenergien von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon an Silicalite fast gleich hohe Werte ergaben (s. Abschnitt 2.2.3.1.1), erfolgt die Diskussion ihrer Affinitäten zu ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 unter diesen Gesichtspunkten (s. u.).

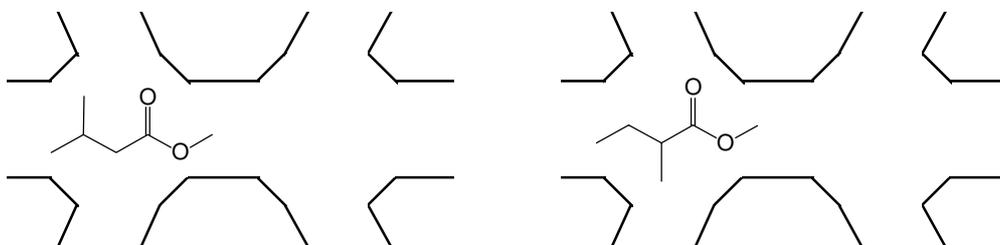


Abb. 3-26 Schematische Darstellung der Adsorption von 3-Methylbutansäuremethylester (links) und 2-Methylbutansäuremethylester (rechts) an ZSM-5

Bei den konstitutionsisomeren Methylbutansäuremethylestern bestehen jedoch kaum Unterschiede hinsichtlich ihrer Wasserlöslichkeit und der Polarität. Trotzdem zeigt 2-Methylbutansäuremethylester höhere Affinitätsparameter an ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 als das in Position 3 verzweigte Isomer. Tatsächlich ist es vorstellbar, daß der 2-Methylbutansäuremethylester aufgrund seiner α -Verzweigung den Raum in der Zeolithpore besser für hydrophobe Wechselwirkungen mit der Porenwand nutzen kann, da hier die Methylengruppe möglicherweise näher an der Porenwand liegt als beim 3-Methylbutansäuremethylester (illustriert in Abb. 3-26).

Eine Überprüfung dieser Hypothese sollte durch Molecular Modelling Berechnungen möglich sein.

Die Adsorption des polaren Aromastoffs 2-Methoxypyrazin ist unter vergleichbaren Bedingungen unabhängig von der Polarität bei allen ZSM-5 Zeolithen größer als bei organischen Adsorbentien, einschließlich der Aktivkohlen (s. Abschnitt 2.2.2.2 und [39]). Da einfach substituierte Aromaten aufgrund ihres effektiven Moleküldurchmessers von ca. 0,6 nm ideal für die Adsorption in ZSM-5 Kanälen dimensioniert sind [123, 125], ist die hohe Überlegenheit der Zeolithe für ihre adsorptive Gewinnung sicher auf den Nest-Effekt zurückzuführen.

Polare Wechselwirkungen

Durch Veränderung des Moduls lassen sich die hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften der Zeolithe in einem weiten Bereich einstellen. Dabei verändern sich auch die Art der aktiven Stellen an der Adsorptionsoberfläche sowie die daraus resultieren Adsorptiv-Adsorbenswechselwirkungen. Mit zunehmenden Aluminiumgehalt nimmt der Anteil an Van-der-Waals-Wechselwirkungen zugunsten von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und ionischen Wechselwirkungen ab.

Die Variation dieser Energiebeiträge wurde bei der Adsorption von C₁–C₄-Alkoholen an verschiedene ZSM-5 Zeolithe und Silicalite deutlich [50, 175]. Methanol zeigte als polarster Alkohol der Reihe die höchste Affinität zu ZSM-5 25, während 1-Butanol am besten von Silicalite adsorbiert wurde.

Für die besonders hohe Affinität von (S)-(+)-Carvon zu ZSM-5 150 im Vergleich zu ZSM-5 1000 können in diesem Zusammenhang nur Mutmaßungen angestellt werden, da ein ähnlich ausgeprägter Effekt bei anderen polaren Verbindungen nicht festgestellt werden konnte (s. Abschnitt 2.2.3.1.1). Möglicherweise liegen die sauren Zentren in der Kanalkreuzung so günstig, daß eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit der Carbonylgruppe des (S)-(+)-Carvons möglich wird.

Wasserlöslichkeit des Adsorptivs

Die Lösung von Kohlenwasserstoffen in Wasser erfordert eine besonders hohe Ordnung der an dem Lösungsprozeß beteiligten Wassermoleküle. Durch die Adsorption an eine hydrophobe Phase wird hier im Vergleich zu polaren Verbindungen durch den Entropiegewinn ein deutlich höherer Enthalpiebeitrag zum Adsorptionsprozeß geleistet [136].

Die Wasserlöslichkeit des Terpenkohlenwasserstoffs (*R*)-(+)-Limonen beträgt etwa 19 mg L⁻¹. Im Gegensatz dazu ist die Löslichkeit von (*S*)-(+)-Carvon etwa hundertfach höher (Tabelle 3-13). Der außergewöhnlich hohe Affinitätsparameter für die Adsorption von (*R*)-(+)-Limonen an ZSM-5 1000 im Vergleich zu allen anderen polaren Verbindungen ist damit wahrscheinlich auf diesen Grund zurückzuführen. Aus den einfachen Grundsätzen „gleiches löst gleiches“ und „gleiches adsorbiert gleiches“ können bereits die hohen Affinitätsparameter unpolarer Substanzen, wie (*R*)-(+)-Limonen, zu hydrophoben Zeolithen erklärt werden.

Tabelle 3-13 Berechnete Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (LogP_{OW}) und Wasserlöslichkeiten [111, 112]

Substanz	LogP _{OW}	Löslichkeit [mg L ⁻¹]
Borneol	2,85	569
(<i>S</i>)-(+)-Carvon	3,07	1818
(<i>R</i>)-(+)-Limonen	4,83	19
(±)-Linalool	3,38	949
2-MBM	1,77	n. B.
3-MBM	1,77	n. B.
Myrcenol	3,46	810

3.8.1.3 Co-Adsorptionsprozesse

Die Adsorption einer unpolaren Verbindung aus einem wäßrigen Medium kann grundsätzlich nicht als Einzeladsorptionsprozeß angesehen werden, da neben der Zielsubstanz auch Wasser als potentielles Adsorptiv zu berücksichtigen ist. Bei ausgesprochen hydrophoben Zeolithen (ZSM-5 1000) ist jedoch mit einem Eintritt von Wasser in die hydrophoben Zeolithkanäle kaum zu rechnen. Deshalb sind Einzeladsorptionstheorien zur Beschreibung des Adsorptionsprozesses geeignet (s. o.). Sobald jedoch mit fallendem Modul die Anzahl von Gerüstaluminium und damit die Hydrophilie des Adsorbens steigt, werden Ionenaustauschprozesse relevant. An jedes Kation, das aus dem Medium ausgetauscht wurde, können bis zu fünf Moleküle Wasser gebunden werden [48]. Daraus resultiert eine Konkurrenz um

Adsorptionsplätze oder sogar ihre Blockierung für organische Verbindungen [49]. Die Folge ist eine reduzierte Adsorptionskapazität für das Zielmolekül. Mit Ausnahme von (*S*)-(+)-Carvon wurde für alle Adsorptive eine Abnahme der Adsorptionskapazität mit zunehmender Hydrophilie des Zeolithen festgestellt (s. Abschnitt 2.2.3.1.1). Für einige Adsorptive (z. B. (*R*)-(+)-Limonen, Tabelle 3-14) konnte auch eine ungefähre Korrelation des Kapazitätsverlusts mit der theoretischen Anzahl an Gerüstaluminium-Atomen festgestellt werden (s. Abschnitt 2.2.3.1.1). Daraus wird deutlich, daß eine einzige negative Ladung im Zeolithgitter eine Kanalkreuzungspore im ZSM-5-Gerüst vollständig für die Adsorption unpolare Verbindungen blockieren kann. Mit abnehmender Molekülgröße des Adsorptivs behindern die Wasserinseln im Zeolithkanal die Adsorption von organischen Molekülen zunehmend weniger. Für 2- und 3-Methylbutansäuremethylester waren nur geringe Kapazitätsunterschiede (0,3 Moleküle EZ⁻¹) zwischen Modul 1000 und Modul 150 feststellbar (Tabelle 2-27). Bei 1-Propanol gab es keine Unterschiede der Adsorptionskapazitäten für ZSM-5 Zeolithe mit Modulen ab 25 bis hin zum praktisch aluminiumfreien Silicalite [50].

Tabelle 3-14 Maximalbeladungen in Abhängigkeit vom Modul an ZSM-5 Zeolithen für verschiedene Adsorptive aus wäßriger Lösung

Substanz	Maximalbeladung [mmol g ⁻¹]/[Moleküle EZ ⁻¹]		Zeolith	Temp. [°C]	Referenz
Ethanol	1,52	8,8	Silicalite	20	[175]
Ethanol	2,71	15,6	ZSM-5 40	20	[168]
Ethanol	2,87	16,5	ZSM-5 13	20	[168]
Na-dodecylsulfat	0,39	2,2	ZSM-5 1000	25	[150]
Na-dodecylsulfat	0,73	4,2	ZSM-5 70	25	[150]
(<i>S</i>)-(+)-Carvon	0,11	0,6	ZSM-5 1000	24	*
(<i>S</i>)-(+)-Carvon	0,30	1,7	ZSM-5 150	24	*
(<i>R</i>)-(+)-Limonen	0,65	3,7	ZSM-5 1000	24	*
(<i>R</i>)-(+)-Limonen	0,41	2,4	ZSM-5 150	24	*

* Abschnitt 2.2.3.1.1

Grundsätzlich kann nicht davon ausgegangen werden, daß die Aluminium-Atome statistisch im Gitter verteilt oder immer in der gleichen der 96 möglichen Positionen in der Einheitszelle vorliegen. Gerade für große ZSM-5-Kristalle ($> 2 \mu\text{m}$) wurde die höchste Aluminiumdichte nahe des äußeren Radius des Kristalls ermittelt [127]. Eine detaillierte Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch ohne die Kenntnis der genauen Lage der sauren Zentren im Kanalsystem nicht möglich.

Es wurde auch der entgegengesetzte Effekt festgestellt. Für Ethanol, Natriumdodecylsulfat und (*S*)-(+)-Carvon steigt die erzielbare Maximalbeladung mit fallendem Modul (Tabelle 3-14). Hierfür sind polare Wechselwirkungen verantwortlich, die bereits diskutiert wurden (s. Abschnitt 3.8.1.2).

Bei Co-Adsorptionsprozessen erfolgt immer eine gegenseitige Beeinflussung der Adsorptive, die sich positiv im Sinne von gegenseitigen Wechselwirkungen oder negativ im Sinne einer gegenseitigen Behinderung auswirken kann.

Die Ausprägung von Co-Adsorptionsprozessen wird bei der Adsorption an Zeolith ZSM-5 durch die Form der Isotherme deutlich. Während die Einzeladsorptionen der unpolaren Verbindungen an die hydrophoben Zeolithe ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 der Langmuir-Theorie folgten, wurden die Co-Adsorptionsprozesse zwischen Zielmolekül und Kationen / Wasser bei ZSM-5 28 besser durch das Freundlich Modell beschrieben (s. Abschnitt 2.2.3.1.2).

Die Interaktionen zwischen den Adsorptiven ließen sich beispielhaft aus dem binären Adsorptionsgleichgewicht von (*S*)-(+)-Carvon und (*R*)-(+)-Limonen an ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 zeigen (s. Abb. 2-44), da hier auch vergleichbare Daten für die Einzelisothermen bestimmt wurden (s. Abb. 2-43).

Im Zweikomponentensystem erfolgte eine Angleichung der thermodynamischen Adsorptionseigenschaften von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon, die besonders an ZSM-5 1000 deutlich wurde. Die Beladung von (*R*)-(+)-Limonen reduzierte sich zugunsten von (*S*)-(+)-Carvon, das jedoch deutlich besser adsorbiert wurde als bei Abwesenheit von (*R*)-(+)-Limonen. Eine Gesamtbeladung von knapp 4 Molekülen EZ^{-1} , wie sie bei der Adsorption von (*R*)-(+)-Limonen allein möglich ist, wurde nicht mehr erreicht. (*S*)-(+)-Carvon blockierte offenbar auch benachbarte Adsorptionsplätze für (*R*)-(+)-Limonen. Die hohe Adsorptionswärme aus den Wechselwirkungen mit (*R*)-(+)-Limonen förderte möglicherweise auch die Adsorption des sterisch anspruchsvolleren (*S*)-(+)-Carvons. Der Trenneffekt an

ZSM-5 1000 fiel deshalb im binären System nicht so deutlich aus, wie aus den Einzelisothermen erwartet wurde.

3.8.2 Adsorptionskinetik

Dem Übergang eines Stoffes aus der wäßrigen Lösung an die Adsorptionszentren der inneren Feststoffoberfläche stehen Transportwiderstände entgegen, deren Art und Größe die zur Gleichgewichtseinstellung erforderliche Zeit bestimmen. Der zeitliche Ablauf eines Adsorptionsprozesses kann durch vier aufeinanderfolgende Teilschritte charakterisiert werden:

- Transport des Adsorptivs aus der wäßrigen Phase an den Rand des Grenzfilms um das Adsorbens
- Transport durch den Grenzfilm an die äußere Oberfläche des Adsorbens
- Transport in das Adsorbensinnere
- Diffusion im Adsorbensinneren

Für die Betrachtung der Kinetik von Adsorptionsprozessen an ZSM-5-Pulver im Batch-Betrieb können die ersten beiden Punkte außer acht gelassen werden, da bei hohen Rühr- oder Schüttelfrequenzen und unter Berücksichtigung der großen äußeren Oberfläche der Pulver von einer raschen Einstellung des äußeren Gleichgewichts ausgegangen werden kann [135].

Die limitierenden Schritte bestehen damit einerseits im Übergang eines an der Oberfläche adsorbierten Teilchens in die Zeolithpore. Andererseits ist gerade bei Transportprozessen in Zeolithen die Oberflächendiffusion in den Kanälen von hohen Wechselwirkungsenergien mit der Zeolithwand geprägt und bestimmt damit maßgeblich die Adsorptionskinetik.

3.8.2.1 Transport in die Zeolithporen

DEROUANE ET AL. [47] stellten folgende Überlegungen zum Transport von Molekülen in die Zeolithporen an und belegten sie durch Modellrechnungen:

Wenn ein Adsorptiv an die Zeolithoberfläche gelangt, so wird seine Orientierung und Konfigurierung relativ zur Porenöffnung zunächst nicht optimal sein, um einen sofortigen Eintritt in das Kanalsystem zu ermöglichen. Das Molekül wird deshalb an der flachen Kristalloberfläche adsorbiert **(1)**. Dabei wird relativ wenig Adsorptionsenergie frei (s. Abschnitt 3.8.1.2). Zusätzlich tritt durch die höhere Ordnung der Adsorptivmoleküle an der Oberfläche ein Entropieverlust ein, dem jedoch ein Entropiegewinn der am der Lösungsprozeß beteiligten Wassermoleküle entgegensteht [136].

Durch Diffusionsprozesse an der Adsorptionsoberfläche kann das Adsorptiv in einer günstigen Orientierung an den Porenrand gelangen. Während des Übergangs von der Oberflächenadsorption zur Porenadsorption muß kurzfristig ein energiereicher Zustand **(2)** überwunden werden. Aufgrund der konvexen Form des Porenrands muß eine teilweise Desorption des Moleküls erfolgen, die mit einer Abnahme an Wechselwirkungsenergie verbunden ist. Nach der Überschreitung dieser Energiebarriere folgt jedoch ein hoher Energiegewinn aufgrund der dreidimensionalen Wechselwirkungen mit der konkaven Oberfläche des Zeolithkanals **(3)** (s. Abb. 3-27).

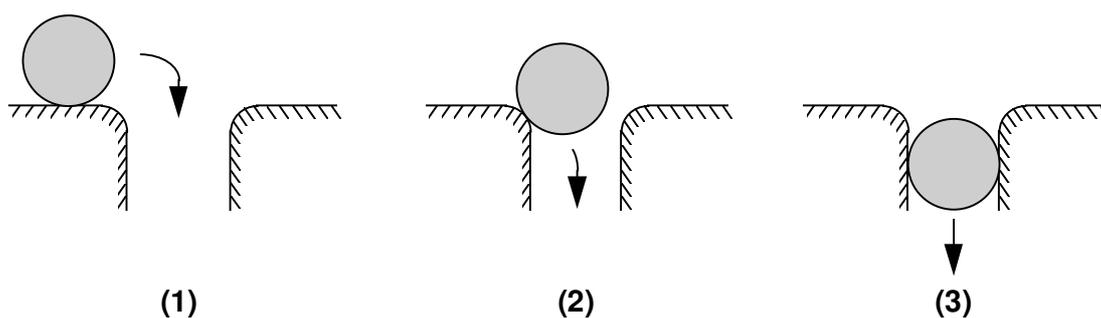


Abb. 3-27 Diffusionsprozeß an ZSM-5: **(1)** Oberflächenadsorption, **(2)** Übergang in die Pore **(3)** Diffusion im Zeolith-Kanal

Die Autoren schlossen daraus, daß der Übergang in die Zeolithpore der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Adsorptionsprozesses an Zeolithen ist.

Bei Adsorptionsprozessen an ZSM-5 ist unter Umständen ein weiterer energie-reicher Schritt zu berücksichtigen. Organische Verbindungen [172] und auch das anorganische Zeolithgitter [173] zeigen eine begrenzte Flexibilität in der Struktur, so daß eine Harmonisierung ihrer Konformation und Geometrie zur Erzielung optimaler Wechselwirkungsenergien möglich ist. Das Ausmaß der notwendigen Deformationsprozesse wächst mit dem molekularen Durchmesser des Adsorptivs. Für eine Deformation muß zusätzlich Energie aufgewendet werden.

Einfluß der Wasserlöslichkeit

Über Adsorptionsprozesse organischer Moleküle aus wäßriger Lösung an hydrophobe Zeolithe ist bisher nur wenig bekannt. Detaillierte Untersuchungen wurden hauptsächlich für kurzkettige Alkohole ($\leq C_5$) durchgeführt [168, 176, 177]. Zur Adsorption von sterisch anspruchsvolleren Molekülen liegen nur empirische Untersuchungen vor [146, 178].

Der Übergang des Adsorptivs von der flüssigen Phase an die Feststoffoberfläche ist jedoch ein bedeutender Teilschritt der Adsorptionskinetik. Deshalb sollen einige Überlegungen zum Einfluß der Wasserlöslichkeit auf die Adsorptionskinetik kurz diskutiert werden.

Die Oberfläche der Zeolithkristalle wird aus freien Si-OH-Gruppen gebildet. Die Adsorptionswärme aus der Oberflächenadsorption wird deshalb für unpolare Verbindungen nicht sehr hoch ausfallen. Oberflächenadsorptionsprozesse aus wäßriger Lösung sind jedoch bei organischen Adsorptiven in der Regel weniger von der Adsorptionswärme aus der Adsorptiv-Adsorbens-Wechselwirkung geprägt als vielmehr von der Wasserlöslichkeit des Adsorptivs. Hier spielt neben den einfachen Prinzipien „gleiches löst sich in gleichem“ und „gleiches adsorbiert an gleichem“ insbesondere der Entropiebeitrag der beteiligten Wassermoleküle eine wichtige Rolle [136]. Da alle Moleküle eine hohe Affinität zu sich selbst besitzen, besteht zudem die Möglichkeit, daß in einem frühen Stadium des Adsorptionsprozesses auf der Kristalloberfläche mehrere Adsorptionsschichten ausgebildet werden. Auch dieser Vorgang würde zu einem zusätzlichen Energiegewinn führen.

Der Einfluß des umgebenden Mediums bestätigte sich zunächst in Adsorptionsversuchen aus Methanol und aus Aceton. (*R*)-(+)-Limonen und Myrcenol wurden nicht von ZSM-5 1000 und ZSM-5 150 adsorbiert (s. Abschnitt 2.2.2.4). Die

Solvatationsenergie im Lösungsmittel überstieg also mögliche Energiegewinne aus Adsorptiv-Adsorbens-Wechselwirkungen.

Der Einfluß der Wasserlöslichkeit machte sich zudem deutlich in den Adsorptionskinetiken aus wäßriger Lösung bemerkbar. Besonders klar war dieser Effekt während der Adsorption des Terpenkohlenwasserstoffs **(R)-(+)-Limonen** an ZSM-5 1000 zu sehen (s. Abschnitt 2.2.3.2.1). Die höchsten Diffusionskoeffizienten wurden für geringe Beladungen ermittelt. Das spricht für einen besonders hohen Enthalpiegewinn aus der Oberflächenadsorption. Die Überwindung der ersten Diffusionshürde kann dann sehr schnell erfolgen. Die Werte nahmen im weiteren Verlauf der Kinetik jedoch steil ab (Abb. 2-45). Damit lag der Schluß nahe, daß während des Adsorptionsprozesses von (R)-(+)-Limonen die Porendiffusion die Kinetik kontrollierte.

Im Gegensatz dazu waren die Diffusionskoeffizienten aus der Adsorption des besser löslichen Terpenalkohols **Myrcenol** (s. Tabelle 3-13 und Abb. 2-45) über den gemessenen Zeitraum hinweg weitgehend konstant. Obwohl hier aufgrund der strukturellen Unterschiede der beiden Moleküle keine direkte Vergleichbarkeit gegeben ist, so liegen doch ihre Diffusionskoeffizienten bei höheren Beladungen in einer vergleichbaren Größenordnung (Tabelle 2-30), so daß angenommen werden konnte, daß der Porendiffusion der beiden Moleküle vergleichbar hohe Diffusionshemmnisse entgegenstanden. In Analogie zu den für das (R)-(+)-Limonen getroffenen Überlegungen kann dann gefolgert werden, daß der Enthalpiegewinn aus der Oberflächenadsorption von Myrcenol den Energiebedarf, der für den Eintritt des Moleküls in das Kanalsystem von ZSM-5 notwendig war, gerade abdeckte.

(S)-(+)-Carvon ist gleichzeitig relativ gut wasserlöslich und hinsichtlich der Molekülgestalt sterisch anspruchsvoll. Eine Adsorption in die Zeolithporen ist deshalb wahrscheinlich nur unter gegenseitiger Anpassung der Form des Zeolithkanals und der Molekülform möglich [47]. Der hohe Energieaufwand hierfür konnte durch Molecular-Modelling-Berechnungen demonstriert werden. Die ermittelte Diffusionsbarriere zwischen zwei Minima in Silicalite beträgt für (S)-(+)-Carvon 154 kJ mol^{-1} und ist damit mehr als doppelt so hoch als für das (R)-(+)-Limonen (s. Abschnitt 2.2.3.2.2). Wenn nun der Energiegewinn aus der Oberflächenadsorption zunächst nicht groß genug ist, um einen Eintritt in die Zeolithporen zu ermöglichen, jedoch der Gesamtadsorptionsprozeß unter Einschluß der erzielbaren Adsorptiv-Adsorbens-Wechselwirkungen in den Zeolithporen

exotherm ist, würde der Eintritt in die Zeolithpore den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Kinetik darstellen. Der nachfolgende Anstieg der Diffusionskoeffizienten (Abb. 2-45) wäre unter der Überlegung nachvollziehbar, daß bereits adsorbierte Moleküle eine Vorformung der Kanäle bewirkt haben, so daß die nachfolgenden Moleküle geringere Energiebeiträge für Deformationsprozesse leisten müssen.

3.8.2.2 Porendiffusion

Diffusionsprozesse in Poren können in drei Typen eingeteilt werden [173]:

- Die molekulare Diffusion wird durch Molekül-Molekül Kollisionen dominiert und beschreibt bei großen Porendurchmessern ab ca. 50 nm Adsorptionsprozesse aus der Gasphase. Die resultierenden Diffusionskoeffizienten bewegen sich zwischen $10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ und $10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.
- Die Knudsen Diffusion resultiert aus Kollisionen zwischen dem Adsorptiv und der Wand des Adsorbens. Dieser Prozeß ist bei niedrigen Drücken oder hohen Temperaturen relevant und führt zu Diffusionskoeffizienten in der Größenordnung von $10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ bis etwa $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.
- Die Oberflächendiffusion repräsentiert den Transport adsorbierter Moleküle entlang der Porenwand. Sie beschreibt damit die Diffusion in Mikroporen (< 2 nm) und variiert je nach Molekülgröße und Polaritätseinflüssen über mehrere Größenordnungen ($10^{-18} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ - $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$).

Adsorptionsprozesse an Zeolithen werden hauptsächlich durch Diffusion in Mikroporen gekennzeichnet. Darum steht hier nur der Beitrag der Oberflächendiffusion zur Diskussion.

3.8.2.2.1 Einfluß der Struktur des Adsorptivs

Aus dem bereits beschriebenen Nesteffekt (s. Abschnitt 3.8.1.1) können auch Schlüsse über das Diffusionsverhalten der Adsorptive abgeleitet werden [47, 174].

Für ein hydrophobes Adsorbens in einer hydrophoben Umgebung wurden folgende Überlegungen angestellt und durch Modellrechnungen bestätigt:

Wenn sich das Molekül in einem lokalen Energieminimum befindet, so wird die freiwerdende Adsorptionswärme dadurch bestimmt, wie gut die Oberflächenkrümmung des Zeolithkanals mit der Krümmung der Moleküloberfläche übereinstimmt, da die Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Größe der Kontaktfläche des Moleküls mit der Adsorptionsoberfläche steigen. Jedoch besteht auch eine Anziehungskraft der Kanalwand zu dem Teil der Adsorptivoberfläche, die im Energieminimum keinen direkten Kontakt zur Kanalwand hat. Die relative Van-der-Waals-Kraft erreicht ihr Maximum, wenn der Porenradius etwa 1,5 mal größer als der Molekülradius ist. Die Größe der Van-der-Waals-Kraft bestimmt, wie stark das Molekül in dieser Position festgehalten wird und wirkt demnach der Mobilität entgegen. Je besser Molekülradius und Porenradius übereinstimmen, desto geringer wird die Van-der-Waals-Kraft. Das Adsorptiv nähert sich dann den hypothetischen Zustand der „Supermobilität“.

