

**Enzymatische Bildung aromaaktiver  $\alpha$ -Hydroxyketone  
mit der Wildhefe *Zygosaccharomyces bisporus***

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung der Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin

**Frauke Neuser**

geboren am 10. Juli 1970 in Berlin

Referent: Prof. Dr. R. G. Berger  
Korreferent: Prof. Dr. P. Winterhalter  
Tag der Promotion: 03. Dezember 1999  
Datum der Veröffentlichung: Dezember 1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1997 bis September 1999 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. G. Berger angefertigt.

**Mein herzlicher Dank** gilt Prof. Dr. R. G. Berger, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Der große gewährte Freiraum bei der Bearbeitung der Aufgaben sowie stete Diskussionsbereitschaft und hervorragende Arbeitsbedingungen waren die Grundsteine dieser Dissertation.

Mein Dank gilt ferner

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie, vor allem Frau Dr. Elke Latza, Frau Manuela Fischer und Frau Sabine Spaether für zahlreiche Sniffing-Sitzungen und fröhliche Tage und Abende; sowie Herrn Dr. Holger Zorn für die konstruktive Kritik beim Schreiben dieser Arbeit und Herrn Daniel Neddermann für die Hilfe beim Lösen von Computer-Problemen.

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Chemische und technische Grundlagen der Naturstofftransformation“ sowie allen Mitstipendiaten für wissenschaftliche und außerfachliche Diskussionen und manche technischen Hilfestellungen.

der BASF AG (Ludwigshafen) und der Knoll AG (Minden) für die freundliche Bereitstellung von Farbstoffen für die Affinitätschromatographie und der Referenzsubstanz 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter und meinem Vater, die mich, jeder auf eigene Weise, immer unterstützt haben und deren Zuversicht und Vertrauen in mich manches erst ermöglicht und vieles erleichtert haben.

Last but not least danke ich Georg, der mir auf angenehmste Weise immer wieder bewußt machte, daß die Lebensmittelchemie nicht das Wichtigste im Leben ist.

## Zusammenfassung

Aus einem Stamm der Wildhefe *Zygosaccharomyces bisporus* wurde das Enzym Pyruvatdecarboxylase (PDC, E.C. 4.1.1.1) mit einer spezifischen Aktivität von  $59 \text{ U mg}^{-1}$  isoliert. Die Lyase katalysiert in der ethanolischen Gärung die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und Kohlendioxid. Strukturell stellte die charakterisierte PDC ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von ca. 240 kDa dar. Das Enzym wird durch sein Substrat Pyruvat aktiviert und zeigte dementsprechend eine sigmoid verlaufende Reaktionskinetik ( $K_M = 1,73 \text{ mM}$ ;  $n = 2,10$ ). Die Anwesenheit der Cofaktoren Thiamindiphosphat und  $\text{Mg}^{2+}$  erwies sich als überaus wichtig für die Erhaltung der Enzymaktivität über einen längeren Zeitraum. Neben Pyruvat (Salz der 2-Oxopropansäure) wurden auch andere 2-Oxocarbonsäuren als Substrate der Pyruvatdecarboxylase akzeptiert, führten jedoch gleichzeitig zu einer Inhibierung des Enzyms.

Eine Nebenaktivität der Pyruvatdecarboxylase stellte die Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen aus einer 2-Oxocarbonsäure und einem Aldehyd in einer Acyloinkondensations-ähnlichen Reaktion dar. Sie wurde für *Zygosaccharomyces bisporus* zuerst in fermentierenden Hefekulturen beobachtet; dabei wurden verschiedene zugesetzte Aminosäuren zunächst transaminiert und anschließend in zwei PDC-katalysierten Schritten zu Acyloinen umgesetzt. Bei der Untersuchung der Substratspezifität der C-C-bindungsknüpfenden Reaktion wurden 18 Aldehyde (mit Pyruvat) sowie 6 2-Oxocarbonsäuren (mit Acetaldehyd) mit isolierter PDC erfolgreich zu den entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxyketonen umgesetzt. Vor allem die Umsetzung aliphatischer Aldehyde wurde in dieser Bandbreite (gesättigte, ungesättigte, verzweigte Strukturen) bisher nicht festgestellt und unterscheidet die Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* offensichtlich erheblich von den Enzymen anderer Organismen. Von den 38 in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Acyloinen wurden 13 erstmals identifiziert, 14 weitere sind erstmals als natürliche Transformationsprodukte beschrieben. 23 Substanzen wiesen interessante geruchsaktive Eigenschaften auf, die bislang größtenteils unbekannt waren.

Schlagworte: *Zygosaccharomyces bisporus*, Pyruvatdecarboxylase,  $\alpha$ -Hydroxyketone, Biotransformation, Aromastoffe

## Summary

Pyruvate decarboxylase (PDC, E.C. 4.1.1.1) was purified from a wildtype yeast strain of *Zygosaccharomyces bisporus* with a specific activity of 59 U mg<sup>-1</sup>. During alcoholic fermentation the enzyme catalyses the non-oxidative decarboxylation of pyruvate to acetaldehyde and carbon dioxide. Characterisation showed the isolated PDC to be homotetrameric with a molecular weight of about 240 kDa. Activation of the enzyme by its substrate pyruvate resulted in a sigmoid dependence of the reaction rate from the substrate concentration ( $K_M = 1,73$  mM;  $n = 2,10$ ). Thiamin diphosphate and Mg<sup>2+</sup>-ions are required as cofactors and proved to be crucial for maintaining the enzymatic activity during storage. Besides pyruvate other 2-oxo-acids were accepted as substrates, however leading to inhibition of the enzyme.

Starting with a 2-oxo-acid and an aldehyde a side activity of pyruvate decarboxylase resulted in the formation of  $\alpha$ -hydroxy ketones in an acyloin-type condensation reaction. With *Zygosaccharomyces bisporus* this conversion was first observed in fermenting yeast cultures. Added amino acids were transformed to acyloins via transamination and two further steps catalysed by PDC. Investigation of substrate specificity of the C-C bond forming reaction showed that 18 aldehydes (+ pyruvate) and 6 2-oxo-acids (+ acetaldehyde) could successfully be converted to the corresponding  $\alpha$ -hydroxy ketones by incubating with isolated PDC. Especially the transformation of such a broad range of aliphatic aldehydes (saturated, unsaturated, branched structures) has not been reported before and is obviously a main difference to pyruvate decarboxylases from other organisms. 13 out of 38 here synthesized acyloins were identified for the first time; 14 further compounds had not been described as natural products (microbial or enzymatic origin) so far. 23  $\alpha$ -hydroxy ketones showed flavour-active properties mostly unknown in literature.

Key words: *Zygosaccharomyces bisporus*, pyruvate decarboxylase,  $\alpha$ -hydroxy ketones, biotransformation, flavours



---

**Inhaltsverzeichnis**

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Problemstellung	3
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Isolierung und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase aus         <i>Zygosaccharomyces bisporus</i></b>	<b>5</b>
2.1.1 Fermentation	5
2.1.2 Zellaufschluß	6
2.1.3 Ammoniumsulfat-Fällung	6
2.1.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	7
2.1.5 Gelpermeationschromatographie (GPC)	8
2.1.6 Ionenaustauschchromatographie (IC)	9
2.1.7 Überprüfung der Reinheit der PDC	10
2.1.8 Bilanzierung der Reinigungsschritte	11
<b>2.2 Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase</b>	<b>12</b>
2.2.1 Molekulargewicht	12
2.2.2 Isoelektrischer Punkt (pI)	15
2.2.3 Substratkinetik	18
2.2.4 Temperatur- und pH-Abhängigkeit	22
2.2.5 Substratspezifität	27
2.2.6 Substratinhibierung	29
<b>2.3 Substratspektrum der Bildung von <math>\alpha</math>-Hydroxyketonen</b>	<b>31</b>
2.3.1 Transformationen mit Hefekulturen von <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	31
2.3.1.1 Aminosäuren als Precursoren	31
2.3.1.2 2-Oxosäuren und Aldehyde als Precursoren	34

---

2.3.2 Transformationen mit isolierter Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	38
2.3.2.1 Aminosäure-Analoga	38
2.3.2.2 Weitere Substrate	47
<b>2.4 Quantitative Untersuchungen zur Acyloinbildung mit isolierter PDC</b>	<b>62</b>
2.4.1 Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert	62
2.4.2 Kinetik	64
2.4.3 Abhängigkeit von Art und Konzentration der Substrate	64
2.4.3.1 Einfluß der Kettenlänge	65
2.4.3.2 Einfluß des Sättigungsgrades	67
2.4.3.3 Einfluß der Kettenverzweigung	68
2.4.3.4 Aromatische Substrate	70
2.4.3.5 Pyruvatkonzentration	70
2.4.3.6 Zusammenfassung	71
2.4.4 Isomerenverhältnis	73
2.4.5 Vergleich der Bildung aromatischer Acyloine mittels isolierter PDC und einem Gesamtprotein-Extrakt	75
<b>2.5 Charakterisierung der gebildeten <math>\alpha</math>-Hydroxyketone</b>	<b>76</b>
2.5.1 Stereochemie	76
2.5.2 Olfaktorische Eigenschaften	82
<b>2.6 Nachweis von <math>\alpha</math>-Hydroxyketonen in Lebensmitteln</b>	<b>85</b>
<b>3 Diskussion</b>	<b>90</b>
<b>3.1 Das Enzym Pyruvatdecarboxylase (PDC)</b>	<b>90</b>
3.1.1 Vorkommen und Struktur	90
3.1.2 Reaktionsmechanismus	93
<b>3.2 Isolierung und Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zygosaccharomyces bisporus</i></b>	<b>95</b>
<b>3.3 Carboligase-Aktivität von Pyruvatdecarboxylasen verschiedener Herkunft</b>	<b>97</b>
3.3.1 Allgemeines	97
3.3.2 Substratspektrum	99
3.3.3 Stereoselektivität	101
<b>3.4 Bildung von <math>\alpha</math>-Hydroxyketonen mit <i>Zygosaccharomyces bisporus</i></b>	<b>102</b>
3.4.1 Substratspektrum der Reaktion	103
3.4.1.1 Aminosäuren und ihre Analoga	103
3.4.1.2 Weitere Substrate	108

---

3.4.2	Quantitative Aspekte der Acyloinbildung mit isolierter PDC	109
3.4.2.1	Reaktionsbedingungen	110
3.4.3	Stereochemie und Isomerenverhältnis der gebildeten Acyloine	112
<b>3.5</b>	<b><math>\alpha</math>-Hydroxyketone: Vorkommen und Bedeutung</b>	<b>118</b>
3.5.1	Natürliches Vorkommen	118
3.5.2	Mögliche Bildungswege	119
3.5.2.1	Die PDC-katalysierte Reaktion	119
3.5.2.2	Alternative Biosynthesewege	121
3.5.2.3	Zusammenfassung und Diskussion der Bildungswege	122
3.5.3	Bedeutung als Aromastoffe	125
<b>3.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>128</b>
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>130</b>
<b>4.1</b>	<b>Materialien und Chemikalien</b>	<b>130</b>
4.1.1	Organismus	130
4.1.2	Lösungsmittel	130
4.1.3	Weitere Chemikalien	131
4.1.4	Gase für Synthesen und Gaschromatographie	132
4.1.5	Sonstige Hilfsmittel	133
<b>4.2</b>	<b>Chromatographie</b>	<b>134</b>
4.2.1	Säulenchromatographie	134
4.2.1.1	Adsorptionschromatographie an Kieselgel	134
4.2.2	Kapillargaschromatographie (HRGC)	134
4.2.2.1	HRGC mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID)	134
4.2.2.2	HRGC mit Split-Splitless-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID)	134
4.2.2.3	HRGC mit On-Column-Injektion und olfaktorischer Detektion (GC-O)	135
4.2.2.4	HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS)	135
4.2.2.5	Präparative Gaschromatographie	136
4.2.2.6	Berechnung von Kovats-Indices	137
4.2.3	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	137
4.2.3.1	Semipräparative HPLC	137
4.2.4	Chromatographie proteinhaltiger Proben	138
4.2.4.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	138

---

4.2.4.2	Gelpermeationschromatographie (GPC)	139
4.2.4.3	Ionenaustauschchromatographie (IC)	139
<b>4.3</b>	<b>UV/VIS-Spektroskopie</b>	<b>140</b>
<b>4.4</b>	<b>Polarimetrie</b>	<b>140</b>
<b>4.5</b>	<b>Gelelektrophorese</b>	<b>140</b>
4.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	140
4.5.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	143
4.5.2.1	Aktivitätsfärbung	143
<b>4.6</b>	<b>Kultivierung von <i>Zygosaccharomyces bisporus</i> CBS 702</b>	<b>144</b>
4.6.1	Kulturmedien	144
4.6.2	Kulturführung	145
4.6.3	Bestimmung der Zellmasse	145
4.6.4	Transformationen	146
4.6.4.1	Zusatz von Aminosäuren	146
4.6.4.2	Zusatz weiterer Substrate	147
4.6.5	Isolierung mittelpolarer Transformationsprodukte aus Hefekulturen	147
<b>4.7</b>	<b>Proteinanalytik</b>	<b>147</b>
4.7.1	Aktivitätsbestimmung der Pyruvatdecarboxylase (PDC)	147
4.7.2	Bestimmung des Proteingehaltes	149
4.7.3	Isolierung und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase	149
4.7.3.1	Biomasse-Bildung	149
4.7.3.2	Zellaufschluß	149
4.7.3.3	Reinigungsschritte	150
4.7.3.3.1	Ammoniumsulfat-Fällung	150
4.7.3.3.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	150
4.7.3.3.3	Gelpermeationschromatographie (GPC)	151
4.7.3.3.4	Ionenaustauschchromatographie (IC)	151
4.7.4	Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase	151
4.7.4.1	Bestimmung des Molekulargewichtes	151
4.7.4.2	Bestimmung des isoelektrischen Punktes	153
4.7.4.3	Untersuchung der Substratkinetik	154
4.7.4.4	Einfluß der Temperatur auf die PDC-Aktivität	154
4.7.4.5	Einfluß des pH-Wertes auf die PDC-Aktivität	154
4.7.4.6	Untersuchung der Substratspezifität	155
4.7.4.7	Untersuchung der Substratinhibition	155
<b>4.8</b>	<b>Transformationen mit isolierter Pyruvatdecarboxylase</b>	<b>156</b>

---

4.8.1	Untersuchung des Substratspektrums der Acyloinbildung	156
4.8.2	Untersuchung der Reaktionsbedingungen der Acyloinbildung	157
4.8.2.1	Substratkonzentration	157
4.8.2.2	Temperatur und pH-Wert	157
4.8.2.3	Zeitverlauf	158
<b>4.9</b>	<b>Bestimmung von Geruchsqualitäten und Geruchsschwellen</b>	<b>158</b>
<b>4.10</b>	<b>Isolierung von <math>\alpha</math>-Hydroxyketonen aus Lebensmitteln</b>	<b>159</b>
<b>4.11</b>	<b>Synthesen</b>	<b>159</b>
4.11.1	(R,S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	159
4.11.2	(S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	160
4.11.3	(R)-3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	161
4.11.4	(S)-3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	161
4.11.5	(S)-2-Hydroxy-4-methyl-3-pentanon	161
4.11.6	(R,S)-3-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon	162
4.11.7	(S)-2-Hydroxy-4-methyl-3-hexanon	162
4.11.8	(3R,S, 4R,S)-3-Hydroxy-4-methyl-2-hexanon	162
4.11.9	(S)-2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon	163
4.11.10	(S)-3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon	163
4.11.11	(R,S)-1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon	163
4.11.12	(R,S)-3-Hydroxy-2-octanon	163
4.11.13	Isomerisierung von $\alpha$ -Hydroxyketonen	164
<b>4.12</b>	<b>Derivatisierungen</b>	<b>164</b>
4.12.1	Derivatisierung mit (S)-MTPA-Cl	164
4.12.2	Stereochemische Analysen	165
<b>4.13</b>	<b>Entsorgungshinweise</b>	<b>165</b>
4.13.1	Biologisches Material	165
4.13.2	Lösungsmittel und Chemikalien	165
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>167</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>179</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb 2-1	Verlauf von Trockenmassegehalt und PDC-Gesamtaktivität in Schüttelkulturen von <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	6
Abb 2-2	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose 6	7
Abb 2-3	Gelpermeationschromatographie an HiPrep Sephacryl S-300	8
Abb 2-4	Ionenaustauschchromatographie an HiLoad Q Sepharose	9
Abb 2-5	Gelpermeationschromatographie an Bio-Silect SEC-400	10
Abb 2-6	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Pyruvatdecarboxylase durch GPC an Superdex 200 HR	12
Abb 2-7	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Pyruvatdecarboxylase durch GPC an Bio-Silect SEC-400	13
Abb 2-8	SDS-PAGE der Pyruvatdecarboxylase	14
Abb 2-9	Bestimmung des Molekulargewichtes der Pyruvatdecarboxylase durch SDS-PAGE	15
Abb 2-10	IEF der Pyruvatdecarboxylase	16
Abb 2-11	Aktivitätsfärbung der PDC nach isoelektrischer Fokussierung	17
Abb 2-12	Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Pyruvatdecarboxylase durch IEF	17
Abb 2-13	Kinetik der PDC	19
Abb 2-14	Kinetik der PDC-Reaktion bei geringen Substratkonzentrationen	19
Abb 2-15	Bestimmung der scheinbaren Michaelis-Konstante von PDC	21
Abb 2-16	Hill-Plot des Pyruvatumsatzes mit PDC	22
Abb 2-17	Temperatur-Optimum der PDC aus <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	22
Abb 2-18	Temperaturstabilität der PDC mit den Cofaktoren Mg <sup>2+</sup> und TDP	23
Abb 2-19	Temperaturstabilität der PDC ohne die Cofaktoren Mg <sup>2+</sup> und TDP	24
Abb 2-20	pH-Optimum der PDC aus <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	25
Abb 2-21	pH-Stabilität der PDC mit den Cofaktoren Mg <sup>2+</sup> und TDP	25

---

Abb 2-22	pH-Stabilität der PDC ohne die Cofaktoren $Mg^{2+}$ und TDP	26
Abb 2-23	Inhibierung der Pyruvatdecarboxylase durch mögliche Substratanaloga	29
Abb 2-24	Inhibierung der Pyruvatdecarboxylase durch mögliche aromatisch substituierte Substratanaloga	30
Abb 2-25	Mögliche Bildungswege von $\alpha$ -Hydroxyketonen in Hefezellen	31
Abb 2-26	Acyloinbildung aus Aminosäuren mit <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	34
Abb 2-27	Bildung aromatischer Acyloine aus verschiedenen Precursorvorstufen	35
Abb 2-28	Struktur der phenylbutanoiden Acyloine aus Phenylpyruvat bzw. Phenylacetaldehyd	36
Abb 2-29	Vergleich der Bildung aliphatischer Acyloine aus Aminosäuren und den entsprechenden 2-Oxosäuren	37
Abb 2-30	Massenspektren von 2-Hydroxy-4-methyl-3-pentanon ( <b>3</b> ) und 3-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon ( <b>4</b> )	42
Abb 2-31	Massenspektren von 2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon ( <b>5</b> ) und 3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon ( <b>6</b> )	43
Abb 2-32	Massenspektren von 2-Hydroxy-4-methyl-3-hexanon ( <b>7</b> ) und 3-Hydroxy-4-methyl-2-hexanon ( <b>8</b> )	45
Abb 2-33	Massenspektren von 2-Hydroxy-5-(methylthio)-3-pentanon ( <b>9</b> ) und 3-Hydroxy-5-(methylthio)-2-pentanon ( <b>10</b> )	46
Abb 2-34	FID-Gaschromatogramm der enzymatischen PDC-Umsetzung	49
Abb 2-35	Massenspektren von 2-Hydroxy-3-nonanon ( <b>19</b> ) und 3-Hydroxy-2-nonanon ( <b>20</b> )	53
Abb 2-36	Massenspektren von 2-Hydroxy-4-methyl-3-heptanon ( <b>23</b> ) und 3-Hydroxy-4-methyl-2-heptanon ( <b>24</b> )	54
Abb 2-37	Massenspektren von 2-Hydroxy-4 <i>E</i> -hexen-3-on ( <b>25</b> ) und 3-Hydroxy-4 <i>E</i> -hexen-2-on ( <b>26</b> )	55
Abb 2-38	Massenspektren von 2-Hydroxy-4 <i>E</i> -hepten-3-on ( <b>27</b> ) und 3-Hydroxy-4 <i>E</i> -hepten-2-on ( <b>28</b> )	56
Abb 2-39	Massenspektren von 2-Hydroxy-4 <i>E</i> -octen-3-on ( <b>29</b> ) und 3-Hydroxy-4 <i>E</i> -octen-2-on ( <b>30</b> )	58
Abb 2-40	Massenspektren von 2-Hydroxy-4-methyl-4 <i>E</i> -hexen-3-on ( <b>31</b> ) und 3-Hydroxy-4-methyl-4 <i>E</i> -hexen-2-on ( <b>32</b> )	59
Abb 2-41	Massenspektren von 2-Hydroxy-5-methyl-4 <i>E</i> -hexen-3-on ( <b>33</b> ) und 3-Hydroxy-5-methyl-4 <i>E</i> -hexen-2-on ( <b>34</b> )	60

---

Abb 2-42	Massenspektren von 1-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon ( <b>37</b> ) und 2-Hydroxy-1-phenyl-1-butanon ( <b>38</b> )	61
Abb 2-43	Acetoinbildung aus Pyruvat und Acetaldehyd mit PDC in Abhängigkeit von der Temperatur	62
Abb 2-44	Acetoinbildung aus Pyruvat und Acetaldehyd mit PDC in Abhängigkeit vom pH-Wert	63
Abb 2-45	Kinetik der enzymatischen Acyloinbildung aus Hexanal und Pyruvat	64
Abb 2-46	Acyloinbildung aus geradkettigen gesättigten Aldehyden in Abhängigkeit von Substratkonzentration und Kettenlänge	65
Abb 2-47	Acyloinbildung aus geradkettigen ungesättigten Aldehyden in Abhängigkeit von Substratkonzentration und Kettenlänge	66
Abb 2-48	Acyloinbildung aus verzweigten gesättigten Aldehyden in Abhängigkeit von Substratkonzentration und Kettenlänge	67
Abb 2-49	Acyloinbildung aus geradkettigen Aldehyden in Abhängigkeit von Sättigungsgrad und Kettenlänge	68
Abb 2-50	Acyloinbildung aus gesättigten Aldehyden in Abhängigkeit von Kettenlänge und -verzweigung	69
Abb 2-51	Acyloinbildung aus Aldehyden in Abhängigkeit von Substratkonzentration sowie Sättigungsgrad und Kettenverzweigung	69
Abb 2-52	Acyloinbildung aus aromatischen Aldehyden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration	70
Abb 2-53	Acyloinbildung aus Hexanal und Pyruvat in Abhängigkeit vom Verhältnis der Substratkonzentrationen	71
Abb 2-54	Acyloinbildung aus 2-Oxosäuren mit isolierter PDC und einem Gesamt-Rohextrakt	75
Abb 2-55	MS-Gaschromatogramm der MTPA-Derivate von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	78
Abb 2-56	MS-Gaschromatogramm der MTPA-Derivate von 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	79
Abb 2-57	MS-Gaschromatogramm der MTPA-Derivate von 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon	81
Abb 2-58	MS-Gaschromatogramm der MTPA-Derivate von 3-Hydroxy-2-octanon	82
Abb 2-59	MS-Gaschromatogramme der Gesamtextrakte von Sherry	86
Abb 2-60	Ausschnitte aus den MS-Chromatogrammen der beiden Sherry-Proben	87
Abb 2-61	MS-Gaschromatogramm des Gesamtextraktes der Sojasauce	88

---

Abb 3-1	Schlüsselreaktionen des Pyruvats im Stoffwechsel von Hefen	91
Abb 3-2	Thiamindiphosphat (TDP)	93
Abb 3-3	Mechanismus der durch Pyruvatdecarboxylase katalysierten Reaktionen	94
Abb 3-4	(-)-Ephedrin-Synthese nach dem Knoll-Verfahren	98
Abb 3-5	Strukturen aromatischer und heterocyclischer Aldehyde, die zu Acyloinen umgesetzt wurden	100
Abb 3-6	Bildung der Fuselalkohole durch Hefen nach dem Schema von Ehrlich	104
Abb 3-7	Bildung flüchtiger Sekundärmetabolite in Hefen	105
Abb 3-8	Postulierter Biosyntheseweg von Soleron	107
Abb 3-9	PDC-katalysierte Acyloinbildung aus Benzaldehyd und verschiedenen 2-Oxosäuren	108
Abb 3-10	Isomerisierungs-Gleichgewicht sekundärer $\alpha$ -Hydroxyketone	112
Abb 3-11	Produkte der PDC-katalysierten Transformation von Butanal und Pyruvat	114
Abb 3-12	Umsetzung von Phenylglyoxylsäure mit isolierter PDC aus <i>Z. bisporus</i>	116
Abb 3-13	Bildung phenylbutanoider Acyloine unterschiedlicher Konstitution und Konfiguration mit Pyruvatdecarboxylase aus <i>Z. bisporus</i>	117
Abb 3-14	Strukturen wichtiger und häufig vorkommender 2-Oxocarbonsäuren des Stoffwechsels	120
Abb 3-15	Biosynthese von Acetoin aus Acetolactat	121
Abb 3-16	Redox-Systeme von Acetoin und Hydroxypentanon	122
Abb 3-17	Strukturen der in Sherry identifizierten $\alpha$ -Hydroxyketone und ihrer möglichen Aminosäure-Precursoren	123
Abb 4-1	Synthese von (R,S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon nach Gill	160
Abb 4-2	Synthese von (S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	160
Abb 4-3	Synthese von 3-Hydroxy-2-octanon	163
Abb 4-4	(S)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluoromethyl-phenylelessigsäurechlorid	164
Abb 6-1	Massenspektren von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon ( <b>1</b> ) und 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon ( <b>2</b> )	179
Abb 6-2	Massenspektren von 2-Hydroxy-3-pentanon ( <b>11</b> ) und 3-Hydroxy-2-pentanon ( <b>12</b> )	180
Abb 6-3	Massenspektren von 2-Hydroxy-3-hexanon ( <b>13</b> ) und 3-Hydroxy-2-hexanon ( <b>14</b> )	181

Abb 6-4	Massenspektren von 2-Hydroxy-3-heptanon ( <b>15</b> ) und 3-Hydroxy-2-heptanon ( <b>16</b> )	182
Abb 6-5	Massenspektren von 2-Hydroxy-3-octanon ( <b>17</b> ) und 3-Hydroxy-2-octanon ( <b>18</b> )	183
Abb 6-6	Massenspektren von 2-Hydroxy-3-decanon ( <b>21</b> ) und 3-Hydroxy-2-decanon ( <b>22</b> )	184
Abb 6-7	Massenspektren von 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon ( <b>35</b> ) und 2-Hydroxy-1-phenyl-1-propanon ( <b>36</b> )	185

---

**Tabellenverzeichnis**

---

Tab 2-1	Bilanzierung von Isolierung und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	11
Tab 2-2	Substratspektrum der Decarboxylierungsreaktion der PDC aus <i>Z. bisporus</i>	27
Tab 2-3	Substratspektrum der Acyloinbildung aus Aminosäuren mit <i>Z. bisporus</i>	32
Tab 2-4	Substratspektrum der Acyloinbildung aus Aminosäure-Analoga mit Pyruvatdecarboxylase aus <i>Z. bisporus</i>	38
Tab 2-5	Identifizierte Acyloine aus Aminosäure-Analoga	40
Tab 2-6	Substratspektrum der Acyloinbildung aus Aldehyden und 2-Oxosäuren mit Pyruvatdecarboxylase aus <i>Z. bisporus</i>	47
Tab 2-7	Identifizierte Acyloine aus der enzymatischen Transformation mit PDC	50
Tab 2-8	Acyloinausbeute der enzymatischen Transformation von Aldehyden	72
Tab 2-9	Acyloinausbeute der enzymatischen Transformation von 2-Oxosäuren	73
Tab 2-10	Isomerenverhältnisse gebildeter Acyloine	74
Tab 2-11	Olfaktorische Eigenschaften aromatischer Acyloine	83
Tab 2-12	Olfaktorische Eigenschaften aliphatischer Acyloine	84
Tab 2-13	Acyloine ohne charakteristische olfaktorische Eigenschaften	85
Tab 3-1	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Z. bisporus</i> im Vergleich zu den Enzymen anderer Organismen	96
Tab 3-2	Wasserlöslichkeit einiger Aldehyde	111
Tab 3-3	Natürliches Vorkommen sekundärer $\alpha$ -Hydroxyketone	118
Tab 3-4	Vorkommen sekundärer $\alpha$ -Hydroxyketone in Sherry und Sojasauce	119
Tab 3-5	Aldehyde als Sekundärprodukte der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren	121
Tab 3-6	$\alpha$ -Hydroxyketone als Aromastoffe	125
Tab 3-7	Vergleich der Geruchsschwellenwerte einiger Verbindungen mit C <sub>8</sub> -Gerüst	126

Tab 3-8	Vergleich der Geruchsschwellenwerte einiger ungesättigter Aldehyde	126
Tab 3-9	Geruchsschwellenwerte verschiedener Carbonyl-Verbindungen	127
Tab 3-10	Vorkommen und Verwendung von $\alpha$ -Diketonen in Lebensmitteln	127
Tab 4-1	Verwendete Lösungsmittel	131
Tab 4-2	Häufig verwendete Chemikalien	132
Tab 4-3	Verwendete Gase	133
Tab 4-4	Verwendete Geräte	133

---

**Abkürzungsverzeichnis**

---

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALS	Acetolactatsynthase
ALDC	Acetolactatdecarboxylase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eV	Elektronenvolt
Da	Dalton (relative Masseneinheit; $m(^{12}\text{C}) = 12$ )
DECHEMA	Deutsche Gesellschaft für chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPY	Glucose-Pepton-Yeastextract (Agar)
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HMW	High Molecular Weight
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IC	Ionen(austausch)chromatographie
ID	Innendurchmesser
IEF	Isoelektrische Fokussierung
ISTD	Interner Standard
KI	Kovats-Index
LMW	Low Molecular Weight
M	$\text{mol L}^{-1}$ ; Stoffmengenkonzentration
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NADH	Nicotinamid-adenindinucleotid (reduzierte Form)

PAC	Phenylacetylcarbinol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PDC	Pyruvatdehydrogenase
pI	isoelektrischer Punkt
PYC	Pyruvatcarboxylase
R <sub>F</sub>	Retentionsfaktor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SL	Stammlösung
TA	Transaminase
TDP	Thiamindiphosphat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
upm	Umdrehungen pro Minute

---

„Je planmäßiger wir vorgehen, um so wirkungsvoller trifft uns der Zufall.“  
(Friedrich Dürrenmatt)

---

## 1 Einleitung

---

Mikrobielle Stoffwechselfvorgänge werden seit Jahrtausenden bei der Verarbeitung von Lebensmitteln genutzt; beispielhaft seien hier die Wein-, Brot- und Käseherstellung genannt. Diese Verfahren können als Vorläufer der modernen Biotechnologie angesehen werden, für die eine Definition der DECHEMA lautet: „Die Biotechnologie beinhaltet den Einsatz biologischer Prozesse im Rahmen technischer Verfahren und industrieller Produktionen. (...) Sie behandelt Reaktionen biologischer Art, die entweder mit lebenden Zellen (Mikroorganismenzellen, pflanzlichen und tierischen Zellen bzw. Geweben) oder mit Enzymen durchgeführt werden. (...)“ [1].

Enzyme sind die Katalysatoren biologischer Reaktionen, deren Gesamtheit den Stoffwechsel aller Organismen darstellt. Bis auf eine Gruppe katalytisch aktiver RNA-Moleküle (Ribozyme) sind alle Biokatalysatoren Proteine [2]. Der Begriff „Enzym“ leitet sich aus dem griechischen ab (*en* = in; *zyme* = Hefe) und wurde am Ende des letzten Jahrhunderts geprägt, um herauszuheben, daß es etwas in der Hefe gäbe, das die Fermentationsreaktionen katalysiert [3]. 1897 gelang es Eduard Buchner, einen zellfreien Hefeextrakt zu gewinnen, der Zucker zu Alkohol vergären konnte. Für diese zukunftsweisenden Arbeiten wurde er 1907 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet [4].

Derzeit sind über 3200 Enzyme bekannt, es wird jedoch angenommen, daß ihre Zahl weit höher liegt und bis zu 10000 beträgt [5]. Nach den katalysierten Reaktionstypen erfolgt die Einteilung der Enzyme in 6 Hauptklassen (Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen). Viele Enzyme benötigen für ihre katalytische Aktivität neben dem Proteinanteil (Apoenzym) zusätzliche chemische Komponenten, die als Cofaktoren bezeichnet werden (Apoenzym + Cofaktor = Holoenzym). Bei den Cofaktoren kann es sich um anorganische Ionen (z.B.  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) oder komplexe organische Moleküle (z.B. TDP, NAD) handeln.

Enzyme sind den üblichen chemischen Katalysatoren in wichtigen Punkten überlegen:

- höhere Reaktionsgeschwindigkeit
- Wirksamkeit unter milderen (physiologischen) Reaktionsbedingungen (Druck, pH, Temperatur)
- größere Reaktions- und Substratspezifität
- höhere Stereoselektivität.

Enzymatisch bzw. mikrobiell katalysierte Reaktionen werden seit Beginn dieses Jahrhunderts in zunehmendem Maße in der pharmazeutischen und chemischen Industrie genutzt (z.B. Herstellung von Antibiotica und anderer mikrobieller Wirkstoffe). Im Lebensmittelbereich können mittlerweile zahlreiche Substanzen wie Citronensäure, Aminosäuren, Polysaccharide oder Vitamine durch biotechnologische Prozesse einfacher und kostengünstiger als mit klassischen Verfahren produziert werden [5, 6].

In den letzten Jahren hat auch die biotechnologische Herstellung von Aromastoffen einen starken Aufschwung erlebt [7, 8, 9]. Dazu hat u.a. beigetragen, daß derart produzierte Stoffe nach europäischem und US-amerikanischem Recht als „natürlich“ klassifiziert werden können, was ihnen einen deutlichen Marktvorteil verschafft [10]. Den Ansprüchen der Verbraucher folgend, sind heute etwa 75 % aller in Deutschland vermarkteten Lebensmittel-Aromen natürlicher Herkunft [11], obwohl 84 % aller weltweit umgesetzten Aroma- und Duftstoffe (Flavours & Fragrances) chemisch synthetisiert werden [9]. Diese Produkte werden z.B. auch als Zusatzstoffe in der Kosmetik- und Waschmittelherstellung eingesetzt. Neben dem rechtlichen Aspekt sprechen jedoch vor allem die oben genannten mechanistischen Vorteile enzymatischer Reaktionen und folgende zusätzliche Gesichtspunkte für den Einsatz biotechnologischer Verfahren [10, 12, 13]:

- Unabhängigkeit von landwirtschaftlichen Ressourcen
- ökologische Kompatibilität
- deutliche Verfahrensverbesserungen durch Fortschritte in der molekularbiologischen Forschung (z.B. *Genetic Engineering*).

Unter den zahlreichen in der Lebensmittel-Biotechnologie eingesetzten Mikroorganismen spielen Hefen, vor allem Bäcker- oder Weinhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), seit langem eine wichtige Rolle. Auch in der chemischen und pharmazeutischen Industrie werden ihre synthetischen Fähigkeiten umfangreich genutzt, insbesondere stereoselektive Reduktio-

nen, aber auch Hydrolysen und C-C-Bindungsknüpfungen sind hier zu nennen [14, 15, 16]. In der Aromastoff-Produktion werden verschiedenen *Candida*-Species u.a. zur Gewinnung von Lactonen wie 4- und 5-Decanolid eingesetzt [9].

## 1.1 Problemstellung

*Saccharomyces cerevisiae* gehört hinsichtlich molekularbiologischer und physiologischer Aspekte zu den bestuntersuchten Mikroorganismen. In zahlreichen fermentierten Lebensmitteln trägt die Hefe zu deren spezifischem Aroma bei (Bier, Wein, Backwaren, Sojasauce etc.). Durch jahrzehntelange Züchtungen hinsichtlich hoher, aber einseitiger Produktausbeuten (z.B. bei der alkoholischen Gärung) ist jedoch möglicherweise die metabolische Vielseitigkeit zur Bildung von flüchtigen Sekundärstoffen begrenzt worden. Breitere Substanzspektren sind hier von den sogenannten „Wildhefen“ oder „non-conventional yeasts“ zu erwarten. Der Oberbegriff umfaßt praktisch alle Hefen außer *S. cerevisiae* [17]. Sie sind auf vielen Rohstoffen pflanzlicher Herkunft ubiquitär vorhanden (z.B. Weintrauben), werden jedoch bei anschließender Fermentation rasch von den zugesetzten Reinzuchthefen überwachsen [4]. Wildhefen werden häufig primär im Zusammenhang mit Lebensmittelverderb und Off-Flavour-Bildung genannt. Ihr Beitrag zum erwünschten Aroma fermentierter Produkte darf jedoch nicht unterbewertet werden.

In vorausgegangenen Studien waren 11 verschiedene Species und Stämme von Wild- und Weinhefen auf ihr Potential zur Synthese aromaaktiver Sekundärmetabolite untersucht worden [18]. Ein Stamm von *Zygosaccharomyces bisporus* fiel bei Supplementierung des Wachstumsmediums mit L-Phenylalanin durch die Bildung signifikanter Mengen aromatischer  $\alpha$ -Hydroxyketone auf, die zum Teil olfaktorisch interessante Eigenschaften aufwiesen. 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon wurde in 87 %igem Enantiomerenüberschuß nachgewiesen (absolute Konfiguration unbekannt). Die Substanz war bisher nicht als Hefe-Stoffwechselprodukt beschrieben. Die höchsten Produktausbeuten ergaben sich im Unterschied zu optimalem Zellwachstum in einem Minimalmedium mit 10 g L<sup>-1</sup> Glucose, 8 Vol% Ethanol sowie Phenylalanin als einziger Stickstoff-Quelle.

Als Biosyntheseweg wurde vorgeschlagen, daß nach erfolgter Transaminierung des Phenylalanins die entstehende 2-Oxocarbonsäure in zwei Pyruvatdecarboxylase-katalysierten Schritten zum Acyloin umgesetzt wird (Decarboxylierung und Addition eines Aldehyds).

Anknüpfend an diese Ergebnisse wurden für die vorliegende Arbeit folgende Ziele formuliert:

- Isolierung und Charakterisierung des vermuteten Schlüsselenzyms Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus*
- Fortführung der Supplementierungsversuche mit verschiedenen Aminosäuren
- Untersuchung des Substratspektrums des Enzymisolats hinsichtlich der Bildung weiterer  $\alpha$ -Hydroxyketone
- Aufklärung der Stereoselektivität der Reaktion
- olfaktorische Charakterisierung der gewonnenen  $\alpha$ -Hydroxyketone.

---

## 2 Ergebnisse

---

### 2.1 Isolierung und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus*

Die Aufreinigung des Enzyms wurde durch Messung der PDC-Aktivität (4.7.1) und des Proteingehaltes (4.7.2) sowie anhand der daraus berechneten spezifischen Enzymaktivität verfolgt.

#### 2.1.1 Fermentation

Für die Anzucht der Hefezellen wurde ein Medium mit hohen Gehalten an Glucose (50 g L<sup>-1</sup>, Kohlenstoff-Quelle) und Hefeextrakt (10 g L<sup>-1</sup>, Stickstoff- und Vitamin-Quelle) gewählt (PDC-Medium, siehe 4.6.1), um rasch größtmögliche Biomassebildung zu erreichen. Da die Pyruvatdecarboxylase ein konstitutives Enzym ist, steigt die Enzymkonzentration parallel mit zunehmender Zellmasse an. Der günstigste Erntezeitpunkt war nach 48stündiger Wachstumsdauer erreicht (Abb 2-1). Danach wurde trotz steigender Zelltrockenmasse eine abnehmende PDC-Gesamtaktivität im Rohextrakt festgestellt, was auf die Einwirkung von Proteasen zurückgeführt worden ist [19].

Pro Liter Fermentationsmedium wurden ca. 25 g Hefefeuchtmasse erhalten.

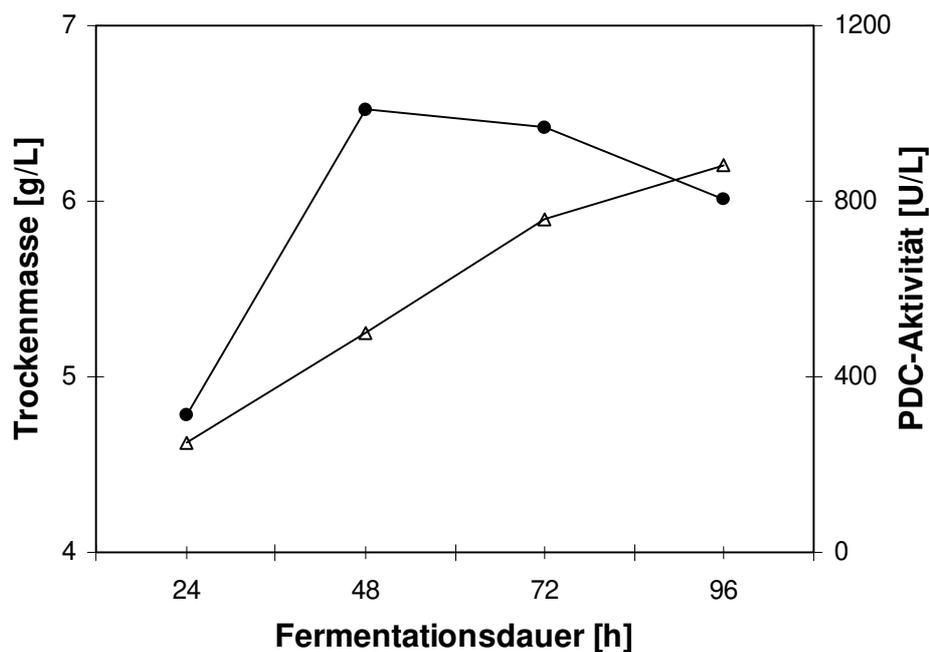


Abb 2-1 Verlauf von Trockenmassegehalt (-△-) und PDC-Gesamtaktivität (-●-, berechnet auf das Fermentationsvolumen) in Schüttelkulturen von *Zygosaccharomyces bisporus* in Abhängigkeit von der Fermentationsdauer

### 2.1.2 Zellaufschluß

Pyruvatdecarboxylase wurde in verschiedenen Hefespecies als cytosolisches Enzym lokalisiert [20]. Für die Gewinnung des Enzyms aus *Zygosaccharomyces bisporus* wurde deshalb ein mechanisches Aufschlußverfahren ohne weitere Solubilisierungsschritte gewählt.

Der Aufschluß der Hefezellen erfolgte wie in 4.7.3.2 beschrieben durch Naßvermahlung mit Glasperlen in einer Rührwerkskugelmühle. Nach 10minütiger Desintegration konnten im mikroskopischen Bild keine intakten Zellen mehr beobachtet werden. Die maximale Enzymausbeute betrug  $43 \text{ U g}^{-1}$  Zellfeuchtmasse. Die spezifische Aktivität der Pyruvatdecarboxylase im Rohextrakt lag bei  $1,43 \text{ U mg}^{-1}$  Protein.

### 2.1.3 Ammoniumsulfat-Fällung

In Vorversuchen zeigte sich, daß die Pyruvatdecarboxylase durch Einstellung eines Sättigungsgrades an  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zwischen 30 und 60 % präzipitiert werden konnte. Um die mit

2 Präzipitationsschritten einhergehenden Verluste an PDC zu verringern, wurde bei einem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gesamtsättigungsgrad von 60 % gefällt (4.7.3.3.1). Nach Resolubilisierung und Abtrennung verbliebener ungelöster Bestandteile wurde ein konzentrierter Proteinextrakt mit einer spezifischen PDC-Aktivität von  $2,78 \text{ U mg}^{-1}$  Protein erhalten.

#### 2.1.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Als erster Reinigungsschritt wurde die Proteinlösung an Phenyl Sepharose mit einem abnehmendem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten ( $1 \rightarrow 0 \text{ M}$ ) chromatographiert (4.7.3.3.2). Der Großteil der PDC-Aktivität eluierte in sieben Fraktionen bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von ca.  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  (Abb 2-2).

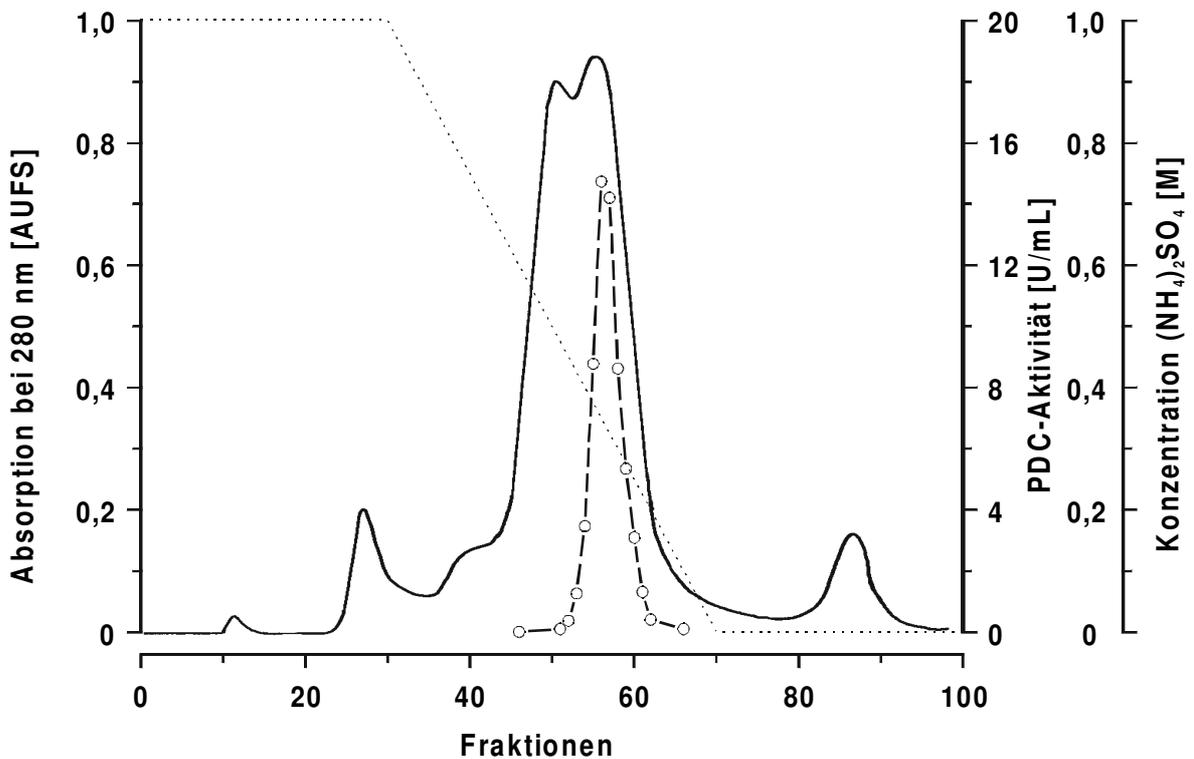


Abb 2-2 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose 6 Fast Flow. Der Proteingehalt wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt (—) und die PDC-Aktivität in den Fraktionen bestimmt (-o-).  
Fließmittel: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradient  $1 \rightarrow 0 \text{ M}$  (- - -), Fluß  $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ , 1 Fraktion =  $7,6 \text{ mL}$

Die vereinigten aktiven Fraktionen wiesen eine spezifische PDC-Aktivität von  $11,6 \text{ U mg}^{-1}$  Protein auf. Sie wurden vor dem nächsten Chromatographieschritt durch erneute  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bei 60 % Sättigung aufkonzentriert und umgepuffert.

### 2.1.5 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie erfolgte eine Auftrennung des Enzymextraktes nach Molekulargewicht bzw. Molekülgrößen (4.7.3.3.3). Das Säulenmaterial HiPrep Sephacryl S-300 mit einem Trennbereich von 10 bis 1500 kDa wurde gewählt, da nach Vorversuchen von einem Molekulargewicht der PDC  $> 200 \text{ kDa}$  auszugehen war.

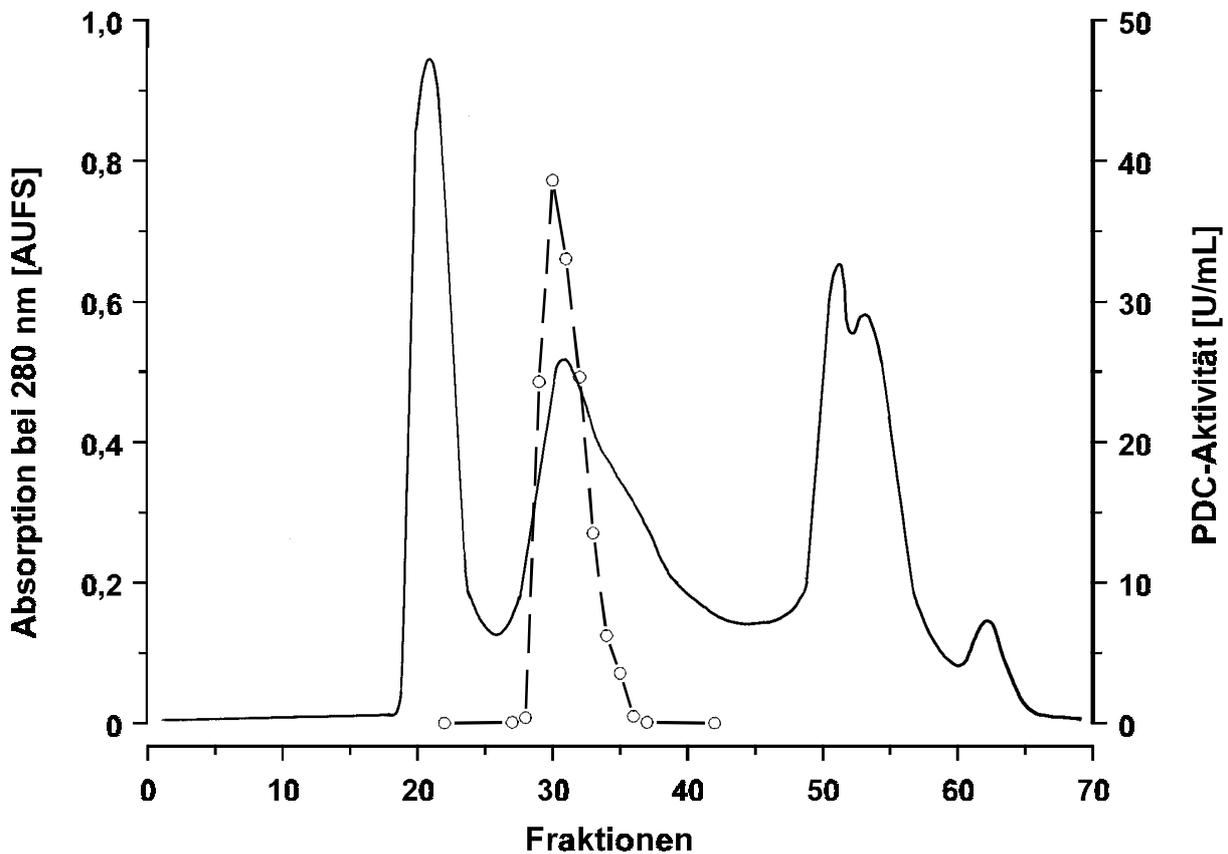


Abb 2-3 Gelpermeationschromatographie an HiPrep Sephacryl S-300. Der Proteingehalt wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt (—) und die PDC-Aktivität in den Fraktionen bestimmt (-o-). Fließmittel: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (0,1 M NaCl), Fluß  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , 1 Fraktion = 5 mL

Der Großteil der Pyruvatdecarboxylase eluierte in den Fraktionen 29-33 (Abb 2-3) mit einer spezifischen Aktivität von insgesamt  $42,2 \text{ U mg}^{-1}$  Protein. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration konzentriert und für die IC entsalzt und umgepuffert.

### 2.1.6 Ionenaustauschchromatographie (IC)

Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Ionenaustauschchromatographie an HiLoad Q Sepharose mit einem zunehmendem NaCl-Gradienten ( $0 \rightarrow 1 \text{ M}$ ) durchgeführt (4.7.3.3.4). Die PDC-Aktivität wurde in sieben Fraktionen durch ca.  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl von der Säule eluiert (Abb 2-4). In dem erhaltenen Enzymextrakt wurde eine spezifische PDC-Aktivität von  $59,2 \text{ U mg}^{-1}$  Protein bestimmt.

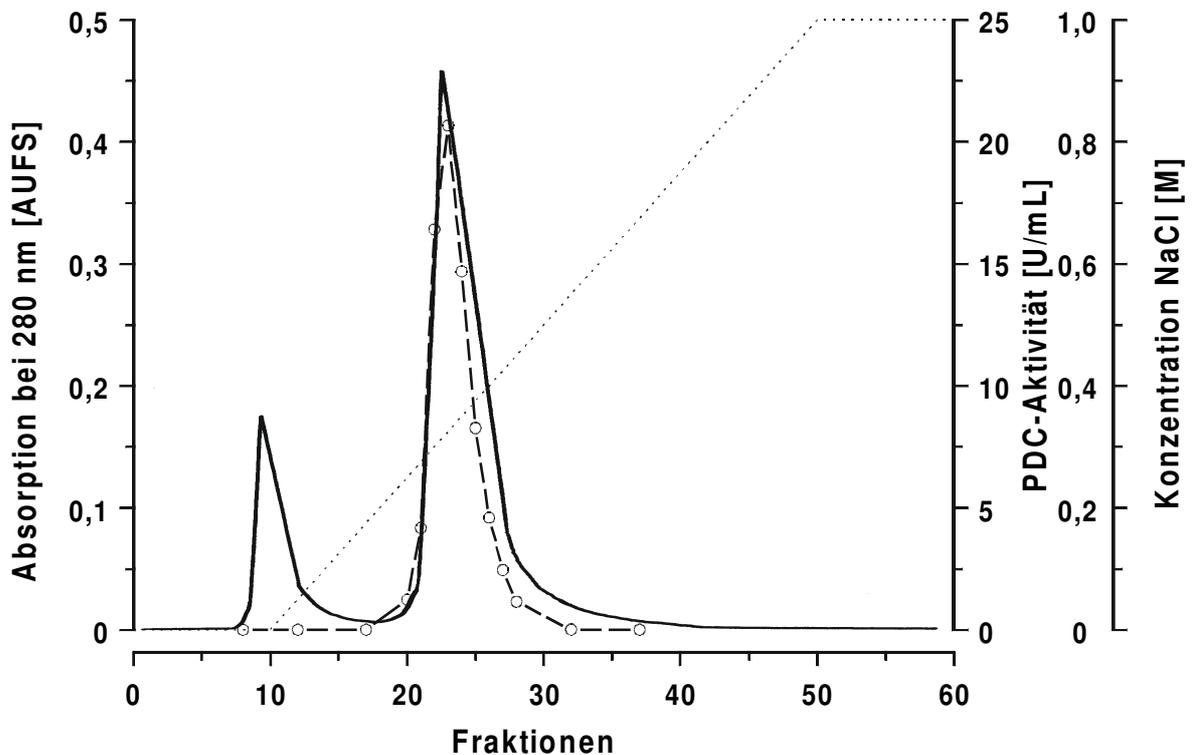


Abb 2-4 Ionenaustauschchromatographie an HiLoad Q Sepharose. Der Proteingehalt wurde durch Absorptionmessung bei 280 nm verfolgt (—) und die PDC-Aktivität in den Fraktionen bestimmt (-o-). Fließmittel: 20 mM MES / KOH-Puffer pH 6,5 mit NaCl-Gradient  $0 \rightarrow 1 \text{ M}$  (- - -), Fluß  $3,4 \text{ mL min}^{-1}$ , 1 Fraktion = 5,1 mL

Zur Lagerung der Pyruvatdecarboxylase wurde die Lösung mittels Ultrafiltration auf einen 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0; 1 mM TDP; 2 mM EDTA, 5 mM MgSO<sub>4</sub>) umgepuffert und auf die Hälfte des Ausgangsvolumens konzentriert. Bei -18 °C konnte das Präparat ohne größere Aktivitätsverluste (< 5 %) über mehrere Wochen aufbewahrt werden.

### 2.1.7 Überprüfung der Reinheit der PDC

Eine erste Überprüfung der Reinheit des erhaltenen Enzymextraktes wurde mittels analytischer GPC (4.2.4.2, System 2, Säule 2) an Bio-Silect SEC-400 durchgeführt. Dabei eluierte ein einziger Proteinpeak (Abb 2-5). Die weitere Beurteilung der Reinheit der Pyruvatdecarboxylase erfolgte mit Hilfe gelelektrophoretischer Methoden (siehe 2.2.1 und 2.2.2).

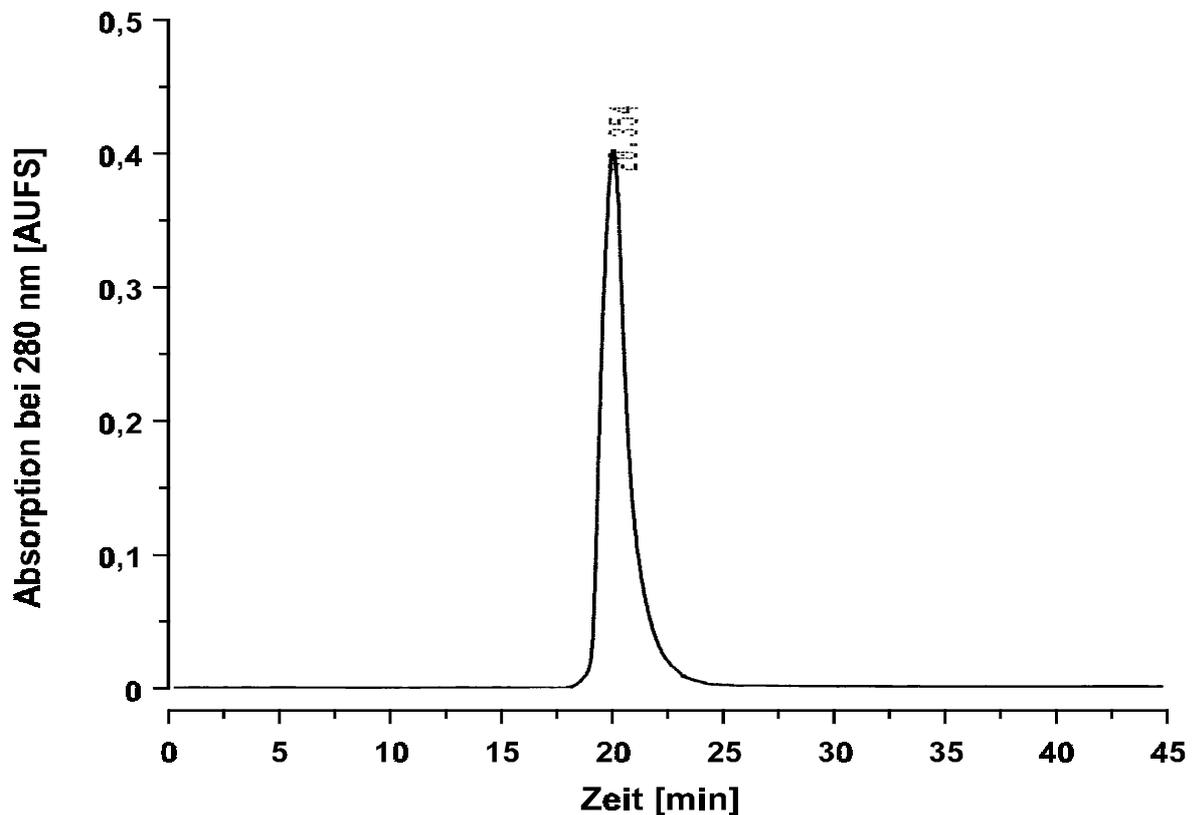


Abb 2-5 Gelpermeationschromatographie an Bio-Silect SEC-400. Der Proteingehalt wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt (—). Fließmittel: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (0,1 M NaCl), Fluß 0,5 mL min<sup>-1</sup>

### 2.1.8 Bilanzierung der Reinigungsschritte

Bei einer Ausbeute von 24 % der ursprünglichen PDC-Aktivität und einem Aufreinigungsfaktor von 41 wurde ein Enzympräparat mit einer spezifischen Aktivität von 59,2 U mg<sup>-1</sup> Protein erhalten. Die Pyruvatdecarboxylase stellte ca. 0,6 % des gesamten unter den gewählten Bedingungen löslichen Zellproteins dar, was auf ihre große Bedeutung im Primärstoffwechsel von *Zygosaccharomyces bisporus* hinweist.

Die Ergebnisse der Isolierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* sind in Tab 2-1 zusammengefaßt.

Tab 2-1 Bilanzierung von Isolierung und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* (Mittelwerte von 10 Aufarbeitungen)

	Proteingehalt [mg]	Aktivität [U]	Spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigungs- faktor
Rohextrakt	1135	1624	1,43	100	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Fällung	462	1283	2,78	79	1,9
HIC (Phenyl Sephacryl <sup>®</sup> 6 Fast Flow)	89,6	1039	11,6	64	8,1
GPC (HiPrep <sup>®</sup> Sephacryl S- 300)	13,5	568	42,2	35	22
IC (HiLoad Q Sephacryl)	6,59	390	59,2	24	41

## 2.2 Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase

### 2.2.1 Molekulargewicht

**GPC:** Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* wurde der nach 2.1 erhaltene Enzymextrakt an zwei verschiedenen GPC-Phasen rechromatographiert (siehe 4.7.4.1). Mit der Superdex 200 HR-Säule (Trennbereich 10-600 kDa) ergab sich ein breiterer linearer Kalibrationsbereich, allerdings traten im Chromatogramm zusätzliche Peaks bei größeren Retentionszeiten auf, was auf einen teilweisen Zerfall der PDC in ihre Untereinheiten hindeutete. Diese Probleme konnten durch Wahl eines geeigneteren Säulenmaterials (Bio-Silect Sec 400, Trennbereich 40-1100 kDa) umgangen werden, jedoch war hier der Linearitätsbereich deutlich kleiner.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch Auftragung der Koeffizienten  $K_{AV}$  der verwendeten Standardproteine gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte ( $\log MW$ ). Aus den Kalibriergeraden (Abb 2-6 und Abb 2-7) ergaben sich für die Pyruvatdecarboxylase MW-Werte von 224 kDa ( $K_{AV} = 0,276$ , Säule 1) bzw. 244 kDa ( $K_{AV} = 0,413$ , Säule 2).

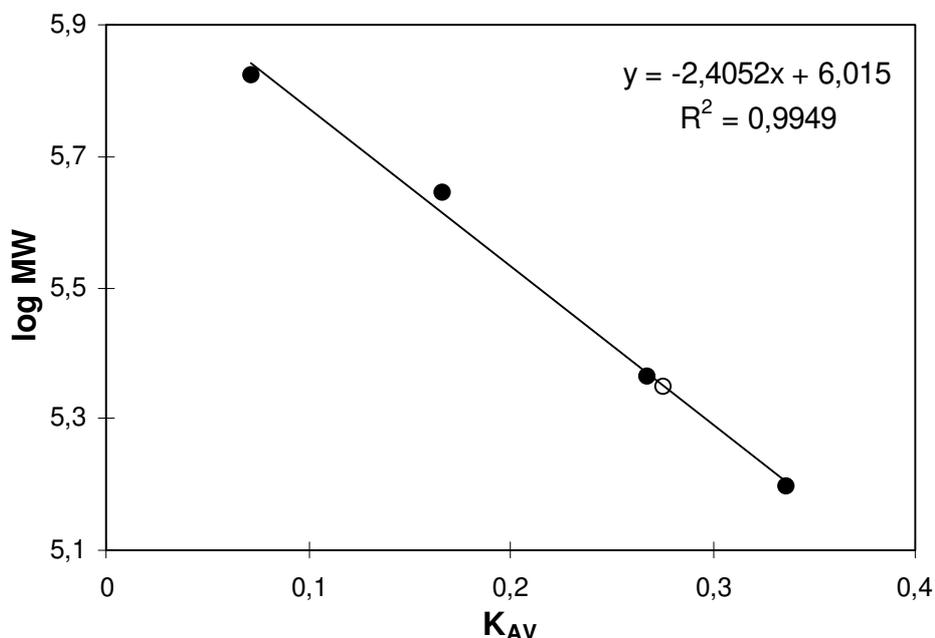


Abb 2-6 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Pyruvatdecarboxylase (o) durch GPC an Säule 1: Superdex 200 HR (Standardproteine: •)

Die Abweichung der beiden Ergebnisse voneinander lässt sich durch die unterschiedlichen Porengrößen (200 bzw. 400 Å) sowie durch die Abweichung der Proteinstrukturen von der idealen Kugelform erklären, die von der Beschaffenheit der Säulenmaterialien (Dextran-Agarose bzw. Silica) abhängig ist.

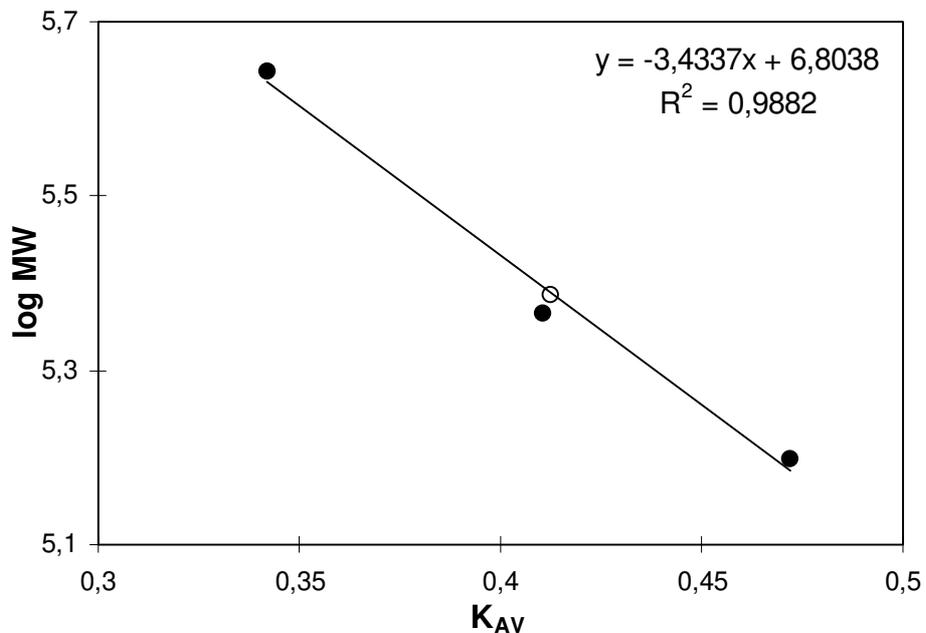


Abb 2-7 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Pyruvatdecarboxylase (o) durch GPC an Säule 2: Bio-Silect SEC-400 (Standardproteine: ●)

**SDS:** Bei der Bestimmung des Molekulargewichtes der Pyruvatdecarboxylase mittels SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen (4.7.4.1) wurde eine homogene Proteinbande beobachtet (Abb 2-8).

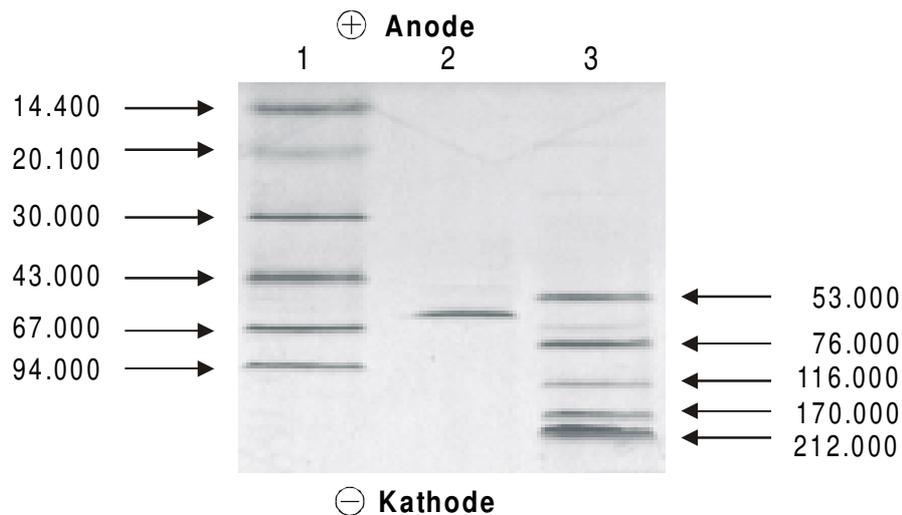


Abb 2-8 SDS-PAGE der Pyruvatdecarboxylase (Bahn 2). Bahn 1 und 3 zeigen Markerproteinmischungen (MW in Da)

Durch Auftragung der Retentionsfaktoren ( $R_F$ ) der Standardproteine gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte ( $\log MW$ ) wurde eine Kalibriergerade erhalten, aus der sich für die PDC eine Molmasse von 60,7 kDa ergab (Abb 2-9). Verglichen mit den Ergebnissen der GPC, die etwa 4fach höhere Werte ergaben, ließ sich auf eine Zusammensetzung der PDC aus 4 Enzymuntereinheiten gleicher Größe schließen ( $4 \cdot 60,7 = 242,8$  kDa). Der Aufbau aus 4 Monomeren gleicher oder ähnlicher Größe wurde bereits für die Pyruvatdecarboxylasen u.a. aus *Saccharomyces cerevisiae* [21, 19] und *Zymomonas mobilis* [22] beschrieben.

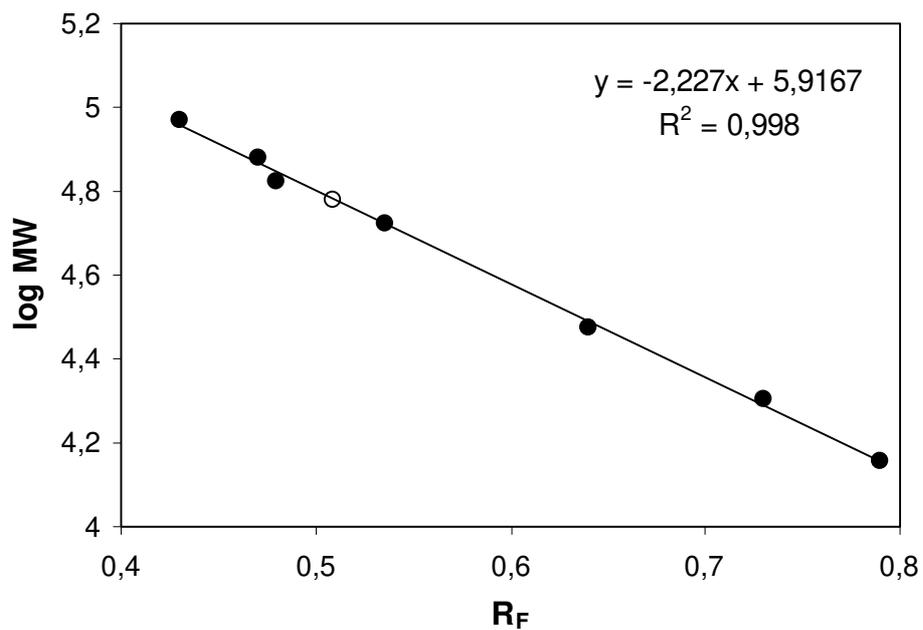


Abb 2-9 Bestimmung des Molekulargewichtes der Pyruvatdecarboxylase (o) durch SDS-PAGE (Standardproteine: ●)

### 2.2.2 Isoelektrischer Punkt (pI)

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Pyruvatdecarboxylase wurde mit Hilfe einer isoelektrischen Fokussierung durchgeführt (4.7.4.2). Zunächst wurde für den pH-Gradienten ein Bereich von pH 3 bis pH 10 gewählt; dabei konnten zwei scharfe Proteinbanden bei pH-Werten von etwa 5-6 detektiert werden (Abb 2-10 b). Zur genauen Zuordnung der Banden wurde daraufhin ein engerer pH-Bereich von 3-7 untersucht. Bei der Elektrophorese zeigten sich nun mindestens 6 Banden unterschiedlicher Intensität (Abb 2-10 a).

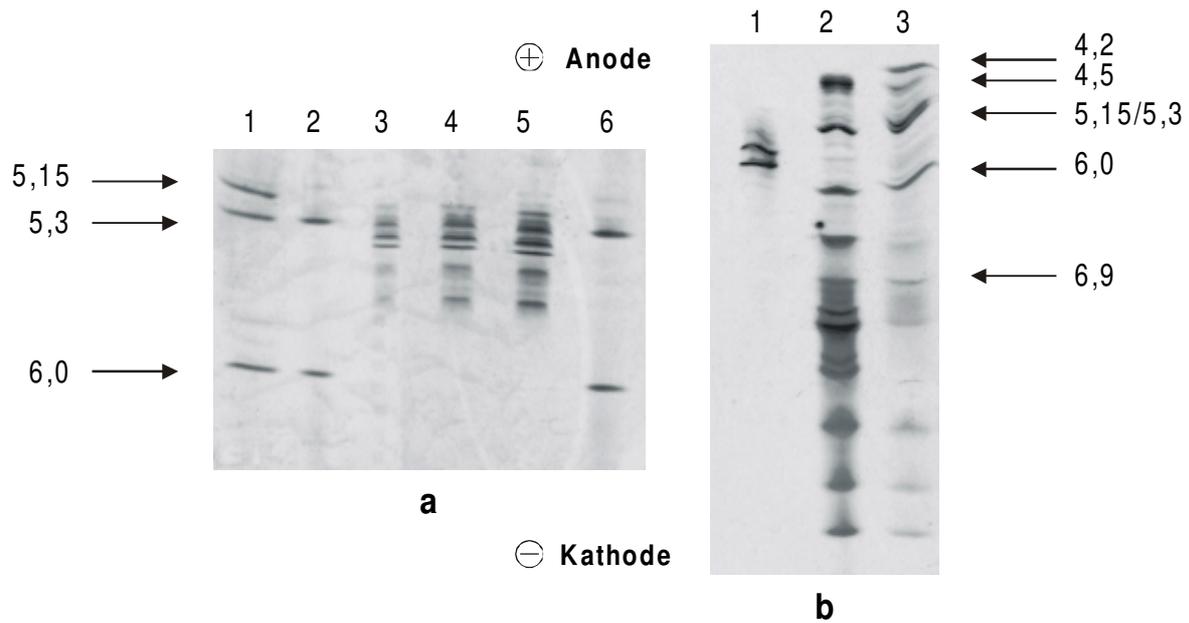


Abb 2-10 IEF der Pyruvatdecarboxylase. a): IEF im pH-Bereich 3-7, Bahnen 1, 2 und 6 Standardproteine, Bahnen 3, 4 und 5 PDC in steigenden Konzentrationen. b): IEF im pH-Bereich 3-10, Bahn 1 PDC, Bahnen 2 und 3 Standardproteine

Um festzustellen, ob es sich bei den nach Coomassie-Färbung der Gele sichtbaren Proteinbanden um Verunreinigungen, also Fremdproteine, oder Isoenzyme der PDC handelt, wurde zusätzlich eine Aktivitätsfärbung durchgeführt. Dazu wurde eine Gelhälfte in einem Citratpuffer, der die Cofaktoren  $MgSO_4$  und TDP sowie das Substrat Pyruvat enthielt, inkubiert. Nach Zugabe von 1,2-Dianilinoethan (DAE) wird bei Anwesenheit von Pyruvatdecarboxylase ein weißes Präzipitat sichtbar, das durch Kondensation von DAE mit *in situ* gebildetem Acetaldehyd entsteht [23]. Wie in Abb 2-11 ersichtlich, konnten (soweit erkennbar) alle aufgetretenen Banden auch mittels Aktivitätsfärbung detektiert werden, wobei 3 Banden die größte Intensität aufwiesen.

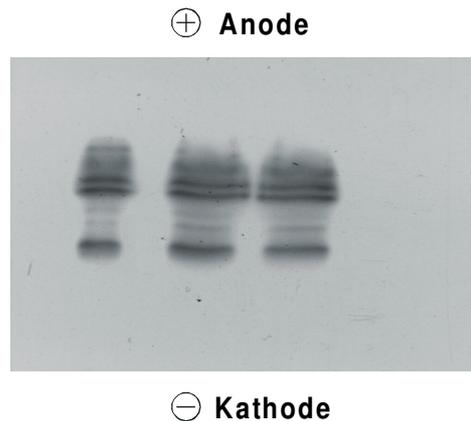


Abb 2-11 Aktivitätsfärbung der PDC nach isoelektrischer Fokussierung im pH-Bereich 3-7 (Ausschnitt), aufgenommen im inversen Modus, aufgetragen wurden 3 verschiedene Konzentrationen (~50-150  $\mu\text{g}$  Protein)

Die Ermittlung der isoelektrischen Punkte der einzelnen Enzymbanden erfolgte durch Auftragung der Retentionsfaktoren ( $R_F$ ) der Standardproteine gegen ihre pI-Werte. Es ergaben sich Werte zwischen  $pI = 5,14$  und  $pI = 5,66$ ; wobei die drei in der Aktivitätsfärbung intensivsten Banden den pI's 5,32; 5,37 und 5,66 zuzuordnen waren (Abb 2-12).

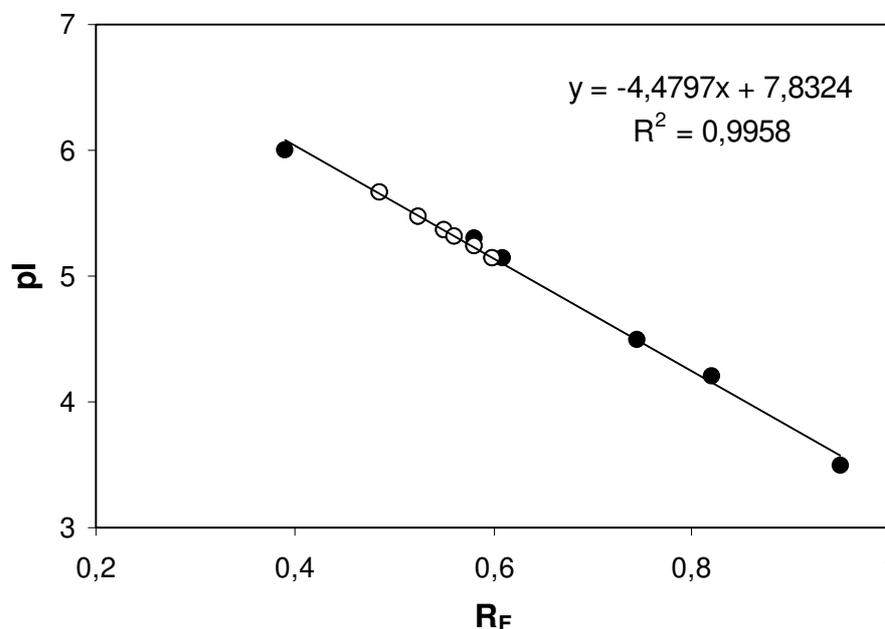


Abb 2-12 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Pyruvatdecarboxylase (o) durch IEF (Standardproteine: •)

In der Literatur sind verschiedentlich Angaben über das Auftreten mehrerer aktiver Isoformen der PDC bzw. mehrerer Proteinbanden in der IEF von Pyruvatdecarboxylase trotz homogenem Bild in der SDS-PAGE zu finden [24, 25, 26]. Das Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus 4 Untereinheiten, die in zwei Dimeren angeordnet sind (Dimer von Dimeren). Jedes Monomer bindet ein Molekül TDP und ein  $Mg^{2+}$ -Ion nicht-kovalent, also reversibel, wobei die Lage des Dissoziationsgleichgewichtes pH-abhängig ist [27, 28]. Je zwei Untereinheiten weisen dieselbe Größe und Zusammensetzung auf, sie werden mit „ $\alpha$ “ und „ $\beta$ “ benannt. Die drei beobachteten Hauptbanden in der IEF könnten analog den entsprechenden Tetrameren  $\alpha_2\beta_2$ ;  $\alpha_4$  und  $\beta_4$  zugeordnet werden. Weitere PDC-aktive Banden können durch unterschiedliche Dissoziationsstufen des Holoenzym in das Apoenzym und die Cofaktoren TDP und  $Mg^{2+}$  erklärt werden; deren Bildung einerseits während der Elektrophorese, aber auch bei Probenvorbereitung durch Ultrafiltration (bzw. Entsalzen) denkbar ist (siehe auch 3.2).

### 2.2.3 Substratkinetik

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten der PDC wurde unter den Bedingungen des Standard-Enzymassays (4.7.1) eine Substratsättigungs-Kurve im Bereich von 0 bis 100 mM Pyruvat aufgenommen. Dabei ergab sich zunächst eine hyperbolische Kinetik, wobei bereits ab einer Konzentration von ca. 25 mM Pyruvat Substrathemmung auftrat (Abb 2-13).

Die Untersuchung der Reaktionskinetik bei kleinen Substratkonzentrationen (0 bis 1 mM Pyruvat) zeigte einen sigmoiden Kurvenverlauf, der auf eine positive Kooperativität des Enzyms hinweist (Abb 2-14). Die Aktivierung der Pyruvatdecarboxylase durch ihr Substrat Pyruvat ist für das Enzym aus verschiedenen Organismen, insbesondere *Saccharomyces cerevisiae* bereits beschrieben [29, 30]; einzig PDC aus *Zymomonas mobilis* weist eine hyperbolisch verlaufende Kinetik auf [31, 22].

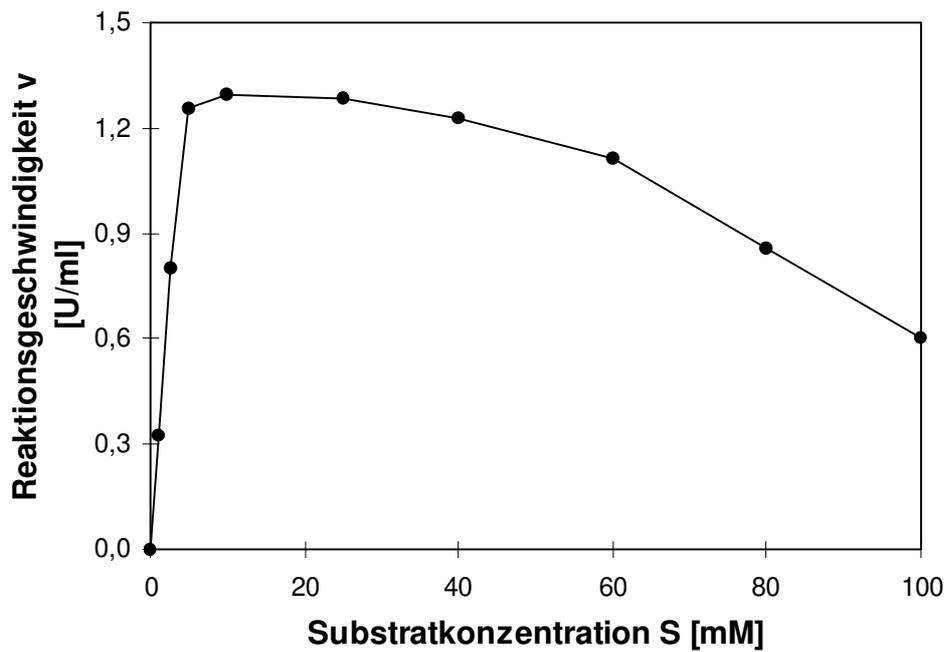


Abb 2-13 Kinetik der PDC: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit ( $v$ ) von der Konzentration an Pyruvat ( $S$ )

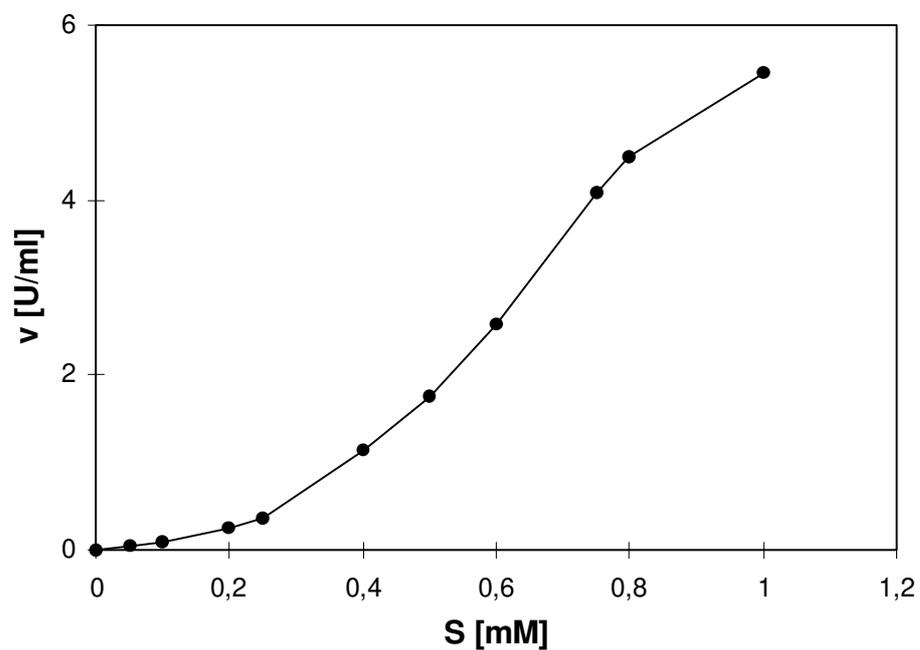


Abb 2-14 Kinetik der PDC-Reaktion bei geringen Substratkonzentrationen

Für allosterisch regulierte Enzyme wie Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* lässt sich die Michaelis-Konstante  $K_M$  nicht durch eine doppelt reziproke Auftragung der Werte nach Lineweaver-Burk ( $1/S$  gegen  $1/v$ ) berechnen. Auch der Effekt der

Substrathemmung bei hohen Konzentrationen läßt dies nicht zu, da hier bei niedrigen Substratkonzentrationen bereits kleine Fehler zu erheblichen Abweichungen in der Abbildung führen. Sigmoide Enzymkinetiken werden durch die Hill-Gleichung beschrieben:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{(S_0)^n}{K' + (S_0)^n} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

mit:  $v$  = Reaktionsgeschwindigkeit  
 $V_{\max}$  = maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung  
 $S_0$  = Anfangssubstratkonzentration  
 $n$  = Hill-Koeffizient  
 $K'$  = Hill-Konstante  $\neq K_M$

Der Hill-Koeffizient  $n$  ist ein Maß für die Sigmoidität der Kurve und damit für die Kooperativität des Enzyms. Für  $n = 1$  geht die Hill-Gleichung in das Michaelis-Menten-Geschwindigkeitsgesetz über. Formt man Gl. 2.1 um, erhält man eine Geradengleichung, deren Steigung den Hill-Koeffizienten  $n$  ergibt:

$$\log \frac{v}{V_{\max} - v} = n \cdot \log(S_0) - \log K' \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Die Konstante  $K'$  ist nicht äquivalent mit der Michaelis-Konstanten  $K_M$ , bzw. der Substratkonzentration  $(S_0)_{0,5v}$ , die zur Erzielung der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit erforderlich ist. Aus Gl. 2.2 ergibt sich für diese Bedingung:

$$\log \frac{0,5}{0,5} = 0 = n \cdot \log(S_0) - \log K' \quad (\text{Gl. 2.3})$$

$$K' = (S_0)_{0,5v}^n$$

Die Kinetik allosterisch regulierter Enzyme resultiert in einem modifizierten Lineweaver-Burk-Plot dann in einer Gerade, wenn der Hill-Koeffizient in der Potenzierung der Substratkonzentration berücksichtigt wird ( $1/S^n$  gegen  $1/v$ ). Für Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte dies durch Auftragung der quadrierten Substratkonzentration gezeigt werden [32, 29]; für den Hill-Koeffizient wurden Zahlenwerte zwischen 1,37 und 2,33 ermittelt [33, 26, 29]. Auch die Substratkinetik der Pyruvatdecarboxylase

aus *Zygosaccharomyces bisporus* ließ sich auf diese Weise im modifizierten Lineweaver-Burk-Plot beschreiben (Abb 2-15).

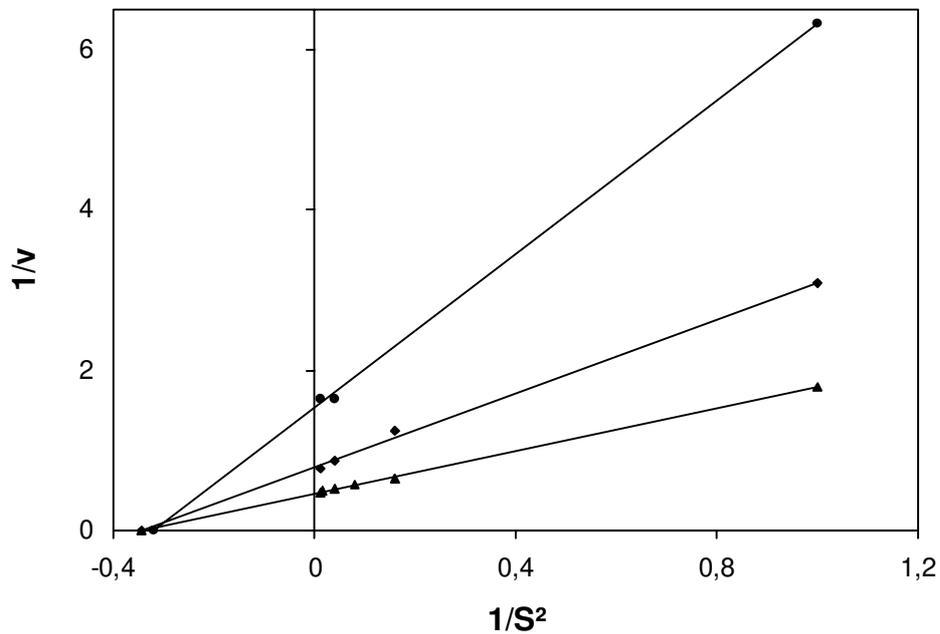


Abb 2-15 Bestimmung der scheinbaren Michaelis-Konstante von PDC mit drei verschiedenen Enzymkonzentrationen in der modifizierten Auftragung nach Lineweaver-Burk

Die Schnittpunkte der erhaltenen Geraden mit der x-Achse ergaben nach Umformung einen  $K^{\prime}$ -Wert von 2,98 und damit eine zur Erzielung der halbmaximalen Geschwindigkeit notwendige Substratkonzentration von 1,73 mM (scheinbare Michaelis-Konstante). Als Hill-Koeffizient wurde nach Gl. 2.2 ein Wert von 2,10 berechnet (Abb 2-16). Dies bedeutet, daß in der Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* mindestens 2 Substratbindungsstellen vorhanden sind.

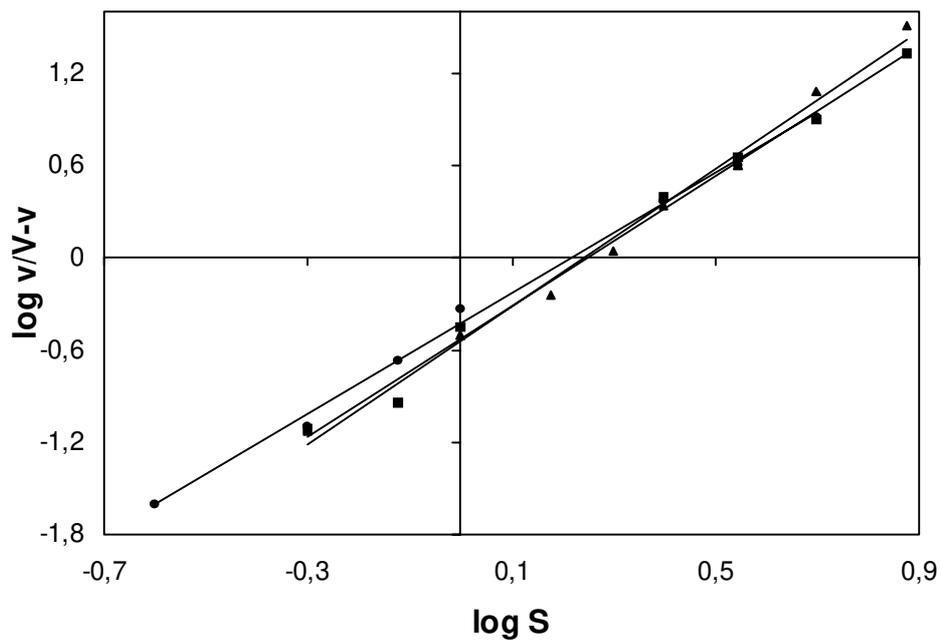


Abb 2-16 Hill-Plot des Pyruvatumsatzes mit drei verschiedenen PDC-Konzentrationen

## 2.2.4 Temperatur- und pH-Abhängigkeit

**Temperatur-Abhängigkeit:** Das ermittelte Temperatur-Optimum der Pyruvatdecarboxylase lag bei etwa 45 °C (Abb 2-17).

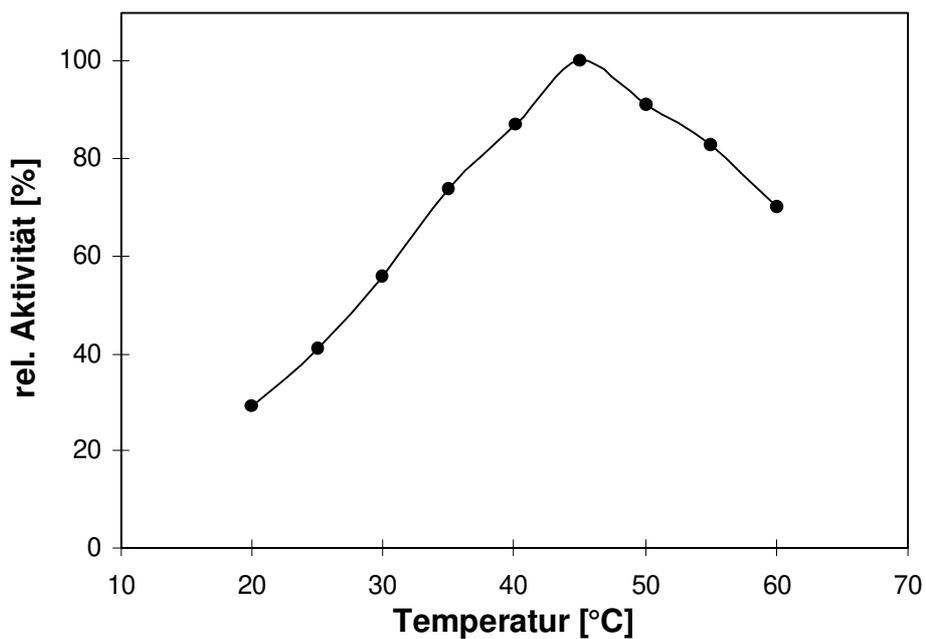


Abb 2-17 Temperatur-Optimum der PDC aus *Zygosaccharomyces bisporus*

Für die Bestimmung der Temperatur-Stabilität des Enzyms wurden zwei Versuchsansätze gewählt, bei denen der Inkubationspuffer einmal mit und einmal ohne  $\text{MgSO}_4$  und TDP angesetzt wurde (4.7.4.4). Die Anwesenheit der Cofaktoren erwies sich als überaus wichtig für die Erhaltung der PDC-Aktivität.

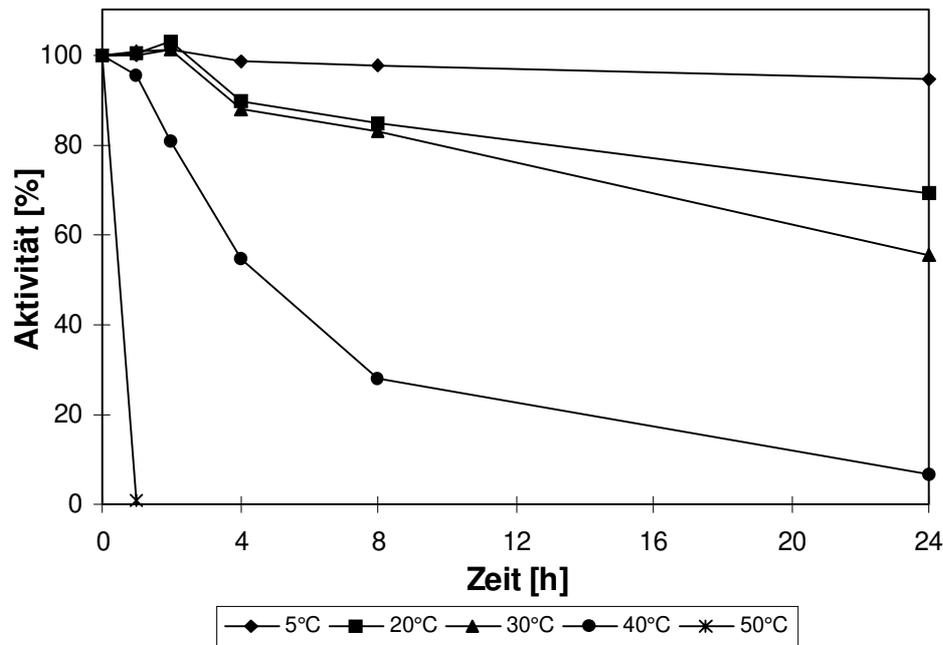


Abb 2-18 Temperaturstabilität der PDC während der Inkubation mit den Cofaktoren  $\text{Mg}^{2+}$  und TDP (pH = 6,0)

Bei der Inkubation mit Cofaktoren wies die Pyruvatdecarboxylase nach 24 h bei 5 °C eine Restaktivität von 96 % auf; bei 30 °C waren es immerhin noch 55 % (Abb 2-18). Wurde die PDC ohne Cofaktoren inkubiert, nahm ihre Aktivität deutlich rascher ab. Nach 24 h bei 5 °C wurden 38 % Restaktivität gemessen, bei 30 °C waren bereits nach 8 h nur noch 2 % Aktivität vorhanden (Abb 2-19). Auf die Lagerung bei 50 °C wurde hier verzichtet, da selbst bei Inkubation in Anwesenheit der Cofaktoren nach 1 h keine PDC-Aktivität mehr meßbar war.

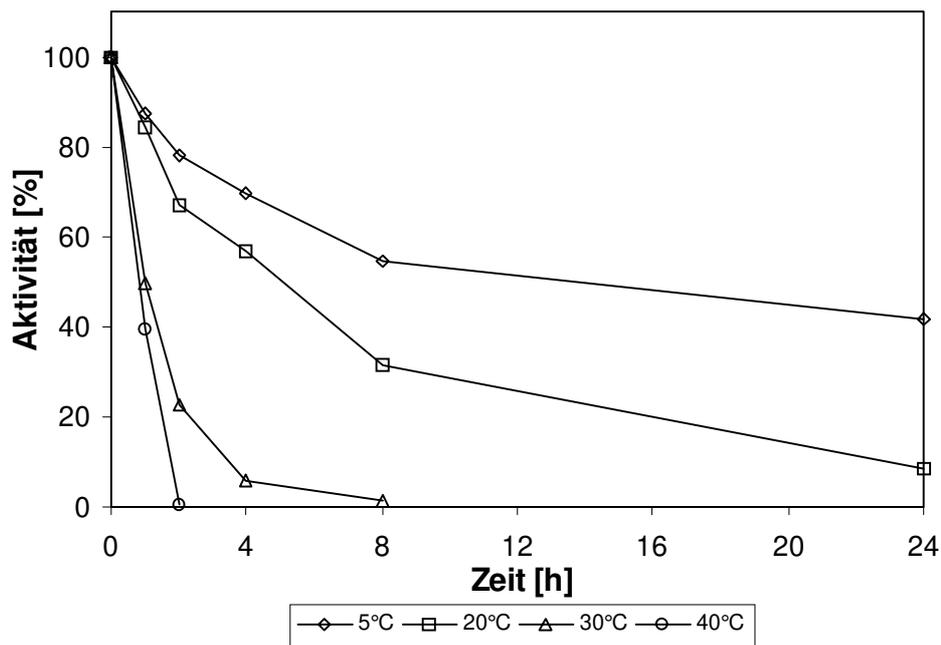


Abb 2-19 Temperaturstabilität der PDC während der Inkubation ohne ihre Cofaktoren  $Mg^{2+}$  und TDP (pH = 6,0)

Zu beachten ist allerdings, daß bei diesem Versuchsansatz eine mögliche Rekombination des Holoenzym mit den Cofaktoren und damit eine Regeneration der Enzymaktivität ausgeschlossen wurde, indem auch der Enzymassay ohne Zusatz der Cofaktoren erfolgte. Zusätzliche Rekombinationsexperimente wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da die Stabilitätsuntersuchungen hauptsächlich die optimale Handhabung des Enzyms zum Ziel hatten.

**pH-Abhängigkeit:** Das pH-Optimum der Pyruvatdecarboxylase befand sich bei pH 6,5 mit einem Aktivitätsplateau zwischen pH 6 und pH 7 (Abb 2-20).

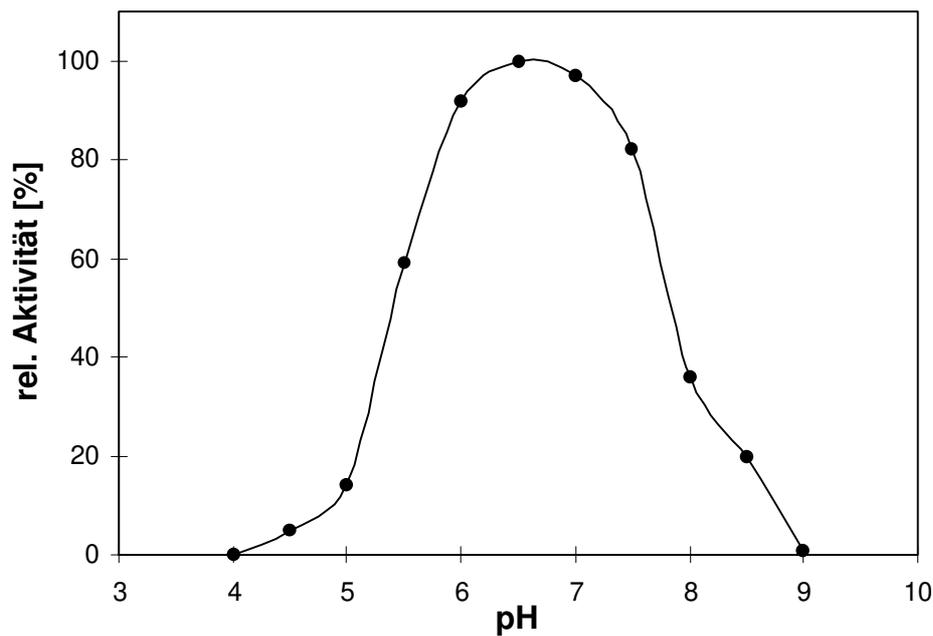


Abb 2-20 pH-Optimum der PDC aus *Zygosaccharomyces bisporus*

Auch die Untersuchung der pH-Stabilität der PDC wurde jeweils in An- und Abwesenheit der Cofaktoren  $Mg^{2+}$  und TDP durchgeführt. Bei Inkubation mit den Cofaktoren erwies sich ein pH-Wert von 6,0 als optimal (96 % Restaktivität nach 24 h), aber auch bei pH-Werten von 5,0 und 7,0 blieb ein Großteil der PDC-Aktivität erhalten (81 bzw. 89 %, Abb 2-21).

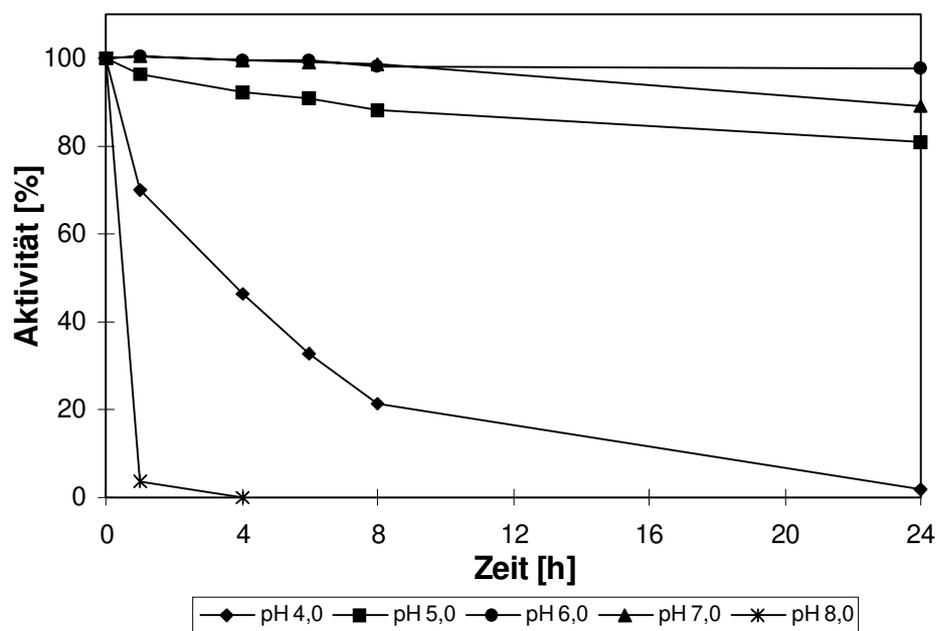


Abb 2-21 pH-Stabilität der PDC während der Inkubation mit den Cofaktoren  $Mg^{2+}$  und TDP ( $T = 5\text{ °C}$ )

Die Inkubation der PDC bei verschiedenen pH-Werten zeigte ohne ihre Cofaktoren analog der Untersuchung der Temperatur-Stabilität einen deutlich schnelleren Abfall der Enzymaktivität (Abb 2-22). Während bei pH-Werten von 5,0 und 6,0 nach 24 h Restaktivitäten von 45 und 38 % beobachtet wurden, zeigte sich die größte Diskrepanz der Stabilität mit und ohne Cofaktoren bei pH 7,0. In Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  und TDP konnte bereits nach 2,5 h keine PDC-Aktivität mehr gemessen werden, was auf die pH-abhängige Dissoziation des Holoenzym in Apoenzym und Cofaktoren zurückzuführen ist.

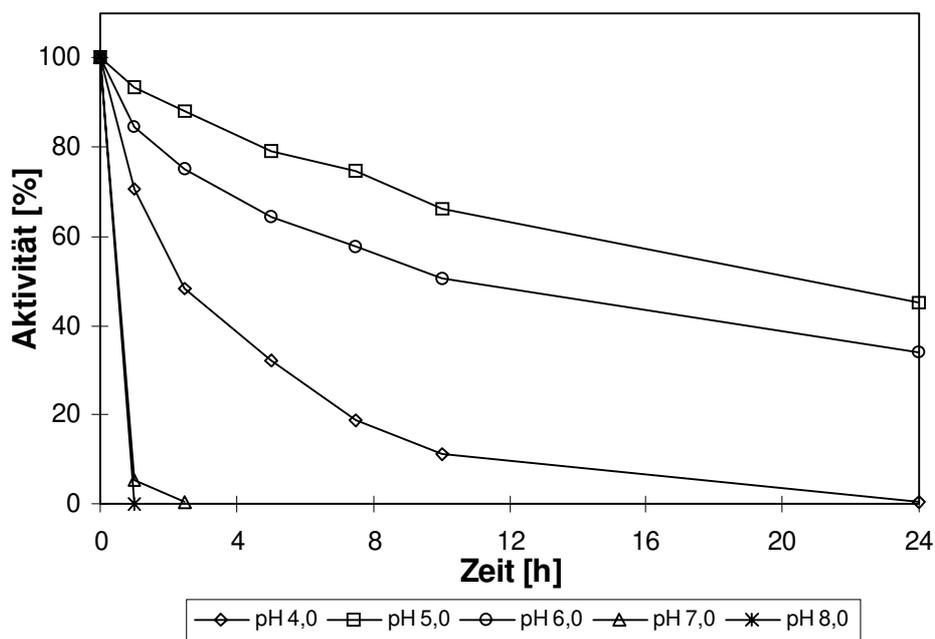


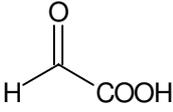
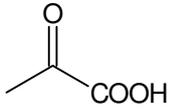
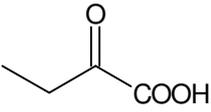
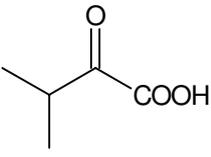
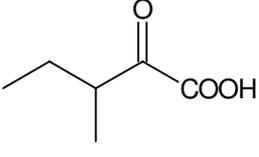
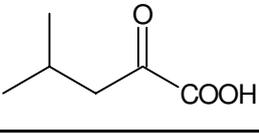
Abb 2-22 pH-Stabilität der PDC während der Inkubation ohne ihre Cofaktoren  $Mg^{2+}$  und TDP ( $T = 5\text{ °C}$ )

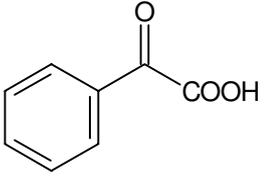
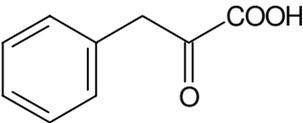
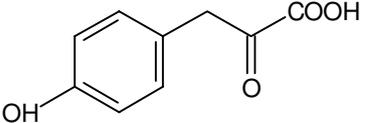
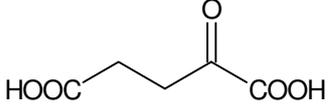
Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen zeigen die große Bedeutung der Cofaktoren für die Erhaltung der PDC-Aktivität. Während der Isolierung und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* wurde bei  $5\text{ °C}$  (Kühlzelle) und pH 6,0 (Ausnahme IC: 6,5) in optimalen Bereichen der Enzymstabilität gearbeitet. Alle Puffer enthielten zudem  $MgSO_4$ , dagegen konnte TDP nur beim Zellaufschluß und den einzelnen Solubilisierungen, nicht jedoch während der Chromatographieschritte zugesetzt werden, da die Eigenabsorption des TDP die Proteindetektion bei 280 nm erheblich störte.

## 2.2.5 Substratspezifität

Das Substratspektrum der PDC wurde insbesondere im Hinblick auf spätere Versuche zur Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen untersucht. Die decarboxylierende Aktivität wurde im gekoppelten enzymatisch-photometrischen Assay bestimmt und relativ zum Substrat Pyruvat berechnet; alle Säuren wurden in Form ihrer Na-Salze eingesetzt (4.7.4.6). Tab 2-2 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung, aus denen hervorgeht, daß einzig 2-Oxobutansäure als gutes Substratanalogon zu betrachten war (Umsatzrate ca. 50 %).

Tab 2-2 Substratspektrum der Decarboxylierungsreaktion der PDC aus *Zygosaccharomyces bisporus*, gemessen im gekoppelten photometrischen Assay, Substratkonzentration 5 bzw. 20 mM

Lineare 2-Oxosäuren		Aktivität [%] 5mM / 20mM
	Glyoxylsäure (Glyox)	-
	2-Oxopropansäure (Salz: Pyruvat, Pyr)	100 / 100
	2-Oxobutansäure (Oxbut)	57 / 44
C <sub>3</sub> -verzweigte 2-Oxosäuren		
	3-Methyl-2-oxo-butansäure (Ox3mbut)	2,1 / 1,6
	3-Methyl-2-oxo-pentansäure (Ox3mpent)	0,7 / 0,4
C <sub>4</sub> -verzweigte 2-Oxosäuren		
	4-Methyl-2-oxo-pentansäure (Ox4mpent)	0,8 / 0,3

<b>Aromatisch substituierte 2-Oxosäuren</b>		
	2-Oxo-2-phenylacetic acid (Phenylglyoxylic acid, Phegly)	-
	2-Oxo-3-phenylpropanoic acid (Salz: Phenylpyruvate, Phepyr)	-
	2-Oxo-3-(4-hydroxyphenyl)- propanoic acid (Salz: 4-Hydroxy- phenylpyruvate, 4Phepyr)	-
<b>2-Oxosäuren mit zweiter Carboxylgruppe</b>		
	2-Oxoglutaric acid (Oxglut)	-

Die Pyruvatdecarboxylase wies gegenüber den verzweigten 2-Oxosäuren eine relative Aktivität von  $\leq 2,1$  % auf, dagegen konnte für die Dicarbonsäure und aromatisch substituierte Säuren kein Umsatz gemessen werden. Dies bedeutet, daß die entsprechenden 2-Oxosäuren entweder von der PDC nicht oder nur sehr schlecht umgesetzt wurden, oder daß nach erfolgter Decarboxylierung der jeweilige Aldehyd nicht als Substrat der verwendeten Alkoholdehydrogenase akzeptiert wurde. Außerdem muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die 2-Oxosäuren zwar von der PDC gebunden wurden, aber als Inhibitoren fungierten und eine Freisetzung der Aldehyde somit verhinderten.

Während letztere Variante durch Inhibierungsexperimente untersucht wurde (2.1.6), sollten GC-Analysen der Decarboxylierungsansätze klären, ob eine Bildung von Aldehyden stattgefunden hatte. Es zeigte sich, daß bei den drei aromatisch substituierten 2-Oxosäuren in der Tat die entsprechenden Aldehyde (Benzaldehyd, Phenylacetaldehyd, 4-Hydroxyphenylacetaldehyd) detektiert werden konnten. 2-Oxoglutaric acid wurde dagegen, wie in der Literatur für *S. cerevisiae* beschrieben, nicht decarboxyliert [34, 35]. Formaldehyd als Decarboxylierungsprodukt der Glyoxylic acid wurde mit den gewählten GC-Analysenbedingungen nicht erfaßt.

## 2.2.6 Substratinhibierung

Die Inhibierung der Pyruvatdecarboxylase durch verschiedene potentielle Substratanaloga wurde zunächst bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen (5 und 100 mM) betrachtet (4.7.4.7). Dabei zeigten bis auf 2-Oxoglutarinsäure alle untersuchten 2-Oxosäuren inhibierende Wirkung (Abb 2-23). Dies unterstützt die These, daß dieses Substrat nicht an das Enzym gebunden werden kann, während alle anderen getesteten Substanzen Wechselwirkungen eingehen.

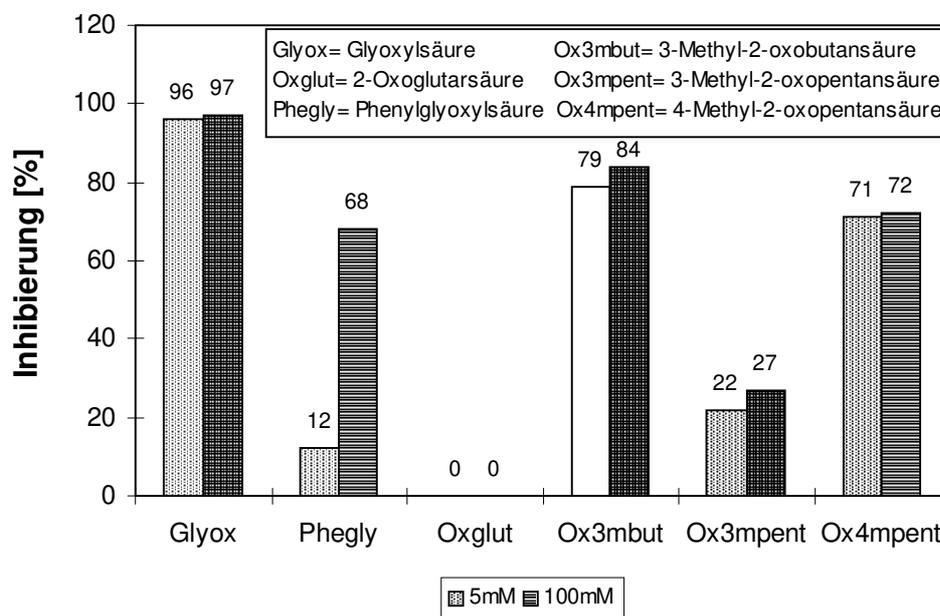


Abb 2-23 Inhibierung der Pyruvatdecarboxylase durch mögliche Substratanaloga

2-Oxobutansäure, das Substrat mit der nach Pyruvat höchsten Decarboxylierungsrate, konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht auf seine inhibierende Wirkung untersucht werden. Im photometrischen Assay überlagerten sich hier die Decarboxylierungen von Pyruvat und 2-Oxobutansäure.

Die starke Hemmung der Pyruvatdecarboxylase durch Glyoxylsäure bzw. Glyoxylat wurde für das Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae* bereits 1976 von Uhlemann et al. beschrieben [36]. Das Substrat bindet zwar an das aktive Zentrum und wird decarboxyliert, das entstehende „aktive Formaldehyd“ kann jedoch nicht bzw. nur sehr langsam abgelöst werden und blockiert das Enzym somit irreversibel.

Auch die Hemmung der PDC durch die getesteten verzweigten 2-Oxosäuren war beträchtlich, korrelierte jedoch nicht mit den Untersuchungen der Substratspezifität. Als Substrat mit der geringsten inhibierenden Wirkung erwies sich die 2-Oxo-3-methylpentansäure, während die besten Decarboxylierungsraten mit der 2-Oxo-3-methylbutansäure erzielt wurden.

Auffällig war der einzig bei der Phenylglyoxylsäure auftretende große Unterschied in der Inhibierungswirkung bei verschiedenen Konzentrationen des Substrates (5 und 100 mM). Aufgrund der schlechten Löslichkeiten konnten die Inhibierungsversuche mit den restlichen aromatisch substituierten 2-Oxosäuren nur bei 5 und 10 mM durchgeführt werden. Die drei untersuchten Verbindungen zeigten alle inhibierende Wirkung (Abb 2-24).

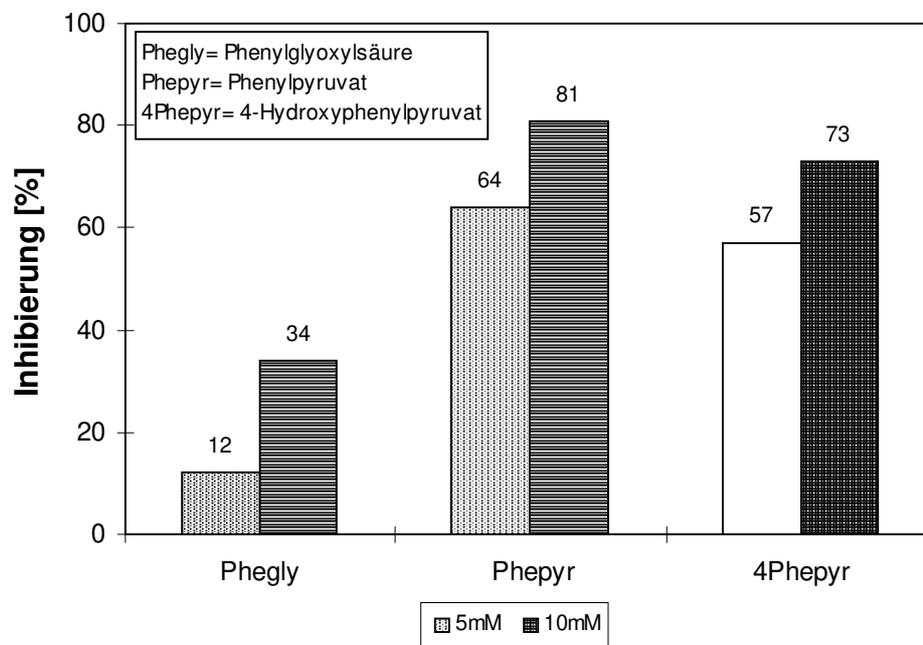


Abb 2-24 Inhibierung der Pyruvatdecarboxylase durch mögliche aromatisch substituierte Substratanaloga

## 2.3 Substratspektrum der Bildung von $\alpha$ -Hydroxyketonen

### 2.3.1 Transformationen mit Hefekulturen von *Zygosaccharomyces bisporus*

#### 2.3.1.1 Aminosäuren als Precursoren

In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, daß die Wildhefe *Zygosaccharomyces bisporus* bei Supplementierung des Wachstumsmediums mit der Aminosäure L-Phenylalanin signifikante Mengen an 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (**1**) bildet [18]. Dieses  $\alpha$ -Hydroxyketon war zuvor erst einmal aus natürlicher Quelle (Blüten von *Phlox paniculata* [37]) beschrieben worden. Auch das tautomere 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (**2**) konnte detektiert werden; es handelt sich dabei um einen aromaaktiven Stoff, der für den typischen Geruch der *Wisteria*-Blüten verantwortlich ist [38]. Darüber hinaus konnten die entsprechenden Acyloine aus L-Tyrosin identifiziert werden. Diese Untersuchungen sollten nun auf weitere Aminosäuren ausgedehnt werden, um das Acyloin-Synthesepotential von *Z. bisporus* zu untersuchen (Abb 2-25).

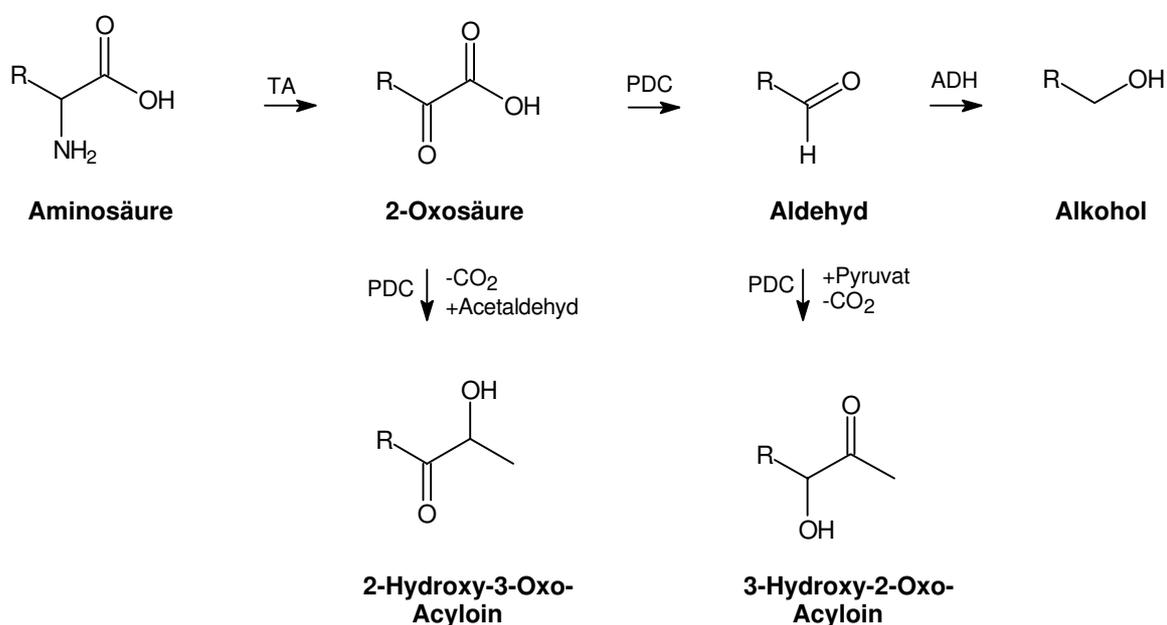


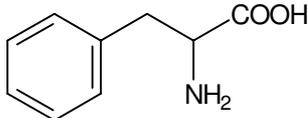
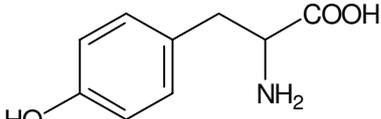
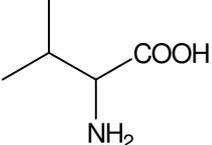
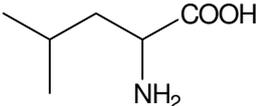
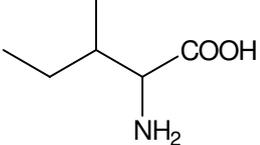
Abb 2-25 Mögliche Bildungswege von  $\alpha$ -Hydroxyketonen in Hefezellen (TA = Transaminase, PDC = Pyruvatdecarboxylase, ADH = Alkoholdehydrogenase)

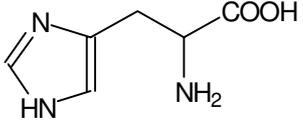
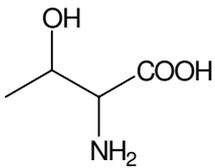
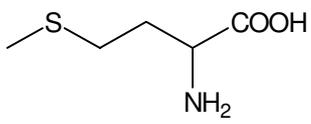
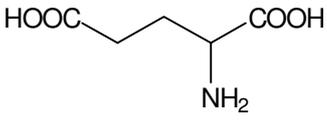
Die Supplementierungsversuche wurden in zwei verschiedenen Transformationsmedien durchgeführt (4.6.4). Dabei handelte es sich zum einen um ein modifiziertes Standard-

Wachstumsmedium (WT 1) mit Glucose (30 g L<sup>-1</sup>) und Ethanol (4 Vol %) als Kohlenstoff-Quellen und Hefeextrakt als Stickstoff- und Vitaminquelle (3 g L<sup>-1</sup>). Zum anderen wurde ein Medium gewählt, das durch seinen geringeren Glucosegehalt (10 g L<sup>-1</sup>), einen höheren Zusatz von Ethanol (8 Vol%) sowie der entsprechenden Aminosäure als einziger Stickstoff-Quelle erschwerte Wachstumsbedingungen bot (WT 2). In der oben zitierten Arbeit erbrachte es die maximalen Acyloinausbeuten.

Neben den bereits erfolgreich umgesetzten Substraten L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurden 7 weitere proteinogene Aminosäuren mit möglichst verschiedenen Funktionalitäten oder besonders erfolgversprechenden Strukturen bezüglich der Aromaaktivität möglicher Acyloine getestet (Tab 2-3).

Tab 2-3 Substratspektrum der Acyloinbildung aus Aminosäuren mit *Zygosaccharomyces bisporus* (++ = > 50 µmol L<sup>-1</sup>; + = > 5 µmol L<sup>-1</sup>; o = < 5 µmol L<sup>-1</sup>, Anfangskonzentrationen der Aminosäuren 10 mM L<sup>-1</sup>)

Aromatische Aminosäuren	Acyloinbildung	
	L-Phenylalanin (Phe)	ja (++)
	L-Tyrosin (Tyr)	ja (++)
Aliphatische verzweigte Aminosäuren		
	L-Valin (Val)	ja (o)
	L-Leucin (Leu)	ja (o)
	L-Isoleucin (Ile)	nein

Heterocyclische Aminosäuren		
	L-Histidin (His)	nein
Aminosäuren mit zusätzlichen funktionellen Gruppen		
	L-Threonin (Thr)	nein
	L-Methionin (Met)	ja (+)
	L-Glutaminsäure (Glu)	nein

Die Auswertung der Supplementierungsversuche erfolgte mittels GC-MS nach Flüssig-Flüssig-Extraktion der zellfreien Kulturbrühen. Neben den bereits bekannten Umsetzungen des Phenylalanins und Tyrosins konnten bei den Transformationen mit den Substraten Valin, Leucin und Methionin Peaks in der GC-MS beobachtet werden, die nach ihrem Fragmentierungsmuster den gesuchten Acyloinen entsprachen. Die gebildeten Mengen unterschieden sich dabei in den beiden Transformationsmedien nicht wesentlich, zeigten sich also vom Wachstum der Hefekulturen weitgehend unabhängig (Abb 2-26). Auf eine Optimierung der Wachstumsbedingungen bezüglich der Acyloinbildung wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

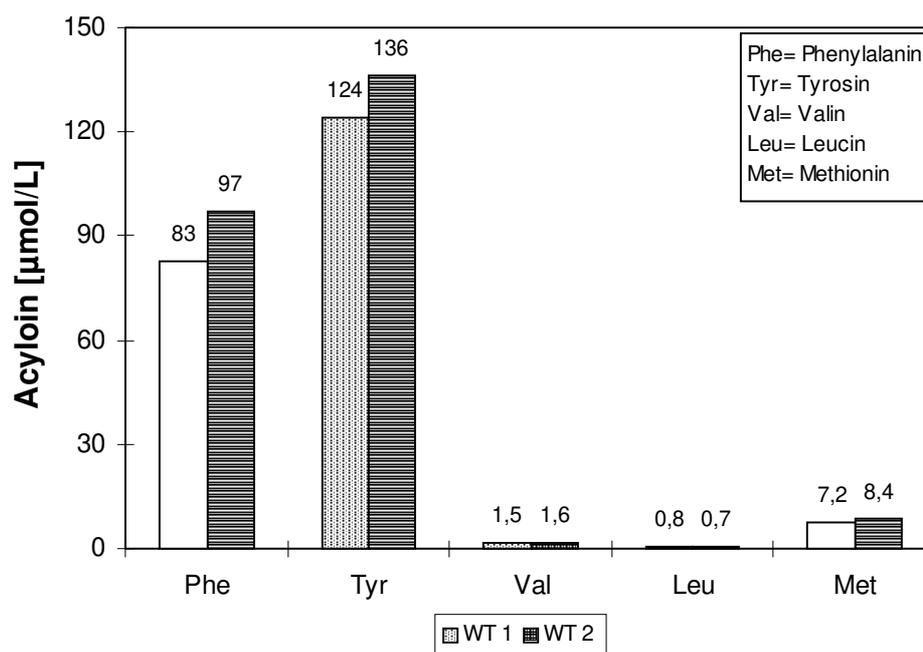


Abb 2-26 Acyloinbildung aus Aminosäuren mit *Zygosaccharomyces bisporus* in zwei verschiedenen Kulturmedien (angegeben als Summe beider Tautomere)

Mit Ausnahme von 3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon (**6**) lagen für keine der betreffenden Verbindungen chromatographische oder spektrometrische Vergleichsdaten vor. Zur Absicherung der Identifizierung der  $\alpha$ -Hydroxyketone wurde deshalb insgesamt 6 der Substanzen ((**3**) – (**8**), siehe 2.3.2.1) chemisch synthetisiert (4.11). Außerdem wurden, sofern verfügbar, die 2-Oxosäuren und Aldehyde, die sich nach Abb 2-25 aus den Aminosäuren ableiten, mit der aus *Zygosaccharomyces bisporus* isolierten Pyruvatdecarboxylase umgesetzt. Dabei wurden als neu entstandene GC-Peaks fast ausschließlich die gesuchten Acyloine beobachtet. Die Übereinstimmung der GC-Retentionszeiten und MS-Fragmentierungsmuster dieser Produkte mit denen der Hefe-Transformationen wurde daher als ausreichende Identifizierung angesehen, wenn nicht zusätzlich die chemische Synthese der Vergleichssubstanzen durchgeführt wurde. Die Auswertung der erhaltenen Daten wird zusammenfassend in Kapitel 2.3.2 diskutiert.

### 2.3.1.2 2-Oxosäuren und Aldehyde als Precursoren

In weiteren Versuchen wurden anstelle von Aminosäuren 2-Oxosäuren und Aldehyde als Precursoren eingesetzt (4.6.4.2). Einerseits sollte damit der in Abb 2-25 vorgeschlagene Bildungsweg der  $\alpha$ -Hydroxyketone überprüft bzw. bestätigt werden. Darüber hinaus wür-

den sich möglicherweise die aus den bisher nicht umgesetzten Aminosäuren abgeleiteten Acyloine doch bilden, wenn der primäre Aminosäure-Stoffwechsel durch Verwendung anderer Substrate umgangen werden konnte.

Zunächst wurde die Synthese der **aromatisch substituierten** Acyloine untersucht. Neben Phenylalanin wurden Phenylpyruvat (Phepyr) und Phenylacetaldehyd (Pheac) als Vorstufen eingesetzt, neben Tyrosin die entsprechende 2-Oxosäure 4-Hydroxyphenylpyruvat (4-Phepyr). Als zusätzlicher Vergleich diente die Umsetzung von Benzaldehyd (Ba); das daraus entstehende Phenylacetylcarbinol (PAC) ist bereits bekannt und umfassend untersucht (vgl. 3.3). Da sich zwischen den Transformationsmedien (siehe 2.3.1.1) keine erheblichen Unterschiede bezüglich der Acyloinbildung ergeben hatten, wurde nunmehr der einfacheren Handhabung halber ausschließlich das Standardmedium WT 1 verwendet (Abb 2-27).

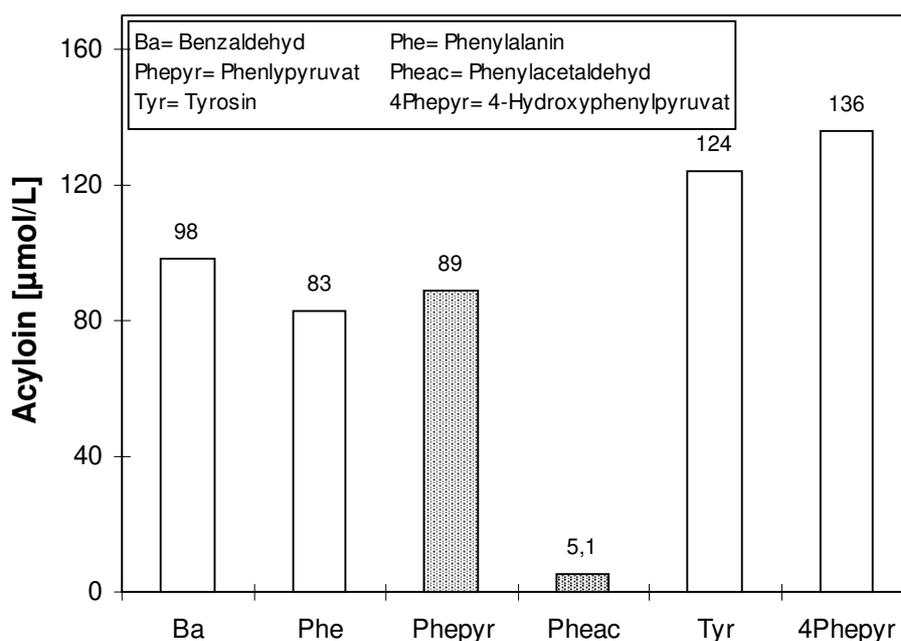


Abb 2-27 Bildung aromatischer Acyloine aus verschiedenen Precursorvorstufen (angegeben als Summe beider Tautomere, Precursor-Anfangskonzentration jeweils 10 mmol L<sup>-1</sup>)

Die quantitative Auswertung der Ergebnisse ergab, daß sich durch den Einsatz der 2-Oxosäuren etwas höhere Ausbeuten an  $\alpha$ -Hydroxyketonen, verglichen mit der Precursorwirkung der Aminosäuren, erzielen ließen. Der Ersatz von Phenylalanin durch Phenylacetaldehyd führte dagegen zu einem drastischen Rückgang der Acyloinbildung. Als

Grund hierfür ist nicht nur die Zelltoxizität aldehydischer Verbindungen anzusehen, da aus Benzaldehyd deutlich höhere Mengen Acyloin entstanden. Das Hauptprodukt der Fermentation mit Phenylacetaldehyd war das durch enzymatische Reduktion mit ADH aus dem Aldehyd hervorgehende 2-Phenylethanol. Phenylacetaldehyd stellte für die Pyruvat-decarboxylase offensichtlich ein deutlich schlechteres Substrat als Phenylpyruvat oder auch Benzaldehyd dar, während es von der beteiligten Alkoholdehydrogenase gut umgesetzt wurde.

Qualitativ ist vor allem das Verhältnis der jeweils entstandenen tautomeren  $\alpha$ -Hydroxyketone zueinander interessant. Zwar beziehen sich die quantitativen Angaben in Abb 2-26 und Abb 2-27 auf die Summe beider Isomeren, da in wäßrigen Lösungen immer das Vorliegen der zwei tautomeren Acyloine nebeneinander zu beobachten war. Während jedoch aus den Precursoren Phenylalanin und Phenylpyruvat 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon **(1)** in mehr als 10fach größerer Menge als 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon **(2)** gebildet wurde, entstand aus Phenylacetaldehyd letztgenannte Verbindung **(2)** in 3fachem Überschuß gegenüber der tautomeren Komponente **(1)** (Abb 2-28).