Tabelle 3-15 Diffusionskoeffizienten acyclischer Verbindungen an ZSM-5 (MBM = Methylbutansäuremethylester)

Substanz	Diffusionskoeffizient [m^2s^{-1}]	Zeolith	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]	Referenz
Methanol	$3,4 \cdot 10^{-14}$	Silicalite	30	[179]
Ethanol	$1,6 \cdot 10^{-14}$	Silicalite	30	[179, 180]
1-Propanol	$7,9 \cdot 10^{-14}$	Silicalite	30	[180]
2-Propanol	$7,9 \cdot 10^{-15}$	Silicalite	30	[179, 180]
1-Butanol	$1,5 \cdot 10^{-13}$	Silicalite	30	[180]
Isobutanol	$4,1 \cdot 10^{-15}$	Silicalite	30	[179, 180]
2-MBM	$7,8 \cdot 10^{-14}$	ZSM-5 1000	21	*
3-MBM	$2,5 \cdot 10^{-13}$	ZSM-5 1000	21	*

* s. Abschnitt 2.2.3.2

Aus diesem Modell wird deutlich, warum gerade für kleine Moleküle (z. B. Methanol, Ethanol, 1-Propanol) keine eindeutige Korrelation zwischen Molekulargewicht und Diffusionskoeffizient ermittelt werden konnte (Tabelle 3-15). Eine zusätzliche

Verzweigung wirkte sich jedoch immer hemmend auf die Diffusion aus (1- und 2-Propanol bzw. 1- und iso-Butanol) [179, 180].

Aufgrund der durchgeführten Näherungen bei der Berechnung der Diffusionskoeffizienten (s. Abschnitt 4.1.7.2) ist ein Vergleich der erhaltenen Absolutwerte mit Literaturdaten nur größenordnungsmäßig möglich. Die für die konstitutionsisomeren **Methylbutansäuremethylester** ermittelten Diffusionskoeffizienten lagen in einem ähnlichen Größenordnungsbereich wie die der deutlich kleineren Alkohole (Tabelle 3-15). Daraus könnte nun geschlossen werden, daß die Ester aufgrund ihres größeren Moleküldurchmessers auch den Adsorptionsraum besser ausfüllen als die Alkohole und sich so näher am Zustand der Supermobilität befinden. Zusätzlich zeigten sich aber auch deutliche Mobilitätsunterschiede zwischen den beiden Isomeren. 3-MBM bewegte sich etwa dreimal schneller durch das Kanalsystem von ZSM-5 1000 als sein Isomer 2-MBM (s. Tabelle 2-30). Gleichzeitig wurde aus den Isothermen eine höhere Affinität von 2-MBM zu ZSM-5 1000 ermittelt (s. Tabelle 2-28). Unter Zugrundelegung des beschriebenen Modells wäre der Schluß möglich, daß 2-MBM höhere Adsorptiv-Adsorbens-Wechselwirkungen mit einer Seite der Kanalwand ausbilden kann als 3-MBM, aber aufgrund von Van-der-Waals-Kräften die Verweilzeit von 2-MBM im lokalen Energieminimum länger ist, so daß daraus eine langsamere Adsorptionskinetik resultiert. Da ein analoger Trenneffekt auch für die korrespondierenden Aminosäuren während der Adsorption an ZSM-5 45 sogar im thermodynamischen Gleichgewicht ermittelt wurde [143], ist es sehr wahrscheinlich, daß der Trenneffekt maßgeblich durch Wechselwirkungen des Methylbutylrests im Energieminimum verursacht wird.

Einen weiteren Erklärungsansatz bietet aber auch das Modell von CHOUDHARY UND DEEPAK [172]. Sie vergleichen das Adsorptiv im Zeolithkanal sehr anschaulich mit einem Federball, der sich in einem Zylinder befindet. Er kann sich relativ leicht in Richtung des Federballkopfes bewegen, da sich dann die Federn leicht stauchen lassen. Aufgrund der gewinkelten Anordnung der Federn wird jedoch eine Bewegung in die Gegenrichtung erheblich behindert. Überträgt man dieses Modell nun auf die Diffusion der Methylbutansäuremethylester in ZSM-5 1000, so ist es vorstellbar, daß sich bei einer Bewegung in Richtung der Esterfunktion die beiden Methylgruppen in der endständigen Isopropylgruppe des 3-MBM relativ leicht stauchen ließen, während die Methylgruppe im 2-MBM zusammen mit einem

sterisch anspruchsvolleren Ethylrest gestaucht werden müßte und so der Porendiffusion einen höheren Widerstand entgegensetzen würde.

Beide Modelle bieten somit sinnvolle Ansätze für eine Klärung des beobachteten Phänomens. Weiterer Aufschluß über die sterischen Verhältnisse der Diffusion könnte durch Molecular Modelling Berechnungen erbracht werden.

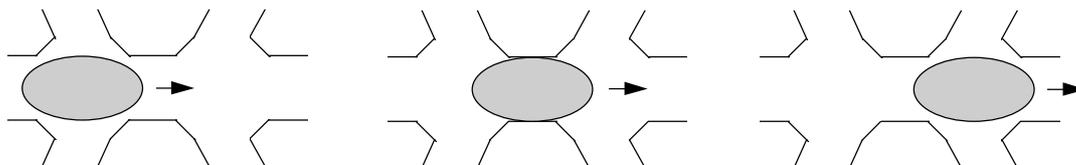


Abb. 3-28 Schematische Darstellung des Diffusionsweges des Adsorptivs in einem geraden Kanal des ZSM-5

Der Diffusion von sterisch anspruchsvollen Molekülen in den Zeolithkanälen steht neben den van-der-Waals-Kräften, die das Adsorptiv in einem lokalen Energieminimum der Pore festhalten, eine zusätzliche Diffusionsbarriere entgegen, die sich aufgrund notwendiger Deformationen von Molekül und Kanalform ergibt (s. Abb. 3-28). Bereits aus diesem Grunde ist die starke Abnahme der Diffusionsgeschwindigkeit von Molekülen mit mehreren Verzweigungen (acyclische Terpenoide) gegenüber den einfach verzweigten Methylbutansäuremethylestern verständlich (Tabelle 2-30). Mit zunehmender Molekülgröße nimmt darüber hinaus die Moleküloberfläche zu, die Wechselwirkungen mit der Porenwand eingehen kann und die Verweildauer des Moleküls in einer energiearmen Position erhöht.

Eine ebenso deutliche Auswirkung auf die Diffusionsgeschwindigkeit ergab sich durch die Anzahl der Substituenten in meta- oder ortho-Position bei cyclischen Verbindungen. Während Toluol, p-Xylen, Benzen und Ethylbenzen praktisch keine Unterschiede im Diffusionsverhalten an NaZSM-5 82 zeigten [139], so waren die Diffusionskoeffizienten der ortho- und meta-substituierten Xylene im Vergleich zum para-substituierten Isomer an ZSM-5 38 um den Faktor 200 und 300 reduziert [172]. Analog diffundierte (*R*)-(+)-Limonen in ZSM-5 1000 etwa zehnmal schneller als das dreifach ringsubstituierte (*S*)-(+)-Carvon (s. Tabelle 2-30). Die Ursache für die Diffusionshemmung ist offensichtlich in der seitlich herausragenden Carbonylgruppe des (*S*)-(+)-Carvons zu suchen und konnte durch Berechnung der

theoretischen Diffusionsbarrieren beider Moleküle in Silicalite bestätigt werden (s. Abschnitt 2.2.3.2).

3.8.2.2.2 Einfluß des Moduls des Zeoliths

Mit fallendem Modul nimmt der Anteil an Gerüstaluminium im Zeolithgitter und damit die Anwesenheit von sauren Si-OH-Al-Zentren zu. Deshalb werden zusätzlich zu den hydrophoben Wechselwirkungen auch elektrostatische Wechselwirkungen ausgebildet, deren Betrag meist deutlich höher ist. Neben polaren und polarisierbaren Einfachbindungen bilden insbesondere π -Elektronensysteme im Adsorptiv starke Wechselwirkungen mit der positiven Ladung am Gitter aus [51, 138]. Die Stärke der Interaktionen hängt auch von der Art des Gegenions ab. So wurden für die Adsorption von Hexan an ZSM-5 63 keine Wechselwirkungen mit H_3O^+ als Gegenion ermittelt, während bei Na^+ eine deutliche Einflußnahme festgestellt werden konnte [49]. Eine zusätzliche Behinderung der Diffusion organischer Verbindungen erfolgt durch die Bindung von bis zu fünf Molekülen Wasser an ein ausgetauschtes Alkalikation [48].

Tabelle 3-16 Diffusionskoeffizienten cyclischer Aromaten an ZSM-5 mit unterschiedlichem Modul

Substanz	Diffusionskoeffizient [m^2s^{-1}]	Zeolith	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]	Referenz
Ethylbenzen	$7,5 \cdot 10^{-16}$	Silicalite	20	[167, 181]
Ethylbenzen	$6,8 \cdot 10^{-17}$	ZSM-5 40	35	[172]
p-Xylen	$1,0 \cdot 10^{-15}$	Silicalite	20	[167, 181]
p-Xylen	$5,1 \cdot 10^{-16}$	ZSM-5 40	35	[172]
o-Xylen	$2,2 \cdot 10^{-16}$	Silicalite	20	[181]
o-Xylen	$2,4 \cdot 10^{-18}$	ZSM-5 38	30	[172]
m-Xylen	$4,1 \cdot 10^{-16}$	Silicalite	20	[167]
m-Xylen	$1,6 \cdot 10^{-18}$	ZSM-5 38	30	[172]

Aufgrund der genannten Faktoren wurde auch in allen hier zitierten Literaturstellen über eine deutlich reduzierte Diffusionsgeschwindigkeit mit abnehmendem Modul berichtet (Tabelle 3-16 und [49]). Das Ausmaß der Mobilitätsabnahme der

einzelnen Adsorptive an ZSM-5 150 im Vergleich zu ZSM-5 1000 variierte in den eigenen Untersuchungen jedoch zwischen Faktor 2 für (S)-(+)-Carvon und Faktor 70 für den 2-Methylbutansäuremethylester (Tabelle 2-30). Ohne die genaue Kenntnis der sterischen Verhältnisse zwischen Molekül und Gitterladung könnten hierzu jedoch nur Vermutungen ausgesprochen werden, da das Zusammenspiel von anziehenden und abstoßenden Kräften in dem elektrostatischen Feld mit hydrophoben Adsorptiv-Adsorbens-Wechselwirkungen kaum voraussehbar ist. Möglicherweise könnten Molecular-Modelling-Berechnungen auch hier Erklärungsansätze bieten.

Kapazitätsabnahmen mit fallendem Modul, die während der einleitenden Untersuchungen der Adsorptionseigenschaften von Zeolithen mit einer Aromamodellösung aufgetreten waren (Abschnitt 2.2.2.2), waren aus diesen Gründen bei einer Adsorptionszeit von 16 h wenigstens zum Teil auch auf eine langsamere Diffusion der Adsorptive zurückzuführen. Gerade bei 3-Phenyl-1-propanol mußte aufgrund des aromatischen Rings mit starken Wechselwirkungen gerechnet werden [138].

3.8.2.2.3 Synergistische Effekte

Der Großteil der veröffentlichten Arbeiten zur Diffusion in ZSM-5 bezieht sich auf Einzeladsorptionsprozesse. Die Ursache hierfür liegt in der Tatsache, daß diese Diffusionsprozesse in der Regel im Hinblick auf eine katalytische Umsetzung des Substrats an den aktiven Zentren des Zeoliths untersucht wurden. Da bei der Nutzung des Zeoliths als selektives Adsorbens grundsätzlich immer mindestens ein binäres System angeboten wird, ist, sofern der Molekularsiebeffekt allein nicht für eine vollständige Trennung der Substanzen genügt, die Erfassung der gegenseitigen Beeinflussung der Adsorptive von großer Bedeutung.

Die Trennung von Xylenisomeren beruht auf einem kinetischen Effekt [172]. Untersuchungen zur Adsorptionskinetik eines Isomers an NaZSM-5 82, das bereits mit einem anderen Isomer beladen war, ergaben immer eine Reduktion der Diffusionsgeschwindigkeit im Vergleich zum Einzeladsorptionsprozeß. So reduzierte sich der Diffusionskoeffizient von p-Xylen im mit o-Xylen gesättigten Zeolith bei 25 °C um den Faktor 45. Umgekehrt wurde für die Diffusion von o-Xylen bei Sättigung mit p-Xylen eine Verlangsamung um den Faktor 178 festgestellt [139].

Für das System (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(+)-Carvon wurde eine echte Konkurrenzadsorption an ZSM-5 1000 untersucht (s. Abb. 2-49). Der Diffusionskoeffizient von (*S*)-(+)-Carvon verfünffachte sich hier im Vergleich zum Einzeladsorptionsprozeß. Die schnelle Adsorption von (*R*)-(+)-Limonen wirkte sich also beschleunigend auf die Kinetik des sterisch anspruchsvolleren Adsorptivs aus. Als Ursache für eine Erniedrigung oder erleichterte Überwindung der hohen Diffusionsbarriere von (*S*)-(+)-Carvon in ZSM-5 1000 sind drei Effekte denkbar. Die freiwerdende Adsorptionswärme aus der (*R*)-(+)-Limonen-Adsorption könnte eine lokale Temperaturerhöhung bewirken, die sich auch positiv auf die Diffusion von (*S*)-(+)-Carvon auswirkt. Außerdem könnten hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Adsorptiven einen zusätzlichen Energiegewinn ermöglichen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Adsorptive könnte zudem eine Anpassung der Kanalform an (*R*)-(+)-Limonen auch die Diffusion von (*S*)-(+)-Carvon erleichtern.

3.9 Trennung von Aromastoffen aus wäßriger Lösung mit Zeolith ZSM-5

3.9.1 Konventionelle Trennmethoden

Neben dem apparativen Aufwand und dem Materialbedarf sind Zeit- und Energieaufwand die wesentlichen Faktoren, die eine Trenntechnik für den industriellen Einsatz interessant und rentabel machen. Eine neue Methode sollte darum in mindestens einem dieser Punkte einen entscheidenden Vorteil bieten. Im folgenden werden deshalb die für die Aromengewinnung etablierten Trenntechniken unter besonderer Berücksichtigung von Energiebedarf und Selektivität kurz dargestellt.

3.9.1.1 Kristallisation

Die Kristallisation beschreibt die Ausfällung eines Feststoffs aus einer übersättigten Lösung. Die Erzeugung der übersättigten Lösung ist oft ein energieintensiver Schritt, da gekühlt oder das Lösungsmittel eingeengt werden muß. Die Kristallisation erfolgt zudem nicht immer spontan, so daß die Zugabe von Kristallisationskeimen erforderlich wird [182]. Viele Aromastoffe liegen als Flüssigkeit und nicht als Feststoff vor. Deshalb kann diese Methode nur in Einzelfällen angewandt werden.

3.9.1.2 Destillative Verfahren

Durch Destillation werden Flüssigkeitsgemische aufgrund ihrer Siedepunkte in die Komponenten getrennt. Zur Überführung der Komponenten in die Gasphase und für die anschließenden Kondensation müssen jedoch erhebliche Energiemengen aufgewendet werden. Aufgrund der universellen Anwendbarkeit sowie hohen erzielbaren Selektivitäten und Produktreinheiten sind Destillation und Rektifikation die in der Aromaindustrie am weitesten verbreiteten Trennmethode [5].

3.9.1.3 Zweiphasensysteme

Die Trennung löslicher Wertstoffe in einem Zweiphasensystem beruht auf der Einstellung eines Verteilungsgleichgewichts der Solute zwischen den beiden nicht mischbaren Phasen. Da sich das Gleichgewicht bei Raumtemperatur einstellt, ist der Energieaufwand im Vergleich zur Destillation deutlich reduziert [183]. Als energieaufwendiger Schritt ist die destillative Trennung des Extraktions- bzw. Elutionslösungsmittels von den Zielsubstanzen zu nennen. Durch kontinuierliche Verfahren können vollständige Phasenübergänge erzielt werden [5]. Die Selektivität ist jedoch oft nur gering. Hier ist nun das Potential der Zeolithe zu sehen, da durch den Molekularsiebeffekt in der festen Phase ein zusätzliches Selektionskriterium entsteht.

Flüssig-flüssig-Extraktion

Die flüssig-flüssig-Extraktion bewirkt eine Überführung gelöster Zielsubstanzen in eine anderes, mit dem ursprünglichen nicht mischbares Lösungsmittel, das eine höhere Affinität zu den Soluten aufweist.

Flüssig-fest-Extraktion

Für flüssig-fest-Extraktionen bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

- Die Zielprodukte befinden sich in der flüssigen Phase und sollen an eine feste Phase adsorbiert werden (z. B. Adsorption von Aromastoffen aus einem wäßrigen Fermentationsmedium)
- Die Zielprodukte sind an der festen Phase adsorbiert und sollen in die flüssige Phase überführt werden (z. B. Lösungsmitteldesorption oder Extraktion von Pflanzenmaterial zur Gewinnung lipophiler Produkte)

Chromatographie

Chromatographische Trennungen an einer festen Phase beruhen auf den gleichen Prinzipien wie flüssig-fest-Extraktionen. Sie bieten jedoch aufgrund der multiplikativen Verteilung zwischen stationärer und mobiler Phase insbesondere bei einer Gradientenelution hohe Selektivitäten. Trotzdem finden chromatographische Verfahren in der Aromatechnologie nur zur Produktion außergewöhnlich hoher Qualitäten, z. B. von Citrusölen, Anwendung [5].

3.9.2 Anforderungen an das Adsorbens

3.9.2.1 Abtrennung des Adsorbens

Die vollständige Abtrennung des Adsorbens aus der Adsorptionslösung ist die primäre Voraussetzung für eine quantitative Desorption der adsorbierten Wertstoffe. Die Trennung einer festen von einer flüssigen Phase erfolgt in der Regel durch Filtration. Zeolithe weisen als anorganische kristalline Substanzen jedoch begrenzte Partikelgrößen auf, die nach der Synthese im Bereich von < 1 -

60 μm liegen. Sie sind deshalb nur schwer filtrierbar. Die Synthese großer Kristalle ist ein technologisches Problem. Auch im Hinblick auf die ohnehin schon begrenzten kinetischen Eigenschaften der Adsorptionsprozesse an ZSM-5 ist der Einsatz großer Kristalle nicht unbedingt vorteilhaft.

3.9.2.1.1 Festbettadsorber

Die technisch bevorzugte Methode der Festphasenextraktion ist der Einsatz eines Festbettadsorbers [135]. Für die Anwendung in Festbettadsorbern sind die Partikelgrößen und ihre Größenverteilung ein Qualitätsmerkmal der Adsorbentien. Um den Druckabfall über die Chromatographiesäule gering zu halten, ist eine möglichst uniforme Partikelgröße erforderlich, damit Partikelzwischenräume nicht verstopft werden. Darüber hinaus sollte die Partikelgröße groß genug sein, um einen Säulenfluß bei Atmosphärendruck zu erhalten, aber klein genug, um eine große Oberfläche anzubieten, die eine rasche Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts während der kurzen Kontaktzeit im Festbett gewährleistet.

Zeolith-Pulver

Die untersuchten Zeolithe lagen in Form von Pulvern mit mittleren Korngrößen im von $< 1 \mu\text{m}$ (DAY), $3,9 \mu\text{m}$ (ZSM-5 28), $9,6 \mu\text{m}$ (ZSM-5 150) und $23 \mu\text{m}$ (ZSM-5 1000) vor und wiesen im einzelnen breite Partikelgrößenverteilungen auf (s. Tabelle 2-21). Der Betrieb im Säulenverfahren bei Atmosphärendruck war damit nicht möglich (s. Abschnitt 2.2.1).

Untersuchungen an druckbetriebenen Säulen mit NaZSM-5 19 Pulver haben ergeben, daß auch die kinetischen Transporteigenschaften der Adsorptive in Zeolith ZSM-5 gegen einen Einsatz von Festbettadsorbern sprechen (s. auch Abschnitt 3.8.2). Kurzkettige Alkohole (Methanol, Ethanol, 1-Propanol) zeigen zwar mit die größten Diffusionskoeffizienten in ZSM-5 (Tabelle 3-15). Das thermodynamische Gleichgewicht wird jedoch bei der Trennung von Alkohol-Wasser-Mischungen im Säulenbetrieb nicht erreicht [184].

Zeolith-Formkörper

In großtechnischen Prozessen werden Zeolithe üblicherweise in gebundener Form eingesetzt [137]. Als Bindemittel finden neben verschiedenen natürlichen Tonmaterialien hauptsächlich anorganische Oxide wie Al_2O_3 und SiO_2 Verwendung. Seltener wurden Untersuchungen mit organisch gebundenen Zeolith-Formkörpern auf der Basis von Methylcellulose oder Celluloseacetat durchgeführt [44]. Die Formkörper enthalten mindestens 10 – 20 % des Bindematerials und werden als Tabletten, Perlen, Extrudate oder sprühgetrocknete Partikel hergestellt [127].

Das makro- bis mesoporöse Bindematerial verfügt selbst über Adsorptionseigenschaften, die sich in der Regel deutlich von denen des mikroporösen Zeolithen unterscheiden. Dies gilt insbesondere für hydrophobe Zeolithe. Die häufig verwendeten Binder SiO_2 bzw. Al_2O_3 weisen hydrophile Eigenschaften auf, die die Diffusion unpolarer Substanzen behindern [149, 177, 178]. Untersuchungen zur Trennung von Alkohol-Wasser-Gemischen haben ergeben, daß die Adsorptionskapazität und -selektivität von NaZSM-5 stärker von der Art des Bindematerials als vom Modul des Zeolithen beeinflusst werden [44]. Die eigenen Ergebnisse zur Adsorption von Aromastoffen zeigten ebenfalls eine deutliche Verschlechterung der Adsorptionseigenschaften bei zunehmender Polarität des Bindemittels (s. Abschnitt 2.2.2.3). Für Al_2O_3 -Formkörper von ZSM-5 28 wurden gravierende Kapazitätseinbrüche im Vergleich zum Pulver festgestellt, die für die einzelnen Substanzen zum Teil mehr als 50 % betragen. Die Adsorption an die weniger polaren SiO_2 -Formkörper von ZSM-5 28 und DAY war ebenfalls deutlich reduziert.

Durch Einbindung der Zeolithe in ein organisches Material können die unerwünschten Adsorptionseffekte zwar verhindert werden [44], jedoch ist dann eine Regeneration des Adsorbens durch Calcinierung nicht mehr möglich. Damit ginge ein entscheidender Vorteil des Zeoliths gegenüber organischen Adsorbentien verloren (s. Abschnitt 3.9.1.3).

Auch bei der Verwendung von Al_2O_3 als Bindemittel für dealuminierte Zeolithe wirkt sich ein Calcinierungsprozeß als Regenerationsschritt nachteilig aus. Bei hohen Temperaturen kann Aluminium aus dem Binder in das Zeolith-Gerüst eingebaut werden [44]. Somit verringert sich das Modul mit jedem Regenerationszyklus und verändert die Adsorptionseigenschaften des Zeoliths.

Die Anwendung von Zeolith-Formkörpern in Festbettadsorbern erwies sich insgesamt für eine adsorptive Gewinnung von Aromastoffen aus wäßriger Lösung als nicht geeignet.

3.9.2.1.2 Batch-Adsorption

Eine Festphasenextraktion zur Gewinnung von Wertstoffen aus wäßriger Lösung ist auch im Batch-Verfahren möglich. Gerade bei Fermentationsprozessen können in vielen Fällen durch *in situ* Adsorption toxische Wirkungen des Produkts auf den Mikroorganismus eingeschränkt und Ausbeutesteigerungen bewirkt werden (s. Abschnitt 3.4.2). Das Adsorbens wird dabei dem Fermentationsmedium direkt zugesetzt und ist hinsichtlich der Umgebungsbedingungen für die Adsorption (Temperatur, pH-Wert, Agitation) an den Bioprozeß gebunden.

Die mechanische Stabilität von SiO_2 - und Al_2O_3 - gebundenen Zeolithformkörpern ist für einen Einsatz im Batch-Verfahren nicht ausreichend (s. Abschnitt 2.2.2.3, [143, 155]).

Im Labormaßstab wurden ZSM-5-Pulver nach der Batch-Adsorption durch Zentrifugation sedimentiert und das Medium anschließend dekantiert. Diese Trennmethode war für pulverförmige DAY-Zeolithe aufgrund ihrer Partikelgrößen unter $1\ \mu\text{m}$ nicht anwendbar (s. Abschnitt 2.2.1).

Die Abtrennung von Adsorbentien aus Batch-Prozessen erfolgt gewöhnlich durch Filtration. Für Zeolith-Pulver sind dafür Membranfilter und hohe Drücke erforderlich. Als alternative Filtrationstechnik wurde speziell für die Abtrennung von Zeolith-Pulvern aus wäßrigen Suspensionen ein Cross-flow-Filtrationssystem entwickelt [143], das eine kontinuierliche Rückführung des Mediums in den Prozeß erlaubt.

DAY-Pulver konnte auch über einen Membranfilter mit $0,45\ \mu\text{m}$ Porenweite nicht vollständig abgetrennt werden. Die Anwendung von Ultrafiltrationstechniken [41] ist aus Energie- und Zeitgründen nicht sinnvoll.

Für den Einsatz von Zeolithen bei fermentativen *in situ* Adsorptionsprozessen ergeben sich zusätzliche Schwierigkeiten. Die Partikeldurchmesser der DAY- und ZSM-5 28-Pulver betragen zum Teil weniger als $5\ \mu\text{m}$ und bewegten sich damit im

Größenordnungsbereich von Bakterienzellen (ca. 1 - 5 μm \varnothing [73]). Für die Rückführung der Biomasse in den Prozeß und für die Durchführung des Desorptionsprozesses ist eine Trennung von Zellen und Adsorbens erforderlich, die jedoch mit Filtrationstechniken in diesem Falle nicht erreicht werden kann. Hier wäre eine Immobilisierung der Bakterienzellen notwendig (s. Abschnitt 2.1.5.1.3).

Für den Einsatz von Zeolithpulvern mit mittleren Partikelgrößen von mindestens 10 μm hat sich das Batch-Verfahren mit anschließender Cross-Flow-Filtration oder Zentrifugation zur Gewinnung von Aromastoffen aus wäßriger Lösung als geeignet erwiesen.