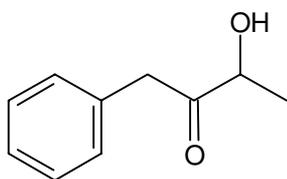
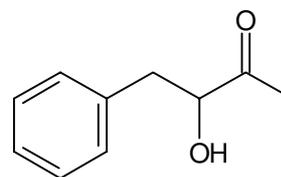
**(1)****3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon****(2)****3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon**

Abb 2-28 Struktur der phenylbutanoiden Acyloine aus Phenylpyruvat (+ Acetaldehyd) **(1)** bzw. Phenylacetaldehyd (+ Pyruvat) **(2)**

Diese Ergebnisse stützen den in Abb 2-25 vorgeschlagenen Biosyntheseweg von  $\alpha$ -Hydroxyketonen in *Zygosaccharomyces bisporus*. Die Tatsache, daß bei allen drei Fermentationen 2-Phenylethanol als Hauptprodukt identifiziert wurde, läßt darauf schließen, daß eine große Affinität des Phenylacetaldehyds zu der beteiligten Alkoholdehydrogenase besteht. Nennenswerte Mengen Acyloin entstehen deshalb nur, wenn nach Decarboxylierung des Phenylpyruvats der resultierende PDC-Phenylacetaldehyd-Komplex ohne vorherige Dissoziation mit Acetaldehyd unter Acyloinbildung weiter reagiert.

Der Einsatz **aliphatischer** 2-Oxosäuren für Precursor-Studien wurde auf solche Säuren fokussiert, die den Transaminierungsprodukten der oben verwendeten Aminosäuren entsprachen. Kommerziell verfügbar waren 3-Methyl-2-oxobutansäure („Ketovalin“, Oxval), 3-Methyl-2-oxopentansäure („Ketoleucin“, Oxleu), 4-Methyl-2-oxopentansäure („Ketoisoleucin“, Oxile) sowie 2-Oxoglutarsäure („Ketoglutaminsäure“, Oxglu). Mit Ausnahme der 2-Oxoglutarsäure konnte bei allen Substraten eine Acyloinbildung festgestellt werden (Abb 2-29).

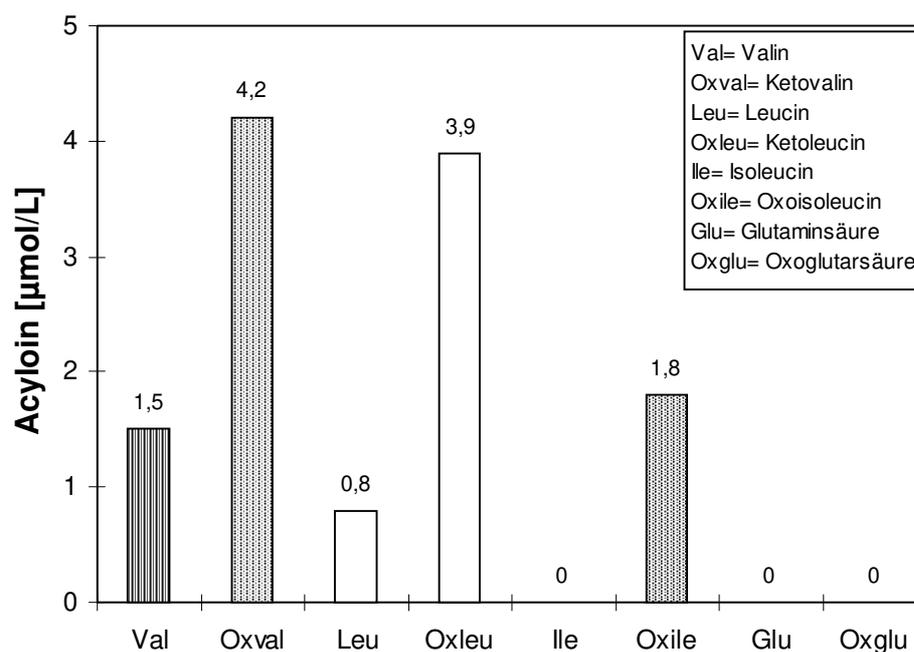


Abb 2-29 Vergleich der Bildung aliphatischer Acyloine aus Aminosäuren und den entsprechenden 2-Oxosäuren (angegeben als Summe beider Tautomere, Precursor-Gesamtkonzentration jeweils  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ )

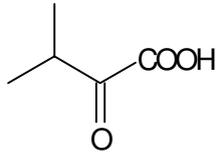
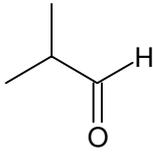
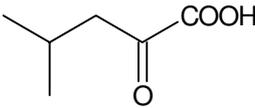
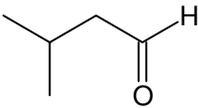
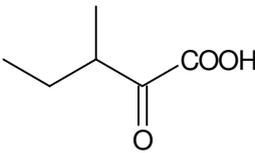
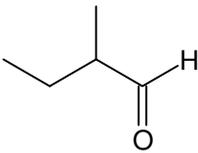
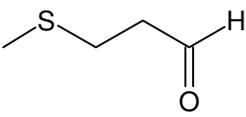
Die 2-Oxosäuren erwiesen sich dabei als effizientere Precursoren als die entsprechenden Aminosäuren; insgesamt war die Produktausbeute jedoch erheblich niedriger als bei den aromatischen Verbindungen.

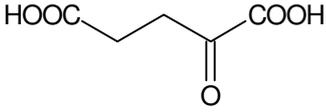
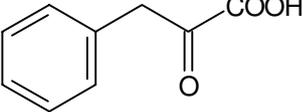
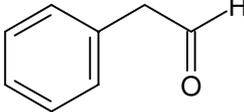
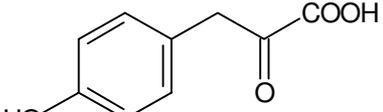
## 2.3.2 Transformationen mit isolierter Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus*

### 2.3.2.1 Aminosäure-Analoga

Versuche zum Substratspektrum der Acyloinbildung mit Pyruvatdecarboxylase aus *Z. bisporus* konzentrierten sich zunächst auf die den in 2.3.1.1 verwendeten Aminosäuren entsprechenden Aldehyde und 2-Oxosäuren. Für erste qualitative Versuche wurden jeweils 500  $\mu\text{mol}$  2-Oxosäure (+ Acetaldehyd) und 500  $\mu\text{mol}$  Aldehyd (+ Pyruvat) mit dem Enzymisolat inkubiert (siehe 4.8.1). Bis auf 2-Oxoglutarsäure und 4-Hydroxyphenylpyruvat wurden alle Substrate zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen umgesetzt, die die Hauptprodukte der Transformationen darstellten (Tab 2-4).

Tab 2-4 Substratspektrum der Acyloinbildung aus Aminosäure-Analoga mit Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus*

Aminosäure	2-Oxosäure	Aldehyd	Umsatz
Val	 3-Methyl-2-oxobutansäure	 2-Methylpropanal	ja
Leu	 4-Methyl-2-oxopentansäure	 3-Methylbutanal	ja
Ile	 3-Methyl-2-oxopentansäure	 2-Methylbutanal	ja
Met	-	 3-(Methylthio)-propanal (Methional)	ja

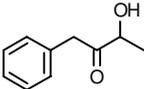
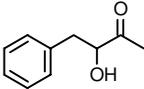
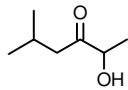
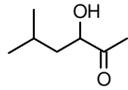
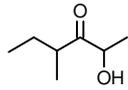
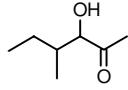
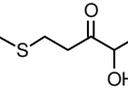
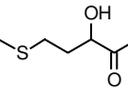
Glu	 2-Oxoglutarinsäure	-	nein
Phe	 Phenylpyruvat	 Phenylacetaldehyd	ja
Tyr	 4-Hydroxyphenylpyruvat	-	nein

Da von den kurzkettig-verzweigten  $\alpha$ -Hydroxyketonen bis auf **(6)** keine Vergleichsdaten in der Literatur vorlagen, wurden zur eindeutigen Identifizierung der Produkte alle sechs Referenzsubstanzen synthetisiert (siehe 4.11).

Wie erwartet, wurden auch bei den Umsetzungen mit der isolierten PDC aus den 2-Oxosäuren und Acetaldehyd bevorzugt 2-Hydroxy-3-oxo-acyloine sowie aus den Aldehyden und Pyruvat 3-Hydroxy-2-oxo-acyloine gebildet (vgl. Abb 2-25). Sowohl die Kovats-Indices als auch die Massenspektren der Referenzsubstanzen **(3)-(8)** stimmten mit den Daten der Produkte der enzymatischen Transformationen und der Hefefermentationen überein (Tab 2-5). Bei den weiteren  $\alpha$ -Hydroxyketonen wurde angesichts erfolgreicher enzymatischer Synthesen, charakteristischer Retentionsindices und Massenspektren sowie Übereinstimmung mit den Hefefermentationen auf eine chemische Synthese der Referenzen verzichtet.

Die Massenspektren und Fragmentierungsmuster der Acyloine 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon **(1)** und 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon **(2)** sind in einer vorausgegangenen Arbeit diskutiert worden [18] und hier im Anhang aufgeführt.

Tab 2-5 Identifizierte Acyloine aus Aminosäure-Analoga (<sup>a</sup> CW 20M, \* erstmals identifiziert, \*\* erstmals als enzymatisches oder mikrobielles Produkt bzw. aus natürlicher Quelle identifiziert)

Acyloin		KI <sup>a</sup> (experimentell)	KI <sup>a</sup> (Literatur)	MS-Vergleich (Literatur)
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon <b>(1)</b>		2266	2259 [18]	[18]
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon <b>(2)</b>		2257	2249 [18]	[18]
2-Hydroxy-4-methyl-3-pentanon <b>(3)**</b>		1348	-	-
3-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon <b>(4)**</b>		1366	-	-
2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon <b>(5)*</b>		1453	-	-
3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon <b>(6)</b>		1472	-	[39]
2-Hydroxy-4-methyl-3-hexanon <b>(7)**</b>		1441	-	-
3-Hydroxy-4-methyl-2-hexanon <b>(8)**</b>		1481	-	-
2-Hydroxy-5-(methylthio)-3-pentanon <b>(9)*</b>		2061	-	-
3-Hydroxy-5-(methylthio)-2-pentanon <b>(10)*</b>		2022	-	-

Aus 3-Methyl-2-oxobutansäure + Acetaldehyd sowie 2-Methylpropanal + Pyruvat (Analoge der Aminosäure Valin), entstanden die Acyloine 2-Hydroxy-4-methyl-3-pentanon (**3**) und 3-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon (**4**). Im Massenspektrum zeigen die Molekülionen  $M^+$  nur schwache Intensität (Abb 2-30), was sich bei der Mehrzahl der  $\alpha$ -Hydroxyketone ebenfalls beobachten ließ.

Als primäre Fragmentierung dominiert die  $\alpha$ -Spaltung zwischen den C-Atomen 2 und 3, also zwischen Hydroxyl- und Ketogruppe, die je nach Tautomer zu den charakteristischen Bruchstücken  $m/z = 43$  bzw.  $m/z = 45$  sowie  $m/z = M - 43$  bzw.  $m/z = M - 45$  führt. Die letztgenannten Fragmente (hier  $m/z = 73$  bzw.  $m/z = 71$ ) spalten in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer Hydroxyl- oder Ketogruppe bevorzugt Wasser oder Kohlenmonoxid als Neutralteilchen ab. Je nach Stabilität der entstandenen Ionen können diese Bruchstücke die größte Intensität im Spektrum aufweisen.

Aus 4-Methyl-2-oxopentansäure + Acetaldehyd sowie 3-Methylbutanal + Pyruvat (Analoge der Aminosäure Leucin) wurden die Acyloine 2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon (**5**) und 3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon (**6**) mit der Masse 130 gebildet (Abb 2-31). Die primäre  $\alpha$ -Spaltung führt hier zu den Fragmenten  $m/z = 43 / 87$  und  $m/z = 45 / 85$ . Mit Ausnahme der Primärbruchstücke  $m/z = 43$  bzw.  $m/z = 45$  unterscheiden sich die Spektren um die Massendifferenz 14 von denen der Substanzen (**4**) und (**5**). Differenzen in den Intensitäten der Fragmente lassen sich auf unterschiedliche Stabilitäten der Ionen zurückführen. Von Acyloin (**6**) war ein Literatur-Vergleichsspektrum bekannt [39], das mit dem hier dargestellten (experimentell ermittelten) übereinstimmte.

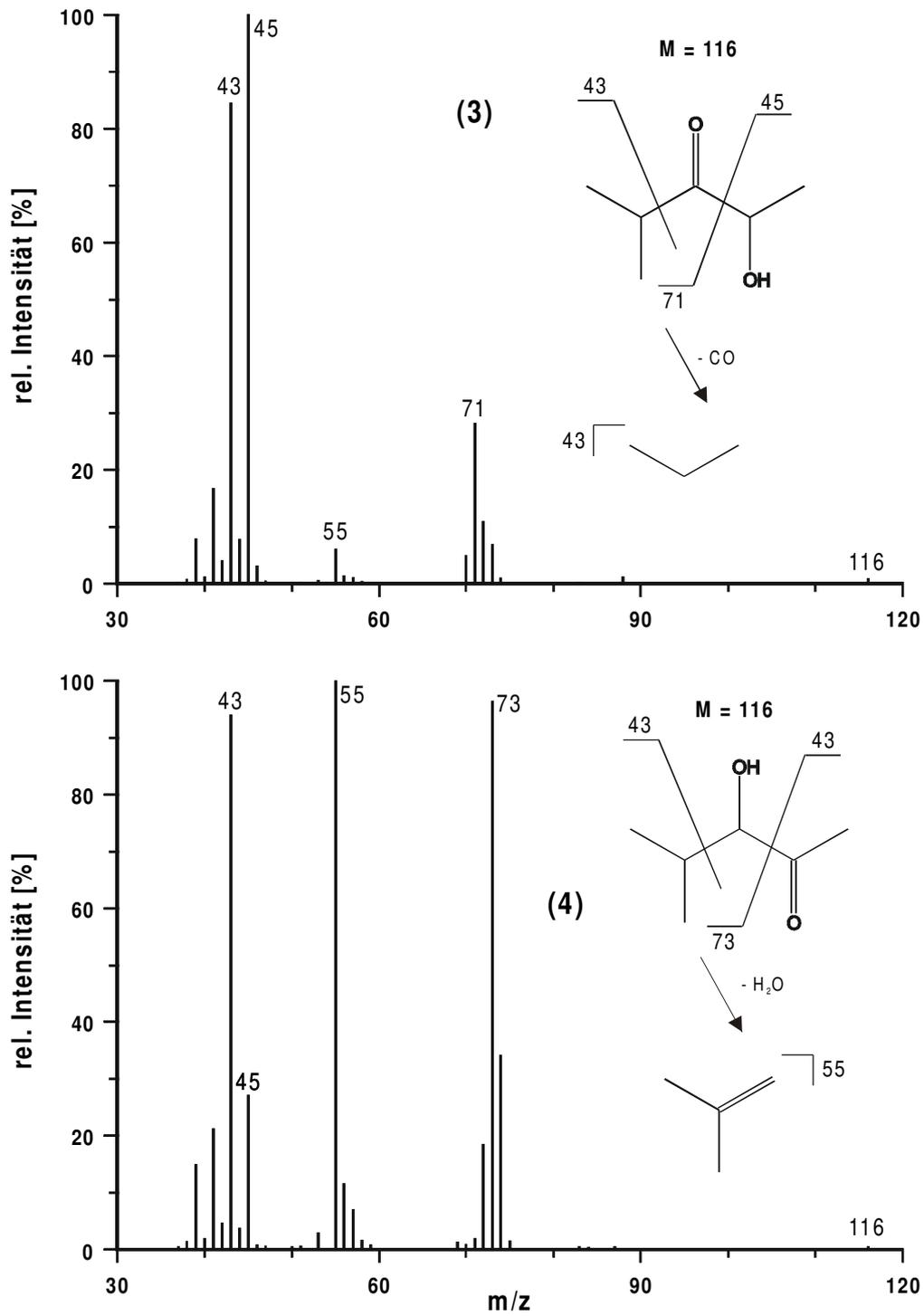


Abb 2-30 Massenspektren von 2-Hydroxy-4-methyl-3-pentanon **(3)** und 3-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon **(4)**

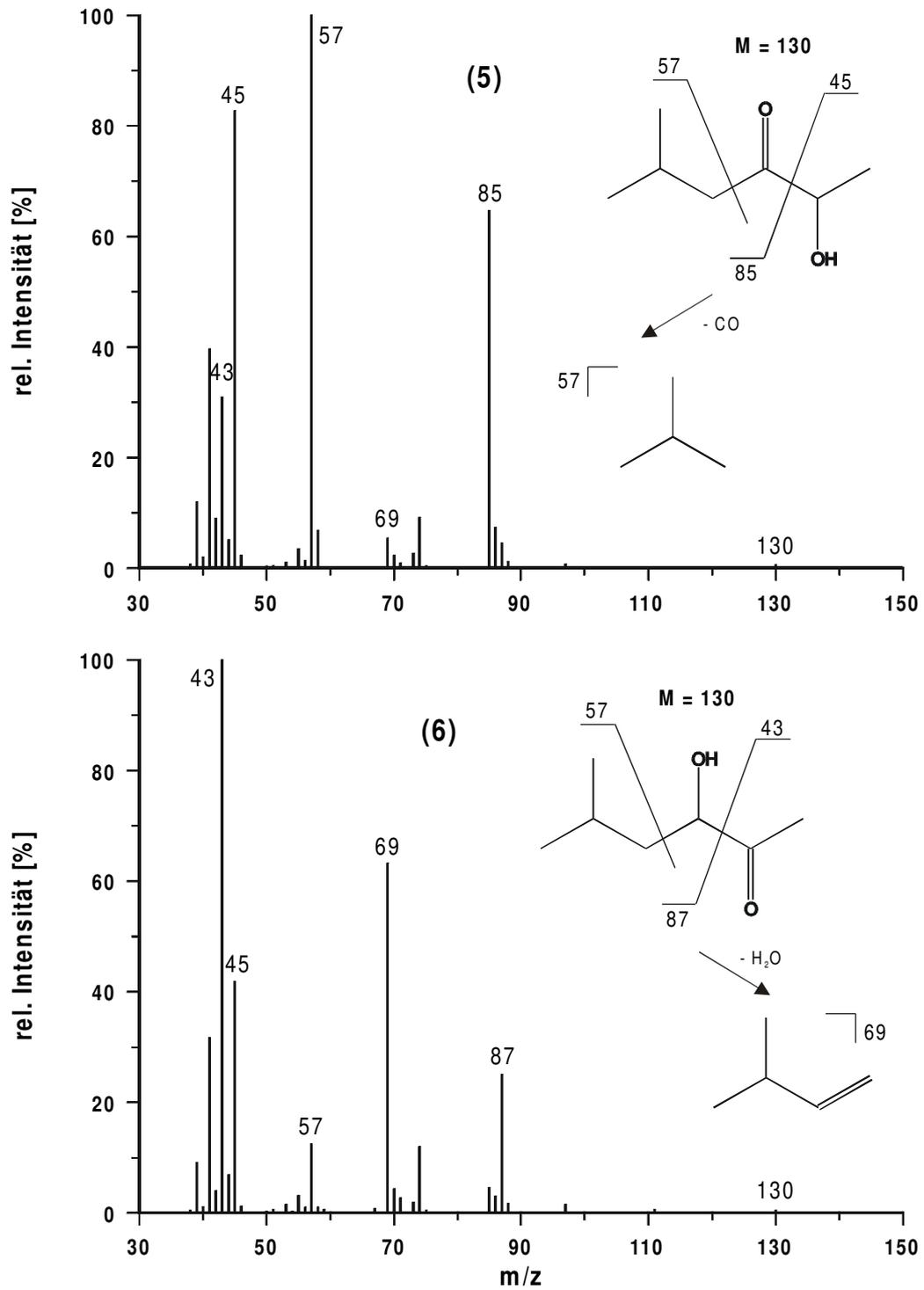


Abb 2-31 Massenspektren von 2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon **(5)** und 3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon **(6)**

Aus 3-Methyl-2-oxopentansäure + Acetaldehyd sowie 2-Methylbutanal + Pyruvat (Analoge der Aminosäure Isoleucin), entstanden die Acyloine 2-Hydroxy-4-methyl-3-hexanon (**7**) und 3-Hydroxy-4-methyl-2-hexanon (**8**). Zwar unterscheiden sie sich von (**5**) und (**6**) lediglich in der Stellung der abzweigenden Methylgruppe, zeigten jedoch in der MS ein unerwartetes Fragmentierungsmuster (Abb 2-32). Beide Verbindungen wiesen fast identische Massenspektren auf, obwohl sie gaschromatographisch vor Einbringung in den MS-Detektor eindeutig getrennt werden konnten. Möglicherweise findet in der Ionenquelle unter Elektronenbeschuss oder thermischer Belastung eine begünstigte Isomerisierung zu (**8**) statt, da die Spektren der hier zu erwartenden Fragmentierung am besten entsprachen. Dies müßte ursächlich mit der Methylgruppe am C4-Atom zusammenhängen, da sie den einzigen strukturellen Unterschied zu den „normal“ fragmentierenden Acyloinen mit C<sub>6</sub>-Grundgerüst (**5**), (**6**), (**13**) und (**14**) darstellt. Das gleiche Bild bot sich tatsächlich auch bei den gegenüber (**7**) und (**8**) nur um eine CH<sub>2</sub>-Einheit verlängerten Acyloinen (**23**) und (**24**) (siehe 2.3.2.2), allerdings nicht bei den um eine CH<sub>2</sub>-Einheit kürzeren Acyloinen (**3**) und (**4**).

Ein Grund für dieses Phänomen könnte die bevorzugte H<sub>2</sub>O-Abspaltung im Sinne einer 1,2-Eliminierung sein, die nur mit der Hydroxylgruppe in C3-Position möglich ist. Lediglich mit einer Methylgruppe in C4-Stellung entsteht hierbei ein tertiäres (stabiles) Carbeniumion. Hinweise auf diese Wasser-Abspaltung mit vorgelagerter Keto-Enol-Umlagerung finden sich in der Literatur bezüglich  $\alpha$ -Hydroxyketonen, wenn auch nicht im Zusammenhang mit der massenspektrometrischen Fragmentierung der Substanzen [40].

Die chemisch synthetisierten Referenzen stimmten bezüglich Retentionszeiten und Massenspektren mit den enzymatischen Transformationsprodukten überein.

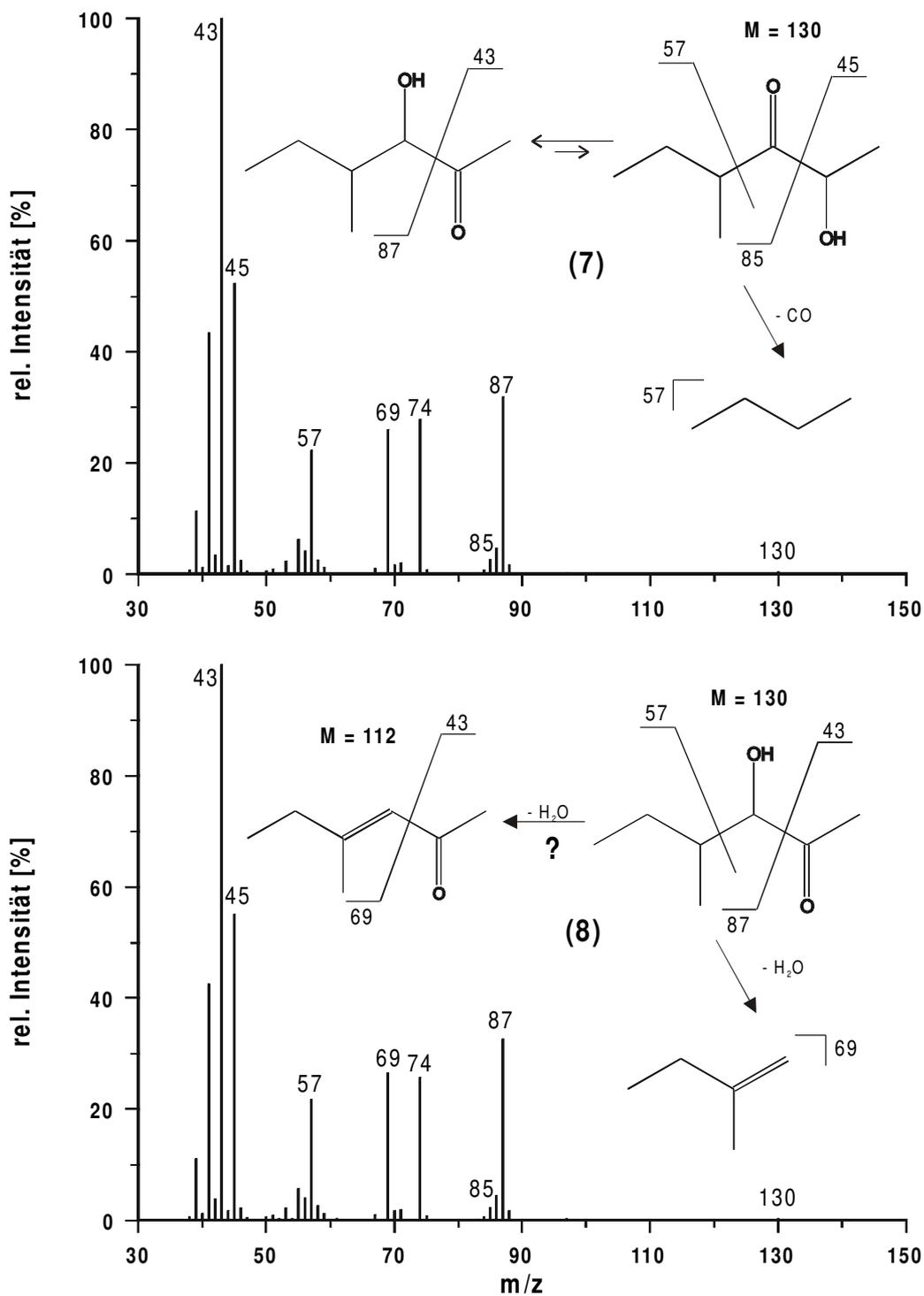


Abb 2-32 Massenspektren von 2-Hydroxy-4-methyl-3-hexanon **(7)** und 3-Hydroxy-4-methyl-2-hexanon **(8)**

Aus Methional + Pyruvat (analog der Aminosäure Methionin), wurde das Acyloin 3-Hydroxy-5-(methylthio)-2-pentanone **(10)** und in geringerem Maße auch 2-Hydroxy-5-(methylthio)-3-pentanone **(9)** gebildet. Neben einem deutlichen Molekülion  $m/z = 148$  ist

hier vor allem das für schwefelhaltige Verbindungen typische Isotopenmuster auffällig (Abb 2-33). Zusätzlich zu den bereits beschriebenen typischen Fragmentierungsreaktionen tritt außerdem eine  $\alpha$ -Spaltung am Thioether-Rest auf, die zu dem in beiden Spektren intensivsten Bruchstück mit  $m/z = 61$  führt.

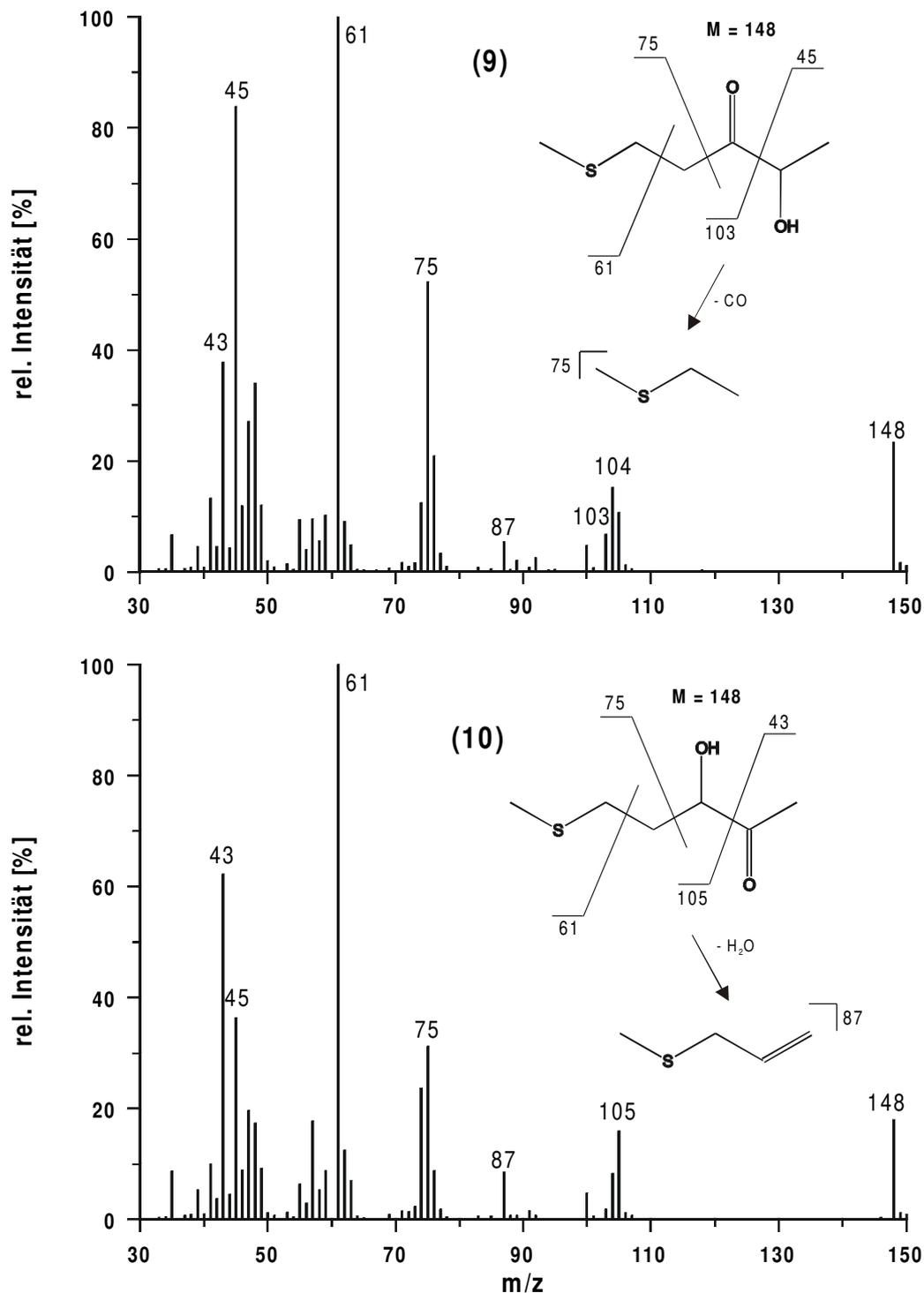
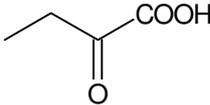
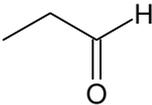
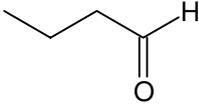
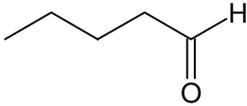
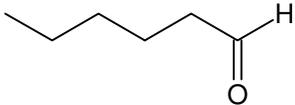
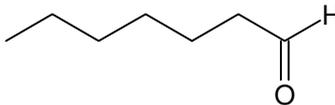
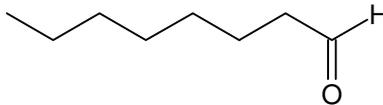


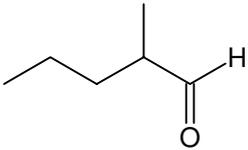
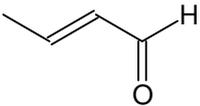
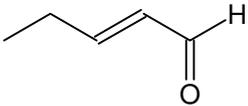
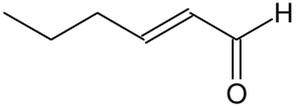
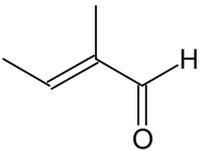
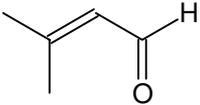
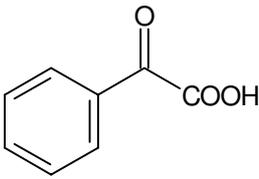
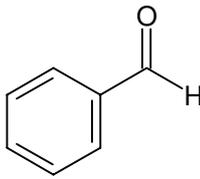
Abb 2-33 Massenspektren von 2-Hydroxy-5-(methylthio)-3-pentanon **(9)** und 3-Hydroxy-5-(methylthio)-2-pentanon **(10)**

## 2.3.2.2 Weitere Substrate

Da mit Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* soweit alle Substrate außer 2-Oxoglutarinsäure und 4-Hydroxyphenylpyruvat zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen umgesetzt werden konnten, wurden die Untersuchungen auf verschiedene weitere Verbindungen ausgedehnt (Tab 2-6).

Tab 2-6 Substratspektrum der Acyloinbildung aus Aldehyden (+ Pyruvat) und 2-Oxosäuren (+ Acetaldehyd) mit Pyruvatdecarboxylase aus *Z. bisporus*

2-Oxosäure	Aldehyd	Umsatz
<b>Gesättigte unverzweigte Substrate</b>		
 2-Oxobutansäure	 Propanal	ja
-	 Butanal	ja
-	 Pentanal	ja
-	 Hexanal	ja
-	 Heptanal	ja
-	 Octanal	ja

Gesättigte verzweigte Substrate		
-	 2-Methylpentanal	ja
Ungesättigte unverzweigte Substrate		
-	 2E-Butenal	ja
-	 2E-Pentenal	ja
-	 2E-Hexenal	ja
Ungesättigte verzweigte Substrate		
-	 2-Methyl-2E-butenal	ja
-	 3-Methyl-2E-butenal	ja
Aromatisch substituierte Substrate		
 Phenylglyoxylsäure	 Benzaldehyd	ja

Wenn möglich, wurden jeweils die 2-Oxosäuren und die „korrespondierenden“ Aldehyde eingesetzt; kommerziell überwiegend verfügbar waren die aldehydische Substrate. Um zu

testen, ob bei der Reaktion außer C<sub>2</sub>-Einheiten auch andere Bausteine übertragen werden können, wurde außerdem Benzaldehyd zusätzlich mit 2-Oxobutansäure (statt Pyruvat) inkubiert.

Analog zu den bisherigen Ergebnissen entstanden aus 2-Oxosäuren bevorzugt 2-Hydroxy-3-oxo-acyloine sowie aus Aldehyden 3-Hydroxy-2-oxo-acyloine. Einzige Ausnahme war Phenylglyoxylsäure, aus der, ebenso wie aus Benzaldehyd, Verbindung (35) im Überschuß entstand. Alle getesteten Substrate wurden zu Acyloinen umgesetzt, die jeweils die Hauptprodukte der enzymatischen Transformationen darstellten (Abb 2-34).

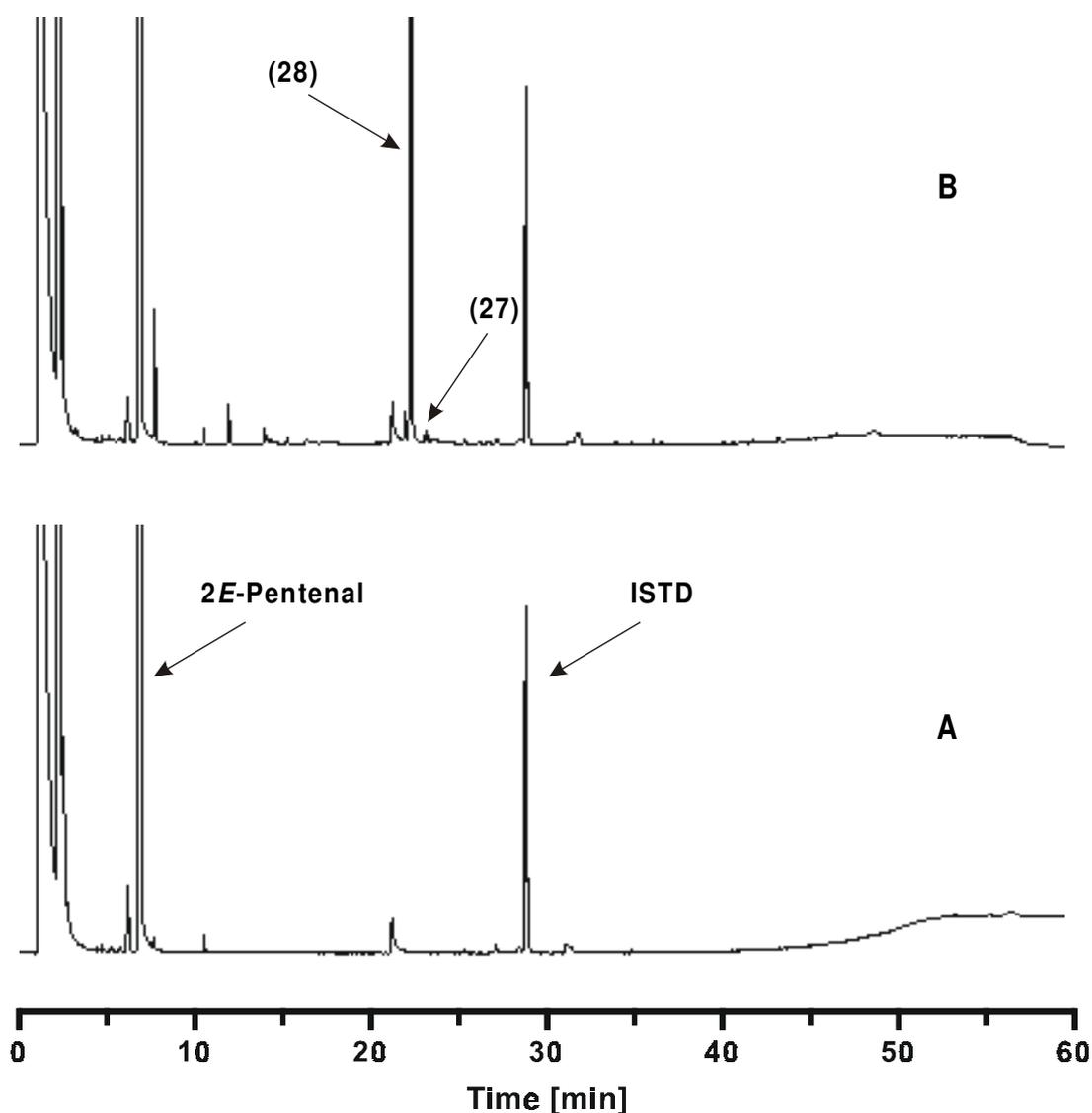
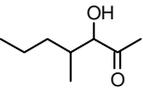
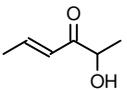
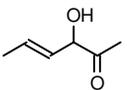
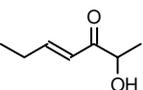
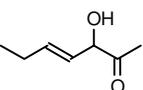
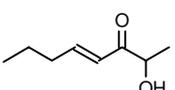
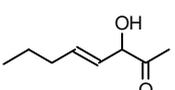
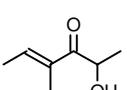
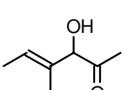
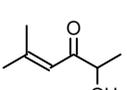
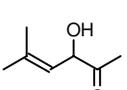
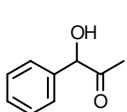
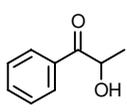
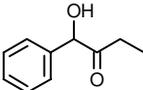
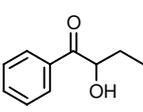


Abb 2-34 FID-Gaschromatogramm der enzymatischen PDC-Umsetzung (B) im Vergleich mit dem chemischen Blindwert (A) am Beispiel des Substrates 2E-Pentenal

Tab 2-7 Identifizierte Acyloine aus der enzymatischen Transformation mit PDC  
(<sup>a</sup> CW 20M, \* erstmals identifiziert, \*\* erstmals als enzymatisches oder  
mikrobielles Produkt bzw. aus natürlicher Quelle identifiziert)

Acyloin		KI <sup>a</sup> (experimentell)	KI <sup>a</sup> (Literatur)	MS-Vergleich (Literatur)
2-Hydroxy-3-pentanon ( <b>11</b> )		1364	1353 [41]	[42]
3-Hydroxy-2-pentanon ( <b>12</b> )		1346	1336 [41]	[42]
2-Hydroxy-3-hexanon ( <b>13</b> )		1434	1414 [41]	[43]
3-Hydroxy-2-hexanon ( <b>14</b> )		1440	1429 [41]	[43]
2-Hydroxy-3-heptanon ( <b>15</b> )		1539	-	[44]
3-Hydroxy-2-heptanon ( <b>16</b> )		1547	-	[44]
2-Hydroxy-3-octanon ( <b>17</b> )		1645	-	[45]
3-Hydroxy-2-octanon ( <b>18</b> )		1655	-	[46]
2-Hydroxy-3-nonanon ( <b>19</b> )		1752	-	-
3-Hydroxy-2-nonanon ( <b>20</b> )		1765	-	-
2-Hydroxy-3-decanon ( <b>21</b> )		1859	-	[44]
3-Hydroxy-2-decanon ( <b>22</b> )		1867	-	[44]
2-Hydroxy-4-methyl-3-heptanon ( <b>23</b> )*		1537	-	-

3-Hydroxy-4-methyl-2-heptanon ( <b>24</b> )*		1565	-	-
2-Hydroxy-4 <i>E</i> -hexen-3-on ( <b>25</b> )*		1511	-	-
3-Hydroxy-4 <i>E</i> -hexen-2-on ( <b>26</b> )**		1504	-	-
2-Hydroxy-4 <i>E</i> -hepten-3-on ( <b>27</b> )*		1620	-	-
3-Hydroxy-4 <i>E</i> -hepten-2-on ( <b>28</b> )*		1589	-	-
2-Hydroxy-4 <i>E</i> -octen-3-on ( <b>29</b> )*		1710	-	-
3-Hydroxy-4 <i>E</i> -octen-2-on ( <b>30</b> )*		1687	-	-
2-Hydroxy-4-methyl-4 <i>E</i> -hexen-3-on ( <b>31</b> )*		1559	-	-
3-Hydroxy-4-methyl-4 <i>E</i> -hexen-2-on ( <b>32</b> )**		1515	-	-
2-Hydroxy-5-methyl-4 <i>E</i> -hexen-3-on ( <b>33</b> )*		1556	-	-
3-Hydroxy-5-methyl-4 <i>E</i> -hexen-2-on ( <b>34</b> )*		1592	-	-
1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon ( <b>35</b> )		2101	-	[47]
2-Hydroxy-1-phenyl-1-propanon ( <b>36</b> )		2072	-	[47]
1-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon ( <b>37</b> )		2175	-	-
2-Hydroxy-1-phenyl-1-butanon ( <b>38</b> )**		2171	-	-

Kovats-Indices und Massenspektren der Produkte stimmten mit teilweise vorhandenen Literaturangaben überein (Tab 2-7). Die erfolgreichen enzymatischen Synthesen mit dem PDC-Isolat sowie charakteristische Massenspektren und typisch ansteigende Kovats-Indices innerhalb der homologen Reihen der  $\alpha$ -Hydroxyketone dienten als Identifizierung der Substanzen, für die keine Literaturdaten verfügbar waren.

Massenspektren und Fragmentierungsmuster der Acyloine, für die Literaturvergleiche vorlagen, sind im Anhang aufgeführt. Im Folgenden werden die Spektren der Substanzen diskutiert, die erstmals identifiziert wurden bzw. für die keine Strukturdaten verfügbar waren.

Aus Heptanal und Pyruvat entstanden durch Transformation mit Pyruvatdecarboxylase die Acyloine 2-Hydroxy-3-nonanon (**19**) und 3-Hydroxy-2-nonanon (**20**) (Hauptprodukt). Die Intensität des Moleküllions  $M^+ \cdot = 158$  lag in beiden Massenspektren unter 0,4 % (Abb 2-35). Deutlich erkennbar sind die Bruchstücke der primären  $\alpha$ -Spaltung  $m/z = 113$  und  $m/z = 115$ , woraus durch Eliminierung von CO bzw.  $H_2O$  die Fragmente  $m/z = 85$  und  $m/z = 97$  gebildet werden. Unter Zerfall der Alkylkette entstehen dann die relativ stabilen Endprodukte  $(C_3H_7)^+$  ( $m/z = 43$ ) und  $(C_4H_7)^+$  ( $m/z = 55$ ), die jeweils die größten Intensitäten im Spektrum zeigen.

Aus 2-Methylpentanal und Pyruvat wurden die Acyloine 2-Hydroxy-4-methyl-3-heptanon (**23**) und 3-Hydroxy-4-methyl-2-heptanon (**24**) (Hauptprodukt) gebildet. Die Massenspektren waren fast identisch und zeigten in Analogie zu den Produkten (**7**) und (**8**) (siehe Abb 2-32) beide das für Substanz (**24**) zu erwartende Fragmentierungsmuster (Abb 2-36). Wahrscheinlich wird auch hier (**24**) als bevorzugtes Isomerisierungsprodukt in oder bei der Überleitung zur Ionenquelle gebildet. Die diskutierte darauffolgende  $H_2O$ -Eliminierung wird durch das Auftreten der Bruchstücke M-18 ( $m/z = 126$ ) untermauert, die in gleicher oder sogar etwas höherer Intensität als die Moleküllionen vorliegen ( $\sim 0,2$  %).

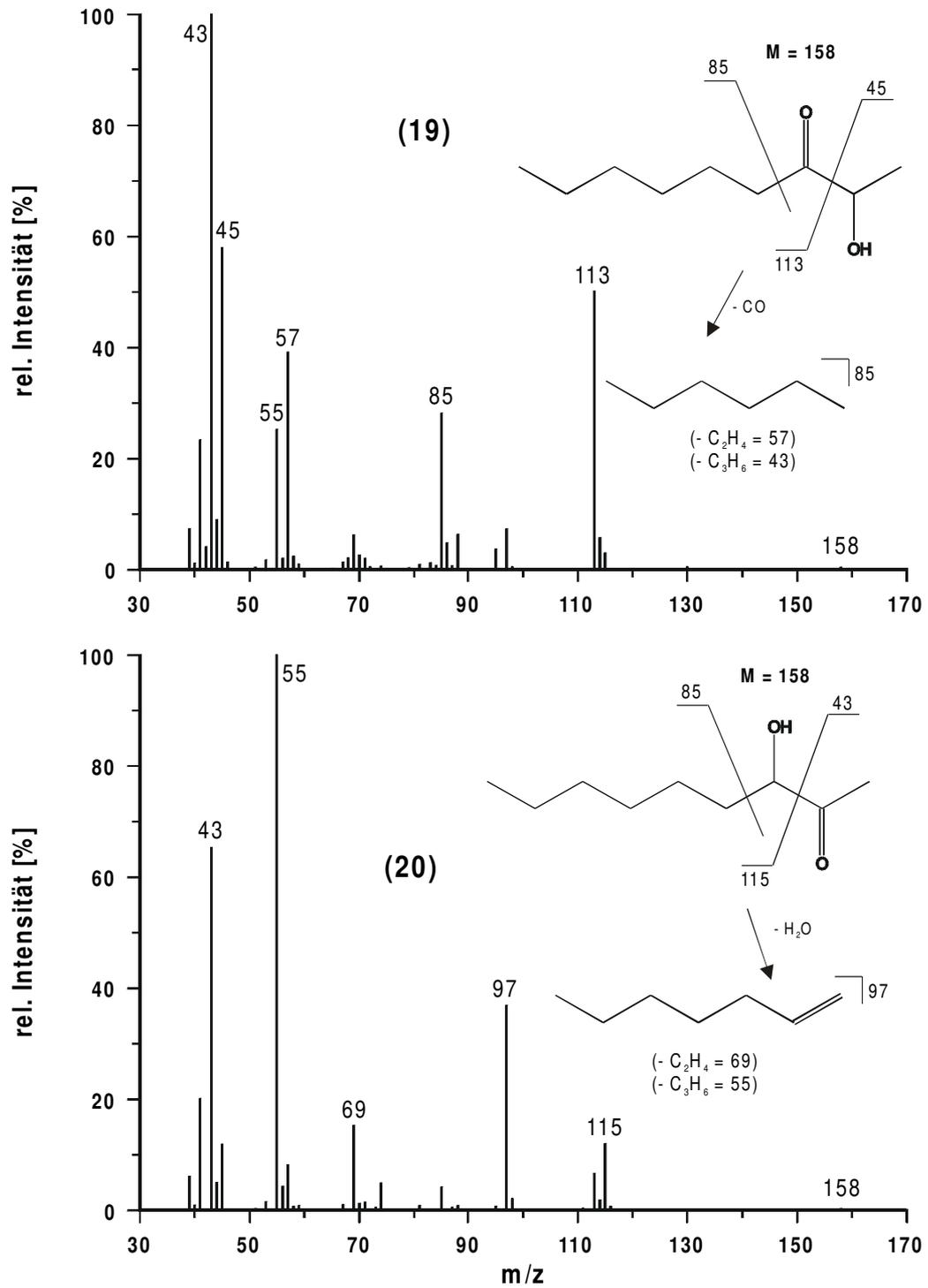


Abb 2-35 Massenspektren von 2-Hydroxy-3-nonanon **(19)** und 3-Hydroxy-2-nonanon **(20)**

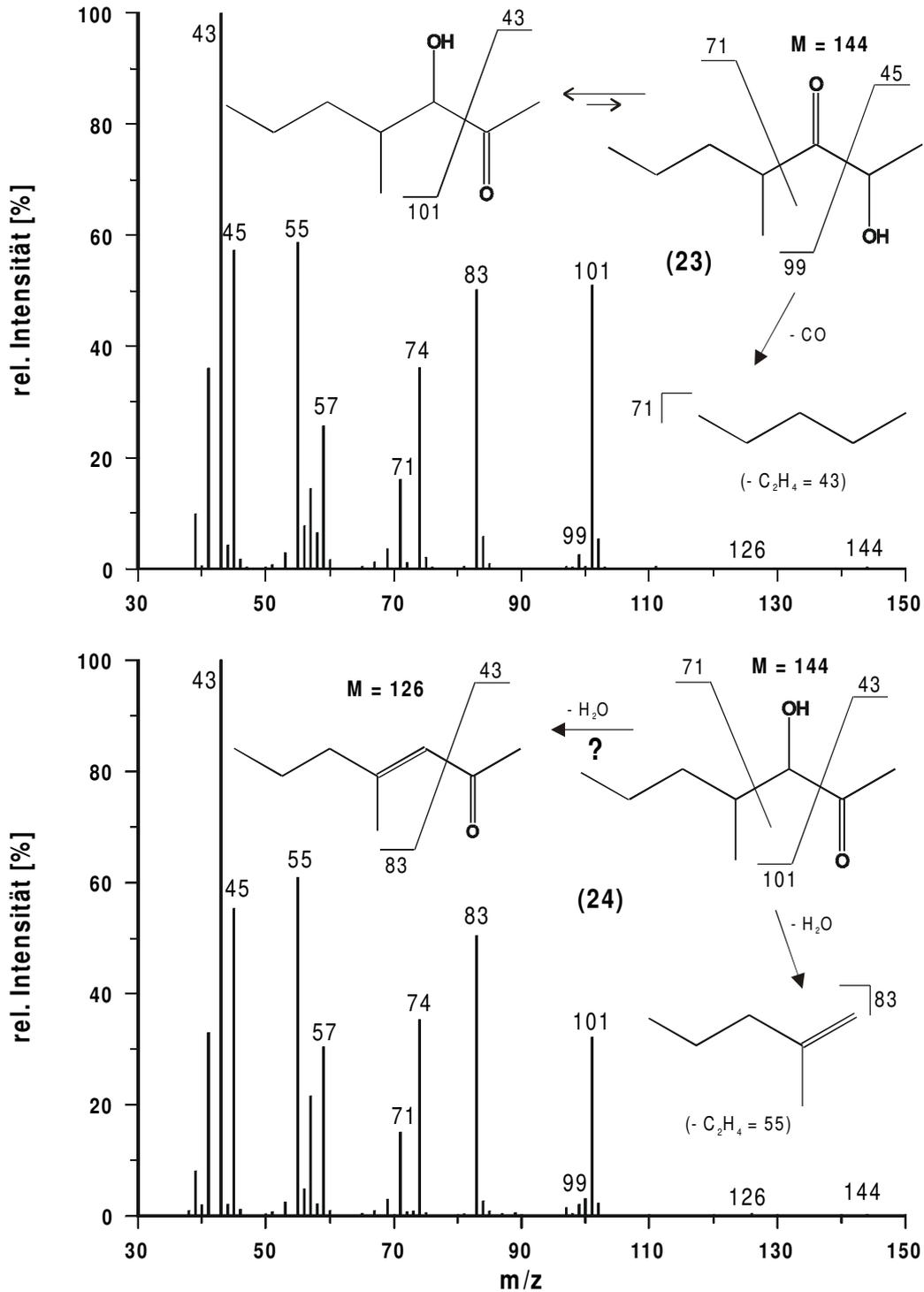


Abb 2-36 Massenspektren von 2-Hydroxy-4-methyl-3-heptanon **(23)** und 3-Hydroxy-4-methyl-2-heptanon **(24)**

Aus 2*E*-Butenal und Pyruvat wurden die Acyloine 2-Hydroxy-4*E*-hexen-3-on **(25)** und 3-Hydroxy-4*E*-hexen-2-on **(26)** (Hauptprodukt) gebildet. Die Massenspektren unterscheiden

sich von denen der gesättigten Analoga (**13**) und (**14**) (siehe Anhang) nicht im Fragmentierungsschema, aber in der Intensität der einzelnen Bruchstücke (Abb 2-37).

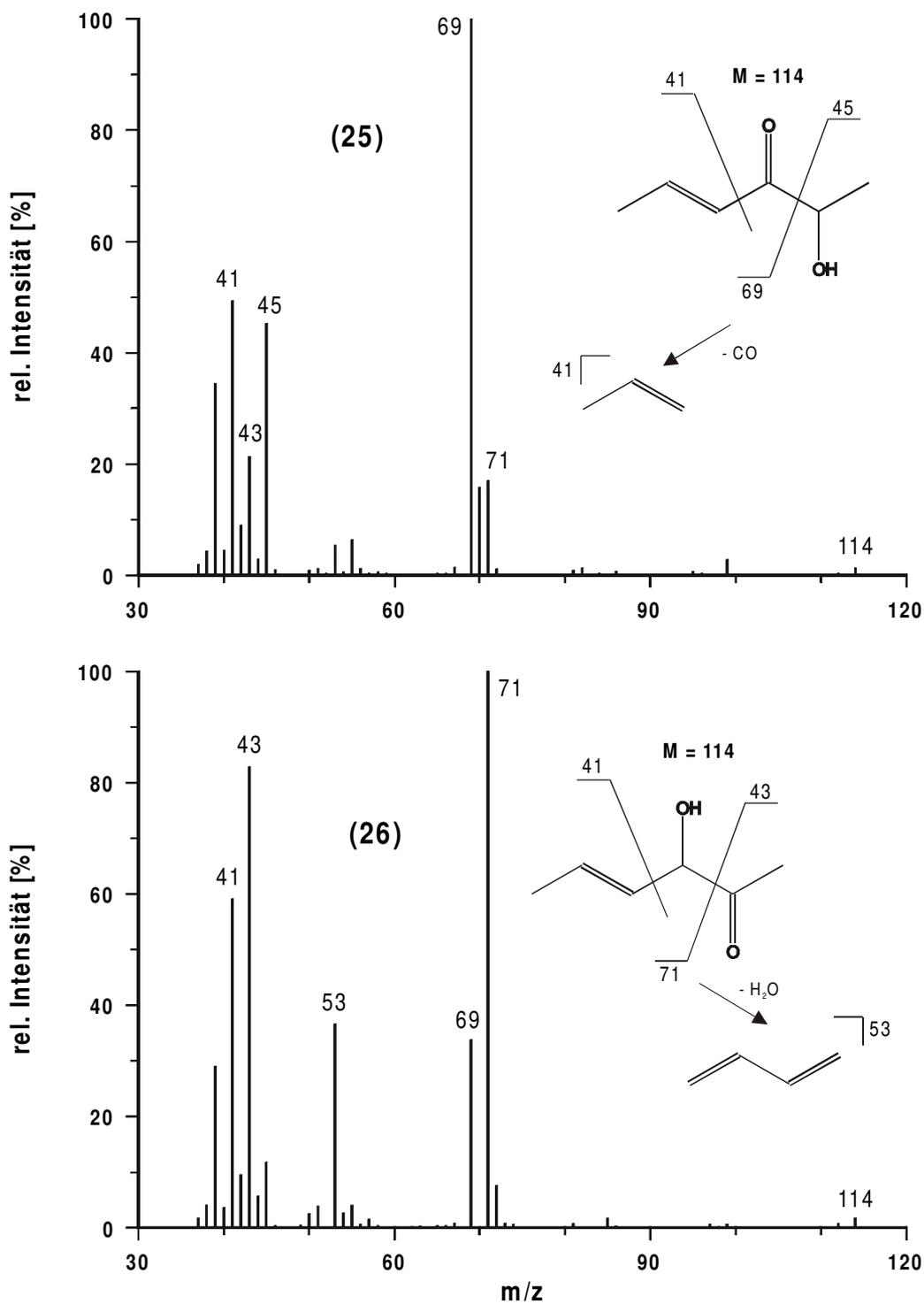


Abb 2-37 Massenspektren von 2-Hydroxy-4E-hexen-3-on (**25**) und 3-Hydroxy-4E-hexen-2-on (**26**)

Die  $\alpha$ -Spaltungsprodukte  $m/z = 69$  bzw.  $m/z = 71$  stellen hier, offensichtlich aufgrund der Resonanzstabilisierung der Ladung durch die Doppelbindung in 4,5-Position, stabile und bevorzugte Endprodukte dar. Auch die Molekülionen  $M^+ \cdot = 114$  weisen im Verhältnis zu den gesättigten Acyloinen eine größere Intensität auf.

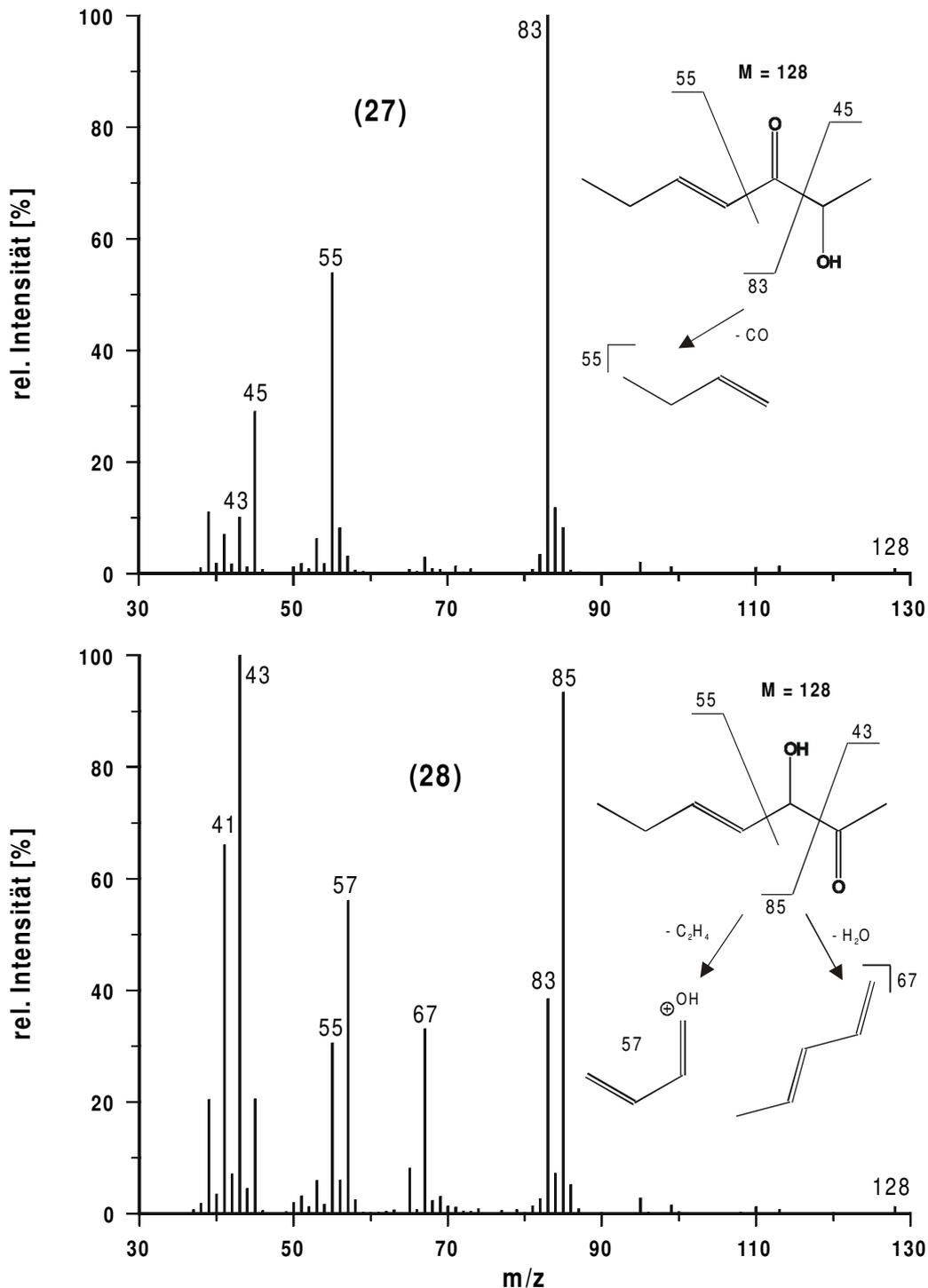


Abb 2-38 Massenspektren von 2-Hydroxy-4E-hepten-3-on (**27**) und 3-Hydroxy-4E-hepten-2-on (**28**)

Aus 2*E*-Pentenal und Pyruvat wurden die Acyloine 2-Hydroxy-4*E*-hepten-3-on (**27**) und 3-Hydroxy-4*E*-hepten-2-on (**28**) (Hauptprodukt) gebildet. Auch hier weisen im Massenspektrum die primären Produkte der  $\alpha$ -Spaltung  $m/z = 83$  bzw.  $m/z = 85$  höhere Intensitäten im Vergleich zu den gesättigten Verbindungen (**15**) und (**16**) (siehe Anhang) auf (Abb 2-38). Ein weiterer Zerfall des Fragments  $m/z = 85$  führt unter Abspaltung einer Ethen-Einheit zu  $m/z = 57$  ( $C_3H_5O^+$ ), welches typischerweise auch in den Spektren ungesättigter Alkohole auftritt [48].

Aus 2*E*-Hexenal und Pyruvat entstanden durch enzymatische Transformation mit PDC die Acyloine 2-Hydroxy-4*E*-octen-3-on (**29**) und 3-Hydroxy-4*E*-octen-2-on (**30**) (Hauptprodukt). Ähnlich wie bei den gesättigten C8-Acyloinen (**17**) und (**18**) (siehe Anhang) dominieren im Massenspektrum neben den Produkten der primären  $\alpha$ -Spaltung die Fragmente, die aus dem weiteren Zerfall der Alkylkette resultieren (Abb 2-39). Für Substanz (**30**) ist dies das oben diskutierte Ion mit  $m/z = 57$ , aus Substanz (**29**) entsteht analog das Ion  $C_3H_3O^+$  mit  $m/z = 55$ .

Aus 2-Methyl-2*E*-butenal und Pyruvat wurden die Acyloine 2-Hydroxy-4-methyl-4*E*-hexen-3-on (**31**) und 3-Hydroxy-4-methyl-4*E*-hexen-2-on (**32**) (Hauptprodukt) gebildet. Im Gegensatz zu den gesättigten Verbindungen (**7**) und (**8**) (siehe Abb 2-32) ist hier wieder die acyloin-typische Fragmentierung zu beobachten (Abb 2-40). Die dort diskutierte Wasserabspaltung kann in diesem Fall aufgrund der C-C-Doppelbindung in 4,5-Position nicht stattfinden. Im Massenspektrum dominieren die Bruchstücke der primären  $\alpha$ -Spaltung und der nachfolgenden Eliminierungsreaktionen.

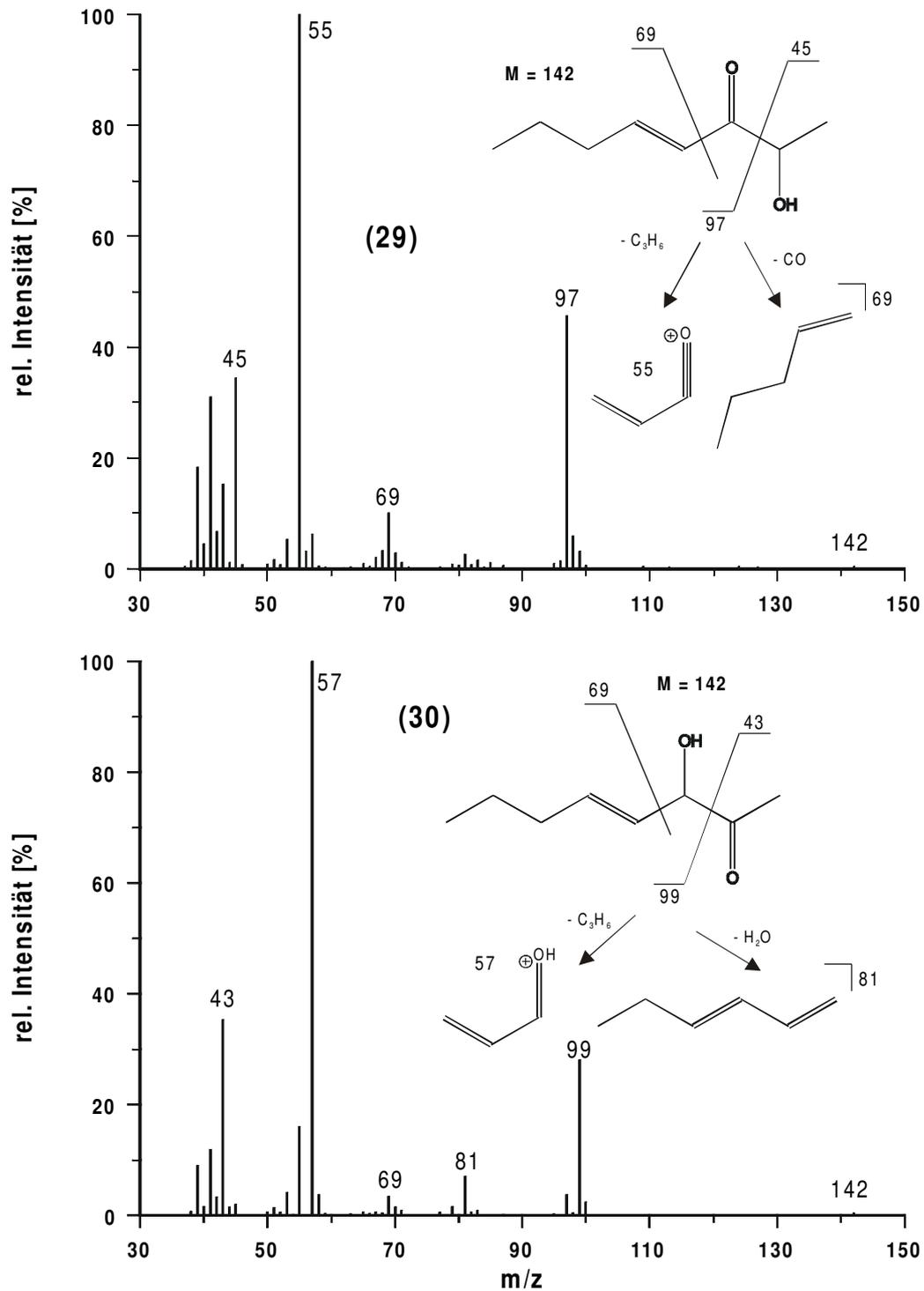


Abb 2-39 Massenspektren von 2-Hydroxy-4E-octen-3-on **(29)** und 3-Hydroxy-4E-octen-2-on **(30)**

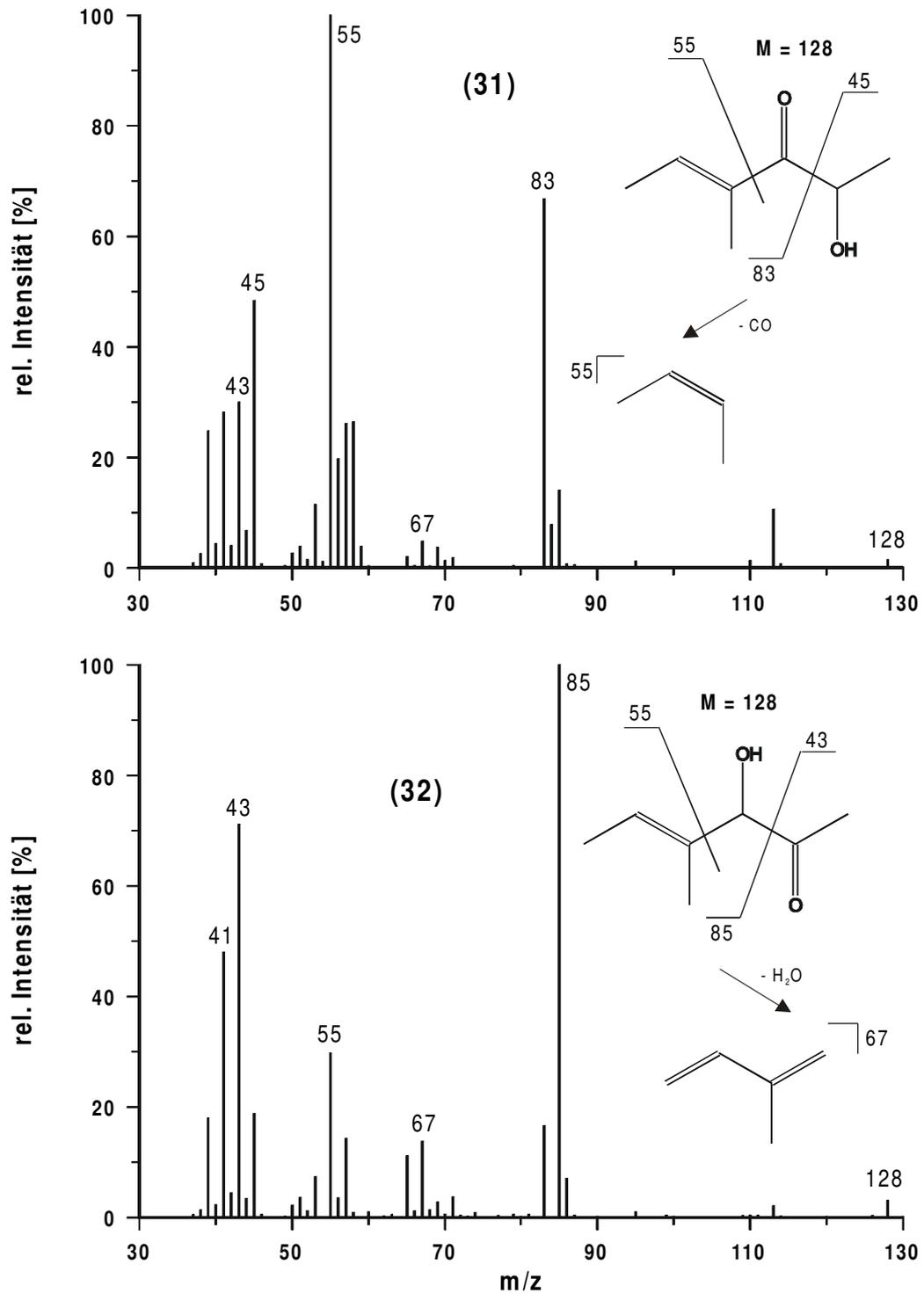


Abb 2-40 Massenspektren von 2-Hydroxy-4-methyl-4E-hexen-3-on **(31)** und 3-Hydroxy-4-methyl-4E-hexen-2-on **(32)**

Aus 3-Methyl-2E-butenal und Pyruvat entstanden durch enzymatische Transformation mit PDC die Acyloine 2-Hydroxy-5-methyl-4E-hexen-3-on **(33)** und 3-Hydroxy-5-methyl-4E-hexen-2-on **(34)** (Hauptprodukt). Die Massenspektren unterscheiden sich von denen der Konstitutionsisomeren **(31)** und **(32)** (siehe Abb 2-40) nur wenig in den durch Stabilitäts-

differenzen bedingten Intensitäten der massengleichen Fragmente (Abb 2-41). Etwas größer sind die Unterschiede zu den gesättigten Analoga **(5)** und **(6)** (siehe Abb 2-31), deren primäre  $\alpha$ -Spaltprodukte aufgrund des fehlenden Mesomerie-Effektes der Doppelbindung stärker einem weiteren Zerfall unterliegen.