3.9.2.1.3 Membranverfahren

Zur Gewinnung und Trennung von flüchtigen Adsorptiven wurden bereits Verfahren entwickelt, die auf einer Immobilisierung von Zeolithen in Membranen beruhen. Als Triebkraft für dieses Trennverfahren ist ein Konzentrations- oder Druckgefälle notwendig.

Hauptsächlich werden zwei Varianten zur Herstellung von Zeolith-haltigen Membranen beschrieben [173]:

- Die Zeolithe werden direkt auf einem porösen Träger aus Keramik, Edelstahl oder Aluminium synthetisiert. Diese Membranen können durch Hitzebehandlung (Calcinieren) regeneriert werden.
- Pulverförmige Zeolithe werden in eine organische Polymermembran (meistens PDMS) eingebunden. Hier ist jedoch mit zusätzlichen unselektiven Transportprozessen durch das Polymer und entlang der Grenzschicht zwischen Polymer und Zeolith zu rechnen [185].

Für einige der etablierten Trennverfahren, die auf den selektiven Adsorptionseigenschaften der Zeolithe beruhen, wurden bereits Pervaporations- oder Filtrationsprozesse an zeolithhaltigen Membranen entwickelt.

Die Trocknung azeotroper Wasser/Lösungsmittel-Gemische gelang in einem Pervaporationsprozeß mit Zeolith A in einer Keramikmembran. Die höchsten Trennfaktoren wurden für die Trennung von Wasser und Ethanol erzielt [186].

Lineare aliphatische Monocarbonsäuren konnten aus wäßriger Lösung an membrangebundenen Zeolith 13X in der Na-Form getrennt werden [187].

Die Einbindung von Silicalite in eine PDMS-Membran wurde für den Einsatz in einem Membranbioreaktor zur Gewinnung von Alkoholen aus Fermentationslösungen untersucht. Pervaporationsprozesse mit PDMS-Membranen zeigten aufgrund ihrer Hydrophobizität bereits eine selektive Durchlässigkeit für Alkohole. Durch Einbindung von Silicalite in PDMS konnte diese Selektivität für C₁ - C₄-Alkohole weiter verbessert werden. Für Butanol ging die erhöhte Selektivität jedoch zu Lasten der kinetischen Trenneigenschaften. Zudem wurde eine geringere mechanische Stabilität der Zeolith-gefüllten Membran im Vergleich zu ungefüllten PDMS-Membranen festgestellt [185, 188].

Membranprozesse sind auch für die Gewinnung von Aromastoffen aus Fermentationslösungen geeignet [34, 189]. Der Einsatz von Zeolith-gefüllten Membranen könnte damit eine Alternative zum Batch-Verfahren darstellen.

3.9.1.2 Desorption und Wiederbeladung

Die Gewinnung von Wertstoffen durch adsorptive Verfahren setzt auch ihre vollständige und unveränderte Desorption voraus. Für einen Einsatz aluminiumhaltiger oder dealuminiertes Zeolithe als Adsorbens muß daher zunächst sichergestellt sein, daß der Zeolith keine unerwünschte katalytische Aktivität besitzt.

Zur Desorption der Wertstoffe eignen sich grundsätzlich zwei Verfahren:

- Die thermische Desorption ist energieaufwendig und deshalb nur bei sehr leicht flüchtigen Adsorptiven sinnvoll. Bei hohen Temperaturen besteht zudem eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für katalytische Umsetzungen des Adsorptivs [50].
- Die Lösungsmitteldesorption ist die bevorzugte Methode für die Elution adsorbierter Aromastoffe [39]. Für die Gewinnung der Aromastoffe muß in einem destillativen Folgeschritt das Lösungsmittel entfernt werden. Bei der Wahl der Lösungsmittel sind jedoch im Hinblick auf eine Verwendung der Aromastoffe in Lebensmitteln Limitationen durch die Lebensmittelgesetzgebung gegeben [14].

Der Desorptionsprozeß unterliegt den gleichen kinetischen Bedingungen wie die Adsorption und erfolgt damit bei ZSM-5 grundsätzlich relativ langsam. Aufgrund der Beladungsabhängigkeit der Diffusion in ZSM-5 (s. Abb. 2-45) ergab sich für sterisch anspruchsvolle Adsorptiv Myrcenol eine Erhöhung der adsorbierbaren und desorbierbaren Menge innerhalb von drei Adsorptionszyklen (s. Abschnitt 2.2.2.4). Kapazitätseinbrüche oder unerwünschte katalytische Umsetzungen wurden für das Modellsystem Myrcenol / ZSM-5 150 bei 30 °C nicht festgestellt.

3.9.2.3 Haltbarkeit und Regeneration

Für die Haltbarkeit von Adsorbentien, die in einem Bioprozeß zum Einsatz kommen, sind insbesondere die drei folgenden Aspekte relevant:

- Stabilität des Materials gegenüber mikrobiellem Abbau,
- keine Adsorption von Medienbestandteilen,
- Stabilität des Materials gegenüber Säuren und Alkalien.

In diesen Punkten zeigen sich die Vorzüge hydrophober ZSM-5 Zeolithe.

Für anorganisches Material besteht nicht die Gefahr der Zersetzung durch den Mikroorganismus.

Aufgrund des Molekularsiebeffekts von ZSM-5 gelangt ein Großteil der Medienbestandteile (Kohlenhydrate, Proteine, Lipide) gar nicht an die eigentliche Adsorptionsoberfläche, die sich im Poreninneren befindet. Mit zunehmender Hydrophobizität von ZSM-5 wird zudem auch der Ausschluß kleiner, hydrophiler Moleküle, z. B. Aminosäuren [143], bewirkt.

Die hohe thermische Stabilität siliciumreicher Zeolithe (bis über 1000 °C) erlaubt eine vollständige Entfernung organischer Rückstände durch Calcinieren [117]. Damit kann eine Regeneration des Adsorbens erfolgen, falls doch unerwünschte Verbindungen adsorbiert wurden. Eine Calcinierung stellt zudem sicher, daß keine organischen Rückstände aus der Synthese des Adsorbens vorhanden sind. So wird für eine Anwendung zur Gewinnung von Lebensmittelaromen die Forderung des LMBG nach einer Reduktion des Übergangs von Stoffen auf Lebensmittel auf unbedenkliche Anteile, die technisch unvermeidbar sind, erfüllt [14].

Die Stabilität von Zeolithen gegen Säuren und Alkalien steigt ebenfalls mit steigendem Modul [143, 190]. Damit sinkt auch die Gefahr, daß Aluminium aus dem Zeolithgerüst herausgelöst wird. Für Aluminium besteht zwar kein Grenzwert im LMBG, jedoch ist die toxikologische Unbedenklichkeit umstritten.

Toxische Effekte für Mikroorganismen sind jedoch bekannt. Versuche zur *in situ* Adsorption von Ethanol an Al_2O_3 -gebundenem Silicalite während des Fermentationsprozesses mit *Saccharomyces cerevisiae* ergaben eine vollständige Inhibierung des Wachstums [155]. Bei Verwendung der hydrophoben, praktisch aluminiumfreien Pulvern muß mit toxischen Effekten nicht gerechnet werden [143].

3.9.3 Trennung von Aromastoffgemischen mit Zeolith ZSM-5

3.9.3.1 Trennung von binären Gemischen mit ZSM-5

Die biotechnologische Gewinnung von Aromastoffen liefert idealerweise aus einem Precursor nur ein aromawirksames Produkt. Die Gewinnung des Aromastoffs erfordert deshalb neben der Extraktion aus dem wäßrigen Medium nur noch einen Trennschritt von nicht umgesetztem Edukt. Optimal ist die selektive Adsorption des Produkts, so daß eine *in situ* Trennung erfolgen kann.

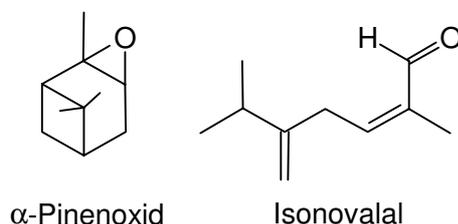
Aus dem EU-Projekt „Terpene Biotransformations“ EC BIO4-CT95-0049 ergaben sich zwei Trennprobleme (α -Pinen / Isonovalal und Limonen / Carvon), für die eine adsorptive Aromastofftrennung mit ZSM-5 möglich erschien. Zwei weitere binäre Aromastoffgemische wurden unter Berücksichtigung aktueller Trennprobleme der Aromaindustrie (Thymol / (-)-Menthol) und destillativ nur schwer trennbare Verbindungen (2- / 3-Methylbutansäuremethylester) ausgewählt.

Trennung von α -Pinenoxid und Isonovalal

Die Transformation von (-)- α -Pinenoxid mit *P. fluorescens* ergab in hohen Ausbeuten den acyclischen Terpenaldehyd Isonovalal (s. Abschnitt 2.1.5.1). Für eine mögliche Anwendung von Zeolithen zur Ausbeutesteigerung durch *in situ*

Adsorption wurden die Adsorptionseigenschaften von Isonovalal an ZSM-5 1000 untersucht (s. Abschnitt 2.2.3.2).

Die Adsorption von Isonovalal an ZSM-5 1000 verläuft sehr langsam. Die Maximalbeladung ($0,49 \text{ mmol g}^{-1}$) wurde erst nach einer Woche Adsorptionszeit erreicht. Eine Anwendung für den genannten Bioprozeß war damit nicht sinnvoll, da die Produktbildung innerhalb weniger Stunden erfolgte.

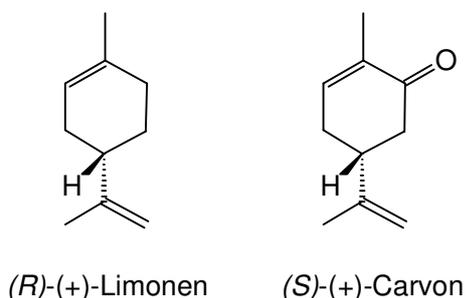


Aufgrund der geringen Stabilität von (-)- α -Pinenoxid in wäßriger Lösung (s. Abschnitt 2.1.4.1) konnten mit dem Precursor keine Adsorptionsexperimente durchgeführt werden. Da aber der strukturell ähnliche bicyclische Terpenalkohol Borneol nicht von ZSM-5 adsorbiert wurde, ist auch die Adsorption von (-)- α -Pinenoxid wenig wahrscheinlich, so daß grundsätzlich eine Trennung von Edukt und Produkt mit ZSM-5 möglich wäre.

Trennung von (R)-(+)-Limonen und (S)-(+)-Carvon

(R)-(-)- bzw. (S)-(+)-Carvon sind die charakteristischen Komponenten des etherischen Öls der Spearminze bzw. des Kümmels. Beide werden zur Aromatisierung von Lebensmitteln und Getränken verwendet [109]. Die biotechnologische Gewinnung von (\pm)-Carvon aus (R)-(+)- oder (S)-(-)-Limonen ist mit dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* P 226-1 bei kontinuierlicher Gasphasendosierung und einer maximalen Produktkonzentration von 100 mg L^{-1} (Carveol + Carvon) innerhalb von zwölf Tagen möglich [34].

Eine Trennung von Produkt und Precursor konnte an Zeolith ZSM-5 1000 erreicht werden (s. Abb. 2-49). Die Trennung beruhte vornehmlich auf einem kinetischen Effekt. (R)-(+)-Limonen diffundierte etwa zehnmal schneller in ZSM-5 1000 als (S)-(+)-Carvon



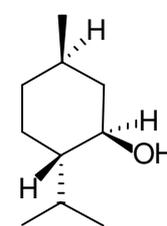
(Tabelle 2-30). Als Ursache hierfür konnte die sterische Beeinträchtigung der Diffusion durch die polare Carbonylgruppe im Carvon verantwortlich gemacht werden (s. Abschnitt 2.2.3.2.2). Bei kurzen Adsorptionszeiten (1 h) ist deshalb eine selektive Anreicherung von Limonen in den

Zeolithporen möglich (Abb. 2-49). Im Sinne einer *in situ* Adsorption ist diese Methode jedoch nicht anwendbar.

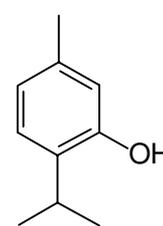
Trennung von (-)-Menthol und Thymol

(-)-Menthol findet aufgrund seiner erfrischenden und desinfizierenden Eigenschaften in Körperpflegemitteln und verschiedenen Lebensmitteln breite Verwendung. 1988 wurden 5600 t (-)-Menthol produziert [8]. Ein Weg zur Mentholsynthese besteht in der katalytischen Hydrierung von Thymol und anschließender Racemattrennung. Die hohe Geruchsaktivität von Thymol wirkt sich jedoch störend auf die sensorische Qualität des (-)-Menthols aus, da bei diesem Prozeß unvermeidbare geringe Rückstände im Produkt verbleiben.

Im Vergleich zu Cyclohexan (0,60 nm) hat Benzol (0,585 nm) einen geringeren kinetischen Durchmesser [167]. Daraus resultierte auch ein Trenneffekt für die ringsubstituierten Derivate Thymol und (-)-Menthol an ZSM-5 1000 aus wäßriger Lösung. (-)-Menthol wurde im Gegensatz zu Thymol bei Raumtemperatur nicht adsorbiert.



(-)-Menthol



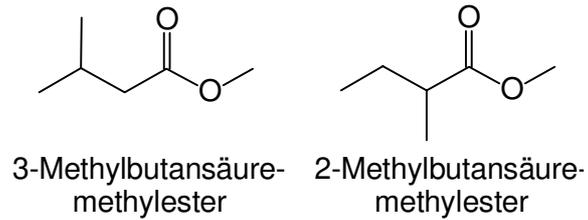
Thymol

Aufgrund der geringen Kapazität ($0,07 \text{ mmol g}^{-1}$) verbunden mit einer sehr langsamen Adsorptionskinetik für Thymol (s. Abschnitte 2.2.3.1 und 2.2.3.2) ist diese Anwendung jedoch nicht sinnvoll. Dieses Trennproblem könnte wahrscheinlich an einem Zeolith mit einer etwas größeren Porenweite (z. B. Mordenit mit 0,7 nm) besser gelöst werden.

Trennung von 2- und 3-Methylbutansäuremethylester

Fruchtester werden zur Aromatisierung von Backwaren, Süßwaren und Getränken verwendet. 2-Methylbutansäuremethylester besitzt ein fruchtig-süßes Aroma und wurde aus Erdbeersaft isoliert. 3-Methylbutansäuremethylester riecht apfelartig und ist ein Bestandteil des natürlichen Ananasaromas [109]. Die konstitutionsisomeren Methylester der 2- und 3-Methylbutansäure wurden als Vertreter natürlicher Fruchtester für Adsorptionsexperimente ausgewählt, um die Grenzen der Trenneigenschaften von ZSM-5 sowie Vorzüge gegenüber konventionellen Methoden herauszuarbeiten.

2- und 3-Methylbutansäuremethylester unterscheiden sich trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit erheblich in ihren kinetischen Adsorptionseigenschaften an ZSM-5. Die Mobilität von 2-MBM ist gegenüber



3-MBM in ZSM-5 150 etwa 24 mal geringerer (s. Tabelle 2-30). Damit sollte eine Anreicherung von 3-MBM im Porensystem von ZSM-5 150 möglich sein. Aufgrund der insgesamt schnellen Adsorptionskinetik (s. Abb. 2-47) könnte dieses Trennverfahren eine Alternative zu aufwendigen Destillationsverfahren darstellen.

3.9.3.2 Fraktionierung von komplexen Gemischen mit ZSM-5

Bei den meisten Prozeßströmen aus der Aromaindustrie handelt es sich nicht um binäre Edukt-Produkt-Gemische. Gerade Naturstoffisolate stellen überaus komplexe Mischungen verschiedenster Substanzklassen dar, die sich mitunter deutlich in ihrer Aromawirksamkeit unterscheiden.

Etherische Öle, vor allem Citrusöle, finden verbreitete Anwendung zur Aromatisierung von Lebensmitteln, Haushaltswaren oder in der Parfümerie [5]. Die sensorisch wertvollen Bestandteile (Aldehyde, Alkohole und Ester) bilden aber nur etwa 10 % des etherischen Öls. Die Matrix besteht aus Kohlenwasserstoffterpenen, die jedoch empfindlich gegen Autoxidationsprozesse und thermische Belastungen sind. Die Produkte dieser unerwünschten Umsetzungen werden als Fehlgerüche wahrgenommen. Zudem weisen Terpenkohlenwasserstoffe eine sehr geringe Wasserlöslichkeit auf, so daß eine Verwendung in wäßrigen Matrices nicht möglich ist.

Orangenöl

Aus der Produktion von Orangensaft fallen große Mengen Orangenschalen an, die 0,5 – 5 % etherisches Öl enthalten. Die Gewinnung des Öls ist durch Wasserdampfdestillation oder schonender durch Kaltpressung möglich. (*R*)-(+)-Limonen bildet mit 88 – 97 % den Hauptbestandteil des Orangenöls [8]. Wichtige

aromawirksame Komponenten sind u. a. lineare Aldehyde (z. B. Octanal, Decanal) sowie acyclische Terpene (z. B. (*S*)-(+)-Linalool, α - und β -Sinenal).

(*R*)-(+)-Limonen wird industriell durch Destillation abgetrennt. Der destillative Prozeß beinhaltet zwei Nachteile. Die Siedepunkte von Limonen und 1-Octanal sind fast gleich hoch. 1-Octanal wird deshalb mit entfernt, so daß durch den Trennprozeß die Zusammensetzung der aromawirksamen Komponenten erheblich verändert wird. Zudem entstehen Fehlgerüche aufgrund der thermischen Belastung [5].

Ein extraktiver Aufreinigungsschritt mit Zeolith ZSM-5 1000 erlaubt bei kurzen Kontaktzeiten eine weitgehende Trennung acyclischer und cyclischer Verbindungen aus wäßrigen Medien (s. Abschnitt 2.2.2.2). Ein Adsorptionsschritt mit ZSM-5 1000 konnte deshalb direkt an eine Wasserdampfdestillation gekoppelt werden. Während der Wasserdampfdestillation von Orangenschalen wurden bereits innerhalb von einer Stunde wichtige Aromakomponenten wie lineare Aldehyde und acyclische Monoterpene weitgehend aus dem Destillat gewonnen (s. Abschnitt 2.2.4.2). Damit wurde ein Trennschritt gespart und eine zusätzliche thermische Belastung vermieden.

Spike-Lavendelöl

Aus vielen Naturstoffisolaten ist die selektive Gewinnung einer einzigen Komponente, gewöhnlich der Hauptkomponente, erwünscht. Die Nebenkomponenten weisen aber oft ähnliche Polaritäten wie das Zielprodukt auf, so daß nach einer Zweiphasenextraktion aus wäßriger Lösung ein zusätzlicher chromatographischer Trennschritt erforderlich ist.

Die Abtrennung einer Komponente aus einem komplexen Terpenoidgemisch konnte stellvertretend anhand der Gewinnung von (-)-Linalool aus Spike-Lavendelöl gezeigt werden. Die mengenmäßig bedeutendsten Komponenten des untersuchten Spike-Lavendelöls waren 1,8-Cineol (23 %), (+)-Campher (17,5 %) und (-)-Linalool (41 %). Der Hauptbestandteil (-)-Linalool wurde mit Zeolith ZSM-5 1000 aus einer wäßrigen Lösung des Öls innerhalb von zwei Stunden selektiv von den bicyclischen Terpenen getrennt und in einem nachfolgenden Desorptionsschritt mit Methanol fast vollständig (92 %) gewonnen.

3.9.3.3 Gewinnung hydrophiler Aromastoffe

Röstaromen

Back-, Brat- und Röstaromen bestehen aus einer Vielzahl von Maillardprodukten, die bei der thermischen Reaktion von Aminosäuren und Zuckern entstehen. Als aromawirksame Komponenten wurden unter anderen aromatische Heterozyklen wie Imidazole, Oxazole oder Pyrazine charakterisiert. Die Aromaindustrie stellt diese Verbindungen auch gezielt als Reaktionsaromen her. Eine biotechnologische Produktion von Pyrazinen ist ebenfalls möglich, da sie *de novo* von einigen Pilzen und Bakterien produziert werden [87].

Die Gewinnung der Heterozyklen aus wäßriger Lösung ist aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften durch extraktive Verfahren nur unvollständig möglich [39]. 2-Methoxypyrazin konnte jedoch mit ZSM-5 28 vollständig aus einer Modellösung extrahiert werden (s. Abschnitt 2.2.2.2), da einfach substituierte Aromaten optimal dimensioniert sind, um starke Wechselwirkungen in ZSM-5-Kanälen einzugehen [123, 125]. Der Pyrazinring kann aufgrund seiner basischen Eigenschaften zusätzliche Wechselwirkungen mit den aziden Zentren im Zeolithen eingehen. Deshalb war die selektive Adsorption aus wäßriger Lösung, wahrscheinlich unter Beteiligung von Ionenaustauschprozessen, möglich.

3.10 Ausblick

Die Isolierung und Identifizierung verschiedener Intermediate aus dem α -Pinenkatabolismus von *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 ergab Hinweise auf eine Reihe von Enzymaktivitäten, die einer Absicherung auf proteinchemischer Ebene bedürfen. Es zeichnet sich jedoch jetzt schon ab, daß mindestens drei Enzyme aus diesem Abbauweg von Interesse für die Biotechnologie von Aromastoffen und möglicherweise auch für stereoselektive Naturstoffsynthesen sein könnten.

Die Isolierung und Klonierung der **Monoxygenase** steht bereits kurz vor der Vollendung und stellt dann das für viele terpenoide Aromastoffe als Precursor fungierende α -Pinenoxid als natürliches Zwischenprodukt bereit.

Die α -Pinenoxid **Lyase** katalysiert den zweifachen Ringbruch des Pinangerüsts. Sie zeichnet sich durch eine hohe Enzymaktivität aus und bildet einen bedeutenden Anteil des löslichen Zellproteins. Nach einer Isolierung des Enzyms wäre wahrscheinlich eine noch effektivere Umsetzung von α -Pinenoxid zu Isonovalal möglich, da Nebenreaktionen mit Medienbestandteilen auf ein Minimum reduziert werden könnten. Möglicherweise bietet auch die Untersuchung der Substratspezifität des Enzyms Ansatzpunkte zur Produktion neuartiger Aromastoffe.

Weiterhin wurden Hinweise auf das Vorliegen einer **Dehydrogenase**-Aktivität erhalten, die eine stereoselektive Reduktion einer nichtaktivierten isolierten Doppelbindung bewirkt. Gelänge die Isolierung einer derartigen Enzymaktivität, so wären bei einer entsprechend breiten Substratspezifität vielfache Anwendungen nicht nur im Bereich der Aromabiotechnologie denkbar.

Die geruchsaktiven Intermediate konnten in hohen Ausbeuten gewonnen werden. Sie gelten im Sinne der Lebensmittelgesetzgebung allerdings nicht als natürliche Aromastoffe, da sie nicht als Bestandteile von Lebensmitteln bekannt sind. Aus dem pflanzlichen Sekundärmetabolismus kennt man jedoch die Entstehung von Terpenoiden mit dem gleichen Kohlenstoffskelett (z. B. Lavandulol). Darum erscheint es sehr wahrscheinlich, daß nun, da detaillierte MS- und KI-Daten ermittelt wurden, eine Suche nach den neuen Substanzen in pflanzlichen Extrakten durchaus erfolgversprechend sein könnte.

Die Adsorption von Aromastoffen an hydrophobe Zeolithe der ZSM-5-Reihe aus wäßrigen Lösungen lieferte neue Ansätze zur Festphasenextraktion, die auf eine selektive Produktgewinnung zielten. Dies kann beispielsweise der Fall sein, wenn aus einem cyclischen Edukt ein acyclisches Produkt oder aus einem verzweigten Edukt ein unverzweigtes Produkt entsteht. Das Potential der ZSM-5 Zeolithe ist durch die untersuchten Modellsysteme sicher noch nicht vollständig erfaßt worden. Hier ist eine Zusammenarbeit mit der Industrie gefordert, damit auch technologisch relevante Trennprobleme bearbeitet werden können.

Eine Zusammenführung des entwickelten Trennverfahrens mit dem untersuchten biologischen System gelang nicht, da die Produktbildungskinetik nicht mit den

kinetischen Anforderungen des Adsorptionsprozesses vereinbar war. Gerade deshalb würde sich aber ein direkter Zusatz von hydrophoben Zeolithen bei langsamen Terpenttransformierern, wie den Basidiomyceten [34], anbieten. So könnte durch *in situ* Adsorption der Toxizität der Transformationsprodukte entgegengewirkt werden. Voraussetzung wäre hier natürlich eine entsprechende Produktselektivität des Zeoliths.

Aufgrund der definierten Struktur der Zeolithgitter konnten mit Molecular-Modelling-Berechnungen entscheidende Beiträge zum Verständnis der molekularen Vorgänge während der Adsorption von (*S*)-(+)-Carvon und (*R*)-(+)-Limonen an ZSM-5 geliefert werden. Im Hinblick auf stetig steigende Rechnerleistungen sollte in Zukunft auch eine Berücksichtigung von weiteren Einflußfaktoren möglich sein, die sich beispielsweise aus dem Modul des Zeolithen oder aufgrund der energetischen Verhältnisse im umgebenden Medium herleiten. Je genauer die Modellierung der Adsorptionsvorgänge in den Zeolithporen möglich sein wird, desto sicherer werden Voraussagen zu bestehenden Trennproblemen getroffen werden können. Das Fernziel könnte dann in der Synthese maßgeschneiderter Zeolithe liegen.

Zeolith DAY zeigte zwar keinen Molekularsiebeffekt für die untersuchten Trennprobleme, jedoch besteht prinzipiell eine gute Eignung als hydrophobes Adsorbens. Aufgrund des hohen relativen Porenvolumens von Zeolith Y könnte sich dieses System für weitere Modifikationen anbieten. Denkbar wäre dabei ein Ionenaustausch mit Aminosäuren, um so in dem großen Hohlraum der DAY-Einheitszelle ein aktives Zentrum von Enzymen [191] oder Rezeptoren zu modellieren. Als Voraussetzung für weitere Untersuchungen mit DAY wären jedoch unbedingt Zeolithproben mit größeren Partikeldurchmessern erforderlich.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Mikroorganismus

Alle mikrobiologischen Untersuchungen wurden mit dem aeroben Bakterium *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 durchgeführt, das von Prof. Dr. D. J. Leak, Dept. Of Biochemistry, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London, zur Verfügung gestellt wurde.