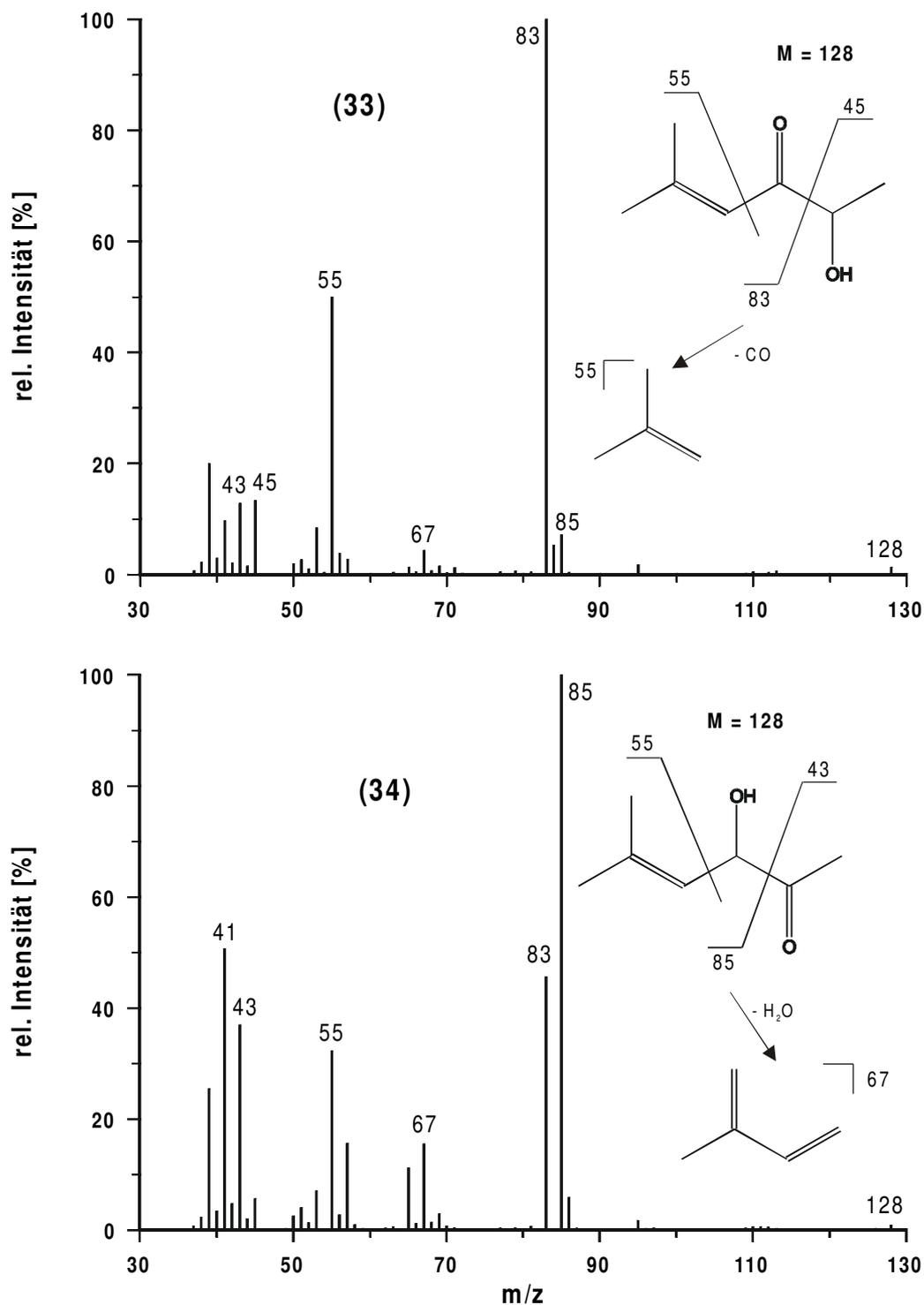


Abb 2-41 Massenspektren von 2-Hydroxy-5-methyl-4E-hexen-3-on **(33)** und 3-Hydroxy-5-methyl-4E-hexen-2-on **(34)**

Aus Benzaldehyd und 2-Oxobutansäure wurden die Acyloine 1-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (**37**) (Hauptprodukt) und 2-Hydroxy-1-phenyl-1-butanon (**38**) gebildet.

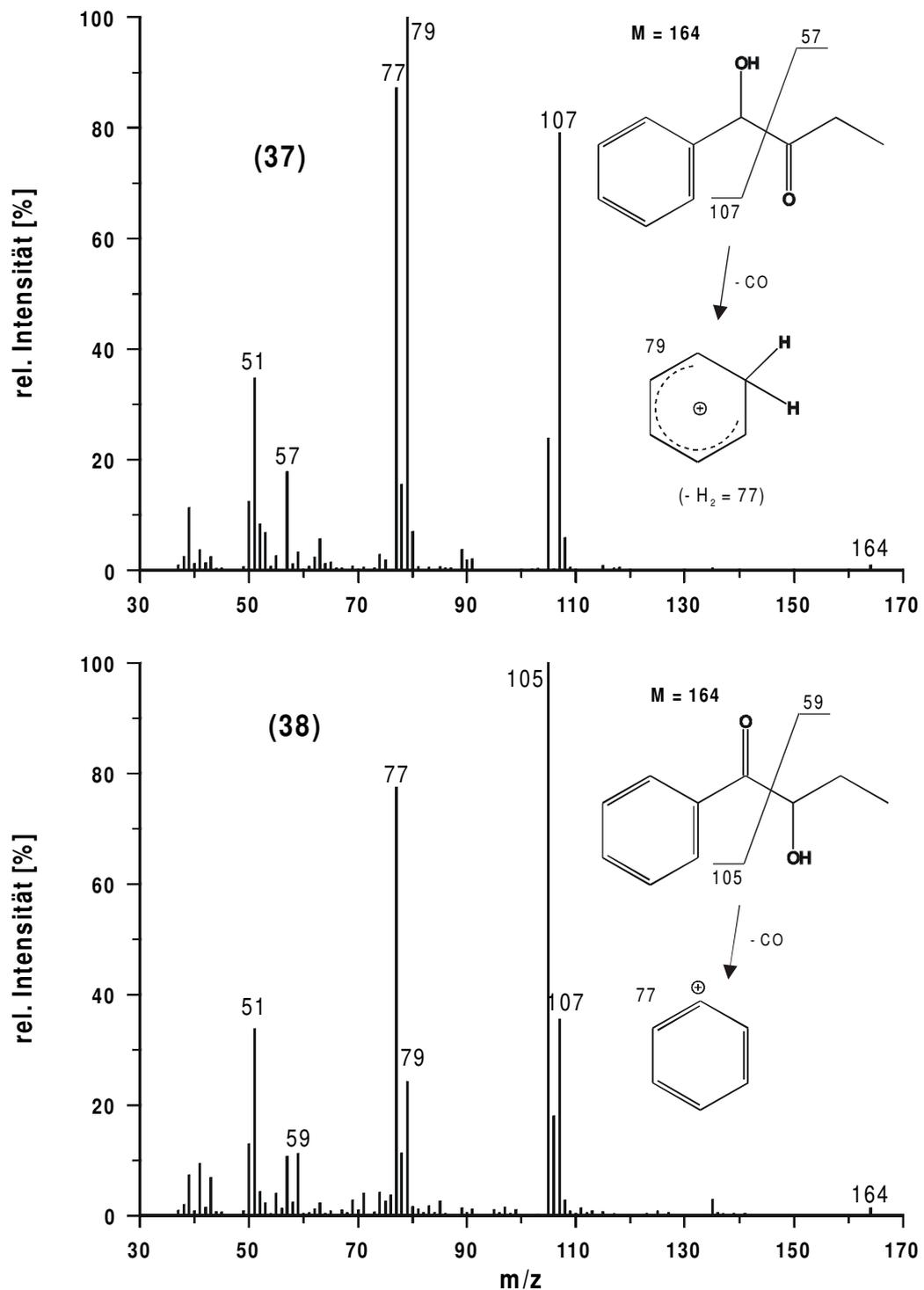


Abb 2-42 Massenspektren von 1-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (**37**) und 2-Hydroxy-1-phenyl-1-butanon (**38**)

Die Massenspektren ähneln sehr stark denen der um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe verkürzten Verbindungen (**35**) und (**36**) (siehe Anhang); einziger Unterschied ist die dementsprechend um 14 höhere Masse der  $\alpha$ -Spaltprodukte  $m/z = 57$  statt 43 und  $m/z = 59$  statt 45 (Abb 2-42). Dagegen unterscheidet sich die Fragmentierung von (**37**) und (**38**) deutlich von der der Konstitutionsisomeren (**1**) und (**2**) (siehe Anhang).

## 2.4 Quantitative Untersuchungen zur Acyloinbildung mit isolierter PDC

### 2.4.1 Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert

Anhand des Beispiels der Acetoinbildung aus Pyruvat und Acetaldehyd wurde untersucht, welche Reaktionsbedingungen sich am günstigsten auf die enzymatische Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen mit isolierter PDC aus *Z. bisporus* auswirken (4.8.2.2). Die Auswahl der Versuchsbedingungen orientierte sich bezüglich pH-Wert und Temperatur (neben experimentellen Gegebenheiten) an den optimalen Enzymaktivitäten bzw. -stabilitäten der PDC, die für die Decarboxylierungsreaktion bestimmt worden waren (vgl. 2.2.4).

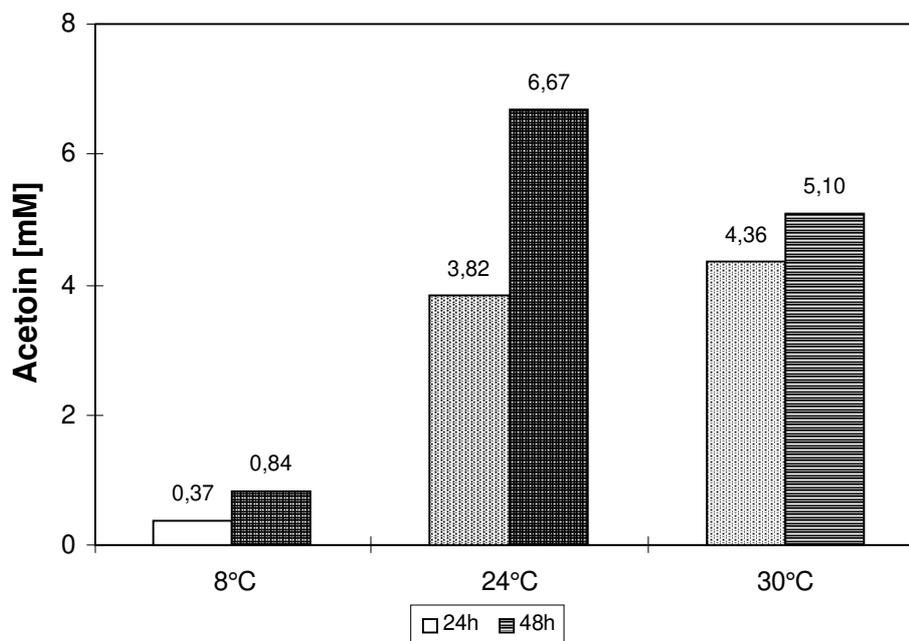


Abb 2-43 Acetoinbildung aus Pyruvat und Acetaldehyd ( $c_0$  jeweils 118 mM) mit PDC in Abhängigkeit von der Temperatur

Innerhalb des Meßzeitraumes (24 und 48 h) wurde die höchste Acetoinbildung nach 48 h bei einer Temperatur von 24 °C erzielt (Abb 2-43). Die bessere Stabilität der PDC bei tiefen Temperaturen wirkte sich aufgrund der niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit nicht positiv aus. Dagegen überwiegt bei 30 °C der thermisch bedingte Aktivitätsverlust des Enzyms die hohe Decarboxylierungs-Aktivität. Möglicherweise ist die niedrigere Ausbeute hier auch auf Verluste an Acetaldehyd aufgrund dessen hoher Flüchtigkeit zurückzuführen.

Als günstigster pH-Wert für die Acetoinbildung erwies sich pH 6,0 (Abb 2-44). Auch in diesem Versuch konnte in den zweiten 24 h eine deutliche Produktzunahme beobachtet werden. Da bei den folgenden quantitativen Untersuchungen auch Substrate eingesetzt werden sollten, deren sehr geringer Umsatz aus Vorversuchen bekannt war, wurde aus praktischen Gründen diese längere Transformationszeit neben 24 °C und pH 6,0 als Standardbedingung für die enzymatische Acyloinbildung gewählt.

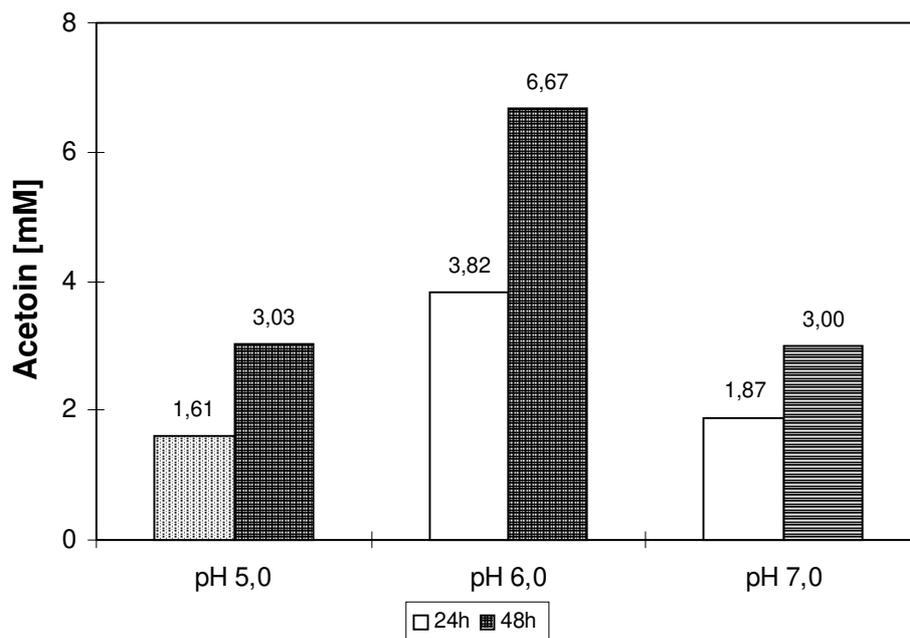


Abb 2-44 Acetoinbildung aus Pyruvat und Acetaldehyd ( $c_0$  jeweils 118 mM) mit PDC in Abhängigkeit vom pH-Wert

## 2.4.2 Kinetik

Der zeitliche Verlauf der Acyloinbildung wurde an dem Beispiel Hexanal + Pyruvat über den für die Inkubationsversuche gewählten Zeitraum von 48 h untersucht (Abb 2-45). Auch hier war über den gesamten Bereich eine Produktzunahme zu beobachten, was auf nur geringe oder fehlende Substratinhibierung hindeutet. Das Verhältnis der beiden Tautomeren zueinander veränderte sich dabei nur leicht, der Anteil an 3-Hydroxy-2-octanon sank von 99,3 % auf 98,7 %.

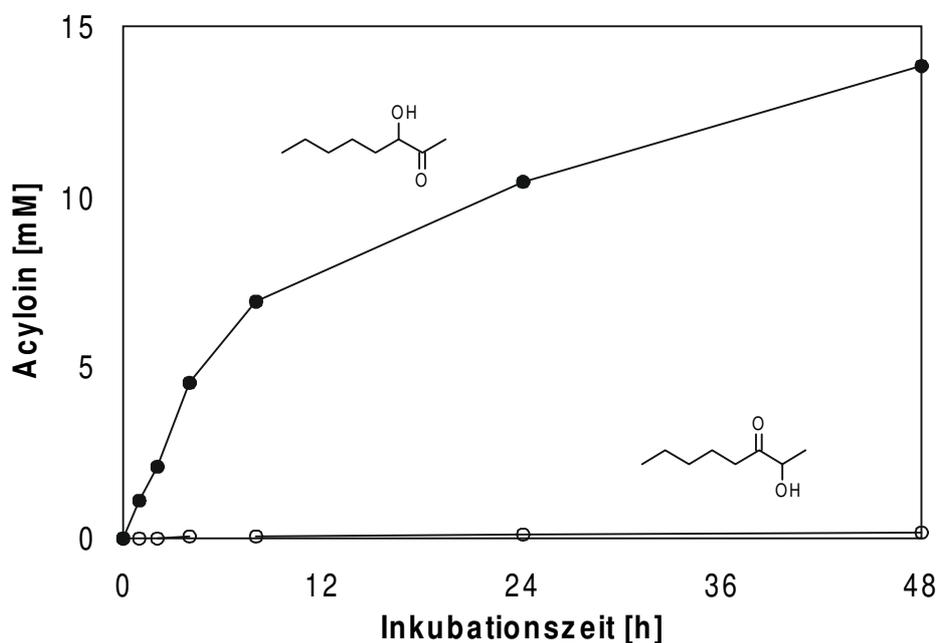


Abb 2-45 Kinetik der enzymatischen Acyloinbildung aus Hexanal und Pyruvat ( $c_0 = 118$  mM, ● 3-Hydroxy-2-octanon, ○ 2-Hydroxy-3-octanon)

## 2.4.3 Abhängigkeit von Art und Konzentration der Substrate

18 Aldehyde und 6 2-Oxosäuren konnten mit isolierter Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* unter Zusatz von Pyruvat bzw. Acetaldehyd zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen umgesetzt werden (siehe Abschnitt 2.3.2). Durch Variation der Substratkonzentration im Bereich von 14 bis 200 mM sollte nun untersucht werden, welche Substrate die quantitativ besten Precursoren darstellen und welchen Einfluß die Konzentration auf die Produktausbeute hat. Die Versuche konzentrierten sich auf Aldehyde als Substrate, die auch die Mehrzahl der verwendeten Precursoren darstellten.

### 2.4.3.1 Einfluß der Kettenlänge

Zunächst wurde der Einfluß der Kettenlänge des aldehydischen Substrates innerhalb der homologen Reihe Propanal (C<sub>3</sub>) bis Octanal (C<sub>8</sub>) auf die Bildung der entsprechenden Acyloine untersucht. Von C<sub>3</sub> bis C<sub>7</sub> stieg die Acyloinbildung mit zunehmender Kettenlänge an (Abb 2-46, hier und in den folgenden Abbildungen ist jeweils die Summe beider tautomeren Acyloine angegeben). Während bei Heptanal und Octanal noch bis 200 mM Anfangskonzentration zunehmende Produktkonzentrationen beobachtet wurden, nahmen diese bei Pentanal und Hexanal bereits ab 118 mM ab, was auf Substratinhibierung der PDC zurückgeführt werden kann.

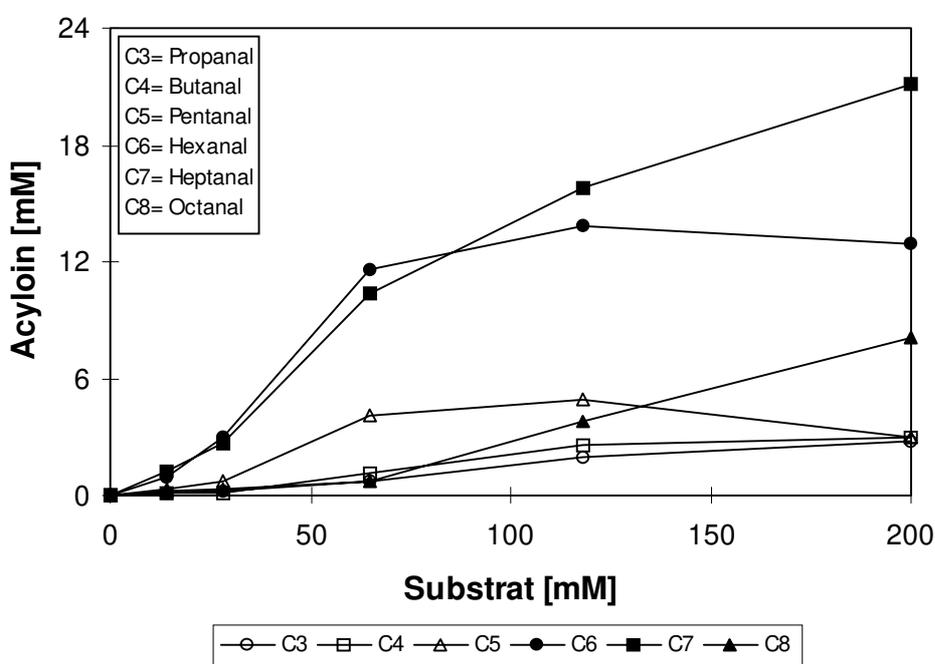


Abb 2-46 Acyloinbildung aus geradkettigen gesättigten Aldehyden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und Kettenlänge

Auch innerhalb der homologen Reihe der *E*- $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aldehyde (von Butenal C<sub>4u</sub> bis Hexenal C<sub>6u</sub>) konnte mit steigender Kettenlänge eine höhere Acyloinausbeute erzielt werden (Abb 2-47). Bei allen Substraten ist ab einer Konzentration von 118 mM eine abnehmende Produktbildung zu beobachten, die vermutlich auf Substratinhibierung der PDC beruht.

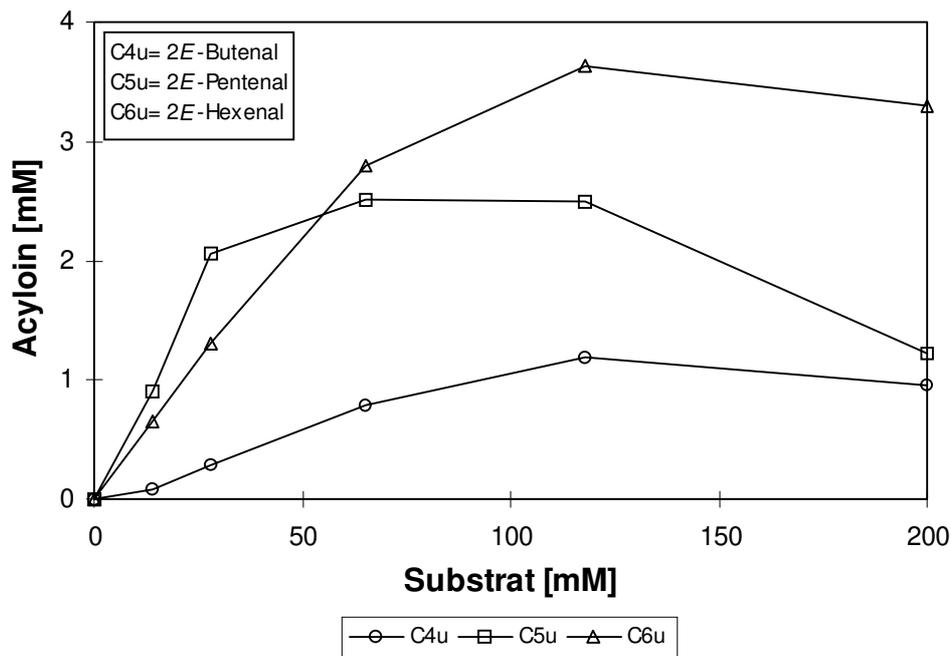


Abb 2-47 Acyloinbildung aus geradkettigen ungesättigten Aldehyden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und Kettenlänge

Ein ähnliches, aber weniger deutliches Ergebnis ergab sich für die Reihe der C2-verzweigten Aldehyde 2-Methylpropanal (C<sub>3v</sub>), 2-Methylbutanal (C<sub>4v</sub>) und 2-Methylpentanal (C<sub>5v</sub>) (Abb 2-48). Die quantitativen Unterschiede der Acyloinbildung in Abhängigkeit von der Kettenlänge waren hier sehr gering und abhängig von der Substratkonzentration.

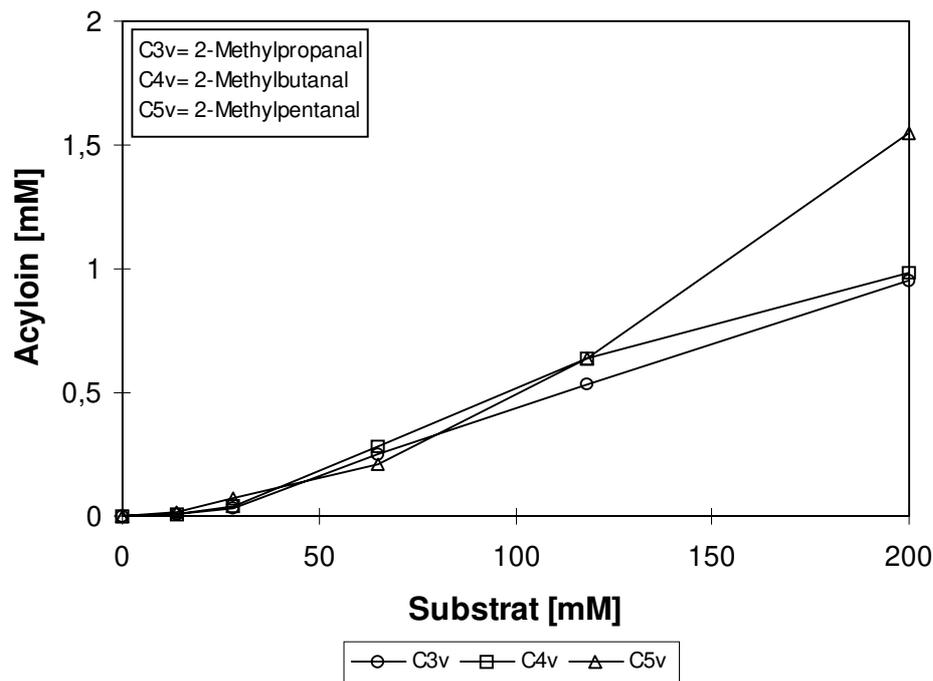


Abb 2-48 Acyloinbildung aus verzweigten gesättigten Aldehyden in Abhängigkeit von Substratkonzentration und Kettenlänge

#### 2.4.3.2 Einfluß des Sättigungsgrades

Der Einfluß des Sättigungsgrades der Aldehyd-Substrate der Kettenlänge  $C_4$  bis  $C_6$  auf die Acyloinbildung wurde durch Vergleich der jeweiligen Produktkonzentration untersucht und ist hier exemplarisch für eine Substratkonzentration von  $c_0 = 118$  mM aufgetragen (Abb 2-49). Die Transformation der gesättigten Substrate führte jeweils zu höheren Produktkonzentrationen als die der ungesättigten Analoga gleicher Kettenlänge. Für Butanal / Butenal und Pentanal / Pentenal lag der Faktor in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei 2 bis 3, für Hexanal / Hexenal sogar zwischen 4 und 10.

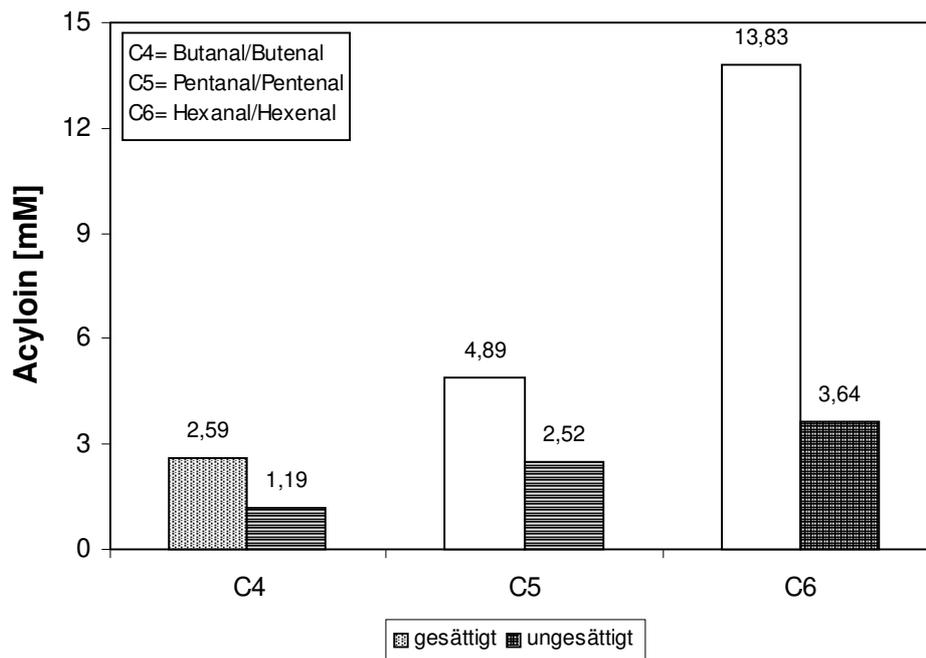


Abb 2-49 Acyloinbildung aus geradkettigen Aldehyden in Abhängigkeit von Sättigungsgrad und Kettenlänge ( $c_0 = 118 \text{ mM}$ )

#### 2.4.3.3 Einfluß der Kettenverzweigung

Eine Methyl-Verzweigung der Aldehyde in C2-Position führte innerhalb der homologen Reihe  $C_3$  bis  $C_5$  gegenüber den unverzweigten Substraten zu deutlich geringeren Acyloin-Ausbeuten. Auch hier wurden die Werte beispielhaft für eine Substratkonzentration von  $c_0 = 118 \text{ mM}$  verglichen (Abb 2-50). Je nach Substratkonzentration variierte der Faktor der Verhältnisse unverzweigt / verzweigt zwischen 3 und 6 ( $C_3$ ), 3 und 5 ( $C_4$ ) sowie 2 und 10 ( $C_5$ ).

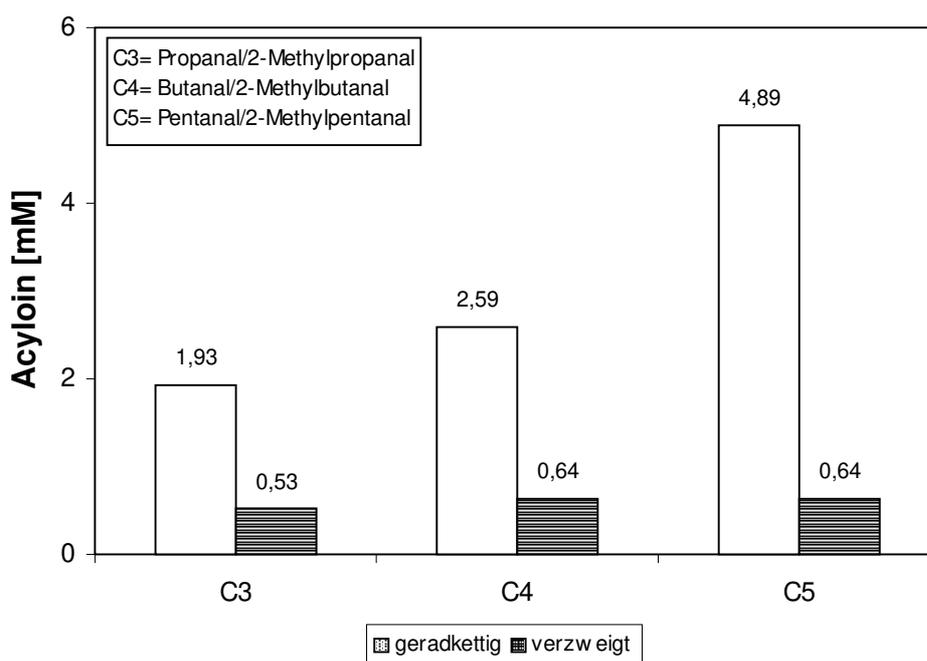


Abb 2-50 Acyloinbildung aus gesättigten Aldehyden in Abhängigkeit von Kettenlänge und -verzweigung ( $c_o = 118 \text{ mM}$ )

Die Position der Methyl-Verzweigung spielte dabei offensichtlich keine entscheidende Rolle. Während 2-Methylbutanal ( $C_{4/2v}$ ) etwas besser umgesetzt wurde als 3-Methylbutanal ( $C_{4/3v}$ ), war bei den ungesättigten Analoga 2-Methylbutenal ( $C_{4u/2v}$ ) und 3-Methylbutenal ( $C_{4u/3v}$ ) das Gegenteil der Fall (Abb 2-51).

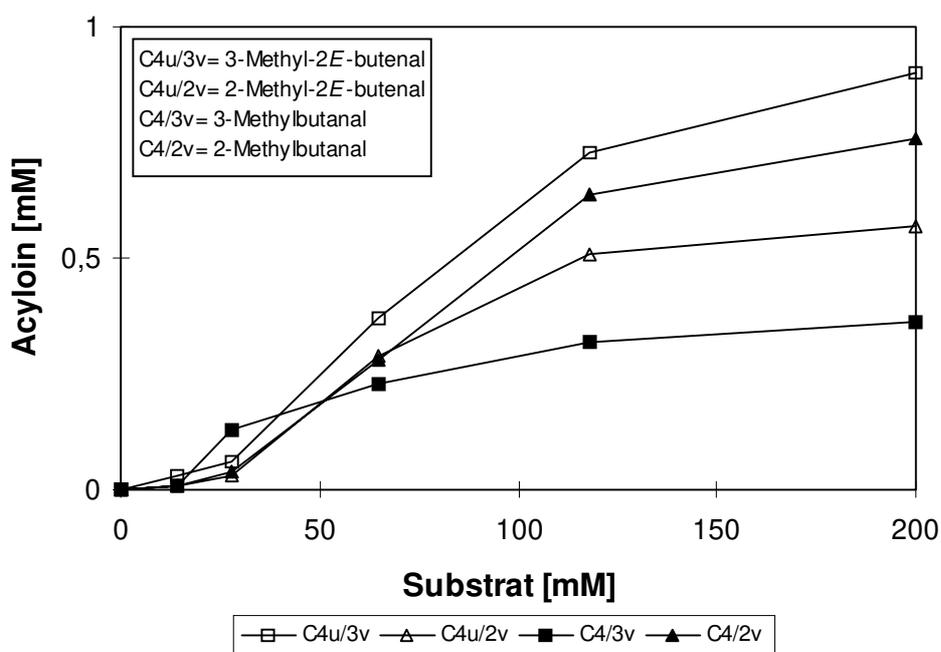


Abb 2-51 Acyloinbildung aus Aldehyden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration sowie Sättigungsgrad und Kettenverzweigung

#### 2.4.3.4 Aromatische Substrate

Untersucht wurde der Umsatz von Benzaldehyd (Ba) und Phenylacetaldehyd (Pa), wobei ersteres im Vergleich etwa die 10-fache Menge an Acyloin ergab (Abb 2-52).

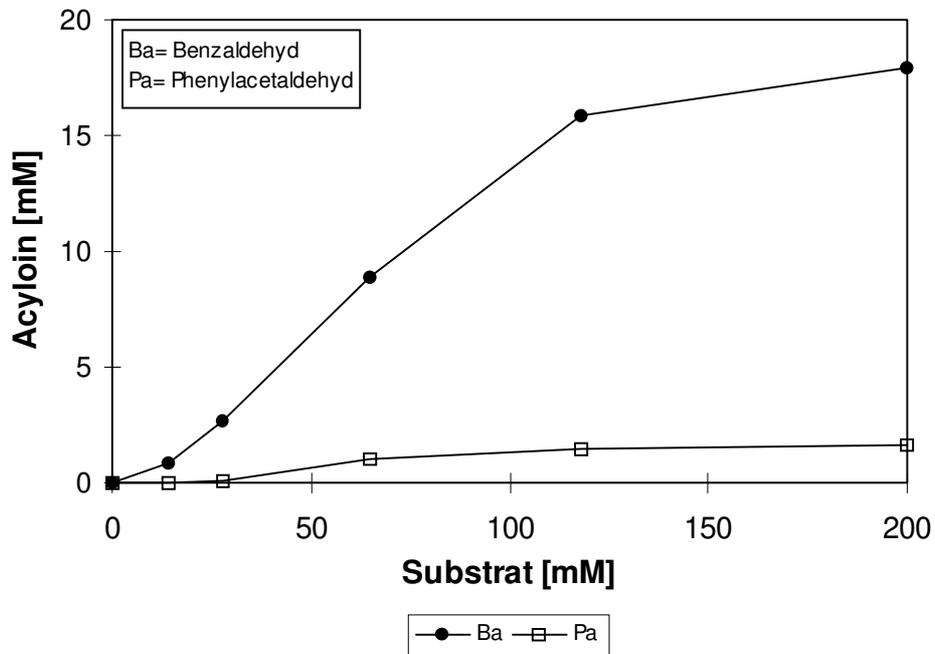


Abb 2-52 Acyloinbildung aus aromatischen Aldehyden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

#### 2.4.3.5 Pyruvatkonzentration

Anhand des Beispiels Hexanal, das sich als gutes Substrat für die Acyloinbildung erwiesen hatte, wurde der Einfluß der Pyruvatkonzentration bzw. des Aldehyd / Pyruvat-Konzentrationsverhältnisses im Bereich von 10:1 bis 1:10 untersucht. Die größten Produktausbeuten ergaben sich bei einem stöchiometrischen Überschuß an Pyruvat (Abb 2-53).

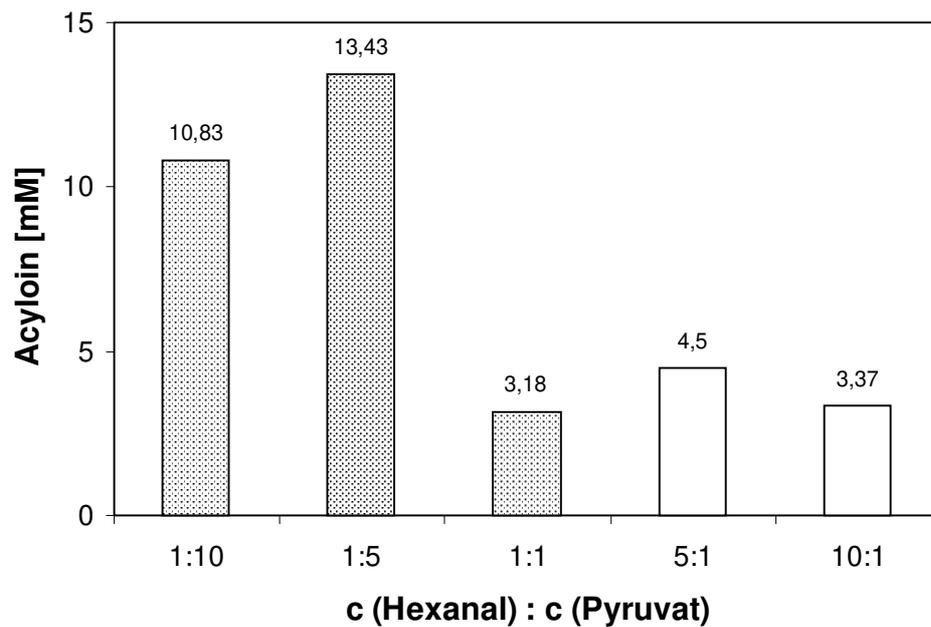


Abb 2-53 Acyloinbildung aus Hexanal und Pyruvat in Abhängigkeit vom Verhältnis der Substratkonzentrationen (1 = 28 mM)

Versuche, in denen Pyruvat gegen Acetaldehyd ausgetauscht wurde, ergaben deutlich niedrigere Produktausbeuten (ca. 1/20 der mit Pyruvat erzielten Mengen).

#### 2.4.3.6 Zusammenfassung

Aufgrund verschiedener Substratparameter, wie Löslichkeit, Inhibierungspotential und Sättigungskonzentration, ist es schwierig, den quantitativen Umsatz aller Substrate in der enzymatischen Acyloinbildung mit Pyruvatdecarboxylase miteinander ins Verhältnis zu setzen. Am vergleichbarsten erscheint es, die besten erzielten prozentualen Ausbeuten (bezogen auf die jeweilige Substratkonzentration) anzugeben. Zusätzlich sind in Tab 2-8 und Tab 2-9 die höchsten erreichten Gesamtmengen an Acyloin aufgeführt.

Tab 2-8 Acyloinausbeute der enzymatischen Transformation von Aldehyden und Pyruvat ( $c_0$  jeweils identisch) mit Pyruvatdecarboxylase

<b>Substrat</b>	<b>Beste erzielte Acyloinausbeute [%] (bei: <math>c_0</math> in mM)</b>	<b>Höchste erzielte Acyloinmenge [mg L<sup>-1</sup>] (bei: <math>c_0</math> in mM)</b>
Propanal	1,64 (118)	279 (200)
Butanal	2,19 (118)	341 (200)
Pentanal	6,34 (65)	636 (118)
<b>Hexanal</b>	<b>17,80</b> (65)	<b>1992</b> (118)
	<b>53,72</b> (28+140 Pyr)	1934 (28)
<b>Heptanal</b>	<b>15,94</b> (65)	<b>3337</b> (200)
<b>Octanal</b>	3,22 (118)	<b>1395</b> (200)
2-Methylpropanal	0,45 (118)	114 (200)
2-Methylbutanal	0,54 (118)	99 (200)
3-Methylbutanal	0,35 (118)	47 (200)
2-Methylpentanal	0,54 (118)	223 (200)
2 <i>E</i> -Butenal	1,20 (65)	136 (118)
2 <i>E</i> -Pentenal	7,36 (28)	321 (65)
2 <i>E</i> -Hexenal	4,68 (28)	517 (118)
2-Methyl-2 <i>E</i> -Butenal	0,45 (118)	73 (200)
3-Methyl-2 <i>E</i> -Butenal	0,62 (118)	115 (200)
Methional	0,31 (65)	62 (200)
<b>Benzaldehyd</b>	<b>13,66</b> (65)	<b>2693</b> (200)
(+ 2-Oxbut)	2,85 (118)	551 (118)
Phenylacetaldehyd	1,65 (65)	266 (200)

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bevorzugt langkettige Aldehyde zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen umgesetzt wurden. Die Einführung einer ungesättigten Funktionalität brachte bei gleicher Kettenlänge eine deutlich verminderte Produktausbeute mit sich. Noch stärker sank die gebildete Acyloinmenge, wenn im Aldehydmolekül eine Kettenverzweigung vorhanden war, während die Position der Methyl-Seitenkette keinen entscheidenden Einfluß ausübte. Eine erhebliche Verbesserung der Ausbeute konnte erreicht werden, indem Pyruvat nicht in stöchiometrischer, sondern 5-fach höherer Menge eingesetzt wurde (53,7 % statt 17,8 % für Hexanal).

Sehr schlechte Umsatzraten (max. 0,31 %) wurden beim Einsatz von Methional, dem einzigen verwendeten Aldehyd mit einem zusätzlichen Heteroatom, beobachtet.

Große Unterschiede zeigten sich in der enzymatischen Transformation der beiden aromatischen Substrate. Während aus Benzaldehyd bis zu  $2,7 \text{ g L}^{-1}$  Acyloin gebildet wurden, lag die Produktausbeute bei Phenylacetaldehyd um etwa eine Größenordnung niedriger.

Verglichen mit den analogen Aldehyden, wurden aus den getesteten 2-Oxosäuren in allen Fällen geringere Mengen an Acyloin produziert. Effektivster Precursor war die Phenylglyoxylsäure, deren inhibierende Wirkung allerdings oberhalb einer Substratkonzentration von 100 mM zur Einstellung der Produktbildung führte (Tab 2-9). 2-Oxobutansäure wurde besser umgesetzt, wenn Benzaldehyd anstelle von Acetaldehyd als Cosubstrat diente.

Tab 2-9 Acyloinausbeute der enzymatischen Transformation von 2-Oxosäuren und Acetaldehyd ( $c_0$  jeweils identisch) mit Pyruvatdecarboxylase

<b>Substrat</b>	<b>Beste erzielte Acyloinausbeute [%] (bei: <math>c_0</math> in mM)</b>	<b>Höchste erzielte Acyloinmenge [<math>\text{mg L}^{-1}</math>] (bei: <math>c_0</math> in mM)</b>
<b>2-Oxobutansäure</b>	<b>1,24</b> (118)	<b>149</b> (118)
(+ Benzaldehyd)	<b>2,85</b> (118)	<b>551</b> (118)
2-Oxo-3-methylbutansäure	0,10 (118)	14 (118)
2-Oxo-3-methylpentansäure	0,26 (118)	40 (118)
2-Oxo-4-methylpentansäure	0,28 (118)	43 (118)
<b>Phenylglyoxylsäure</b>	<b>4,50</b> (28)	<b>189</b> (28)
Phenylpyruvat	0,18 (28)	8,0 (28)

#### 2.4.4 Isomerenverhältnis

Wie bereits erwähnt, wurden bei den Umsetzungen mit Pyruvatdecarboxylase aus den 2-Oxosäuren und Acetaldehyd bevorzugt 2-Hydroxy-3-oxo-acyloine sowie aus den Aldehyden und Pyruvat 3-Hydroxy-2-oxo-acyloine gebildet. Immer lag jedoch auch das entsprechende Tautomer vor, wobei dessen Mengenanteil von der Art und Konzentration des Substrates abhängig war. Charakteristische Beispiele sind in Tab 2-10 aufgeführt.

Tab 2-10 Isomerenverhältnisse gebildeter Acyloine

<b>Substrat</b>	<b>Konzentration [mM]</b>	<b>Anteil des überwiegenden tautomeren Acyloins [%]</b>
2-Oxobutansäure	14	77,1
	200	93,6
Propanal	14	54,4
	200	90,1
Butanal	14	82,4
	200	97,4
Hexanal	14	95,6
	200	99,2
Octanal	14	83,3
	200	94,8
Phenylglyoxylsäure	14	97,5
	28	97,2
Benzaldehyd	14	97,8
	200	99,3
Phenylpyruvat	14	65,2
	118	67,6
Phenylacetaldehyd	14	84,1
	118	91,2
3-Methylbutanal	14	55,2
	200	93,4
2 <i>E</i> -Butenal	14	86,3
	200	88,1
2 <i>E</i> -Hexenal	14	97,9
	200	97,3

Als Trend ließ sich erkennen, daß vor allem bei schlechten Acyloin-Precursoren wie Propanal oder 3-Methylbutanal große konzentrationsabhängige Unterschiede in den Tautomerenverhältnissen vorlagen, d.h. mit zunehmender Substratkonzentration stieg der Anteil des hauptsächlich entstandenen Produkts an. Bei sehr effektiven Precursoren wie Hexanal oder Benzaldehyd waren dagegen kaum Unterschiede im Verhältnis der Isome-

ren zu beobachten. Nur sehr kleine Abweichungen lagen auch bei den ungesättigten Aldehyden sowie Phenylglyoxylsäure und Phenylpyruvat als Substrat vor.

#### 2.4.5 Vergleich der Bildung aromatischer Acyloine mittels isolierter PDC und einem Gesamtprotein-Extrakt

Der sehr guten Umsetzung der aromatischen Substrate Phenylalanin, Phenylpyruvat, Tyrosin und 4-Hydroxyphenylpyruvat mit fermentierenden Zellen von *Z. bisporus* standen geringe Produktausbeuten bei der Transformation mit isolierter PDC gegenüber. Um die hypothetische Anwesenheit weiterer Decarboxylasen (eventuell mit ausgeprägter Substratspezifität gegenüber aromatischen Substraten) zu überprüfen, wurden vergleichende Inkubationsversuche mit isolierter PDC und einem zellfreien Gesamtprotein-Extrakt durchgeführt (Abb 2-54). Die Menge an PDC (gemessen als Pyruvat-decarboxylierende Aktivität) war dabei in beiden Ansätzen identisch.

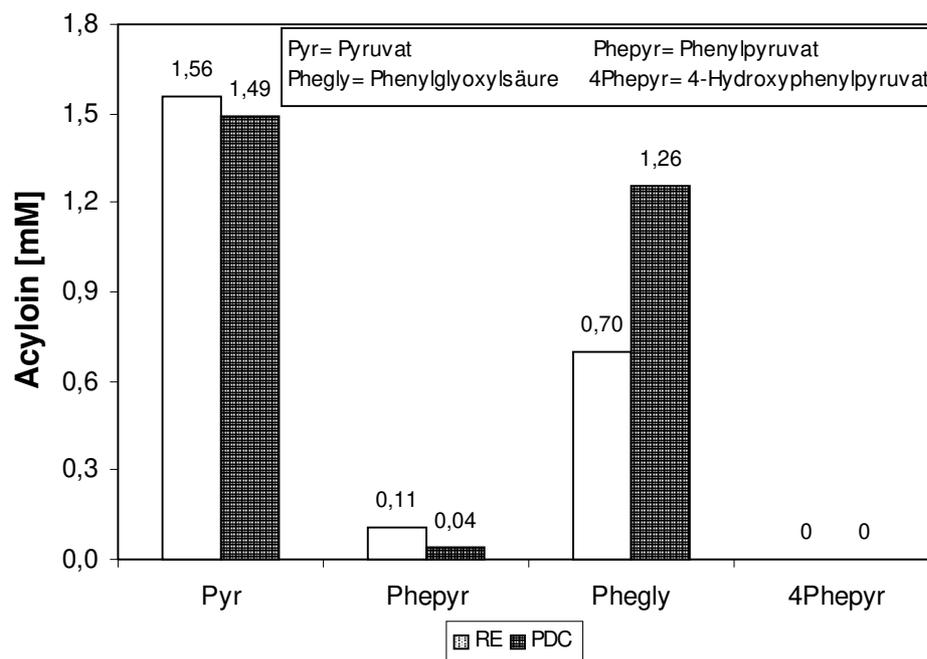


Abb 2-54 Acyloinbildung aus 2-Oxosäuren (+ Acetaldehyd,  $c_0$  jeweils 28 mM) mit isolierter PDC (PDC) und einem Gesamt-Rohextrakt (RE) (jeweils 5 U PDC)

Aus Pyruvat und Acetaldehyd wurde in beiden Ansätzen etwa die gleiche Menge Acetoin gebildet. Der Anwesenheit weiterer Pyruvat-verbrauchender Enzyme im Rohextrakt steht

hier wahrscheinlich der zusätzliche Umsatz eines Anteils vormals intrazellulären Pyruvats gegenüber. Aus Phenylglyoxylsäure wurde mit isolierter PDC deutlich mehr Acyloin als im Rohextrakt gebildet, was auf fehlende Konkurrenzreaktionen (z.B. ADH-Reduktion) zurückgeführt werden kann. Dagegen entstand aus Phenylpyruvat mit dem Gesamtprotein-Extrakt mehr als die doppelte Menge an Acyloin, verglichen mit dem Enzymisolat.

## 2.5 Charakterisierung der gebildeten $\alpha$ -Hydroxyketone

### 2.5.1 Stereochemie

In vorausgegangenen Arbeiten [18] wurde ein Enantiomerenüberschuß des aus Kulturen von *Zygosaccharomyces bisporus* isolierten Acyloins (**1**) (3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon) von 87 % ermittelt. Die noch nicht bekannte absolute Konfiguration des enzymatischen Transformationsproduktes sollte nun durch die Synthese optisch reiner Referenzsubstanzen bestimmt werden. Die stereochemischen Untersuchungen wurden darüber hinaus auf weitere  $\alpha$ -Hydroxyketone ausgedehnt.

Optisch aktive Acyloine wurden aus chiralen  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäureestern durch Amidierung mit Ammoniakgas und anschließender Grignard-Umsetzung der Amide hergestellt [49, 50]. Die Reaktion verläuft unter Konfigurationserhalt am chiralen Zentrum. Waren die entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäureester nicht kommerziell erhältlich, wurden die jeweiligen Hydroxysäuren verwendet und zunächst verestert. War nur die 2-Oxosäure verfügbar, wurde diese zuvor mit Natriumborhydrid reduziert (vgl. 4.11).

Die Analytik der Enantiomerenverteilung erfolgte im Unterschied zu [18] nicht anhand der TFA-Ester der  $\alpha$ -Hydroxyketone an einer chiralen GC-Phase, da sich zeigte, daß die Methode auf andere hier untersuchte Beispiele nicht übertragbar war. Die Acyloine wurden deshalb mit (S)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluoromethyl-phenyllessigsäurechlorid ((S)-MTPACl) derivatisiert (4.12). Die diastereomeren Ester konnten auf einer unpolaren Säule gaschromatographisch getrennt werden (4.12.2).

Verbindung **(2)** und **(35)** ließen sich auch underivatisiert an einer chiralen GC-Phase (HYDRODEX<sup>®</sup>  $\beta$ -3 P, Macherey-Nagel) in ihre Enantiomeren trennen. Bei den tautomeren Acyloinen **(1)** und **(36)** war dies jedoch nicht der Fall; zudem coeluierten sie mit je einem Enantiomer von **(2)** bzw. **(35)**.

3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon **(1)** wurde sowohl aus Kulturen von *Z. bisporus* als auch aus Transformationsansätzen mit isolierter PDC extrahiert und mittels semipräparativer HPLC (4.2.3.1) gereinigt. Nach Derivatisierung wurde die Verteilung der MTPA-Ester mit den synthetisierten Referenzen verglichen (Abb 2-55). Acyloin **(1)** lag als natürliches Produkt überwiegend in der (S)-Konfiguration vor. Der Enantiomerenüberschuß betrug 84 % (umgesetzt mit intakten Zellen) bzw. 30 % (umgesetzt mit Pyruvatdecarboxylase).

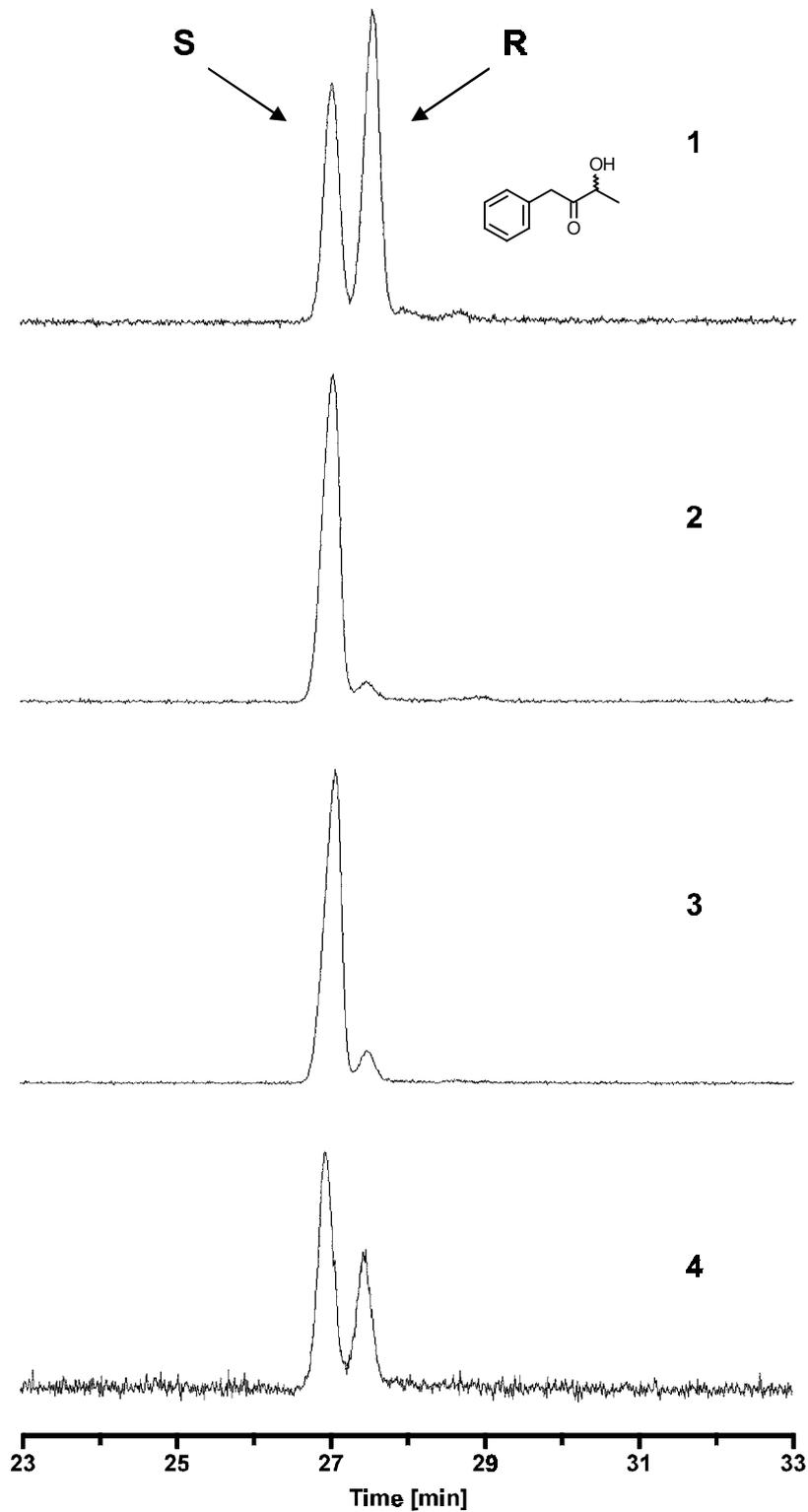


Abb 2-55 MS-Gaschromatogramm der MTPA-Derivate von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon: 1 = synthetisiertes Racemat, 2 = synthetisiertes (S)-Enantiomer, 3 = Produkt der Hefefermentation, 4 = Produkt der enzymatischen Transformation mit isolierter PDC

Die Enantiomerenverteilung von 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (**2**) wurde ausschließlich für das Produkt der enzymatischen Umsetzung untersucht, da bei der Hefefermentation nur sehr geringe Mengen der Substanz gebildet wurden. Das mittels HPLC isolierte Acyloin lag mit einem Enantiomerenüberschuß von 58 % in der (R)-Konfiguration vor (Abb 2-56).

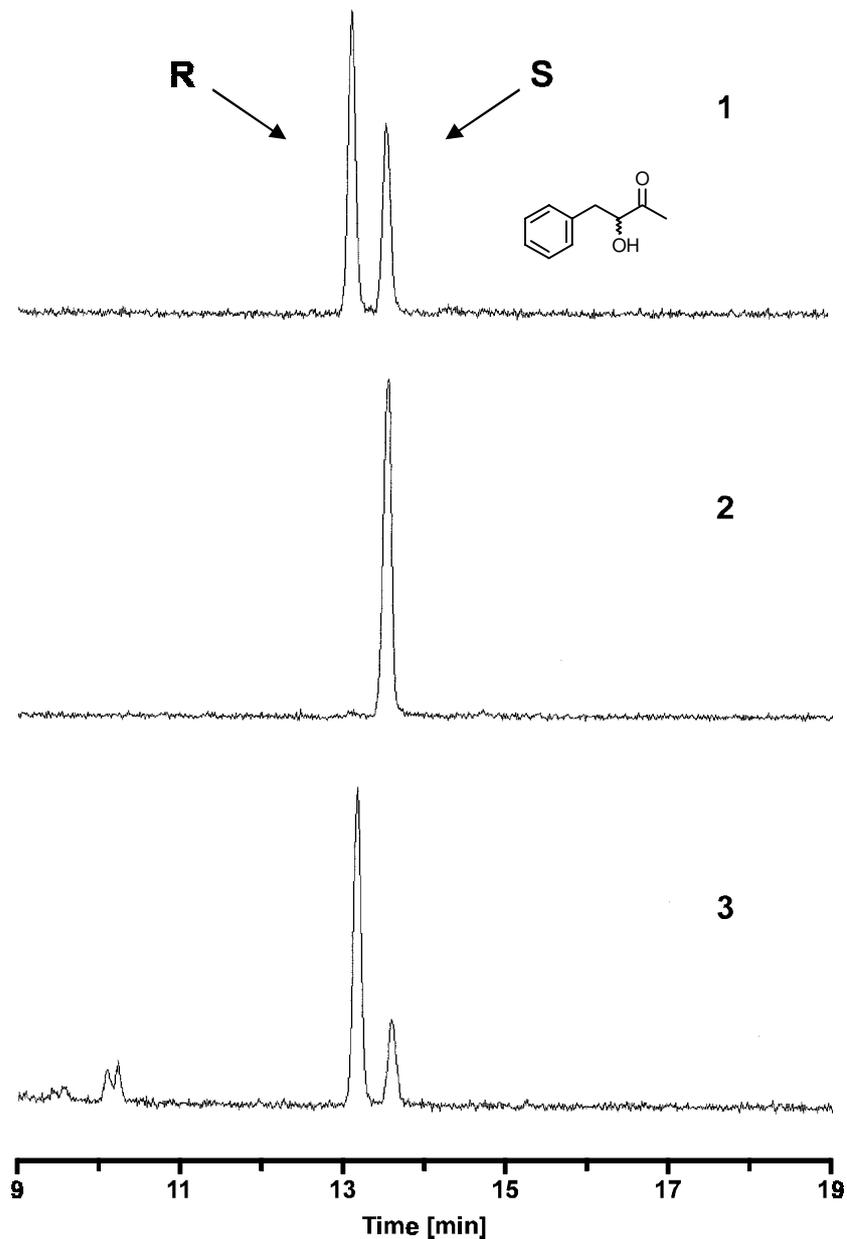


Abb 2-56 MS-Gaschromatogramm der MTPA-Derivate von 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon: 1 = Mischung der synthetisierten Enantiomeren, 2 = synthetisiertes (S)-Enantiomer, 3 = Produkt der enzymatischen Transformation mit isolierter PDC

Die Enantiomerenverteilung von 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon (**35**) (PAC) wurde für die Produkte verschiedener Bildungswege untersucht: aus der Hefefermentation von Benzaldehyd, aus der enzymatischen Transformation von Benzaldehyd und aus der enzymatischen Transformation von Phenylglyoxylsäure. Aus allen Umsetzungen lag das mittels HPLC isolierte Acyloin mit einem Enantiomerenüberschuß von  $\geq 98\%$  in der (R)-Konfiguration vor (Abb 2-57).

Von der Vielzahl der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten aliphatischen Acyloine wurde exemplarisch 3-Hydroxy-2-octanon (**18**) nach gaschromatographischer Isolierung (4.2.2.5) auf die Stereoselektivität der enzymatischen Transformation untersucht. Die tautomere Verbindung (**17**) konnte im präparativen Maßstab nur durch Isomerisierung von (**18**) erhalten werden und war einer Analyse der Enantiomerenverteilung deshalb nicht zugänglich. Die gaschromatographische Trennung der MTPA-Ester von (**18**) war möglich, wurde aber von den isomeren Estern des gleichzeitig vorliegenden Acyloins (**17**) etwas überlagert (Abb 2-58). Der Enantiomerenüberschuß wurde zu 69 % bestimmt. Die absolute Konfiguration wurde durch polarimetrische Messung ermittelt. Laut Literatur weist (S)-3-Hydroxy-2-octanon einen positiven Drehwinkel auf [51]. Die hier isolierte Verbindung zeigte eine negative Drehung des linear polarisierten Lichts und war deshalb der (R)-Konfiguration zuzuordnen.