4.1.2 Etherische Öle

Die Orangen und die reinen etherischen Öle für die Versuche zur Terpenfraktionierung wurden aus dem lokalen Handel bezogen. Spike-Lavendelöl (*Lavandula latifolia* Medic.) und Orangenöl waren kaltgepreßt und stammten aus kontrolliert biologischem Anbau.

4.1.3 Chemikalien

4.1.3.1 Bestandteile der Kulturmedien

Tabelle 4-1 Bestandteile der Kulturmedien

	Reinheit	Hersteller
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99 \%$	Riedel-De Haën
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	99 %	Riedel-De Haën
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	99 %	Riedel-De Haën
EDTA	$\geq 99 \%$	Merck
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99 \%$	Baker
K_2HPO_4	für die Molekularbiologie	Merck
KH_2PO_4	für die Molekularbiologie	Merck
LB-Agar	für die Mikrobiologie	Fluka
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99 \%$	Baker
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$> 98 \%$	Fluka
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,5 \%$	Riedel-De Haën
DL-Natriumlactat	$\geq 99 \%$	Fluka
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\geq 99,5 \%$	Fluka
Ammoniummolybdat $\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	$> 99 \%$	Fluka
Nitilotriessigsäure	$> 99 \%$	Fluka
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,5 \%$	Fluka

4.1.3.2 Substrate und Standards

Tabelle 4-2 Substrate und Standards (IS = Interner Standard, ES = Externer Standard, A = Standard für Adsorptionsversuche, S = Substrat für Biotransformation, I = Standard zur Identifikation)

	Reinheit	Hersteller	Verwendung
(1 <i>S</i>)-(-)-Borneol	≥ 99 %	Fluka	A
Butansäurebutylester	> 99 %	Fluka	A
(1 <i>R</i>)-(+)-Campher	~ 99 %	Sigma	IS
(<i>R</i>)-(-)-Carvon	~ 99 %	Fluka	A
(<i>S</i>)-(+)-Carvon	> 99 %	Merck	A
(±)-5-Decanolid	> 99 %	Aldrich	A
1-Decanal	~ 97 %	Fluka	A
Decansäuremethylester	> 99,5 %	Fluka	IS
Heptansäuremethylester	~ 99 %	Sigma	ES
(2 <i>E</i>)-Hexenal	98 %	Sigma	A
β-Ionon	~ 95 %	Fluka	A
2-Methylpropansäure	~ 99,5 %	Fluka	I
(<i>R</i>)-(+)-Limonen	~ 98 %	Fluka	A
(±)-Linalool	~ 97 %	Fluka	A
(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-Menthol	99 %	Aldrich	IS, ES
2-Methoxypyrazin	95 %	Aldrich	A
2-Methylbutansäuremethylester	≥ 98 %	Fluka	A
3-Methylbutansäuremethylester	≥ 98 %	Fluka	A
Myrcen	≥ 90 %	Fluka	A
Myrcenol	k. A.	Tastemaker	A
(<i>Z</i>)-Nerolidol	> 98 %	Fluka	A
3-Phenyl-1-propanol	99 %	EGA-Chemie	A
(1 <i>S</i>)-(-)-α-Pinen	> 97 %	Fluka	A, S
(-)-α-Pinenoxid	97 %	Aldrich	S
α- und β-Thujon	Techn.	Fluka	I
Thymol	≥ 99,5 %	Sigma	A

4.1.3.3 Chemikalien für Synthesen und Derivatisierungen

Tabelle 4-3 Chemikalien für Synthesen und Derivatisierungen

	Reinheit	Hersteller	Verwendung
1-Butanol	> 99 %	Fluka	Estersynthese
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	> 99 %,	Aldrich	Methylierung
Eisessig	99,5 %	Fluka	Methylierung
Essigsäureanhydrid	≥ 99,5 %	Fluka	Acetylierung
Isobutansäureanhydrid	≥ 98 %	Fluka	Acylierung
Natriumborhydrid	99 %	Aldrich	Reduktion
N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid (Diazald)	99 %	Aldrich	Methylierung
1-Propanol	> 99 %	Fluka	Estersynthese
Propansäureanhydrid	~ 98 %	Fluka	Acylierung

4.1.3.4 Weitere Chemikalien

Tabelle 4-4 Weitere Chemikalien

	Reinheit	Hersteller	Verwendung
AgNO ₃	chem. rein	Degussa	Chromatographie
Ammoniumacetat	> 99 %	Riedel-De Haën	Chromatographie
HCl	37 %	Riedel-De Haën	pH-Wert
KBr	für IR-Spektroskopie	Fluka	IR-Spektroskopie
KNO ₃	99 %	Riedel-De Haën	Ionenaustausch
Na ₂ CO ₃	> 99 %	Fluka	pH-Wert
NaCl	> 99 %	AppliChem	Mikroextraktion
KOH	≥ 98 %	Fluka	pH-Wert
Na ₂ SO ₄	≥ 99 %	Riedel-De Haën	Trockenmittel
NADH	≥ 95 %	Fluka	Cosubstrat

4.1.4 Lösungsmittel

Der überwiegenden Anteil der verwendeten Lösungsmittel wurde nach Gebrauch rückdestilliert und ebenso wie Faßware über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt. Die Redestillate wurden nach einer Reinheitskontrolle wieder eingesetzt. Diethylether wurde vor Gebrauch frisch destilliert.

Tabelle 4-5 Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Reinheit	Hersteller	Verwendung
Aceton	redestilliert	Hochschullieferung	Reinigung
CH ₂ Cl ₃	redestilliert	Hochschullieferung	Elution
CHCl ₃	≥ 99,8 %	Fluka	Polarimetrie
Diethylether	redestilliert	Hochschullieferung	Chromatographie, Extraktion, Synthese
Ethanol	redestilliert	Kraul & W.	Synthese
Methanol	HPLC	Baker	HPLC, Desorption, Stammlösungen
Methanol	redestilliert	Hochschullieferung	Synthese
Pentan	redestilliert	Hochschullieferung	Extraktion Chromatographie
Pentan/Diethylether 1:1,12 (v/v)	redestilliert	Hochschullieferung	Extraktion Chromatographie
2-Propanol	HPLC	Fluka	Synthese, Elution
THF	≥ 99,5 %	Fluka	Acylierung

4.1.5 Gase für die Gaschromatographie

Die Druckluft 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.

Tabelle 4-6 Gase für die Gaschromatographie

Gas	Reinheit	Hersteller	Verwendung
Druckluft	Getrocknet	Kompressor	Detektorgas
H ₂	5.0	Linde	Trägergas/Detektorgas
He	5.0	Linde	Trägergas (GC-MS)
N ₂	5.0	Linde	Trägergas, Methylierung

4.1.6 Adsorbentien und Ionenaustauscher

4.1.6.1 Zeolithe

Folgende Zeolithe wurden von der Degussa-Hüls AG zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4-7 Verwendete Zeolithe

Zeolith	Modul	Form	Partikelgröße [mm]	Chargen-Nummer
DAY	200	Si-Formkörper	1,6	D 161 / D 124
DAY	200	Pulver	k. A.	D 162
DAY	k. A.	Pulver	k. A.	k. A.
DAY	15	Pulver	k. A.	TC 164 PQ
ZSM-5	45	Si-Formkörper	1,6	13
ZSM-5	45	Al-Formkörper	2,0	KAZ 92/003
ZSM-5	28	Si-Formkörper	1,6	9
ZSM-5	28	Al-Formkörper	1,6	KAZ 92/011 + 012
ZSM-5	1000	Pulver	k. A.	KAZ 92/010
ZSM-5	150	Pulver	k. A.	KAZ 93/025
ZSM-5	28	Pulver	k. A.	KAZ 93/068 + 069

Alle für diese Arbeit eingesetzten Zeolithe lagen in der H-Form vor [169], d. h. die negativen Ladungen am Zeolith-Aluminium waren mit Wasserstoff-Ionen ausgeglichen.

Das Porenvolumen der Zeolithe betrug $0,13 \text{ mL g}^{-1}$ für Zeolithe der ZSM-5 Reihe und $0,3 \text{ mL g}^{-1}$ bei Zeolithen der DAY-Reihe. Die Messung beruht auf einer Ethylacetat-Isotherme aus der Gasphase und wurde Degussa-intern durchgeführt [169].

4.1.6.2 Weitere Adsorbentien und Ionenaustauscher

Tabelle 4-8 Weitere Adsorbentien und Ionenaustauscher (PS-DVB: Polystyren-Divinylbenzen, AA: Anionenaustauscher)

	Partikelgröße [mm]	Typ	Hersteller	Verwendung
Amberlite XAD-16	0,25 - 0,84	PS-DVB	Sigma	Adsorption
Amberlite IR-20	0,37 - 1,12	AA	Fluka	Estersynthese
Kieselgel 60	0,063 - 0,200		Merck	Chromatographie
Lewatit OC 1064	0,32 - 1,3	PS-DVB	Bayer	Adsorption
SCX	0,055	AA	ICT	Argentations- chromatographie

4.1.7 Weitere Hilfsmittel

Tabelle 4-9 Weitere Hilfsmittel

Gerät	Modell-Nr.	Hersteller
SPME Manual Holder	5-7330	Supelco
SPME-Faser (65 μm CW-DVB)	5-7312	Supelco
SPME-Faser (100 μm PDMS)	5-7300	Supelco
Filtereinheit (hydrophil), 0,45 μm , 13 mm \varnothing	5992.1	Roth
Sterilfiltrationseinheit, 0,45 μm , 30 mm \varnothing Minisart RC 25	17765	Sartorius

4.1.8 Geräte

Tabelle 4-10 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VST 50/90	Zirbus Apparatebau
Brutschrank	BE 500	Memmert
Gefrierschrank	VX 350 Series 2	Jouan
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
Steril-Werkbank	Laminar flow	Stangl
Tischzentrifuge	Piccolo	Martin Christ
Ultraschallbad	Sonorex 510H	Bandelin
Umlaufkühler	Frigomix U	B. Braun
Vakuumpumpe	Two Stage Nr. 3	Edwards
Vortexer	Dangoumill 300	Prolabo
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus Sepatech

4.2 Methoden

4.2.1 Adsorption mit Zeolithen

4.2.1.1 Bestimmung der Partikelgrößen der Zeolithe

Gerät:	Coulter Counter LS 230
Lösungsmittel:	Isopropanol
Meßbereich:	0,004 µm – 2 mm

4.2.1.2 Vorbehandlung der Adsorbentien

4.2.1.2.1 Zeolithe

Reinigung: 3 - 5 g Zeolith wurden in einer offenen Glasschale bei 500 °C 8 h im Muffelofen geglüht und damit von eventuellen organischen Rückständen befreit. Nach dem Abkühlen wurden die Zeolithe im Exsiccator gelagert.

Ionenaustausch: 1 g Zeolith wurde über Nacht mit 40 mL 1 M KNO₃ bei 30 °C geschüttelt und anschließend fünfmal mit deion. Wasser gewaschen. Die Abtrennung der Zeolithe erfolgte jeweils durch Zentrifugation (4000 g, 20 min, 3 °C) und anschließendes Dekantieren der wäßrigen Phase. Danach wurde wie oben beschrieben geglüht.

4.2.1.2.2 Polystyrenharze

Reinigung: 10 – 15 g Harz wurden in einer Soxhlet-Apparatur 24 h mit 300 mL Aceton extrahiert, über Nacht bei 100 °C getrocknet und bis zum Gebrauch im Exsiccator gelagert.

Benetzung: Zur Erhöhung der Benetzbarkeit der hydrophoben Polystyrenharze mit Wasser wurden unmittelbar vor dem Einsatz der Harze die genau eingewogenen Proben mit 20 mL (0,1 - 1 g Harz) oder 200 mL (10 – 20 g Harz) Methanol 1 h lang geschüttelt und anschließend fünfmal mit dem gleichen Volumen deion. Wasser gewaschen. Die Abtrennung der flüssigen Phasen erfolgte bei den 20 mL - Ansätzen durch Dekantieren. Größere Harzmengen wurden dazu in eine Glassäule (3 cm Ø x 40 cm) mit Fritte (Por. 0) überführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das jeweils benötigte Volumen des entsprechenden Mediums (deion. Wasser, Puffer oder Bakteriensuspension) zugegeben.

4.2.1.3 Herstellung von Standardlösungen

Die Komponenten der Aromamodelllösungen, internen und externen Standards wurden an einer Analysenwaage genau eingewogen, in Methanol (HPLC-Qualität) gelöst und auf das gewünschte Volumen (i. A. 100 mL) aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Standardlösung der für das Zeolith-Screening eingesetzten Aromamodelllösung (Abschnitt 2.2.2) bestand aus jeweils $3,3\text{ g L}^{-1}$ (*E2*)-Hexenal, 2-Methoxypyrazin, Butansäurebutylester, 1-Decanal, 3-Phenyl-1-propanol, (*S*)-(+)-Carvon, β -Ionon, δ -Decanolacton und (*Z*)-Nerolidol. Die Gesamtkonzentration betrug 30 g L^{-1} .

Die Stammlösungen zur Erstellung von Einzel-Isothermen und -Kinetiken enthielten 80 mmol L^{-1} des Adsorbats.

Für Versuche zur Trennung binärer Terpenmischungen (Limonen/Carvon und α -Pinen/Borneol) wurden methanolische Lösungen mit jeweils 40 mmol L^{-1} der Einzelkomponenten eingesetzt.

Zur Bestimmung von Kalibrationsreihen und Isothermen wurden weitere Verdünnungen der Stammlösungen angefertigt.

4.2.1.4 Screening

250 mg Zeolith wurden 1 h mit 1 mL Methanol konditioniert, dann mit 98 mL deion. Wasser und 1,0 mL Aromamodelllösung versetzt, mit einem Glasstopfen

verschlossen und 16 h bei 130 upm und 20 °C geschüttelt. Ein Leerwert ohne Zeolith wurde parallel geführt. Nach dem Absitzen des Zeoliths (ca. 2 h) wurden 50 mL aus dem Überstand entnommen, mit 0,1 mL internem Standard (0,2 mg Campher) versetzt und 0,5 mL davon zur Quantifizierung mittels SPME (CW-DVB) eingesetzt (s. Abschnitt 4.2.1.9). Die Differenz zum Leerwert wurde als adsorbierte Stoffmenge pro Gramm Zeolith berechnet. Grundsätzlich wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.2.1.5 Fraktionierung von etherischen Ölen

4.2.1.5.1 Fraktionierung von Spike-Lavendelöl

1,0 g Spike-Lavendelöl wurde mit Methanol auf 50 mL (20 g L^{-1}) verdünnt und zur Identifizierung der Hauptkomponenten mittels GC-MS (s. Abschnitt 4.2.7.3.4) untersucht. Diese Lösung wurde zum Einsatz als Stammlösung für die Adsorptionsversuche nochmals 1:5 verdünnt (4 g L^{-1}).

Jeweils 100 mg Zeolith (DAY 200 Si-Formkörper, ZSM-5 150 und ZSM-5 1000 in doppelten Ansätzen) wurden in 43 mL Oak-Ridge Zentrifugenbecher eingewogen, mit 40 mL Phosphatpuffer pH 7,0 (50 mmol L^{-1}) und 1,0 mL Stammlösung versetzt und zwei Stunden bei 30 °C, 200 upm equilibriert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (4000 g, 20 min, 3 °C) und dekantieren. Nach einem Waschschrift mit 20 mL Puffer wurden die vereinigten Überstände mit 100 µL internem Standard versetzt (3,4 mg Menthol) und mittels SPME (PDMS-Faser) gaschromatographisch quantifiziert (s. Abschnitte 4.2.1.9 und 4.2.7.3.1). Parallel wurden zwei Leerwerte ohne Zeolith geführt.

Die Desorption erfolgte mit zweimal jeweils 10 mL Methanol über zwei bzw. 16 Stunden bei 30 °C unter Agitation. Die vereinigten Desorbate wurden mit 100 µL internem Standard versetzt und gegen einen Blindwert mit 1,0 mL Stammlösung und 100 µL internem Standard (Menthol) in 20 mL Methanol quantifiziert (s. Abschnitt 4.2.7.3.2).

4.2.1.5.2 Fraktionierung von Orangenöl

20 g Orangenschalen wurden an einer Destillationsbrücke mit 800 mL deion. Wasser versetzt und erhitzt. Die Vorlage enthielt 15 g ZSM-5 1000 in 30 mL Phosphatpuffer pH 7,0 (50 mmol L⁻¹) und wurde mit Eiswasser gekühlt.

Nach einer Stunde Destillationszeit wurde der Zeolith durch Zentrifugation (4000 g, 20 min, 3 °C) abgetrennt und einmal mit 50 mL deion. Wasser gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden viermal mit 50 mL Pentan/Diethylether ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet, an einer Vigreux-Kolonnen auf ca. 10 mL eingengt und in einem Meßkolben auf 20 mL aufgefüllt.

Parallel wurde ein Blindwert geführt, der anstatt der Zeolithsuspension 20 mL Pentan/Diethylether in der Vorlage enthielt.

Die Hauptkomponenten wurden mittels GC-MS (s. Abschnitt 4.2.7.3.4) identifiziert.

4.2.1.6 Gleichgewichtsbeladung und Isothermen

4.2.1.6.1 Allgemeine Vorgehensweise

Routinemäßig wurden 4 – 6 Isothermenpunkte parallel bestimmt. Jeder Ansatz bestand aus 100 mg Zeolith und 40 mL Phosphatpuffer pH 7,0 (50 mmol L⁻¹) in 43 mL Oak-Ridge Zentrifugenbechern. Zu dieser Zeolithsuspension wurde 1,0 mL methanolische Standardlösung (s. Abschnitt 4.2.1.3) mit unterschiedlichen Konzentrationen pipettiert. Dann wurde 4 - 8 Tage bei 200 upm im Schüttler bei 20 °C oder 30 °C bis zur Einstellung des Gleichgewichts geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (4000 g, 20 min, 3 °C). Der Überstand wurde mittels SPME (PDMS-Faser) gaschromatographisch quantifiziert (s. Abschnitte 4.2.1.9 und 4.2.7.3.1).

Für Adsorptionsversuche aus organischer Lösung wurde analog verfahren. Es wurden 40 mL Methanol oder Aceton als Medium eingesetzt und 1 µL des Überstands direkt injiziert.

Die Beladung des Zeolithen im Gleichgewicht wurde jeweils aus der Differenz

zwischen der Ausgangskonzentration des Adsorptivs und der gaschromatographisch bestimmten Gleichgewichtskonzentration berechnet und als Diagramm gegen diese aufgetragen.

4.2.1.6.2 Berechnung der Isothermenparameter nach Langmuir und Freundlich

Langmuir-Isothermen

Die Gleichung für die Langmuir-Isotherme lautet wie folgt [135]:

$$q = \frac{q_{\infty} \cdot b \cdot C_{eq}}{1 + b \cdot C_{eq}} \quad (1)$$

Zur Bestimmung der Adsorptionsparameter wurde $\frac{C_{eq}}{q}$ gegen C_{eq} aufgetragen und die Regressionsgerade ermittelt.

$$\frac{C_{eq}}{q} = \frac{1}{q_{\infty} \cdot b} + \frac{1}{q_{\infty}} \cdot C_{eq} \quad (2)$$

Aus dem Achsenabschnitt und der Steigung der Regressionsgeraden konnten entsprechend der linearen Form der Gleichung (2) die Maximalbeladung q_{∞} und der Affinitäts-Parameter b berechnet werden.

Freundlich-Isothermen

Die Gleichung für die Freundlich-Isotherme lautet [135]:

$$q = k \cdot C_{eq}^n \quad (3)$$

Die lineare Form ergibt sich durch Logarithmieren:

$$\ln q = \ln k + n \cdot \ln C_{eq} \quad (4)$$

Die Freundlich-Parameter k und n wurden hier analog nach Auftragen von $\ln q$ gegen $\ln C_{eq}$ und anschließender Bestimmung der Regressionsgeraden erhalten.

4.2.1.7 Adsorptionskinetik

4.2.1.7.1 Allgemeine Vorgehensweise

0,5 g Zeolith wurden in einem 500 mL Erlenmeyerkolben mit 450 mL Phosphatpuffer (50 mmol L⁻¹, pH 7,0) versetzt, mit einem Glasstopfen verschlossen und auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurden 2,0 mL methanolische Standardlösung zugegeben. Die Ausgangskonzentration der wäßrigen Lösung betrug dann 0,36 mmol L⁻¹. Nach definierten Zeitintervallen wurden 5 mL - Proben entnommen. Dabei wurde versucht, durch möglichst kurzes Öffnen des Kolbens die Terpenverluste über die Gasphase gering zu halten. Der Zeolith wurde über einen hydrophilen Filter abgetrennt und 0,5 mL des Filtrats mittels SPME (PDMS) gaschromatographisch quantifiziert (s. Abschnitte 4.2.1.9 und 4.2.7.3.1).

Für jedes Substrat wurde ein Blindwert ohne Zeolith geführt.

4.2.1.7.2 Berechnung der Diffusionskoeffizienten

Bei Vernachlässigung von Produktverlusten über die Gasphase konnte die Gesamtmasse des Adsorbats während des Adsorptionsprozesses als konstant angesehen werden. So konnte aus der Konzentrationsabnahme des Substrats in der wäßrigen Phase für jeden Zeitpunkt direkt die Substrataufnahme durch den Zeolithen und damit seine Beladung berechnet werden.

$$q_t = \frac{C_0 - C_t \cdot V}{m_z} \quad (5)$$

Die Berechnung der Diffusionskoeffizienten erfolgte unter der Annahme, daß die Zeolithpartikel eine kugelförmige Gestalt besäßen und die Partikelgröße uniform sei. Als Teilchenradius r wurde der mittlere Radius aus der Partikelgrößenbestimmung (s. Abschnitt 2.2.1.1) eingesetzt. Die Diffusionsgleichung für kugelförmige Teilchen lautet [132]:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 D_c \frac{\partial q}{\partial r} \right) \quad (6)$$

Bei konstanter (beladungsunabhängiger) Diffusion gilt dann:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = D_c \left(\frac{\partial^2 q}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial q}{\partial r} \right) \quad (7)$$

Die Integration liefert:

$$\frac{m_t}{m_\infty} = \frac{q_t - q_0}{q_\infty - q_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D_c t}{r_c^2}\right) \quad (8)$$

bei folgenden Randbedingungen:

$$\begin{aligned} t < 0, & \quad C = C_0, & \quad q = q_0 \\ t \geq 0, & \quad C = C_\infty, & \quad q(r_c, t) \rightarrow q_\infty \\ t \rightarrow \infty, & \quad C = C_\infty, & \quad q(r, t) \rightarrow q_\infty \\ \frac{\partial q}{\partial t} \Big|_{r=0} = 0 & \quad \text{für alle } t \end{aligned}$$

Gleichung (8) bildete die Grundlage für die Berechnung der Diffusionskoeffizienten D_c für jede Beladung q_t . Da keine geeignete Software zu Verfügung stand, wurde zur Lösung der Gleichung ein schrittweises Verfahren angewandt. Zunächst wurde ein Wert für den Diffusionskoeffizienten abgeschätzt. Daraus konnte über ein Excel-Formelprogramm für $n \leq 28$ der Wert des Summenterms ermittelt und mit dem experimentell erhaltenen Beladungsanteil verglichen werden. Unter Zugrundelegung des Ergebnisses wurde der abgeschätzte Wert schrittweise dem wahren Wert angenähert.

4.2.1.8 Desorption

Die Desorption der Aromastoffe aus den Zeolithporen erfolgte mit Lösungsmitteln bei 20 °C oder 30 °C. Für die Aromamodelllösung wurde eine Lösungsmittelsequenz mit steigender Hydrophobizität (Aceton, Dichlormethan, Diethylether) verwendet. Terpene wurden mit Methanol desorbiert.

Der einmal mit 20 mL des entsprechenden Mediums (deion. Wasser oder Phosphatpuffer) gewaschene Zeolith wurde dreimal mindestens 1 h mit jeweils 10 mL Lösungsmittel im Schüttler (20 °C oder 30 °C, 200 upm) behandelt. Die

Trennung von Lösungsmittel und Zeolith erfolgte durch Zentrifugation und anschließendes Dekantieren.

Die vereinigten Eluate wurden mit 1,0 mL internem Standard (3 mg Decansäuremethylester) versetzt und 1 μ L davon gaschromatographisch quantifiziert (s. Abschnitt 4.2.7.3.1).

4.2.1.9 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Je nach Konzentration und Flüchtigkeit der gelösten Substrate wurden 0,25 - 1,0 mL wäßrige Probe in ein mit einem Rührfisch (2 x 5 mm) versehenes 4 mL - Schraubdeckelglas pipettiert und das Volumen mit Phosphatpuffer (50 mmol L⁻¹, pH 7,0) auf 4,0 mL aufgefüllt. Nach Eintauchen der SPME-Faser in die wäßrige Lösung wurde auf einem Mehrplatzrührer bei 750 upm 40 min adsorbiert. Anschließend wurde die Faser im GC-Injektor (s. Abschnitt 4.2.7.3.1) 3 min desorbiert.

Kalibration: Zur Erstellung von Kalibrationsgeraden wurden mindestens fünf Verdünnungen der entsprechenden Stammlösung angefertigt (i. A. 1:20; 1:10; 1:5; 1:2,5; 1:1,5). 1,0 mL jeder Konzentration wurden zu einem dem jeweiligen Versuch entsprechenden Ansatz pipettiert. Dieser Lösung wurden sofort 0,5 mL entnommen und mittels SPME wie oben beschrieben quantifiziert.

Die SPME-Ansätze (4,0 mL) enthielten somit 7,5 μ g; 15 μ g; 30 μ g; 60 μ g; 100 μ g und 150 μ g (Aromamodelllösung) bzw. 0,05 μ mol; 0,1 μ mol; 0,2 μ mol; 0,4 μ mol; 0,65 μ mol und 1,0 μ mol (Terpene und Ester) gelöste Substanzen.

Die Nachweisgrenzen für die einzelnen Substanzen der Aroma-modelllösung lagen unter 0,1 % der wäßrigen Adsorptionslösung (s. Abschnitt 4.2.1.4). Ausnahmen waren 2-Methoxypyrazin mit 3 % und (E2)-Hexenal mit 1 %.

Reproduzierbare Werte für Limonen waren nur für Konzentrationen bis maximal 0,1 - 0,2 mmol L⁻¹ (ca. 20 mg L⁻¹) in der Lösung erhältlich, sofern die GC-Analyse unmittelbar nach der Probenahme erfolgte. Eine Lagerung der Proben war nicht möglich. Bei α -Pinen lag die maximale Bestimmungsgrenze in wäßriger Lösung unter 0,3 mmol L⁻¹ (ca. 4 mg L⁻¹).

4.2.2 Kultivierung von *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671

4.2.2.1 Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden mindestens alle sechs Wochen Stammkulturen parallel auf zwei Agarplatten und zwei Schrägagarröhrchen mit LB-Agar angelegt und zwei Tage bei 30 °C im Brutschrank belassen. Die Röhrchen und Platten wurden dann mit Parafilm verschlossen und bei 4 – 7 °C im Kühlschrank gelagert.

4.2.2.2 Kulturmedium

4.2.2.2.1 Zusammensetzung des Kulturmediums

Die Zusammensetzung des Kulturmediums entsprach weitgehend dem von COHEN-BAZIRE et al. [192] beschriebenen *Pseudomonas* Basal Minimal Medium. Die Wahl der Kohlenstoffquelle erfolgte entsprechend den Empfehlungen von Herrn D. J. Leak. Neben einer Mineralsalzlösung (2 % v/v) und Phosphatpuffer pH 6,8 (4 % v/v) enthielt das Medium 1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ als Stickstoffquelle, 2 g L⁻¹ Natriumlactat als Kohlenstoffquelle und 0,25 % v/v (-)- α -Pinen zur Induktion der für den α -Pinenabbau notwendigen Enzyme.

Pufferlösung: Die Pufferlösung bestand aus 9,94 g KH₂PO₄ und 7,8 g K₂HPO₄ in 300 mL bidest. Wasser und wurde mit KOH auf pH 6,8 eingestellt.

Tabelle 4-11 Zusammensetzung der Spurenelementelösung

Salz	Konzentration [mg L ⁻¹]
EDTA	250
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1095
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	500
MnSO ₄ · H ₂ O	154
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	39,2
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	20,3
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	17,7

Mineralsalzlösung: Zur Herstellung der Mineralsalzlösung (Tabelle 4-12) wurde Nitritotriessigsäure zunächst durch Neutralisation mit KOH gelöst. Dann wurden die weiteren Salze und 50 mL einer gemäß Tabelle 4-10 hergestellten Spurenelementelösung in bidest. Wasser zugegeben, der pH-Wert mit KOH auf 7,2 eingestellt und mit bidest. Wasser auf 1,0 L aufgefüllt.

Tabelle 4-12 Zusammensetzung der Mineralsalzlösung pH 7,2

Salz	Konzentration [g L ⁻¹]
Nitritotriessigsäure	10
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	29,7
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	3,34
Ammoniummolybdat	9,25
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,099
Spurenelementelösung	50 mL

4.2.2.2.2 Herstellung steriler Kulturmedien

In 500 mL bidest. Wasser wurden 1 g (NH₄)₂SO₄ und 2 g Natriumlactat gelöst, mit 20 mL Mineralsalzlösung versetzt und mit bidest. Wasser auf 960 mL aufgefüllt. Zehn 300 mL Erlenmeyerkolben wurden mit jeweils 96 mL dieser Lösung befüllt, mit Cellulosestopfen verschlossen und mit Alufolie abgedeckt und gemeinsam mit der Pufferlösung 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Nach dem Abkühlen wurden 4 mL Pufferlösung steril jedem Kolben zupipettiert und mit 250 µL sterilfiltriertem (-)-α-Pinen versetzt.

4.2.2.2 Transformationsmedium

Das Transformationsmedium für die ruhenden Zellen bestand aus unsterilem Phosphatpuffer pH 7,5 (20 mmol L⁻¹).

4.2.2.3 Anzucht von Biomasse in Minimalmedium

Eine Impföse aus einer Schrägagar-Stammkultur wurde in einen mit 100 mL Kulturmedium befüllten Erlenmeyerkolben überführt und 24 h im Schüttler bei 30 °C und 200 upm inkubiert. Jeweils 5 mL der Vorkultur wurden dann steril in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Kulturmedium pipettiert und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Routinemäßig wurden während einer Aufarbeitung aus zwei Vorkulturen 18 Kolben beimpft.

Nach 24 h wurden die Zellen vom Medium durch Zentrifugation bei 4000 g (3 °C, 20 min) getrennt, zweimal mit 200 mL Transformationspuffer aufgeschlämmt und wieder abzentrifugiert. Die gewaschenen Zellpellets wurden in 200 mL Transformationspuffer suspendiert und die optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm durch Verdünnung mit Puffer auf den Wert 10 eingestellt. Bei einer Routineaufarbeitung wurden 300 – 450 mL Zellsuspension erhalten, die entweder direkt für die Transformationsexperimente eingesetzt oder in 40 mL bzw. 100 mL Portionen bei –20 °C eingefroren wurden.

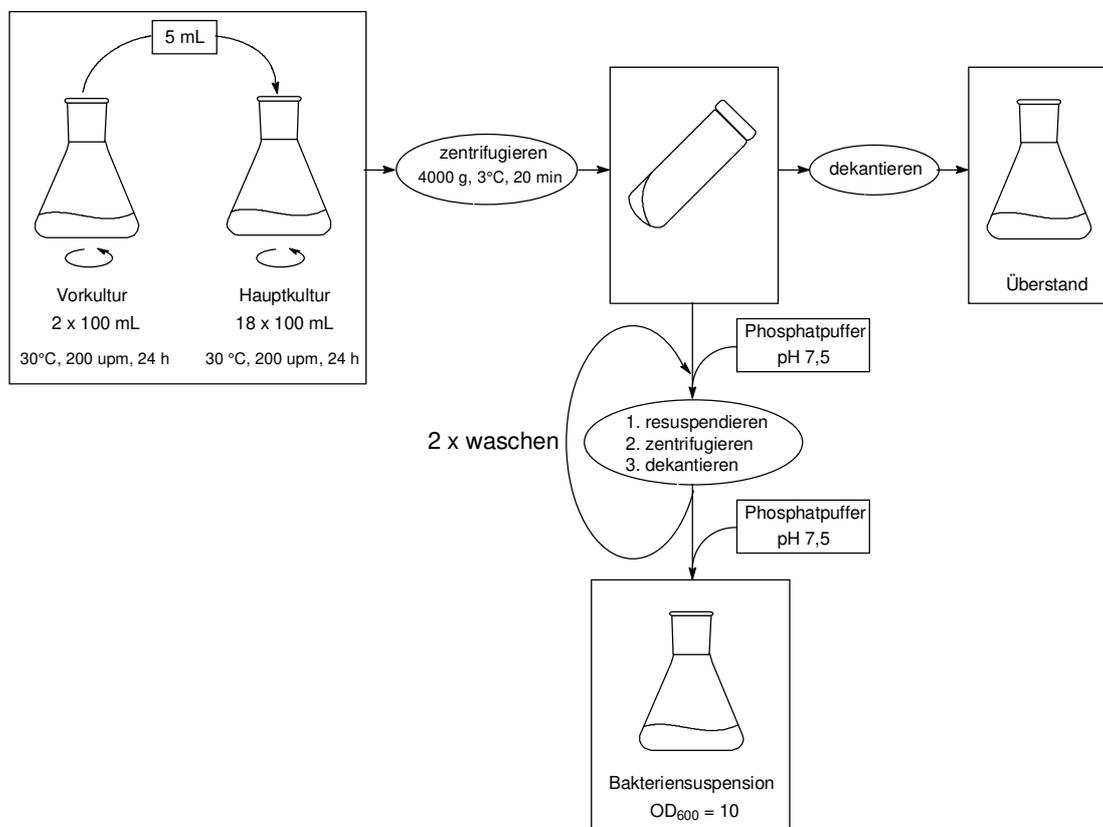


Abb 4-1 Arbeitsschema für die Anzucht von Biomasse in Minimalmedium

4.2.3 Biotransformation mit ruhenden Zellen

4.2.3.1 Isolierung und Identifizierung der Transformationsprodukte aus (-)- α -Pinenoxid

4.2.3.1.1 Transformation unter Sauerstoff-Limitierung

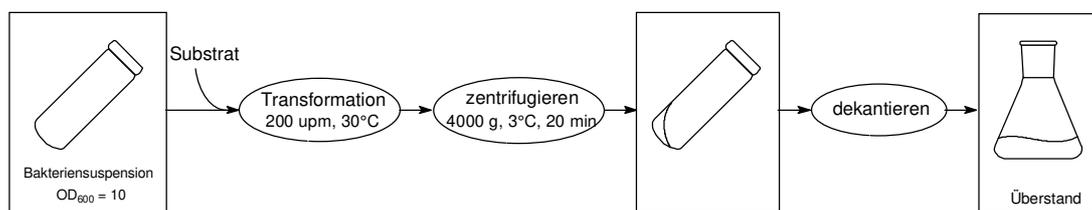


Abb 4-2 Arbeitsschema für die Transformationen unter Sauerstoff-Limitierung

40 mL in 43 mL Oak-Ridge Zentrifugenbecher eingefrorene Bakteriensuspension wurden bei Raumtemperatur in einem Wasserbad aufgetaut (ca. 3 h) und 10 min bei 30 °C und 200 upm im Schüttler temperiert. Dann wurden 50 μ L (-)- α -Pinenoxid direkt hinzupipettiert. Der Becher wurde sofort gasdicht verschlossen und bei 30 °C und 200 upm im Schüttler inkubiert. Nach definierten Zeitintervallen (i. A. 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 3 h und 5 h) wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 g, 15 min, 3 °C) und der Medienüberstand zur Produktisolierung eingesetzt (s. Abschnitt 4.2.3.1.3).

4.2.3.1.2 Mehrfache Transformation ohne Sauerstofflimitierung

40 mL frische Bakteriensuspension wurde in einen 100 mL Erlenmeyerkolben gegeben und mit 50 μ L (-)- α -Pinenoxid bei 30 °C und 200 upm im Schüttler inkubiert. Nach 20 min wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 g, 15 min, 3 °C) und der Medienüberstand zur Produktisolierung eingesetzt (s. Abschnitt 4.2.3.1.3). Das Zellpellet wurde mit 20 mL Transformationspuffer gewaschen, in 40 mL Puffer resuspendiert und in gleicher Weise für einen zweiten und dritten

Transformationszyklus eingesetzt.

4.2.3.1.3 Produktisolierung für die Gaschromatographie

Das Medium wurde mit dem Waschwasser vereinigt und fünfmal mit 20 mL Pentan/Diethylether (1:1,12 v/v) ausgeschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (3000 g, 10 min, 3 °C). Um auch saure Metabolite zu erfassen, wurde nach dem dritten Extraktionsschritt mit 3 N HCl auf pH 1-2 angesäuert. Die über Natriumsulfat getrockneten vereinigten Extrakte wurden in einen 100 mL Meßkolben überführt, bis zur Marke mit Pentan/Diethylether aufgefüllt und 1 µL gaschromatographisch analysiert (s. Abschnitt 4.2.7.3.2 und 4.2.7.3.4). Auf die Mitführung von internen Standards wurde hier verzichtet, um möglichst saubere Proben für die Aufreinigung und Identifizierung der Produkte zu erhalten. Die Quantifizierung erfolgte extern gegen eine mit Menthol erstellte Kalibrationsreihe.

4.2.3.1.4 Aufreinigung der Produkte

Säuren: Zur Isolierung der *Novalsäure* wurde die organische Lösung der Metabolite aus Abschnitt 4.2.3.1.3 viermal mit 25 mL 5 % Na₂CO₃ extrahiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden anschließend mit 3 M HCl auf pH 1-2 angesäuert und die Säuren fünfmal mit 20 mL Pentan/Diethylether in die organische Phase überführt. Das azeotrope Pentan/Diethylether-Gemisch wurde an einer Vigreux-Kolonnen bei 40 °C abdestilliert. Lösungsmittelreste wurden im Stickstoffstrom entfernt. 20 mg der isolierten Säure wurden direkt zur NMR-Spektroskopie (s. Abschnitt 4.2.8.1) eingesetzt.

Alkohole: Die Ansätze aus Abschnitt 4.2.3.1.1 enthielten nach 3 h und 5 h Transformationsdauer *Novalsäure* und *Novalol* als Hauptprodukte. Nach der Abtrennung der Säure (s. o.) wurde die verbliebene organische Phase an der Vigreux-Kolonnen auf ca. 2 mL eingengt und mittels präparativer Gaschromatographie (s. Abschnitt 4.2.7.3.6) weiter aufgereinigt. Dabei wurden ca. 3 mg *Novalol* gewonnen und zur NMR-Spektroskopie (s. Abschnitt 4.2.8.1) eingesetzt.

Aldehyde: Nach 20 min Transformationsdauer enthielten die Ansätze aus Abschnitt 4.2.3.1.1 als Hauptprodukt *Novalal* neben Novalsäure und Novalol. Nach der Abtrennung der Säure (s. o.) wurde die verbliebene organische Phase an der Vigreux-Kolonnen auf ca. 1 mL eingengt und über eine Kieselgelsäule (s. Abschnitt 4.2.7.1) aufgetrennt. Fraktion 3 enthielt reines Novalal. Das Lösungsmittel Diethylether wurde im Stickstoffstrom entfernt.

Isonovalal lag als Hauptprodukt nach 20 min Transformationszeit im dritten Transformationszyklus (s. Abschnitt 4.2.3.1.1) vor. Einziges Nebenprodukt war Novalal im Verhältnis ~1:20. Eine weitere Aufreinigung war nicht möglich. Das Lösungsmittel wurde an einer Vigreux-Kolonnen bei 40 °C abdestilliert und die Lösungsmittelreste im Stickstoffstrom entfernt.

4.2.3.1.5 Probenvorbereitung für die HPLC

Ein Teil der gemäß Abschnitt 4.2.3.1.3 aufgereinigten Probe wurde in 4 mL Methanol gelöst, gegebenenfalls verdünnt und 25 µL direkt in die Probenschleife des HPLC-DAD Systems (s. Abschnitt 4.2.9.2) eingespritzt.

4.2.3.2 Kinetik der Produktbildung

4.2.3.2.1 Transformationskinetik bei einmaliger Substratzugabe

Allgemeine Vorgehensweise: 10 – 50 µL reines Terpen oder Terpenisolat wurden zu 40 mL vortemperierter (10 min) Bakteriensuspension pipettiert und bei 30 °C, 200 upm in 100 mL Erlenmeyerkolben geschüttelt. Nach definierten Zeitintervallen wurde jeweils 1,0 mL Probe entnommen und entsprechend den Abschnitten 4.2.3.2.4 und 4.2.7.3.2 aufgearbeitet und quantifiziert.

Säurebildung: In 100 mL Erlenmeyerkolben wurden jeweils 20 mL vortemperierte (10 min) Bakteriensuspension, 0,4 mL Mineralsalzlösung (Abschnitt 4.2.1.2.1) und 20 mg Ammoniumsulfat vorgelegt, mit 25 µL (-)- α -Pinenoxid versetzt und bei 30 °C und 200 upm geschüttelt. Nach definierten Zeitintervallen (30 min, 60 min, 120 min,

180 min und 240 min) wurden die Ansätze wie in Abschnitt 4.2.3.1.3 beschrieben vollständig aufgearbeitet und quantifiziert.

4.2.3.2.2 Transformationskinetik bei semi-kontinuierlicher Substratdosierung

Versuch 1: 100 mL frisch gewonnene Bakteriensuspension (s. Abschnitt 4.2.2.3) wurde in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit Rührfisch überführt und 10 min in einem Wasserbad bei 30 °C auf einem Magnetrührer temperiert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ und alle weiteren 10 min wurden jeweils 100 μL (-)- α -Pinenoxid zupipettiert. Unmittelbar vor jeder Substratzugabe wurde 1,0 mL Bakteriensuspension entnommen und gaschromatographisch quantifiziert (s. Abschnitte 4.2.3.2.4 und 4.2.7.3.2). Nach 2 h wurde aufgearbeitet (s. u.).

Versuch 2: 100 mL bei Raumtemperatur aufgetaute Bakteriensuspension (s. Abschnitt 4.2.2.3) wurde in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit Rührfisch überführt und 10 min in einem Wasserbad bei 30 °C auf einem Magnetrührer temperiert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ und alle weiteren 15 min wurden jeweils 200 μL (-)- α -Pinenoxid zupipettiert. Unmittelbar vor jeder Substratzugabe wurde 1,0 mL Bakteriensuspension entnommen und gaschromatographisch quantifiziert (s. Abschnitte 4.2.3.2.4 und 4.2.7.3.2). Die Aufarbeitung (s. u.) erfolgte nach 3 h.

Versuch 3: 100 mL bei Raumtemperatur aufgetaute Bakteriensuspension (s. Abschnitt 4.2.2.3) wurde in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit Rührfisch überführt und 10 min in einem Wasserbad bei 30 °C auf einem Magnetrührer temperiert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ und alle weiteren 20 min wurden jeweils 500 μL (-)- α -Pinenoxid zupipettiert. Unmittelbar vor jeder Substratzugabe wurde 100 μL Bakteriensuspension entnommen und gaschromatographisch quantifiziert (s. Abschnitte 4.2.3.2.4 und 4.2.7.3.2). Die Aufarbeitung (s. u.) erfolgte nach 5 h.

Aufarbeitung: Die Bakteriensuspension wurde sechsmal mit 60 mL Pentan/Diethylether ausgeschüttelt, wobei nach dem dritten Extraktionsschritt mit 6 M HCl auf pH 1-2 angesäuert wurde. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (4000 g, 20 min, 3 °C). Die vereinigten Extrakte wurden bei 40 °C an einer Vigreux-Kolonnen eingeeengt und auf 100 mL (Versuche 1 und 2) bzw. 250 mL (Versuch 3) im

Meßkolben aufgefüllt. Zur Quantifizierung wurden hiervon 0,5 mL entnommen, mit 1,0 mL internem Standard (10 mg Menthol) versetzt, verdünnt und gaschromatographisch bestimmt (s. Abschnitt 4.2.7.3.2).

4.2.3.2.3 Transformationskinetik im zwei-Phasen-System mit Lewatit OC 1064

Versuch 1: 12 g nach Abschnitt 4.2.1.2.2 vorbehandeltes Lewatit OC 1064 wurde in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit Rührfisch überführt, mit 100 mL Bakterien-suspension (s. Abschnitt 4.2.2.3) versetzt und in einem Wasserbad bei 30 °C mit einem Magnetrührer gerührt. Nach 10 min Temperierzeit wurden 2,4 mL (-)- α -Pinenoxid zupipettiert. Nach jeweils 15 min wurden 1 mL - Proben aus dem Überstand entnommen und entsprechend Abschnitt 4.2.3.2.4 analysiert. Nach 3 h wurde der gesamte Ansatz zur Abtrennung des Harzes in eine Glassäule (3 cm \varnothing x 40 cm) mit Fritte (Por. 0) überführt, mit 50 mL Transformationspuffer gewaschen und mit 100 mL Methanol und 200 mL Pentan/Diethylether eluiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit 6 M HCl auf pH 1-2 angesäuert und fünfmal mit 40 mL Pentan/Diethylether extrahiert. Die organischen Extrakte wurden dann an der Vigreux-Kolonnen auf ca. 50 mL Gesamtvolumen eingeeengt und in einem Meßkolben auf 100 mL aufgefüllt. Zur Quantifizierung wurden hiervon 0,5 mL entnommen, mit 1,0 mL internem Standard (10 mg Menthol) versetzt, verdünnt und gaschromatographisch bestimmt (s. Abschnitt 4.2.7.3.2).

Versuch 2: 20 g vorbehandeltes Lewatit OC 1064 wurde in einen 300 mL Erlenmeyerkolben überführt, mit 100 mL Bakteriensuspension (s. Abschnitt 4.2.2.3) versetzt und in einem Wasserbad wie oben beschrieben gerührt. Nach 10 min Temperierzeit wurde die Transformation durch Zugabe von 5 mL (-)- α -Pinenoxid gestartet und nach jeder Stunde wurde nochmals 1 mL Substrat nachdosiert. Unmittelbar vor jeder Zugabe wurde 1 mL Bakteriensuspension entnommen und gemäß Abschnitt 4.2.3.2.4 analysiert. Nach 5 h erfolgte die Aufarbeitung wie oben beschrieben, jedoch wurde mit insgesamt 400 mL Pentan/Diethylether eluiert.

4.2.3.2.4 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie (Mikroextraktion)

In 10 mL Zentrifugengläser mit Schraubverschluss wurden jeweils 0,5 g NaCl eingewogen und 4,0 mL Pentan/Diethylether mit 4 mg internem Standard Menthol pipettiert. Zur Detektion von sauren Metaboliten wurden außerdem 200 μ L 3 N HCl vorgelegt. Nach Zugabe der Probe wurde das Röhrchen kräftig geschüttelt und zur Zerstörung der Zellen 3 min im Ultraschallbad behandelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge (15 min). Die organische Phase wurde in ein 4 mL Probenglas pipettiert, das 1,0 g Na₂SO₄ als Trockenmittel enthielt, und bis zur gaschromatographischen Untersuchung (s. Abschnitt 4.2.7.3.2) bei – 18 °C gelagert.

Wiederfindung: Zur Überprüfung der Effektivität der Mikroextraktion wurden Verdünnungen eines Produktisolats bekannter Zusammensetzung (Novalal, Novalol und Novalsäure) aus Abschnitt 4.2.3.1.3 hergestellt und nach Entfernung des Lösungsmittels mit jeweils 1,0 mL totautoklavierter Bakteriensuspension versetzt. Die Extraktion erfolgte wie oben beschrieben. Die Wiederfindungen lagen bei $100,3 \pm 0,6$ % (Novalal), $100,0 \pm 0,5$ % (Novalol) und $100,0 \pm 3,1$ % (Novalsäure).

4.2.3.3 Stabilität und Blindwerte

Allgemeine Vorgehensweise: 10 – 50 μ L reines Terpen oder Terpenisolat wurden zu 40 mL vortemperiertem (10 min) Medium pipettiert und bei 30 °C, 200 upm in gasdicht verschlossenen Zentrifugenbechern (43 mL) geschüttelt. Nach definierten Zeitintervallen wurden jeweils 1,0 mL Probe entnommen und diese entsprechend den Abschnitten 4.2.3.2.4 und 4.2.7.3.2 aufgearbeitet und quantifiziert.

Medien: Folgende Medien kamen zum Einsatz:

- Transformationspuffer pH 7,5 (20 mmol L⁻¹ K₂HPO₄ / KH₂PO₄)
- Puffer pH 6,0 (20 mmol L⁻¹ K₂HPO₄ / KH₂PO₄)
- Salzlösung pH 4,5 (Puffer pH 6,0 mit 0,5 M HCl auf pH 4,5 eingestellt)

- Salzlösung pH 9,0 (Puffer pH 7,5 mit 1 M NaOH auf pH 9,0 eingestellt)
- Puffer pH 7,5 mit 1 g L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Puffer pH 7,5 mit 10 % (v/v) Mineralsalzlösung (Abschnitt 4.2.1.2.1)
- Autoklavierte Bakteriensuspension
- Zellfreies Medium nach einem Transformationszyklus: Hierfür wurde Bakterienmedium eingesetzt, das gemäß Abschnitt 4.2.3.1.1 bereits einmal (20 min) für die α -Pinenoxid-Umsetzung verwendet wurde. Nach der Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation wurde das Medium zur adsorptiven Entfernung der organischen Transformationsprodukte mit 1 g konditioniertem Lewatit versetzt und zwei Stunden bei 30 °C, 200 upm geschüttelt. Das Adsorbens wurde durch Filtration entfernt (Blindwert zum zweiten Transformationszyklus).

4.2.4 Berechnung von Kovats-Indices

Die Kovats-Indices wurden nach folgender Formel berechnet:

$$KI = 100 \cdot N + 100 \cdot n \cdot \frac{(\lg t'_A - \lg t'_N)}{(\lg t'_{N+n} - \lg t'_N)}$$

t' = relative Retentionszeit = Retentionszeit (t) – Totzeit (t_0)

A = Analyt

N = Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyten eluiert wird

n = Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierten Alkans

Die Alkanreihe enthielt alle Alkane von C_6 bis C_{28} mit Ausnahme von C_{27} .

4.2.5 Synthesen und Derivatisierungen

4.2.5.1 Reduktion von Isonovalal und Novalal zu den Alkoholen

Ansatz 1: 10 μL isoliertes Isonovalal bzw. Novalal (s. Abschnitt 4.2.3.1.3) wurden zu 1,0 mL einer Lösung von Natriumborhydrid in Methanol (1 g L^{-1}) pipettiert und 48 h bei Raumtemperatur belassen. Die Proben wurden mit Pentan/Diethylether auf ca. 30 mL verdünnt und mittels GC-MS und GC-O (s. Abschnitte 4.2.7.3.4 und 4.2.7.3.3) untersucht.

Ansatz 2: 1 mL isoliertes Isonovalal (s. Abschnitt 4.2.3.2.2) wurden in 50 mL Methanol gelöst und mit 200 mg Natriumborhydrid versetzt. Nach 48-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Methanol am Rotavapor abdestilliert. Der Rückstand wurde zur Entfernung von überschüssigem Natriumborhydrid mit 100 mL Wasser versetzt und viermal mit 100 mL Pentan/Diethylether ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt. Der Rückstand (1,1 g) enthielt 75 % reines Isonovalol.

Zur weiteren Aufreinigung wurden 0,2 mL des Isolats über eine Kieselgelsäule (s. Abschnitt 4.2.7.1.1) gegeben. Die Fraktionen 12-14 wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Die GC-Analyse ergab 90 % Reinheit. Diese Probe wurde für die IR-Spektroskopie (s. Abschnitt 4.2.8.2) eingesetzt.