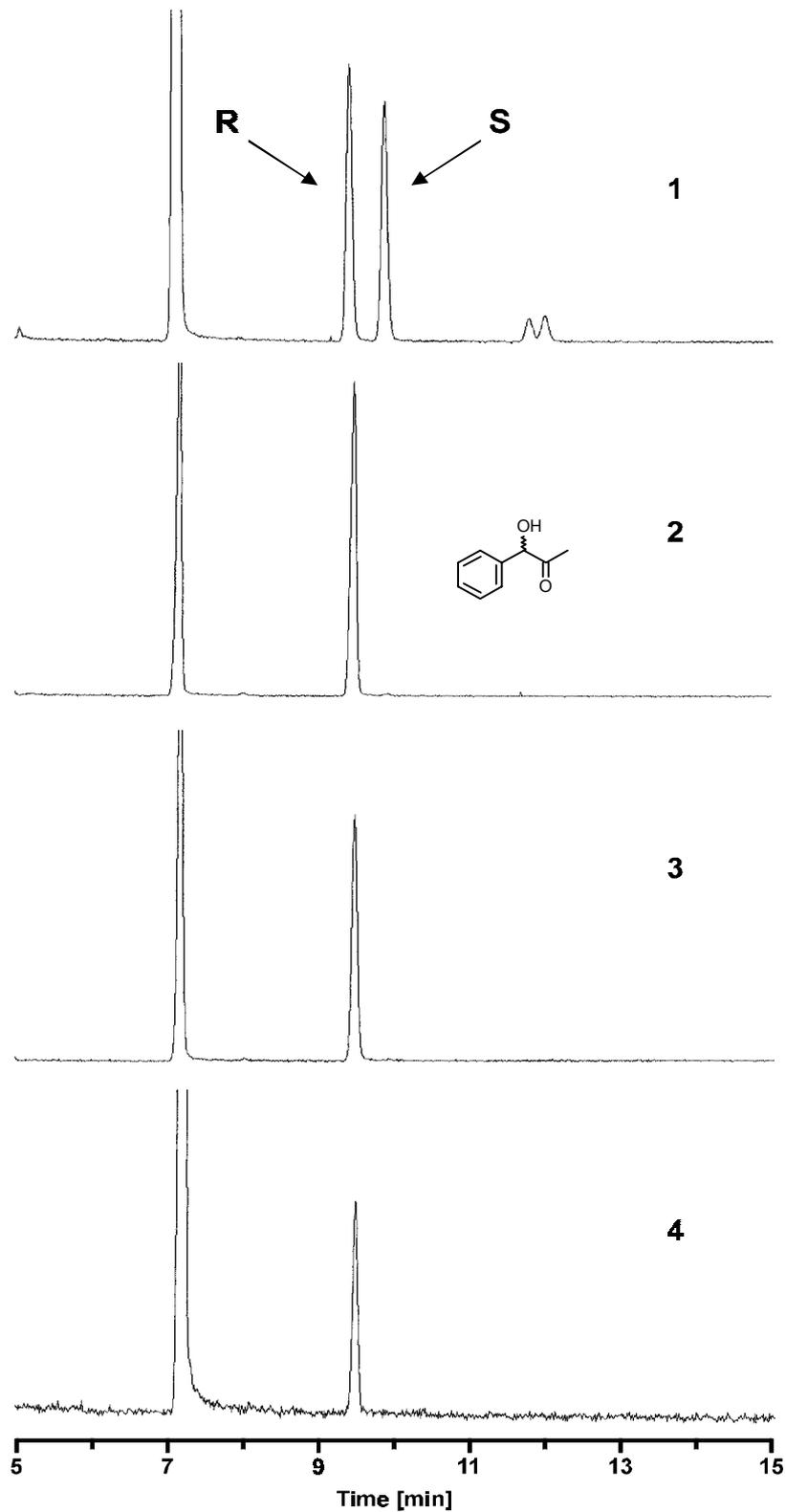


Abb 2-57 MS-Gaschromatogramm der MTPA-Derivate von 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon: 1 = Racemat, 2 = Produkt der Hefefermentation, 3 = Produkt der enzymatischen Benzaldehyd-Transformation, 4 = Produkt der enzymatischen Phenylglyoxylsäure-Transformation

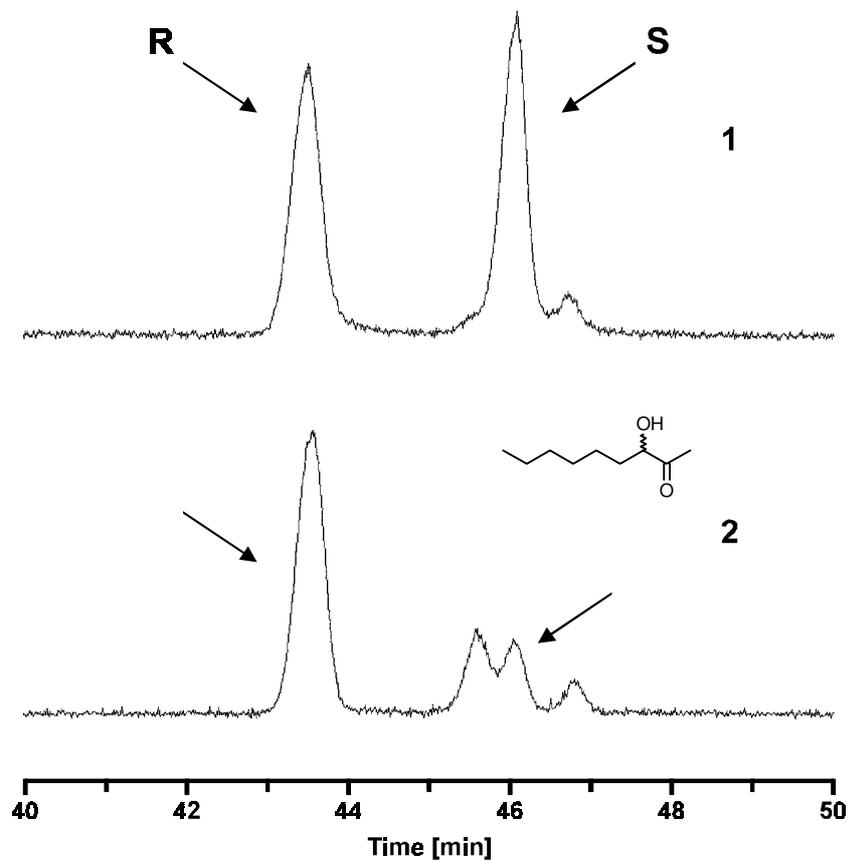


Abb 2-58 MS-Gaschromatogramm der MTPA-Derivate von 3-Hydroxy-2-octanon:  
 1 = synthetisiertes Racemat, 2 = Produkt der enzymatischen Transformation  
 mit isolierter PDC

## 2.5.2 Olfaktorische Eigenschaften

Von den kurzkettigen  $\alpha$ -Hydroxyketonen 3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin), 2-Hydroxy-3-pentanon und 3-Hydroxy-2-pentanon sowie der aromatischen Verbindung 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon sind deren aromaaktive Eigenschaften bekannt (vgl. 3.5.3). Geht man von der  $\alpha$ -Keto-Gruppierung als strukturell entscheidender Voraussetzung dieses Merkmals aus, so konnte erwartet werden, daß zumindest ein Teil der weiteren in dieser Arbeit hergestellten Acyloine geruchswirksam sein sollte.

Zur Überprüfung der olfaktorischen Eigenschaften der  $\alpha$ -Hydroxyketone wurden diese durch präparative Adsorptions- oder Gaschromatographie aus den enzymatischen Ansätzen isoliert und angereichert. Die jeweiligen Tautomeren konnten in ausreichenden

Mengen meist nur durch chemische Isomerisierung (4.11.13) gewonnen werden. Die olfaktorische Untersuchung enantiomerenreiner Verbindungen erfolgte anhand der chemisch synthetisierten Referenzen.

Zunächst wurden mittels GC-O die qualitativen Geruchseindrücke der Substanzen ermittelt und darauffolgend durch Abschniffen verschiedener Verdünnungsstufen die einzelnen Geruchsschwellen bestimmt (vgl. 4.9). Aufgrund der großen Anzahl der untersuchten Acyloine und der zum Teil erheblichen Unterschiede in der Geruchswahrnehmung der einzelnen Testpersonen werden hier **Geruchsschwellenbereiche** angegeben und alle häufig genannten Geruchseindrücke aufgeführt, auch wenn diese in der Beschreibung olfaktorischer Stoffeigenschaften sonst nicht üblich sind oder sich z.T. nicht zu ergänzen scheinen.

Tab 2-11 Olfaktorische Eigenschaften aromatischer Acyloine

Substanz	Geruchsqualität	Geruchsschwelle [ng]
(R)-3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon ( <b>2</b> )	blumig-süßlich, frische Note	75 - 100
(S)-3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon ( <b>2</b> )	blumig-süßlich	75 - 100
(S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon ( <b>1</b> )	unspezifisch	≥ 1500
(R,S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon ( <b>1</b> )	unspezifisch	≥ 1500

Verbindung (**2**) zeichnete sich durch einen angenehm blumigen Geruch aus, der für beide Enantiomeren kaum unterscheidbar ist (Tab 2-11). Das isomere Acyloin (**1**) wies dagegen keine charakteristischen olfaktorischen Eigenschaften auf. Die hier angegebene Grenze von 1500 ng wurde aus analytischen Gegebenheiten gewählt, da größere Substanzmengen die GC-Säule überladen und somit nicht zu einer Intensivierung, sondern nur zu einer Verbreiterung des Signals führen würden.

Eine Vielzahl der untersuchten aliphatischen Acyloine zeigte ebenfalls geruchsaktive Eigenschaften (Tab 2-12). Die niedrigsten Geruchsschwellen wiesen Verbindungen mit einer Kohlenstoffkette von mindestens 7 C-Atomen auf. In Übereinstimmung mit anderen Substanzklassen zeigten die ungesättigten Acyloine niedrigere Schwellenwerte als die entsprechenden gesättigten Analoga [52]. Im allgemeinen waren die 2-Hydroxy-3-Oxo-Acyloine geruchsintensiver als die entsprechenden Tautomeren. Einzige Ausnahme bildeten hier die schwefelhaltigen Verbindungen (**9**) und (**10**), die mit Geruchsschwellen von 15 - 20 ng bzw. 5 -10 ng Substanz auch die potentesten Aromastoffe darstellten.

Tab 2-12 Olfaktorische Eigenschaften aliphatischer Acyloine (<sup>a</sup> durch chemische Isomerisierung erhalten)

<b>Substanz</b>	<b>Geruchsqualität</b>	<b>Geruchsschwelle [ng / Geruchsreiz]</b>
2-Hydroxy-3-pentanon ( <b>11</b> )	milchsauer, buttrig, Heu	250 – 300
3-Hydroxy-2-pentanon ( <b>12</b> )	karamellig-süß, buttrig	500 – 600
2-Hydroxy-3-hexanon ( <b>13</b> ) <sup>a</sup>	milchsauer, grasig, Heu	500 – 600
3-Hydroxy-2-hexanon ( <b>14</b> )	erdig, Heu, pilzig	900 – 1000
2-Hydroxy-3-heptanon ( <b>15</b> ) <sup>a</sup>	blumig, buttrig, pilzig, erdig	100 – 150
3-Hydroxy-2-heptanon ( <b>16</b> )	erdig, Heu, Kräuter	400 – 500
2-Hydroxy-3-octanon ( <b>17</b> ) <sup>a</sup>	blumig-süß, buttrig, pilzig	40 – 50
3-Hydroxy-2-octanon ( <b>18</b> )	pilzig, erdig, Heu, Kräutertee	250 – 300
2-Hydroxy-3-nonanon ( <b>19</b> ) <sup>a</sup>	buttrig-süß, lactonartig	100 – 120
3-Hydroxy-2-nonanon ( <b>20</b> )	pilzig, buttrig, Heu	500 – 600
2-Hydroxy-3-decanon ( <b>21</b> ) <sup>a</sup>	fruchtig-süß, blumig, grüne Note	100 – 120
3-Hydroxy-2-decanon ( <b>22</b> )	grasig, Heu, Kräuter	700 – 800
2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon ( <b>5</b> )	käsiger, milchsauer	400 – 500
3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon ( <b>6</b> )	käsiger, milchsauer	800 – 900
2-Hydroxy-4-methyl-3-heptanon ( <b>23</b> ) <sup>a</sup>	blumig-grasig, Heu	80 – 120
3-Hydroxy-4-methyl-2-heptanon ( <b>24</b> )	blumig-erdig, Heu	200 – 250
2-Hydroxy-4 <i>E</i> -hepten-3-on ( <b>27</b> ) <sup>a</sup>	blumig, würzig, röstig, erdig	50 – 80
3-Hydroxy-4 <i>E</i> -hepten-2-on ( <b>28</b> )	erdig, pilzig, brenzlich, künstlich	250 – 300
2-Hydroxy-4 <i>E</i> -octen-3-on ( <b>29</b> ) <sup>a</sup>	blumig, grasig, holzig, Heu	20 – 30
3-Hydroxy-4 <i>E</i> -octen-2-on ( <b>30</b> )	pilzig, erdig, blumig	80 – 10
2-Hydroxy-5-(methylthio)-3-pentanon ( <b>9</b> )	würzig, fleischig, pilzig	15 – 20
3-Hydroxy-5-(methylthio)-2-pentanon ( <b>10</b> )	würzig, Knoblauch, gekochte Kartoffel	5 – 10

Fünf der untersuchten aliphatischen Isomerenpaare zeigten bis 1500 ng keinen charakteristischen Geruch (Tab 2-13). Es handelte sich hierbei um kurzkettige (maximal C<sub>6</sub>) verzweigte und / oder ungesättigte Acyloine.

Tab 2-13 Acyloine ohne charakteristische olfaktorische Eigenschaften

Substanz	Geruchsqualität	Geruchsschwelle [ng]
2-Hydroxy-4-methyl-3-pentanon ( <b>3</b> )	unspezifisch	≥ 1500
3-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon ( <b>4</b> )	unspezifisch	≥ 1500
2-Hydroxy-4-methyl-3-hexanon ( <b>7</b> )	unspezifisch	≥ 1500
3-Hydroxy-4-methyl-2-hexanon ( <b>8</b> )	unspezifisch	≥ 1500
2-Hydroxy-4 <i>E</i> -hexen-3-on ( <b>25</b> ) <sup>a</sup>	unspezifisch	≥ 1500
3-Hydroxy-4 <i>E</i> -hexen-2-on ( <b>26</b> )	unspezifisch	≥ 1500
2-Hydroxy-4-methyl-4 <i>E</i> -hexen-3-on ( <b>31</b> ) <sup>a</sup>	unspezifisch	≥ 1500
3-Hydroxy-4-methyl-4 <i>E</i> -hexen-2-on ( <b>32</b> )	unspezifisch	≥ 1500
2-Hydroxy-5-methyl-4 <i>E</i> -hexen-3-on ( <b>33</b> ) <sup>a</sup>	unspezifisch	≥ 1500
3-Hydroxy-5-methyl-4 <i>E</i> -hexen-2-on ( <b>34</b> )	unspezifisch	≥ 1500

## 2.6 Nachweis von $\alpha$ -Hydroxyketonen in Lebensmitteln

Analog der in dieser Arbeit verfolgten Biosynthesewege von  $\alpha$ -Hydroxyketonen wurden Lebensmittel untersucht, die während ihrer Herstellung einer Hefe-Fermentation unterliegen, die nicht von *Saccharomyces cerevisiae* dominiert ist. Hierfür wurden Sherry (2 Proben) und Sojasauce (3 Proben) ausgewählt (siehe 4.10).

Beide Sherry-Proben zeigten unter den Hauptinhaltsstoffen die typischen Produkte einer Hefe-Fermentation, wie 2-Methylbutanol, 3-Methylbutanol, Butandiol und 2-Phenylethanol. An  $\alpha$ -Hydroxyketonen konnten in beiden Extrakten neben Acetoin auch 2-Hydroxy-3-pentanone, 3-Hydroxy-2-pentanone sowie 2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon detektiert werden (Abb 2-59). In Sherry 1 (Fino Dry) wurden darüber hinaus 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanone und 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanone identifiziert.

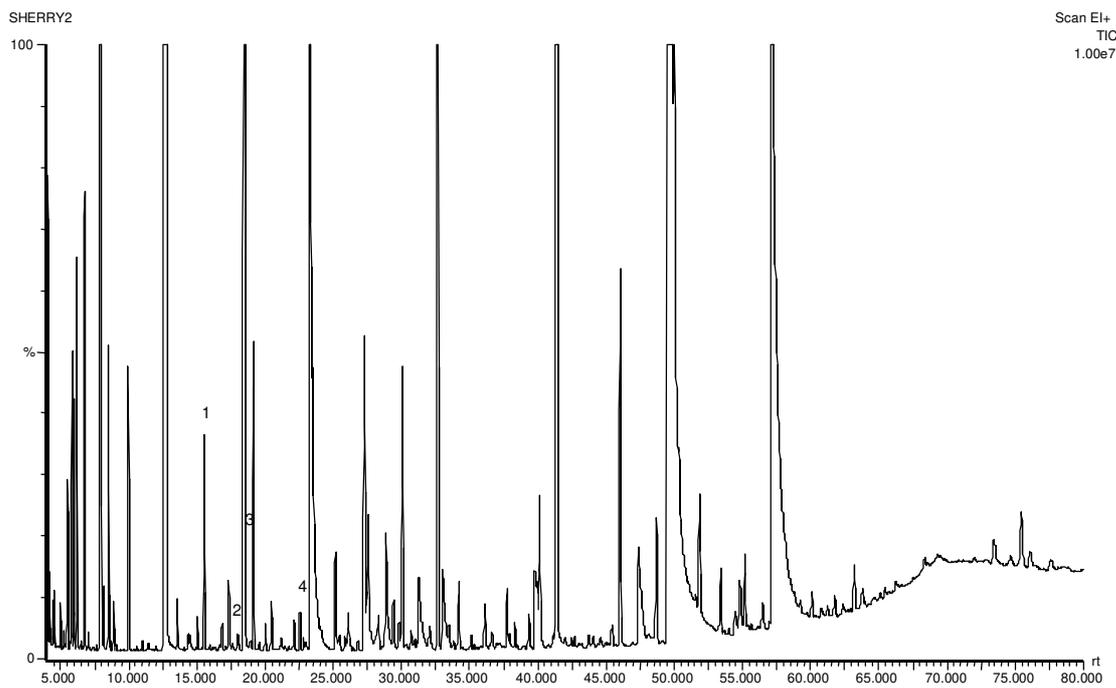
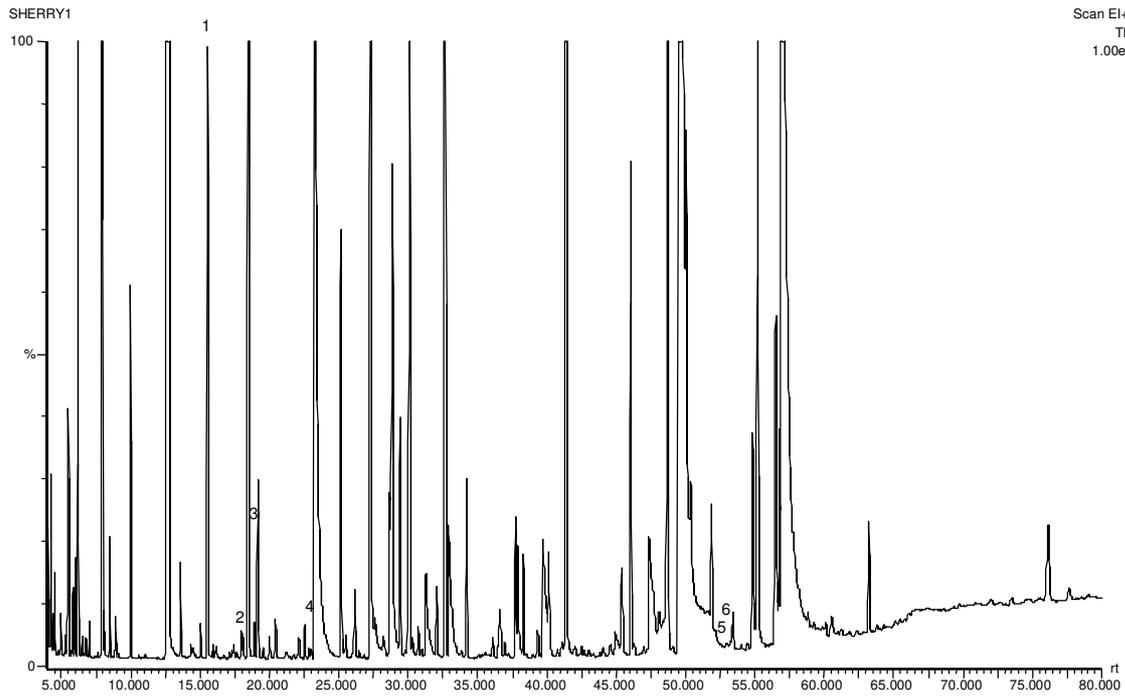


Abb 2-59 MS-Gaschromatogramme der Gesamtextrakte von Sherry 1 (oben) und Sherry 2 (unten) (1 = Acetoin, 2 = 3-Hydroxy-2-pentanon, 3 = 2-Hydroxy-3-pentanon, 4 = 2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon, 5 = 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon, 6 = 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon)

Außer Acetoin lagen alle nachgewiesenen Acyloine nur in geringen Mengen vor (< 0,5 Area%), ließen sich jedoch anhand der Massenspektren und Retentionszeiten eindeutig identifizieren (Abb 2-60). Nach Fraktionierung der Proben an verschiedenen Festphasen konnten keine weiteren  $\alpha$ -Hydroxyketone detektiert werden.

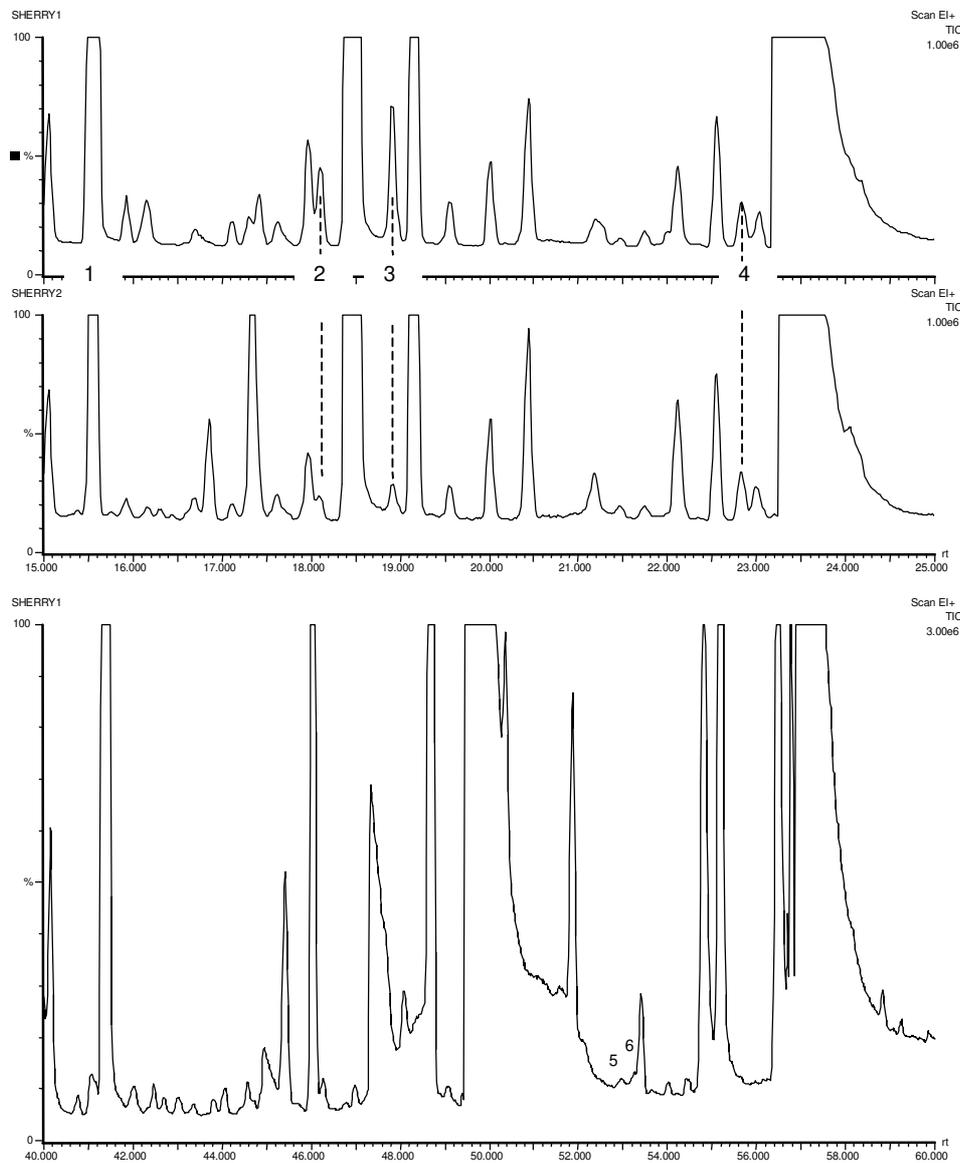


Abb 2-60 Ausschnitte aus den MS-Chromatogrammen der beiden Sherry-Proben (1 = Acetoin, 2 = 3-Hydroxy-2-pentanon, 3 = 2-Hydroxy-3-pentanon, 4 = 2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon, 5 = 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon, 6 = 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon)

Von den drei untersuchten Sojasaucen wies nur Probe 1 (japanische Herkunft) das typische Substanzspektrum einer Hefe-Fermentation auf. Möglicherweise handelte es sich bei den anderen Proben um sogenannte „chemische Sojasauce“, die durch Säure-

hydrolyse aus Sojabohnenmehl gewonnen und vor allem für den europäischen Markt produziert wird [53].

Im Gesamtextrakt der analysierten japanischen Sojasauce wurden neben Acetoin die  $\alpha$ -Hydroxyketone 2-Hydroxy-3-pentanon und 3-Hydroxy-2-pentanon nachgewiesen (Abb 2-61).

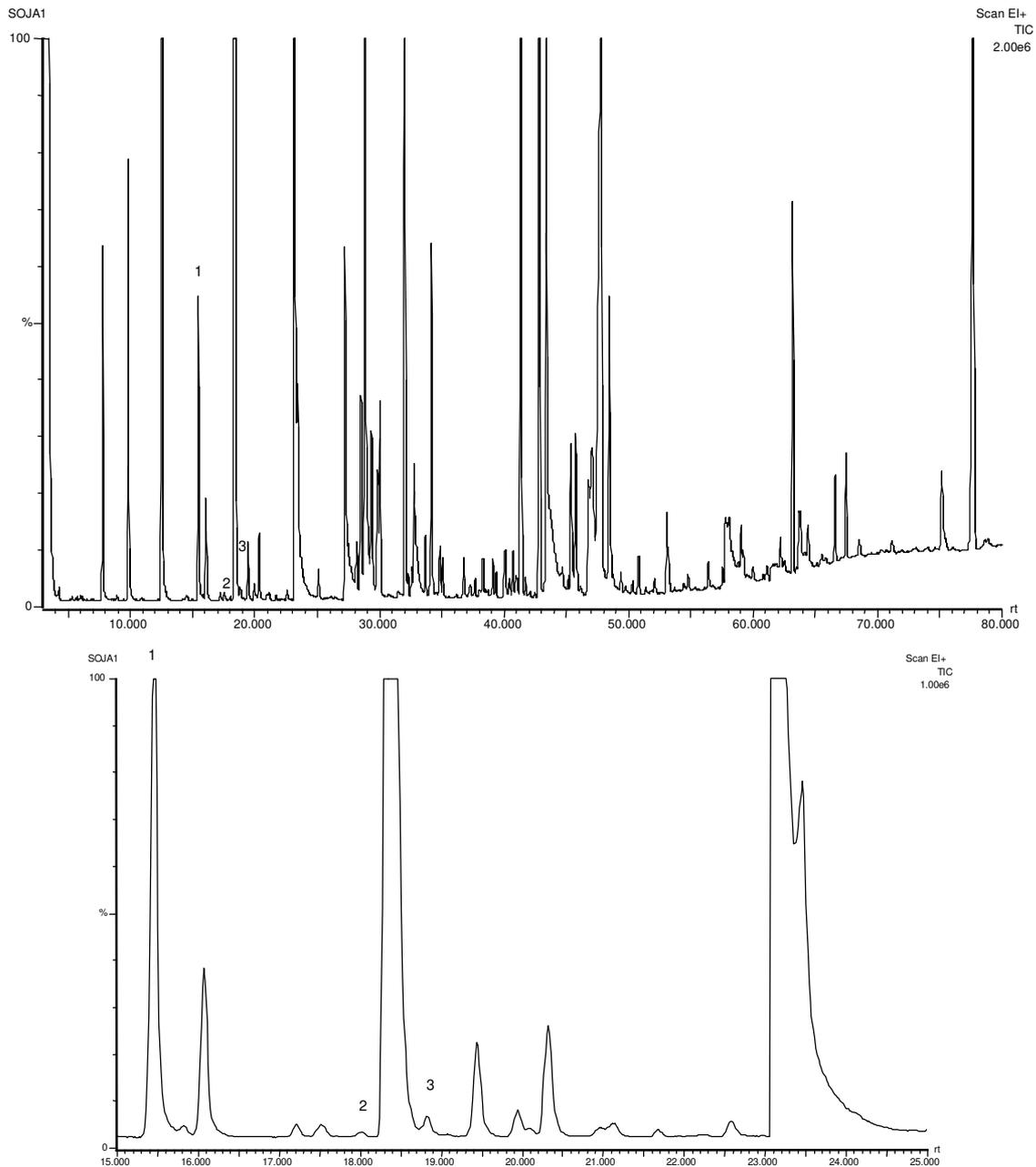


Abb 2-61 MS-Gaschromatogramm des Gesamtextraktes der Sojasauce 1 (1 = Acetoin, 2 = 3-Hydroxy-2-pentanon, 3 = 2-Hydroxy-3-pentanon), unten: vergrößerter Ausschnitt

---

Auch hier lagen die identifizierten Acyloine außer Acetoin nur in sehr geringen Mengen vor. Die Fraktionierung der Probe führte nicht zum Nachweis weiterer  $\alpha$ -Hydroxyketone.

---

## 3 Diskussion

---

### 3.1 Das Enzym Pyruvatdecarboxylase (PDC)

#### 3.1.1 Vorkommen und Struktur

Das Enzym Pyruvatdecarboxylase (E.C. 4.1.1.1.) wurde erstmals 1911 in Hefeextrakten beschrieben [54]. Die Lyase katalysiert in der ethanolischen Gärung die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und Kohlendioxid und stellt somit ein Schlüsselenzym am Verzweigungspunkt zwischen Atmung und Gärung dar (Abb 3-1). Neben Pyruvat können auch andere 2-Oxocarbonsäuren von PDC decarboxyliert werden [34, 55]. Als Cofaktoren werden Thiamindiphosphat (TDP) und  $Mg^{2+}$ -Ionen benötigt [56, 57]. Pyruvatdecarboxylasen wurden außer in Hefen auch in anderen Pilzen (*Aspergillus parasiticus*) [58], verschiedenen Pflanzen (Erbse, Reis, Weizen u.a.) [59, 60, 61] sowie in Bakterien (*Zymomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi*) [31, 62] gefunden.

Kohlenhydrat-Stoffwechselfvorgänge in Hefen und daran beteiligte Enzyme sind vor allem am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae* umfassend untersucht worden; über Enzyme aus *Zygosaccharomyces bisporus* gibt es dagegen praktisch keine Literatur. Da *Z. bisporus* derselben Familie (Saccharomycetaceae) und Subfamilie (Saccharomycetoideae) wie *S. cerevisiae* angehört sowie bezüglich Sprossung (multipolar), Fermentationsverhalten (stark gärend) und Coenzym-Q-System (Q-6) die gleichen Eigenschaften aufweist [63], scheint es sinnvoll, hier einen kurzen Überblick der bezüglich *S. cerevisiae* bekannten Daten darzustellen.

In *Saccharomyces cerevisiae* ist die Pyruvatdecarboxylase im Cytosol lokalisiert [20]. Das Enzym wird durch sein Substrat Pyruvat aktiviert und weist dementsprechend eine sigmoide Substratkinetik auf [30, 29]. Dieses allosterische Verhalten und ein vergleichsweise hoher  $K_M$ -Wert bewirken, daß unter aeroben Bedingungen bis zu einer bestimmten intrazellulären Pyruvatkonzentration vorzugsweise die oxidative Metabolisierung des Pyruvats über den Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex abläuft (vgl. Abb 3-1). Unter anaeroben Bedingungen, aber bei hohen Glucose- bzw. Pyruvatkonzentrationen auch unter

aeroben Verhältnissen, dominiert die PDC-Decarboxylierung, die eine deutlich höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit als die PDH-Reaktion aufweist (Crabtree-Effekt) [64].

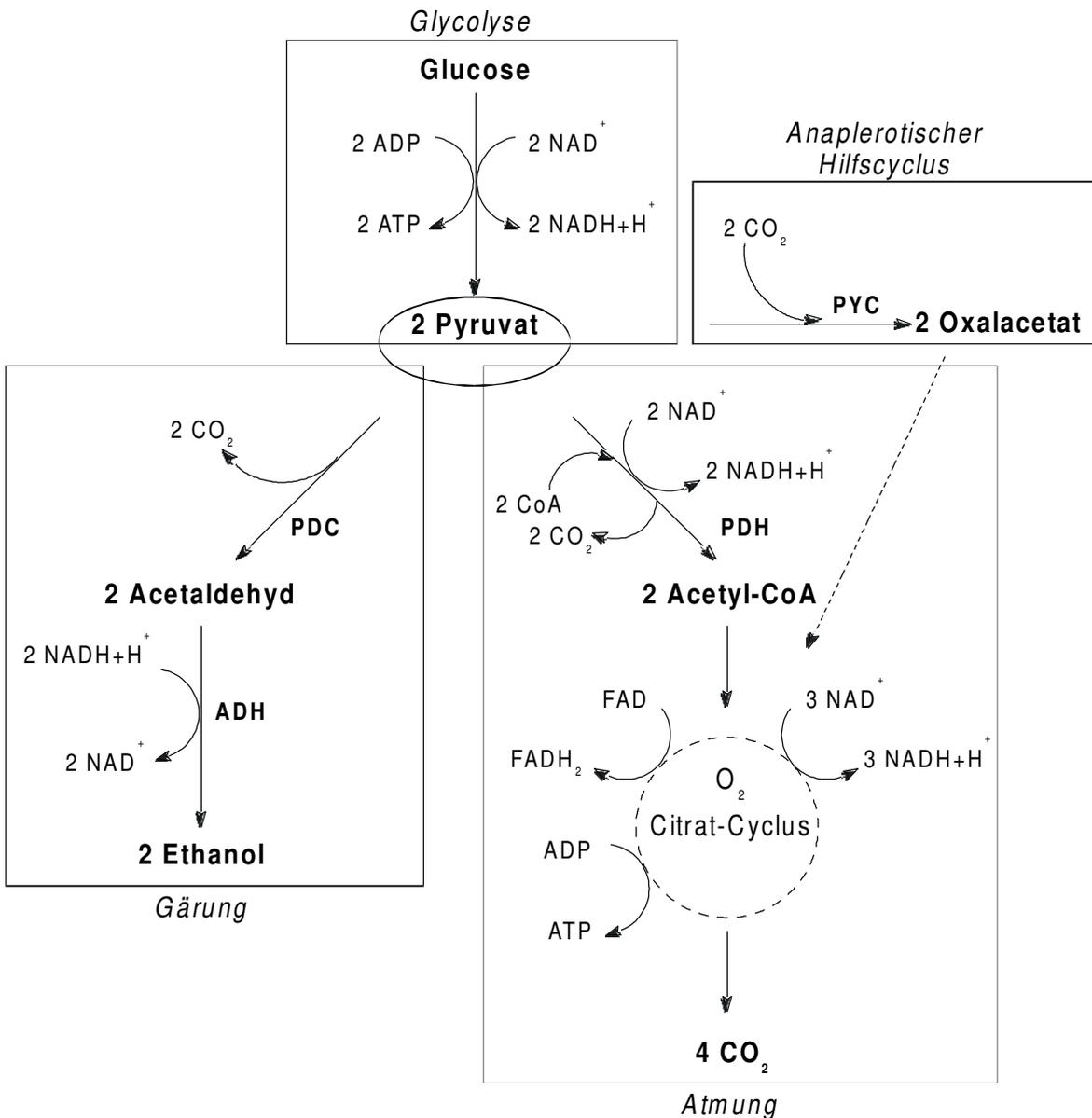


Abb 3-1 Schlüsselreaktionen des Pyruvats im Stoffwechsel von Hefen (PYC = Pyruvatcarboxylase, PDC = Pyruvatdecarboxylase, PDH = Pyruvatdehydrogenase)

Alle bisher in Hefen und Bakterien beschriebenen Pyruvatdecarboxylasen sind im aktiven Zustand Tetramere und weisen Untereinheiten mit einer molekularen Masse von etwa 60 kDa auf (PDCS.c.: je 563 Aminosäuren). Die 4 Monomere können entweder in identischer Größe vorliegen [22, 21] oder jeweils zwei Monomere ( $\alpha$  und  $\beta$ ) weisen unter-

schiedliche Massen von ca. 57 / 59 bzw. 59 / 61 kDa auf [33, 26]. Die Polypeptidkette der Monomere faltet in drei etwa gleich große Domänen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ; entsprechend ihrer Reihenfolge vom N- zum C-Terminus). Kristallstrukturanalysen zeigten, daß sich die räumliche Anordnung der Untereinheiten am besten als „Dimer von Dimeren“ beschreiben läßt, mit starken Wechselwirkungen zwischen den Monomeren eines Dimers (Kontakte der  $\alpha$ - und  $\gamma$ - Domänen) und schwächeren Wechselwirkungen zwischen den beiden Dimeren ( $\beta$ - Domänen) [56, 65]. In *Saccharomyces cerevisiae* überwiegt mengenmäßig der  $(\alpha\beta)_2$ -Typ; inzwischen konnten jedoch sowohl die  $\alpha_4$ - als auch die  $\beta_4$ -Form nachgewiesen werden [33, 26]. Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer spezifischen Aktivität und ihren kinetischen Daten nicht. Die Gründe für das Vorliegen unterschiedlich großer Untereinheiten sind noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet, daß eine Monomerenform durch posttranslationale Modifikationen aus der anderen hervorgeht. So konnte gezeigt werden, daß in Protease-defekten Stämmen von *S. cerevisiae* die PDC als Homotetramer der größeren Untereinheit vorlag [66].

Bis heute wurden in *S. cerevisiae* sechs mit der Pyruvatdecarboxylase assoziierte Gene identifiziert, von denen drei als Strukturgene fungieren (PDC1, PDC5 und PDC6) [66, 67, 68, 69, 70]. In Wildtypen der Hefe wird PDC1 zu 90 %, PDC5 zu etwa 10 % und PDC6 nur in sehr geringem Umfang oder gar nicht exprimiert [71]. Es konnte gezeigt werden, daß PDC1 die größere Monomerenform codiert, während für die kleinere Form noch kein Strukturgen gefunden wurde. Dies stützt die oben erwähnte These einer posttranslationalen Entstehung dieser Untereinheit. Andererseits konnte aus einem haploiden Hefestamm, der nur das PDC1-Gen enthielt, ein PDC-Homotetramer isoliert werden [72]. Auch die Expression von PDC1 oder PDC5 in *Escherichia coli* führt zu aktiven Homotetrameren [68, 71].

Die Stabilität der PDC-Enzymaktivität ist stark pH-abhängig. Oberhalb pH 8,5 dissoziiert das Holoenzym aus *S. cerevisiae* unter Freisetzung der Cofaktoren TDP und  $Mg^{2+}$  in seine Dimere, die katalytisch nicht wirksam sind [21]. Das Gleichgewicht verschiebt sich bei pH-Werten  $< 7,0$  wieder auf die Seite des Holoenzym und führt zu einer Regenerierung der Enzymaktivität.

### 3.1.2 Reaktionsmechanismus

Pyruvatdecarboxylase beschleunigt die Decarboxylierung von Pyruvat gegenüber freiem Thiamindiphosphat um den Faktor  $3 \cdot 10^{12}$  (bei pH 6,2 und 30 °C) [73]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist als Modellreaktion TDP-abhängiger Enzyme umfassend untersucht worden.

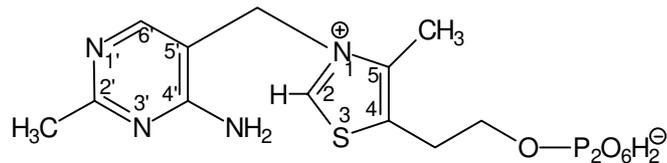


Abb 3-2 Thiamindiphosphat (TDP)

TDP wird mit Hilfe von  $Mg^{2+}$  über seinen Diphosphatrest an die  $\gamma$ - Domäne jedes Pyruvatdecarboxylase-Monomers gebunden. Es liegt im Enzym in der energetisch ungünstigen, sogenannten V-Konformation vor, die durch starke van der Waals-Wechselwirkungen eines großräumigen aliphatischen Restes (*S. cerevisiae*: Ile415) erzwungen und stabilisiert wird [56]. Für die katalytische Aktivität ist die C2-Position im Thiazoliumring von entscheidender Bedeutung. Sie liegt nach neueren  $^{13}C$ -NMR-Untersuchungen sowohl in freiem als auch in enzymgebundenem TDP in undissoziierter Form vor [74]. Die Deprotonierung zum C2-Carbanion wird bei Substratbindung von der Proteinkomponente selbst katalysiert, indem die Carboxylgruppe einer Glutaminsäure-Seitenkette (E51) eine Wasserstoffbrücke zum N1' des Pyrimidinrings bildet und den Stickstoff in der protonierten Form stabilisiert. Dadurch wird die Basizität der 4'-Aminogruppe erhöht (Amino-Imino-Tautomerie), die infolge der V-Konformation des TDP nahe genug am C2-Atom ist, um durch Protonenabstraktion ein intermediäres Carbanion zu bilden. Der Austausch sowohl des N1'-Atoms gegen ein C-Atom als auch der Austausch der 4'-Aminogruppe gegen ein Proton bzw. eine Hydroxylgruppe bewirken einen völligen Aktivitätsverlust, obwohl die entsprechenden Cofaktoren im Proteinanteil der PDC gebunden werden [56, 75, 76].

Das reaktive TDP-Carbanion 1 greift die  $\alpha$ -Carbonylgruppe des Substrates Pyruvat nucleophil an, durch anschließende Protonierung entsteht als erstes kovalent vorliegendes Zwischenprodukt  $\alpha$ -Lactyl-TDP 2 (Abb 3-3). Nach Decarboxylierung bildet sich ein Carbanion-Enamin-Intermediat 3, das auch als „aktives Acetaldehyd“ bezeichnet wird. Neuerliche Protonierung führt zu Hydroxyethyl-TDP 4. Anstelle eines Protons kann auch

ein Aldehyd als Cosubstrat unter Knüpfung einer neuen C-C-Bindung elektrophil an das intermediäre Carbanion **3** addiert werden. Der Reaktionscyclus schließt sich nach Freisetzung von Acetaldehyd (oder dem gebildetem  $\alpha$ -Hydroxyketon) unter Regeneration des Cofaktors Thiamindiphosphat [77, 78, 79].

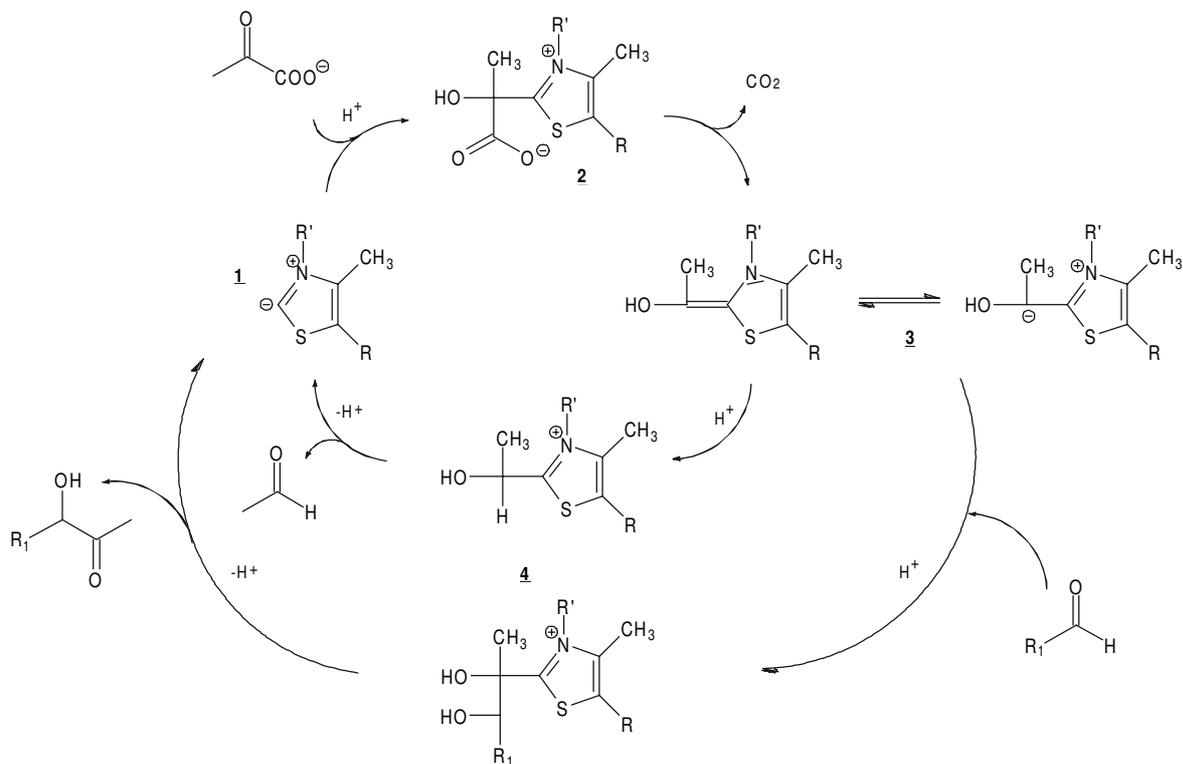


Abb 3-3 Mechanismus der durch Pyruvatdecarboxylase katalysierten Reaktionen

Das Enzym aus *Zymomonas mobilis* ist die einzige bisher bekannte PDC, die nicht allosterisch reguliert ist. Dagegen wird die Mehrzahl der Pyruvatdecarboxylasen aus verschiedenen Organismen, so auch aus *S. cerevisiae*, durch ihr Substrat Pyruvat aktiviert. Die Aktivierung kann ebenfalls durch Pyruvamid bzw. verschiedene andere 2-Oxosäureamide erreicht werden, die jedoch nicht als Substrate fungieren können [30]. Dies deutet darauf hin, daß aktives Zentrum und Ort der Substratregulation nicht identisch sind. Tatsächlich konnte durch zielgerichtete Mutagenese gezeigt werden, daß Interaktionen des Pyruvats mit einem Cysteinrest (Cys221), der etwa 20 Å vom aktiven Zentrum entfernt ist, den Ausgangspunkt der Aktivierung darstellen. Offensichtlich findet eine kovalente Bindung unter Ausbildung eines Hemithioketals statt, die eine Rückgratkaskade von Konformations- und Ladungsänderungen auslöst und letztendlich am aktiven Zentrum die Reaktion ermöglicht bzw. startet [80, 81, 82].

### **3.2 Isolierung und Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus***

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der aus intakten Zellen der Hefe *Zygosaccharomyces bisporus* das Enzym Pyruvatdecarboxylase isoliert werden konnte. Ein effektiver Zellaufschluß wurde durch Naßvermahlung in einer Rührwerkskugelmühle erreicht. Die chromatographischen Trennschritte beruhten auf hydrophoben Eigenschaften (HIC), Molekülgröße (GPC) und pH-abhängigem Ladungszustand (IC) des Enzyms. Entgegen Literaturvorschriften bezüglich der PDC aus *Zymomonas mobilis* führte eine Farbstoff-Affinitätschromatographie mit den Farbstoffen Procion Gelb H-E4R und Procion Grün H-E4BD (BASF, Ludwigshafen) aufgrund fehlender Selektivität nicht zu einer nutzbaren Aufreinigung des Enzyms [83, 84].

Bei einer Ausbeute von 24 % der im Rohextrakt enthaltenen PDC-Aktivität wurde ein Enzympräparat mit einer spezifischen Aktivität von  $59,2 \text{ U mg}^{-1}$  Protein erhalten, das in der Rechromatographie mittels GPC und in der denaturierenden SDS-Gelelektrophorese Homogenität zeigte.

Tab 3-1 zeigt die wichtigsten experimentell ermittelten Parameter im Vergleich zu Pyruvatdecarboxylasen aus anderen Organismen.

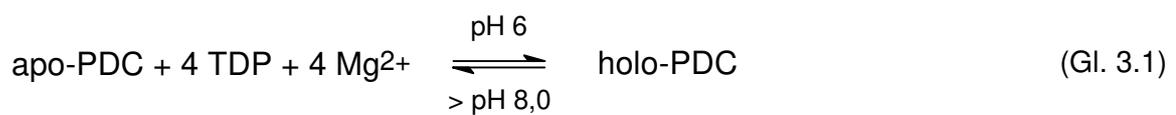
Tab 3-1 Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* im Vergleich zu den Enzymen anderer Organismen (<sup>a</sup> bei 25 °C, <sup>b</sup> 30 °C, - keine Angaben)

	Hefen		Bakterien	Pflanzen	
	<i>Z. bisporus</i>	<i>C. utilis</i> [20]	<i>S. cerevisiae</i> [85, 24, 33, 26]	<i>Zym. mobilis</i> [31, 22, 86]	Erbse [59]
Spez. Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]	<b>59,2<sup>a</sup></b>	31,1 <sup>b</sup>	50 - 80 <sup>b</sup>	120 - 180 <sup>b</sup>	51 <sup>b</sup>
MW [kDa]	<b>224 bzw. 244 (GPC)</b>	-	220 - 240	210 - 240	240
Monomere [kDa]	<b>60,7 (SDS)</b>	-	$\alpha$ + $\beta$ (57+59; bzw. 59+61)	$\alpha$ (57 - 59)	$\alpha$ + $\beta$ (65+68)
Aktive Isoformen	<b>ja (<math>\geq 6</math>; IEF)</b>	-	3 ( $\alpha_4$ , $\alpha_2\beta_2$ , $\beta_4$ )	nein	3 ( $\alpha_2\beta_2$ ) <sub>1/2/4</sub>
pI	<b>5,14 - 5,66</b>	-	5,2 - 5,8	4,8	5,5 - 8,5
K <sub>M</sub> [mM]	<b>1,73</b>	3,6	0,85 - 1,1	0,3 - 0,5	1,0
Allosterie	<b>ja</b>	ja	ja	nein	ja
Hill-Koeff. n	<b>2,10</b>	-	1,93 - 2,33	1,0	-
Temp.-Opt. [°C]	<b>45</b>	-	-	-	-
pH-Opt.	<b>6,5</b>	-	5,7 - 6,0	6,0	6,0

0,6 % des gesamten löslichen Zellproteins verblieben im Enzymisolat. Dies liegt in der Größenordnung der Literaturangaben über Pyruvatdecarboxylase aus *S. cerevisiae* (1,1 %) [64], aber deutlich unter denen für *Z. mobilis* (5-6 %) [22]. Das Enzym stellt in allen diesen Organismen ein Mengenprotein dar, was den relativ geringen Aufreinigungsfaktor von 41 erklärt. Auch hinsichtlich spezifischer Enzymaktivität, kinetischer Daten (positive Kooperativität) und anderer proteinchemischer Eigenschaften (Molekulargewicht, pI) lassen sich weitgehende Übereinstimmungen mit der PDC aus *S. cerevisiae* feststellen.

Unerwartet war das Verhalten der PDC aus *Z. bisporus* bei der Isoelektrischen Fokussierung. Trotz der beobachteten Homogenität in der SDS-PAGE traten hier 6 bis 8 Banden auf, denen mit Hilfe einer speziellen Färbung eindeutig Pyruvat-decarboxylierende Aktivität zugeordnet werden konnte (vgl. 2.2.2). Vergleiche der mit GPC und SDS-PAGE

ermittelten Molekulargewichte lassen auf das Vorhandensein von 4 Enzym-Untereinheiten schließen. Entweder unterscheiden sich diese Monomeren nicht oder nur in einem mittels SDS-PAGE und GPC nicht auflösbarem Maße in ihrer Größe. Ihre isoelektrischen Eigenschaften, also Art und Anteil von Aminosäuren mit geladenen Seitenketten, sind jedoch möglicherweise verschieden genug, um deutlich detektierbare Abweichungen in den pI's der jeweiligen Tetramere zu bewirken. Eine andere Erklärung für das inhomogene Verhalten in der IEF ist das Auftreten unterschiedlicher pH-abhängiger Dissoziationsstufen des Holo- bzw. Apoenzyms (Gl. 3.1).



Schellenberger stellte zwischen den beiden reinen Formen eine pI-Differenz von 0,2 pH-Einheiten fest [24]. Die Dissoziation kann auch bereits während der Probenvorbereitung für die IEF stattgefunden haben. Diese bestand aus einem Entsalzungsvorgang, also praktisch einer Dialyse gegen bidestilliertes Wasser. Da die Cofaktoren zwar sehr fest, aber doch reversibel am Protein gebunden sind, ist eine Freisetzung hierbei durchaus möglich [27].

Die exakten Gründe für das Auftreten mehrerer PDC-aktiver Banden in der IEF konnten in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Es werden jedoch bereits Nachfolgearbeiten auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt. Die Ermittlung der PDC-codierenden Gensequenz(en) kann hier möglicherweise zur Aufklärung beitragen.

### 3.3 Carboligase-Aktivität von Pyruvatdecarboxylasen verschiedener Herkunft

#### 3.3.1 Allgemeines

Bei ihren Versuchen über „phytochemische Reduktionen“ von Aldehyden stellten Neuberg und Hirsch bereits 1921 fest, daß fermentierende Hefelösungen Kohlenstoffketten verknüpfen können [87]. Sie gingen davon aus, ein neues „Ferment“ entdeckt zu haben, das sie als „Carboligase“ bezeichneten. Die Reaktion wurde im Detail am Beispiel des Benzaldehyds untersucht, aus dem eine neue optisch aktive Verbindung entstand, die später

als (-)-Phenylacetylcarbinol (PAC, 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon) identifiziert wurde [88]. Erst Dirscherl postulierte 1930, daß die Acyloinbildung eine Nebenreaktion der Pyruvatdecarboxylase sei [89]. Diese Hypothese wurde durch die Arbeiten von Singer und Pensky, die Acetoinbildung aus Pyruvat oder Acetaldehyd mit PDC aus Weizenkeimen beobachteten [90], sowie durch Juni, der PDC aus Brauhefe und Weizenkeimen nicht von den acetoinbildenden Bestandteilen trennen konnte [91], bestätigt. Endgültige Beweise für die PDC-katalysierte Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen wurden vor allem in den letzten 20 Jahren durch Arbeiten verschiedener Gruppen mit isolierten Pyruvatdecarboxylasen erbracht [42, 92, 93].

Die Herstellung von (R)-PAC mit Hilfe fermentierender Hefe war eine der ersten industriell genutzten Biotransformationen [94]. Die Substanz wird bis heute als chirale Vorstufe in der Produktion von L-Ephedrin eingesetzt, das u.a. in der Asthma-Behandlung pharmazeutischen Einsatz findet (Abb 3-4).

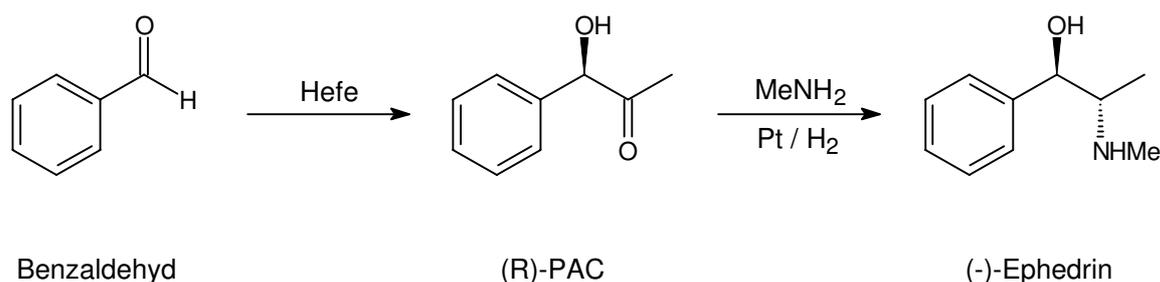


Abb 3-4 (-)-Ephedrin-Synthese nach dem Knoll-Verfahren [52]

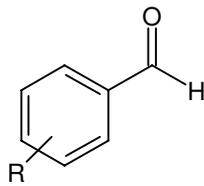
Die Optimierung des Prozesses war und ist Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte, die sich u.a. mit dem Screening geeigneter Hefespecies [95], verschiedenen Fermentationstechniken [96, 97], der Zellimmobilisierung [98, 99, 100] und dem Einsatz isolierter und immobilisierter PDC [101, 102] befaßten. In den letzten Jahren ist besonders die Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (PDCZ.m.) in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Das Enzym weist im Vergleich zu PDC aus *Saccharomyces cerevisiae* bessere thermische Stabilität und eine 3 – 4fach höhere spezifische Decarboxylase-Aktivität auf, synthetisiert unter gleichen Bedingungen allerdings nur ein Fünftel der Menge an Phenylacetylcarbinol [92]. Durch Sequenzierung der beiden Enzyme und zielgerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, daß ein sterisch anspruchsvoller Tryptophanrest in Position 392, der im Hefeenzym durch einen Alaninrest ersetzt ist, für die geringe Affinität der PDCZ.m. gegenüber aromatischen Substraten verantwortlich ist [103]. Das entspre-

chende Enzym PDC W392A besitzt eine 3 – 4fach höhere Carboligase-Aktivität als der Wildtyp, zeigt jedoch auch geringere Stabilität. Diesbezüglich verbesserte Eigenschaften weisen die Mutanten PDC W392M und PDC W392I auf [104]. Bei der Firma Knoll (Minden) werden die veränderten Enzyme inzwischen industriell eingesetzt. Sie werden in *Escherichia coli* exprimiert und können mittels eines angefügten Affinitäts-Tags chromatographisch ohne großen Aufwand isoliert werden [persönliche Mitteilung].

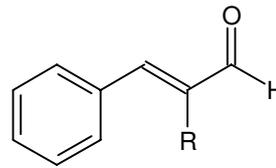
### 3.3.2 Substratspektrum

Wie unter 3.1.2 erwähnt, kann das bei der Decarboxylierung von Pyruvat mit PDC entstehende „aktive Acetaldehyd“ (Acyl-Donor) unter Knüpfung einer C-C-Bindung mit einem zweiten Aldehyd (Acyl-Akzeptor) als Cosubstrat reagieren. Fungiert Acetaldehyd auch als Acyl-Akzeptor, wird Acetoin gebildet. Die Fähigkeit der Pyruvatdecarboxylase, anstelle von Acetaldehyd andere Aldehyde als Cosubstrate zu akzeptieren, wurde seit der Beschreibung der Biosynthese von Phenylacetylcarbinol aus Benzaldehyd intensiv untersucht (Abb 3-5).

Fuganti und Grasselli inkubierten Bäckerhefe mit  $\alpha,\beta$ - ungesättigten aromatischen Aldehyden und konnten aus Zimtaldehyd,  $\alpha$ -Methylzimtaldehyd und  $\alpha$ -Bromzimtaldehyd als Endprodukte die um eine  $C_2$ -Einheit verlängerten ungesättigten Diole gewinnen, die durch Reduktion aus den entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxyketonen hervorgehen [105, 106]. Während auch Anisaldehyd zum Diol umgesetzt wurde, zeigten p-Chlor- und p-Nitrobenzaldehyd keine Reaktion. Stumpf et al. isolierten ebenfalls ausschließlich Diole, die durch Inkubation verschiedener Pilze (z.B. *Mucor*-Species) mit acyclischen  $\alpha,\beta$  -ungesättigten Aldehyden (u.a. Citral) entstanden waren [107, 108]. Beide Arbeitsgruppen betonten die offensichtlich strukturelle Notwendigkeit der Aktivierung der Aldehyd-Substrate durch die C=C-Doppelbindung.



R = H; Cl; F; CH<sub>3</sub>; OCH<sub>3</sub>; CF<sub>3</sub>; NO<sub>2</sub>



R = H; Br; CH<sub>3</sub>

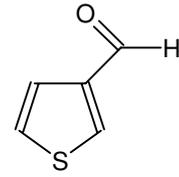
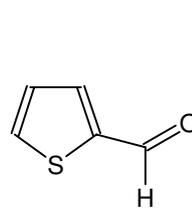
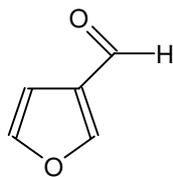
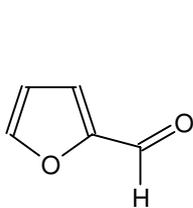


Abb 3-5 Strukturen aromatischer und heterocyclischer Aldehyde, die mit *S. cerevisiae* und / oder *Z. mobilis* zu Acyloinen umgesetzt wurden (Literaturverweise siehe Text)

Auch Ohta et al. isolierten keine Acyloine, sondern die entsprechenden Diolen, die durch Fermentation mit *S. cerevisiae* aus aromatischen Aldehyden hervorgegangen waren [109]. Als einziger Substituent inhibierte die Trifluormethyl-Gruppe die gewünschte Reaktion, alle anderen getesteten Benzaldehyd-Derivate (-CH<sub>3</sub>, -F, -Cl, NO<sub>2</sub> oder -OCH<sub>3</sub>) wurden zu den Diolen transformiert.

Long et al. untersuchten ebenfalls die Umsetzung aromatischer Aldehyde mit -CH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -Cl oder -OCH<sub>3</sub>-Gruppen als Substituenten in ortho-, meta- und para-Position durch *S. cerevisiae* [110, 111]. Alle Substrate wurden zu Acyloinen transformiert, wobei die Ausbeuten stark von der Art und Stellung der Substituenten abhingen, in jedem Fall aber niedriger als für Benzaldehyd waren.

Crout et al. inkubierten Pyruvatdecarboxylase aus *S. cerevisiae* mit verschiedenen aromatischen (-Cl oder -F als Substituenten), heterocyclischen (Furfural, Formylthiophen) und aliphatischen Aldehyden (Acetaldehyd, Propanal) [42, 112]. Auch hier erfolgte in allen Fällen ein Umsatz zu den  $\alpha$ -Hydroxyketonen, wobei sich 2-Fluor-, 2-Chlor- und 2,3-Difluorbenzaldehyd im Vergleich zu Benzaldehyd als quantitativ bessere Substrate erwiesen. In einer späteren Arbeit mit PDC aus *Z. mobilis* und *S. cerevisiae* wird erwähnt, daß

eine Anzahl weiterer aliphatischer Aldehyde nicht umgesetzt werden konnte, ohne diese näher zu nennen [113].

Die einzige bekannte Studie, die sich ausführlicher mit der Acyloinbildung aus aliphatischen Aldehyden befaßt, datiert von 1968 [114]. Gärenden Kulturen von Bäckerhefe wurden die geradkettigen gesättigten Aldehyde von C<sub>7</sub> bis C<sub>12</sub> zugesetzt. In allen Fällen wurden in der DC zwei neue 2,4-Dinitrophenylhydrazin-positive Zonen nachgewiesen, die jeweils dem C<sub>2</sub>-verlängerten Ketol und dem entsprechenden Diketon zugeordnet wurden.

Literatur, die sich mit der Variation der an der Acyloinreaktion beteiligten 2-Oxosäure beschäftigt, ist wenig umfassend. Fuganti et al. konnten mit *S. cerevisiae* 2-Oxobutansäure und 2-Oxopentansäure, nicht aber 2-Oxoisopentansäure mit Benzaldehyd und Zimtaldehyd umsetzen; isoliert wurden wiederum die Diole als unmittelbare Reduktionsprodukte der  $\alpha$ -Hydroxyketone [78].

Cardillo et al. stellten fest, daß von 4 untersuchten Hefespecies nur *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage war, aus Benzaldehyd und 2-Oxopentan- sowie -isopentansäure die entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxyketone zu synthetisieren [115]. Bornemann et al. konnten mit PDC aus *Z. mobilis* nur mit Brenztraubensäure (bzw. Pyruvat) als einziger der getesteten 2-Oxosäuren Acyloinbildung erzielen [113].

### 3.3.3 Stereoselektivität

Die Bildung von PAC und anderen Acyloinen mit Hefe bzw. Pyruvatdecarboxylase ist, neben der Knüpfung einer neuen C-C-Bindung, vor allem aufgrund der großen Stereoselektivität der Reaktion interessant. Werden aromatische oder heterocyclische Aldehyde als Acyl-Akzeptoren eingesetzt, so entstehen in hohem Enantiomerenüberschuß die (R)- $\alpha$ -Hydroxyketone [16]. Dabei spielt es offenbar keine Rolle, ob *Zymomonas mobilis* oder *Saccharomyces cerevisiae* für die Transformation verwendet werden.

Bornemann et al. fanden, daß bei der Umsetzung von Benzaldehyd und einigen anderen aromatischen Aldehyden mit *Z. mobilis* - PDC die (R)-Acyloine in einem Enantiomerenüberschuß (ee) von  $\geq 97\%$  vorlagen [113]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Kren et al. mit *S. cerevisiae* - PDC (ee  $\geq 98\%$ ); wobei die optische Reinheit der mit intakten Hefezellen erhaltenen Produkte jeweils um 2 bis 22 % niedriger war [112].

Wanner hingegen konnte (R)-PAC aus Fermentationen mit *S. cerevisiae* nur in einem Enantiomerenüberschuß von 24 % isolieren, bestimmte jedoch für das ebenfalls entstandene (1R, 2S)-Phenylpropandiol einen ee-Wert von  $\geq 99$  % [47]. Er folgerte daraus, daß die in vorangegangenen Arbeiten beschriebenen hohen Stereoselektivitäten der enzymatischen Acyloinbildung fälschlicherweise aus den untersuchten Diolen abgeleitet worden waren, daß aber gerade der Reduktionsschritt erst zu den hohen optischen Reinheiten der Produkte führte. Für das aus Phenylacetaldehyd gebildete Produkt (R)-3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon bestimmte Wanner dagegen einen ee-Wert von 64 %, der seiner Meinung nach die tatsächliche chirale Induktion der PDC-katalysierten Acyloinbildung repräsentierte. Die höhere Enantiomerenreinheit im Vergleich zu PAC wurde auf fehlende Isomerisierung und damit Racemisierung zurückgeführt, da das tautomere 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon nicht nachgewiesen werden konnte.

Weniger strikt als mit aromatischen Substraten wird die Stereoselektivität beschrieben, wenn aliphatische Aldehyde transformiert werden. Während *S. cerevisiae* - PDC (R)-Acetoin mit etwa 50 % ee produziert, weist das mit *Z. mobilis* - PDC erhaltene Acetoin (S)-Konfiguration mit etwa 25 % ee auf [116, 93].

Mit Hilfe von Molecular-Modelling-Studien wurden die Gründe für diese unterschiedlich strikte Stereochemie der Produkte in Abhängigkeit von der Struktur der Substrate untersucht [113, 79]. Ausschlaggebend ist offensichtlich ein Isoleucinrest in Position 476 (PDCS.c.), dessen Raumanpruch einen Angriff aromatischer Aldehyde nur an deren *si*-Seite erlaubt, was zum entsprechenden (R)-Acyloin führt. Das deutlich kleinere Acetaldehyd kann dagegen in beiden möglichen Positionen gebunden werden, da die energetischen Unterschiede sehr gering sind. Warum *Z. mobilis* und *S. cerevisiae* unterschiedliche Acetoin-Konfigurationen bevorzugt synthetisieren, ist nicht geklärt.

### 3.4 Bildung von $\alpha$ -Hydroxyketonen mit *Zygosaccharomyces bisporus*

In vorausgegangenen Studien war die Fähigkeit von *Zygosaccharomyces bisporus* CBS 702 zur Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen aus Aminosäure-Precursoren festgestellt worden [18]. Da diese Verbindungen z.T. Aromaaktivität aufwiesen, sollte durch weiterführende Untersuchungen das Potential der Hefe bzw. des Schlüsselenzyms Pyruvatdecarboxylase zur Synthese strukturell diverser Acyloine mit olfaktorisch möglichst interessanten Eigenschaften analysiert werden.

### 3.4.1 Substratspektrum der Reaktion

#### 3.4.1.1 Aminosäuren und ihre Analoga

Der erste Abschnitt der Arbeit umfaßte die Untersuchung der Acyloinbildung aus Aminosäuren und ihren analogen 2-Oxosäuren durch fermentierende Kulturen von *Z. bisporus*. Neben den bereits bekannten Umsetzungen von Phenylalanin und Tyrosin konnten auch bei Supplementierung der Hefekulturen mit Valin, Leucin und Methionin die gesuchten  $\alpha$ -Hydroxyketone im Wachstumsmedium detektiert werden. Wurden als Precursoren die 2-Oxosäuren als (transaminierte) Analoga von Valin, Leucin und Isoleucin verwendet, konnte in allen drei Fällen Acyloinbildung beobachtet werden, die quantitativ höher als bei den entsprechenden Aminosäuren war (siehe 2.3.1). Die Absolutmengen lagen allerdings um zwei Größenordnungen unter denen der aromatischen Substrate (Phenylalanin, Phenylpyruvat, Tyrosin, 4-Hydroxyphenylpyruvat). Keine Acyloinbildung konnte neben Isoleucin für die Aminosäuren Glutaminsäure, Histidin und Threonin festgestellt werden.

Die Unterschiede in der Acyloin-Precursorwirkung der getesteten Aminosäuren lassen sich, wie die späteren Versuche mit isolierter Pyruvatdecarboxylase zeigten, nicht nur auf unterschiedliche Affinitäten der beteiligten 2-Oxosäuren und Aldehyde zur PDC zurückführen. Während Phenylacetaldehyd hier 3 – 5fach höhere Acyloinausbeuten als 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal und 3-Methylbutanal erbrachte, wurden die analogen 2-Oxosäuren Phenylpyruvat sowie 2-Oxo-3-methylbutansäure, 2-Oxo-3-methylpentansäure und 2-Oxo-4-methylpentansäure zu etwa gleich großen Mengen an  $\alpha$ -Hydroxyketonen umgesetzt (siehe 2.4.1.6).