Fraktion 11 aus der Kieselgel-Trennung wurde auf ca. 2 mL eingeeengt und mittels präparativer Gaschromatographie (s. Abschnitt 4.2.7.3.6) für die NMR-Spektroskopie (s. Abschnitt 4.2.8.1) aufgereinigt. Dabei wurden 27 mg Isonovalol (GC-Reinheit 98 %) gewonnen und für die NMR-Spektroskopie eingesetzt.

4.2.5.2 Acylierung von Novalol

Essigsäureester: In einem braunen 4 mL Schraubdeckelglas mit Rührfisch wurden 10 μ L Novalol in 1,0 mL wasserfreiem THF gelöst und mit 20 μ L Acetylchlorid versetzt. Nach zweitägigem Rühren auf dem Mehrplatzrührer war die Umsetzung abgeschlossen. Die Identifizierung der Produkte erfolgte nach Verdünnung der Probe durch GC-MS (s. Abschnitt 4.2.7.3.4). Die Probe wurde außerdem mittels GC-O (s. Abschnitt 4.2.7.3.3) auf Geruchsaktivität des Produkts geprüft.

Propansäure- und Isobutansäureester: Zu 1,0 mL wasserfreiem Pyridin wurden in einem braunen 4 mL Schraubdeckelglas mit Rührfisch 10 μ L Novalol pipettiert und mit 100 μ L Propansäureanhydrid bzw. Isobutansäureanhydrid versetzt. Nach fünfständigem Rühren auf dem Mehrplatzrührer wurde die Umsetzung abgebrochen, indem mit Pentan/Diethylether auf ca. 30 mL verdünnt und das Pyridin dreimal mit 20 mL 1 N HCl ausgeschüttelt wurde. Anschließend wurde überschüssige Säure dreimal mit 5 % Na_2CO_3 -Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und mittels GC-MS und GC-O (s. Abschnitte 4.2.7.3.4 und 4.2.7.3.3) untersucht.

4.2.5.3 Methylierung der Säuren mit Diazomethan

Zur Erzeugung von Diazomethan wurde Stickstoff in einer Apparatur nach [288] in ein Zweiphasensystem eingeleitet, das aus 1 mL 2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol und 1,5 mL KOH (60 % w/v) als unterer Phase, sowie 0,5 g N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid in 3 mL Diethylether als oberer Phase, bestand. Das Gas wurde in die Lösung der Probe in Diethylether, der vorher zum Abfangen überschüssigen Diazomethans drei Tropfen Methanol zugesetzt wurden, solange eingeleitet, bis eine Gelbfärbung erkennbar war. Die Gasentwicklung konnte durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig beendet werden. Die Produkte wurden durch GC-MS identifiziert und mittels GC-O (s. Abschnitte 4.2.7.3.4 und 4.2.7.3.3) auf Geruchsaktivität geprüft.

4.2.5.4 Veresterung und Umesterung

Veresterung der Novalsäure: 2 g stark saurer Anionenaustauscher (Amberlite IR-20) wurden mit 1 N HCl vorbehandelt und anschließend dreimal mit deion. Wasser gewaschen. Dann wurde bei 100 °C 24 h lang getrocknet. In vorgetrockneten Kolben wurden jeweils 5 mL wasserfreier Ethanol, 2-Propanol, 1-Propanol oder 1-Butanol vorgelegt und mit 0,5 g getrockneten Ionenaustauscher und 20 µL isolierter Novalsäure versetzt. Nach 48 h wurde der Alkohol am Rotavapor entfernt. Die Probe wurde mit 50 mL Pentan/Diethylether versetzt und dreimal mit 5 % Na₂CO₃ zu Entfernung der überschüssigen Säure ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und mittels GC-MS und GC-O (s. Abschnitte 4.2.7.3.4 und 4.2.7.3.3) untersucht.

Umesterung von 3,4-Dimethylpentansäuremethylester und 2,5,6-Trimethyl-2-heptensäuremethylester: 0,5 g stark saurer Anionenaustauscher (Vorbehandlung wie oben) wurde zu ca. 50 mg der in Pentan gelösten Methylester gegeben, mit 200 mg (-)-Menthol versetzt, gasdicht verschlossen und bei 80 °C sechs Tage im Trockenschrank belassen. Die Produkte wurden mittels GC-MS (s. Abschnitt 4.2.7.3.4) untersucht.

4.2.6 Ermittlung von Geruchsschwellenwerten

Die Geruchsschwellenwerte im Verdünnungsmedium Luft wurden mittels GC-O in Anlehnung an die Arbeiten von CHRISTOPH [10] bestimmt.

Die Kapillarsäule im Gaschromatographen (s. Abschnitt 4.2.7.2.3) wurde am Ende mit einem Y-Glasverbinder versehen, der den Gasstrom in zwei gleiche Teile aufspaltet und über zwei weitere, ca. 35 cm lange Säulenstücke zum FID-Detektor bzw. zum Sniffport führt. So konnte parallel zur olfaktorischen Detektion der Substanzpeak am Integrator verfolgt und quantifiziert werden. Der Sniffport war auf 200 °C geheizt um ein vorzeitiges Kondensieren der Prüfsubstanz zu verhindern und mündete in einen mit Teflonband abgedichteten Glastrichter (4 cm Ø).

Die Testpersonen wurden angewiesen, gleichmäßig und langsam (mindestens zwei Sekunden lang) durch die Nase einzusatmen und schnell durch den Mund auszuatmen, so daß der Gasstrom möglichst quantitativ erfaßt werden konnte.

Für qualitative Bestimmungen wurden 250 – 1000 ng Substanz eingesetzt. Zur quantitativen Bestimmung einer Geruchsschwelle wurde zunächst die Geruchsqualität der jeweiligen Prüfsubstanz einmal von jeder Testperson mit einer ausreichend konzentrierten Probe geübt. Dann wurden Verdünnungen hergestellt. Mittels einfacher ja-nein-Entscheidungen wurden für mindestens sieben Testpersonen die individuellen Schwellen bestimmt. Als Geruchsschwelle, die von mindestens 50 % der Testpersonen erkennbar ist, wurde der Mittelwert der individuellen Schwellen mit einem Schwankungsbereich von $\pm 20\%$ angegeben.

4.2.7 Chromatographie

4.2.7.1 Säulenchromatographie

4.2.7.1.1 Fraktionierung von Terpenen an Kieselgel

Eine Glassäule (1,5 cm \varnothing x 25 cm) mit Fritte (Por. 2) wurde mit 15 g Kieselgel 60 befüllt und mit Diethylether equilibriert. Nach Aufgabe von ca. 1 mL Produktlösung in Diethylether wurde mit Diethylether bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 - 2 Tropfen pro Sekunde eluiert. Dabei wurden 5-Minuten-Fractionen aufgefangen und gaschromatographisch (s. Abschnitt 4.2.7.3.2) untersucht.

4.2.7.1.2 Argentationschromatographie

2 g SCX Kationenaustauscher wurden in eine Glassäule (1,5 cm \varnothing x 25 cm) mit Fritte (Por. 2) gefüllt und mit 50 mL 1%iger (w/v) Ammoniumacetat-Lösung konditioniert. Dann wurde mit 50 mL deion. Wasser gewaschen. Die Beladung mit Silberionen erfolgte durch langsames Durchleiten von 1%iger (w/v) Silbernitratlösung [24].

Die Methylester (ca. 20 mg) wurden in 0,5 mL Pentan gelöst und auf die Säule aufgegeben. Eluiert wurde mit 5 mL Pentan, 25 mL Pentan/Diethylether 98:2 v/v, 25 mL Pentan/Diethylether 90:10 v/v, 10 mL Diethylether und 10 mL Methanol.

Dabei wurden 3 mL - Fraktionen aufgefangen und gaschromatographisch untersucht. Die Fraktionen 4 - 7 enthielten 3,4-Dimethylpentansäuremethylester und 2,5,6-Trimethyl-2-heptensäuremethylester (Säure 1). Sie wurden vereinigt und für die weitere Aufreinigung durch präparative Gaschromatographie (s. Abschnitt 4.2.7.3.6) eingesetzt. Die zweifach ungesättigten Ester befanden sich in den Fraktionen 15 - 18.

4.2.7.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Pumpe:	PU-980 Intelligent HPLC Pump (Jasco)
Degasser:	DG-980-50 3-Line Degasser (Jasco)
Gradientenformer:	LG-980-02 Ternary Gradient Unit (Jasco)
Injektionsventil:	RH 7725i mit 20 µL Probenschleife (Rheodyne)
Detektor:	MD-910 Multiwavelength Detector (Jasco)
Auswerteeinheit	Dell Dimension 166a mit Borwin-PDA Version 1.0 (JMBS Developments)
Trennsäule:	Nucleosil 120-5-C ₁₈ ; 5 µm, 250 × 4 mm, Vorsäule 11 × 4 mm (Macherey – Nagel)
Flußrate:	1 mL min ⁻¹
Fließmittel A:	Methanol
Fließmittel B:	Bidest. Wasser
Gradient:	A:B 50:50 ⇒ 100:0 in 30 min

4.2.7.3 Kapillargaschromatographie

4.2.7.3.1 Gaschromatographie mit Split-Splitless-Injektion und Flammenionisationsdetektor

Gaschromatograph:	HRGC Fractovap 4160 (Carlo Erba)
Injektor:	Split-Splitless (1:10), 250 °C, Splitöffnung nach 1 min, bei SPME nach 2 min
Vorsäule:	FS-Phenyl-Sil deaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)

Trennsäule:	BC SE 54 fused silica, 25 m × 0,32 mm ID, 0,4 µm Filmdicke (Leupold)
Detektor:	FID, 270 °C
Trärgas:	H ₂ ; Vordruck: 50 kPa; Fluß: 3,3 mL min ⁻¹
Detektorgase:	H ₂ :50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chromatopac C-R5A Integrator (Shimadzu)
Temperaturprogramme:	I.: 40 °C (3 min), 3 °C min ⁻¹ - 230 °C (20 min) II. (SPME): 40 °C (2 min), 4 °C min ⁻¹ - 230 °C (5 min)

4.2.7.3.2 Gaschromatographie mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektor

Gaschromatograph:	Satochrom (Sato)
Injektor:	On-column
Vorsäule:	FS-CW-desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule:	CW 20M, 30 m × 0,32 mm ID x 0,25 µm Filmdicke (Macherey-Nagel)
Detektor:	FID, 230 °C
Trärgas:	H ₂ ; Vordruck: 45 kPa; Fluß: 3,3 mL min ⁻¹
Detektorgase:	H ₂ : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chrom Card Version 1.19 (CE Instruments)
Temperaturprogramme:	I. 40 °C (3 min), 3 °C min ⁻¹ - 230 °C (20 min) II. 40 °C (3 min), 4 °C min ⁻¹ - 230 °C (5 min)

4.2.7.3.3 Gaschromatographie mit olfaktorischer Detektion (GC-O)

Gaschromatograph, Injektor, Säulen und Gase: *siehe 4.2.1.2*

Detektoren:	FID, 230 °C; Sniff-Port, 200 °C
Datenaufnahme:	Chromatopac C-R5A Integrator (Shimadzu)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 4 °C min ⁻¹ - 230 °C (10 min)

4.2.7.3.4 Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor (GC-MS)

Gaschromatograph:	GC 8000 (Fisons)
Detektor:	MD 800 (Fisons)
Injektor:	On column
Vorsäule:	FS-CW-desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule:	CW 20M, 25 m × 0,32 mm ID × 0,4 µm Filmdicke (Macherey – Nagel)
Trägergas:	He ; Vordruck: 50 kPa
Temperaturen:	Ionenquelle: 200 °C, Interface: 230 °C Quadrupol-Massenfilter: 100 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich:	<i>m/z</i> 33-300
Datenaufnahme:	Masslab Version 1.3 (Fisons)
Spektrenbibliotheken:	NIST, LIBTX, Wiley, institutseigene Referenzdatei
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 3 °C min ⁻¹ - 230°C (20 min)

4.2.7.3.5 Gaschromatographie zur Enantiomerentrennung

Gaschromatograph:	Sichromat 2-8 (Siemens)
Injektor:	PTV
Vorsäule:	FS-CW-desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule 1:	FS-CW 20M–CB-0.35 30 m × 0,32 mm ID × 0,38 µm Filmdicke (Chromatographie-Service)
Trennsäule 2:	Cyclosil B [Heptakis-(2,3-di-O-methyl)-6-O-t- butyldimethylsilyl-β-Cyclodextrin 30 % in DB-1701], 30 m × 0,32 mm ID × 0,25 µm Filmdicke (J&W)
Detektoren 1 und 2:	FID, 230 °C
Druckparameter	Anfangsdruck am PTV: ~ 107 kPa Mitteldruck: ~ 45 kPa Positiver Differenzdruck: 230 Pa Negativer Differenzdruck: - 850 Pa

Detektorgase:	H ₂ und Luft: ≥ 200 kPa	
Datenaufnahme 1 und 2:	Chromatopac C-R5A Integrator (Shimadzu)	
Schnitte:	3,4-DM-pentansäuremethylester:	16,4 – 16,7 min
	2,6,7-TM-2-heptensäuremethylester:	29,0 – 32,0 min
Temperaturprogramme:	1:	40°C (3 min), 3°C min ⁻¹ – 230°C (10 min)
	2:	40°C, 2°C min ⁻¹ - 230°C

4.2.7.3.6 Präparative Gaschromatographie

Gaschromatograph:	GC 5890 Series II (Hewlett Packard) mit MCS (Gerstel)	
Injektor:	KAS-3 Kaltaufgabesystem (Gerstel)	
Autosampler:	7673 (Hewlett Packard), Injektionsvolumen 2 x 5 µL	
Fraktionensammler:	PFS (Gerstel)	
Detektoren 1 und 2:	FID, 250°C	
Detektorgase 1 und 2:	H ₂ : 50 kPa; Luft: 100 kPa	
Trennsäule 1:	OV 1 Fused Silica, 3 m × 0,53 mm ID, 2 µm Filmdicke (Leupold)	
Trennsäule 2:	BC CW 20M Fused Silica, 25 m × 0,53 mm ID, 1 µm Filmdicke (Leupold)	
Schnitt 1:	Novalol:	24,1 – 32,0 min
Schnitt 2:	Isonovalol:	15,0 – 19,1 min
Schnitt 3:	3,4-DM-pentansäuremethylester:	9,3 – 13,2 min
Schnitt 4:	2,6,7-TM-2-heptensäuremethylester:	25,0 – 28,4 min
Falle 1:	Novalol:	33,4 – 34,4 min
Falle 2:	Isonovalol:	22,5 – 24,5 min
Falle 3:	3,4-DM-pentansäuremethylester:	12,0 – 15,3 min
Falle 4:	2,6,7-TM-2-heptensäuremethylester:	28,5 – 32,0 min
Temperaturen:	Transferleitung: 200°C; Verteiler 200: °C, Fallen 2 °C (Umlaufkühler), KAS 40 °C	
Gase und Strömungen:	Trärgas (H ₂): 5 mL min ⁻¹	
	Gegengase 1 und 2 (H ₂): 10 mL min ⁻¹	
	Hilfsgase 1 und 2 (H ₂): 1 mL min ⁻¹	

Temperaturprogramme: 1: 40°C (3 min), 3°C min⁻¹ - 150°C, 5°C min⁻¹ - 220°C
2: 60°C (2 min), 3°C min⁻¹ - 150°C, 5°C min⁻¹ - 220°C
3/4: 40°C (2 min), 3°C min⁻¹ - 120°C, 5°C min⁻¹ - 220°C

Datenaufnahme und Steuerung: Vectra QS/16S (Hewlett Packard) mit MCS 1.15 Software (Gerstel)

4.2.8 Spektroskopische Methoden

4.2.8.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektrometer: Bruker DPX-300 (300 MHz und 75 MHz)
Lösungsmittel: CDCl₃ 100% D
Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS)
Meßverfahren: ¹³C ¹H Breitbandentkopplung, DEPT

4.2.8.2 Infrarot-Spektroskopie (IR)

IR-Spektrometer: Perkin Elmer Paragon 1000 PC FT-IR
Datenauswertung: GRAMS-Analyst
KBr-Preßlinge: 2 mg Substanz wurden mit ca. 200 mg KBr vermischt und unter Vakuum 3 min bei ca. 10 t Druck zu einer Tablette verpreßt. Die Messung erfolgte gegen einen Preßling aus reinem KBr.

4.2.8.3 UV/VIS-Spektroskopie

Photometer: Lambda 12 (Perkin-Elmer)
Datenauswertung: UV Win Lab (Version 2.0)

4.2.9 Polarimetrie

Polarimeter:	Perkin Elmer Polarimeter 341
Lösungsmittel:	CHCl_3
Wellenlänge:	589 nm (Na)
Konzentration:	ca. 10 mg mL^{-1}

5 Literatur

- [1] E. P. KÖSTER: *Interaction of Senses in Flavour Perception*. In: KRUSE, H.-P.; ROTHE, M. (EDS): *Flavour Perception, Aroma Evaluation, Proceedings of the 5th Wartburg Aroma Symposium, March 17-20, 1997, Eisenach*, Eigenverlag Universität Potsdam, **1997**
- [2] VON CAMPENHAUSEN, C.: *Die Sinne des Menschen. Einführung in die Psychophysik der Wahrnehmung*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, **1993**
- [3] HAUG, M. E.; MATHEIS, G.: Essenzen, Aromen und Grundstoffe für die Spirituosenherstellung, *Dragoco Report* 46 (1), **1999**, S. 39-48
- [4] WHITEHEAD, I. M.: Challenges to Biocatalysis from Flavor Chemistry, *Food Technology* 52 (2), **1998**, S. 40-46
- [5] ZIEGLER, E.; ZIEGLER, H.: *Flavourings: Production, Composition, Applications, Regulations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**
- [6] P. S. J. CHEETHAM: *Combining the Technical Push and the Business Pull for Natural Flavours*. In: BERGER, R. G.: *Biotechnology of Aroma Compounds* Springer Verlag, Berlin, **1996**
- [7] GATFIELD, I. L.: Enzymatic and Microbial Production of Flavors, *Perfumer & Flavorist* 20 (5), **1995**, S. 5-14
- [8] OHLOFF, G.: *Scent and Fragrances*, Springer-Verlag, Berlin, **1994**
- [9] VAN DER WERF, M. J.; DE BONT, J. A. M.; LEAK, D. J.: *Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes*. In: BERGER, R. G.: *Biotechnology of Aroma Compounds*, Springer Verlag, Berlin, **1996**
- [10] CHRISTOPH, N.: Die Anwendung der Gaschromatographischen Sniffing-Technik zur Bestimmung von Geruchsschwellen und Aromawerten, *Dissertation, TU München*, **1983**
- [11] BEST, D. J.; FLOYD, N. C.; MAGALHAES, A.; BURFIELD, A.; RHODES, P. M.: Initial Enzymatic Steps in the Degradation of α -Pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671, *Biocatalysis* 1, **1987**, S. 147-159
- [12] HARRIES, P. C.; JEFFCOAT, R.; GRIFFITHS, E. T.; TRUDGILL, P. W.: Monoterpene Aldehyde or Alcohol Derivatives and Their Use as Perfumes or Flavouring Agents, EP 0 271 609, **1986**

- [13] BURFIELD, A. G.; BEST, D. J.; DAVIES, K. J.: Production of 2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dien-1-al and of 2-Methyl-5-isopropylhexa-2,4-dien-1-al in Microorganisms, EP 0 304 318 A2, **1987**
- [14] *Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (LMBG)*, C. H. Beck'sche Verlagsbuchhandlung, München, **1998**
- [15] DE BONT, J. A. M.: Solvent-Tolerant Bacteria in Biocatalysis, *Trends in Biotechnology* 16 (12), **1998**, S. 493-499
- [16] KRINGS, U.; KELCH, M.; BERGER, R. G.: Adsorbents for the Recovery of Aroma Compounds in Fermentation Processes, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 58, **1993**, S. 293-296
- [17] KRINGS, U.; BERGER, R. G.: Porous Polymers for Fixed Bed Adsorption of Aroma Compounds in Fermentation Processes, *Biotechnology Techniques* 9 (1), **1995**, S. 19-24
- [18] RUTHVEN, D. M.: Zeolites as Selective Adsorbents, *Chemical Engineering Progress* 2, **1988**, S. 42-50
- [19] FLANIGEN, E. M.: Zeolites and Molecular Sieves - An Historical Perspective, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 58, **1991**, S. 13-35
- [20] COLOCOSI, A.; SAQIB, K. M.; LEAK, D. J.: Mutants of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 Defective in the Catabolism of α -Pinene, *Applied Microbiology and Biotechnology* 45 (6), **1996**, S. 822-830
- [21] GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. E. (EDS.): *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, Academic Press, London, **1985**, S. 145-166
- [22] LAYCOCK, M. V.; HILDEBRAND, P. D.; THIBAUT, P.; WALTER, J. A., WRIGHT, J. L. C.: Viscosin, a Potent Peptidolipid Biosurfactant and Phytopathogenic Mediator Produced by a Pectolytic Strain of *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (3), **1991**, S. 483-489
- [23] SYLDATK, C.: Mikrobielle Bildung und Charakterisierung Grenzflächenaktiver Rhamnolipide aus *Pseudomonas* spec. DSM 2874, *Dissertation, Universität Braunschweig*, **1984**
- [24] HARTMANN, M.; AMMON, J.; BERG, H.: Determination of Radiation-Induced Hydrocarbons in Processed Food and Complex Liquid Matrices, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* 204 (3), **1997**, S. 231-236
- [24a] SCHULTE-ELTE, K. H.; MULLER, B. L.; PAMINGLE, H.: Photooxygenation of 3,3-Dialkylsubstituted Allyl Alcohols. Occurrence of Syn Preference in the Ene Addition of $^1\text{O}_2$ at *E/Z*-Isomeric Allyl Alcohols, *Helvetica Chimica Acta* 62 (3), **1979**, S. 816-829

- [25] TUDROSZEN, N. J.; KELLY, D. P., MILLIS, N. F.: α -Pinene Metabolism by *Pseudomonas putida*, *Biochem. J.* 168 (2), **1977**, S. 315-318
- [26] GRIFFITHS, E. T.; BOCIEK, S. M.; HARRIES, P. C.; JEFFCOAT, R.; SISSONS, D. J.; TRUDGILL, P. W.: Bacterial Metabolism of α -Pinene: Pathway from α -Pinene Oxide to Acyclic Metabolites in *Nocardia* sp. Strain P18.3, *Journal of Bacteriology* 169 (11), **1987**, S. 4972-4979
- [27] BOHLMANN, F.; ZEISBERG, R.; KLEIN, E.: ^{13}C -NMR-Spektren von Monoterpenen, *Organic Magnetic Resonance* 7, **1975**, S. 426-432
- [28] GÜNTHER, H.: *NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**
- [29] ENDERS, D.; RENDENBACH, B. E. M.: Asymmetric Michael Additions Via SAMP-/RAMP-Hydrazones: Enantioselective Synthesis of Pheromones of the Small Forest Ant (*Formica polyctena*) and the Red Wood Ant (*F. rufa*), *Tetrahedron* 42 (8), **1986**, S. 2235-2242
- [30] MCLAFFERTY, F. W.; TURECEK, F.: *Interpretation von Massenspektren*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**
- [31] COATES, R. M.; HO, Z.; ZHU, L.: A Novel Cyclopropane Ring Fragmentation of Bicyclo[3.1.0]hexene Epoxides to 2,5-Dienals, *J. Org. Chem.* 61 (3), **1996**, S. 1184-1186
- [32] GIBBON, G. H.; PIRT, S. J.: The Degradation of α -Pinene by *Pseudomonas* PX1, *FEBS Letters* 18 (1), **1971**, S. 103-105
- [33] ROL, N. C.: Correlations Between Molecular Structure and Mass Spectra, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 84, **1965**, S. 413-423
- [34] ONKEN, J.: Biotechnologie lipophiler Substrate in wässrigen Systemen: Terpentransformationen durch Basidiomyceten als Modell, *Dissertation, Universität Hannover*, **1998**
- [35] DAVIES, N. W.: Gas Chromatographic Retention Indices of Monoterpenes and Sesquiterpenes on Methyl Silicone and Carbowax 20M Phases, *Journal of Chromatography* 503, **1990**, S. 1-24
- [36] KONDOYAN, N.; BERDAGUE, J.-L.: *A Compilation of Relative Retention Indices for the Analysis of Aromatic Compounds* Edition du Laboratoire Flaveur, **1996**
- [37] JENNINGS, W.; SHIBAMATO, T.: *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Chromatography*, Academic Press, New York, **1980**
- [38] WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I.: *Strukturaufklärung in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1991**

-
- [39] KRINGS, U.: Verfahren zur kontinuierlichen Gewinnung von Aromastoffen aus dem Kulturmedium von Bioreaktoren durch kontinuierliche Festphasenextraktion, *Dissertation, Universität Hannover, 1993*
- [40] HAGEDORN, S.; KAPHAMMER, B.: Microbioal Biocatalysis in the Generation of Flavor and Fragrance Chemicals, *Annu. Rev. Microbiol.* 48, **1994**, S. 773-800
- [41] PUNDSACK, E.: Technische Aspekte der natürlichen Darstellung und Aufarbeitung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-on (Furaneol), *Dissertation, Universität Hannover, 1999*
- [42] <http://www.acdlabs.com>
- [43] STASHENKO, E.; MARTINEZ, C. R.; MARTINEZ, J. R.; SHIBAMOTO, T.: Catalytic Transformation of Anise (*Pimpinella anisum* L.) Oil Over Zeolite Y, *Journal of High Resolution Chromatography* 18 (8), **1995**, S. 501-503
- [44] EINICKE, W.D.; MESSOW, U.; HEUCHEL, M.; SZOMBATHELY, M. v.; BRÄUER, P., SCHÖLLNER, R.: Liquid-Phase Adsorption of Binary Ethanol-Water-Mixtures on NaZSM-5 Zeolite with Inorganic and Organic Binders, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87 (8), **1991**, S. 1283-1286
- [45] MA, Y. H.; LIN, Y. S.: Adsorption and Diffusion of Liquids in Silicalite using HPLC, *AIChE Symposium Series* 83 (259), **1987**, S. 1-10
- [46] MEIER, W. M.; OLSON, D. H.: *Atlas of Zeolite Structure Types*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, **1992**
- [47] DEROUANE, E. G.; ANDRE, J.-M.; LUCAS, A. A.: Surface Curvature Effects in Physisorption and Catalysis by Microporous Solids and Molecular Sieves, *Journal of Catalysis* 110, **1988**, S. 58-73
- [48] EINICKE, W.D.; GLÄSER, B.; LIPPERT, R.; HEUCHEL, M.: Adsorbed Phase Composition in Liquid-Phase Adsorption of Organic Compounds from Aqueous Solution on Hydrophobic Zeolites, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 91 (5), **1995**, S. 971-974
- [49] JENTYS, A.; MIRTH, G.; SCHWANK, J.; LERCHER, J. A.: Interaction of Hydrocarbons and Water with ZSM-5, In: JACOBS, P. A. (ED.): *Zeolites: Facts, Figures, Future: Proceedings of the 8th international Zeolite Conference, Amsterdam 1989*, Elsevier, Amsterdam, **1989**, S. 847-857
- [50] MILESTONE, N. B.; BIBBY, D. M.: Adsorption of Alcohols from Aqueous Solution by ZSM-5, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34A, **1983**, S. 73-79
- [51] DEROUANE, E. G.; VEDRINE, J. C.: On the Role of Shape Selectivity in the Catalytic Conversion of Alcohols and Simple Hydrocarbon Molecules on Zeolite ZSM-5, *Journal of Molecular Catalysis* 8, **1980**, S. 479-483