Größeren Einfluß auf die Produktbildung scheint also der Metabolismus der einzelnen Aminosäuren in Hefezellen unter den gewählten Wachstumsbedingungen zu haben. Im Fall von Valin, Leucin und Isoleucin steht die Bildung der sogenannten „Fuselalkohole“ im Vordergrund [4], deren bevorzugte Synthese aus den entsprechenden Aldehyden möglicherweise dazu führt, daß diese nicht in ausreichender Konzentration für eine Weiterreaktion mit Pyruvatdecarboxylase zur Verfügung stehen (Abb 3-6).

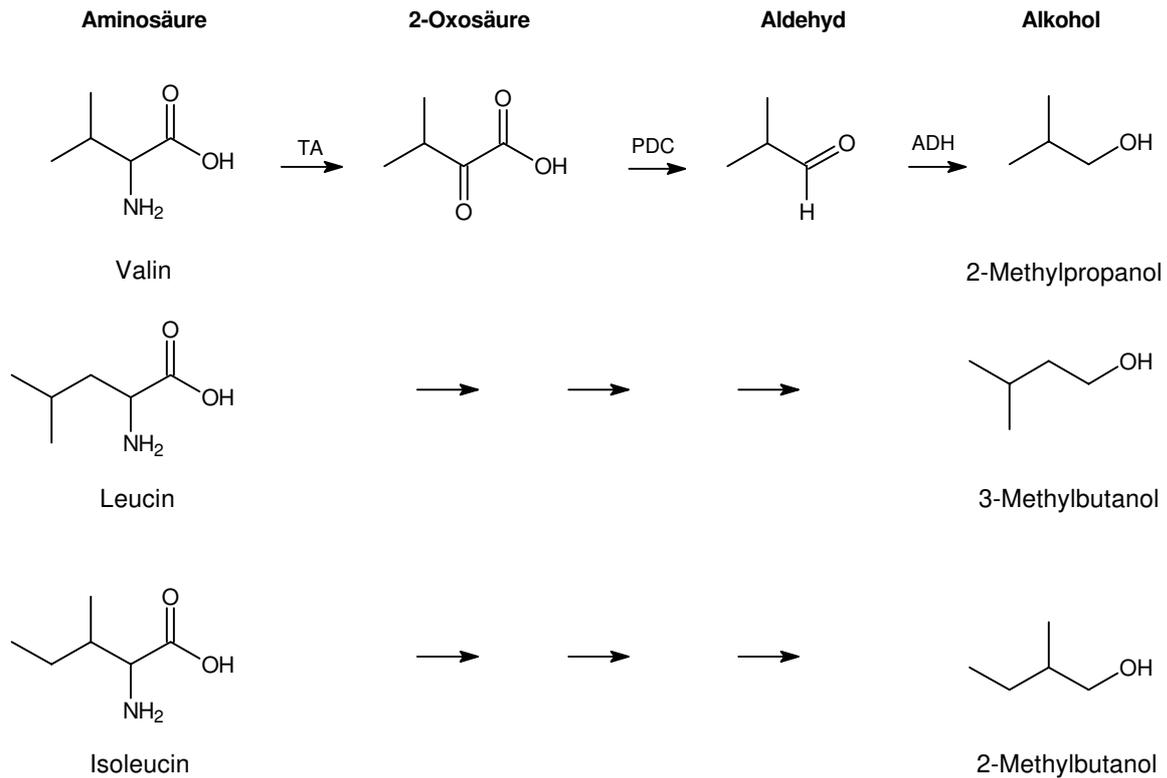


Abb 3-6 Bildung der „Fuselalkohole“ durch Hefen nach dem Schema von Ehrlich [117]

Wie verschiedene Untersuchungen zeigten, erfolgt die Biosynthese der Fuselalkohole aber auch teilweise oder vollständig außerhalb des sogenannten „Ehrlich-Weges“, also ohne Beteiligung der PDC [118, 119]. Beispielsweise entstehen die Alkohole während der Aminosäure-Synthese in einem anabolen Prozess aus Zuckerabbauprodukten. Das in dieser Arbeit beobachtete Vorliegen großer Mengen der Fuselalkohole im Fermentationsmedium der Hefe läßt als Rückschluß demnach nicht zwingend zu, daß die Vorstufen der Produkte (2-Oxosäuren und / oder Aldehyde) als Substrate der PDC-katalysierten Acyloinbildung verfügbar waren.

Darüber hinaus wird beschrieben, daß Valin, Leucin und Isoleucin sowie deren Abbauprodukte stärker als andere Aminosäuren in den assimilatorischen Stoffwechsel der Hefen mit einbezogen werden (vgl. z.B. [119]). Einen Überblick über den Zusammenhang von Aminosäure-Stoffwechsel und Bildung flüchtiger Sekundärmetabolite in Hefen zeigt Abb 3-7.

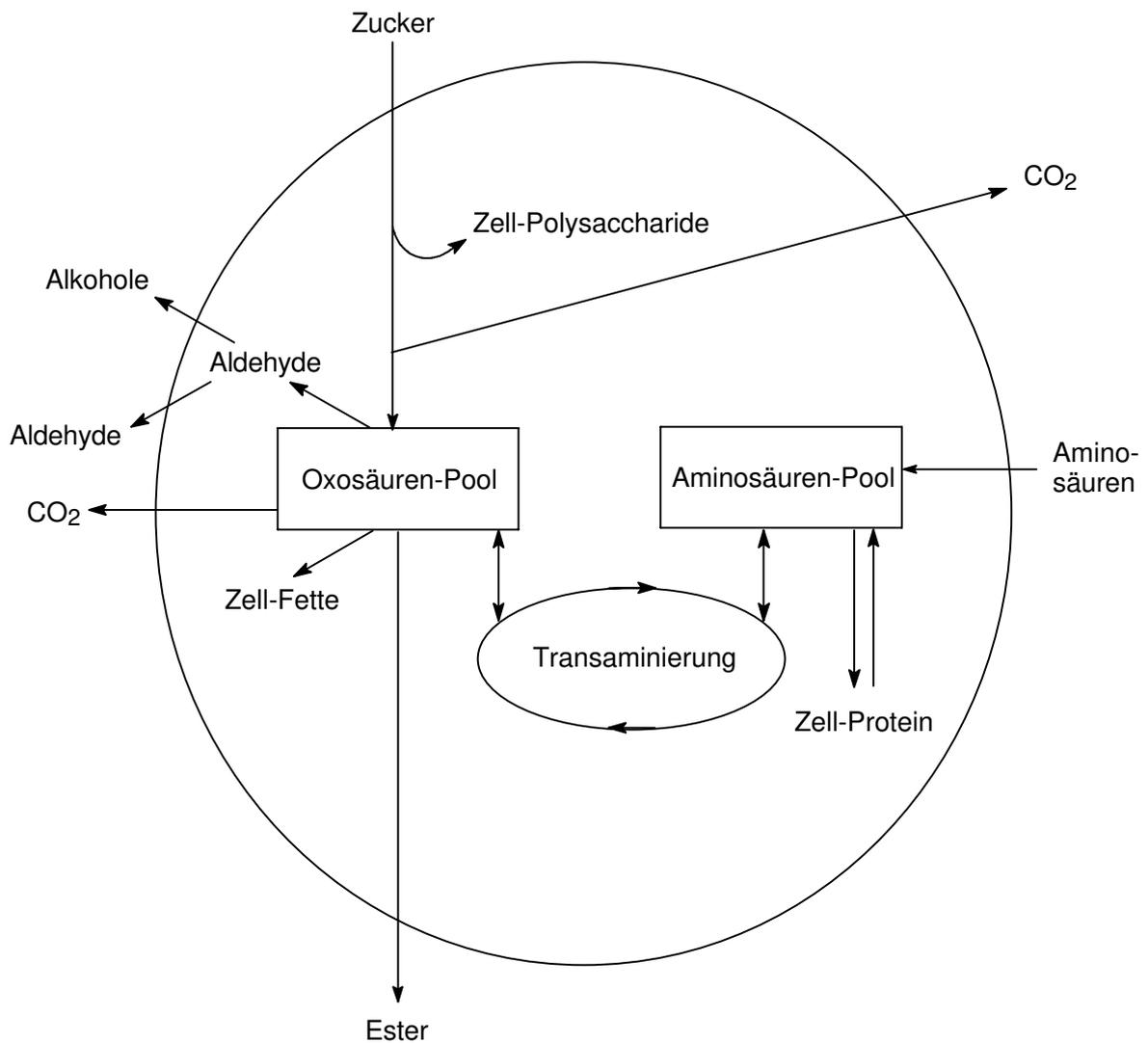


Abb 3-7 Bildung flüchtiger Sekundärmetabolite in Hefen (nach [120])

Tyrosin und die zugehörige 2-Oxosäure 4-Hydroxyphenylpyruvat stellten bei den Versuchen mit intakten Hefezellen von *Z. bisporus* die effektivsten Precursoren der Acyloinsynthese dar (vgl. 2.3.1). Wurde 4-Hydroxyphenylpyruvat mit isolierter Pyruvatdecarboxylase inkubiert, konnte jedoch keine entsprechende Produktbildung festgestellt werden. Gaschromatographisch ließen sich dagegen geringe Mengen von 4-Hydroxyphenylacetaldehyd detektieren, die auf eine erfolgte Decarboxylierung des Substrates hindeuten. Inhibierungsexperimente zeigten einen 73 %igen Aktivitätsverlust der PDC in Anwesenheit von 10 mM 4-Hydroxyphenylpyruvat. Für die Inkubationsversuche zur Acyloinbildung wurden jedoch etwa 10fach größere Substratkonzentrationen eingesetzt, um zu detektierbaren Produktmengen zu gelangen (als Anhaltspunkt wurde hier Phenylpyruvat herangezogen, dessen Umsatz mit intakten Hefezellen und Inhibierungswirkung der PDC mit denen von 4-Hydroxyphenylpyruvat vergleichbar waren). Wahrscheinlich konnte

deshalb unter den gewählten Bedingungen aufgrund der Hemmung des Enzyms keine Acyloinbildung nachgewiesen werden. Auch beim Einsatz deutlich geringerer Substratkonzentrationen (10 mM) waren keine  $\alpha$ -Hydroxyketone detektierbar; hier möglicherweise aufgrund zu geringer Produktmengen. Versuche mit 4-Hydroxyphenylacetaldehyd konnten nicht durchgeführt werden, da das Aldehyd kommerziell nicht verfügbar war und nicht in notwendiger Menge und Reinheit synthetisiert werden konnte.

Ähnliche Ergebnisse wie bei Tyrosin / 4-Hydroxyphenylpyruvat ließen sich, wie bereits erwähnt, auch für Phenylalanin und seine Analoga feststellen. Niedrigen Produktausbeuten bei der Transformation mit isoliertem Enzym stand sehr guter Umsatz durch fermentierende Hefekulturen gegenüber (jeweils im Vergleich zu den kurzkettenigen verzweigten Substraten oder Benzaldehyd). Physiologische Regulationsmechanismen in der Hefezelle führten hier offensichtlich zu einer Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen ohne Inhibierung der Pyruvatdecarboxylase.

Ausgeschlossen werden kann auch nicht, daß in *Z. bisporus* eine Decarboxylase existiert, die bevorzugt oder ausschließlich aromatische Substrate umsetzt. Derartige Phenylpyruvat-Decarboxylasen (PPDC, E.C. 4.1.1.43) sind vereinzelt in verschiedenen Organismen wie *Nocardia* [121] und *Acinetobacter calcoaceticus* [122] identifiziert worden. Auch ihr Vorkommen in *Candida guilliermondii* wurde postuliert [123]. Erst die Anwesenheit von Phenylalanin oder Phenylpyruvat induziert möglicherweise die Expression des Enzyms, das in seinen proteinchemischen Eigenschaften der Pyruvatdecarboxylase sehr ähnlich ist [121, 124]. Ein niedriger (postulierter) PPDC-Spiegel im Rohextrakt von *Z. bisporus* ließe sich demzufolge damit erklären, daß dem Wachstumsmedium bei der Biomasseproduktion zur anschließenden PDC-Isolierung kein Phenylalanin zugesetzt worden war. Da zudem bei der Enzymaufreinigung ausschließlich die Pyruvat-decarboxylierende Aktivität zur Selektion PDC-haltiger Fraktionen diente, ist trotz ähnlicher Enzymeigenschaften auch eine sukzessive Abreicherung eventuell vorhandener PPDC-Aktivität denkbar. Ergebnisse eines Versuchs bezüglich der Bildung des Acyloins 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (**1**) mittels isolierter PDC und eines Gesamt-Rohextraktes aus *Z. bisporus* entsprachen dieser Hypothese. Bei der Inkubation des Rohextraktes mit Phenylpyruvat wurde im Vergleich zu dem Enzymisolat mehr als die doppelte Menge an Verbindung (**1**) detektiert. Mit Phenylglyoxylat als aromatischem Substrat wurden allerdings gegenteilige Resultate erzielt.

Für Glutaminsäure konnte gezeigt werden, daß hier die analoge 2-Oxosäure (2-Oxoglutarsäure) nicht als Substrat der Pyruvatdecarboxylase akzeptiert wird (2.2.5). Hydrophile Eigenschaften und elektrostatische Wechselwirkungen der zweiten Carboxylgruppe verhindern offensichtlich die Bindung des Substrates im hydrophoben aktiven Zentrum des Enzyms. Dagegen wird der 5-Ethylester der 2-Oxoglutarsäure von *S. cerevisiae*-PDC als Substrat akzeptiert [34, 35]. In biomimetischen Studien konnte auch die enzymatische Acyloinbildung nachvollzogen werden [125]. Durch Lactonisierung entsteht hier anschließend 5-Oxo-4-hexanolid (Soleron) (Abb 3-8), ein bekannter Inhaltsstoff von Sherry, dessen Aromabeitrag inzwischen allerdings kontrovers diskutiert wird [126].

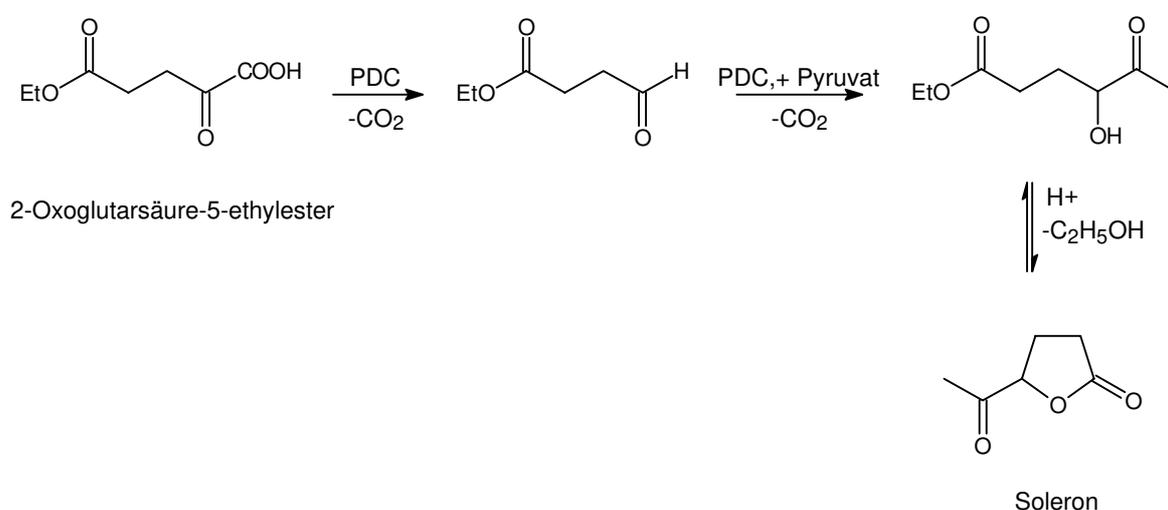


Abb 3-8 Postulierter Biosyntheseweg von Soleron [125]

Die Aminosäuren Histidin und Threonin wurden von *Z. bisporus* nicht zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen umgesetzt. Ob die transaminierten Analoga generell als Substrate der Pyruvatdecarboxylase dienen können, ließ sich in dieser Arbeit nicht klären, da die entsprechenden 2-Oxosäuren oder Aldehyde für Versuche mit isolierter PDC nicht zur Verfügung standen. Beispiele für die enzymatische Acyloinbildung aus heterocyclischen Aldehyden sind in der Literatur ausschließlich für Furan- und Thiophen-Derivate beschrieben, die jedoch nur sehr schlechte Substrate darstellen [113, 42]. Stickstoff-haltige Heterocyclen wurden bisher nicht untersucht. Im Fall von Threonin verhindert möglicherweise die  $\beta$ -Hydroxyl-Gruppe im Molekül, analog der  $\gamma$ -Carboxyl-Gruppe der Glutaminsäure, durch die erhöhte Hydrophilie der entsprechenden 2-Oxosäure die Bindung des Substrates im hydrophoben aktiven Zentrum der Pyruvatdecarboxylase.

### 3.4.1.2 Weitere Substrate

Neben den verschiedenen Aminosäure-Analoga wurden 13 weitere Aldehyde und zwei 2-Oxosäuren auf Acyloinbildung mittels isolierter Pyruvatdecarboxylase untersucht. Aus allen getesteten Substraten entstanden nach Inkubation mit Pyruvat bzw. Acetaldehyd die erwarteten  $\alpha$ -Hydroxyketone. Auch die Umsetzung von Benzaldehyd mit 2-Oxobutansäure führte zu einem Acyloin, das in diesem Fall um eine  $C_3$ -Einheit verlängert war (Abb 3-9).

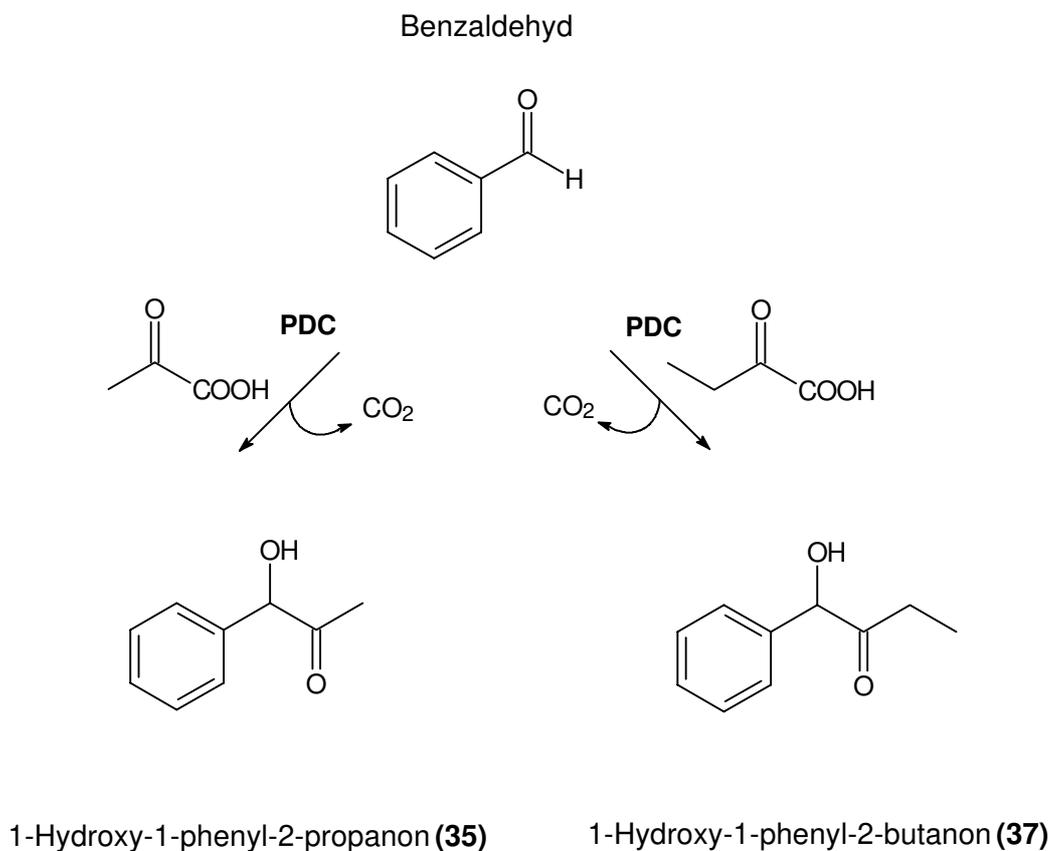


Abb 3-9 PDC-katalysierte Acyloinbildung aus Benzaldehyd und verschiedenen 2-Oxosäuren (2-Oxopropansäure bzw. Pyruvat und 2-Oxobutansäure)

Die dargestellten Ergebnisse belegen das breite Substratspektrum der Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* hinsichtlich der Acyloinbildung. Sie stehen zum Teil im Gegensatz zu verschiedenen Publikationen bezüglich *Saccharomyces cerevisiae*, was auf Unterschiede in der Substratazeptanz der Enzyme hindeutet. Die zitierten Arbeiten weisen allerdings auch untereinander z.T. erhebliche Differenzen auf, was unter anderem darauf zurückzuführen sein kann, daß in der Vergangenheit oft ver-

schiedene (nicht näher spezifizierte) Hefestämme von *S. cerevisiae* (auch in Mischkulturen) eingesetzt wurden. Sie werden verallgemeinernd oft mit dem Begriff „Bäckerhefe“ oder „Brauhefe“ bezeichnet, können sich in ihrer Enzymausstattung jedoch erheblich unterscheiden.

### 3.4.2 Quantitative Aspekte der Acyloinbildung mit isolierter PDC

Die Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen aus 2-Oxosäuren (und Acetaldehyd) führte im Vergleich mit den Umsetzungen der analogen Aldehyde (und Pyruvat) ohne Ausnahme zu geringeren Produktausbeuten. Dies beruht einerseits auf den geringeren Decarboxylierungsraten der Substrate im Vergleich zu Pyruvat, die in dieser Arbeit für Pyruvatdecarboxylase aus *Z. bisporus* ermittelt wurden und in der Literatur für *S. cerevisiae* und *Z. mobilis* beschrieben sind [34, 58]. So ergab sich die beste Acyloinausbeute der aliphatischen Substrate für 2-Oxobutansäure, welche nach Pyruvat auch die höchste Decarboxylierungsrate aufwies. Darüber hinaus ist jedoch auch das Enzym-Inhibierungspotential der 2-Oxosäuren zu berücksichtigen, das bei allen getesteten Substraten, die zu Acyloinen umgesetzt wurden, festzustellen war. Mit Ausnahme von 3-Methyl-2-oxopentansäure (27 % Inhibierung) betrug die inhibierende Wirkung aller Substratanaloga mehr als 60 % (bei  $C_0 = 100$  mM), d.h. die verbliebene Decarboxylase-Restaktivität der PDC war kleiner als 40 %.

In der Literatur beschriebene Markierungsexperimente zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus zeigten, daß z.T. auch stark inhibierend wirkende Substratanaloga durch PDC aus *S. cerevisiae* decarboxyliert werden [77]. Die Hemmung des weiteren Reaktionsverlaufes wird dadurch bedingt, daß das nach  $\text{CO}_2$ -Abspaltung gebildete Enamin aufgrund sterischer Einflüsse und Ladungsverhältnisse im Gleichgewicht mit der Carbanion-Form das bevorzugte (energieärmere) Intermediat darstellt, welches in der Folge nicht weiter reagiert („suicide inhibition“ [76]). Das entstandene Aldehyd wird demzufolge nicht oder nur sehr langsam aus dem Enzym-Produkt-Komplex freigesetzt und blockiert so das aktive Zentrum des Enzyms.

Ein Vergleich der Acyloinbildung aus strukturell diversen Aldehyden und Pyruvat zeigte, daß langkettige Substrate wie Hexanal, Heptanal und Octanal am besten umgesetzt wurden. Desweiteren konnten mit Benzaldehyd ähnlich hohe Produktmengen ( $> 1 \text{ g L}^{-1}$ ) erzielt werden (vgl. 2.4.3.6). Kettenverzweigungen oder ungesättigte Kohlenstoffbindungen

in  $\alpha,\beta$ -Position zur Carbonylfunktion hatten deutlich niedrigere Ausbeuten an Acyloinen zur Konsequenz. Letztgenannter Aspekt steht im Gegensatz zu den Arbeiten verschiedener Gruppen mit *S. cerevisiae* und verschiedenen *Mucor*-Spezies (vgl. 3.3.2). Sie stellten fest, daß gerade die C=C-Doppelbindung die strukturelle Notwendigkeit für den Umsatz der Aldehyde zu Acyloinen darstellte, während gesättigte Substrate keine Acyloinbildung ergaben. Diese Diskrepanz ist ein weiterer Hinweis auf die ungewöhnlich breite Substrat-akzeptanz der untersuchten Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* im Vergleich zu den Enzymen anderer Organismen.

Die Thiamindiphosphat-Bindungsstelle von Pyruvatdecarboxylasen verschiedener Herkunft wie auch anderer TDP-abhängiger Enzyme (z.B. Pyruvatoxidase) ist ein hochkonservierter Bereich. Die Umgebung des Cofaktors und der zum aktiven Zentrum führende Hohlraum werden durch hydrophobe Aminosäure-Reste dominiert [56, 32]. Analog dazu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit steigende Acyloinbildung mit abnehmender Polarität (zunehmender Kettenlänge) des aldehydischen Substrates. Die sterische Hinderung einer sekundären Methylgruppe bietet eine plausible Erklärung für die deutlich geringeren Produktausbeuten, die mit C2-verzweigten Aldehyden erzielt wurden. Ob die vergleichsweise schlechte Umsetzung der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Substrate auf sterische Gründe durch starre Molekülstruktur, eine Änderung der Elektronendichte (Reaktivität) am Carbonyl-Kohlenstoff oder Polaritätsunterschiede zurückzuführen ist, kann hier nicht abschließend beurteilt werden; wahrscheinlich tragen alle erwähnten Faktoren zu den beobachteten Effekten bei. Festzuhalten ist jedenfalls, das Benzaldehyd mit einem elektronenreichen, planaren Benzen-Substituenten zu den effektivsten Precursoren der Acyloinbildung zählte. Dagegen lag die Produktausbeute für Phenylacetaldehyd, bei dem die Carbonylgruppe nur durch eine Methylengruppierung vom aromatischen Ring getrennt ist, etwa um eine Größenordnung niedriger.

#### 3.4.2.1 Reaktionsbedingungen

Versuche mit variablen Konzentrationsverhältnissen der Substrate (Aldehyd : Pyruvat) zeigten, daß die höchsten Acyloinausbeuten bei Pyruvatkonzentrationen erzielt wurde, die dem 5-fachen der stöchiometrisch erforderlichen Menge entsprachen (siehe 3.4.3.5). Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß die Decarboxylase-Reaktion als Hauptaktivität der PDC mit größerer Geschwindigkeit als die Acyloinbildung als Nebenreaktion abläuft. Eine entsprechende Anzahl der Enzym-Produkt-Komplexe wird Acetaldehyd als Nebenprodukt

der Transformation freisetzen, bevor der Angriff des aldehydischen Cosubstrates erfolgt. Dieser Effekt kann durch das Vorhandensein eines Pyruvat-Pools oder eine kontinuierliche Zudosierung von Pyruvat kompensiert werden. Der Rückgang der Acyloinausbeute bei 10-fachem Pyruvat-Überschuß beruht wahrscheinlich auf der enzyminhibierenden Wirkung des freien Acetaldehyds [127].

Die Acyloinbildungsraten verschiedener Aldehyde wie Heptanal, Octanal und Benzaldehyd nahmen mit steigender Substratkonzentration bis hin zum hier gewählten Höchstwert ( $c_0 = 200 \text{ mM}$ ) stetig zu. In Analogie zu Studien der PAC-Synthese mit *S. cerevisiae* oder *Z. mobilis* ist davon auszugehen, daß eine Substratsättigung der Pyruvatdecarboxylase hinsichtlich der Aldehyde hier nicht erreicht werden konnte [102, 92]. Auffallend war dabei jedoch, daß eine Erhöhung der Produktausbeute auch oberhalb der Löslichkeitsgrenze der betreffenden Aldehyde mit zunehmenden Substratkonzentrationen zu beobachten war (Tab 3-2). Benzaldehyd weist beispielsweise eine Wasserlöslichkeit von etwa  $3 \text{ g L}^{-1}$  ( $\sim 30 \text{ mmol L}^{-1}$ ) auf, Heptanal und Octanal sind noch weniger wasserlöslich ( $< 1 \text{ g L}^{-1}$ ).

Der beschriebene Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, daß die organische Aldehyd-Phase eine kontinuierliche Aufrechterhaltung der (Löslichkeits-) Sättigungskonzentration der Substrate in der wäßrigen Phase bewirkt. Denaturierende Einflüsse der entstehenden organischen Phase oder inhibierende Wirkungen der Aldehyde waren bei den genannten Beispielen nicht festzustellen.

Tab 3-2 Wasserlöslichkeit einiger Aldehyde im Vergleich zu der Substratkonzentration, bei der die höchsten Acyloinausbeuten der enzymatischen Transformation erzielt wurden

Aldehyd	Wasserlöslichkeit		Substratkonzentration bei höchster Acyloinausbeute [mM]
	[g L <sup>-1</sup> ]	[mM]	
Propanal	200	3450	118
Butanal	37	514	118
Benzaldehyd	3,0	28	65
Octanal	< 1	< 8	118

### 3.4.3 Stereochemie und Isomerenverhältnis der gebildeten Acyloine

Die exemplarisch auf ihre Stereochemie untersuchten Umsetzungen von Benzaldehyd, Phenylacetaldehyd und Hexanal mit isolierter Pyruvatdecarboxylase aus *Z. bisporus* führten zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen, die überwiegend in der (R)-Konfiguration vorlagen (siehe 2.5.1). Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit Literaturangaben bezüglich der Stereoselektivität der Reaktion in anderen Organismen (vgl. Abschnitt 3.3.3).

Die höchsten Enantiomerenüberschüsse von  $\geq 98\%$  wies 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon (**35**) auf, das Produkt der Transformation von Benzaldehyd. Gleiche Ergebnisse und Zahlenwerte ergaben sich auch bei der Transformation von Phenylglyoxylsäure und der Hefefermentation von Benzaldehyd. Geringere Enantiomerenreinheit zeigten 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (**2**) (59 % ee) und 3-Hydroxy-2-octanon (**18**) (69 % ee). Die Ergebnisse können als Indiz für eine unterschiedlich strikte Stereospezifität der Reaktion in Abhängigkeit von der Substratstruktur gewertet werden. Auch für 3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin) wurden in verschiedenen Studien bereits niedrigere ee-Werte als für Verbindung (**35**) gefunden.

Möglich ist auch, daß experimentelle Bedingungen bei der Probenaufarbeitung Grund für die Unterschiede in den ermittelten Resultate sind. Anhand der zur Auswertung gleich behandelten enantiomerenreinen Standards konnte zwar belegt werden, daß es während der Isolierung (HPLC) und Derivatisierung von Verbindung (**2**) nicht zu einer signifikanten Isomerisierung oder Racemisierung des  $\alpha$ -Hydroxyketons kam. Dagegen deutete der gestiegene Isomerenanteil an (**17**) der mittels präparativer GC isolierten Substanz (**18**) darauf hin, daß hier Tautomerisierung in erheblichem Maß stattgefunden hatte (vorher 98 % (**18**), danach ca. 60 %).

$\alpha$ -Hydroxyketone stehen im allgemeinen im Gleichgewicht mit den ihnen isomeren  $\alpha$ -Hydroxyketonen (Abb 3-10).

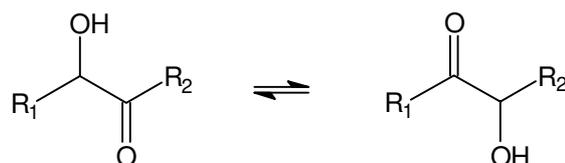


Abb 3-10 Isomerisierungs-Gleichgewicht sekundärer  $\alpha$ -Hydroxyketone via Keto-Enol-Tautomerie

Die Keto-Enol-Umlagerung wird durch verschiedene Katalysatoren wie Brönsted-Säuren und -Basen sowie Lewis-Säuren, aber z.B. auch durch Erhitzen begünstigt [40]. Das chirale Zentrum des Moleküls unterliegt dabei einer Racemisierung.

So beobachteten Herderich et al. bei der chiralen Analytik von Acyloinen mittels mehrdimensionaler GC-Methoden in Abhängigkeit von der Kopplungstechnik deutliche Isomerisierung oder sogar komplette Isomerisierung und Racemisierung der Zielsubstanzen [128]. Auch Crout et al. erklärten das Auftreten tautomerer Verbindungen bei der PDC-katalysierten Acyloinsynthese von 2-Hydroxy-3-pentanon (9 % Isomer) und 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon (23 % Isomer) mit chemischer Umlagerung der Keto-Enol-Funktion [42].

Bei der Pyruvatdecarboxylase-katalysierten Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen können die isomeren Verbindungen jedoch auch auf enzymatischem Weg entstehen, da die für die Acyloinbildung entscheidenden Schritte im PDC-Reaktionsmechanismus reversibel sind [104]. Das reaktive Carbanion-Enamin-Intermediat kann dementsprechend auch durch Bindung eines Aldehyds an das TDP-Carbanion und nachfolgende Deprotonierung entstehen und mit einem weiteren Aldehyd verknüpft werden (vgl. 3.1.2). Diese Annahme wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell dadurch belegt, daß in den Transformationsansätzen verschiedener Aldehyde als Nebenprodukte die symmetrischen  $\alpha$ -Hydroxyketone identifiziert werden konnten, die sich aus der Addition von 2 Molekülen des gleichen Aldehyds ableiten (Beispiel in Abb 3-11).

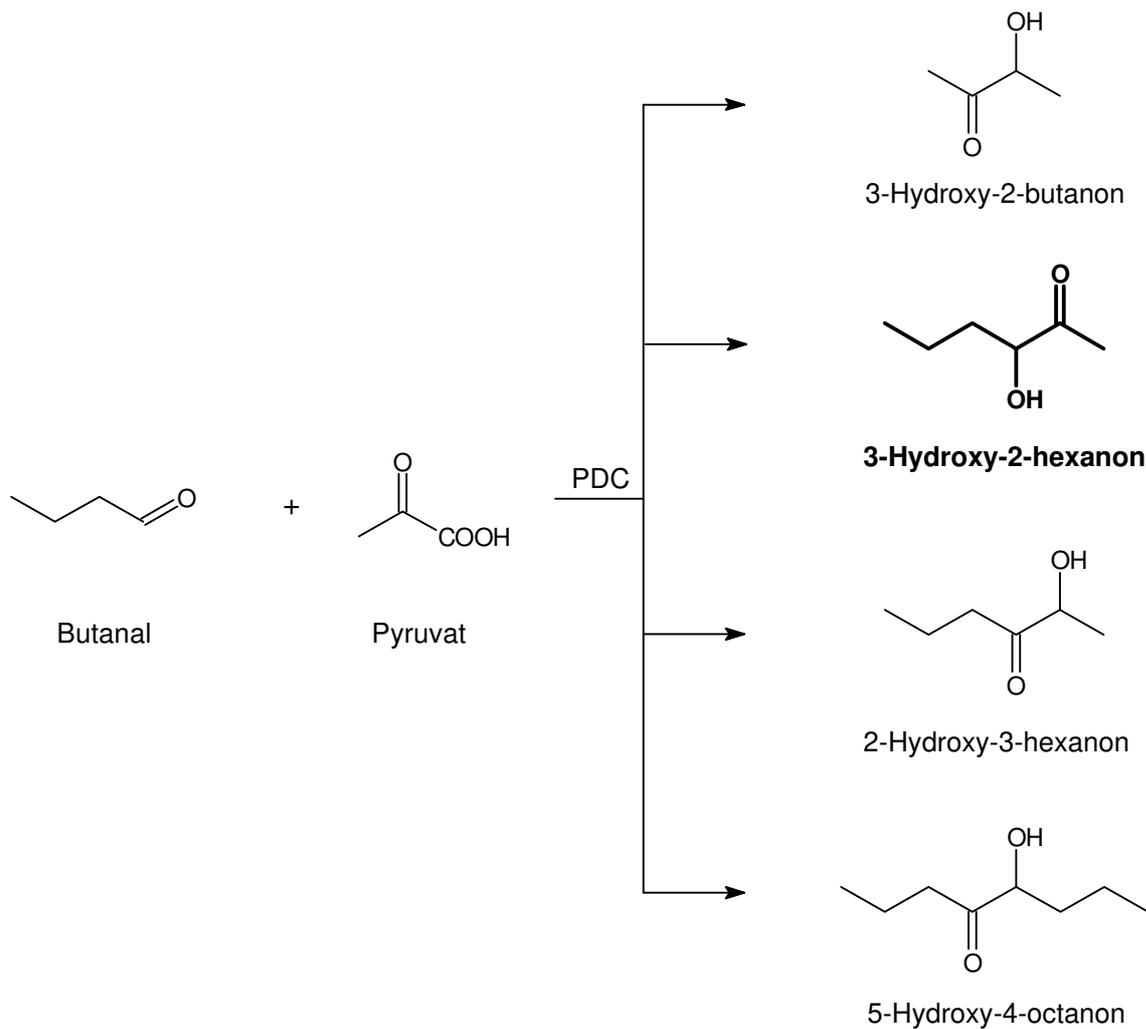


Abb 3-11 Produkte der PDC-katalysierten Transformation von Butanal und Pyruvat (Hauptprodukt fettgedruckt)

Demgemäß ist davon auszugehen, daß auch die tautomeren Acyloine der jeweiligen Transformations-Hauptprodukte zumindest teilweise auf enzymatischem Weg entstanden sind. Dafür sprechen auch das weitgehend zeitunabhängige Isomerenverhältnis (vgl. 2.4.2) und der deutliche Einfluß der Substrat- und damit Produktkonzentration auf den Tautomerenanteil (siehe 2.4.4). Die Acyloinbildung aus zwei Aldehyden läuft allerdings deutlich langsamer ab und führt zu erheblich niedrigeren Produktausbeuten als bei der Substratkombination Aldehyd + Pyruvat. Diese Tatsache ist auch für die Pyruvatdecarboxylase aus *S. cerevisiae* beschrieben und unterscheidet die beiden Hefe-Enzyme von der PDC aus *Z. mobilis*, die z.B. auch aus Acetaldehyd und Benzaldehyd deutliche Mengen PAC bilden kann [113].

Bei der Bewertung des für 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (**2**) gefundenen Enantiomerenüberschusses von 59 % ist zu berücksichtigen, daß der Anteil des Hauptisomers an der Gesamtacyloinmenge mit 84 bis 91 % deutlich unter den Werten für 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon (**35**) lag (97 bis 99 %). Unabhängig vom Bildungsweg des Tautomeren (**1**) (chemisch oder enzymatisch) ist bei diesem Konzentrationsverhältnis von einem Keto-Enol-Gleichgewicht auszugehen, das zwangsläufig durch Racemisierung zu einer Senkung der ursprünglichen Enantiomerenreinheit führen wird.

Unter demselben Aspekt ist auch die Stereochemie von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (**1**) zu betrachten. Während das Produkt der Hefefermentation aus Phenylalanin einen ee-Wert von 84 % aufwies, wurde für die Verbindung aus der enzymatischen Transformation von Phenylpyruvat ein deutlich geringerer ee-Wert von 30 % bestimmt. Beide Produkte lagen überwiegend in der (S)-Konfiguration vor. Geht man davon aus, daß die Bildungswege jeweils identisch unter Beteiligung von Pyruvatdecarboxylase ablaufen, ist die geringere Enantiomerenreinheit des mit isolierter PDC synthetisierten Acyloins (**1**) wahrscheinlich auf chemische Racemisierung infolge von Isomerisierung zurückzuführen. Der Anteil des bei der Transformation hauptsächlich gebildeten Isomers lag hier sogar nur zwischen 65 und 68 %, bei der Umsetzung mit intakten Hefezellen dagegen bei etwa 93 %. Theoretisch denkbar ist auch der unter 3.4.1.1 diskutierte Aspekt des zusätzlichen Vorhandenseins einer „Phenylpyruvat-Decarboxylase“ mit möglicherweise modifizierter Stereoselektivität, die im verwendeten Enzymisolat nicht oder nur kaum enthalten war.

Die PDC-katalysierte Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen der (S)-Konfiguration ist bisher nur in Ausnahmen beschrieben worden. Neben der Bildung von (S)-Acetoin durch *Zymomonas mobilis* wurde unlängst die Synthese von (S)-2-Hydroxy-1-phenyl-1-propanon (**36**) aus Benzaldehyd mittels einer *Z. mobilis*-PDC beobachtet, die durch zielgerichtete Mutagenese entstanden war (PDC/472A) [129]. Als Hauptprodukt entstand (R)-1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon (**35**), beide Verbindungen wiesen ee-Werte von 70 % auf. Die Mutante PDC/476E produzierte ausschließlich (S)-1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon (**35**) mit einem Enantiomerenüberschuß von 60 %.

Offensichtlich kommt die unterschiedliche Konfiguration der tautomeren Produkte der Acyloinsynthese durch veränderte strukturelle Bedingungen bei der Bindung der Substrate im aktiven Zentrum der PDC zustande. 3-Hydroxy-2-Oxo-Acyloine (z.B. auch Verbindung (**2**) und (**35**)) entstehen aus einem räumlich relativ kleinen Carbanion-Intermediat (TDP + Pyruvat bzw. Acetaldehyd) und einem relativ großen Aldehydmolekül (z.B.

Phenylacetaldehyd). 2-Hydroxy-3-Oxo-Acyloine (z.B. auch **(1)** und **(36)**) werden dagegen aus einem sterisch anspruchsvolleren Carbanion (TDP + Phenylpyruvat bzw. Phenylacetaldehyd) und einem verhältnismäßig kleinen Acetaldehyd-Molekül gebildet (vgl. Abb 3-3). Wechselwirkungen zwischen den Substraten und den Seitenketten verschiedener Aminosäuren im Hohlraum zum aktiven Zentrum des Enzyms sind wahrscheinlich der Grund für den räumlich unterschiedlichen Angriff des Cosubstrates am Carbanion. Je nach Größe und Struktur der beteiligten Edukte läßt sich so auch die unterschiedlich strikte Stereoselektivität der Reaktion erklären.

Die Festigung der diskutierten Hypothese mittels Isolierung und Bestimmung der Stereochemie von Verbindung **(36)** war nicht möglich, da diese bei den hier untersuchten Transformationen nur in sehr geringen Mengen vorlag. Die unerwartete Bildung von enantiomerenreinem Acyloin **(35)** auch aus Phenylglyoxylsäure läßt sich nur durch Bildung des reaktiven Carbanions aus Acetaldehyd und TDP und anschließender Addition eines Moleküls Benzaldehyd erklären (Abb 3-12). Die Reaktionsfolge wurde in diesem Ausmaß unter allen hier getesteten 2-Oxosäuren nur bei Phenylglyoxylsäure beobachtet und ist wahrscheinlich auf die hohe Affinität der PDC (bzw. des Carbanion-Intermediats) zu Benzaldehyd zurückzuführen.

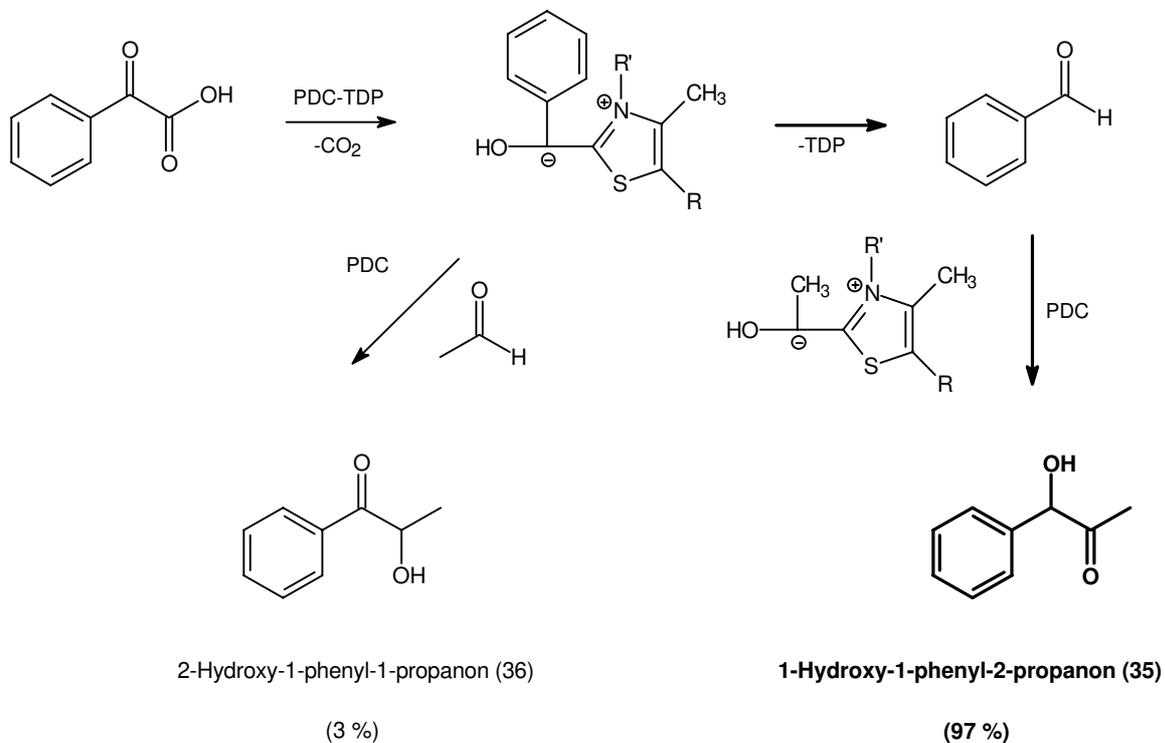


Abb 3-12 Umsetzung von Phenylglyoxylsäure mit isolierter PDC aus *Z. bisporus*

Die Bildung von (S)-konfigurierten  $\alpha$ -Hydroxyketonen aus 2-Oxosäuren und Acetaldehyd ist analog zu den hier vorgestellten Ergebnissen am Beispiel von Verbindung **(36)** bei der Umsetzung von Phenylglyoxylat mit Benzoylformat-Decarboxylase (BFD, EC 4.1.1.17, = Phenylglyoxylat-Decarboxylase) aus *Acinetobacter coalceticus* (ee  $\geq$  98 %) [130] und *Pseudomonas putida* (ee = 91 %) [131] beschrieben worden. Das tautomere Acyloin **(35)** wurde in beiden Fällen nicht identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Decarboxylase-katalysierte Acyloinbildung charakterisiert werden, bei der in Abhängigkeit von der Substratkombination überwiegend eines der beiden möglichen tautomeren Produkte in jeweils entgegengesetzter absoluter Konfiguration entsteht (Abb 3-13).

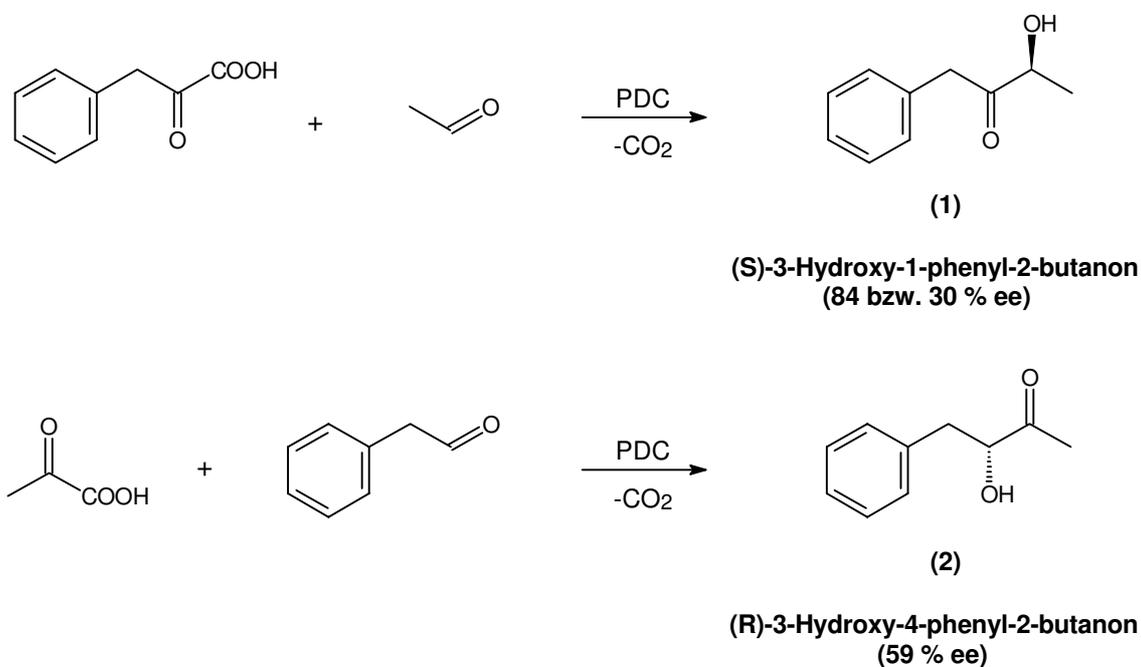


Abb 3-13 Bildung phenylbutanoider Acyloine unterschiedlicher Konstitution und Konfiguration mit Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus*

### 3.5 $\alpha$ -Hydroxyketone: Vorkommen und Bedeutung

Analog zu den Möglichkeiten der Pyruvatdecarboxylase-katalysierten Synthese werden hier nur sekundäre  $\alpha$ -Hydroxyketone behandelt.

#### 3.5.1 Natürliches Vorkommen

Acetoin (3-Hydroxy-2-butanon) ist das strukturell einfachste sekundäre  $\alpha$ -Hydroxyketon. Beide Enantiomere sind in Lebensmitteln weit verbreitet, oft als Nebenprodukte mikrobieller Stoffwechsellätigkeit. Die Substanz weist einen buttrigen Geruch und Geschmack auf und wird als Lebensmittel-Aromastoff z.B. in Margarine und Backwaren verwendet [132, 133].

Weitere  $\alpha$ -Hydroxyketone sind aus natürlichen Quellen nur vereinzelt beschrieben; in Lebensmitteln wurden am häufigsten 2-Hydroxy-3-pentanon und 3-Hydroxy-2-pentanon nachgewiesen (Tab 3-3).

Tab 3-3 Natürliches Vorkommen sekundärer  $\alpha$ -Hydroxyketone (<sup>a</sup> tropische Frucht)

$\alpha$ -Hydroxyketon	Natürliches Vorkommen
2-Hydroxy-3-pentanon	Käse [134, 135], Durian <sup>a</sup> [136], Kaffee [137], Wein [138], Honig [139], Butter [140]
3-Hydroxy-2-pentanon	Käse [134, 135], Durian <sup>a</sup> [136], Wein [141, 138], Bier [142], Spargel [143], Honig [139], Tee [144], Butter [140]
2-Hydroxy-3-hexanon	Wein [145]
3-Hydroxy-2-hexanon	Pheromon-Komponente verschiedener Insekten [43]
4-Hydroxy-3-hexanon	Durian <sup>a</sup> [136], Tee [146]
3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon	Mozzarella [39]
2-Hydroxy-3-octanon	Pheromon-Komponente einer Käferart [45]
3-Hydroxy-2-octanon	Rinderfett [147], Lammfett [148]
5-Hydroxy-4-octanon	Kakao [149]
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	Wein [141, 150], Sherry [151], Honig [152, 153], Blüten von <i>Mimusops elengi</i> , <i>Wisteria floribunda</i> und <i>Phlox paniculata</i> [154, 38, 37]
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	Blüten von <i>Phlox paniculata</i> [37]

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neben Acetoin 5 weitere  $\alpha$ -Hydroxyketone in Sherry und Sojasauce identifiziert werden (Tab 3-4). Von diesen war 2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon bisher nicht aus natürlicher Quelle beschrieben worden.

Tab 3-4 Vorkommen sekundärer  $\alpha$ -Hydroxyketone in Sherry und Sojasauce

$\alpha$ -Hydroxyketon	Lebensmittel
2-Hydroxy-3-pentanon	Sherry Fino, Sherry Amontillado, Sojasauce
3-Hydroxy-2-pentanon	Sherry Fino, Sherry Amontillado, Sojasauce
2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon	Sherry Fino, Sherry Amontillado
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon	Sherry Fino
3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon	Sherry Fino

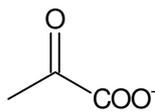
### 3.5.2 Mögliche Bildungswege

#### 3.5.2.1 Die PDC-katalysierte Reaktion

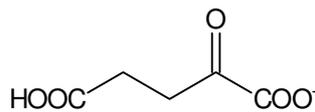
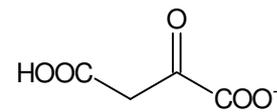
Die enzymatische Bildung sekundärer  $\alpha$ -Hydroxyketone im Laufe einer Nebenreaktion von Pyruvatdecarboxylase aus Hefe wurde in dieser Arbeit diskutiert (siehe 2.3.1.1 und 3.3). Obwohl 2-Oxocarbonsäure-Decarboxylasen auch in verschiedenen Pflanzen gefunden wurden, ist die Acyloinbildung bisher nur für die Enzyme aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Zymomonas mobilis* sowie einiger anderer Mikroorganismen beschrieben. Voraussetzung für die Biosynthese der Acyloine in Lebensmitteln würde demnach eine Fermentation durch Hefen sein. Diese sollte möglichst nicht durch *S. cerevisiae* dominiert werden, da, wie in dieser Arbeit gezeigt, von den Pyruvatdecarboxylasen sogenannter Wildhefen eine vielseitigere Substratazeptanz erwartet werden kann.

Von entscheidender Bedeutung für die Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen ist die Verfügbarkeit geeigneter Precursoren. Die PDC-katalysierte Reaktion erfordert 2-Oxosäuren und / oder Aldehyde als Substrate. Die Substanzen können aus endogener Quelle stammen (Hefe-Metabolismus) oder exogen im Lebensmittel vorliegen, sie müssen in diesem Fall durch die Zellwand in die Hefezellen transportiert werden.

2-Oxopropansäure (Brenztraubensäure, Anion: Pyruvat) kommt als Endprodukt der Glycolyse und Schlüsselsubstanz vieler weiterer Stoffwechselwege in Hefe und anderen Organismen in signifikanten Mengen vor. Die Decarboxylierung mittels PDC führt zu Acetaldehyd, das seinerseits auch als Edukt in der Acyloinbildung fungiert. Weitere 2-Oxocarbonsäuren entstehen vor allem während des Aminosäure-Metabolismus, sowohl auf anabolem als auch katabolem Weg (Transaminierung). So kann z.B. 2-Oxobutansäure sowohl durch Transaminierung von  $\alpha$ -Aminobuttersäure als auch bei der Biosynthese von Isoleucin aus Threonin oder beim Abbau von Methionin gebildet werden [3]. 2-Oxoglutarat ( $\alpha$ -Ketoglutarat) als bedeutendster Aminogruppen-Akzeptor der Transaminierung und Intermediat des Citronensäurecyclus liegt zwar in der Hefezelle frei vor, wird von der Pyruvatdecarboxylase jedoch nicht als Substrat akzeptiert. Ähnlich dürfte sich die Situation bezüglich Oxalacetat (2-Oxobernsteinsäure) verhalten, eines weiteren häufigen Metaboliten in Hefen und anderen Organismen (Abb 3-14).



Pyruvat

 $\alpha$ -Ketoglutarat

Oxalacetat

Abb 3-14 Strukturen wichtiger und häufig vorkommender 2-Oxocarbonsäuren des Stoffwechsels

Aldehyde können im Hefe-Stoffwechsel aus 2-Oxocarbonsäuren direkt durch Decarboxylierung gebildet werden. Ein weiterer Syntheseweg ist die Alkoholdehydrogenase-katalysierte Oxidation von Alkoholen, die gerade in Hefen jedoch bevorzugt in Richtung der Alkohole abläuft (Reduktion). In Lebensmitteln entstehen Aldehyde z.B. als Sekundärprodukte der Lipid-Peroxidation (Tab 3-5).

Tab 3-5 Aldehyde als Sekundärprodukte der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren ( $\mu\text{g g}^{-1}$  Fettsäure) [155]

Ölsäure		Linolsäure		Linolensäure	
Heptanal	50	Pentanal	55	2E-Butenal	10
Octanal	320	Hexanal	5100	2E-Pentenal	35
Decanal	370	Heptanal	50	2E-Hexenal	10
		2E-Heptenal	450		
		Octanal	45		
		2E-Octenal	420		

### 3.5.2.2 Alternative Biosynthesewege

Neben der PDC-katalysierten Synthese kann Acetoin auch aus der enzymatischen Decarboxylierung von 2-Acetolactat resultieren, welches wiederum aus Pyruvat und 2-Hydroxyethyl-TDP im Laufe der Biosynthese von Valin und Leucin gebildet wird (Abb 3-15). Analog kann 3-Hydroxy-2-pentanon aus 2-Oxobuttersäure und 2-Hydroxyethyl-TDP über 2-Aceto-2-hydroxybutansäure entstehen, die ein Intermediat der Isoleucinsynthese darstellt [4, 156].

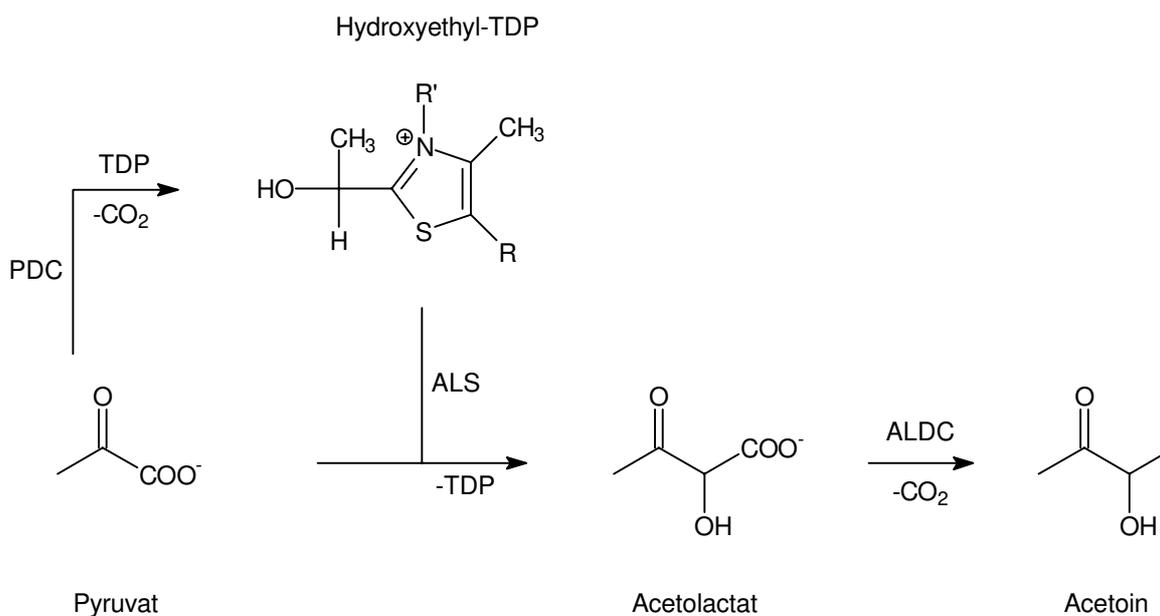


Abb 3-15 Biosynthese von Acetoin aus Acetolactat (ALS = Acetolactatsynthase, ALDC = Acetolactatdecarboxylase)

Acetoin und die 2 isomeren Hydroxypentanone liegen z.B. in Wein neben den jeweiligen Diolen (Butan-2,3-diol bzw. Pentan-2,3-diol) und Diketonen (Diacetyl bzw. Pentan-2,3-dion) vor. Sie werden als Redox-Systeme angesehen, wobei die Reduktionsschritte durch den Gewinn der Coenzyme NAD bzw. NADP bevorzugt sind (Abb 3-16) [138, 4].

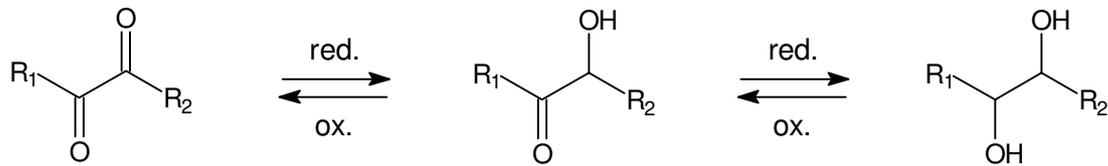


Abb 3-16 Redox-Systeme von Acetoin ( $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CH}_3$ ) und Hydroxypentanon ( $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ ;  $\text{R}_2 = \text{C}_2\text{H}_5$ ) in Wein

Die Diketone Butan-2,3-dion und Pentan-2,3-dion werden hauptsächlich nicht durch Oxidation der entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxyketone, sondern außerhalb der Hefezelle durch spontanen Zerfall von Acetolactat bzw. 2-Aceto-2-hydroxybutansäure gebildet [157]. Auch eine enzymatische oxidative Decarboxylierung der Vorstufen wird diskutiert. Aus den vicinalen Diketonen können dann entsprechend Abb 3-16 nach Reduktion die Acyloine und Dirole resultieren.

Diacetyl wird von verschiedenen Milchsäurebakterien nicht über Acetolactat, sondern aus Hydroxyethyl-TDP und Acetyl-CoA synthetisiert [156]. Liegt die Substanz in einem Lebensmittel vor, kann sie durch Hefen zu Acetoin und Butandiol reduziert werden und somit zu einer Erhöhung der Acetoin-Konzentration beitragen.

### 3.5.2.3 Zusammenfassung und Diskussion der Bildungswege

Die in Lebensmitteln am häufigsten identifizierten  $\alpha$ -Hydroxyketone sind 3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin) und die isomeren 2/3-Hydroxy-3/2-pentanone. Neben der PDC-katalysierten Acyloinbildung existieren für diese Substanzen verschiedene andere Biosynthesemöglichkeiten. Das verbreitete Vorkommen beider Enantiomere des Acetoin spricht dafür, daß hier tatsächlich unterschiedliche Bildungswege beschrrieben werden. Die Stereochemie der Hydroxypentanone ist bisher dagegen kaum untersucht. In Honig wurde (R)-2-Hydroxy-3-pentanone in einem Enantiomerenüberschuß von 20 % gefunden;

3-Hydroxy-2-pentanon wies einen ee-Wert von 30 % auf (absolute Konfiguration unbekannt) [139].

Die Struktur weiterer in den hier untersuchten (hefefermentierten) Lebensmitteln identifizierter  $\alpha$ -Hydroxyketone, die sich aus proteinogene Aminosäuren ableiten, weist dagegen auf ihre Bildung durch Pyruvatdecarboxylase hin (Abb 3-17).

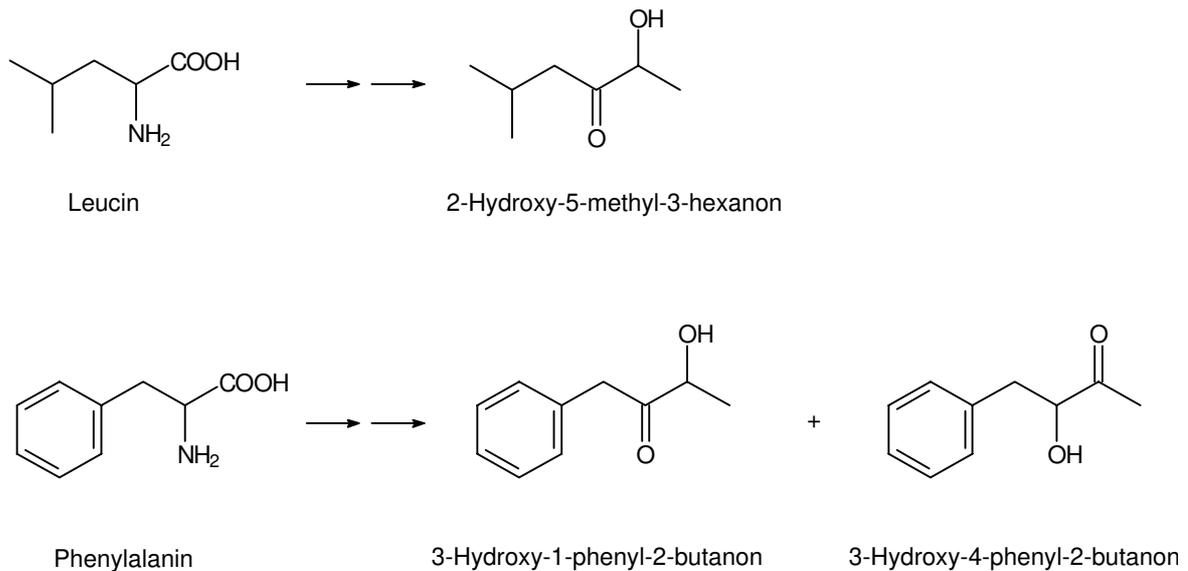


Abb 3-17 Strukturen der in Sherry identifizierten  $\alpha$ -Hydroxyketone und ihrer möglichen Aminosäure-Precursoren

Limitierender Faktor der Biosynthese von  $\alpha$ -Hydroxyketonen wird vor allem die Verfügbarkeit der erforderlichen Precursoren sein. 2-Oxocarbonsäuren und Aldehyde liegen zwar sowohl endogen in der Hefezelle als auch exogen im Lebensmittel aus verschiedenen Quellen vor. Entscheidend ist jedoch, ob die endogene Konzentration im Hefe-Cytosol ausreichend hoch ist, um die Reaktion in nennenswertem Ausmaß stattfinden zu lassen.

Pyruvatdecarboxylase aus *Z. bisporus* weist bereits für die Decarboxylierung des „natürlichen“ Substrates Pyruvat einen relativ hohen  $K_M$ -Wert von 1,73 mM auf. Auch für die Acyloinbildung waren meist Substratkonzentrationen  $> 50$  mM erforderlich, um zu signifikanten Produktmengen ( $> 1$  mM) zu gelangen. Da Hefen oft hohe ADH-Aktivitäten aufweisen, wird die intrazelluläre Konzentration an Aldehyden zu gering für Sättigungsbedingungen hinsichtlich der PDC-Reaktion sein. Die Hauptquelle von Acyloinen würden demnach 2-Oxosäuren darstellen, die nach Decarboxylierung direkt zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen

weiter reagieren können. 2-Oxosäuren wiederum entstehen hauptsächlich durch Transaminierung von Aminosäuren, die sowohl in Hefezellen als auch in den meisten Lebensmitteln in signifikanten Konzentrationen vorliegen.

Am Beispiel der untersuchten Sojasauce zeigte sich jedoch, daß proteinreiche Matrices allein keine hinreichende Voraussetzung für die Acyloinbildung sind. Vielmehr muß offensichtlich der Hefe-Stoffwechsel so gesteuert werden, daß andere metabolische Prozesse zugunsten der PDC-katalysierten Acyloinbildung zurücktreten. Sherry, in dem hier die größte Anzahl verschiedener  $\alpha$ -Hydroxyketone identifiziert wurde, weist beispielsweise vor der 2. Hefegärung einen Ethanolgehalt von 15 –16 Vol % auf [4]. In Analogie dazu sind die Ergebnisse vorausgegangener Studien hinsichtlich eines Nährmedien-Screenings zu betrachten. Die besten Acyloinausbeuten (hier von Verbindung **(1)**) ergaben sich für *Zygosaccharomyces bisporus* in einem Minimalmedium mit 8 Vol % Ethanol [18].

Weiterer Aufschluß über das Vorkommen und die Bildungswege von Acyloinen in Lebensmitteln kann durch umfassendere Proben-Screenings und stereochemische Untersuchungen der detektierten Substanzen erhalten werden.

### 3.5.3 Bedeutung als Aromastoffe

Neben Acetoin sind nur wenige andere  $\alpha$ -Hydroxyketone auf ihre olfaktorischen Eigenschaften untersucht worden. Diese finden zum Teil als Lebensmittel-Aromastoffe Verwendung (Tab 3-6).