- [52] ERMAN, W. F. (ED.): *Chemistry of the Monoterpenes Part A. Monoterpenes*, Marcel Dekker Inc., New York, **1985**
- [53] HERBERT, R. B.: *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, Chapman and Hall, London, **1989**
- [54] RICHTER, G.: *Biochemie der Pflanzen*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1996**
- [55] CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. (EDS.): *Dictionnary of Terpenoids* Vol. 1. Chapman and Hall, London, **1991**
- [56] TSUNEYA, T.; ISHIHARA, M.; SHIOTA, H.; SHIGA, M.: Isolation and Identification of Novel Terpene Lactones from Quince Fruit (*Cydonia oblonga* Mill., Marmelo), *Agric. Biol. Chem.* 44 (4), **1980**, S. 957-958
- [57] KRAMMER, G.; WINTERHALTER, P.; SCHWAB, M.; SCHREIER, P.: Glycosidically Bound Aroma Compounds in the Fruits of Prunus Species: Apricot (*P. armeniaca* L.), Peach (*P. persica*, L.), Yellow Plum (*P. domestica*, L. spp. Syriaca), *J. Agricult. Food Chem.* 39, **1991**, S. 778-781
- [58] DE KIMPE, N.; AELTERMAN, W.: An Efficient Synthesis of (S)-(+)-Manicone, an Alarm Pheromone of *Manica* Ants, *Tetrahedron* 52 (39), **1996**, S. 12815-12820
- [59] BANTHORPE, D. V.; DOONAN, S.; GUTOWSKI, J. A.: Biosynthesis of Irregular Monoterpenes in Extracts from Higher Plants, *Phytochemistry* 16 (1), **1977**, S. 85-92
- [60] LLOYD, H. A.; JONES, T. H.; HEFETZ, A.; TENGOE, J.: Lasiol, a new acyclic Monterpenol in the Madibular Gland Secretion of *Lasius meridonalis*, *Tetrahedron Letters* 31 (39), **1990**, S. 5559-5562
- [61] SHUKLA, O. P.; MOHOLAY, M. N.; BHATTACHARYYA, P. K.: Microbial Transformations of Terpenes. Part X. Fermentation of α - and β -Pinenes by a Soil Pseudomonad (PL-Strain), *Indian Journal of Biochemistry* 5, **1968**, S. 79-91
- [62] SHUKLA, O. P.; BHATTACHARYYA, P. K.: Microbial Transformations of Terpenes: Part XI. Pathways of Degardation of α - and β -Pinenes in a Soil Pseudomonad (PL-Strain), *Indian Journal of Biochemistry* 5, **1968**, S. 92-101
- [63] DRAUZ, K.; WALDMANN, H. (EDS.): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis Vol. II.*, VCH Weinheim, New York, **1994**
- [64] WISLOCKI, P. G.; MIWA, G. T.; LU, A. Y. H.: Reactions Catalyzed by the Cytochrome P-450 System. In: JAKOBY, W. B.: *Enzymatic Basis of Detoxication*, Academic Press, New York, **1980**, S. 135-182

- [65] BUSMANN, D., BERGER, R. G.: Oxyfunctionalization of α - and β -Pinene by Selected Basidiomycetes, *Z. Naturforsch.* 49 (c), **1994**, S. 545
- [66] WRIGHT, S. J.; CAUNT, P.; CARTER, D.; BAKER, P. B.: Microbial Oxidation of α -Pinene by *Serratia marcescens*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 23, **1986**, S. 224-227
- [67] PREMA, B. R.; BHATTACHARYYA, P. K.: Microbial Transformation of Terpenes. II. Transformations of α -Pinene, *Applied Microbiology* 10, **1962**, S. 524-528
- [68] TRUDGILL, P. W.: Terpenoid Metabolism by Pseudomonas, In: *The Bacteria Vol. X*, Academic Press Inc., London, **1986**, S. 483-525
- [69] RHODES, P. M.; WINSKILL, N.: Microbiological Process for the Preparation of 1-Carvone, US Patent 4,495,284, **1985**
- [70] GIBBON, G. H.; MILLIS, N. F.; PIRT, S. J.: Degradation of α -Pinene by Bacteria, In: *Ferment. Technology Today, Proc. Int. Ferment. Symposium 4th*, **1972**, S. 609-612
- [71] RATLEDGE, C. (ED.): *Biochemistry of Microbial Degradation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1994**
- [72] DEMAİN, A. L.; SOLOMON, N. A. (EDS.): *Biology of Industrial Microorganisms*, Butterworths, Boston, **1985**
- [73] SCHLEGEL, H. G.: *Allgemeine Mikrobiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1985**
- [74] ANDREONI, V.; BAGGI, G.; BERNASCONI, S.: Microbial Degradation of Nitrogenous Xenobiotics of Environmental Concern, In: S. P SINGH (Ed.): *Biotransformations: Microbial Degradation of Health-Risk Compounds, Progress in Industrial Microbiology* 32, **1995**, S. 1-35
- [75] SINGH, V. P.: Aflatoxin Biotransformations: Biodetoxification Aspects, In: S. P SINGH (Ed.): *Biotransformations: Microbial Degradation of Health-Risk Compounds, Progress in Industrial Microbiology* 32, **1995**, S. 51-73
- [76] BUMPUS, J. A.: Microbial Degradation of Azo Dyes, In: S. P SINGH (Ed.): *Biotransformations: Microbial Degradation of Health-Risk Compounds, Progress in Industrial Microbiology* 32, **1995**, S. 157-187
- [77] HARTMANS, S.: Microbial Degradation of Styrene, In: S. P SINGH (Ed.): *Biotransformations: Microbial Degradation of Health-Risk Compounds, Progress in Industrial Microbiology* 32, **1995**, S. 227-238
- [78] BOSETTI, A.; BIANCHI, D.; ANDRIOLLO, N.; CIDARIA, D.; CESTI, P.; SELLO, G.; DI GENNARO, P.: Microbial Oxidation of Naphthalene to cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene in a Membrane Bioreactor, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66 (4), **1996**, S. 375-381

-
- [79] CLAUS, D.; WALKER, N.: The Decomposition of Toluene by Soil Bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 36, **1964**, S. 107-122
- [80] HACK, C. J.; WOODLEY, J. M.; LILLY, M. D.; LIDDELL, J. M.: The Production of *Pseudomonas putida* for the Hydroxylation of Toluene to its cis-Glycol, *Applied Microbiology and Biotechnology* 41 (5), **1994**, S. 495-499
- [81] WINKELMANN, G.: *Microbial Degradation of Natural Products*, VCH, Weinheim, **1992**
- [82] GANSSON, M. G.; KITAMURA, Y.; MCLAUCHLAN, W. R.; NARBAD, A.; PARR, A. J.; PARSONS, E. L. H.; PAYNE, J.; RHODES, M. J. C.; WALTON, N. J.: Metabolism of Ferulic Acid to Vanillin, *Journal of Biological Chemistry* 273 (7), **1998**, S. 4163-4170
- [83] BARE, G.; GERARD, J.; JACQUES, P.; DELAUNAI, V.; THONARD, P.: Bioconversion of Vanillin into Vanillic Acid by *Pseudomonas fluorescens* Strain BTP9, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34/35, **1992**, S. 499-510
- [84] JOGLEKAR, S. S.; DHAULIKAR, R. S.: Microbial Transformation of Terpenoids I. Identification of Metabolites Produced by a Pseudomonad from Citronellal and Citral, *Applied Microbiology* 18 (6), **1969**, S. 1084-1087
- [85] SEUBERT, W.; FASS, E.: Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden V. Der Mechanismus des Isoprenoidabbaus, *Biochemische Zeitschrift* 341, **1964**, S. 35-44
- [86] HARDER, J.; PROBIAN, C.: Microbial Degradation of Monoterpenes in the Absence of Molecular Oxygen, *Applied and Environmental Microbiology* 61 (11), **1995**, S. 3804-3808
- [87] JANSSENS, L.; DE POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J.: Production of Flavours by Microorganisms, *Process Biochemistry* 27, **1992**, S. 195-215
- [88] ZHOU, N. Y.; LEAK, D. J.: Progress Report Apr. 98 - Nov. 98, *EC BIO4-CT95-0049*, **1998**
- [89] GRIFFITHS, E. T.; HARRIES, P. C.; JEFFCOAT, R.; TRUDGILL, P. W.: Purification and Properties of α -Pinene Oxide Lyase from *Nocardia* sp. Strain P18.3, *Journal of Bacteriology* 169 (11), **1987**, S. 4980-4983
- [90] VOET, D.; VOET, J. G.: *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1992**
- [91] GOTTSCHALK, G.: *Bacterial Metabolism*, Springer Verlag, New York **1985**
- [92] SEUBERT, W.; REMBERGER, U.: Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden II. Die Rolle der Kohlensäure, *Biochemische Zeitschrift* 338, **1963**, S. 245-264

-
- [93] STEGLICH, W.; FUGMANN, B.; LANG-FUGMANN S. (EDS.): *Römpp Lexikon Naturstoffe*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**
- [94] DESAI, J. D.; BANAT, I. M.: Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (1), **1997**, S. 47-64
- [95] KOSARIC, N. (ED.): *Biosurfactants: Production, Properties, Applications* Vol. 48., Marcel Dekker Inc., New York, **1993**
- [96] KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C.: *Biosurfactants and Technology* Vol. 25., Marcel Dekker Inc., New York. **1987**
- [97] HEALY, M. G.; DEVINE, C. M.; MURPHY, R.: Microbial Production of Biosurfactants, *Resources, Conservation and Recycling* 18, **1996**, S. 41-57
- [98] APPANNA, V. D.; FINN, H.; PIERRE, M. St.: Exocellular Phosphatidylethanolamine Production and Multiple-Metal Tolerance in *Pseudomonas fluorescens*, *FEMS Microbiology Letters* 131, **1995**, S. 53-56
- [99] GOSWAMI, P.; SINGH, H. D.: Different Modes of Hydrocarbon Uptake by Two *Pseudomonas* Species, *Biotechnology and Bioengineering* 37 (1), **1991**, S. 1-11
- [100] MATULOVIC, U.: Verfahrensentwicklung zur Herstellung grenzflächenaktiver Rhamnolipide mit immobilisierten Zellen von *Pseudomonas spec.* DSM 2874, *Dissertation, Universität Braunschweig*, **1987**
- [101] WILSON, N. G.; BRADLEY, G.: The Effect of Immobilization on Rhamnolipid Production by *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of Applied Bacteriology* 81 (5), **1996**, S. 525-530
- [102] PÉQUIGNOT, C.; LARROCHE, C.; GROS, J. B.: A Spectrophotometric Method for Determination of Biomass in the Presence of a Polymer, *submitted*, **1999**
- [103] MATHEIS, G.: *Raw Materials for Flavourings*. In: ZIEGLER, E.; ZIEGLER, H.: *Flavourings: Production, Composition, Applications, Regulations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**
- [104] BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H.: *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim **1990**
- [105] WELSH, F. W.; WILLIAMS, R. E.; DAWSON, K. H.: Lipase Mediated Synthesis of Low Molecular Weight Flavor Esters, *Journal of Food Science* 55 (6), **1990**, S. 1679-1682
- [106] CLAON, P. A.; AKOH, C. C.: Lipase-Catalyzed Synthesis of Terpene Esters by Transesterification in n-Hexane, *Biotechnology Letters* 16 (3), **1994**, S. 235-240

-
- [107] YEE, L. N.; AKOH, C. C.; PHILLIPS, R. S.: Terpene Ester Synthesis by Lipase-Catalyzed Transesterification, *Biotechnology Letters* 17 (1), **1995**, S. 67-70
- [108] ARCTANDER, S.: *Perfume and Flavor Chemicals (Aroma Chemicals)*, Steffan Arctander, Montclair, **1969**
- [109] BURDOCK, G. A. (ED.): *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients Volume II*, CRC Press, Boca Raton, **1994**
- [110] BRUCE, L. J.; DAUGULIS, A. J.: Solvent Selection Strategies for Extractive Biocatalysis, *Biotechnol. Prog.* 7, **1991**, S. 116-224
- [111] MEYLAN, W. M.; HOWARD, P. H.: Atom/Fragment Contribution Method for Estimating Octanol-Water Partition Coefficients, *J. Pharm. Sci.* 84, **1995**, S. 83-92
- [112] LARROCHE, C.; GROS, J. B.: A Corralation for Water Solubility of Hydrophobe Compounds: Application to Terpenens and Terpenoids, *submitted* , **1999**
- [113] LOFFELD, B.; KEWELOH, H.: cis/trans Isomerization of Unsaturated Fatty Acids as Possible Control Mechanism of Membrane Fluidity in *Pseudomonas putida* P8, *Lipids* 31 (8), **1996**, S. 811-815
- [114] KIEBOOM, J.; DENNIS, J. J.; DE BONT, J. A. M.; ZYLSTRA, G. J.: Identification and Molecular Characterization of an Efflux Pump Involved in *Pseudomonas putida* S12 Solvent Tolerance, *Journal of Biological Chemistry* 273 (1), **1998**, S. 86-91
- [115] BARTOLO, B.; ONKEN, J.; LARROCHE, C.: Terpene Biotransformations Report November 1998, *BIO4-CT95-0049* , **1998**
- [116] SPEELMANS, G.; BIJLSMA, A.; EGGINK, G.: Efficient Limonene Bioconversion to High Concentrations of a Single Product, Perillic Acid, by a Solvent-Resistant *Pseudomonas putida* Strain, *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (5), **1998**, S. 538-544
- [117] RUTHVEN, D. M.: *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*, John Wiley & Sons Inc., New York, **1984**
- [118] BARRER, R. M.: *Hydrothermal Chemistry of Zeolites*, Academic Press, London, **1982**
- [119] LECHERT, H.; HENNIG, H. J.; MIRTSCH, S.: Protonenresonanzmessungen an Molekeln verschiedener Gestalt und Polarität in Hohlräumen von Zeolithen des Faujasit-Typs, *Surface Science* 43, **1974**, S. 88-100
- [120] LECHERT, H.; HENNEKE, H. W.: Untersuchungen der Protonenresonanz von adsorbiertem Wasser an Zeolithen des Faujasit-Typs mit verschiedenen Silicium-Aluminium-Verhältnissen, *Surface Science* 51, **1975**, S. 189-198

-
- [121] PUPPE, L.: Zeolithe - Eigenschaften und technische Anwendungen, *Chemie in unserer Zeit* 20 (4), **1986**, S. 117-127
- [122] BHATIA, S.: *Zeolite Catalysis: Principles and Applications*, CRC Press, Boca Raton, **1990**
- [123] FLANIGEN, E. M.; BENETT, J. M.; GROSE, R. W.; COHEN, J. P.; PATTON, R. L.; KIRCHNER, R. M.; SMITH, J. V.: Silicalite, a New Hydrophobic Crystalline Silica Molecular Sieve, *Nature* 271 (2), **1978**, S. 512-516
- [124] OLSON, D. H.; KOKOTAILO, G. T.; LAWTON, S. L.; MEIER, W. M.: Crystal Structure and Structure-Related Properties of ZSM-5, *J. Phys. Chem.* 85, **1981**, S. 2238-2243
- [125] KOKOTAILO, G. T.; LAWTON, S. L.; OLSON, D. H.: Structure of Synthetic Zeolite ZSM-5, *Nature* 272 (3), **1978**, S. 437-438
- [126] MÜLLER, U.; TISSLER, A.; UNGER, K. K.: Zeolithe, poröse Festkörper mit definierten Hohlräumssystemen in molekularen Dimensionen - Synthese und Einsatz -, *GIT Fachz. Lab.* (6), **1988**, S. 635-641
- [127] CHEN, N. Y.; DEGNAN, T. F.; SMITH, C. M.: *Molecular Transport and Reaction in Zeolites. Design and Application of Shape Selective Catalysts*, VCH Publishers Inc., New York **1994**
- [128] BEYER, H. K.; BELENKAYA, I.; HANGE, F.; TIELEN, M.; GROBET, P. J.; JAKOBS, P. A.: Preparation of High-Silica Faujasites by Treatment with Silicon Tetrachloride, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 81, **1985**, S. 2889
- [129] LIEBENS, A.: Heterogenkatalysierte selektive Umlagerung ausgewählter Epoxide zur Darstellung von Duftstoffen, *Dissertation, RWTH Aachen*, Shaker Verlag, Aachen **1997**
- [130] WILLIAMS, P. T.; HORNE, P. A.: Analysis of Aromatic Hydrocarbons in Pyrolytic Oil Derived From Biomass, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 31, **1995**, S. 15-37
- [131] STASHENKO, E.; WIAME, H.; DASSY, S.; MARTINEZ, J. R.; SHIBAMOTO, T.: Catalytic Transformation of Copaiba (*Copaifera officinalis*) Oil Over Zeolite ZSM-5, *Journal of High Resolution Chromatography* 18 (1), **1995**, S. 54-58
- [132] KÄRGER, J.; RUTHVEN, D. M.: *Diffusion in Zeolites and Other Microporous Solids*, John Wiley & Sons Inc., New York, **1992**
- [133] BARRER, R. M.: *Zeolites and Clay Minerals as Sorbents and Molecular Sieves*, Academic Press Inc. Ltd., London, **1978**
- [134] PUPPE, L.; BÜCHNER, W.: Zeolithe - Strukturen, Synthesen, Anwendungen, *Naturwissenschaften* 71, **1984**, S. 192-198

- [135] KÜMMEL, R.; WORCH, E.: *Adsorption aus wäßrigen Lösungen* Leipzig: VEB Verlag für Grundstoffindustrie, **1990**
- [136] LISKA, I.; KRUPCIK, J.; LECLERCQ, P. A.: The Use of Solid Sorbents for Direct Accumulation of Organic Compounds from Water Matrices - A Review of Solid-Phase-Extraction Techniques, *J. High Resol. Chromatogr.* 12 (9), **1989**, S. 577-590
- [137] JOHNSON, J. A.; OROSKAR, A. R.: Sorbex Technology for Industrial Scale Separation, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 46, **1989**, S. 451-467
- [138] CHOI, J.-W.; CHOI, K.-Y.; HA, B.-H.: Liquid-Phase Adsorption of a Benzene + Heptane Mixture on NaHY Zeolites, *J. Chem. Eng. Data* 39, **1994**, S. 27-32
- [139] CHOUDARY, N. V.; JASRA, R. V.; BHAT, S. G. T.; PRASADA RAO, T. S. R.: Liquid Phase Adsorption, Diffusion and Counter Diffusion of Aromatic Hydrocarbons on ZSM-5 Zeolites, In: JACOBS, P. A. (ED.): *Zeolites: Facts, Figures, Future: Proceedings of the 8th international Zeolite Conference, Amsterdam 1989*, Elsevier, Amsterdam, **1989**, S. 867-876
- [140] YOUNG, G. W.; KIOVSKY, J. R.; KORADIA, P. B.: Liquid Phase Drying Applications of Zeolites, *ACS Symposium Series* 135, **1983**
- [141] TAYLOR, D.R.; UNGERMANN, C.B.; DEMIDOWICZ, Z.: The Adsorption of Fatty Acids from Vegetable Oils with Zeolites and Bleaching Clay/Zeolite Blends, *Journal of the American Oil Chemists Society* 61 (8), **1984**, S. 1372-1379
- [142] ÜSTÜN, G.: Separation of Fatty Acid Methyl Esters from Tall Oil by Selective Adsorption, *Journal of the American Oil Chemists Society* 73 (2), **1996**, S. 203
- [143] TREFFENFELDT, W.; STOCKHAMMER, S.: Neuartige Anwendung von Zeolithen in der wäßrigen Phase zur Trennung von Aminosäuregemischen, Vortragskript Degussa-Hüls AG, **1997**
- [144] TREFFENFELDT, W.; STOCKHAMMER, S.; KNAUP, G.; DRAUZ, K.; SEXTL, E.: Verfahren zur Abtrennung von Aminosäuren und Aminosulfonsäuren durch Adsorption an Zeolithen, EP 765864 A 97040, **1997**
- [145] PAZLAROVA, J.; VOTRUBA, J.: Use of Zeolite to Control Ammonium in *Bacillus amyloliquefaciens* α -Amylase Fermentations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 (3), **1996**, S. 314-318
- [146] OGAWA, I.; FRITZ, J. S.: Determination of Low Concentrations of Low-Molecular-Weight Aldehydes and Ketones in Aqueous Samples, *Journal of Chromatography* 329, **1985**, S. 81-89
- [147] BOTTERO, J. Y.; KHATIB, K.; THOMAS, F.; JUCKER, K.; BERSILLON, J. L.; MALLEVIALLE, J.: Adsorption of Atrazine onto Zeolites and Organoclays in the Presence of Background Organics, *Water Res.* 28 (2), **1994**, S. 483-490

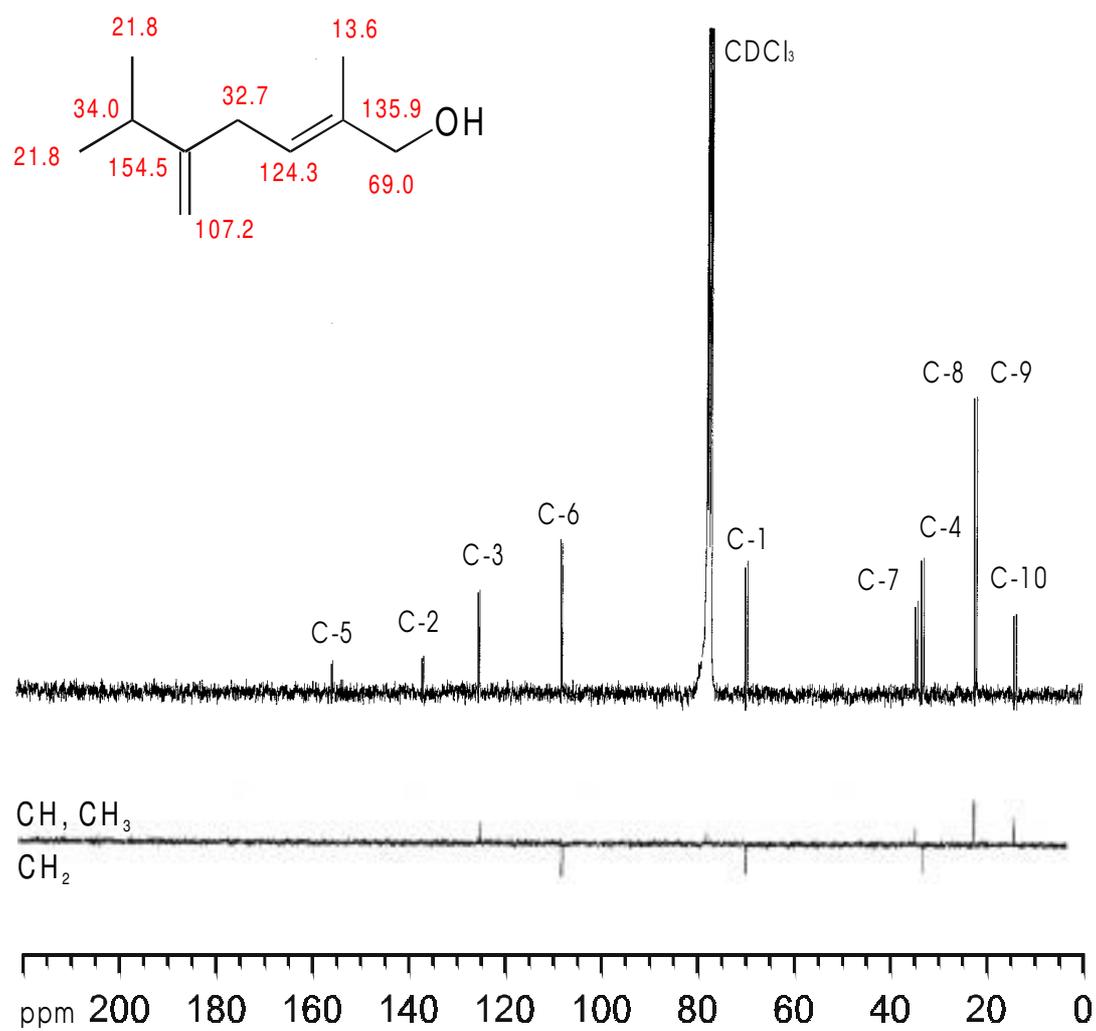
-
- [148] SENIN, N. N.; FILIPOV, Y. S.; TOLIKINA, N. F.; SMOLYANINOV, G. A.; VOLKOV, S. A.; KUKUSHKIN, V. S.: Chromatographic Determination of Some Trace Organic Impurities in Natural and Waste Waters with Preliminary Adsorption Trapping, *Journal of Chromatography* 364, **1986**, S. 315-321
- [149] ELLIS, J.; KORTH, W.: Removal of Geosmin and Methylisoborneol from Drinking Water by Adsorption on Ultrastable Zeolite Y, *Water Res.* 27 (4), **1993**, S. 535-539
- [150] KAWAI, T.; TSUTSUMI, K.: The Appearance of Adsorption Ability of Modified Zeolites for Sodium Dodecylsulfate From Its Aqueous Solution, *Colloid Polym. Sci.* 272, **1994**, S. 830-836
- [151] NARITA, E.; HORIGUCHI, N.; OKABE, T.: Adsorption of Phenol, Cresols, and Benzyl Alcohol from Aqueous Solution by Silicalite, *Chemistry Letters* 6, **1985**, S. 787-790
- [152] CHORLEY, S. R.; CRITTENDEN, D. B.; KOLACZOWSKI, S. T.: Adsorption of Trihalomethanes on to Zeolites, *Water Treatment - Proceedings of the 1st International Conference*, **1991**, S. 181-190
- [153] KAWAI, T.; YANAGIHARA, T.; TSUTSUMI, K.: Adsorption Characteristics of Chloroform on Modified Zeolites from Gaseous Phase as well as its Aqueous Solution, *Colloid Polym. Sci.* 272, **1994**, S. 1620-1626
- [154] FARHADPOUR, F. A.; BONO, A.; TUZUN, U.: Separation of Alcohol-Water Mixtures by Liquid Phase Adsorption, *Monograph - European Brewery Convention* 9, **1984**, S. 203-217
- [155] LENCKI, R. W.; ROBINSON, C. W., MOO-YOUNG, M.: On-Line Extraction of Ethanol from Fermentation Broths Using Hydrophobic Adsorbents, *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 13, **1983**, S. 617-628
- [156] FARHADPOUR, F. A.; BONO, A.: Adsorption from Solution of Nonelectrolytes by Microporous Crystalline Solids: Ethanol-Water/Silicalite System, *Journal of Colloid and Interface Science* 124 (1), **1988**, S. 209-227
- [157] EINICKE, W. D.; GLÄSER, B.; SCHÖLLNER, R.: In-Situ Recovery of Ethanol from Fermentation Broth by Hydrophobic Adsorbents, *Acta Biotechnologica* 11 (4), **1991**, S. 353-358
- [158] BUI, S.; VERYKOS, X.; MUTHARASAN, R.: In Situ Removal of Ethanol from Fermentation Broths. 1. Selective Adsorption Characteristics, *Ind. Eng. Process Des. Dev.* 24, **1985**, S. 1209-1213
- [159] SCHÖLLNER, R.; EINICKE, W.-D.; UNVERRICHT, S.; BRETTNER, E.: Investigations of Adsorptive Separation of Glycerol/Propane-1,3-diol in Aqueous Solution on Zeolites by Liquid Phase Adsorption, *J. prakt. Chem.* 336, **1994**, S. 404-407

- [160] SCHÖLLNER, R.; EINICKE, W.-D.; GLÄSER, B.: Liquid-Phase Adsorption of Monosaccharide-Water Mixtures on X and Y Zeolites, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 89 (11), **1993**, S. 1871-1876
- [161] CHENG, Y. L.; LEE, T. Y.: Separation of Fructose and Glucose Mixture by Zeolite Y, *Biotechnology and Bioengineering* 40, **1992**, S. 498-504
- [162] HO, C.; CHING, C. B.; RUTHVEN, D. M.: A Comparative Study of Zeolite and Resin Adsorbents for the Separation of Fructose-Glucose Mixtures, *Ind. Eng. Chem. Res.* 26, **1987**, S. 1407-1412
- [163] CHING, C. B.; RUTHVEN, D. M.: A Liquid Phase Chromatographic Study of Sorption and Diffusion of Glucose and Fructose in NaX and KX Zeolite Crystals, *Zeolites* 8 (1), **1988**, S. 68-73
- [164] SCHÖLLNER, R.; UNVERRICHT, S.; EINICKE, W.-D.: Liquid-Phase Adsorption of Binary Monosaccharide-Water and Polyol-Water Mixtures on X and Y Zeolites, *Proc. Int. Zeolite Conf. 9th* 2 (1), **1993**, S. 3-10
- [165] SCHÖLLNER, R.; SIELER, D.; BRETTNER, E.: Komplexbildung von geradkettigen Polyolen in wäßriger Lösung mit partiell hydratisierten K⁺- und Ca²⁺-Ionen in X- und Y-Zeolithen, *J. Prakt. Chem.* 337, **1995**, S. 567-575
- [166] NOWAK, A. K.; CHEETHAM, A. K.: The Use of Computer Graphics to Study Adsorption, Diffusion, and Catalysis in Zeolites, *Proceedings of 7th International Zeolite Conference*, **1986**, S. 475-479
- [167] WU, P.; DEBEBE, A.; MA, Y. H.: Adsorption and Diffusion of C₆ and C₈ Hydrocarbons in Silicalite, *Zeolites* 3 (4), **1983**, S. 118-122
- [168] EINICKE, W.D.; RESCHETILKOWSKI, W.; HEUCHEL, M.; SZOMBATHELY, M. v.; BRÄUER, P.; SCHÖLLNER, R.; SCHWIEGER, W.; BERGK, K.-H.: Liquid-phase Adsorption of Binary Ethanol-Water-Mixtures on High Silica Adsorbents, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87 (8), **1991**, S. 1279-1282
- [169] Fr. Dr. A. Preuß, Degussa-Hüls AG, persönliche Mitteilung, **1998**
- [170] MA, Y. H.; TANG, T. D.; SAND, L. B.; HOU, L. Y.: Adsorption of Hydrocarbons in (Na, K)-ZSM-5, -ZSM-11 and "Al-Free" NaZSM-5 and NaZSM-11, *Proceedings of 7th International Zeolite Conference*, **1986**, S. 531-538
- [171] DEROUANE, E. G.: The Energetics of Sorption by Molecular Sieves: Surface Curvature Effects, *Chemical Physics Letters* 142 (3,4), **1987**, S. 200-204
- [172] CHOUDAHRY, V. R.; AKOLEKAR, D. B.: Shuttlecock-Shuttlebox Model for Shape Selectivity of Medium-Pore Zeolites in Sorption and Diffusion, *Journal of Catalysis* 117, **1989**, S. 542-548
- [173] DEN EXTER, M. J.; JANSEN, J. C.; VAN DE GRAAF, J. M.; KAPTEIJN, F.; MOULIJN, J. A.; VAN BEKKUM, H.: Zeolite-Based Membranes - Preparation, Performance and Prospects, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 102, **1996**, S. 413-454

- [174] DEROUANE, E. G.: Shape Selectivity in Catalysis by Zeolites: The Nest Effect, *Journal of Catalysis* 100, **1986**, S. 541-544
- [175] MILESTONE, N. B.; BIBBY, D. M.: Concentration of Alcohols by Adsorption on Silicalite, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 31, **1981**, S. 732-736
- [176] GLÄSER, B.; EINICKE, W.D.; SCHÖLLNER, R.: Frontalchromatographische Untersuchungen zur Flüssigphasenadsorption von binären n-Alkohol-Wasser-Gemischen an NaZSM-5-Zeolithen, *Chem. Technik (Leipzig)* 47 (3), **1995**, S. 143-148
- [177] SCHÖLLNER, R.; EINICKE, W.D.: Use of ZSM Zeolites in the Liquid Phase Separation of Alcohols, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 65, **1991**, S. 75-88
- [178] SHULTZ-SIBBEL, G. M. W.; GJERDE, D. T.; CHRISWELL, C. D.; FRITZ, J. S.: Analytical Investigation of the Properties and Uses of a New Hydrophobic Molecular Sieve, *Talanta* 29, **1982**, S. 447-452
- [179] LIN, Y.S.; MA, Y.H.: A Comparative Study of Adsorption and Diffusion of Vapor Alcohols and Alcohols from Aqueous Solutions in Silicalite, In: JACOBS, P. A. (ED.): *Zeolites: Facts, Figures, Future: Proceedings of the 8th international Zeolite Conference, Amsterdam 1989*, Elsevier, Amsterdam, **1989**, S. 877-887
- [180] LIN, Y. S.; MA, Y. H.: Liquid Diffusion and Adsorption of Aqueous Ethanol, Propanols, and Butanols in Silicalite by HPLC, *ACE Symposium Series* 368, **1988**, S. 452-465
- [181] CHIANG, A. S.; DIXON, A. G.; MA, Y. H.: The Determination of Zeolite Crystal Diffusivity by Gas Chromatography - II. Experimental, *Chemical Engineering Science* 39 (10), **1984**, S. 1461-1468
- [182] GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J.: *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries. Principles and Applications*, Technomic Publishing Co Inc., Lancaster, Basel **1996**
- [183] PITT, W. W.; HAAG, G. L.; LEE, D. D.: Recovery of Ethanol from Fermentation Broths Using Selective Sorption-Desorption, *Biotechnology and Bioengineering* 25, **1983**, S. 123-131
- [184] EINICKE, W. D.; MESSOW, U.; SCHÖLLNER, R.: Untersuchungen zur Thermodynamik der Flüssigphasenadsorption von binären Gemischen an siliciumreichen Molekularsieben, *Chem. Techn.* 41 (11), **1989**, S. 482-485
- [185] TE HENNEPE, H. J. C.; BARGEMAN, D.; MULDER, M. H. V., SMOLDERS, C. A.: Zeolite-Filled Silicone Rubber Membranes. Part 1. Membrane Preparation and Pervaporation Results., *Journal of Membrane Science* 35, **1987**, S. 39-55

-
- [186] KITA, H.; HORII, K.; OHTOSHI, Y.; TANAKA, K.; OKAMOTO, K.-I.: Synthesis of a Zeolite NaA Membrane for Pervaporation of Water/Organic Liquid Mixtures, *Journal of Materials Science Letters* 14, **1995**, S. 205-208
- [187] BELLOBONO, I. R.; SELLI, E.; RIGHETTO, L.; MISSANA, T.; MUFFATO, F.; PIZZALA, A.; TAIANA, A.; ZENI, M.: Thermodynamic Study of Some Linear Aliphatic Monocarboxylic Acids from Aqueous Solution by Photografted Membranes Immobilizing Zeolite, *Materials Chemistry and Physics* 28, **1991**, S. 291-302
- [188] FAVRE, E.; NGUYEN, Q. T.; BRUNEAU, S.: Extraction of 1-Butanol From Aqueous Solutions by Pervaporation, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 65, **1996**, S. 221-228
- [189] BENGSTON, G.; BÖDDEKER, K. W.: Extraction of Bioproducts with homogenous Membranes, *Bioflavour '95 Dijon (France) 14.-17.2 1995* INRA, Paris, **1995**, S. 393-403
- [190] DYER, A.: *An Introduction to Zeolite Molecular Sieves*, John Wiley & Sons Ltd., New York, **1988**
- [191] DYER, A.; HAYES, G. G.; PHILLIPS, G. O.; TOWNSEND, R. P.: Synthetic Zeolites as Models for Biological Systems, *Molecular Sieves* , **1973**, S. 299-308
- [192] COHEN-BAZIRE, G.; SISTROM, H. R.; STANIER, R. Y.: Kinetic Studies of Pigment Synthesis by Non-Sulfur Purple Bacteria, *J. Cell. Comp. Physiol.* 49, **1957**, S. 25-28

6 Anhang

Abb. 6-1 ^{13}C -NMR-Spektrum von Novalol

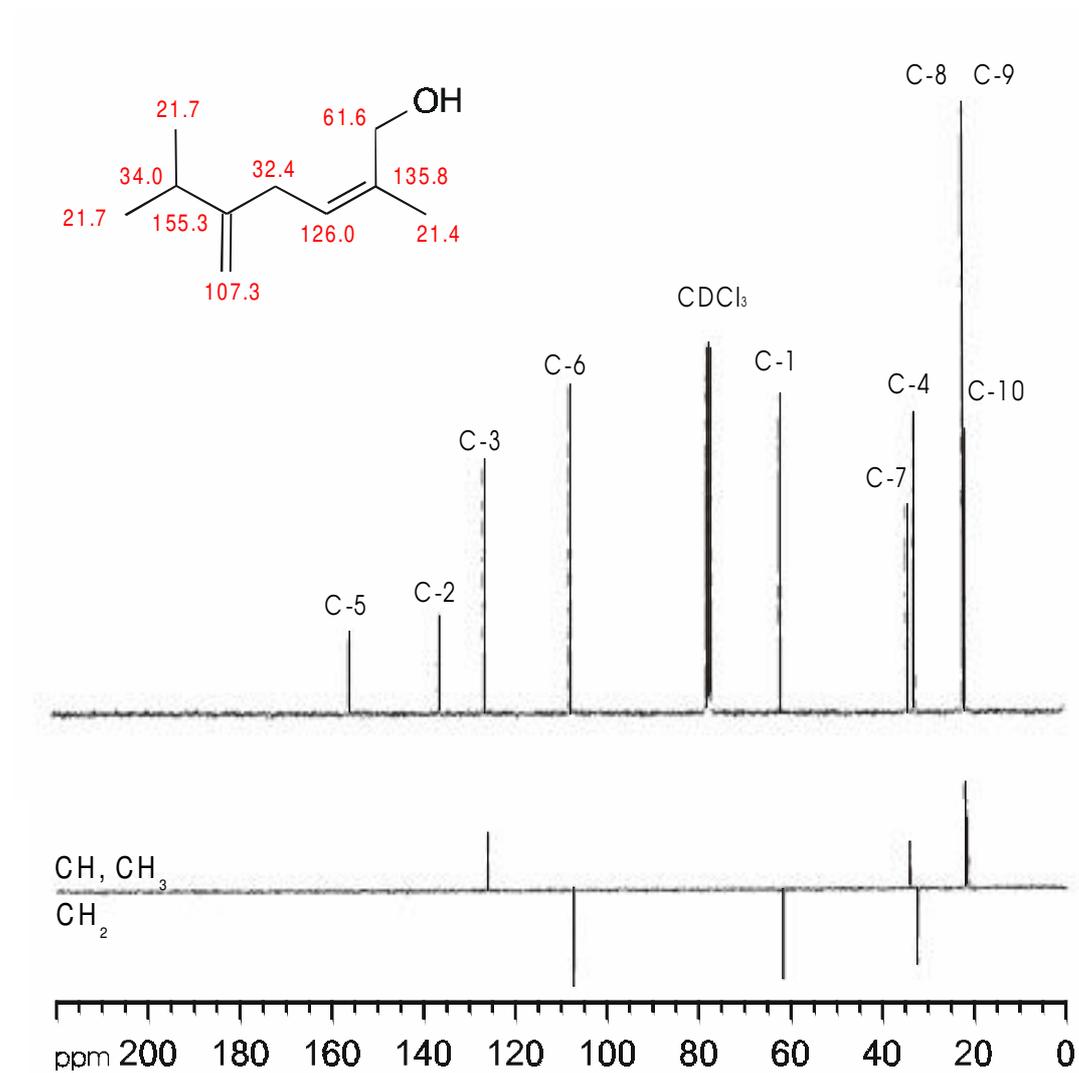


Abb. 6-2 ^{13}C -NMR-Spektrum von Isonovalol

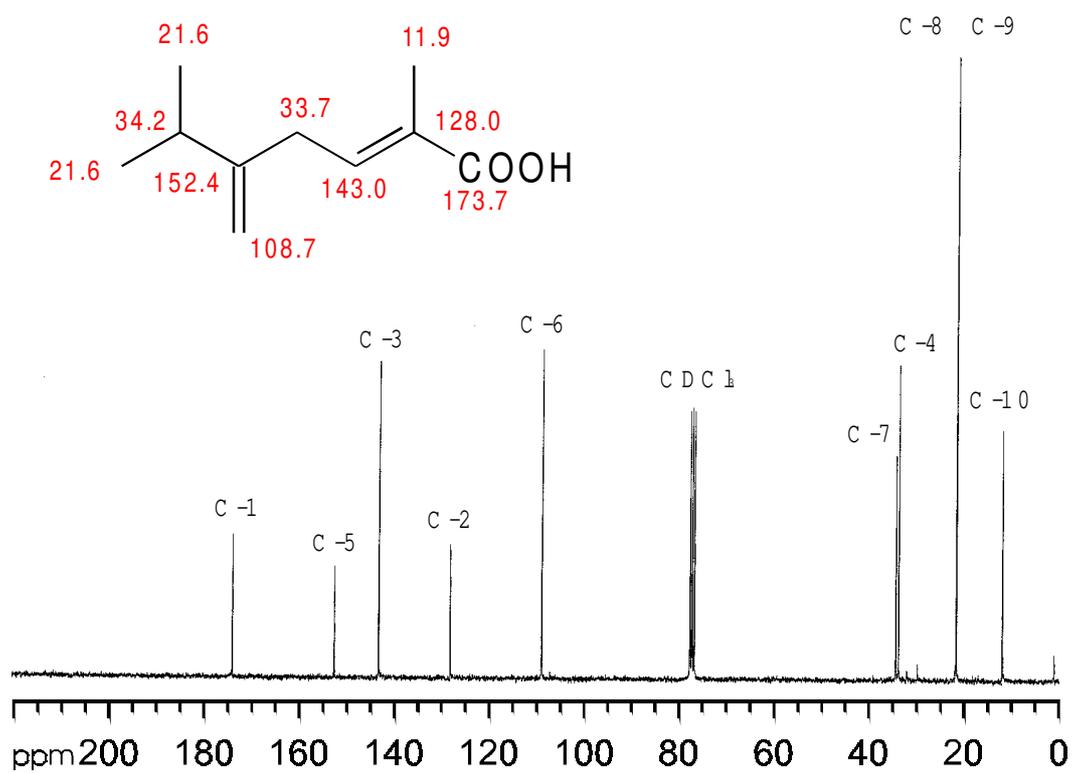


Abb. 6-3 ¹³C-NMR-Spektrum von Novalsäure

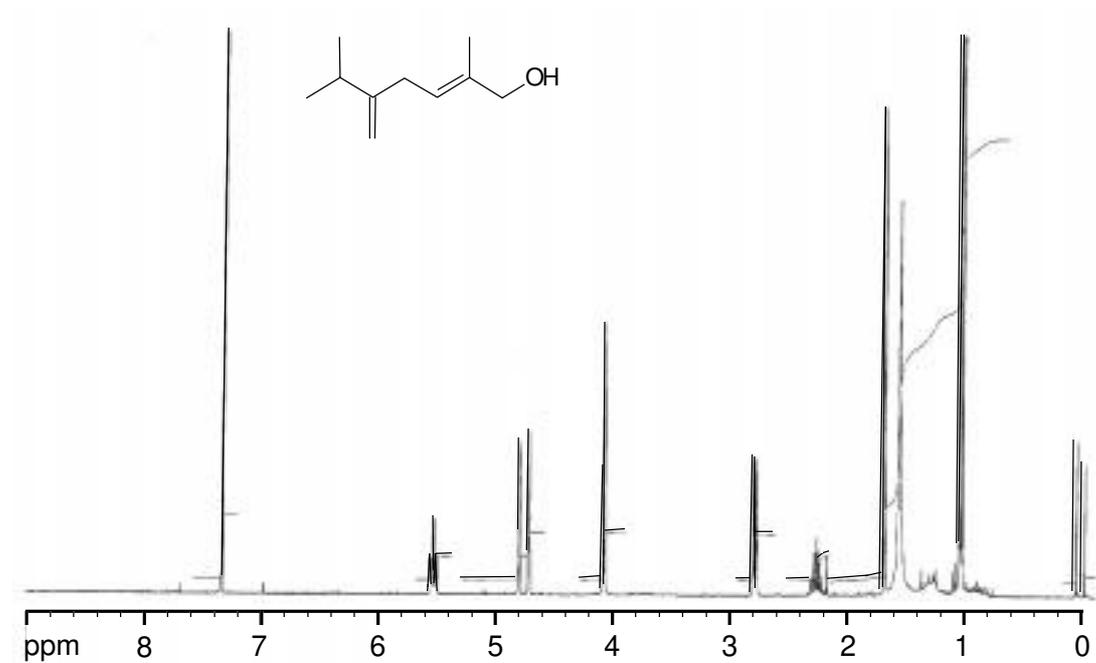


Abb. 6-4 ¹H-NMR-Spektrum von Novalol

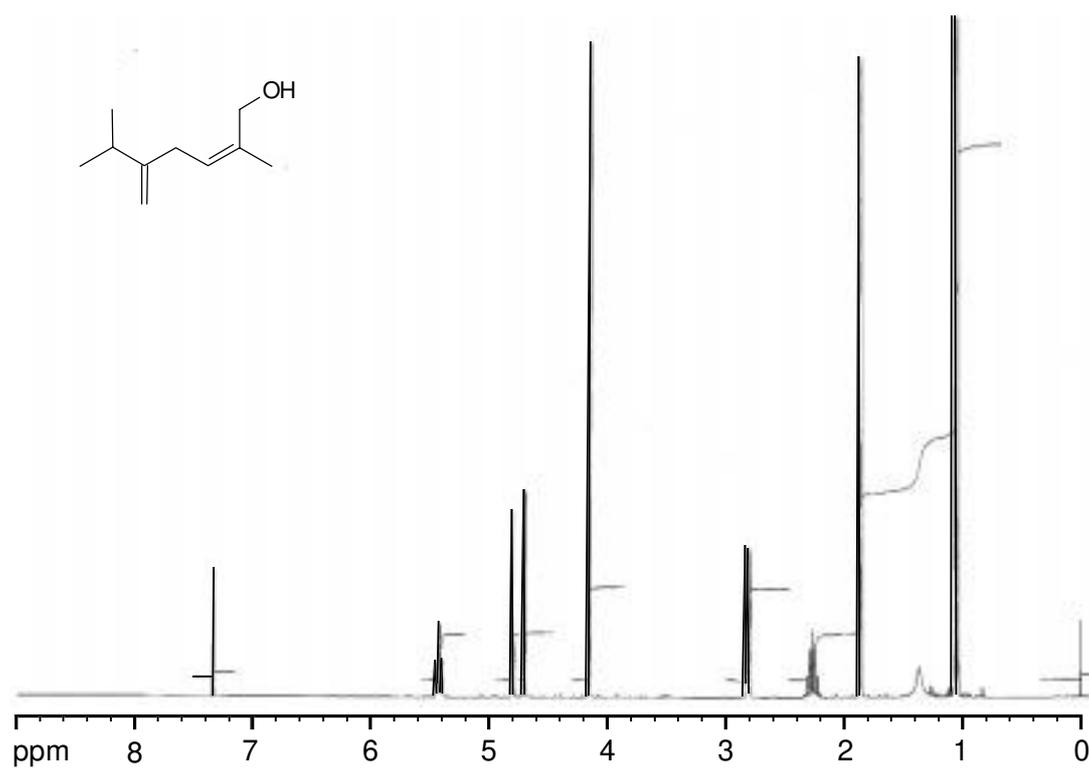


Abb. 6-5 ¹H-NMR-Spektrum von Isonovalol

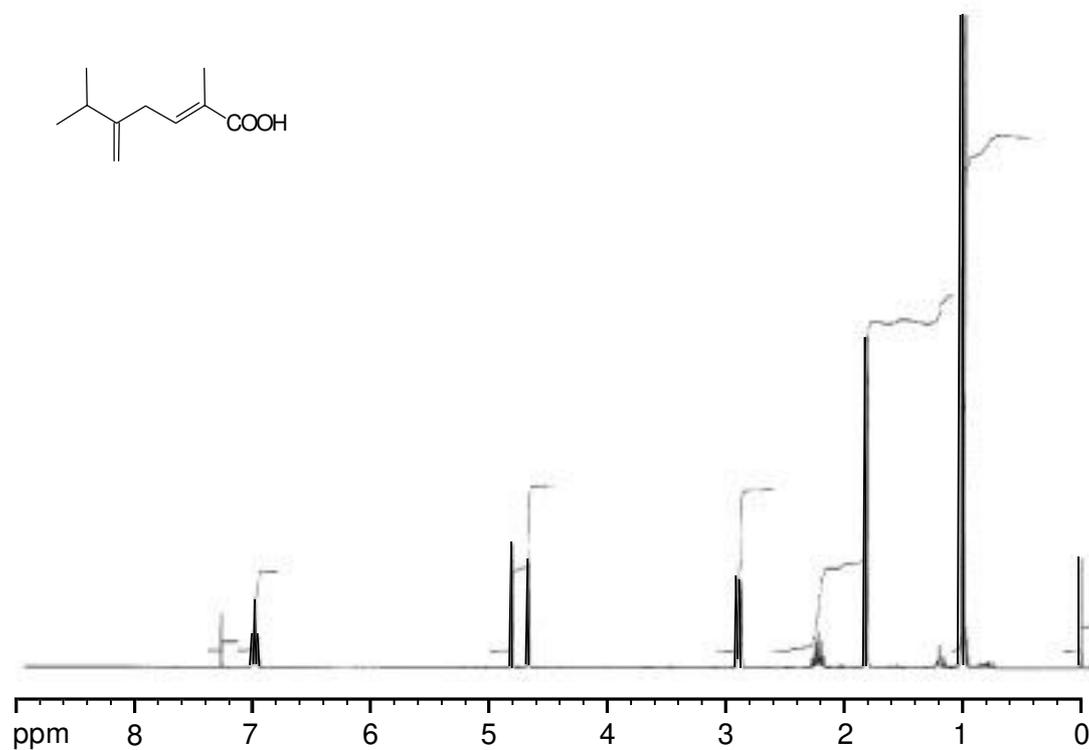


Abb. 6-6 ¹H-NMR-Spektrum von Novalsäure

Lebenslauf

Name: Elke Latza, geb. Vogel
Geburtsdatum: 26. März 1969
Geburtsort: Heidelberg
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1975-1978 Grundschule Neu-Ulm
1978-1979 Grundschule Augsburg
1979-1988 Gymnasium Augsburg, Abitur

Hochschulbildung

4/1989-3/1994 Studium der Lebensmittelchemie an der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
6/1994 Erstes Staatsexamen

Berufspraktische Ausbildung

1/1995-1/1996 Praktisches Jahr am Landesuntersuchungsamt für
das Gesundheitswesen Südbayern, Oberschleißheim
3/1996 Zweites Staatsexamen

Promotion

6/1996 Beginn der vorliegenden Arbeit
seit 10/1997 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Lebensmittelchemie der Universität Hannover