Tab 3-6  $\alpha$ -Hydroxyketone als Aromastoffe ( - keine Angaben verfügbar)

$\alpha$ -Hydroxyketon	Geruch	Verwendung als LM-Aromastoff
2-Hydroxy-3-pentanone	Trüffel, erdig-nussig [134]	naturidentisch (Milchprodukte) [158]
3-Hydroxy-2-pentanone	Trüffel, Kräuter [134]; röstig, etherisch [138]	naturidentisch (Milchprodukte, Backwaren, Süßwaren, nichtalkoholische Getränke) [132, 158]
3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon	geschmolzener Käse [39]	-
5-Hydroxy-4-octanon	süß, buttrig, nussig [132]	naturidentisch (Backwaren, Süßwaren, nichtalkoholische Getränke) [132]
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanone	blumig [38]	-

In der vorliegenden Arbeit wurden 19 weitere aromaaktive  $\alpha$ -Hydroxyketone vorgestellt, 7 Verbindungen zeigten keinen charakteristischen Geruch (siehe 2.5.2). Die olfaktorischen Beschreibungen reichten von pilzig-erdigen bis zu blumigen, grün-grasigen und würzigen Noten. Unterschiede in der qualitativen oder quantitativen Geruchswahrnehmung in Abhängigkeit von der Stereochemie der Acyloine konnten anhand der zwei untersuchten Beispiele nicht festgestellt werden.

Als bifunktionelle, relativ polare Moleküle weisen die Acyloine Geruchsschwellen auf, die höher als bei bekannten Aromastoffen gleicher Kettenlänge mit Monofunktionalität liegen (Tab 3-7).

Tab 3-7 Vergleich der Geruchsschwellenwerte einiger Verbindungen mit C<sub>8</sub>-Gerüst

Substanz	Geruchsschwelle [ng / Geruchsreiz]
2-Hydroxy-3-octanon	40 – 50
3-Hydroxy-2-octanon	250 – 300
Octanal	0,5 - 0,9 [159]
1-Octanol	3 – 5 [159]

Die Vielzahl der geruchlich interessanten Acyloine und die Diversität der beschriebenen Geruchseindrücke zeigt das Potential dieser Substanzklasse zur Verwendung als Aromastoffe. Strukturelle Variationen könnten zu weiteren geruchsaktiven  $\alpha$ -Hydroxyketonen führen. So sind beispielsweise hier entsprechend dem Einsatz von *E*-ungesättigten Aldehyden überwiegend die *E*-ungesättigten Acyloine entstanden und charakterisiert worden. Für zahlreiche andere Aromastoffe mit Doppelbindungsstruktur ist jedoch beschrieben, daß die *Z*-Isomere geruchlich ansprechender und / oder geruchsintensiver als die *E*-konfigurierten Analoga sind [52]. Auch die Stellung der Doppelbindung kann die Aromawirksamkeit stark beeinflussen (Tab 3-8).

Tab 3-8 Vergleich der Geruchsschwellenwerte einiger ungesättigter Aldehyde [52]

Substanz	Geruchsschwelle [mg kg <sup>-1</sup> ]
<i>E</i> -2-Hexenal	17
<i>Z</i> -3-Hexenal	0,25
<i>E</i> -4-Heptenal	10
<i>Z</i> -4-Heptenal	0,8

Als problematisch kann sich dagegen die Stabilität der Verbindungen erweisen, da die tautomeren Acyloine meist unterschiedliche Geruchsschwellen und -qualitäten aufweisen.

Eine Alternative bietet sich mit der oxidativen Modifizierung der  $\alpha$ -Hydroxyketone zu den entsprechenden Diketonen an. Diese weisen meist deutlich geringere Geruchsschwellen als die Acyloine auf (Tab 3-9) [158, 4, 157, 160].

Tab 3-9 Geruchsschwellenwerte verschiedener Carbonyl-Verbindungen (- keine Daten verfügbar) [160]

Substanz	Geruchsschwellenwert [mg kg <sup>-1</sup> ]		
	Wasser	Wein	Bier
3-Hydroxy-2-butanon	0,055	150	17 - 50
Butan-2,3-dion	0,0065	3	0,1 - 0,3
Pentan-2,3-dion	-	-	0,9 - 1

Vicinale Diketone werden weitaus häufiger als  $\alpha$ -Hydroxyketone in Lebensmitteln identifiziert. Aufgrund ihrer Geruchsaktivität finden sie z.T. als Lebensmittel-Aromastoffe Anwendung (Tab 3-10). Interessant ist das aufgeführte Vorkommen verschiedener Diketone in Sojasauce, die in dieser Arbeit als potentielle Quelle von Acyloinen untersucht worden war. Möglicherweise werden  $\alpha$ -Hydroxyketone zwar gebildet, aber unter oxidativen Bedingungen anschließend in die Diketone umgewandelt.

Tab 3-10 Vorkommen und Verwendung von  $\alpha$ -Diketonen in Lebensmitteln [132, 168]

Diketon	Vorkommen (u.a.)	Geruch	Verwendung als LM-Aromastoff
Pentan-2,3-dion	Pfirsich, Erbse, Kartoffel, Tomate, Joghurt, Fisch, Hähnchen, Schweinefleisch, Weinbrand, Sojasauce	buttrig	Back- und Süßwaren, Getränke, Frühstückscerealien
Hexan-2,3-dion	Pfirsich, Hähnchen, Bier, Kaffee, Sojasauce	buttrig, süß, sahnig	Back- und Süßwaren, Getränke
Hexan-3,4-dion	Kaffee	buttrig, nussig, Mandel	Backwaren, Milchprodukte
Heptan-2,3-dion	Tomate, Rum, Pilze, Sojasauce	-	-
Heptan-3,4-dion	Kaffee	-	-
Octan-2,3-dion	Fisch, Hähnchen, Rind- und Lammfleisch, Kaffee, Tee, Pilze	-	-
Octan-4,5-dion	Kakao	-	-

### 3.6 Ausblick

Die Isolierung und Aufreinigung einer Pyruvatdecarboxylase aus *Zygosaccharomyces bisporus* führte zu einem Enzympräparat, das in der Gelpermeationschromatographie und in der SDS-Gelelektrophorese Homogenität zeigte. Zusätzliche in der Isoelektrischen Fokussierung erkennbare Proteinbanden zeigten in einer spezifischen Färbung ebenfalls PDC-Aktivität. Ob es sich dabei um PDC-Isoformen oder möglicherweise um Pyruvatdecarboxylasen unterschiedlicher Substratspezifität handelt, soll durch molekularbiologische Untersuchungen geklärt werden, die inzwischen vorangeschritten sind. Nach Lokalisierung des Strukturgens (bzw. der Strukturgene) besteht die Möglichkeit, das Enzym durch Expression in *Escherichia coli* in größerer Menge verfügbar zu machen.

Sowohl intakte Hefezellen als auch das isolierte Enzym wurden auf ihre Fähigkeit zur Acyloinbildung untersucht, die eine Nebenaktivität der Pyruvatdecarboxylase darstellt. Durch Inkubation des Enzymextraktes mit strukturell verschiedenartigen 2-Oxocarbonsäuren und Aldehyden (aromatisch, aliphatisch: gesättigt, ungesättigt, verzweigt, unverzweigt) konnten insgesamt 38  $\alpha$ -Hydroxyketone synthetisiert werden. 11 dieser Verbindungen sind bisher aus „natürlicher Quelle“ bekannt (Hefe-Fermentationen und enzymatische Umsetzungen eingeschlossen), 14 andere werden in der Literatur im Zusammenhang mit Synthesevorschriften erwähnt. Die übrigen 13 Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals identifiziert. Es kann davon ausgegangen werden, daß weiterführende Studien mit strukturell diversen (eventuell zu synthetisierenden) Aldehyden ebenfalls zur Bildung neuartiger Acyloine führen würden, da sich diesbezüglich bisher keine Einschränkungen in der Substratspezifität der verwendeten PDC gezeigt haben.

Das Pyruvatdecarboxylase-Isolat wies bei geeigneten pH- und Temperaturbedingungen 5 °C; pH 6,0) in Anwesenheit der Cofaktoren  $Mg^{2+}$  und TDP sehr gute Stabilität auf (96 % Restaktivität nach 24 h). Eine Optimierung der Acyloinbildung beschränkte sich auf die Parameter pH-Wert, Temperatur und Substratkonzentration. Die Produktausbeute ließ sich am Beispiel des Substrates Hexanal durch Variation der Pyruvatkonzentration auf 53 % (bezogen auf die eingesetzte Menge an Aldehyd) erhöhen. Weitere Verbesserungen der Syntheseleistung könnten möglicherweise durch eine kontinuierliche Substratzugabe, *in situ* erfolgende Produktabtrennung und / oder den Einsatz eines immobilisierten Enzympräparates erzielt werden.

Den Vorteilen einer Biotransformation mit isolierten Enzymen (wie Unterdrückung von Nebenreaktionen, höhere Produktkonzentration, leichtere Produktisolierung) stehen in diesem Fall erhebliche Kosten gegenüber. Sowohl das Substrat Pyruvat als auch insbesondere der Cofaktor Thiamindiphosphat sind verhältnismäßig teure Chemikalien. Ihre exogene Zugabe ließe sich bei Anwendung einer Fermentation mit intakten Hefezellen vermeiden. Nachteilig wirken sich in diesem Fall allerdings z.B. die Zelltoxizität von Aldehyden und die überwiegende Bildung von Beiprodukten (Alkohole) aus.

23 der hier untersuchten  $\alpha$ -Hydroxyketone wiesen in der GC-O interessante geruchsaktive Eigenschaften auf, die größtenteils noch nicht beschrieben waren. Ihr möglicher Einsatz als Lebensmittel-Aromastoffe wird durch rechtliche Einschränkungen bzw. Definitionen limitiert, da aktuell vor allem natürliche Zusatzstoffe vom Verbraucher gewünscht und akzeptiert werden. Produkte aus enzymatischen oder mikrobiologischen Verfahren gelten jedoch nur dann als „natürliche“ Aromastoffe, wenn sie in einem Lebensmittel pflanzlicher oder tierischer Herkunft natürlicherweise vorkommen (herkömmliche Zubereitungsverfahren wie Rösten oder Fermentieren eingeschlossen). Zudem müssen die Ausgangsstoffe der Biotransformation pflanzlichen oder tierischen Ursprungs sein. Werden die genannten Anforderungen nicht erfüllt, wird der Aromastoff als „künstlich“ eingestuft [161]. Nur ein kleiner Teil der in dieser Arbeit untersuchten  $\alpha$ -Hydroxyketone wurde allerdings bisher in Lebensmitteln nachgewiesen (insgesamt 8) und könnte somit bei entsprechender Herstellung als natürlich deklariert werden. Es ist jedoch fraglich, ob die genannten Begriffsdefinitionen und rechtlichen Vorgaben in Zukunft Bestand haben werden.

---

## 4 Experimenteller Teil

---

### 4.1 Materialien und Chemikalien

#### 4.1.1 Organismus

In der vorliegenden Arbeit wurde der Hefestamm *Zygosaccharomyces bisporus* CBS 702 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande) verwendet. Die Stammhaltung erfolgte bei 4 °C in Schrägagar-Röhrchen auf GPY-Agar.

#### 4.1.2 Lösungsmittel

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

Tab 4-1      Verwendete Lösungsmittel

<b>Lösungsmittel</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Verwendung</b>
Aceton	redest.	Hoechst	Reinigung
Dichlormethan	redest.	Hoechst	Extraktion
Diethylether	redest.	Kraemer & M	Extraktion, Synthesen, Säulenchromatographie
Dimethylsulfoxid	puriss., absolut	Fluka	Synthesen
Ethanol, unvergällt	redest.	Kraul und Wilkening	Nährmedien
Ethylacetat	reinst	Riedel-de Haen	Extraktion
n-Hexan	HPLC	Roth	präp. HPLC
Isopropanol	HPLC	Fluka	präp. HPLC
Methanol	HPLC	Baker	Lösungsmittel f. Standards
Methanol	redest.	Bayer	Synthesen
Pentan	redest.	BASF	Extraktion, Säulenchromatographie
Pyridin	puriss., absolut	Fluka	Synthesen, Derivatisierungen
Tetrahydrofuran	puriss., absolut	Fluka	Synthesen

### 4.1.3 Weitere Chemikalien

Die meisten Chemikalien werden bei ihrer Anwendung in den Folgekapiteln spezifiziert; hier werden nur die häufig verwendeten Substanzen aufgeführt.

Tab 4-2 Häufig verwendete Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Verwendung</b>
Acetaldehyd	puriss.	Fluka	Enzymsubstrat
ADH (yeast)	500 U/mg	Sigma	Enzymassay
EDTA	f.d.Molekularbiologie	Merck	Pufferzusatz
HCl (37 %)	reinst	Riedel-de Haen	pH-Einstellung
2 <i>E</i> -Hexen-1-ol	pract.	Fluka	ISTD
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	reinst	Merck	Puffersubstanz
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	puriss.	Fluka	Puffersubstanz
KOH	p.a.	Riedel-de Haen	pH-Einstellung
MES	≥ 90 %	Roth	Puffersubstanz
MgSO <sub>4</sub>	reinst	Riedel-de Haen	Enzymassay, Pufferzusatz
Tri-Natriumcitrat, Dihydrat	MicroSilect	Fluka	Puffersubstanz
NaCl	reinst	Riedel-de Haen	Pufferzusatz
NADH	98 %	Sigma	Enzymassay
NaHCO <sub>3</sub>	reinst	Riedel-de Haen	Synthesen
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	reinst	Riedel-de Haen	Trocknungsmittel
Natriumpyruvat	puriss.	Fluka	Enzymsubstrat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	f.d.Biochemie	Merck	Proteinfällung, Pufferzusatz
1-Phenylethanol	p.a.	Riedel-de Haen	ISTD
Thiamindiphosphat	97 %	Sigma	Enzymassay, Pufferzusatz

#### 4.1.4 Gase für Synthesen und Gaschromatographie

Die Luft für den Kompressor wurde durch einen Staubfilter der Raumluft entnommen und nach der Kompression zur Trocknung durch eine 5 x 30 cm Silicagelsäule geleitet.

Tab 4-3 Verwendete Gase

<b>Gas</b>	<b>Qualität</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Verwendung</b>
Ammoniak	wasserfrei	Gerling Holz & Co	Synthesen
Argon	5.0	Linde	Schutzgas Synthesen
Druckluft	getrocknet	Kompressor	Detektorgas/ Hilfgas
Helium	5.0	Linde	Trägergas (GC/MS)
Stickstoff	5.0	Linde	Spülgas
Wasserstoff	5.0	Linde	Trägergas/ Detektorgas

#### 4.1.5 Sonstige Hilfsmittel

Die meisten Geräte werden bei ihrer Anwendung in den Folgekapiteln spezifiziert.

Tab 4-4 Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Firma</b>
Autoklav	VST 50/70	Zirbus
Gefrierschrank	VX 350 Series 2	Jouan
Magnetrührer	Ikamag RH	Janke & Kunkel
Multi-Elektronikrührer	Multipoint HP	Variomag
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134	Büchi
Schüttler	Infors HT	Infors
Trockenschrank	UM 500	Memmert
Umlaufkühler	Frigomix U	B. Braun
Vakuumpumpe	Two Stage Nr.3	Edwards
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus

## 4.2 Chromatographie

### 4.2.1 Säulenchromatographie

#### 4.2.1.1 Adsorptionschromatographie an Kieselgel

Eine Glassäule (3 x 30 cm) mit Fritte (Por. 2) wurde mit Kieselgel 60 (70-230 mesh, Merck) befüllt und mit Pentan equilibriert. Nach Aufgabe der Probelösung in Pentan wurden die zu isolierenden Substanzen durch Variation der Lösungsmittelzusammensetzung (Pentan/Diethylether 100:0  $\Rightarrow$  0:100) eluiert und die Säule durch Spülen mit Methanol regeneriert.

### 4.2.2 Kapillargaschromatographie (HRGC)

#### 4.2.2.1 HRGC mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID)

Gaschromatograph:	Fisons GC 8000 Series
Injektor:	Cold on column, 40 °C
Vorsäule:	FS-CW deaktiviert, 3 m $\times$ 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule:	BC CW 20M, 30 m $\times$ 0,32 mm ID, 0,3 $\mu$ m Filmdicke (Leupold)
Detektor:	FID, 250 °C
Trägergas:	H <sub>2</sub> ; Vordruck: 50 kPa; Fluß: 3,5 mL min <sup>-1</sup>
Detektorgase:	H <sub>2</sub> :50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19
Temperaturprogramme:	I 40 °C (3 min), 3 °C min <sup>-1</sup> – 230 °C (20 min) II 40 °C (3 min), 4 °C min <sup>-1</sup> – 230 °C (5 min)

#### 4.2.2.2 HRGC mit Split-Splitless-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID)

Gaschromatograph:	Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series
Injektor:	Split-Splitless (1:10), 230°C, Splitöffnung nach 1 min

---

Vorsäule:	FS-Phenyl-Sil desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule:	Optima 5-MS, 30 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Detektor:	FID, 250 °C
Trägergas:	H <sub>2</sub> ; Vordruck: 70 kPa; Fluß: 2,5 mL min <sup>-1</sup>
Detektorgase:	H <sub>2</sub> : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19
Temperaturprogramme:	I 40 °C (3 min), 3 °C min <sup>-1</sup> – 280 °C (10 min) II 40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> - 280 °C (5 min)

#### 4.2.2.3 HRGC mit On-Column-Injektion und olfaktorischer Detektion (GC-O)

Gaschromatograph:	Satochrom (Sato)
Injektor:	Cold on column, 40 °C
Vorsäule:	FS-CW desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule:	CW 20M, 30 m × 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Detektor:	FID, 250 °C; Sniff-Port, 200 °C
Trägergas:	H <sub>2</sub> ; Vordruck: 50 kPa; Fluß: 3,3 mL min <sup>-1</sup>
Detektorgase:	H <sub>2</sub> : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 4 °C min <sup>-1</sup> - 230 °C (10 min)

#### 4.2.2.4 HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS)

##### GC 1:

Gaschromatograph:	GC 8000 (Fisons)
Injektor:	Cold on column, 40 °C
Trennsäule:	CW 20M, 30 m × 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Detektor:	MD 800 (Fisons)
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)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 4 °C min <sup>-1</sup> - 230 °C (20 min)

GC 2:

Gaschromatograph:	HP 5890 (Hewlett-Packard)
Injektor:	Cold on column, 40 °C
Trennsäule:	BC SE 54, 30 m × 0,32 mm ID, 0,4 µm Filmdicke (Leupold)
Detektor:	Mass Spectrometer 5989 A (Hewlett - Packard)
Trägergas:	He, Vordruck: 50 kPa
Temperaturen:	Ionenquelle 250 °C, Interface 250 °C, Quadrupol Massenfilter 100 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich:	<i>m/z</i> 33-300
Datenaufnahme:	MS HP-UX Chem Station, B06.01 Software
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> - 280 °C (10 min)

## 4.2.2.5 Präparative Gaschromatographie

Gaschromatograph:	GC 5890 Series II (Hewlett-Packard) mit MCS (Gerstel)
Injektor:	KAS-3 Kaltaufgabesystem (Gerstel), 40 °C
Autosampler:	HP 7673 (Hewlett-Packard), Injektionsvolumen 2 × 5 µL
Fraktionensammler:	PFS (Gerstel)
Säule 1:	OV 1 Fused silica, 3 m × 0,53 mm ID, 2 µm Filmdicke (Leupold)
Säule 2:	BC CW 20M, 25 m × 0,53 mm ID, 2 µm Filmdicke (Leupold)
Detektoren:	FID, 250 °C

Gase und Strömungen:	Trärgas: H <sub>2</sub> ; Fluß: 5 mL min <sup>-1</sup> Gegengase 1 und 2: H <sub>2</sub> ; 10 mL min <sup>-1</sup> Hilfsgase 1 und 2: H <sub>2</sub> ; 1 mL min <sup>-1</sup>
Detektorgase:	H <sub>2</sub> : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Temperaturen:	Transferleitung 200 °C, Verteiler 200 °C, Fallen 2 °C
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 4 °C min <sup>-1</sup> - 210 °C (10 min)
Datenaufnahme und Steuerung:	Vectra QS/16S (Hewlett-Packard) mit MCS 1.15 Software (Gerstel)

#### 4.2.2.6 Berechnung von Kovats-Indices

Die Kovats-Indices wurden nach folgender Formel berechnet:

$$KI = 100 \cdot N + 100 \cdot n \cdot \frac{(\log t'_A - \log t'_N)}{(\log t'_{N+n} - \log t'_N)}$$

mit:	N	=	Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyt eluiert
	n	=	Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans
	A	=	Analyt
	t'	=	relative Retentionszeit = Retentionszeit t – Totzeit t <sub>0</sub>

### 4.2.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

#### 4.2.3.1 Semipräparative HPLC

Pumpe 1 (Master):	Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Pumpe 2 (Slave):	Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Injektionsventil:	Rheodyne RH 7125 mit 2 mL Probenschleife
Säule:	Lichrosorb Diol 7 µm, 250 mm x 25 mm (Merck)
Degasser:	Shodex-Online-3-Kanal-Degasser

---

Detektor:	LC-UV-Detektor mit präparativer Meßzelle (Pye Unicam), $\lambda = 260 \text{ nm}$
Gradientenformer:	Jasco Dynamischer Hochdruckmischer
Fraktionensammler:	Foxy Fraction Collector 2200 (Isco Instrumentation), 20 mL Fraktionen
Flußrate:	$10 \text{ mL min}^{-1}$
Datenaufnahme:	Autochrom CIS mit Apex Software
Fließmittel A:	n-Hexan/Isopropanol 99:1
Fließmittel B:	Isopropanol
Gradient:	A:B 100:0 $\Rightarrow$ 95:5 in 80 min

#### 4.2.4 Chromatographie proteinhaltiger Proben

##### 4.2.4.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

FPLC-System:	Bio-Rad Econo System, bestehend aus Econo Sample Diverter SV 3, Econo Pumpe EP-1, Econo System Controller ES-1, Econo UV Monitor EM-1 und Econo Fraction Collector 2110
Schreiber:	Linear Chart Recorder Modell 500
Säule:	Phenyl Sepharose <sup>®</sup> 6 Fast Flow low sub, 2,5 cm x 50 cm, 45-165 $\mu\text{m}$ (Pharmacia Biotech)
Detektionswellenlänge:	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Flußrate:	$3,8 \text{ mL min}^{-1}$
Fließmittel A:	0,1 M Kaliumphosphat-Puffer; pH 6,0; 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2 mM EDTA, 5 mM $\text{MgSO}_4$
Fließmittel B:	0,1 M Kaliumphosphat-Puffer; pH 6,0; 2 mM EDTA, 5 mM $\text{MgSO}_4$
Gradient:	20 min 100 % A 20 min $\Rightarrow$ 80 min 100 % B 140 min 100% B

#### 4.2.4.2 Gelpermeationschromatographie (GPC)

##### System 1 (präparativ):

FPLC-System:	Siehe 4.2.4.1
Schreiber:	Siehe 4.2.4.1
Säule:	HiPrep <sup>®</sup> Sephacryl S-300 High Resolution; 2,6 cm x 60 cm, 25-75 µm (Pharmacia Biotech)
Detektionswellenlänge:	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Flußrate:	$1,0 \text{ mL min}^{-1}$
Fließmittel:	0,1 M Kaliumphosphat-Puffer; pH 6,0; 0,1 M NaCl ; 2 mM EDTA, 5 mM MgSO <sub>4</sub>

##### System 2 (analytisch):

Pumpe:	Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Injektionsventil:	Rheodyne RH 9125 mit 200 µL Probenschleife
Säule 1:	Superdex <sup>®</sup> 200 HR 10/30; 1 cm x 30 cm; 13- 15 µm (Pharmacia Biotech)
Säule 2:	Bio-Silect SEC-400 Column; 3,0 cm x 7,8 cm, 5 µm (Bio-Rad)
Detektor:	SPD-6AV UV/VIS Detektor (Shimadzu), $\lambda =$ 280 nm
Fraktionensammler:	LKB-Bromma 17000 Minirac
Flußrate:	$0,5 \text{ mL min}^{-1}$
Datenaufnahme:	Chromatopac C-R3A Integrator (Shimadzu)
Fließmittel:	0,1 M Kaliumphosphat-Puffer; pH 6,0; 0,1 M NaCl ; 2 mM EDTA, 5 mM MgSO <sub>4</sub>

#### 4.2.4.3 Ionenaustauschchromatographie (IC)

FPLC-System:	Siehe 4.2.4.1
Schreiber:	Siehe 4.2.4.1
Säule:	HiLoad <sup>®</sup> Q Sepharose <sup>®</sup> High Performance

---

	16/10 ; 1,6 cm x 10 cm, 24-44 $\mu\text{m}$ (Pharmacia Biotech)
Detektionswellenlänge:	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Flußrate:	$3,4 \text{ mL min}^{-1}$
Fließmittel A:	20 mM MES/KOH-Puffer; pH 6,5; 2 mM EDTA, 5 mM $\text{MgSO}_4$
Fließmittel B:	20 mM MES/KOH-Puffer; pH 6,5; 1 M NaCl; 2 mM EDTA, 5 mM $\text{MgSO}_4$
Gradient:	15 min 100 % A 15 min $\Rightarrow$ 75 min 100 % B 90 min 100% B

### 4.3 UV/VIS-Spektroskopie

Spektrometer:	Perkin Elmer Lambda 12
Datenaufnahme:	UV Win Lab (Version 2.0)
Schichtdicke der Küvette:	1 cm

### 4.4 Polarimetrie

Polarimeter:	Perkin Elmer Polarimeter 341
Lösungsmittel:	Trichlormethan
Wellenlänge:	$\lambda = 589 \text{ nm (Na)}$
Schichtdicke der Küvette:	10 cm
Temperatur:	$20 \text{ }^\circ\text{C}$

### 4.5 Gelelektrophorese

#### 4.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Angewendet wurde die Methode nach Laemmli [162]. Die SDS-Behandlung unter reduzierenden Bedingungen führt zu einer Trennung der Proteine vorwiegend aufgrund ihrer Molekülgröße bzw. Molekularmasse.

Stammlösungen (SL):

Tris-HCL-SL (pH 8,8):	1,5 M Tris (> 99,8 %, Pharmacia Biotech) mit 0,4 % (m/v) SDS (> 99 %, Roth); mit HCl auf pH 8,8 eingestellt
Tris-HCL-SL (pH 6,8):	0,5 M Tris mit 0,4 % (m/v) SDS; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt
SDS-SL:	20 % (m/v) SDS
APS-SL:	40 % (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (p.a. Riedel-De Haen), jeweils frisch angesetzt
Acrylamid-SL:	30 % (m/v) Acrylamid (Rotiphorese Gel A, Roth)
BIS-SL:	2 % (m/v) Bisacrylamid (Rotiphorese Gel B, Roth)
BPB-SL:	0,01 % (m/v) Bromphenolblau (Merck)
Glycerol-SL:	60 % (v/v) Glycerol (analytical grade, Serva)

Pufferlösungen:

5 x Kathodenpuffer:	0,25 M Tris mit 1,92 M Glycin (analytical grade, Serva) und 0,4 % (m/v) SDS
5 x Anodenpuffer:	0,25 M Tris mit HCl auf pH 8,8 eingestellt

Pipettierschema diskontinuierliches Gel:

Vernetzungsgrad:	C = 3 % (Crosslinking)	
	<u>Sammelgel (6 mL)</u>	<u>Trenngel (11 mL)</u>
Totalacrylamid:	T = 4,0 %	T = 12,5 %
Acrylamid-SL:	0,775 mL	4,450 mL
BIS-SL:	0,360 mL	2,060 mL
Bidest H <sub>2</sub> O:	1,355 mL	1,675 mL
Glycerol-SL:	2,0 mL	-
Tris-HCL-SL (pH 6,8):	1,5 mL	-
Tris-HCL-SL (pH 8,8):	-	2,8 mL
TEMED (99 %, Roth)	5 µL	5 µL
APS-SL:	5 µL	10 µL

Die Lösungen wurden vor Zugabe der Katalysatoren per Ultraschall entgast. Die Gele wurden in einer Gießkassette aus Glasplatten mit Slotformern auf eine Trägerfolie gegossen (Gel-Fix für PAGE, Serva) und für die Dauer der Polymerisation (über Nacht) mit 1-Butanol überschichtet. Gelmaße: 250 x 120 x 0,5 mm.

#### Probenvorbereitung:

Je 200  $\mu\text{L}$  Probe (Proteingehalt ca.  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurde mit 21  $\mu\text{L}$  Tris-HCL-SL (pH 8,8), 60  $\mu\text{L}$  SDS-SL, 16  $\mu\text{L}$  20 % (m/v) Dithiothreitol (research grade, Serva) und 33  $\mu\text{L}$  BPB-SL 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Proteinstandards wurden analog behandelt.

#### Elektrophorese:

Elektrophoresesystem:	Pharmacia LKB Multiphor II Flachgel-Elektrophoresekammer mit MultiDrive XL Power Supply
Pufferreservoirs:	1 + 4 verd. Elektrodenpuffer ( je 1 L)
Auftragsvolumen:	5 $\mu\text{L}$ ; Standards 2 $\mu\text{L}$
Bedingungen:	200 V; 50 mA; 30 W; 20 min (Probeneintritt) 800 V; 50 mA; 30 W; 1,5 h

Als Kontaktflüssigkeit zwischen Gel und Kühlblock dienten 2 bis 3 mL Kerosin. Für die Elektrodenbrücken wurden 2 Lagen Blottingpapier (Roth) verwendet.

#### Nachbehandlung:

Färbelösung:	0,1 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (95 %, Sigma); 40 % (v/v) EtOH; 10 % (v/v) Eisessig in bidest. $\text{H}_2\text{O}$ ; 30 min
Entfärber:	25 % (v/v) EtOH; 10 % (v/v) Eisessig; 6 h
Konservierung:	5 % (v/v) Glycerol; 1 h

Das Gel wurde anschließend mit einer vorgequollenen Cellophanfolie überspannt, getrocknet und zur Dokumentation eingescannt.

## 4.5.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die IEF wurden getrocknete Fertiggele verwendet (CleanGel IEF, Pharmacia Biotech), die vor Gebrauch nach Vorschrift rehydratisiert wurden.

### IEF-Gele:

Gelmaße:	125 x 110 x 0,43 mm (nach Rehydratisierung)
Gelmatrix:	Polyacrylamid T = 5 %; C = 3 %
Rehydratisierungslösung:	10 % (m/v) Sorbit (MicroSelect, Fluka); 650 µL Ampholyt mit bidest. H <sub>2</sub> O auf 10 mL; Ampholyt A: Bio-Lyte <sup>®</sup> 3/10 (BioRad) Ampholyt B: Servalyt <sup>®</sup> 3-7 (Serva)
Rehydratisierungsbedingungen:	10 mL Lösung pro Gel, 1 h

### Probenvorbereitung:

Die Proben wurden durch Ultrafiltration (Centriplus<sup>®</sup> Concentrators, Amicon, 100000 Da Ausschlußgrenze) bei 2500 g mit bidest. Wasser entsalzt und konzentriert (Proteingehalt ca. 10 mg mL<sup>-1</sup>). Die Proteinstandards wurden nach Vorschrift in bidest. Wasser gelöst.

### Elektrophorese:

Probenauftrag:	mit Lochband in der Gelmitte
Auftragsvolumen:	5 µL; Standards 2 µL
Bedingungen:	700 V; 6 mA; 4 W; 20 min (Vorfokussierung) 500 V; 4 mA; 4 W; 20 min (Probeneintritt) 1000 V; 7 mA; 7 W, 2 h (IEF)
Nachbehandlung:	Siehe SDS-PAGE

### 4.5.2.1 Aktivitätsfärbung

Zur besseren Zuordnung der in der IEF erhaltenen Proteinbanden wurde eine PDC-Aktivitätsfärbung durchgeführt [23]. Die Färbung beruht auf einer cyclischen Kondensation von 1,2-Dianilinoethan (DAE) mit *in situ* gebildetem Acetaldehyd, wobei ein weißes Präzipitat entsteht.

Die IEF-Gele (identische Auftragung rechts und links der Mitte) wurden nach der Elektrophorese in der Mitte geteilt und eine Hälfte 15 min bei Raumtemperatur in 400 mL 0,3 M Citratpuffer pH 6,0 (5 mM TDP; 5 mM MgSO<sub>4</sub>; 30 mM Pyruvat) inkubiert. Anschließend wurden 6 mL DAE-Lösung (0,4 % (m/v) in 40 %iger Essigsäure) zugegeben. Nach 5-10 min konnten die Enzymbanden als weiße Präzipitationslinien detektiert werden. Zum Vergleich wurde die zweite Gelhälfte mit einer Coomassie-Färbung behandelt.

Die Dokumentation der Gele erfolgte durch Abfotographieren mit einer digitalen Kamera (INTAS®, Göttingen; mit Videoprinter Mitsubishi P90).

## 4.6 Kultivierung von *Zygosaccharomyces bisporus* CBS 702

### 4.6.1 Kulturmedien

Die Medienbestandteile wurden in dest. Wasser gelöst, die Nährlösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und in 300 mL (100 mL Füllmenge) oder 500 mL Erlenmeyerkolben (300 mL Füllmenge) überführt. Die Kolben wurden mit Cellulosestopfen verschlossen, mit Alufolie abgedeckt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

#### SNL-Standardmedium nach Sprecher:

30	g L <sup>-1</sup>	Glucose-Monohydrat (Merck, f.d.Mikrobiologie)
4,5	g L <sup>-1</sup>	Asparagin-Monohydrat (Merck, reinst)
3,0	g L <sup>-1</sup>	Hefeextrakt (Merck, f.d.Mikrobiologie)
1,5	g L <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, f.d.Molekularbiologie)
0,5	g L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> (Riedel-De Haen, reinst)
1,0	mL L <sup>-1</sup>	Spurenelementesg.

mit 1 N KOH auf pH 6,0 eingestellt

#### Spurenelementlösung:

0,08	g L <sup>-1</sup>	FeCl <sub>3</sub> *6 H <sub>2</sub> O (Fluka, puriss.)
0,09	g L <sup>-1</sup>	ZnSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O (Fluka, puriss.)
0,03	g L <sup>-1</sup>	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O (Fluka, purum)
0,005	g L <sup>-1</sup>	CuSO <sub>4</sub> *5 H <sub>2</sub> O (Riedel-De Haen, chem. pure)
0,4	g L <sup>-1</sup>	EDTA

PDC-Medium:

50	g L <sup>-1</sup>	Glucose-Monohydrat
4,5	g L <sup>-1</sup>	Asparagin-Monohydrat
10	g L <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
1,5	g L <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,0	g L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub>
1,0	mL L <sup>-1</sup>	Spurenelementesg.

mit 1 N KOH auf pH 6,0 eingestellt

#### 4.6.2 Kulturführung

Vorkulturen:

Von der Schrägagar-Stammkultur wurden die Hefezellen mit einer Impföse in 100 mL SNL-Standardmedium überführt und 3 Tage im Schüttler bei 24 °C und 150 upm inkubiert.

Hauptkulturen:

Pro 100 mL Hauptkultur wurden 5 mL der Vorkultur unter sterilen Bedingungen in das Transformations- oder Wachstumsmedium pipettiert. Die Inkubation erfolgte im Schüttler bei 24 °C und 150 upm.

#### 4.6.3 Bestimmung der Zellmasse

Feuchtmasse:

Nach Zentrifugation der Hefekulturen wurde der Überstand sorgfältig abgegossen und die Zellmasse in den Zentrifugenbehältern ausgewogen.

Trockenmasse:

Ein aliquoter Teil der Hefekulturen wurde membranfiltriert (Cellulose-Acetat, 0,2 µm, Sartorius), der Filter 12 h bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend ausgewogen.

#### 4.6.4 Transformationen

##### Transformationsmedium 1:

entspricht SNL-Standardmedium

##### Transformationsmedium 2:

10 g L<sup>-1</sup> Glucose-Monohydrat  
8 Vol % Ethanol (unvergällt)  
0,5 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,0 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>  
2,0 mg L<sup>-1</sup> Vitamin B<sub>1</sub> (Thiaminhydrochlorid, >99 %, Fluka)  
2,0 mg L<sup>-1</sup> Vitamin B<sub>7</sub> (Biotin, >99 %, Fluka)  
2,0 mL L<sup>-1</sup> Spurenelementesg.  
mit 1 N KOH auf pH 6,0 eingestellt

Vitaminlösungen (sterilfiltriert) und Ethanol wurden nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

##### 4.6.4.1 Zusatz von Aminosäuren

Die Aminosäuren wurden portionsweise autoklaviert und den Transformationsmedien (100 mL) direkt nach Überimpfen der Hefevorkultur zugesetzt (Endkonzentration 10 mmol L<sup>-1</sup>). Die Fermentationszeit betrug 7 Tage.

Eingesetzte Aminosäuren:

- L-Phenylalanin (> 98 %, Sigma)
- L-Tyrosin (Sigma)
- L-Leucin (ICN)
- L-Isoleucin (biochem., Merck)
- L-Valin (> 99,5 %, Fluka)
- L-Threonin (> 99 %, Merck)
- L-Glutaminsäure (Na-Salz, > 98 %, Fluka)
- L-Histidin (biochem., Fluka)
- L-Methionin (> 99 %, Fluka)

#### 4.6.4.2 Zusatz weiterer Substrate

Von Aldehyden und 2-Oxosäuren wurden ethanolische Stammlösungen hergestellt (1 M). Je 500  $\mu\text{L}$  der Substratlösungen wurden den Transformationsmedien am 2. und 5. Tag der Fermentation zugesetzt (Endkonzentration  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Da das Transformationsmedium 2 in der Standardzusammensetzung keine Stickstoffquelle enthielt, wurde hier zusätzlich  $1 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zugegeben.

Eingesetzte Substrate:	Phenylbrenztraubensäure (Na-Salz, > 97 %, Fluka)
	4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (Na-Salz, > 98 %, Fluka)
	3-Methyl-2-oxo-butansäure (Na-Salz, > 97 %, Fluka)
	3-Methyl-2-oxo-pentansäure (Na-Salz, > 99 %, Fluka)
	4-Methyl-2-oxo-pentansäure (Na-Salz, > 98 %, Fluka)
	2-Oxo-glutarsäure (Na <sub>2</sub> -Salz, > 98 %, Fluka)
	Benzaldehyd (> 99 %, Fluka)
	Phenylacetaldehyd (> 95 %, Sigma)

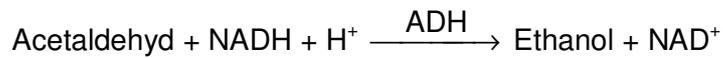
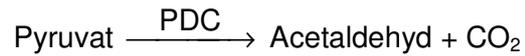
#### 4.6.5 Isolierung mittelpolarer Transformationsprodukte aus Hefekulturen

Die Hefekulturen (100 mL) wurden nach beendeter Fermentation mit internem Standard versetzt (1-Phenylethanol, methanolische Lösung, Endkonzentration  $4 \text{ mg L}^{-1}$ ). Die Abtrennung der Biomasse erfolgte durch Zentrifugation bei  $6000 \text{ g}$  (20 min;  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde mit  $3 \times 40 \text{ mL}$  Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel an einer Vigreux-Kolonnen abdestilliert. Der erhaltene Extrakt wurde mittels GC (4.2.2.1 und 4.2.2.2) und GC-MS (4.2.2.4) untersucht.

### 4.7 Proteinanalytik

#### 4.7.1 Aktivitätsbestimmung der Pyruvatdecarboxylase (PDC)

Die Bestimmung der PDC-Aktivität erfolgte mit einem gekoppelten enzymatischen Test nach Ullrich [163] gemäß dem folgenden Reaktionsschema:



Da ein Überschuß an ADH vorliegt, wird der durch die PDC katalysierte Reaktionsschritt geschwindigkeitslimitierend und die Abnahme der NADH-Konzentration ist direkt proportional zu der gebildeten Menge an Acetaldehyd. Die Reaktion wurde durch Messung der Extinktionsabnahme bei 340 nm verfolgt (Spektrometer mit temperierbarem Küvettenhalter).

Die Aktivität A berechnet sich nach:

$$A [\text{U mL}^{-1}] = \frac{\Delta E \cdot V_g}{V_p \cdot d \cdot \varepsilon}$$

mit  $\Delta E$  = Extinktionsabnahme pro Minute  
 $V_g$  = Gesamtvolumen in der Küvette [mL]  
 $V_p$  = Probenvolumen [mL]  
 $d$  = Schichtdicke der Küvette (1 cm)  
 $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient von NADH  
 (6,3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 340 nm)

Per Definition entspricht eine Enzymeinheit U (Unit) der Enzymmenge, die 1  $\mu\text{mol}$  Pyruvat in einer Minute bei 25 °C umsetzt.

Testansatz:

Volumen	Lösung	Endkonzentration in der Küvette
2,0 mL	0,1 M Citrat-Puffer, pH 6,0	2 mM TPP, 20 mM MgSO <sub>4</sub>
40 $\mu\text{L}$	1 M Natriumpyruvatlsg.	20 mM
20 $\mu\text{L}$	20 mM NADH-Lsg.	0,2 mM
20 $\mu\text{L}$	ADH-Lsg. (500 U mL <sup>-1</sup> )	5 U mL <sup>-1</sup>

mischen, Start der Reaktion durch Zugabe von 5-50  $\mu\text{L}$  PDC-Lösung

### 4.7.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung wurde unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Farbstofflösung (Roti<sup>®</sup>-Quant, Roth) nach der Methode von Bradford [164] durchgeführt. Der Assay beruht auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue, wobei in saurer Lösung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm auftritt.

Testansatz:	1,5 mL	0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0
	100 µL	Probelösung
	400 µL	Farbstoffkonzentrat

Nach 10 min Reaktionszeit wurde die Extinktion bei 595 nm spektrophotometrisch gegen einen Reagentienblindwert gemessen. Die Kalibriergerade wurde in einem Bereich von 50 bis 400 µg mL<sup>-1</sup> mit Rinder-Serumalbumin (BSA; Fluka) als Standard erstellt.

### 4.7.3 Isolierung und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase

#### 4.7.3.1 Biomasse-Bildung

Die Fermentation der Hefezellen erfolgte in einem Medium mit hohen Gehalten an Glucose und Hefeextrakt (PDC-Medium, siehe 4.6.1). Pro Aufarbeitung wurden 10 Schüttelkulturen à 300 mL Medium angesetzt. Die Inkubationszeit der Hauptkulturen betrug 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 g (20 min; 2 °C) vom Medium abgetrennt, mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 gewaschen und nochmals zentrifugiert.

#### 4.7.3.2 Zellaufschluß

Der Aufschluß der Hefezellen erfolgte in einer Rührwerkskugelmühle zur Naßvermahlung (DYNO-Mill Typ KDL, Willy A. Bachofen AG, CH-Basel). Die Mühle war mit einem doppelwandigen Mahlgefäß (V = 150 mL, Durchflußkühlung) ausgestattet.

Aus 3 L Kulturmedium pro Aufarbeitung wurden ca. 75 g Hefefeuchtmasse erhalten, die in vorgekühltem 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0; 1 mM TDP; 2 mM EDTA, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ ) aufgeschlämmt wurden. Das Mahlgefäß wurde in 3 Desintegrationsdurchgängen mit je 80 mL Glasperlen (0,5 mm  $\varnothing$ , bleifrei, Braun Biotech) und 25 g Zellmasse in 70 mL Puffer befüllt. Die Aufschlußzeit betrug 10 min bei  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  und 3200 Umdrehungen  $\text{min}^{-1}$ . Die Suspension wurde anschließend über Glaswolle filtriert und die Zelltrümmer bei 36000 g (30 min,  $2\text{ }^\circ\text{C}$ ) abzentrifugiert.

#### 4.7.3.3 Reinigungsschritte

Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei  $6\text{ }^\circ\text{C}$  (Kältezelle mit Kühlaggregat CS 0900 S, Viessmann) durchgeführt, um eine Inaktivierung des Enzyms durch Wärme und proteolytische Aktivitäten zu minimieren. Die Fällungen und Transporte der Proteinlösungen erfolgten unter Kühlung im Eisbad. Alle Puffer enthielten EDTA als Schutz vor Metallsuren und  $\text{MgSO}_4$  als Cosubstrat. TDP wurde bei den Chromatographieschritten nicht zugesetzt, da dessen Eigenabsorption bei 280 nm die Detektion des Proteingehaltes beträchtlich störte.

##### 4.7.3.3.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Der zellfreie Rohextrakt wurde bis zur 60 %igen Sättigung mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  versetzt und während der vollständigen Auflösung des Salzes geschüttelt. Der Überstand wurde bei 36000 g (20 min,  $2\text{ }^\circ\text{C}$ ) abzentrifugiert und das Präzipitat in 1/6 des ursprünglichen Volumens HIC-Fließmittel A (siehe 4.2.4.1) gelöst. Verbliebene unlösliche Bestandteile wurden durch erneute Zentrifugation bei 36000 g abgetrennt.

##### 4.7.3.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die Proteinlösung wurde vor diesem und jedem weiteren Chromatographieschritt membranfiltriert (PVDF  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ; Macherey-Nagel). Der Proteingehalt im Eluat wurde jeweils durch Absorptionmessung bei 280 nm in einer Durchflußküvette verfolgt und die PDC-Aktivität in den einzelnen Fraktionen mittels photometrischem Enzymassay (siehe 4.7.1) bestimmt.

Jeweils 10 mL Probelösung wurden an einer mit Phenyl Sepharose® 6 Fast Flow low sub gefüllten Säule chromatographiert (siehe 4.2.4.1). Die Fraktionierung des Eluats erfolgte in Intervallen von 2 min, entsprechend 7,6 mL. Die aktiven Fraktionen von drei Läufen wurden vereinigt und durch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – Fällung bei 60 % Sättigung und Resolubilisierung des Präzipitats in GPC-Puffer (siehe 4.2.4.2) auf 10 % des vorherigen Volumens konzentriert.

#### 4.7.3.3.3 Gelpermeationschromatographie (GPC)

10 ml der nach 4.9.3.3.2 erhaltenen Proteinlösung wurden an einer mit HiPrep® Sephacryl S-300 High Resolution gefüllten Säule chromatographiert. Die Fraktionierung des Eluats erfolgte in Intervallen von 5 min, entsprechend 5,0 mL. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration bei 2500 g (2 h, 2 °C) auf 20 % des vorherigen Volumens konzentriert und auf den IC-Startpuffer (4.2.4.3) umgepuffert.

#### 4.7.3.3.4 Ionenaustauschchromatographie (IC)

5 ml der nach 4.9.3.3.3 erhaltenen Proteinlösung wurden an einer mit HiLoad® Q Sepharose® High Performance gefüllten Säule chromatographiert. Die Fraktionierung des Eluats erfolgte in Intervallen von 1,5 min, entsprechend 5,1 mL. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration konzentriert und entsalzt und bis zum weiteren Gebrauch bei  $-18\text{ °C}$  tiefgefroren.

### 4.7.4 Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase

#### 4.7.4.1 Bestimmung des Molekulargewichtes

**SDS-PAGE:** Die bei der IC erhaltenen PDC-aktiven Fraktionen wurden bis zu einem Proteingehalt von ca.  $10\text{ mg mL}^{-1}$  konzentriert und weiter wie unter 4.5.1 beschrieben behandelt. Die Kalibrationskurve wurde durch Auftragung der Logarithmen der Molekulargewichte ( $\log\text{ MW}$ ) der Standardproteine gegen ihre Retentionsfaktoren ( $R_F$ ) durch lineare Regression erhalten.

Markerproteine:

Marker 1:	Myosin	212 kDa
(HMW-SDS Calibration Kit, Pharmacia Biotech)	$\alpha_2$ -Macroglobulin	170 kDa
	$\beta$ -Galactosidase	116 kDa
	Transferrin	76 kDa
	Glutamic Dehydrogenase	53 kDa
Marker 2:	Phosphorylase b	94 kDa
(LMW Electrophoresis Calibration Kit, Pharmacia Biotech)	BSA	67 kDa
	Ovalbumin	43 kDa
	Carbonic Anhydrase	30 kDa
	Soybean Trypsin Inhibitor	20,1 kDa
	$\alpha$ -Lactalbumin	14,4 kDa

**GPC:** Die bei der IC erhaltenen PDC-aktiven Fraktionen wurden vereinigt und wie unter 4.2.4.2 beschrieben an Superdex 200 HR bzw. Bio-Silect SEC-400 rechromatographiert. Die Kalibrationskurve wurde durch Auftragung der  $K_{AV}$ -Werte der Standardproteine gegen die Logarithmen ihrer Molekulargewichte (log MW) durch lineare Regression erhalten. Die  $K_{AV}$ -Werte leiten sich folgendermaßen aus den chromatographischen Bedingungen ab:

$$K_{AV} = \frac{V_E - V_0}{V_X}$$

mit:	$V_E$	= Elutionsvolumen [mL]	=	$F \cdot t_R$	
				$F$	= Flußrate [mL min <sup>-1</sup> ]
				$t_R$	= Retentionszeit [min]
	$V_0$	= Ausschlußvolumen [mL]	=	$F \cdot t_0$	
				$t_0$	= Totzeit [min]
	$V_X$	= Gelvolumen [mL]	=	$V_G - V_0$	
				$V_G$	= Säulengesamtvolumen [mL]

Markerproteine:

HMW Gel Filtration	Thyroglobulin	669 kDa
Calibration Kit (Pharmacia Biotech)	Ferritin	440 kDa
	Katalase	232 kDa
	Aldolase	158 kDa

Für die Bestimmung der Totzeit wurde Blue Dextran 2000 verwendet.

## 4.7.4.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Für die IEF-PAGE wurden die bei der IC erhaltenen PDC-aktiven Fraktionen vereinigt und durch Ultrafiltration mit bidest. Wasser entsalzt. Probe und Marker wurden doppelt aufgetragen, das Gel nach der Elektrophorese (siehe 4.5.2) geteilt und je eine Hälfte mit Coomassie Brilliant Blue und der unter 4.5.2.1 beschriebenen Aktivitätsfärbung behandelt. Die Kalibrationskurve wurde durch Auftragung der pI-Werte der Standardproteine gegen ihre Retentionsfaktoren  $R_F$  durch lineare Regression erhalten.

Markerproteine:

Marker 1:	Cytochrome C	pI = 9,6
(IEF Standard Broad Range pI 4,45-9,6, Bio-Rad)	Lentil Lectin	7,8
	Human Hemoglobin C	7,5
	Human Hemoglobin A	7,1
	Equine Myoglobin	7,0
	Human Carbonic Anhydrase	6,5
	Bovine Carbonic Anhydrase	6,0
	$\beta$ -Lactoglobulin B	5,1
	Phycocyanin	4,45
Marker 2:	Cytochrome C	pI = 10,65
(Protein-Testmischung zur pI- Bestimmung pH 3-10, Serva)	Ribonuclease A	9,45
	Lentil Lectin	7,75 / 8,3
	Equine Myoglobin	6,9
	Bovine Carbonic Anhydrase	6,0
	$\beta$ -Lactoglobulin	5,15
	Soybean Trypsin Inhibitor	4,5
	Glucoseoxidase	4,2
	Amyloglucosidase	3,5

#### 4.7.4.3 Untersuchung der Substratkinetik

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ -Wert) wurde die Geschwindigkeit der PDC-katalysierten Reaktion im Bereich von 0 - 100 mM Pyruvat untersucht. Reaktionsbedingungen und Durchführung wurden wie unter 4.7.1 beschrieben gewählt.

#### 4.7.4.4 Einfluß der Temperatur auf die PDC-Aktivität

**Temperatur-Optimum:** Für die Bestimmung des Temperatur-Optimums der enzymatischen Reaktion wurden je 20  $\mu$ L Probe bei verschiedenen Temperaturen in 2 mL 0,1 M Citrat-Puffer (pH 6,0; 2 mM TPP, 20 mM  $MgSO_4$ ) inkubiert und die Aktivität wie unter 4.7.1 beschrieben bei der entsprechenden Inkubationstemperatur gemessen.

**Temperatur-Stabilität:** Zur Messung der Temperatur-Stabilität der PDC wurden je 100  $\mu$ L Probe 24 h bei verschiedenen Temperaturen in 2 mL 0,1 M Citrat-Puffer (pH 6,0) einmal mit (1 mM TPP, 5 mM  $MgSO_4$ ) und einmal ohne Zusatz der Cofaktoren inkubiert. Die verbliebene Aktivität wurde in unterschiedlichen Zeitabständen in einem entnommenen Aliquot wie unter 4.7.1 beschrieben bestimmt. Dem Assaypuffer wurden hierbei keine Cofaktoren zugefügt, um eine Regenerierung des Enzyms auszuschließen.

#### 4.7.4.5 Einfluß des pH-Wertes auf die PDC-Aktivität

**pH-Optimum:** Für die Bestimmung des pH-Optimums der enzymatischen Reaktion wurden je 20  $\mu$ L Probe bei verschiedenen pH-Werten inkubiert und die Aktivität wie unter 4.7.1 beschrieben in dem jeweiligen Inkubationspuffer gemessen. Für den Bereich zwischen pH 4 und pH 9,5 wurden folgende Pufferlösungen als Inkubations- und Assaypuffer gewählt:

pH 4 - 6,5:	0,1 M Citrat-Puffer
pH 6,5 - 8:	0,05 M Imidazol/HCl-Puffer
pH 8,5 - 9:	0,1 M Glycin/HCl-Puffer

Alle Puffer enthielten 1 mM TPP und 5 mM  $MgSO_4$ .

**pH-Stabilität:** Zur Messung der pH-Stabilität der PDC wurden je 100  $\mu\text{L}$  Probe 24 h bei 5  $^{\circ}\text{C}$  und verschiedenen pH-Werten in 2 mL der oben beschriebenen Puffer einmal mit (1 mM TPP, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ ) und einmal ohne Zusatz der Cofaktoren inkubiert. Die verbliebene Aktivität wurde in unterschiedlichen Zeitabständen in einem entnommenen Aliquot wie unter 4.7.1 beschrieben bestimmt. Dem Assaypuffer wurden hierbei keine Cofaktoren zugefügt, um eine Regenerierung des Enzyms auszuschließen.

#### 4.7.4.6 Untersuchung der Substratspezifität

Für die Bestimmung der Substratspezifität der Decarboxylierungsreaktion der PDC wurden im Aktivitätstest nach 4.7.1 anstelle von Pyruvat verschiedene 2-Oxosäuren in Endkonzentrationen von 5-20 mM eingesetzt.

Untersuchte 2-Oxosäuren:

- Glyoxylsäure (Na-Salz, > 99 %, Fluka)
- 2-Oxo-butansäure (Na-Salz, > 99 %, Fluka)
- 2-Oxo-glutarsäure
- 3-Methyl-2-oxo-butansäure
- 3-Methyl-2-oxo-pentansäure
- 4-Methyl-2-oxo-pentansäure
- Phenylglyoxylsäure (> 98 %, Fluka)
- Phenylbrenztraubensäure
- 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure

#### 4.7.4.7 Untersuchung der Substratinhibition

Für die Untersuchung der Inhibition der PDC durch mögliche Substrate bzw. Substratanaloga wurden 100  $\mu\text{L}$  Probe in 1 mL 0,1 M Citrat-Puffer (pH 6,0; 1 mM TPP, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ ) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer enthielt verschiedene 2-Oxosäuren (siehe 4.7.4.6) in Konzentrationen zwischen 5 und 100 mM. Ein Aliquot des Ansatzes wurde nach beendeter Inkubation im Aktivitätsassay (4.7.1) eingesetzt (Endkonzentration an Pyruvat und der jeweiligen 2-Oxosäure in der Küvette = 5 mM).

Inhibierung [%] = Anfangsaktivität (= 100 %) – Restaktivität [%]

## 4.8 Transformationen mit isolierter Pyruvatdecarboxylase

Für die Transformationsversuche wurden die vereinigten PDC-aktiven Fraktionen aus der IC (4.7.3.3.4) eingesetzt.

### 4.8.1 Untersuchung des Substratspektrums der Acyloinbildung

Verschieden Aldehyde und 2-Oxosäuren wurden mit PDC unter Zusatz von Pyruvat bzw. Acetaldehyd inkubiert und auf die Bildung von Acyloinen untersucht.

Stammlösungen (SL) Aldehyde: 2 M in MeOH  
 Stammlösungen (SL) 2-Oxosäuren: 1 M in dest. H<sub>2</sub>O

Testansatz Aldehyde	Testansatz 2-Oxosäuren	Endkonzentration
3,4 mL 0,1 M Citratpuffer pH 6,0		2 mM TPP, 20 mM MgSO <sub>4</sub>
100 µL PDC-Lösung		1 U mL <sup>-1</sup>
250 µL Aldehyd-SL	250 µL Acetaldehyd-SL	118 mM
500 µL Pyruvat-SL	500 µL 2-Oxosäure-SL	118 mM

Die Testansätze wurden 48 h bei 24 °C inkubiert. Anschließend wurde 1-Phenylethanol oder 2*E*-Hexen-1-ol als interner Standard zugesetzt (Endkonzentration 50 µg mL<sup>-1</sup>) und eine Mikroextraktion mit 2 x 2 mL Diethylether durchgeführt. Der Extrakt wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und direkt in der GC eingesetzt. Bei allen Substratversuchen wurden chemische Blindwerte (Testansatz ohne PDC) mitgeführt.

Untersuchte 2-Oxosäuren: siehe 4.7.4.6

Untersuchte Aldehyde:

- Propanal (> 98 %, Fluka)
- Butanal (> 99 %, Fluka)
- Pentanal (> 98 %, Fluka)
- Hexanal (> 98 %, Fluka)
- Heptanal (> 97 %, Fluka)
- Octanal (> 98 %, Fluka)

2-Methyl-propanal (> 99 %, Fluka)  
2-Methyl-butanal (> 98 %, Fluka)  
3-Methyl-butanal (> 90 %, Fluka)  
2-Methyl-pentanal (> 90 %, Fluka)  
2*E*-Butenal (> 99 %, Merck)  
2-Methyl-2*E*-butenal (> 97 %, Fluka)  
3-Methyl-2*E*-butenal (> 97 %, Fluka)  
2*E*-Pentenal (> 97 %, Merck)  
2*E*-Hexenal (> 97 %, Fluka)  
Benzaldehyd  
Phenylacetaldehyd  
3-Methylthio-propanal (techn., Fluka)

## 4.8.2 Untersuchung der Reaktionsbedingungen der Acyloinbildung

### 4.8.2.1 Substratkonzentration

Der Einfluß der Substratkonzentration auf die Acyloinbildung wurde für alle Substrate untersucht, bei denen nach 4.8.1 eine Produktbildung beobachtet wurde. Die Endkonzentrationen der Aldehyde und 2-Oxosäuren wurden hierbei zwischen 14 mM und 200 mM variiert; Pyruvat und Acetaldehyd wurden jeweils in der selben Konzentration wie das Substrat zugegeben. Alle Werte wurden mindestens dreimal mit Enzymisolaten aus verschiedenen Aufarbeitungen verifiziert.

In einem weiteren Versuch wurde an einem Beispiel der Einfluß des Verhältnisses der Konzentrationen von Aldehyd (Hexanal) und Pyruvat untersucht. Der Bereich erstreckte sich von 280 mM Aldehyd : 28 mM Pyruvat (10:1) bis 28 mM Aldehyd : 280 mM Pyruvat (1:10). Die Aufarbeitung aller Ansätze erfolgte wie unter 4.8.1 beschrieben.

### 4.8.2.2 Temperatur und pH-Wert

Der Einfluß der Temperatur auf die Acyloinbildung wurde an einem ausgewählten Beispiel (Acetaldehyd + Pyruvat) wie unter 4.8.1 beschrieben untersucht. Dabei wurden verschiedene Inkubationstemperaturen zwischen 8 und 30 °C gewählt.

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Acyloinbildung erfolgte am Beispiel Acetaldehyd + Pyruvat wie unter 4.8.1 beschrieben. Hierbei wurde der verwendete Citrat-Puffer auf 3 verschiedene pH-Werte zwischen pH 5 und 7 eingestellt.

#### 4.8.2.3 Zeitverlauf

Der zeitliche Verlauf der Acyloinbildung wurde an einem ausgewählten Beispiel (Hexanal + Pyruvat) wie unter 4.8.1 beschrieben untersucht, dabei wurden die einzelnen Proben nach unterschiedlichen Inkubationszeiten zwischen 1 und 48 h analysiert.

### 4.9 Bestimmung von Geruchsqualitäten und Geruchsschwellen

Die Geruchsqualitäten und –schwellenwerte im Verdünnungsmedium Luft wurden mittels GC-O in Anlehnung an die Arbeiten von Christoph [159] bestimmt.

Bei der Gaschromatographie mit olfaktorischer Detektion (GC-O, siehe 4.2.2.3) war die Kapillarsäule am Ende mit einem Y-Glasverbinder versehen, der den Gasstrom über zwei kurze Säulenstücke zu gleichen Teilen in den FID-Detektor und den Sniffport leitet. Der Sniffport wurde auf 200 °C beheizt, um ein vorzeitiges Kondensieren der Substanzen zu verhindern, und mündete in einem mit Teflonband abgedichtetem Glastrichter. Jede untersuchte Substanz wurde von 4 bis 8 Testpersonen bezüglich ihrer Geruchsqualität und ihres Geruchsschwellenwertes abgesniff. Dabei galt als Geruchsschwelle die Konzentration bzw. Intensität einer Substanz, bei der ihre charakteristischen Geruchseigenschaften für mindestens 50 % der Testpersonen noch eindeutig erkennbar waren.

Die Geruchsschwellen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$M = \frac{c \cdot V}{2}$$

mit: M = Reizmenge, die am Sniffausgang eluiert wird [ng]  
c = Konzentration der Lösung [ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ]  
V = Einspritzvolumen [ $\mu\text{L}$ ]

## 4.10 Isolierung von $\alpha$ -Hydroxyketonen aus Lebensmitteln

Die Durchführung und Optimierung der Arbeitsschritte erfolgte zum Teil im Rahmen einer am Institut betreuten Diplomarbeit.

### **Probenmaterial:**

Sherry: 2 verschiedene handelsübliche Marken (Sherry 1 = Fino Dry, Sherry 2 = Amontillado Medium Dry)

Sojasauce: 3 verschiedene Marken aus einem Asia-Markt (Soja 1 = japanischer, Soja 2 = chinesischer, Soja 3 = koreanischer Herkunft)

Die Proben wurden 1:1 mit Wasser verdünnt und mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  KCl versetzt. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion erfolgte in einer kontinuierlich arbeitenden Anlage mit Pentan / Dichlormethan (2:1) als Lösungsmittel (Dauer ca. 20 h,  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  Wasserbad-Temperatur der Lösungsmittelvorlage, Kühlung mit Methanol bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Die organische Phase wurde anschließend über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  Wasserbad-Temperatur an einer Vigreux-Kolonnen eingengt und der Extrakt für die GC-MS eingesetzt.

Die Proben wurden darüber hinaus nach Verdünnung mit Pentan durch Festphasenextraktion (SPE) fraktioniert. Eingesetzt wurden Chromabond<sup>®</sup>-Säulen (2 g, Macherey-Nagel) mit verschiedenen Adsorbentien (Florisil<sup>®</sup>, Kieselgel, Diol-modifiziertes Kieselgel). Die Elution erfolgte mit Pentan / Diethylether (100:0  $\rightarrow$  0:100) und Methanol (100 %). Die einzelnen Fraktionen wurden nach Einengen an einer Vigreux-Kolonnen ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mittels GC-MS untersucht.

## 4.11 Synthesen

### 4.11.1 (R,S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon

Nach Gill [165] werden unsymmetrische Acyloine in hohen Ausbeuten durch Umsetzung von Cyanhydrin-O-Trimethylsilylethern mit Grignardreagenzien erhalten.

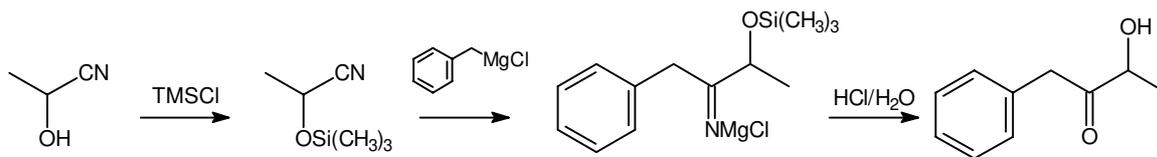


Abb 4-1 Synthese von (R,S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon nach Gill [165]

Zu einer Mischung aus 12,1 g (0,1 mol) Milchsäurenitril (98 %, Aldrich) und 7,9 g (0,1 mol) Pyridin in 50 ml trockenem Diethylether wurden langsam 10,8 g Trimethylsilylchlorid (TMSCl, 99 %, Aldrich) getropft und über Nacht gerührt. Danach wurde abgesaugt und der Rückstand mit 30 mL Ether gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Reaktionsprodukt wurde in 20 mL Ether aufgenommen, gemäß einer Grignard Umsetzung zu einem Ansatz aus 2,45 g (0,1 mol) Magnesiumspänen (98 %, Aldrich), 12,7 g (0,1 mol) Benzoylchlorid (99 %, Merck) sowie 75 ml Ether gegeben und 2 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden vorsichtig 200 mL Eiswasser zugegossen und mit soviel 6 N HCl versetzt, bis sich der entstandene Niederschlag gerade auflöste. Die wäßrige Phase wurde mit NaCl gesättigt und mit 3 x 70 mL Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und der Ether in vacuo abgetrennt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC (siehe 4.2.3.1) gereinigt.

#### 4.11.2 (S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon

(S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon und weitere optisch aktive Acyloine wurden aus chiralen  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäureestern durch Amidierung und anschließende Grignard Umsetzung hergestellt [49, 50]. Die Reaktion verläuft unter Konfigurationserhalt am chiralen Zentrum.

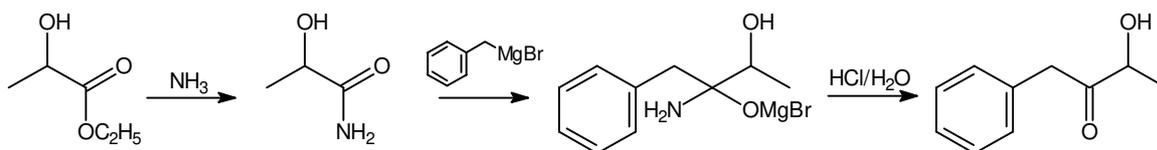


Abb 4-2 Synthese von (S)-3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon

11,8 g (0,1 mol) (S)-Milchsäureethylester (99 %, Fluka) wurden unter Rühren während 24stündigem Durchleiten von trockenem Ammoniakgas amidiert und anschließend das entstandene Ethanol in vacuo abgezogen. 4,46 g (0,05 mol) des erhaltenen Amids wurden in 20 mL Tetrahydrofuran gelöst und zu 120 mL einer etherischen Grignard-Lösung aus 6,08 g (0,25 mol) Magnesium und 42,8 g (0,25 mol) Benzylbromid (> 98 %, Fluka) getropft. Der Ansatz wurde 6 h unter Rückfluß erhitzt und anschließend wie unter 4.11.1 beschrieben aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC (siehe 4.2.3.1) gereinigt.

#### **4.11.3 (R)-3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon**

5 g (0,03 mol) (R)-Phenylmilchsäure (> 97 %, Fluka) wurden zur Methylierung in 40 mL Methanol gelöst, vorsichtig mit 3 mL Acetylchlorid (> 99 %, Fluka) versetzt und 4 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Entfernen des überschüssigen Alkohols lag der bei Raumtemperatur feste Phenylmilchsäuremethylester vor. Zur Amidierung wurde der pulverisierte Ester in einem Glasgefäß auf – 60 °C thermostatisiert, wobei er sich in dem bei dieser Temperatur kondensierendem durchgeleiteten Ammoniak löste. Nach Beendigung der Reaktion (10 h) wurden NH<sub>3</sub> und entstandenes MeOH abgedampft. 3,3 g (0,02 mol) Phenylmilchsäureamid wurden mit einem Grignard-Reagenz aus 2,43 g (0,1 mol) Magnesium und 14,2 g (0,1 mol) Methyljodid (> 99 %, Fluka) wie unter 4.11.2 beschrieben umgesetzt. Das entstandene Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC (siehe 4.2.3.1) gereinigt.

#### **4.11.4 (S)-3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon**

5 g (0,03 mol) (S)-Phenylmilchsäure (> 99 %, Bachem) wurden analog der Vorschrift in 4.11.3 umgesetzt. Das entstandene Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC (siehe 4.2.3.1) gereinigt.

#### **4.11.5 (S)-2-Hydroxy-4-methyl-3-pentanon**

11,8 g (0,1 mol) (S)-Milchsäureethylester wurden wie unter 4.11.2 beschrieben amidiert und 4,46 g (0,05 mol) des erhaltenen Amids mit 120 mL einer etherischen Grignard-Lösung aus 6,08 g (0,25 mol) Magnesium und 30,8 g (0,25 mol) Isopropylamid (> 99 %,

Fluka) umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde adsorptionschromatographisch (siehe 4.2.1.1) gereinigt.

#### **4.11.6 (R,S)-3-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon**

5,15 g (0,04 mol) (R,S)- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure (> 99 %, Fluka) wurden wie unter 4.11.3 beschrieben methyliert. 3,96 g (0,03 mol) des Methylesters wurden amidiert und 2,93 g (0,025 mol) des erhaltenen Amids wie unter 4.11.2 beschrieben mit 60 mL einer etherischen Grignard-Lösung aus 3,04 g (0,125 mol) Magnesium und 17,7 g (0,125 mol) Methyljodid umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde adsorptionschromatographisch (siehe 4.2.1.1) gereinigt.

#### **4.11.7 (S)-2-Hydroxy-4-methyl-3-hexanon**

11,8 g (0,1 mol) (S)-Milchsäureethylester wurden wie unter 4.11.2 beschrieben amidiert und 4,46 g (0,05 mol) des erhaltenen Amids mit 120 mL einer etherischen Grignard-Lösung aus 6,08 g (0,25 mol) Magnesium und 34,3 g (0,25 mol) 2-Brombutan (> 98 %, Fluka) umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde adsorptionschromatographisch (siehe 4.2.1.1) gereinigt.

#### **4.11.8 (3R,S, 4R,S)-3-Hydroxy-4-methyl-2-hexanon**

7,30 g (0,05 mol) (R,S)-3-Methyl-2-oxo-valeriansäure-Natriumsalz (> 99 %, Fluka) wurden in 50 mL Methanol gelöst, portionsweise mit 2,0 g (0,05 mol) Natriumborhydrid (99 %, Aldrich) versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurden zur Entfernung des überschüssigen Reduktionsmittels Wasser/ verd. HCL zugegeben und der Ansatz mit 4 x 40 mL Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde der Ether in vacuo entfernt. 5,29 g (0,04 mol) der synthetisierten Hydroxysäure wurden wie unter 4.11.3 beschrieben methyliert und 4,38 g (0,03 mol) des Methylesters amidiert. 3,28 g (0,025 mol) des erhaltenen Amids wurden anschließend wie unter 4.11.2 beschrieben mit 60 mL einer etherischen Grignard-Lösung aus 3,04 g (0,125 mol) Magnesium und 17,7 g (0,125 mol) Methyljodid umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde adsorptionschromatographisch (siehe 4.2.1.1) gereinigt.

#### 4.11.9 (S)-2-Hydroxy-5-methyl-3-hexanon

11,8 g (0,1 mol) (S)-Milchsäureethylester wurden wie unter 4.11.2 beschrieben amidiert und 4,46 g (0,05 mol) des erhaltenen Amids mit 120 mL einer etherischen Grignard-Lösung aus 6,08 g (0,25 mol) Magnesium und 34,3 g (0,25 mol) Isobutylbromid (> 97 %, Fluka) umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde adsorptionschromatographisch (siehe 4.2.1.1) gereinigt.

#### 4.11.10 (S)-3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanon

5,29 g (0,04 mol) (S)- $\alpha$ -Hydroxyisocaproensäure (Bachem) wurden wie unter 4.11.3 beschrieben methyliert. 4,38 g (0,03 mol) des Methylesters wurden amidiert und 3,28 g (0,025 mol) des erhaltenen Amids wie unter 4.11.2 beschrieben mit 60 mL einer etherischen Grignard-Lösung aus 3,04 g (0,125 mol) Magnesium und 17,7 g (0,125 mol) Methyljodid umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde adsorptionschromatographisch (siehe 4.2.1.1) gereinigt.

#### 4.11.11 (R,S)-1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon

Enantiomerenreines (R)-1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon wurde freundlicherweise von der Firma Knoll (Minden) zur Verfügung gestellt. Die Racemisierung erfolgte bei 90 °C in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,7 (40 min). Unter diesen Bedingungen war nur eine geringe Tautomerisierung, aber vollständige Racemisierung zu beobachten.

#### 4.11.12 (R,S)-3-Hydroxy-2-octanon

Die Bromierung von 2-Octanon mit tert.-Butylbromid in Dimethylsulfoxid (DMSO) ergibt selektiv 3-Brom-2-octanon, das durch Hydrolyse in alkalischer Lösung zu 3-Hydroxy-2-octanon umgesetzt wird [166, 167].

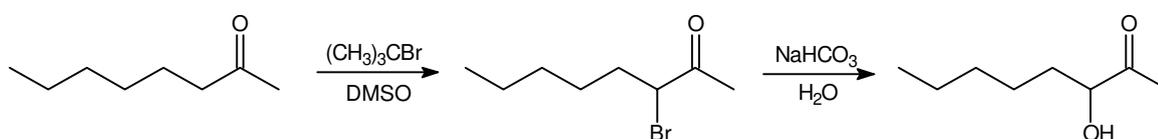


Abb 4-3 Synthese von 3-Hydroxy-2-octanon

5,2 g (0,04 mol) 2-Octanon (> 95 %, Fluka) wurden in 6,2 g (0,08 mol) DMSO gelöst, mit 22,6 g (0,16 mol) t-Butylbromid (> 97 %, Fluka) versetzt und 12 h bei 65 °C unter Rückfluß gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser versetzt, mit 3 x 30 mL Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen nach dem Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in 50 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgenommen und 8 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde mit Ether extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel in vacuo abgezogen. Das erhaltene Rohprodukt wurde adsorptionschromatographisch (siehe 4.2.1.1) gereinigt.

#### 4.11.13 Isomerisierung von $\alpha$ -Hydroxyketonen

Bei der enzymatischen Synthese von  $\alpha$ -Hydroxyketonen wurde zumeist eines der beiden Tautomere im Überschuß gebildet. Das jeweils isomere Acyloin konnte durch Behandlung mit Glycin/HCl-Puffer (30 min bei pH 8,5) erhalten werden; es entstand ein 1:1 Gemisch der beiden Verbindungen.

### 4.12 Derivatisierungen

#### 4.12.1 Derivatisierung mit (S)-MTPA-Cl

Zur Überführung chiraler  $\alpha$ -Hydroxyketone in diastereomere Ester wurde das Derivatisierungsreagenz (S)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluoromethyl-phenyllessigsäurechlorid (Abb 4-4) verwendet [49].

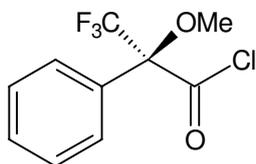


Abb 4-4 (S)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluoromethyl-phenyllessigsäurechlorid

10-100  $\mu$ g Substanz in 50  $\mu$ L trockenem Diethylether wurden mit 4  $\mu$ L Pyridin und 2  $\mu$ L (S)-MTPA-Cl (> 99 %, Fluka) versetzt und 16 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Verdünnen mit Ether wurde der Ansatz direkt für die GC eingesetzt.

## 4.12.2 Stereochemische Analysen

Die MTPA-Derivate der  $\alpha$ -Hydroxyketone wurden unter isothermen Bedingungen an einer unpolaren GC-Säule getrennt (4.2.2.4, GC 2).

3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon:	165 °C
3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon:	180 °C
1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon:	180 °C
3-Hydroxy-2-octanon:	130 °C

Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee):

$$ee(\%) = 100 \cdot \frac{Area_1 - Area_2}{Area_1 + Area_2}$$

mit:  $Area_1$  = Peakfläche des überwiegend vorliegenden Enantiomers  
 $Area_2$  = Peakfläche des geringer vorliegenden Enantiomers

## 4.13 Entsorgungshinweise

### 4.13.1 Biologisches Material

Sämtliche Kulturen und Kulturreste wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert. Nach Filtration wurde das Medium in das Laborabwasser gegeben und feste Bestandteile in den Laborabfall.

### 4.13.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Der Verbrauch organischer Lösungsmittel wurde durch die verwendeten Aufarbeitungsverfahren (Mikroextraktion) sowie durch weitgehende Wiederverwendung destillativ gereinigter Lösungsmittel auf ein Minimum reduziert. Auf die Verwendung halogenerter Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet. Nicht wiederverwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel

Ebenso wie andere Sonderabfälle wurden diese Lösungsmittel der zentralen Entsorgung der Universität Hannover zugeführt.

---

## 5 Literatur

---

- [1] Biotechnologie. Eine Studie über Forschung und Entwicklung, 3. Aufl. (1976), DECHEMA, Frankfurt
- [2] Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M.: Prinzipien der Biochemie, 2. Aufl. (1994), Spektrum Verlag, Heidelberg
- [3] Voet, D., Voet, J.G.: Biochemie, (1992) VCH, Weinheim, Kap. 24
- [4] Dittrich, H.H.: Mikrobiologie des Weines, (1987) Eugen Ulmer, Stuttgart
- [5] Ruttloff, H.: Industrielle Enzyme, 2. Aufl. (1994), Behr's Verlag, Hamburg
- [6] Präve, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D.A. (Hrsg.): Handbuch der Biotechnologie, 4. Aufl. (1994), Oldenbourg Verlag, München
- [7] Tramper, J. Chemical versus biochemical conversion: When and how to use biocatalysts, *Biotech. Bioeng.* 52 (1996), S. 290-295.
- [8] Hagedorn, S., Kaphammer, B. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals, *Ann. Rev. Microbiol.* 48 (1994), S. 773-800
- [9] Janssens, L., DePooter, H.L., Schamp, N.M., Vandamme, E.J. Production of flavours by microorganisms, *Process Biochem.* 27 (1992), S. 195-215
- [10] Krings, U., Berger, R.G. Biotechnological production of flavours and fragrances, *Appl. Microbiol. Biotech.* 49 (1998), S. 1-8
- [11] Haug, M.E., Matheis, G. Essenzen, Aromen und Grundstoffe für die Spirituosenherstellung, *Dragoco report* 46 (1999), S. 38-48
- [12] Berger, R.G. Genetic engineering part III: Food flavors, in: Encyclopedia of food science and technology (Hrsg. Y.H. Hui), Vol.2, (1992) Wiley, New York, S. 1313-1320.
- [13] Berger, R.G.: Aroma biotechnology, (1995) Springer, Heidelberg
- [14] Pereira, R.S. The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds, *Crit. Rev. Biotech.* 18 (1998), S. 25-83
- [15] D'Arrigo, P., Pedrocchi-Fantoni, G., Servi, S. Old and new synthetic capacities of baker's yeast, *Adv. Appl. Microbiol.* 44 (1997), S. 81-123
- [16] Csuk, R., Glänzer, B.I. Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry, *Chem. Rev.* 91 (1991), S. 49-97
- [17] Wolf, K. (Hrsg.): Nonconventional yeasts in biotechnology, (1996) Springer, Berlin Heidelberg

- [18] Richter, U.: Aminosäuren und aromatische Acyloine bei Wildhefen und *Saccharomyces cerevisiae*, (1998) Dissertation Uni Hannover
- [19] Ullrich, J., Freisler, H. Gehalt und Effekt von Proteinasen bei Pyruvatdecarboxylase aus Bierhefe, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358 (1977), S. 318
- [20] Van Urk, H., Schipper, D., Breedveld, G.J., Mak, P.R., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P. Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621, *Biochim. Biophys. Acta* 992 (1989), S. 78-86
- [21] Gounaris, A.D., Turkenkopf, I., Civerchia, L.L., Grenlie, J. Pyruvate decarboxylase III: Specificity restrictions for thiamine pyrophosphate in the protein association step, subunit structure, *Biochim. Biophys. Acta* 405 (1975), S. 492-499
- [22] Bringer-Meyer, S., Schimz, K.-L., Sahm, H. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization, *Arch. Microbiol.* 146 (1986), S. 105-110
- [23] Zehender, H., Trescher, D., Ullrich, J. Activity stain for pyruvate decarboxylase in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 135 (1983), S. 16-21
- [24] Ludewig, R., Schellenberger, A. A new procedure to prepare highly purified and crystallized yeast pyruvate decarboxylase, *FEBS Lett.* 45 (1974), S. 340-343
- [25] Freisler, H. Pyruvat-Decarboxylase: Verbesserte Reindarstellung und Charakterisierung, (1979) Dissertation Uni Freiburg i. Br., S. 86-89
- [26] Farrenkopf, B.C., Jordan, F. Resolution of brewer's yeast pyruvate decarboxylase into multiple isoforms with similar subunit structure and activity using high-performance liquid chromatography, *Protein Express. Purif.* 3 (1992), S. 101-107
- [27] Diefenbach, R.J., Duggleby, R.G. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Structure and re-activation of apoenzyme by the cofactors thiamin diphosphate and magnesium ion, *Biochem. J.* 276 (1991), S. 439-445
- [28] Hopmann, R.F.W. Hydroxyl-ion-induced subunit dissociation of yeast cytoplasmic pyruvate decarboxylase. A circular dichroism study, *Eur. J. Biochem.* 110 (1980), S. 311-318
- [29] Boiteux, A., Hess, B. Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase, *FEBS Lett.* 9 (1970), S. 293-296
- [30] Hübner, G., Weidhase, R., Schellenberger, A. The mechanism of substrate activation of pyruvate decarboxylase: A first approach, *Eur. J. Biochem.* 92 (1978), S. 175-181
- [31] Hoppner, T.C., Doelle, H.W. Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 (1983), S. 152-157
- [32] Ullrich, J., Donner, I. Lipophilic binding sites of yeast pyruvate decarboxylase, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351 (1970), S. 1030-1034

- [33] Kuo, D.J., Dikdan, G., Jordan, F. Resolution of brewer's yeast pyruvate decarboxylase into two isozymes, *J. Biol. Chem.* 261 (1986), S. 3316-3319
- [34] Lehmann, H., Fischer, G., Hübner, G., Kohnert, K.-D., Schellenberger, A. The influence of steric and electronic parameters on the substrate behaviour of  $\alpha$ -oxo acids to yeast pyruvate decarboxylase, *Eur. J. Biochem.* 32 (1973), S. 83-87
- [35] Suomalainen, H., Konttinen, K., Oura, E. Decarboxylation by intact yeast and pyruvate decarboxylase of some derivatives of pyruvic acid and  $\alpha$ -ketoglutaric acid, *Arch. Mikrobiol.* 64 (1969), S. 251-261
- [36] Uhlemann, H., Schellenberger, A. Glyoxylic acid as an active site marker of yeast pyruvate decarboxylase, *FEBS Lett.* 63 (1976), S. 37-39
- [37] Surburg, H., Guentert, M., Harder, H. Investigation of volatiles from flowers. Analytical and olfactory aspects, in: Recent developments in flavor and fragrance chemistry (1993) VCH, Weinheim, S. 103-121.
- [38] Watanabe, I., Yanai, T., Awano, K., Kogami, K., Hayashi, K. Volatile components of wisteria flower, in: Flavors and fragrances: A world perspective. Proceedings of the 10th international congress of essential oils, fragrances and flavors, Washington D.C., (1988), Elsevier, Amsterdam, S. 425-437
- [39] Moio, L., Semon, E., Le Quere, J.L. 3-Hydroxy-5-methyl-2-hexanone, a new compound characterized by a melted cheese flavour in dairy products, *Ital. J. Food Sci.* 6 (1994), S. 441-447
- [40] Müller, E. (Hrsg.) Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl), Bd. Ketone 1, (1973) Thieme, Stuttgart, S. 1117-1123
- [41] Kunert-Kirchhoff, J., Baltus, W. Model reactions on roast aroma formation VIII., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 190 (1990), S. 14-16
- [42] Crout, D.H.G., Dalton, H., Hutchinson, D.W., Miyagoshi, M. Studies on pyruvate decarboxylase: Acyloin formation from aliphatic, aromatic and heterocyclic aldehydes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1991), S. 1329-1334
- [43] Schröder, F., Fettköther, R., Noldt, U., Dettner, K., König, W.A., Francke, W. Synthesis of (3R)-3-hydroxy-2-hexanone, (2R,3R)-2,3-hexanediol and (2S,3R)-hexanediol, the male sex pheromone of *Hylotrupes bajalus* and *Pyrrhidium sanguineum* (Cerambycidae), *Liebigs Ann. Chem.* 12 (1994), S. 1211-1218
- [44] Srinivasan, N.S., Lee, D.G. The preparation of  $\alpha$ -hydroxy ketones by oxidation of alkenes with potassium permanganate in aqueous acetone, *Synthesis* (1979), S. 520-521
- [45] Mori, K., Otsuka, T. Synthesis of (2S,3S)-2,3-octanediol and (S)-2-hydroxy-3-octanone, the male sex pheromone of the grape borer *Xylotrechus pyrrhoderus*, *Tetrahedron* 41 (1985), S. 553-556
- [46] Nixon, L.N., Wong, E., Johnson, C.B., Birch, E.J. Nonacidic constituents of volatiles from cooked mutton, *J. Agric. Food Chem.* 27 (1979), S. 355-359

- [47] Wanner, P.: Enantioselektive Biotransformationen mit Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Charakterisierung beteiligter Enzyme, (1996) Dissertation TU Berlin
- [48] Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D.H.: Interpretation of mass spectra of organic compounds, (1964) Holden-Day, San Francisco, S. 36.
- [49] Heidlas, J.: Enzymatische Bildung chiraler Hydroxyverbindungen in Ananas (*Ananas comosus* L.) und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), (1990) Dissertation TU Berlin
- [50] Kawabata, J., Tahara, S., Mizutani, J. (2S,3R)-trans-4-trans-6-Octadiene-2,3-diol: Structure and absolute configuration of a novel metabolite of sorbic acid, *Agric. Biol. Chem.* 42 (1978), S. 89-94
- [51] Bel-Rhliid, R., Fauve, A., Veschambre, H. Synthesis of the pheromone components of the grape borer *Xylotrechus pyrrhoderus* by microbiological reduction of an  $\alpha$ -diketone, *J. Org. Chem.* 54 (1989), S. 3221-3223
- [52] Ohloff, G.: Scent and fragrances, (1994) Springer, Berlin Heidelberg
- [53] Beuchat, L.R. Traditional fermented food products, in: Food and beverage mycology (Hrsg. Beuchat, L.R.) AVI Book (1987), S. 269-280
- [54] Neuberg, C., Karczag, L. Über zuckerfreie Hefegärungen. IV. Carboxylase, ein neues Enzym der Hefe, *Biochem. Z.* 36 (1911), S. 68-81.
- [55] Suomalainen, H., Linnahalm T. Metabolites of  $\alpha$ -ketomonocarboxylic acids formed by dried baker's and brewer's yeast, *Arch. Biochem. Biophys.* 114 (1966), S. 502-513
- [56] Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B., Jordan, F. Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4 Å resolution, *Biochemistry* 32 (1993), S. 6165-6170
- [57] Lohmann, K., Schuster, P. Untersuchungen über die Cocarboxylase, *Biochem. Z.* 294 (1937), S. 188-214
- [58] Bruhn, H.: Verbesserung der Acyloinkondensationsfähigkeit der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*, (1995) Dissertation Uni Düsseldorf
- [59] Mücke, U., König, S., Hübner, G. Purification and characterisation of pyruvate decarboxylase from pea seeds (*Pisum sativum* cv. Miko), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376 (1995), S. 111-117
- [60] Rivoal, J., Ricard, B., Pradet, A. Purification and partial characterization of pyruvate decarboxylase from *Oryza sativa* L., *Eur. J. Biochem.* 194 (1990), S. 791-797
- [61] Zehender, H., Trescher, D., Ullrich, J. Improved purification of pyruvate decarboxylase from wheat germ. Its partial characterisation and comparison with the yeast enzyme, *Eur. J. Biochem.* 167 (1987), S. 149-154

- [62] Lowe, S.E., Zeikus, J.G. Purification and characterization of pyruvate decarboxylase from *Sarcina ventriculi*, *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992), S. 803-807
- [63] Rose, A.H., Harrison, J.S. (Hrsg.) The yeasts. Volume I: Biology of yeasts, (1987) Academic Press, London, S. 23-27
- [64] VanHoek, P., Flikweert, M.T., VanDerAart, Q.J.M., YdeSteensma, H., VanDijken, J.P., Pronk, J.T. Effects of pyruvate decarboxylase overproduction on flux distribution at the pyruvate branch point in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998), S. 2133-2140
- [65] König, S., Svergun, D., Koch, M.H.J., Hübner, G., Schellenberger, A. Synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH dependence of the quaternary structure of yeast pyruvate decarboxylase, *Biochemistry* 31 (1992), S. 8726-8731
- [66] Leube, I., Ullrich, J. Pyruvatdecarboxylase from an almost protease-free yeast, *J. Biol. Chem. Hoppe-Seyler Suppl.* 363 (1986), Abstr. 06.03.39
- [67] Schmitt, H.D., Zimmerman, F.K. Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis, *J. Bacteriol.* 151 (1982), S. 1146-1152
- [68] Seeboth, P.G., Bohnsack, K., Hollenberg, C.P. PDC1<sup>0</sup> mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural PDC gene. Cloning of PDC5, a gene homologous to PDC1, *J. Bacteriol.* 172 (1990), S. 678-685
- [69] Hohmann, S. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 173 (1991), S. 7963-7969
- [70] Hohmann, S. Characterization of PDC2, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 241 (1993), S. 657-666
- [71] Hohmann, S., Cederberg, H. Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes PDC1 and PDC5, *Eur. J. Biochem.* 188 (1990), S. 615-621
- [72] Killenberg-Jabs, M., König, S., Hohmann, S., Hübner, G. Purification and characterisation of the pyruvate decarboxylase from a haploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 377 (1996), S. 313-317
- [73] Alvarez, F.J., Ermer, J., Hübner, G., Schellenberger, A., Schowen, R.L. Catalytic power of pyruvate decarboxylase. Rate-limiting events and microscopic rate constants from primary carbon and secondary hydrogen isotope effects, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), S. 8402-8409
- [74] Kern, D., Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G., Hübner, G. How thiamine diphosphate is activated in enzymes, *Science* 275 (1997), S. 67-70
- [75] Killenberg-Jabs, M., König, S., Eberhardt, I., Hohmann, S., Hübner, G. Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxylase from yeast studied by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 36 (1997), S. 1900-1905

- [76] Schellenberger, A. Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry, *Biochim. Biophys. Acta* 1385 (1998), S. 177-186
- [77] Zeng, X., Chung, A., Haran, M., Jordan, F. Direct observation of the kinetic fate of a thiamin diphosphate bound enamine intermediate on brewer's yeast pyruvate decarboxylase. Kinetic and regiospecific consequences of allosteric activation, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), S. 5842-5849
- [78] Fuganti, C., Grasselli, P., Poli, G., Servi, S., Zorzella, A. Decarboxylative incorporation of  $\alpha$ -oxobutyrate and  $\alpha$ -oxovalerate into (R)- $\alpha$ -hydroxyethyl- and n-propyl ketones on reaction with aromatic and  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes in baker's yeast, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1988), S. 1619-1621
- [79] Lobell, M., Crout, D.H.G. Pyruvate decarboxylase: A molecular modelling study of pyruvate decarboxylation and acyloin formation, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996), S. 1867-1873
- [80] Baburina, I., Li, H., Bennion, B., Furey, W., Jordan, F. Interdomain information transfer during substrate activation of yeast pyruvate decarboxylase: The interaction between cysteine 221 and histidine 92, *Biochemistry* 37 (1998), S. 1235-1244
- [81] Zeng, X., Farrenkopf, B., Hohmann, S., Dyda, F., Furey, W., Jordan, F. Role of cysteines in the activation and inactivation of brewer's yeast pyruvate decarboxylase investigated with a PDC1-PDC6 fusion protein, *Biochemistry* 32 (1993), S. 2704-2709
- [82] Baburina, I., Gao, Y., Hu, Z., Jordan, F., Hohmann, S., Furey, W. Substrate activation of brewer's yeast pyruvate decarboxylase is abolished by mutation of cysteine 221 to serine, *Biochemistry* 33 (1994), S. 5630-5635
- [83] Neale, A.D., Scopes, R.K., Wettenhall, R.E.H., Hoogenraad, N.J. Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: Isolation, properties and genetic expression in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 169 (1987), S. 1024-1028
- [84] Miczka, G.: Enzymatische und proteinchemische Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, (1991) Dissertation Uni Düsseldorf
- [85] Sieber, M., König, S., Hübner, G., Schellenberger, A. A rapid procedure for the preparation of highly purified pyruvate decarboxylase from brewer's yeast, *Biomed. Biochim. Acta* 42 (1983), S. 343-349
- [86] Miczka, G., Vernau, J., Kula, M.-R., Hofmann, B., Schomburg, D. Purification and primary structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15 (1992), S. 192-206
- [87] Neuberg, C., Hirsch, J. An enzyme which brings about union into carbon chains (carboligase), *Biochem. Zeitschr.* 115 (1921), S. 282-310
- [88] Neuberg, C., Ohle, H. Zur Kenntnis der Carboligase. Der Bau der biosynthetisch verknüpften mehrgliedrigen Kohlenstoffketten., *Biochem. Zeitschr.* 127 (1922), S. 327-339

- [89] Dirscherl, W. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 201 (1931), S. 47-62
- [90] Singer, T.P., Pensky, J. Isolation and properties of the  $\alpha$ -carboxylase of wheat germ, *J. Biol. Chem.* 196 (1952), S. 375-388
- [91] Juni, E. Evidence for a two-site mechanism for decarboxylation of  $\alpha$ -keto acids by  $\alpha$ -carboxylase, *J. Biol. Chem.* 236 (1961), S. 2302-2308
- [92] Bringer-Meyer, S., Sahm, H. Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylases of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces carlsbergensis*, *Biocatalysis* 1 (1988), S. 321-331
- [93] Chen, G.C., Jordan, F. Brewer's yeast pyruvate decarboxylase produces acetoin from acetaldehyde: A novel tool to study the mechanism of steps subsequent to carbon dioxide loss, *Biochemistry* 23 (1984), S. 3576-3582
- [94] Hildebrandt, G., Klavehn, W. Deutsches Patent Nr. 548 549, U.S. Patent No. 1956950 (1934).
- [95] Netrval, J., Vojtisek, V. Production of phenylacetylcarbinol in various yeast species, *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16 (1982), S. 35-38
- [96] Liew, M.K.H., Fane, A.G., Rogers, P.L. Applicability of continuous membrane bioreactor in production of phenylacetylcarbinol, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 64 (1995), S. 200-206
- [97] Nikolova, P., Ward, O.P. Production of phenylacetylcarbinol by biotransformation using baker's yeast in two-phase systems, in: *Biocatalysis in non-conventional media* (Ed.: Tramper, J.) (1992) Elsevier, Amsterdam, S. 675-680
- [98] Mahmoud, W.M., El-Sayed, A.-H., Coughlin, R.W. Production of L-phenylacetyl carbinol by immobilized yeast cells. I. Batch fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* 36 (1990), S. 47-54
- [99] Mahmoud, W.M., El-Sayed, A.-H., Coughlin, R.W. Production of L-phenylacetyl carbinol by immobilized yeast cells: II. Semicontinuous fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* 36 (1990), S. 55-63
- [100] Mahmoud, W.M., El-Sayed, A.-H., Coughlin, R.W. Effect of beta-cyclodextrin on production of L-phenylacetyl carbinol by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.* 36 (1990), S. 256-262
- [101] Shin, H.S., Rogers, P.L. Kinetic evaluation of biotransformation of benzaldehyde to L-phenylacetylcarbinol by immobilized pyruvate decarboxylase from *Candida utilis*, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996), S. 429-436
- [102] Shin, H.S., Rogers, P.L. Production of L-phenylacetylcarbinol (L-PAC) from benzaldehyde using partially purified pyruvate decarboxylase (PDC), *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996), S. 52-62
- [103] Bruhn, H., Pohl, M., Grötzinger, J., Kula, M.-R. The replacement of Trp392 by alanine influences the decarboxylase/carboligase activity and stability of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*, *Eur. J. Biochem.* 234 (1995), S. 650-655

- [104] Pohl, M. Protein design on pyruvate decarboxylase (PDC) by site directed mutagenesis, *Advances in biochemical engineering* 58 (1997), S. 15-43
- [105] Fuganti, C., Grasselli, P. Stereochemistry and synthetic applications of products of formation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aromatic aldehydes by baker's yeast, in: *Enzymes in organic synthesis* (Pitman London, Ciba Foundation symposium 111) (1985), S. 112-127.
- [106] Fuganti, C., Grasselli, P. Transformation of non-conventional substrates by fermenting baker's yeast: Production of optically active methyl-diols from aldehydes, *Chem. Ind.* (1977), S. 983
- [107] Stumpf, B., Kieslich, K. Acyloin condensation of acyclic unsaturated aldehydes by *Mucor* species, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34 (1991), S. 598-603
- [108] Abraham, W.-R., Stumpf, B. Enzymatic acyloin condensation of acyclic aldehydes, *Z. Naturforsch.* 42c (1987), S. 559-566
- [109] Ohta, H., Ozaki, K., Konishi, J., Tsuchihashi, G. Reductive  $C_2$ -homologation of substituted benzaldehydes by fermenting baker's yeast, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986), S. 1261-1266
- [110] Long, A., Ward, O.P. Biotransformation of aromatic aldehydes by *Saccharomyces cerevisiae*: investigation of reaction rates, *J. Ind. Microbiol.* 4 (1989), S. 49-53
- [111] Long, A., James, P., Ward, O.P. Aromatic aldehydes as substrates for yeast and yeast alcohol dehydrogenase, *Biotechnol. Bioeng.* 33 (1989), S. 657-660
- [112] Kren, V., Crout, D.H.G., Dalton, H., Hutchinson, D.W., König, W., Turner, M.M., Dean, G., Thomson, N. Pyruvate decarboxylase: a new enzyme for the production of acyloins by biotransformation, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* (1993), S. 341-343
- [113] Bornemann, S., Crout, D.H.G., Dalton, H., Kren, V., Lobell, M., Dean, G., Thomson, N., Turner, M.M. Stereospecific formation of R-aromatic acyloins by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1996), S. 425-430
- [114] Schmauder, H.-P., Gröger, D. Studien zur Acyloinbildung durch *Saccharomyces cerevisiae*, *Pharmazie* 23 (1968), S. 320-331
- [115] Cardillo, R., Servi, S., Tinti, C. Biotransformation of unsaturated aldehydes by microorganisms with pyruvate decarboxylase activity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 (1991), S. 300-303
- [116] Bornemann, S., Crout, D.H.G., Dalton, H., Hutchinson, D.W., Dean, G., Thomson, N., Turner, M.M. Stereochemistry of the formation of lactaldehyde and acetoin produced by the pyruvate decarboxylases of yeast (*Saccharomyces* sp.) and *Zymomonas mobilis*: Different Boltzmann distributions between bound forms of the electrophile, acetaldehyde, in the two enzymatic reactions, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1993), S. 309-311
- [117] Ehrlich, F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 40 (1907), S. 1027-1047

- [118] Ter Schure, E.G., Flikweert, M.T., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T., Verrips, C.T. Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998), S. 1303-1307
- [119] Dickinson, J.R., Harrison, S.J., Hewlins, M.J.E. An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998), S. 25751-25756
- [120] Walker, G.M., *Yeast physiology and biotechnology*, (1998) Wiley, Chichester
- [121] DeBoer, L., Harder, W., Dijkhuizen, L. Phenylalanine and tyrosine metabolism in the facultative methylotroph *Nocardia* sp. 239, *Arch. Microbiol.* 149 (1988), S. 459-465
- [122] Barrowman, M.M., Fewson, C.A. Phenylglyoxylate decarboxylase and phenylpyruvate decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*, *Curr. Microbiol.* 12 (1985), S. 235-240
- [123] Gopalakrishna, Y., Narayanan, T.K., Ramananda Rao, G. Biosynthesis of  $\beta$ -phenylethyl alcohol in *Candida guilliermondii*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69 (1976), S. 417-422
- [124] Barrowman, M.M., Harnett, W., Scott, A.J., Fewson, C.A., Kusel, J.R. Immunological comparison of microbial TPP-dependent non-oxidative  $\alpha$ -keto acid decarboxylases, *FEMS Microbiol. Lett.* 34 (1986), S. 57-60
- [125] Häring, D., Schreier, P., Herderich, M. Rationalizing the origin of solerone (5-oxo-4-hexanolide): Biomimetic synthesis and identification of key metabolites in sherry wine, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997), S. 369-372
- [126] Martin, B., Etiévant, P., LeQuéré, J.-L. More clues of the occurrence and flavor impact of solerone in wine, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991), S. 1501-1503
- [127] Hübner, G., Schellenberger, A. Untersuchungen zum Mechanismus der Produkthemmung bei der Pyruvat-Decarboxylase-Reaktion, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351 (1970), S. 1435-1440
- [128] Häring, D., König, T., Withopf, B., Herderich, M., Schreier, P. Enantiodifferentiation of  $\alpha$ -ketols in sherry by one- and two-dimensional HRGC techniques, *J. High Resol. Chrom.* 20 (1997), S. 351-354
- [129] Pohl, M., Siegert, P., Mesch, K., Bruhn, H., Grötzinger, J. Active site mutants of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*, *Eur. J. Biochem.* 257 (1998), S. 538-546
- [130] Prosen, E., Ward, O.P., Collins, S., Dewdney, N.J., Hong, Y., Wilcocks, R. Enantiospecific production of S-(-)-2-hydroxypropiophenone mediated by benzoylformate decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*, *Biocatalysis* 8 (1993), S. 21-29
- [131] Wilcocks, R., Ward, O.W., Collins, S., Dewdney, N.J., Hong, Y., Prosen, E. Acyloin formation by benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992), S. 1699-1704

- [132] G.A. Burdock (Hrsg.), Fenaroli's Handbook of flavor ingredients, Volume II, 3. Aufl. (1995), CRC Press, Boca Raton
- [133] Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., Common fragrance and flavor materials, 2. Aufl. (1990), VCH, Weinheim
- [134] Moio, L., Langlois, D., Etievant, P.X., Addeo, F. Powerful odorants in water buffalo and bovine mozzarella cheese by use of extract dilution sniffing analysis, *Ital. J. Food Sci.* 5 (1993), S. 227-237
- [135] Bosset, J.O., Liardon, R. The aroma composition of Swiss Gruyère cheese II. The neutral volatile components, *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 17 (1984), S. 359-362
- [136] Wong, K.C., Tie, D.Y. Volatile constituents of durian (*Durio zibethinus* Murr.), *Flavour Fragrance J.* 10 (1995), S. 79-83
- [137] Silwar, R., Kamperschröer, H., Tressl, R. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen des Röstkaffeearomas - Quantitative Bestimmung wasserdampfvlüchtiger Aromastoffe, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 10 (1987), S. 176-187
- [138] De Revel, G., Bertrand, A. Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes, in: Trends in flavour research (Hrsg. Maarse, H., van der Heij, D.G.), (1994) Elsevier, Amsterdam, S. 353-361
- [139] Mosandl, A., Fischer, K., Hener, U., Kreis, P., Rettinger, K., Schubert, V., Schmarr, H.-G. Stereoisomeric flavor compounds. 48. Chirospecific analysis of natural flavors and essential oils using multidimensional gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991), S. 1131-1134
- [140] Moncrieff, R.W. The butter flavor, *Food process. mark.* 33 (1965), S. 51-54
- [141] Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S., Drawert, F. Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars, *J. Sci. Food Agric.* 37 (1986), S. 927-943
- [142] Tressl, R., Friese, L., Fendesack, F., Köppler, H. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of hop aroma constituents in beer, *J. Agric. Food Chem.* 26 (1978), S. 1422-1426
- [143] Tressl, R., Bahri, D., Holzer, M., Kossa, T. Formation of flavor components in asparagus. 2. Formation of flavor components in cooked asparagus, *J. Agric. Food Chem.* 25 (1977), S. 459-463
- [144] Mick, W., Schreier, P. Additional volatiles of black tea aroma, *J. Agric. Food Chem.* 32 (1984), S. 924-929
- [145] De la Calle Garcia, D., Reichenbächer, M., Danzer, K., Hurlbeck, C., Bartsch, C., Feller, K.-H. Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction capillary gas chromatography (SPME-CGC) using different fibers, *J. High Resol. Chromatogr.* 20 (1997), S. 665-668

- [146] Bondarovich, H.A., Giammarino, A.S., Renner, J.A., Shepard, F.W., Shingler, A.J., Gianturo, M.A. Some aspects of the chemistry of tea. A contribution to the knowledge of volatile constituents, *J. Agric. Food Chem.* 15 (1967), S. 36-47
- [147] Larick, D.K., Hedrick, H.B., Bailey, M.E., Williams, J.E., Hancock, D.L., Garner, G.B., Morrow, R.E. Flavor constituents of beef as influenced by forage- and grain-feeding, *J. Food Sci.* 52 (1987), S. 245-251
- [148] Suzuki, J., Bailey, M.E. Direct sampling capillary GLC analysis of flavor volatiles from ovine fat, *J. Agric. Food Chem.* 33 (1985), S. 343-347
- [149] Van der Wal, B., Kettenes, D.K., Stoffelsma, J., Sipma, G., Semper, A.T.J. New volatile compounds of roasted cocoa, *J. Agric. Food Chem.* 19 (1971), S. 276-280
- [150] Sakato, K.H., Hoekman, M., Kepner, R.E., Webb, A.D., Muller, C.J. Some neutral aroma components of wines of *Vitis vinifera* variety carignane, *Am. J. Enol. Vitic.* 26 (1975), S. 70-74
- [151] Brock, M.L., Kepner, R.E., Webb, A.D. Comparison of volatiles in a palomino wine and a submerged culture flor sherry, *Am. J. Enol. Vitic.* 35 (1984), S. 151-155
- [152] D'Arcy, B.R., Rintoul, G.B., Rowland, C.Y., Blackman, A.J. Composition of Australian honey extractives. 1. Norisoprenoids, monoterpenes and other natural volatiles from Blue gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow box (*Eucalyptus melliodora*) honeys, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997), S. 1834-1843
- [153] Rowland, C.Y., Blackman, A.J., D'Arca, B.R., Rintoul, G.B. Comparison of organic extractives found in leatherwood (*Eucryphia lucida*) honey and leatherwood flowers and leaves, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995), S. 753-763
- [154] Wong, K.C., Teng, Y.E. Volatile components of *Mimusops elengi* L. flowers, *J. Essent. Oil Res.* 6 (1994), S. 453-458
- [155] Belitz, H.-D., Grosch, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 4. Aufl. (1992), Springer Verlag, Heidelberg Berlin, S. 186ff.
- [156] Michal, G. (Hrsg.): Biochemical pathways, (1999) Spektrum Verlag, Heidelberg
- [157] Nykänen, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages, *Am. J. Enol. Vitic.* 37 (1986), S. 84-96
- [158] Van der Schaft, P.H., deGoede, H., ter Burg, N. Baker's yeast reduction of 2,3-pentanedione to natural 3-hydroxy-2-pentanone, *Spec. Publ. R. Soc. Chem.* 197 (Flavour Science) (1996), S. 134-137
- [159] Christoph, N.: Die Anwendung der gaschromatographischen Sniffing-Technik zur Bestimmung von Geruchsschwellen und Aromawerten, (1983) Dissertation Uni München
- [160] Maarse, H.: Volatile compounds in foods and beverages, (1991) Marcel Dekker, New York, S. 505-508.
- [161] Aromenverordnung vom 22.12.1981, zuletzt geändert am 29.1.1998, §1 Abs.1 i.V.m. Anlage 1, *BGBI.* I (1998), S. 230, 298.

- 
- [162] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1979) S. 680-685
- [163] Ullrich, J. Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacid carboxylase, EC 4.1.1.1). Assay of thiamine pyrophosphate, *Meth. Enzymol.* 18 (1970), S. 109-115
- [164] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976), S. 248-254
- [165] Gill, M., Kiefel, M.J., Lally, D.A. Addition of organomagnesium reagents to cyanohydrin-O-silyl ethers: An efficient and flexible synthesis of unsymmetrically substituted acyloins, *Tetrahedron Letters* 27 (1986), S. 1933-1934
- [166] Spitteller, M., Spitteller, G., Hoyer, G.-A. Urofuransäuren - eine bisher unbekannte Klasse von Stoffwechselprodukten, *Chem. Ber.* 113 (1980), S. 699-709
- [167] Armani, E., Dossena, A., Marchelli, R., Casnati, G. Reaction of aldehydes and ketones with t-butyl bromide-dimethyl sulphoxide, *Tetrahedron* 40 (1984), S. 2035-2039
- [168] Nijssen, L.M., Visscher, C.A., Maarse, H., Willemsens, L.C. (Hrsg.), Volatile compounds in food (TNO Nutrition and Food Research Institut Netherlands), 7. Aufl. (1996)

## 6 Anhang

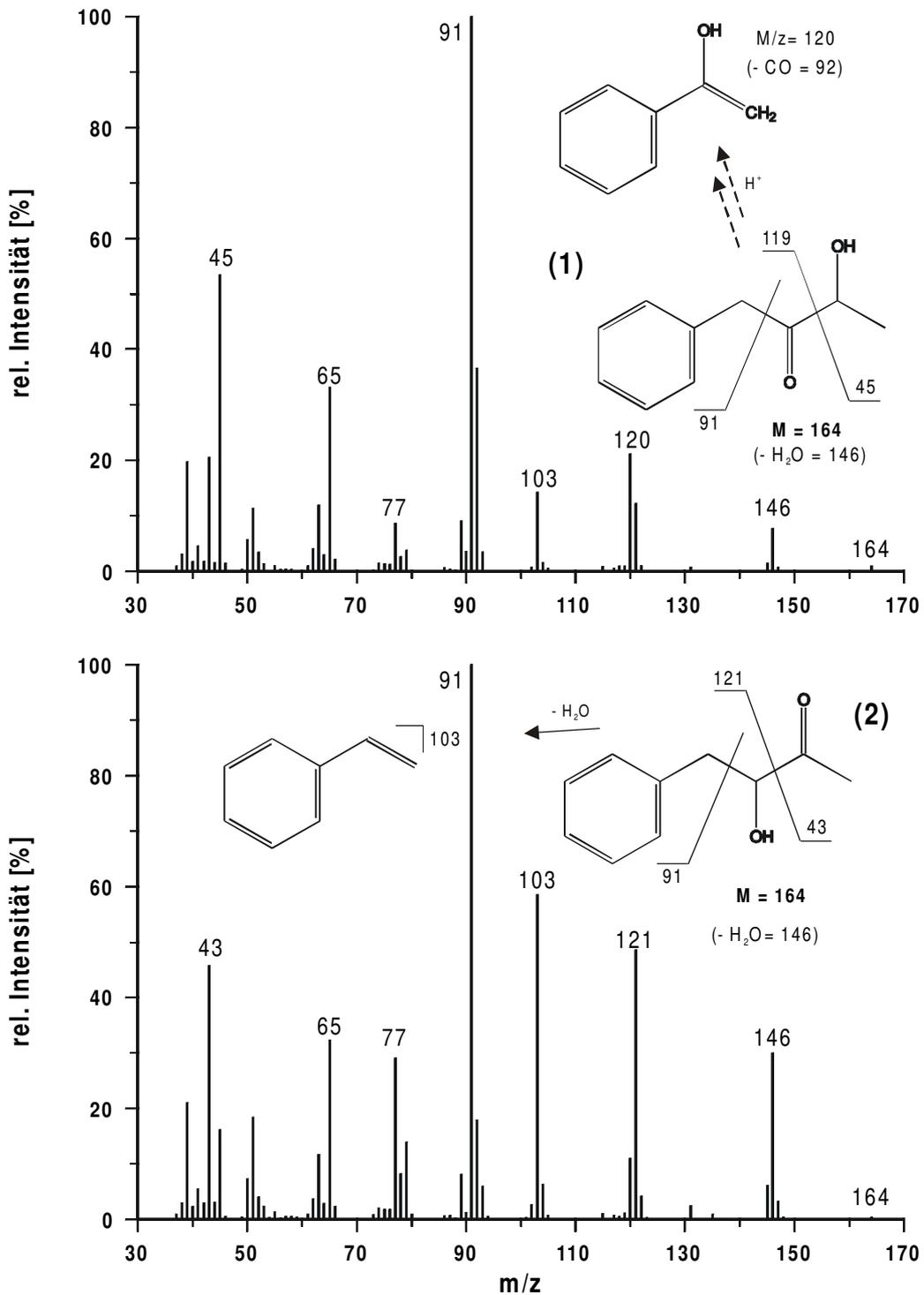


Abb 6-1 Massenspektren von 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon (1) und 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon (2)

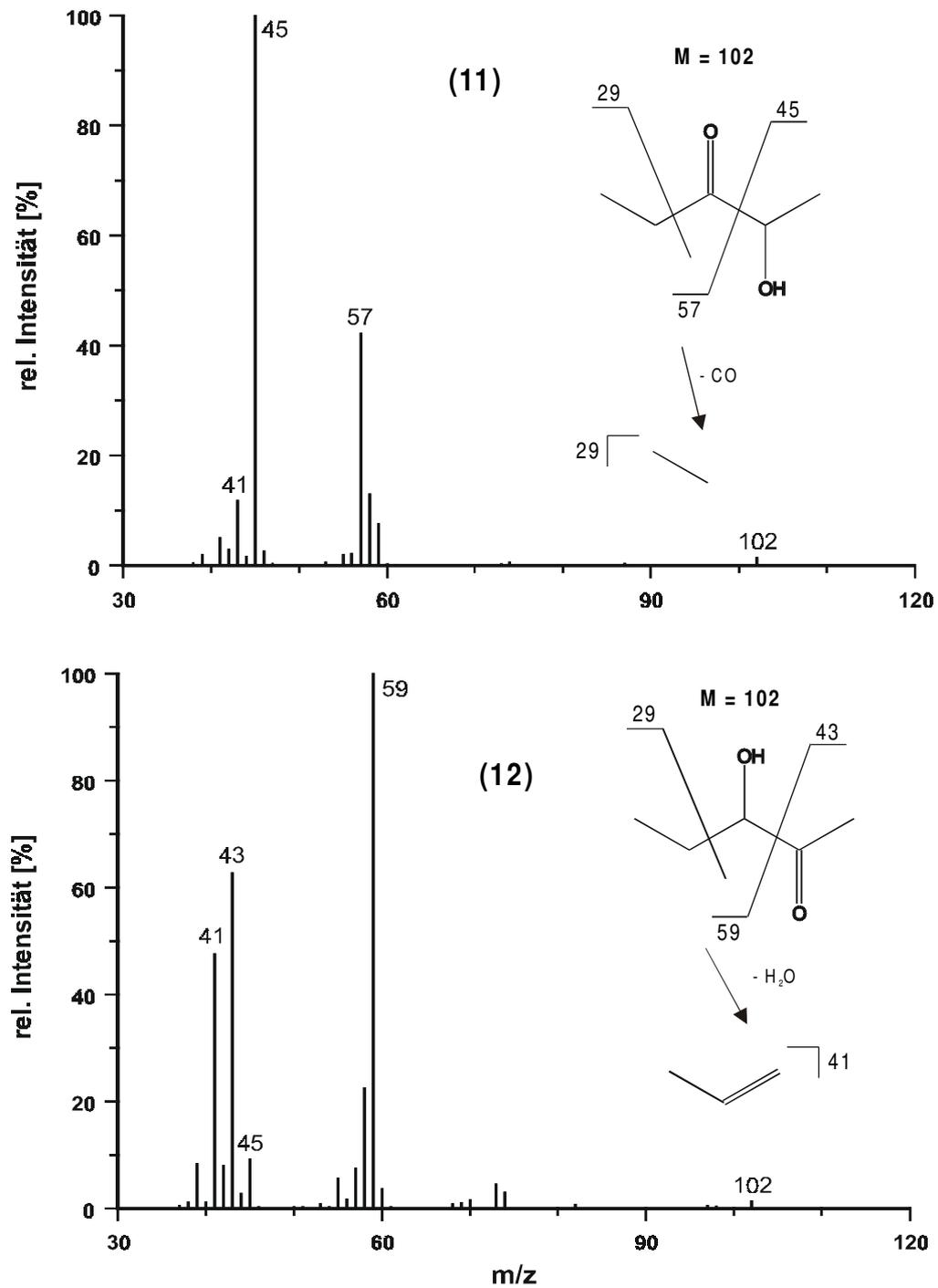


Abb 6-2 Massenspektren von 2-Hydroxy-3-pentanon (11) und 3-Hydroxy-2-pentanon (12)

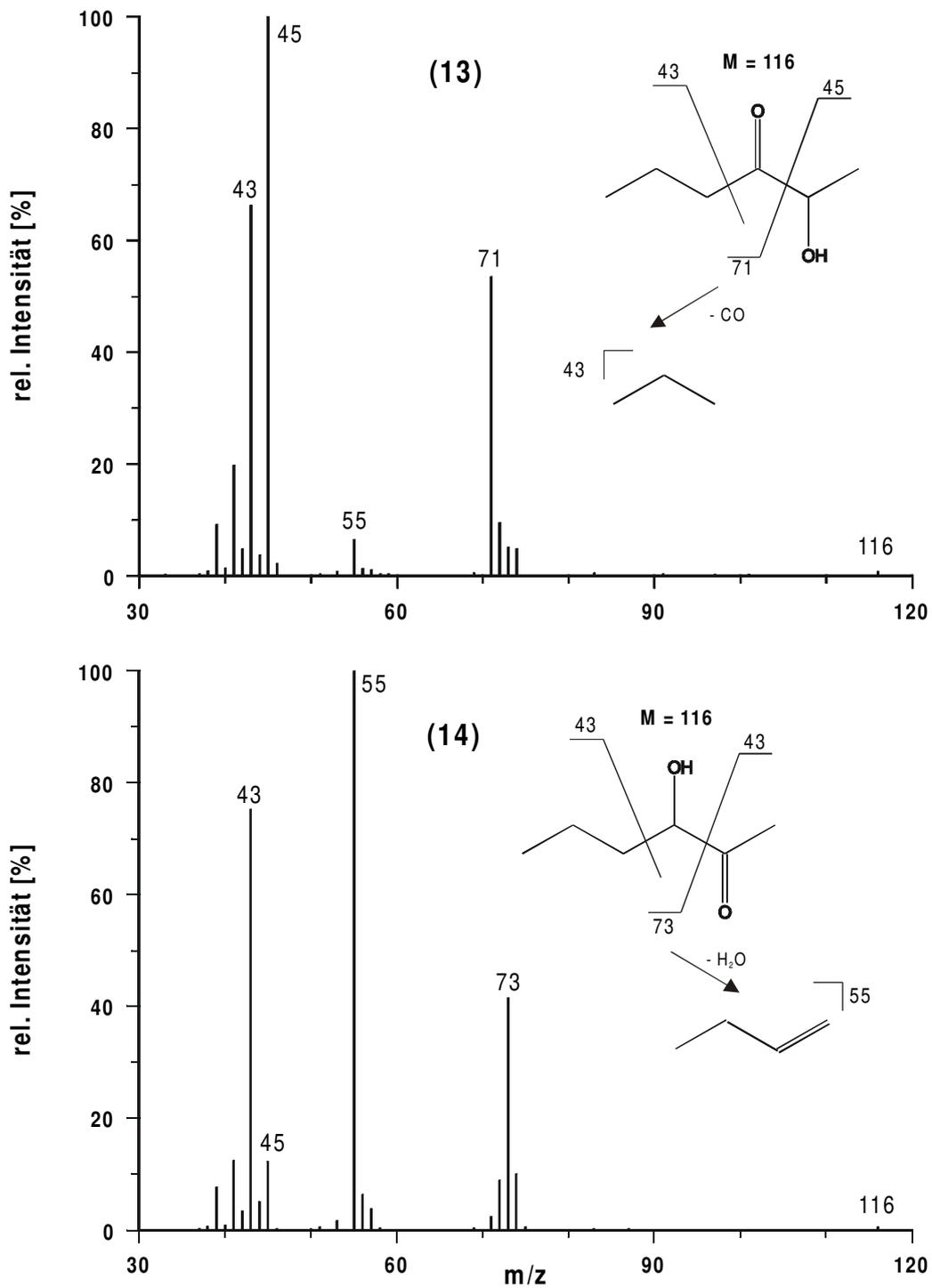


Abb 6-3 Massenspektren von 2-Hydroxy-3-hexanon **(13)** und 3-Hydroxy-2-hexanon **(14)**

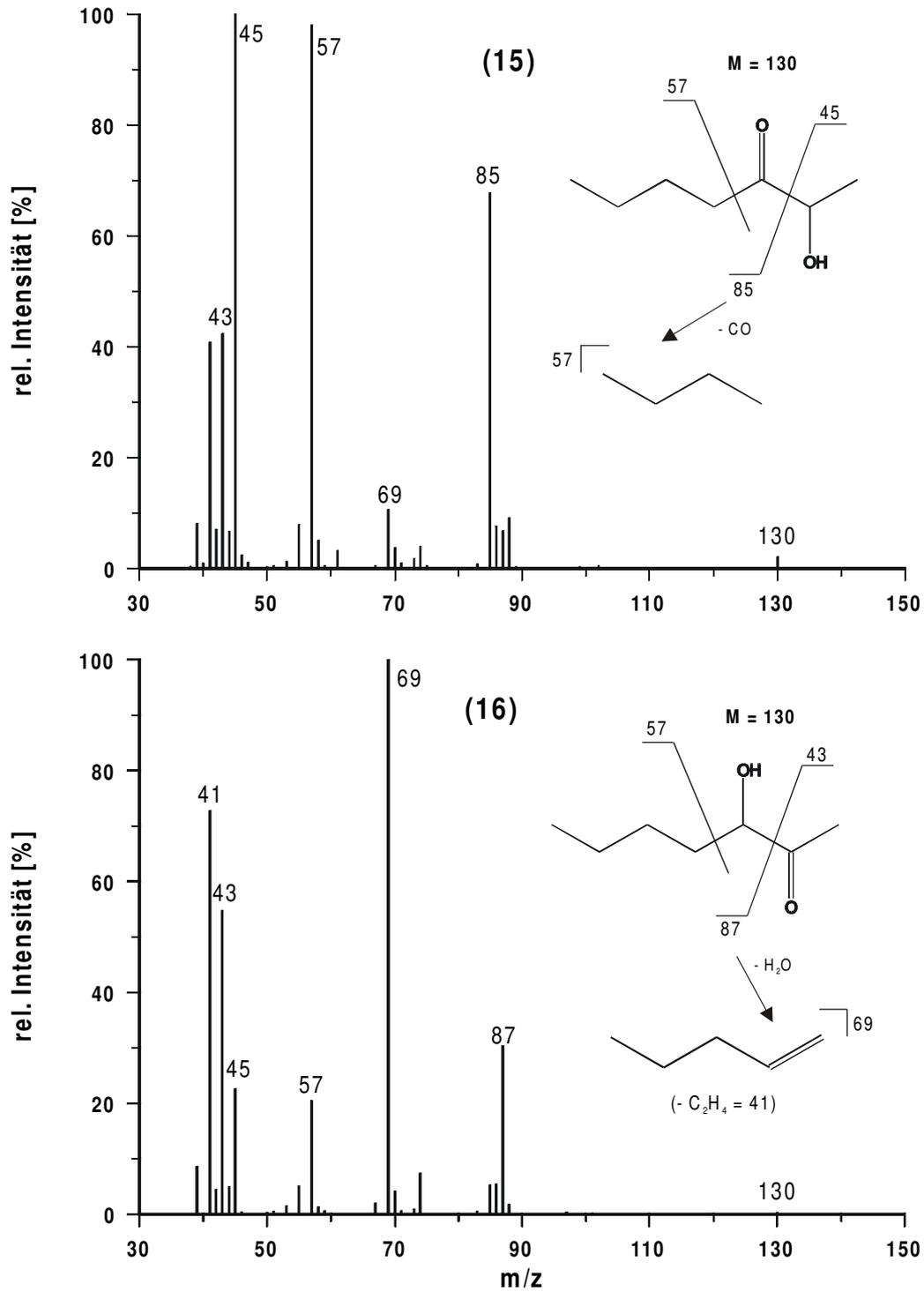


Abb 6-4 Massenspektren von 2-Hydroxy-3-heptanon **(15)** und 3-Hydroxy-2-heptanon **(16)**

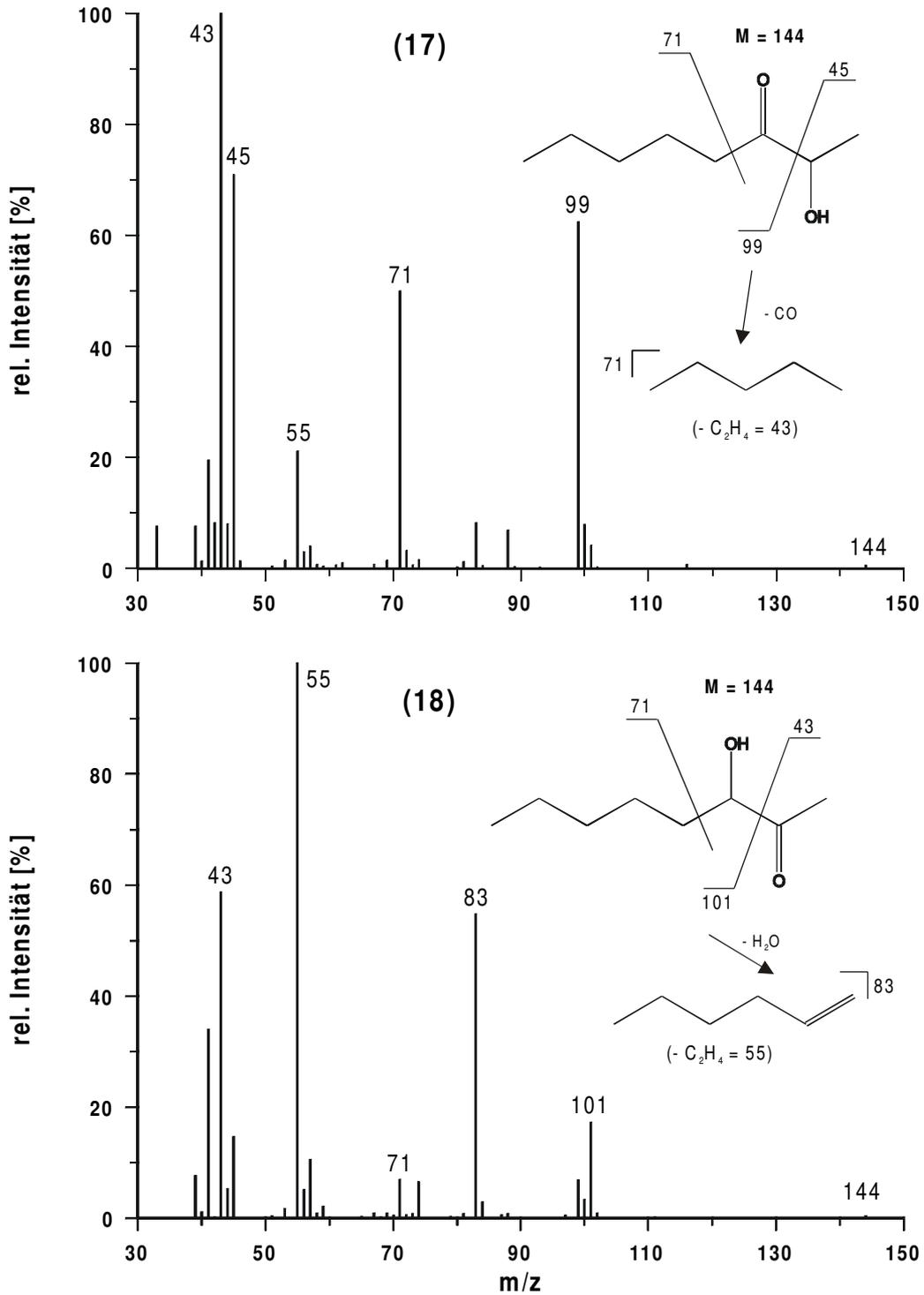


Abb 6-5 Massenspektren von 2-Hydroxy-3-octanon **(17)** und 3-Hydroxy-2-octanon **(18)**

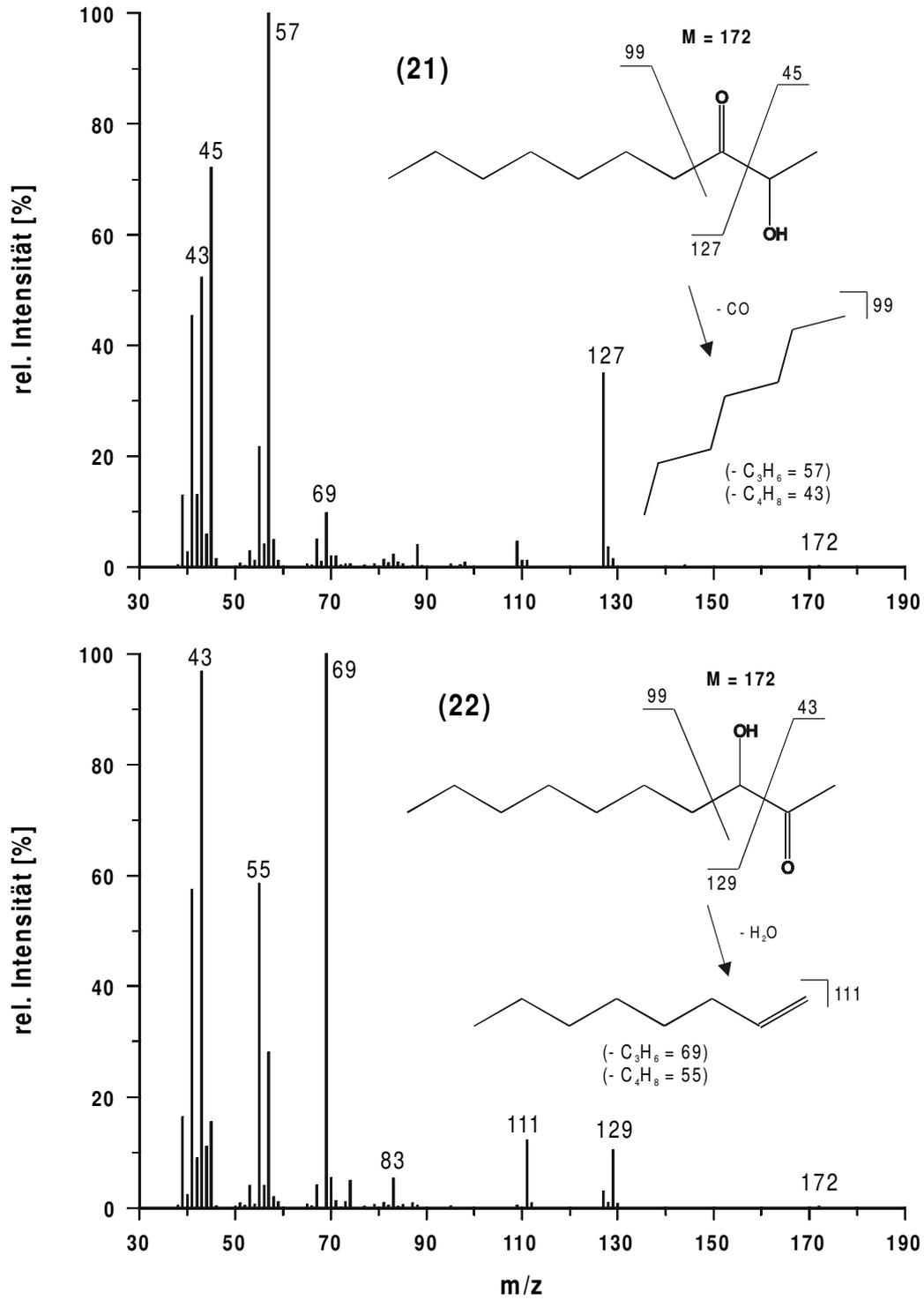


Abb 6-6 Massenspektren von 2-Hydroxy-3-decanon **(21)** und 3-Hydroxy-2-decanon **(22)**

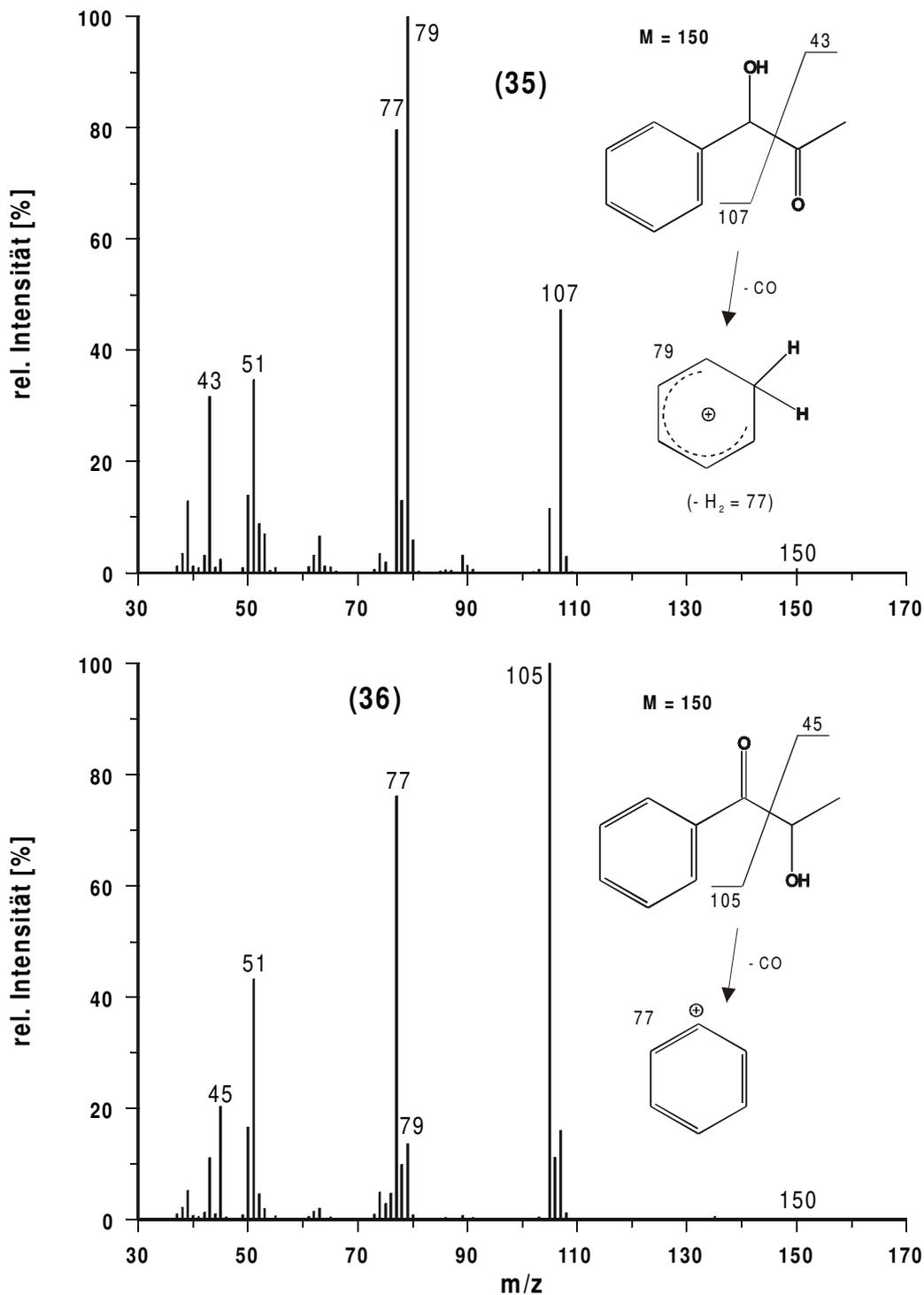


Abb 6-7 Massenspektren von 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon **(35)** und 2-Hydroxy-1-phenyl-1-propanon **(36)**

---

---

## Lebenslauf

Frauke Neuser

geboren am 10.07.1970 in Berlin

### Schulische Ausbildung

1976 - 1977	Oberschule W.Florin (Berlin/Mitte)
1977 - 1984	Oberschule W.Bahnik (Berlin/Prenzlauer Berg)
1984 - 1985	Gymnasium Starnberg
1985 - 1989	Werner-Heisenberg-Gymnasium in Weinheim Abitur im April 1989

### Akademische Ausbildung

1990 - 1995	Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Karlsruhe, Staatsexamen Teil A im Mai 1995
Jan 96 - Dez 96	Berufspraktische Ausbildung zur Lebensmittelchemikerin an der Chemischen Landesuntersuchungsanstalt Karlsruhe, Staatsexamen Teil B im März 1997
März 1997	Beginn der vorliegenden Arbeit am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover (Prof. Dr. R. G. Berger) im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs "Naturstofftransformation"
seit Dez 1998	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelchemie