

**Untersuchungen zur $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung bei der
Biogenese von Aromastoffen**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Markus Appel
aus Würzburg

Würzburg 2008

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom Dezember 2002 bis November 2005 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Schreier durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. P. Schreier gilt mein Dank für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen und das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Heckel und Herrn Michael Kempf, die mir bei vielen technischen Fragestellungen rund um die IRMS behilflich waren.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Christina Preston, Frau Eva-Maria Rumpel und Frau Dr. Sandra Elss für die langjährige und gute Zusammenarbeit an der IRMS bedanken.

Für ihre tatkräftige, tapfere und talentierte Mitarbeit während ihres Fortgeschrittenen-Praktikums danke ich Frau Kathrin Fink und Frau Christina Engelhaupt, die mich bei meinen anderweitigen Tätigkeiten im Rahmen des Lehrstuhlbetriebes entlastet haben.

Dank gilt des weiteren Herrn Dr. Michael Kraus für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Betreuung des organisch-chemischen Studentenpraktikums.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Marcus Taupp, sowohl für das freundschaftliche Verhältnis als auch das stets offene Ohr bei umfangreichen Diskussionen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern und Freunden, insbesondere Herrn Christian Bremer, Herrn Matthias Jäger und Frau Michaela Jäger, aus deren aufmunternden und verständnisvollen Worten ich stets neue Kraft ziehen konnte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	3
2.1	Vorkommen, Verteilung, und Fraktionierung von Isotopen	3
2.2	Isotopenfraktionierungen von Wasserstoff	6
2.2.1	Thermodynamische Isotopenfraktionierungen	6
2.2.2	Isotopenfraktionierungen in Pflanzen	7
2.3	Isotopenfraktionierungen von Kohlenstoff	10
2.3.1	Thermodynamische Isotopenfraktionierungen	10
2.3.2	Isotopenfraktionierungen in Pflanzen	11
2.4	Methoden und Anwendungen der Stabilisotopenanalytik in der Lebensmittelchemie	14
2.4.1	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS)	14
2.4.1.1	Elementaranalyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-IRMS)	15
2.4.1.1.1	Elementaranalyse-Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-C-IRMS)	16
2.4.1.1.2	Elementaranalyse-Pyrolyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-P-IRMS)	17
2.4.1.2	Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-IRMS)	18
2.4.1.2.1	Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-C-IRMS)	19
2.4.1.2.2	Gaschromatographie-Pyrolyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-P-IRMS)	20
2.4.2	Deuterium-Kernresonanzspektroskopie (SNIF-NMR [®])	21
2.4.3	Anwendungsgebiete der Stabilisotopenanalytik	22
2.4.3.1	Authentizitätskontrolle von Aromastoffen	22
2.4.3.2	Weitere Anwendungsgebiete	24
2.5	Aromawirksame C ₆ -/C ₉ -Aldehyde und -Alkohole („Grünnoten“)	26
2.5.1	Allgemeines	26
2.5.2	Biogenese von C ₆ -/C ₉ -Aldehyden und -Alkoholen im Lipidstoffwechsel	27
2.5.2.1	Lipoxygenase-katalysierte Dioxygenierung ungesättigter Fettsäuren	27
2.5.2.2	„Hydroperoxidlyase“-katalysierte Spaltung ungesättigter Fettsäurehydroperoxide	29
2.5.2.2.1	Vorkommen und Eigenschaften von Hydroperoxidlyasen	31

2.5.2.2.2	Der Mechanismus der Hydroperoxidlyase-Katalyse	33
2.5.3	Biotechnologische Produktion von C ₆ -/C ₉ -Aldehyden und -Alkoholen	36
2.5.4	Problemstellung bei der Untersuchung von Isotopenfraktionierungen während der Biogenese von C ₆ -/C ₉ -Aldehyden und -Alkoholen	40
2.6	Die Gärungsnebenprodukte 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol	41
2.6.1	Vorkommen, Eigenschaften und Verwendung	41
2.6.2	Industrielle Prozesse zur Darstellung von 2-Phenylethanol	43
2.6.3	Problemstellung bei der Untersuchung von Isotopenfraktionierungen während der Bildung von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol	45
3	Untersuchungen zur ²H/¹H- und ¹³C/¹²C-Isotopenfraktionierung während der Biogenese von C₆-Aldehyden und -Alkoholen	46
3.1	² H/ ¹ H- und ¹³ C/ ¹² C-Isotopenfraktionierung bei der Lipoxygenase-katalysierten Darstellung von 13-(S)-Linol- und 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid	46
3.2	² H/ ¹ H- und ¹³ C/ ¹² C-Isotopenfraktionierung bei der enzymatischen und chemischen Spaltung von 13-HPOD	51
3.3	² H/ ¹ H- und ¹³ C/ ¹² C-Isotopenfraktionierung bei der enzymatischen und chemischen Spaltung von 13-HPOT	54
3.4	² H/ ¹ H- und ¹³ C/ ¹² C-Isotopenfraktionierung bei der durch <i>S. cerevisiae</i> katalysierten Reduktion von C ₆ -Aldehyden zu C ₆ -Alkoholen	58
3.4.1	² H/ ¹ H- und ¹³ C/ ¹² C-Isotopenfraktionierung bei der durch <i>S. cerevisiae</i> katalysierten Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol	58
3.4.1.1	Fermentative Reduktion von Hexanal aus 13-HPOD	58
3.4.1.2	Modellstudien zur fermentativen Reduktion von Hexanal	59
3.4.1.3	Fermentative Reduktion von Hexanal in D ₂ O	62
3.4.2	² H/ ¹ H- und ¹³ C/ ¹² C-Isotopenfraktionierung bei der durch <i>S. cerevisiae</i> katalysierten Reduktion von (Z)-3- und (E)-2-Hexenal	65
3.4.2.1	Fermentative Reduktion von (Z)-3-Hexenal zu (Z)-3-Hexenol	65
3.4.2.2	Modellstudien zur fermentativen Reduktion von (E)-2-Hexenal	68
3.4.2.2.1	Fermentative Totalreduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol	68
3.4.2.2.2	Fermentative Totalreduktion von (E)-2-Hexenal in D ₂ O	71
3.4.2.3	Fermentative Partialreduktion von (E)-2-Hexenal zur Darstellung von (E)-2-Hexenol	73
4	Untersuchungen zur ²H/¹H- und ¹³C/¹²C-Isotopenfraktionierung bei der fermentativen Bildung von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol	76
4.1	² H/ ¹ H- und ¹³ C/ ¹² C-Isotopenfraktionierung bei der fermentativen Bildung von 2-Phenylethanol	76
4.1.1	Modellgärungen mit C ₃ - und C ₄ -Zuckern zur Darstellung von 2-Phenylethanol	76
4.1.2	Traubensaftgärungen mit C ₃ - und C ₄ -Zuckern zur Darstellung von 2-Phenylethanol	80

4.1.3	Auswertung der Ergebnisse von 2-Phenylethanol unter Anwendung einer $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Multielementkorrelation	82
4.2	$^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung bei der fermentativen Bildung von 2-Methyl-1-propanol	84
4.2.1	Modellgärungen mit C_3 - und C_4 -Zuckern zur Darstellung von 2-Methyl-1-propanol	84
4.2.2	Traubensaftgärungen mit C_3 - und C_4 -Zuckern zur Darstellung von 2-Methyl-1-propanol	86
4.2.3	Auswertung der Ergebnisse von 2-Methyl-1-propanol unter Anwendung einer $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Multielementkorrelation	88
5	Material und Methoden	90
5.1	Material	90
5.1.1	Chemikalien	90
5.1.2	Verbrauchsmaterialien Elementaranalyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-IRMS)	90
5.1.3	Enzyme und Hefen	91
5.1.4	Untersuchungsmaterial	91
5.1.5	Adsorptionsmaterial	91
5.1.6	Dünnschichtchromatographie	92
5.2	Geräte	92
5.2.1	UV-VIS-Spektralphotometer	92
5.2.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	92
5.2.3	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)	92
5.2.4	Kapillargaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS)	93
5.2.5	Elementaranalysatoren (EA)	94
5.2.6	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	95
5.2.7	Sonstige Geräte	95
5.3	Methoden	95
5.3.1	Pufferherstellung	95
5.3.2	Gewinnung einer Hydroperoxidlyase-aktiven Proteinfraction aus Lauch	96
5.3.3	Darstellung von 13-(S)-Linol- und 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid	96
5.3.4	Abbau der Fettsäurehydroperoxide mittels Bortrifluorid	97
5.3.5	Abbau der Fettsäurehydroperoxide mittels Bentonit	98
5.3.6	Abbau der Fettsäurehydroperoxide mittels Hydroperoxidlyase aus Lauch	98
5.3.7	Reduktion von C_6 -Aldehyden zu C_6 -Alkoholen mittels <i>S. cerevisiae</i>	98
5.3.7.1	Fermentative Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol	98
5.3.7.2	Fermentative Totalreduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol	99
5.3.7.3	Fermentative Partialreduktion von (E)-2-Hexenal zur Darstellung von (E)-2-Hexenol	99
5.3.7.4	Fermentative Reduktion von (Z)-3-Hexenal zu (Z)-3-Hexenol	100

5.3.7.5	Fermentative Reduktion von Hexanal und (Z)-3-Hexenal aus dem enzymatischen Abbau von 13-(S)-Linol- und 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid	100
5.3.7.6	Fermentative Reduktion von Hexanal und (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol in D ₂ O	100
5.3.8	Darstellung von Gärungsalkoholen mittels <i>S. cerevisiae</i> aus C ₃ -/C ₄ -Zuckern	100
5.3.9	Darstellung von Gärungsalkoholen mittels <i>S. cerevisiae</i> aus Traubensaft und dotierten C ₃ -/C ₄ -Zuckern	101
5.3.10	Darstellung von Gärungsalkoholen mittels <i>S. cerevisiae</i> aus Aminosäuren	101
5.3.11	Flüssig-Flüssig-Extraktion	101
	Literaturverzeichnis	103
	Anhang	125
	Publikationen, Posterpräsentationen und Vorträge	134
	Erklärung	136

Allgemeine Erläuterungen und Anmerkungen

Die im Text auftretenden Fettsäuren wurden mit ihren Trivialnamen bezeichnet, also 9Z,12Z-Octadecadiensäure als Linolsäure, 9Z,12Z,15Z-Octadecatriensäure als Linolensäure und 5Z,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraensäure als Arachidonsäure. Die im Text auftretenden Fettsäurehydroperoxide wurden dementsprechend z. B. mit 13-(S)-Linolsäurehydroperoxid bzw. 13-HPOD statt als 13-(S)-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiensäure, sowie mit 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid bzw. 13-HPOT anstelle von 13-(S)-Hydroperoxy-9Z,11E,15Z-Octadecatriensäure benannt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, bezieht sich Hefe auf *Saccharomyces cerevisiae* und Linolensäure auf (α)-Linolensäure. Die abgebildeten Massenspektren und HRGC-MS Totalionenchromatogramme wurden den Originalvorlagen entnommen.

Erläuterung der verwendeten Abkürzungen:

2,4-DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
BGBL	Bundesgesetzblatt
CAM	Crassulacean Acid Metabolism (diurnaler Säurerhythmus)
DC	Dünnschichtchromatographie
df	Filmdicke der stationären Phase (GC)
EA	Elementaranalysator
EA-(P/C)-IRMS	Elementaranalysator-(Pyrolyse/Verbrennungs)-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoßionisation
eV	Elektronenvolt
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-(P/C)-IRMS	Gaschromatographie-(Pyrolyse/Verbrennungs)-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
GISP	Greenland Ice Sheet Precipitation
HPL	Hydroperoxidlyase
HPOD	Linolsäurehydroperoxid
HPOT	Linolensäurehydroperoxid
HRGC	Kapillargaschromatographie
HRGC-MS	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie

HRGC-(P/C)-IRMS	Kapillargaschromatographie-(Pyrolyse/Verbrennungs)-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
IAEA	Internationale Atomenergiebehörde
i.d.	innerer Durchmesser
IF	Isomerisierungsfaktor
IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
LLE	Flüsig-Flüssig-Extraktion
LOX-1	Typ I Lipoxygenase-Isoenzym aus Sojabohnen
LOX	Lipoxygenase
M_r	Molekularmasse (relative Molmasse)
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (phosphat)
n.b.	nicht bestimmt
NBS	National Bureau of Standards
NMR	Kernmagnetresonanzspektroskopie
(NP-) HPLC	(Normal Phase-) Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
o.d.	äußerer Durchmesser
ppm	parts per million
SD	Standardabweichung
SLAP	Standard Light Antarctic Precipitation
SNIF-NMR [®]	positionsspezifische Deuterium-Kernresonanzspektroskopie
Tab.	Tabelle
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VO	Verordnung
(V-)PDB	(Vienna-) Pee Dee Belemnite
Vs	Voltsekunde
(V-)SMOW	(Vienna-) Standard Mean Ocean Water

Zusammenfassung

Für die Authentizitätsbewertung achiraler Aromastoffe ist die gaschromatographische Isotopenverhältnismessung mittels massenspektrometrischer Analyse ein etabliertes Verfahren. Diese Technik ermöglicht es, über geeignete Datenbanken authentischer Referenzproben gesicherte Aussagen hinsichtlich deren Herkunft aus natürlicher oder synthetischer Quelle zu treffen. Zunehmend ins Interesse rückt allerdings auch die Frage, ob es mittels Techniken der Stabilisotopenanalytik ebenso möglich ist, das breite Feld der legislativ als „natürlich“ deklarierten Aromastoffe analytisch weiter in deren Herkunft aus biotechnologischer oder natürlicher („ex plant“) Quelle aufzutrennen. Zwar kann dieser Fragestellung prinzipiell über die Erweiterung bestehender Stabilisotopen-Datenbanken mit authentischen Proben nachgegangen werden, sie scheitert jedoch häufig an der limitierten Verfügbarkeit authentischer biotechnologischer Referenzen oder der eingeschränkten Kenntnis über die der Produktion „natürlicher“ Aromastoffe zugrundeliegenden Verfahrenstechniken. Eine mögliche Vorgehensweise zur Umgehung dieses Sachverhalts stellt daher die in Anlehnung an beschriebene biotechnologische Verfahren im Labormaßstab durchgeführte Produktion ausgewählter und somit auch authentischer Referenz-Aromastoffe dar. Diese Methode hat zudem den Vorteil, dass gegebenenfalls zusätzliche Informationen über mögliche Isotopenfraktionierungen in solchen Systemen ermittelt werden können, welche sich nicht nur zur Authentizitätsprüfung als nützlich erweisen können, sondern auch zur stetig wachsenden Grunderkenntnis über Isotopenfraktionierungen in biologischen Systemen beitragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, der geschilderten Fragestellung bezüglich ausgewählter Aromastoffe aus den Gruppen der C₆-Aldehyde und -Alkohole („Grünnoten“) sowie der Gärungsalkohole nachzugehen. Zu diesem Zweck erfolgten zum einen im Labormaßstab die biogenetische Bildung von C₆-Aldehyden und -Alkoholen ausgehend von den ungesättigten Fettsäuren Linol- und Linolensäure, ferner wurden parallel Edukte, Intermediate und Produkte isoliert und hinsichtlich ihrer Stabilisotopengehalte durch Bestimmung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte untersucht. Zum anderen sind auf fermentativem Wege ausgehend von unterschiedlichen Kohlenhydratquellen die Gärungsalkohole 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol dargestellt worden. Des Weiteren galt es, die bei den Gärungsalkoholen resultierende Datenlage dahingehend zu prüfen, ob sich diese über eine Korrelation der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte dazu eignet, eine Authentizitätsbewertung dieser Aromastoffe hinsichtlich natürlicher oder synthetischer Herkunft zu ermöglichen. Zusammenfassend lassen sich die folgenden Ergebnisse festhalten:

Ausgehend von Linol- und Linolensäure kam es im Rahmen der Lipoxygenase Typ-1 katalysierten Biogenese von 13-(S)-Linol- und 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid zu einer durchschnittlichen Deuteriumanreicherung im Bereich von $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = 20\text{-}30\%$, deren Ursache nicht allein über die stattfindenden Wasserstoff-Austauschreaktionen erklärt werden kann. Demgegenüber wurde das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis durch die Dioxygenierung nicht verändert.

Die enzymatische und chemische Spaltung von 13-(S)-Linolsäurehydroperoxid führte zur Bildung von Hexanal, welches um einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert im Bereich von 42-66‰ gegenüber der Edukt-Linolsäure angereichert war, und somit die nicht-statistische intramolekulare Deuteriumverteilung von Fettsäuren auch über das Hydroperoxid konservierte. Demgegenüber zeigte sich bei der Betrachtung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wertes nur eine marginale Anreicherung. Allein aufgrund der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der gebildeten Hexanale ergab sich jedoch keine Unterscheidungsmöglichkeit bezüglich der chemischen oder enzymatischen Spaltung des 13-(S)-Linolsäurehydroperoxids.

Die enzymatische Spaltung von 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid führte zur Bildung von (Z)-3-Hexenal, welches um einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von 38‰ gegenüber der Edukt-Linolensäure angereichert war, womit auch in diesem Fall die nicht-statistische intramolekulare Deuteriumverteilung von Fettsäuren über das Hydroperoxid konserviert wurde. Demgegenüber wurde der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert praktisch nicht beeinflusst.

Die chemische Spaltung von 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid erbrachte je nach verwendeter Methode unterschiedliche Anteile von (Z)-3-Hexenal und (E)-2-Hexenal, wobei das resultierende (E)-2-Hexenal in Deuterium um einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert im Bereich von 91-110‰ gegenüber der Edukt-Linolensäure angereichert wurde. (Z)-3-Hexenal konnte auf chemischem Weg nur zusammen mit (E)-2-Hexenal erhalten werden, dabei zeigte sich eine Anreicherung der schwereren ^2H - und ^{13}C -Isotope gegenüber dem hierbei isotopomer leichteren (E)-2-Hexenal.

Die fermentative Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol mittels *S. cerevisiae* erbrachte - je nach $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert des verwendeten Edukt-Hexanals - eine unterschiedliche Deuteriumanreicherung um einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert im Bereich von 16-48‰, wohingegen der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert praktisch nicht verändert wurde. Durch graphische Auftragung konnte der formale $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert der übertragenen Wasserstoffatome ermittelt werden, welcher sich als konstant herausstellte und dadurch die unterschiedlichen Deuteriumanreicherungen (je nach $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert des verwendeten Edukt-Hexanals) bedingte. Durch die zusätzliche fermentative Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol mittels *S. cerevisiae* in D_2O ließ sich zudem der Einfluss von Wasser bei der Entstehung der beobachteten Deuteriumanreicherungen nachweisen.

Die fermentative Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol mittels *S. cerevisiae* erbrachte je nach $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert des verwendeten Edukt-(E)-2-Hexanals sowohl eine Deuteriumabreicherung, als auch -anreicherung um einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert im Bereich von -40 bis +51‰. Auch hier war keine signifikante Veränderung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wertes zu beobachten. Durch graphische Auftragung wurde auch in diesem Fall der formale $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert der übertragenen Wasserstoffatome ermittelt, welcher sich als konstant herausstellte und so zu den unterschiedlichen beobachteten Veränderungen in den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten führte. Durch die zusätzliche fermentative Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol mittels *S. cerevisiae* in D_2O konnte auch hier der Einfluss von Wasser bei der Entstehung der beobachteten Deuteriumanreicherungen nachgewiesen werden.

Die fermentative Reduktion von (Z)-3-Hexenal zu (Z)-3-Hexenol mittels *S. cerevisiae* erbrachte ebenfalls je nach $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert des verwendeten Edukt-(Z)-3-Hexenals eine unterschiedliche Deuteriumanreicherung um einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert im Bereich von 6-51‰, wohingegen der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert ebenfalls praktisch nicht verändert wurde.

Die fermentative Partialreduktion von (E)-2-Hexenal zur Darstellung von (E)-2-Hexenol mittels *S. cerevisiae* erbrachte neben einer Deuteriumanreicherung um einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert im Bereich von 114-147‰ eine ^{12}C -Isotopendiskriminierung und eine damit verbundene Anreicherung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wertes von 0,6-4,1‰.

Modellgärungen mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen (C_3 , C_4 und CAM) und C_3/C_4 -Zuckermischungen führten bei der Bildung von 2-Phenylethanol zu unterschiedlichen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten. Für die verwendeten C_3 -Zucker resultierten hierbei $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von -204 bis -210‰ sowie $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von -28,0 bis -28,5‰. Unterschiedliche C_4 -Zucker bedingten demgegenüber $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von -164 bis -180‰ sowie $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von -18,2 bis -20,3‰. Für 2-Phenylethanol aus einer CAM-Kohlenhydratquelle sind $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von -165 und -167‰ sowie $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von -21,4 und -21,7‰ ermittelt worden.

Traubensaftgärungen mit C_3 und C_4 -Kohlenhydratdotierung zur Bildung von 2-Phenylethanol zeigten, dass bezüglich des $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wertes der Zusatz von C_4 - und C_3/C_4 -Zuckermischungen zu keiner nennenswerten Veränderung führte, wohingegen die Dotierung mit C_3 -Rübenzucker ab einem Zusatz von 40% mit einer einhergehenden Abreicherung von 2-Phenylethanol um einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von 20-25‰ zunehmend ersichtlich wurde. Hinsichtlich des $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wertes von 2-Phenylethanol konnte gezeigt werden, dass bereits die Zugabe von 20% C_4 -Zucker zu einer merklichen Anreicherung führte, welche auch bei der entsprechenden Dotierung mit C_3/C_4 -Zuckermischungen mit zunehmenden C_4 -Kohlenhydratanteil auftrat.

Modellgärungen unterschiedlicher Kohlenhydratquellen (C_3 , C_4 und CAM) und C_3/C_4 -Zuckermischungen führten bei der Bildung von 2-Methyl-1-propanol im Gegensatz zu 2-Phenylethanol zu keiner deutlichen Veränderung des $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wertes, wenngleich eine Tendenz zur Anreicherung mit steigendem C_4 -Kohlenhydratanteil durchaus erkennbar, jedoch nicht so stark wie bei 2-Phenylethanol ausgeprägt war. Für die verwendeten C_3 -Zucker resultierten hierbei $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von -296 bis -281‰ sowie $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von -21,4 bis -21,7‰. Unterschiedliche C_4 -Zucker bedingten demgegenüber $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von -256 bis -268‰ sowie $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von -9,2 bis -12,1‰. Für 2-Methyl-1-propanol aus der verwendeten CAM-Kohlenhydratquelle sind $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von -260‰ sowie $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von -12,0 und -12,7‰ ermittelt worden.

Traubensaftgärungen mit C_3 und C_4 -Kohlenhydratdotierung zur Bildung von 2-Methyl-1-propanol zeigten, dass bezüglich des $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wertes der Beobachtung bei 2-Phenylethanol entsprechend der Zusatz von C_4 - und C_3/C_4 -Zuckermischungen zu keiner nennenswerten Veränderung führte, wohingegen die Dotierung mit C_3 -Rübenzucker ab einem Zusatz von 40% mit einer einhergehenden Ab-

reicherung von 2-Methyl-1-propanol um einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von 20-25‰ zunehmend erkennbar wurde. Bezüglich der resultierenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol führte im Gegensatz zu den Beobachtungen bei 2-Phenylethanol lediglich die Zugabe von C_4 -Zuckern zu einer merklichen Anreicherung, wohingegen dieser Effekt bei der entsprechenden Dotierung mit C_3/C_4 -Zuckermischungen mit zunehmenden C_4 -Kohlenhydratanteil nicht so deutlich erschien.

Die Auswertung der Ergebnisse von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol unter Anwendung einer $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Multielementkorrelation erbrachte, dass sich die bestehende Datenlage für eine Unterscheidung von natürlichem und synthetischen 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol eignet.

Summary

For the authenticity assessment of achiral flavor substances gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry (HRGC-IRMS) is an established method. Using authentic reference data, this technique allows the differentiation between a “natural” or synthetic origin. The problem, however, to distinguish biotechnologically produced “natural” flavors from other “natural” ones, e.g. “ex plant” origin, is still unsolved. A suitable approach would be to expand the already existing stable isotope databases using authentic samples. However, this often fails due to the limited availability of authentic biotechnological references or restricted knowledge about the production processes for “natural” flavors. An appropriate alternative is the controlled production of authentic reference flavors according to published biotechnological processes on a laboratory scale. With this strategy additional information about eventual isotopic fractionations can be obtained, which is not only useful for authenticity assessment, but also to extend our basic knowledge about isotopic discriminations in biological systems.

The aim of the present study was therefore to elucidate this question regarding selected flavor substances from the groups of the C₆-aldehydes and -alcohols (“green notes”), as well as some fermentation alcohols. For this purpose, the biogenetic production of C₆-aldehydes and -alcohols from the unsaturated fatty acids linoleic and linolenic acid was realized, and, in parallel, educts, intermediates and products were isolated and analysed as to their $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - and $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values. In addition, the fermentative production of 2-phenylethanol and 2-methyl-1-propanol was performed by using different sources of carbohydrates. Regarding these fermentation alcohols, the resulting data should also be tested, whether the correlation of the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - and $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values enables the authenticity assessment of the flavor substances towards their synthetic or “natural” origin. In summary, the following results were acquired:

During lipoxygenase type-1 catalyzed biogenesis of 13-(S)-linoleic- and 13-(S)-linolenic acid hydroperoxide, starting from linoleic and linolenic acid respectively, an average deuterium enrichment of $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = 20\text{-}30\text{‰}$ was observed, which cannot be explained entirely by the proposed hydrogen exchanges. In contrast, dioxygenation did not affect the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios.

Enzymatical and chemical cleavage of 13-(S)-linoleic acid hydroperoxide led to the formation of hexanal, which was depleted towards the educt linoleic acid by $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = 42\text{-}66\text{‰}$ and therefore conserved the non-statistical intramolecular deuterium distribution within fatty acids beyond the hydroperoxide. As to the $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values, only a minimal depletion was observed. By comparison of the resulting $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - and $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values, it was not possible to distinguish between chemical and enzymatic cleavage of the 13-(S)-linoleic acid hydroperoxide.

Enzymatical cleavage of 13-(S)-linolenic acid hydroperoxide resulted into the formation of (Z)-3-hexenal, which was depleted towards the educt linolenic acid by $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = 38\%$ and therefore also, conserved the non-statistical intramolecular deuterium distribution within fatty acids. In principle, the $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -value was not affected at all.

Chemical cleavage of 13-(S)-linolenic acid hydroperoxide led, depending on the used method, to different amounts of (E)-2- and (Z)-3-hexenal, whereas the resulting (E)-2-hexenal was depleted in deuterium by $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = 91\text{-}110\%$ towards the educt linolenic acid. (Z)-3-hexenal was only obtained together with (E)-2-hexenal; an enrichment of the heavier ^2H - and ^{13}C -isotopes towards the lighter (E)-2-hexenal was observed.

Fermentative reduction of hexanal to 1-hexanol using *S. cerevisiae* led to a deuterium enrichment within the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values by 16-48%, with the degree of enrichment depending on the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -value of the starting hexanal. $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values showed no change after fermentative reduction. Graphical evaluation made the formal $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -value of the transferred hydrogen atoms accessible, which was shown to be constant and, thus caused the different enrichments observed in dependence on the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of the educt hexanal. Additional fermentative reduction of hexanal to 1-hexanol with *S. cerevisiae* in D_2O showed the influence of water on the observed deuterium enrichments.

Fermentative reduction of (E)-2-hexenal to 1-hexanol using *S. cerevisiae* led, depending on the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of the educt (E)-2-hexenal, both to deuterium enrichment and depletion within the range of $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -40$ to $+51\%$. Here as well, no significant changes in the $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values were observed. Graphical evaluation made again the formal $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -value of the transferred hydrogen atoms accessible, which also was shown to be constant and therefore caused the different enrichments observed in dependence on the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of the educt (E)-2-hexenal. Additional fermentative reduction of (E)-2-hexenal to 1-hexanol with *S. cerevisiae* in D_2O showed as well the influence of water on observed deuterium enrichments.

Fermentative reduction of (Z)-3-hexenal to (Z)-3-hexenol using *S. cerevisiae* resulted - in dependence of the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -value of the educt (Z)-3-hexenal - into a deuterium enrichment within the range of $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = 6$ to 51% , whereas the $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -value was not affected.

Partial fermentative reduction of (E)-2-hexenal for the preparation of (E)-2-hexenol using *S. cerevisiae* led to a deuterium enrichment within the range of $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = 114\text{-}147\%$ but also to a ^{12}C -isotopic discrimination, exhibiting an enrichment within the $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -value by 0,6-4,1%.

Model fermentations using different carbohydrate sources (C_3 , C_4 und CAM) and C_3/C_4 -sugar mixtures led within the production of 2-phenylethanol to different $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -and $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values. For the used C_3 -sugars, $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of -204 to -210‰ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values of -28,0 to -28,5‰ were obtained; different C_4 -sugars resulted into $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of -164 to -180‰ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -

values of -18,2 to -20,3‰, respectively. 2-Phenylethanol produced from a CAM-carbon source showed $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of -165 and -167‰, as well as $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values of -21,4 and -21,7‰.

Regarding the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of 2-phenylethanol, the fermentation of grape juice with added C₃- and C₄-sugars showed that the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values varied only slightly after the addition of C₄- and C₃/C₄-sugar mixtures, whereas the addition of C₃-beet sugar to a concentration of 40% or more deduced an depletion within the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values by 20-25‰. In view of the $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values of 2-phenylethanol it became obvious, that the addition of only 20% C₄-sugar led to a significant enrichment, which was also visible using C₃/C₄-sugar mixtures in relation to the increasing amount of C₄-carbon source.

Model fermentations with different carbohydrate sources (C₃, C₄ und CAM) and C₃/C₄-sugar mixtures did not show within the fermentative production of 2-methyl-1-propanol - in contrast to the observations on 2-phenylethanol - distinct changes of the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values, although the tendency for an enrichment with an increasing amount of C₄-sugar was still visible. For the used C₃-sugars, $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of -296 to -281‰ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values of -21,4 to -21,7‰ were obtained, different C₄-sugars resulted into $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of -256 to -268‰ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values of -9,2 to -12,1‰, respectively. 2-Methyl-1-propanol produced from a CAM-carbon source showed $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of -260‰, as well as $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values of -12,0 and -12,7‰.

The fermentations of grape juice with added C₃- and C₄-sugars showed in analogy to the observations on 2-phenylethanol that the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values of 2-methyl-1-propanol changed only slightly after the addition of C₄- and C₃/C₄-sugar mixtures, whereas the addition of C₃-beet sugar at 40% content or more deduced an depletion within the $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -values by 20-25‰. In view of the $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -values of 2-methyl-1-propanol and in contrast to the observations on 2-phenylethanol, only the addition of C₄-sugars led to an significant enrichment. This was also visible, if only slightly, by the addition of C₃/C₄-sugar mixtures in relation to the increasing amount of C₄-carbon source.

The evaluation of the results for 2-phenylethanol and 2-methyl-1-propanol by using a $^2\text{H}/^1\text{H}$ - and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -multielement correlation made sure that the obtained databasis is suitable for the authenticity assessment of natural and synthetic 2-phenylethanol and 2-methyl-1-propanol.

1 Einleitung

Zu den zahlreichen qualitätsrelevanten Parametern von Lebensmitteln, deren Mindestmaß der Gesetzgeber in einer Vielzahl von Gesetzen und Verordnungen geregelt hat, zählen auch solche, die sich mit Herkunft und Authentizität sowie weiteren Aussagen diesbezüglicher Art befassen. Es sind bekanntlich vornehmlich die Herkunft sowie die verwendeten Rohstoffqualitäten, welche den Preis, aber auch den Marktwert eines Lebensmittels bestimmen. Sowohl das zunehmende Ernährungs- und Gesundheitsbewusstsein, als auch der seit Jahren stetig an Bedeutung gewinnende ökologisch sensibilisierte Zeitgeist tragen dazu bei, dass der Konsument von Lebensmitteln zunehmend nach mehr „natürlichen“ Produkten als solches, oder aber zumindest nach mehr natürlichen Inhaltsstoffen verlangt. Aussagen der Hersteller bezüglich solcher Qualitätskriterien beeinflussen daher auch das Kaufverhalten des Verbrauchers. Da dieser in diesem Zusammenhang auch dazu bereit ist, mehr für das Produkt zu bezahlen, besteht die Gefahr von unzulässigen und falschen Aussagen bezüglich qualitätsrelevanter Merkmale eines Lebensmittels, vor denen der Verbraucher geschützt werden muss.

Dies gilt insbesondere für die Aromatisierung von Lebensmitteln mit Aromastoffen und Aromazubereitungen, wobei die Erfahrungen der vergangenen Jahre gezeigt haben, dass der Verbraucher Produkte mit „natürlicher“ Aromatisierung solchen mit „naturidentischer“ Aromatisierung den Vorzug gibt. Dieses Kaufverhalten hat nicht nur die Industrie stimuliert, Verfahren zur Produktion von natürlichen Aromastoffen auszuweiten bzw. neu zu entwickeln, sondern auch den „schwarzen Schafen“ in der Branche Möglichkeiten eröffnet, sich mit falscher Deklaration bezüglich der verwendeten Aromastoffe einen Wettbewerbsvorteil zu verschaffen, da oftmals Preisspannen bis in den höheren dreistelligen Prozentbereich zwischen „naturidentischen“ und „natürlichen“ Aromen vorliegen. Der Gesetzgeber hat dieses Problem erkannt und daher sowohl den Wettbewerb als auch den Schutz des Verbrauchers legislativ geregelt. Demnach dürfen Aromen nur dann als „natürlich“ deklariert werden, wenn sie durch physikalische Verfahren aus natürlichen Quellen (z. B. „ex plant“) erhalten oder mit Hilfe von Enzymen und/oder Mikroorganismen aus natürlichen Vorstufen (biotechnologisch) hergestellt wurden.

Es ist daher notwendig, die von den Herstellern gemachten Angaben bezüglich der in einem Lebensmittel verwendeten Aromen auf chemisch-analytischen Wege zu kontrollieren, um diesbezüglichen Verfälschungen auf die Spur zu kommen. Da jedoch „naturidentische“ Aromen den „natürlichen“ chemisch gleich sind, gelingt dies nicht mehr auf klassisch chemisch-analytischem Weg, sondern meist nur noch mittels Techniken der Stabilisotopenanalytik. Diese machen es sich zunutze, dass die Isotopenzusammensetzungen von Aromastoffen je nach Herkunft aus synthetischer oder natürlicher Quelle unterschiedlich geartet sind, so dass durch umfangreiche Datenaquisition und Erstellung aromarelevanter Datenbanken, gegebenenfalls auch gepaart mit statistischen Methoden, gesicherte Aussagen bezüglich der Authentizität eines Aromastoffs gemacht werden können.

Bezüglich der Authentizitätsbewertung von achiralen Aromastoffen ist die Untersuchung derartiger Verbindungen mit Stabilisotopen-analytischen Methoden mittlerweile ein etabliertes Verfahren. Allerdings stellt sich hierbei auch unweigerlich die Frage, ob sich biotechnologisch produzierte Aromastoffe ebenfalls von denjenigen natürlicher („ex plant“) Herkunft unterscheiden lassen. Die Ausweitung diesbezüglicher Datenbanken wird durch die limitierte Verfügbarkeit authentischer biotechnologischer Referenzproben oftmals erschwert, weshalb als Alternative bzw. Ergänzung hier sicherlich die unter kontrollierten Bedingungen im Labormaßstab durchgeführte biotechnologische Produktion von Aromastoffen in Frage kommt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Datenlage bezüglich ausgewählter und biotechnologisch im Labormaßstab erzeugter Aromastoffe zu erweitern. Zu diesem Zweck sollte in Modellstudien sowohl die biotechnologische Produktion ausgewählter aromaaktiver C₆-Aldehyde und -Alkohole („Grünnoten“) in Anlehnung an publizierte Verfahren erfolgen, als auch die fermentative Darstellung der Gärungsalkohole 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol durchgeführt werden. In Bezug auf die „Grünnoten“ sollten die dabei erhaltenen Daten dahingehend geprüft werden, inwieweit sie in Verbindung mit der bereits vorhandenen Datenlage eine detailliertere Aussage zur Authentizitätsbewertung zulassen. Demgegenüber galt es bei der fermentativen Produktion der beiden Gärungsalkohole zunächst eine solide Datengrundlage für die Authentizitätsbewertung zu erstellen, da in diesem Bereich bisher nur vereinzelt Stabilisotopendaten zur Verfügung standen.

2 Kenntnisstand

2.1 Vorkommen, Verteilung, und Fraktionierung von Isotopen

Im Allgemeinen treten Atome einzelner chemischer Elemente in der Natur nicht homogen auf, sondern stets in Form einer Ansammlung unterschiedlicher Nuklide mit gleicher Ordnungszahl (= Protonenzahl), jedoch unterschiedlicher Massenzahl (= Protonenzahl + Neutronenzahl). Für diese Elemente prägte 1913 der Rutherford-Schüler und spätere Nobelpreisträger Frederick Soddy den Begriff *Isotop*, nachdem er bei Arbeiten mit radioaktiven Elementen zeigen konnte, dass Atome radioaktiver Elemente zwar unterschiedliche Massen, jedoch gleiche chemische Eigenschaften besitzen. Isotope (*griech.: gleicher Ort*) sind demnach alle Atome eines Elements, die sich lediglich in der Anzahl von Neutronen im Kern unterscheiden. Dabei differenziert man zusätzlich zwischen den stabilen und radioaktiven Isotopen, d.h. denjenigen, die entsprechend ihrer Halbwertszeit radioaktivem Zerfall und somit Kernumwandlungsprozessen unterliegen. In der Regel besitzt jedes natürlich vorkommende Element ein oder wenige stabile Isotope, während die anderen Isotope instabil sind und früher oder später zerfallen. Als *relative Häufigkeit* bezeichnet man den prozentualen Anteil eines Isotops an dessen jeweiligem Element. Diese wird in Atom-% angegeben. Multipliziert man bei Elementen die Massen der Nuklide jedes stabilen Isotops, welche als relative Größen in Bezug zum Kohlenstoffisotop ^{12}C angegeben werden, mit der jeweiligen relativen Häufigkeit und addiert diese, so erhält man das *Atomgewicht* bzw. die *mittlere Atommasse* in Dalton, wie sie dann auch z. B. im Periodensystem angegeben wird. Von den Elementen sind neben den 267 stabilen Nukliden ca. 1600 instabile Nuklide bekannt, einige Elemente wie Fluor, Natrium, Phosphor oder Iod werden *Reinelemente* oder *anisotop* bezeichnet, da von ihnen jeweils nur ein stabiles Isotop existiert (Lieser, 1991). In der vorliegenden Arbeit wird themenbezogen lediglich auf einige der aus lebensmittelanalytischer Sicht interessanten Isotope, d. h. der sog. „Bioelemente“ (C, H, O, N, S) eingegangen, insbesondere auf die stabilen Isotope von Wasserstoff und Kohlenstoff. Tabelle 1 gibt diesbezüglich einen kleinen Überblick.

Gängigstes Verfahren zur analytischen Bestimmung von Isotopenzusammensetzungen stellt die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) dar, bei der das zu bestimmende Material bzw. einzelne Moleküle in einfache Messgase überführt und die relative Abweichung des Isotopenverhältnisses gegenüber einem geeigneten Standard angegeben wird. Hierzu gibt Tabelle 2 einen Einblick. Diese Standardisierung ist zwingend erforderlich, da sich die analytisch bestimmten und unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen lediglich im Bereich von wenigen Atom-% bewegen. International gültige Einheit für die Isotopenverhältnis-Messung ist der in [‰] angegebene δ -Wert (Gleichung 1) (McKinney et al., 1950).

Dieser ist definiert als

$$(1) \quad \delta [\text{‰}] = \frac{R_{(\text{Probe})} - R_{(\text{Standard})}}{R_{(\text{Standard})}} \times 1000$$

wobei

$$R = \text{Isotopenverhältnis} \frac{c_{\text{schweresIsotop}}}{c_{\text{leichtesIsotop}}}$$

Der δ -Wert ist demnach um so niedriger, je stärker die zu analysierende Probe an schwerem Isotop abgereichert ist. In Kapitel 2.4.1 wird die Thematik der Standardisierung sowie der zugrundeliegenden instrumentell-analytischen Technik genauer betrachtet.

Tab. 1: Überblick über das Vorkommen stabiler Isotope einiger Bioelemente sowie deren Eigenschaften (nach Schmidt et al., 2007)

Element	Isotop	Relative Häufigkeit [Atom-%]	Kernmasse [Dalton]	Isotopenverhältnis R ^{a)}
Wasserstoff	¹ H	99,9855	1,00782522	
	² H	0,0145	2,01410220	0,000145
Kohlenstoff	¹² C	98,8920	12,00000000	
	¹³ C	1,1080	13,00335430	0,0112041
Sauerstoff	¹⁶ O	99,7587	15,99491490	
	¹⁷ O	0,0374	16,99913340	0,0003749
	¹⁸ O	0,2039	17,99915980	0,0020439

^a siehe Gleichung (1)

Zwar verfügen Isotope bei gleicher Protonenzahl im Kern auch über eine identische Elektronenzahl in der Hülle, jedoch verhalten sie sich chemisch nicht absolut gleich, sondern lediglich gleichartig. Die unterschiedliche Neutronenzahl bedingt je nach Element eine mehr oder weniger stark abweichende Masse, was letztlich zu den charakteristischen *Isotopie-Effekten* führt. Diese manifestieren sich aufgrund unterschiedlicher Nullpunktenergien von chemischen Bindungen, sofern an diesen unterschiedliche Isotope beteiligt sind (Willi, 1983). So verlaufen chemische Reaktionen an diesen Bindungen in der Regel schneller bei den leichteren Isotopen. Dies kann besonders gut bei markierten Verbindungen beobachtet werden. Diese *kinetischen Isotopeneffekte* sind umso stärker, je größer die

relativen Massendifferenzen der Isotope sind. Besonders deutlich in Erscheinung treten diese daher bei den Wasserstoffisotopen Protium (^1H), Deuterium (^2H) und Tritium (^3H), da hier die Relativen Massenverhältnisse mit 1, 2 und 3 am größten sind. Auch treten solche kinetische Isotopeneffekte bei enzymkatalysierten Reaktionen in Erscheinung, einige davon werden in den Kapiteln 2.2.2 und 2.3.2 näher betrachtet. Doch nicht allein in Bindungsenergien äußern sich diese Isotopeneffekte, sondern auch in den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Verbindungen, in denen unterschiedliche Isotope vorhanden sind. So beeinflussen diese Effekte u. a. auch Molvolumen, Dichte, Schmelz- und Siedepunkte, Dampfdrücke, chromatographisches Verhalten sowie die spinabhängigen Spektroskopieverfahren. Man spricht in diesem Fall von den sog. *thermodynamischen Isotopeneffekten*, diese dienen auch zur Etablierung von Verfahren zur Isotopentrennung. Des weiteren können Isotopenzusammensetzungen durch sog. *Austauschreaktionen* verändert werden, d.h. Reaktionen, bei denen innerhalb eines Moleküls einzelne Atome oder ganze funktionelle Gruppen ersetzt werden. Als Beispiel sei hier auf die Protonentransfers bei enolisierenden Verbindungen hingewiesen. Speziell im analytischen Bereich müssen thermodynamische Isotopeneffekte sowie Austauschreaktionen im Rahmen der Probenvorbereitung erfasst und berücksichtigt werden, um gegebenenfalls dadurch bedingte Isotopenfraktionierungen auszuschließen.

Tab. 2: Einige international gebräuchliche Isotopenstandards, deren Isotopenverhältnis R^a) sowie Messgase für die Stabilisotopenanalytik (nach Schmidt et al., 2007)

Isotopenverhältnis	Internationaler Standard ^{b)}	R-Wert des Standards	Gas für IRMS-Analyse
$^2\text{H}/^1\text{H}$	(V-)SMOW	0,00015576	H_2
	SLAP	0,00008902	
	GISP	0,00012618	
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	(V-)PDB	0,0112372	CO_2
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	(V-)SMOW	0,0020052	CO, CO_2
	SLAP	0,00189391	
	GISP	0,00195563	

^a siehe Gleichung (1)

^b Abkürzungen der gelisteten Standards: V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water), SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation), GISP (Greenland Ice Sheet Precipitation), V-PDB (Vienna PeeDee Belemnite Carbonat)

Die aufgezeigten Isotopeneffekte führen nun auch in der Biosphäre zu schwachen, aber signifikanten Abweichungen von den relativen Häufigkeiten einzelner Isotope (*Isotopenfraktionierung*). Dies kön-

nen z.B. klimatische Faktoren wie Wettergeschehen oder geographische Lage sein, weitere thermodynamische Effekte im Rahmen der Stoffassimilation und -transpiration bei Pflanzen, metabolischen Produktflüssen sowie nicht zuletzt kinetischen Isotopeneffekten bei (bio-) chemischen Stoffwechselprozessen. In den folgenden Kapiteln werden einige und für die vorliegende Arbeit relevante thermodynamische und kinetische Isotopeneffekte näher behandelt.

2.2 Isotopenfraktionierungen von Wasserstoff

2.2.1 Thermodynamische Isotopenfraktionierungen

Mit seinem Vorkommen von geschätzten 0,74 Gew.-% in der Summe von Lithosphäre, Hydrosphäre und Atmosphäre ist Wasserstoff das 9. häufigste Element auf Erden. Dabei tritt es überwiegend gebunden auf, in freier Form findet sich elementarer Wasserstoff lediglich in einigen vulkanischen Gasen sowie gelegentlich in Spuren eingeschlossen in Mineralien und Gesteinen (Römpp, 2006). Mengemäßig am häufigsten liegt Wasserstoff gebunden an Sauerstoff in Form von Wasser vor, sowie gebunden an Kohlenstoff in fast allen organischen Verbindungen.

Während das Wasser der Ozeane über eine recht konstante Isotopenzusammensetzung hinsichtlich ^2H und ^{18}O verfügt, unterliegt das daraus resultierende und dem Wasserkreislauf beitretende meteorologische Wasser signifikanten Isotopenfraktionierungen, welche überwiegend durch die thermodynamischen Isotopeneffekte bei Verdunstung, Kondensation und Niederschlag bedingt sind. Somit ist der Kreislauf des Wassers auf der Erde maßgebend verantwortlich für die globalen thermodynamischen Isotopenfraktionierungen von Wasserstoff, wobei die Fraktionierung der Wasserstoffisotope stets mit denen des Sauerstoffs korreliert (Friedmann, 1953) und sich dieser lineare Zusammenhang der *meteorologischen Wasserlinie* in der Gleichung $\delta^2\text{H} = 8 * \delta^{18}\text{O} + 10$ widerspiegelt (Craig, 1961). Die auftretenden Isotopensignaturen des meteorologischen Wassers sind abhängig von den gegebenen geographischen und klimatischen Faktoren an dem jeweiligen Ort und reflektieren das Produkt aus der geographischen Lage (geographische Länge und Breite, Höhe über dem Meeresspiegel), der Temperatur, Niederschlagsmenge als auch der Luftfeuchtigkeit (Epstein und Mayeda, 1953; Martin und Martin, 2003).

So erfolgt bei der Wolkenbildung über den Ozeanen vorzugsweise eine Verdunstung der leichteren und somit an ^2H und ^{18}O abgereicherten isotopomeren Wassermoleküle, da diese den höheren Dampfdruck aufweisen und durch die Sonneneinstrahlung leichter in die Gasphase übergehen (Hoefs, 1973). Der Großteil der Wolkenbildung erfolgt dabei in den äquatorialen Gegenden des Globus, durch die stetige Erdrotation findet eine weitere Isotopenfraktionierung statt und führt mit zunehmender geographischer Breite zu deuteriumärmeren Niederschlägen. Während der Wolkenpassage über die Konti-

nente werden in Küstennähe ebenfalls zunächst die darin enthaltenen schweren isotopomeren Wassermoleküle abgerechnet, bis schließlich in den höher gelegenen Gebieten das an ^2H und ^{18}O abgereicherte Wasser kondensiert. Einen weiteren Einfluss auf die Isotopenfraktionierung von Wasserstoff übt die im Landesinneren vorliegende Luftfeuchtigkeit aus; dies führt zu abgereicherten Niederschlägen in regenreichen Monaten bzw. zu angereicherten in niederschlagsarmen Jahreszeiten (Dansgaard, 1964). Die geographischen und klimatischen Gegebenheiten an den jeweiligen Standorten üben somit definierte Einflüsse auf die Isotopenzusammensetzung des meteorologischen Wassers aus. In der Summe der genannten Faktoren entsteht so eine Isotopensignatur, die für den jeweiligen Standort charakteristisch sein kann. Untersuchungen von Kluge et al. (1995) an madagassischen Orchideen und Sukkulenten unterschiedlicher Habitate (Wald- und Wüstengebiete) deuten jedoch darauf hin, dass für die globalen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte pflanzlicher Biomasse die Deuteriumkonzentration des meteorologischen Wassers weniger entscheidend ist als „andere Faktoren“.

Im pflanzlichen Xylem angekommen, wird das von den Wurzeln aufgenommene meteorologische Wasser zu den Blättern transportiert, wo durch Transpirationsprozesse weitere Isotopenfraktionierungen auftreten. So ist das Blattwasser von Pflanzen deutlich gegenüber dem aufgenommenen Wasser an den schweren Isotopen ^2H und ^{18}O angereichert (Bricout, 1978), was ebenfalls den unterschiedlichen Dampfdrücken isotopomerer Wassermoleküle zuzuschreiben ist. Die durchschnittliche Anreicherung von ^2H im Blattwasser beträgt $\sim +30\%$ gegenüber dem meteorologischen Wasser (Schmidt et al., 2003a). Fruchtwasser ist ebenfalls, wenn auch nicht ganz so stark wie das Blattwasser, angereichert (Lesaint et al., 1974). Weitere bedeutende Fraktionierungen finden in Pflanzen durch metabolische und kinetische Prozesse während biochemischer Stoffwechselforgänge statt. Abb. 1 (Kap. 2.2.2) gibt eine Zusammenfassung von $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werten der in der Natur üblicherweise zu erwartenden natürlichen Schwankungsbreiten von anorganischen und organischen Wasserstoffverbindungen.

2.2.2 Isotopenfraktionierungen in Pflanzen

Für Pflanzen stellt das am Standort zur Verfügung stehende Wasser die einzige und primäre Wasserstoffquelle dar. Der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert des Wassers im Boden ist zunächst abhängig von dem des Niederschlagswassers (Gat, 1971), welches - wie bereits erwähnt - durch geographische und klimatische Faktoren determiniert wird (siehe Kapitel 2.2.1). Nach dessen Transport in die photosynthetisch aktiven Blätter erfolgt dort durch den Gasaustausch an den Stomata eine deutliche Anreicherung der schwereren isotopomeren Wassermoleküle (Bricout, 1978). Obwohl diese Anreicherung unabhängig vom Photosynthesetyp der Pflanze ist (Flanagan et al., 1991), zeigen CAM-Pflanzen in der freien Natur üblicherweise höhere Deuterium-Anreicherungen als C_3 - und C_4 -Pflanzen. Da CAM-Pflanzen nur unter Wasserstress Deuterium anreichern, ist diese Tatsache nicht allein den unterschiedlichen Transpirationsmustern der Pflanzen zuzuschreiben (CAM-Pflanzen transpirieren nur Nachts), sondern

auch den höheren Deuterium-Gehalten des Grundwassers an den üblicherweise trockenen Standorten der CAM-Pflanzen (Ziegler et al., 1976; Sternberg et al. 1986).

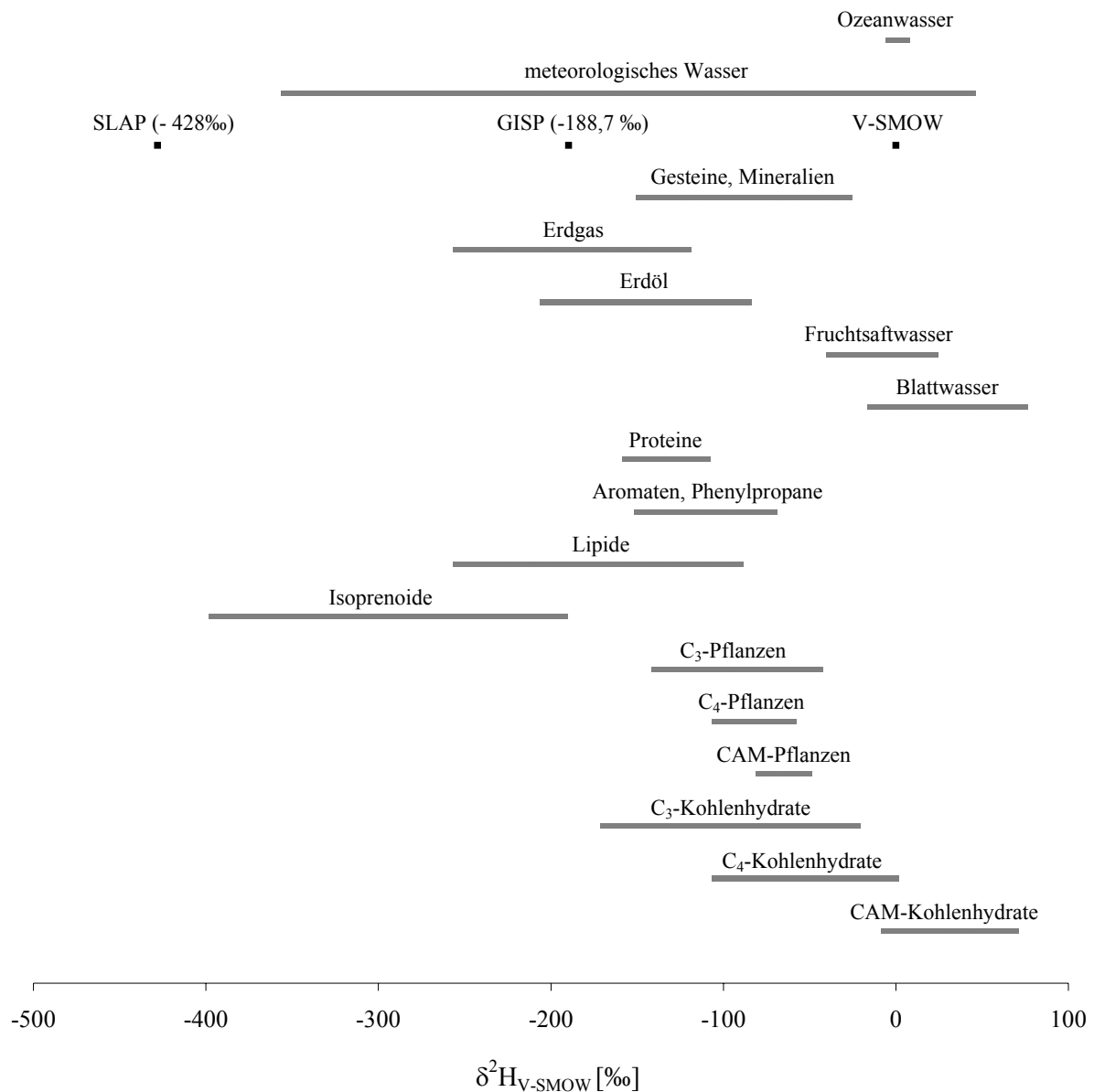


Abb. 1: Übersicht über die üblicherweise zu erwartenden natürlichen Schwankungsbreiten von $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten einiger anorganischer und organischer Verbindungen (Winkler, 1984; Schmidt et al., 2007; Schmidt et al., 2003a; Naraoka et al., 2001; Sternberg et al., 1984a).

Im Rahmen der Photosynthese werden anschließend die Wasserstoffatome des Wassers photochemisch in NAD(P)H überführt, was nun über die reduktive Biosynthese deren Einbau in organisches Material ermöglicht. Für dieses primäre Reduktionsäquivalent konnte bisher lediglich durch das von Cyanobakterien produzierte Wasserstoffgas eine Deuteriumanreicherung von $\sim -600\text{‰}$ gegenüber dem Wasser bestimmt werden (Luo et al., 1991). Weitere Untersuchungen an photosynthetisch produzierter

Zellulose, welche eine Deuteriumabreicherung von -171‰ gegenüber Wasser aufwies und je nach Wachstumsbedingung der Pflanze 40-100% der im Primärassimilat fixierten Wasserstoffatome mit Wasser austauschten, legen die Vermutung nahe, dass auch bei Pflanzen das primäre Reduktionsäquivalent aus der Photosynthese stark abgereichert sein muss (Yakir und DeNiro, 1990; Hayes, 2001). Im Verlauf der anabolen und katabolen Stoffwechselprozesse kommt es dann durch den Isotopenaustausch mit Wasser zu einer Anreicherung in den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten. Für organisches C_3 -Pflanzenmaterial lässt sich anhand der beobachteten Durchschnittswerte ein Schema erstellen, in welcher Reihenfolge die Abreicherung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte gegenüber dem Blattwasser (hier 0‰) stärker in Erscheinung tritt (Schmidt et al., 2003a):

Blattwasser (0‰) > Aminosäuren und organische Säuren (-50‰) > Phenylpropanoide (-90‰) > Kohlenhydrate (-110‰) > homogenisiertes Pflanzenmaterial (-120‰) > Proteine (-130‰) > Kohlenwasserstoffe (-140‰) > Lipide (-180‰) > Sterine (-250‰) > Phytol, Sesquiterpene (-330‰)

Nach dem Model von Schmidt et al. (2003b) spiegeln die beobachteten Werte die Entfernung im Stoffwechsel des jeweiligen sekundären Pflanzeninhaltsstoffes zu dem Primärassimilat der Photosynthese sowie den damit verbundenen Deuteriumabreicherungen aufgrund der zur Verfügung stehenden Reduktionsäquivalente, metabolischer Produktflüsse und nicht zuletzt den kinetischen Isotopeneffekten der beteiligten Enzyme. Letztgenannte treten dabei jedoch nur in Erscheinung, wenn es im Rahmen eines biochemischen Stoffumsatzes zu einer Abzweigung im Produktfluss kommt. Ein ähnliches Model ermöglicht auch die Erklärung der beobachteten Unterschiede in den Deuteriumgehalten von C_3 - und C_4 -Pflanzen (Fogel und Cifuentes, 1993): Bei C_4 -Pflanzen finden sich in den Blättern zwei verschiedene Typen photosynthetisch aktiver Zellen, die um die Blattleitbündel geschichtet sind. Das in den Mesophyllzellen primär als Oxalacetat fixierte CO_2 wird zusammen mit NADPH-Reduktionsäquivalenten in die Kranzzellen transportiert, wo CO_2 wieder freigesetzt und über den Calvin-Cyclus assimiliert wird. Folglich ist der bei C_4 -Pflanzen in den Kranzzellen zur Verfügung stehende Pool an Reduktionsäquivalenten ein anderer als in C_3 -Pflanzen. Diese verhältnismäßig höhere Deuteriumkonzentration gegenüber C_3 -Pflanzen scheint also allgemein mit der unterschiedlichen und effektiveren CO_2 -Fixierung in Verbindung zu stehen (Smith und Ziegler, 1990).

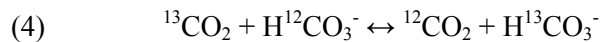
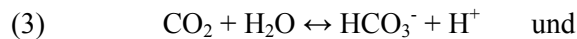
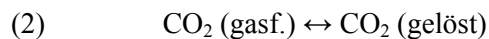
Über eine bemerkenswerte Besonderheit bei CAM-Pflanzen in Form des ungewöhnlich stark angereicherten Deuteriums in Cellulosenitrat berichteten erstmals Sternberg und DeNiro (1983). Im folgenden konnte gezeigt werden, dass diese Anreicherung unabhängig gegenüber den $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnissen in Lipiden (Sternberg et al., 1984a) sowie den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnissen in Cellulose stattfindet (Sternberg et al., 1984b), weshalb die Autoren eine transpirationsbedingte Ursache ablehnten und die unterschiedliche biochemische Kompartimentierung sowie eine Anreicherung während der Gluconeogenese bzw. des Kohlenhydratmetabolismus im Cytoplasma als Ursache postulierten (Sternberg et al., 1984a). Dieses Model erhärteten Luo und Sternberg (1991), indem sie die Unterschiede in den Deuteriumgehalten von Stärke- und Cellulosenitrat in C_3 - und CAM-Pflanzen analysierten. Dabei stellten sie fest, dass Cellulose unabhängig vom Photosynthesetyp grundsätzlich gegenüber der Stärke in Deuterium angereichert ist. Je niedriger dabei der Deuteriumgehalt der Stärke, desto größer waren die Un-

terschiede gegenüber Cellulose, wobei CAM-Pflanzen die höchsten Deuteriumgehalte in der Stärke aufwiesen.

2.3 Isotopenfraktionierungen von Kohlenstoff

2.3.1 Thermodynamische Isotopenfraktionierungen

Für biologisches Material stellen das atmosphärische CO_2 sowie das hydrosphärische HCO_3^- die primären Kohlenstoffquellen dar. Gasförmiges CO_2 weist mit einem globalen Durchschnittswert von $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = \sim -7$ bis -10% aufgrund von Äquilierungsprozessen ein recht homogenes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnis auf (Hoefs, 1973), kann jedoch durch den Grad der lokal vorliegenden natürlichen (Freyer, H. D., 1979; Martin, B. und Sutherland, E. K., 1990) und anthropogenen (Keeling et al., 1979; Penuelas, J. und Azcon-Bieto, J., 1992) Emissionen nachhaltig beeinflusst werden. Im Wasser gelöstes HCO_3^- weist einen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert von $\sim \pm 0\%$ auf, der beobachtete Unterschied kann durch die Isotopenfraktionierung während der Gleichgewichtsreaktionen



erklärt werden (Deuser und Degens, 1967; Mook et al., 1974; Marlier und O'Leary 1984), was zu einer ^{13}C -Anreicherung ($\sim +8\%$) auf der Seite des Hydrogencarbonats während des globalen atmosphärischen Gasaustausch mit der Hydrosphäre führt. Landpflanzen, welche atmosphärisches CO_2 assimilieren, sind demnach prinzipiell gegenüber aquatischen Pflanzen und Organismen in ^{13}C angereichert (Schmidt et al., 2007). Des weiteren üben Faktoren wie Lichteinstrahlung (Ehleringer et al., 1986; Evans et al., 1986), Transpirationsrate (Farquhar et al., 1982) und Salzgehalt (Downton et al., 1985) einen mitunter großen Einfluss auf die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Pflanzenmaterial aus. Abb. 2 (Kap. 2.3.2) gibt eine Zusammenfassung von $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten der in der Natur üblicherweise zu erwartenden natürlichen Schwankungsbreiten von anorganischen und organischen Kohlenstoffverbindungen.

2.3.2 Isotopenfraktionierungen in Pflanzen

Im Gegensatz zur Isotopenfraktionierung von Wasserstoff in Pflanzen ist diejenige von Kohlenstoff mittlerweile weitaus besser verstanden. Abhängig vom Photosynthesetyp ergeben sich gleich zu Beginn, der Assimilation von atmosphärischem CO_2 in Form von niedermolekularen Verbindungen, signifikante Voraussetzungen für die weitere Genese von unterschiedlichen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnissen sowohl von pflanzlicher Biomasse, als auch deren individueller Substanzgruppen.

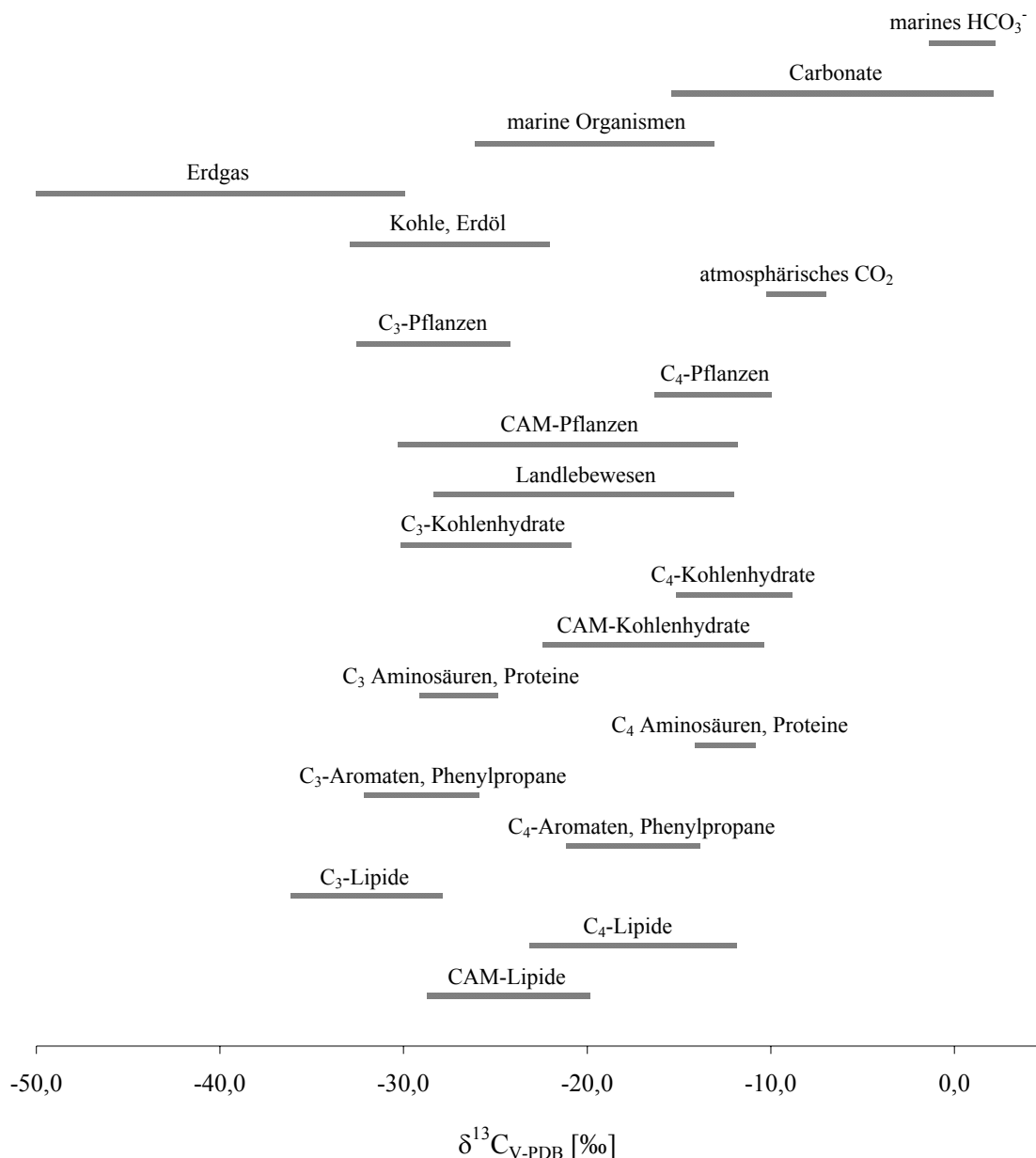


Abb. 2: Übersicht über die üblicherweise zu erwartenden natürlichen Schwankungsbreiten von $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten einiger anorganischer und organischer Verbindungen (Winkler, 1984; Hoefs, 1973; Schmidt et al., 2007; Naraoka et al., 2001; Sternberg et al., 1984a-c).

Bei C_3 -Pflanzen erfolgt der Einbau von CO_2 über den Calvin-Zyklus im Stroma der Chloroplasten. Dabei wird das atmosphärische CO_2 durch das Enzym Ribulosebisphosphat-Carboxylase mit D-Ribulose-1,5-bisphosphat verknüpft, und es werden zwei Moleküle der C_3 -Verbindung 3-Phospho-D-glycerat als erstes greifbares Photosyntheseprodukt gebildet. Diese enzymatische Reaktion der CO_2 -Fixierung ist mit einem großen kinetischen Isotopeneffekt behaftet (Park und Epstein, 1960; Christeller et al., 1976), der dazu führt, dass bevorzugt das leichtere $^{12}CO_2$ umgesetzt wird. Die exakte Größe der dadurch bedingten Abreicherung gegenüber CO_2 kann nur mit Vorsicht angegeben werden, da die experimentell ermittelten Werte in der Literatur je nach Herkunft des Enzyms und Aufbau des Experiments sehr stark schwanken (O'Leary, 1981; Winkler et al., 1982). Die *in vitro* ermittelten Isotopenfraktionierungen erscheinen gegenüber den *in vivo* sichtbaren Effekten jedoch generell viel größer (O'Leary, 1981; Ivlev, 2001). Die von Schmidt et al. (1978) ermittelten Werte von $\sim -18\%$ für die Enzyme aus Spinat und Mais stellen eine Art Minimum dar, allerdings wurden auch bereits Abreicherungen von bis zu -30% und mehr gemessen (Estep et al., 1978). O'Leary (1981) gibt daher als Durchschnitt für die ^{13}C -Abreicherung einen Wert von $\delta^{13}C_{V-PDB} = \sim -30 \pm 10\%$ an, welcher sich bis in die jüngste Zeit ($\sim -29\%$, Hobbie und Werner, 2004) gehalten hat.

In C_4 -Pflanzen wird CO_2 über den sogenannten Hatch-Slack-Zyklus in organisches Material integriert. Dabei wird zunächst das in den Mesophyllzellen aufgenommene CO_2 gelöst und in HCO_3^- überführt, welches das Substrat für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase darstellt (Cooper et al., 1971). Diese bildet aus HCO_3^- und Phosphoenolpyruvat die C_4 -Verbindung Oxalacetat, welche u. a. zu Malat umgesetzt und anschließend in die Kranzzellen zur darauffolgenden CO_2 -Fixierung transportiert wird. Diese erfolgt wie auch bei den C_3 -Pflanzen über den Calvin-Zyklus, nachdem das in Form der C_4 -Verbindung vorfixierte und interzellulär transportierte CO_2 wieder freigesetzt und mittels Ribulosebisphosphat-Carboxylase umgesetzt wird. Im Unterschied zu den C_3 -Pflanzen entstammt das CO_2 bei den C_4 -Pflanzen jedoch einem primär an ^{13}C angereicherten Substratpool, und zwar in Form des HCO_3^- , welches gemäß Gleichung (2) und (3) (siehe Kap. 2.3.1) gegenüber dem leichteren Isotop diskriminiert. Die bei C_4 -Biomasse beobachtbaren $\delta^{13}C_{V-PDB}$ -Werte (Whelan et al., 1970) von ~ -10 bis -16% werden des weiteren dadurch bedingt, dass bei der Vorfixierung die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase mit einer kinetisch bedingten Abreicherung von -2 bis $-2,5\%$ nur schwach gegenüber $^{13}CO_2$ diskriminiert (Whelan et al., 1973; Reibach und Benedict, 1977; Schmidt et al., 1978), und praktisch das gesamte transportierte CO_2 in den Kranzzellen umgesetzt wird. Die Unterschiede in den $\delta^{13}C_{V-PDB}$ -Werten von C_3 - und C_4 -Pflanzen spiegeln somit auch die Effektivität der CO_2 -Assimilation (O'Leary, 1981).

Beim Photosyntheseweg der CAM-Pflanzen (Crassulacean Acid Metabolism) findet ebenfalls eine Vorfixierung des CO_2 in Form von C_4 -Körpern statt, im Unterschied zu den C_4 -Pflanzen ist dieser aber nicht räumlich, sondern zeitlich von der CO_2 -Assimilation im Calvin-Zyklus getrennt. CAM-Pflanzen zeigen einen diurnalen Säurerhythmus, gekennzeichnet durch eine im Tag-Nacht-Wechsel auftretende Änderung des pH-Wertes des Zellsaftes. Die CO_2 -Aufnahme erfolgt nachts, wobei das CO_2 zunächst durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase in Form von Malat (C_4 -Stoffwechselweg) vorfixiert und

in der Zellvakuole gespeichert wird. Tagsüber werden bei geschlossenen Spaltöffnungen die akkumulierten Säuren u.a. zu den Chloroplasten transportiert und enzymatisch decarboxyliert. Somit wird das CO₂ über die Ribulosebiphosphat-Carboxylase in den Calvin-Zyklus eingebracht. Diese Anpassung, vor allem an trockene Standorte, ermöglicht es den CAM-Pflanzen, tagsüber bei geschlossenen Stomata Photosynthese zu betreiben sowie nachts unter geringen Wasserverlusten CO₂ aufzunehmen (Sayed, 2001). Da viele CAM-Pflanzen allerdings nicht strikt CAM-Photosynthese betreiben, sondern auch tagsüber CO₂ aufnehmen und dieses direkt über Ribulosebiphosphat-Carboxylase (C₃-Stoffwechselweg) in den Calvin-Zyklus einbringen, ergeben sich für die beobachtbaren $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von CAM-Biomasse üblicherweise Werte zwischen denen von C₃- und C₄-Pflanzen, je nach Ausmaß der Nacht- bzw. Tagfixierung (Ziegler et al., 1976; Ziegler, 1996; Winter und Holtum, 2002).

Der Photosynthesetyp stellt somit die zugrundeliegende Basis für die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte pflanzlicher Biomasse dar, für die weitere Genese unterschiedlicher ¹³C/¹²C-Verhältnisse individueller Substanzklassen konnten ferner eine Reihe von Enzymen verantwortlich gemacht werden (Hobbie und Werner, 2004). Die bekannteste und am besten untersuchte Isotopenfraktionierung im biochemischen Sekundärstoffwechsel stellt sicherlich die Pyruvat-Dehydrogenase-katalysierte Decarboxylierung von Pyruvat unter Bildung von Acetyl-CoA dar (DeNiro und Epstein, 1977), welche zu einer ¹³C-Abreicherung von $\sim -7 \pm 3\%$ in Lipiden gegenüber den primär gebildeten Kohlenhydraten (Naraoka und Chikaraishi, 2001) bzw. zu einer Abreicherung von 2,4-9,9‰ gegenüber pflanzlicher Blattbiomasse (Chikaraishi et al., 2004) führt. Lipide von C₃-Pflanzen zeigen dabei in der Regel geringere Abreicherungen gegenüber den Kohlenhydraten (4-6‰) als die Lipide von C₄-Pflanzen (8-10‰), allerdings wird dies auch im Zusammenhang mit etwaigen unterschiedlichen Lipidkonzentrationen diskutiert (Collister et al., 1994; Naraoka und Chikaraishi, 2001; Conte et al., 2003). Des Weiteren sorgt diese enzymatische Isotopenfraktionierung für eine ¹³C-Abreicherung an der Carbonylfunktion des Acetyl-CoA, und damit verbunden zur ¹³C-Abreicherung von Fettsäuren und Isoprenoiden (DeNiro und Epstein, 1977; Melzer und Schmidt, 1987). Einen vergleichbaren Effekt verursacht die Pyruvat-Decarboxylase, die für die ¹³C-Abreicherung in der Carbonylfunktion von Acetaldehyd verantwortlich ist (Alvarez et al., 1991; Sun et al., 1995). Sowohl im Rahmen der Glykolyse als auch der Gluconeogenese sorgt die Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase für eine ¹³C-Anreicherung an der Position C-3 und C-4 von Kohlenhydraten, wobei dieser Effekt abhängig von der Orientierung dieser Gleichgewichtsreaktion ist (Gleixner und Schmidt, 1997).

2.4 Methoden und Anwendungen der Stabilisotopenanalytik in der Lebensmittelchemie

2.4.1 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS)

Massenspektrometrische Methoden zur Analyse natürlicher Isotopenhäufigkeiten haben mit Abstand die weiteste Verbreitung erlangt, da hier die verwendeten Instrumente grundsätzlich ein variables Aufgabengebiet abdecken können. Die zu analysierenden Proben müssen dafür zunächst mit elementaranalytischen Aufschlussverfahren in geeignete Meßgase überführt werden, wobei diese Umsetzung quantitativ und ohne Isotopenfraktionierungen zu erfolgen hat. Nach Ionisation werden die isotopomeren Gasmoleküle im Magnetfeld eines Sektorfeld-Massenspektrometers entsprechend ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses getrennt und an unterschiedlichen Faraday-Kollektoren detektiert, der Vergleich mit zertifizierten internationalen Standards ermöglicht die Bestimmung der jeweiligen Isotopenverhältnisse (Schmidt et al., 2007).

War es bis vor wenigen Jahren lediglich möglich, mit großen Substanzmengen über Elementaranalysatoren Pyrolyse (EA-P-IRMS) und Verbrennung (*Combustion*) (EA-C-IRMS) zu betreiben, sowie über die Kopplung mit Gaschromatographen mittels spezieller Interfaces auch $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse mit Verbrennungstechniken zu bestimmen, stehen seit wenigen Jahren kommerzielle Pyrolysesysteme zur Verfügung, die auch die gaschromatographische Analyse von $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ - und $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenverhältnissen ermöglichen. Im Bereich der Aromastoffanalytik von Einzelsubstanzen stellt vor allem die gaschromatographische Bestimmung von $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, bei sorgfältiger Beachtung des dynamischen Linearitätsbereichs aber auch diejenige von $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenverhältnissen, mittlerweile ein etabliertes Verfahren dar (Schmidt et al., 2007; Richling et al., 2007). Auch in der amtlichen Lebensmittelüberwachung wird in den letzten Jahren immer häufiger von dieser Technik Gebrauch gemacht. Die gaschromatographische Analyse von $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotopenverhältnissen wird durch die damit verbundene empirische Pyrolysetechnik zu CO zwar nach wie vor erschwert, stellt aber ohne Zweifel eine hilfreiche Methode dar, um in Zweifelsfällen gesicherte Aussagen über die Authentizität eines Aromastoffs zu gewährleisten (Schmidt et al., 2005a; Richling et al., 2007). Der Aufbau eines IRMS-Systems zur Isotopenverhältnismessung von Aromastoffen ist im folgenden anhand des in unserem Arbeitskreis verwendeten Systems dargestellt (Abbildung 3).

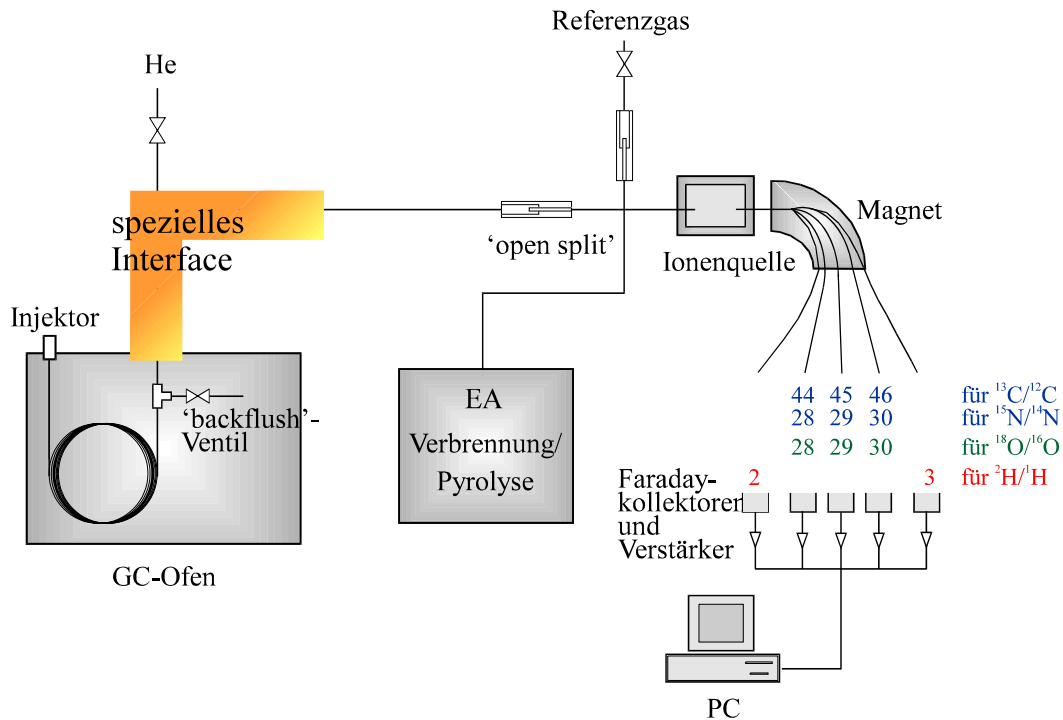


Abb. 3: Schematische Darstellung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten EA/HRGC-IRMS-Systems. Der Aufbau besteht aus einem Sektorfeld-Massenspektrometer, je einem Elementaranalysator für Verbrennung und Pyrolyse sowie einem Gaschromatographen mit den entsprechenden Interfaces für Verbrennung und Pyrolyse (siehe Kap. 2.4.1.2). Für nähere Erläuterungen zum System siehe Kap. 2.4.1-2.4.1.2.2.

2.4.1.1 Elementaranalyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-IRMS)

Bei der Verwendung von Elementaranalysatoren zur Isotopenverhältnisbestimmung ist zu beachten, dass hier nur Reinsubstanzen im Milligramm-Bereich analysiert werden können. Der Vorteil ist ein schneller Probendurchsatz sowie das Vorhandensein internationaler *Primär-* und *Sekundärstandards*, die von der IAEA in Wien herausgegeben und für die Analyse benötigt werden. Möchte man Isotopenverhältnismessung von authentischen Aromastoffen z. B. aus Frucht- oder Pflanzenextrakten durchführen, eignet sich diese Methode aufgrund der vorliegenden Substanzgemische und deutlich geringeren Konzentrationen an Analyten nicht. Lediglich aufwendig isolierte oder über den Handel bezogene Reinsubstanzen können analysiert werden. Da jedoch für die gaschromatographische Analyse von Einzelsubstanzen trotz zahlreicher Forschungsarbeiten noch keine internationalen Standards verfügbar sind (Serra et al., 2007), benötigt man Elementaranalysatoren, um im Labor eigene *Tertiärstandards* (*Working Standards*) zu kalibrieren. Diese Standards stellen üblicherweise die zu analysierende Substanz in Reinform dar, welche zunächst mittels EA-P/C-IRMS anhand der verfü-

baren IAEA-Standards vermessen werden. Anschließend erfolgt die Analyse des „Working Standards“ mittels GC-P/C-IRMS, und nur wenn die ermittelten δ -Werte über Elementaranalysator und Gaschromatograph vernachlässigbare Schwankungen ergeben, kann die Isotopenverhältnismessung von Analyten in Aromaextrakten anhand des so validierten Standards erfolgen (Ruff, 2001; Hör, 2001).

Bei der im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Elementaranalysatoren handelt es sich um zwei Geräte, jeweils für Pyrolyse- und Verbrennungs-Technik, die parallel zum Gaschromatographen über ein Nadelventil an das Isotopenmassenspektrometer gekoppelt sind. Während der EA-Messungen wird die parallel gekoppelte Seite des Gaschromatographen durch einen „open split“ sowie einen Helium-„Backflush“ abgekoppelt, um eine Messwertverfälschung durch mögliches Untergrundrauschen zu unterdrücken.

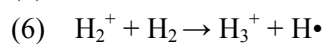
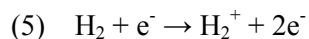
2.4.1.1.1 Elementaranalyse-Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-C-IRMS)

Die elementaranalytische Isotopenverhältnismessung von Kohlenstoff erfolgt in einem auf 1000°C erhitzten Quarzrohr, das mit Wolframoxid, Quarzwolle und Kupfer bestückt ist. Ein Sauerstoffpuls von wenigen Sekunden Dauer wird zugeführt, je nach Menge der zu analysierenden Substanz, um zunächst einen Teil des Cu zu CuO zu oxidieren. Die Probenaufgabe erfolgt über einen Autosampler und Zinnkartuschen, in die einige wenige Milligramm der zu analysierenden Substanz abgefüllt werden. Unmittelbar nachdem die Probe dem Elementaranalysator zugeführt wird erfolgt die blitzartige und exotherme Verbrennung des Zinns zu Zinnoxid, was im Zusammenspiel mit den verwendeten Katalysatoren zu einer vollständigen Verbrennung des substanzgebundenen Kohlenstoffs zu $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ ($M_r = 44$ bzw. 45) führt. Ein konstanter Heliumstrom überführt die gebildeten Gase auf ein temperiertes Molekularsieb, parallel entstehendes Wasser wird bereits zuvor über geeignete Absorber (z.B. Magnesiumperchlorat) abgetrennt. Eventuell entstehende Stickoxide ($M_r(\text{N}_2\text{O}) = 44$) werden noch im Reaktor durch elementares Kupfer zu Stickstoff reduziert. Nach der Trennung der entstehenden Gase über das Molekularsieb erfolgt dessen Zuführung in das Isotopenverhältnis-Massenspektrometer. Parallel wird mit einem bekannten Isotopengehalt zertifiziertes und mit den IAEA-Standards (z. B. NBS 22, IAEA-CH-7) validiertes Referenz- CO_2 eingespeist, um anhand dessen die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte (siehe Kap. 2.1) der Analyten zu bestimmen (Ruff, 2001).

2.4.1.1.2 Elementaranalyse-Pyrolyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-P-IRMS)

Die elementaranalytische Isotopenverhältnismessung von Wasserstoff erfolgt in einem auf 1440°C erhitzten Glaskohlenstoffrohr, das mit Glaskohlenstoffsplittern, Nickelwolle und Nickelkohle bestückt ist. Die Probenaufgabe erfolgt über einen Autosampler und Silberkartuschen, in die einige wenige Milligramm der zu analysierenden Substanz abgefüllt werden. Die im Hochtemperaturofen entstehenden Pyrolyseprodukte $^2\text{H}_2/{}^3\text{H}_2$ und $^{28}\text{CO}/{}^{30}\text{CO}$ (für Sauerstoffmessung) werden im Heliumstrom zur Trocknung und Reinigung über Magnesiumperchlorat und Carbosorb (Absorptionsmittel für CO_2) geleitet und anschließend an einem temperierten Molekularsieb aufgetrennt. Analog zur $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Messung wird auch hier dem Massenspektrometer parallel zertifiziertes und mit den IAEA-Standards (z. B. V-SMOW, IAEA-CH-7) validiertes Referenz-Wasserstoffgas zugeführt, um anhand dessen die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte (siehe Kap. 2.1) der Analyten zu bestimmen.

Bei der Isotopenverhältnismessung von H_2 müssen einige zusätzliche Kriterien berücksichtigt werden, um die Genauigkeit der Messung zu gewährleisten. Zum einen muss nach Kalibration des Massenspektrometers, dem Beginn einer Meßreihe bzw. in Abhängigkeit von den Wassergehalten in der Ionenquelle des Massenspektrometers der sog. H_3 -Faktor bestimmt werden. Die Notwendigkeit für diesen Korrekturfaktor resultiert aus der Tatsache, dass bei Wasserstoffisotopen-Verhältnismessungen durch Ionen-Molekül-Reaktionen im Ionisierungsvolumen Linearitätsprobleme auftreten. So entsteht in der Ionenquelle des Massenspektrometers bei der (unvollständigen) Ionisierung des H_2 -Gases neben den gewünschten HH^+ - ($m/z = 2$) und HD^+ -Ionen ($m/z = 3$) nach Gleichung (5) und (6) die Elektronenmangelverbindung H_3^+ , welche ebenfalls auf den Kollektor der Masse 3 trifft und so einen erhöhten Deuteriumgehalt vortäuscht.



Die Bildungstendenz der H_3^+ -Ionen ist dabei von dem Partialdruck bzw. der Konzentration des Wasserstoffgases in der Ionenquelle abhängig. Während die Konzentration der zweiatomigen Ionen (H_2^+ , HD^+ , D_2^+) linear mit dem Partialdruck des Gases in der Ionenquelle zunimmt, steigt die Konzentration der dreiatomigen Ionen (H_3^+ , H_2D^+ , HD_2^+ , D_3^+) mit dem Quadrat dieses Druckes und somit dem Quadrat der Anzahl an H_2^+ -Ionen (Schmidt 1974, Habfast 1997). Die Korrektur erfolgt anhand des Verhältnisses der Ionenströme (i), die als Masse 2 und 3 bei unterschiedlichen Partialdrücken gemessen werden und durch Gleichung (7) ausgedrückt werden (Habfast 1997).

$$(7) \quad \frac{i(3)}{i(2)} = \frac{\text{HD}^+ + \text{H}_3^+}{\text{H}_2^+} = \frac{\text{HD}^+}{\text{H}_2^+} + \frac{k[\text{H}_2^+]^2}{\text{H}_2^+} \rightarrow \frac{\text{HD}^+}{\text{H}_2^+} = \frac{i(3)}{i(2)} - ki(2)$$

Der H_3 -Faktor (k) muss daher für jede Messung von Deuterium bekannt sein. Die Bestimmung erfolgt durch die Messung von D/H-Verhältnissen in H_2 -Gaspulsen unterschiedlicher Intensität (Hilkert et al., 1999), die Variation der in die Ionenquelle des Massenspektrometers eingespeisten Menge von Wasserstoffgas erfolgt dabei über die Regelung an einem entsprechendem Nadelventil.

Auf die Bedeutung des linearen Messbereichs bei der Bestimmung von D/H-Verhältnissen wird in Kapitel 2.4.1.2.2 näher eingegangen, da dies vor allem bei der gaschromatographischen Bestimmung von D/H-Verhältnissen unter Pyrolysebedingungen von Bedeutung ist.

2.4.1.2 Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-IRMS)

Für die HRGC-IRMS-Messungen verwendet man handelsübliche Gaschromatographen, die über geeignete Interface-Vorrichtungen für die Konvertierung der Analyten in die entsprechenden Messgase versehen sind. Proben von Aromaextrakten bzw. (verdünnten) Referenzsubstanzen werden grundsätzlich „splitless“ mittels Autosampler auf die Kapillarsäule übertragen, um die für die Isotopenverhältnis-Messungen benötigten Substanzmengen zu gewährleisten. Die verwendeten Kapillarsäulen haben in der Regel eine Länge von 60 m, um den im Anschluss der Pyrolyse bzw. Verbrennung am Interface folgenden Trennverlust während der Überführung der Messgase in das Massenspektrometer über unbelegte Transfer-Kapillarsäulen möglichst auszugleichen. Temperaturprogramme können den jeweiligen Trennproblemen unter Wahrung der üblichen qualitätssichernden Maßnahmen angepasst werden, vor allem ist jedoch die quantitative Integration von Peakflächen von Bedeutung, da es im Laufe der gaschromatographischen Trennung zu signifikanten Isotopendiskriminierungen kommen kann (Barrie et al., 1984; Shepard et al., 1976; Matthews und Hayes, 1978). Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau des im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrennungs- und Pyrolyse-Interfaces.

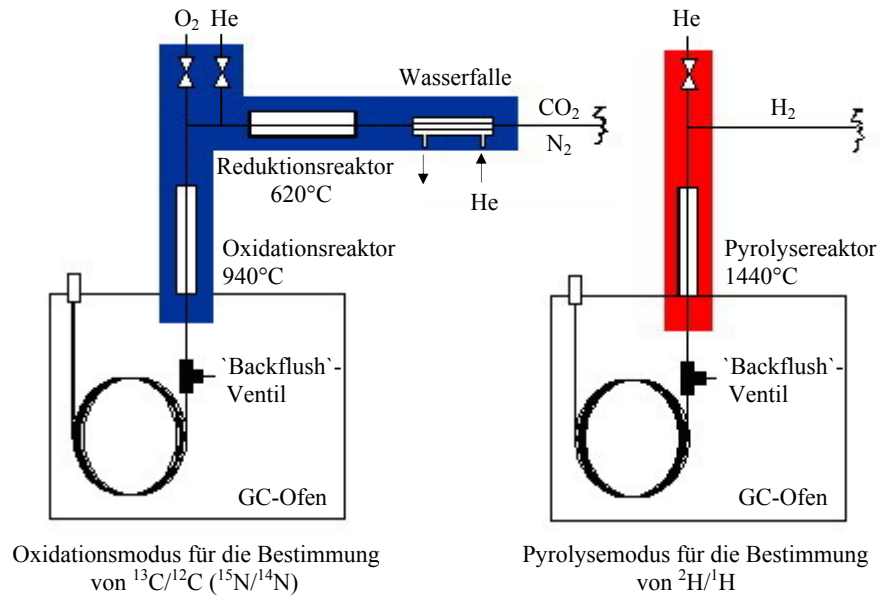


Abb. 4: Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Interface-Typen für die HRGC-P/C-IRMS Analytik. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

2.4.1.2.1 Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-C-IRMS)

Die gaschromatographische Isotopenverhältnismessung von Kohlenstoff erfolgt mit Hilfe eines Verbrennungs- (*Combustion*-) Interfaces, welches die von der Kapillarsäule eluierenden Moleküle oxidativ in CO_2 überführt. Der Transfer von der Kapillarsäule auf diesen Verbrennungsofen wird über ein T-Stück mit Strömungsteiler („Backflush“-Ventil) realisiert, bei dem das zeitlich gesteuerte Zu- oder Abschalten eines konstanten Heliumstroms den selektiven Transfer ausgewählter Substanzen ermöglicht. Der Aufbau des Combustion-Interfaces ist dem des Elementaranalysators nachempfunden, jedoch entsprechend der kleineren Substanzmengen anders konzipiert. Dieser Verbrennungsofen besteht aus einem Heizelement, welches ein dünnes Keramikrohr (Al_2O_3 , $l = 320$ mm, $0,5$ mm innerer Durchmesser, $1,5$ mm äußerer Durchmesser) mit den Katalysatoren Kupfer, Nickel und Platin in Form dreier kleiner Drähte beinhaltet. Durch regelmäßiges Durchleiten von Sauerstoffgas (i.d.R. einmal pro Tag) bei 940°C werden die Metalle teilweise oxidiert und stellen in dieser Form den eigentlichen Katalysator für die quantitative Verbrennung von Eluenten dar. Die Notwendigkeit zur Reoxidation wird unter anderem durch den Probendurchsatz und/oder Probenauftrag beeinflusst, und macht sich durch eine unvollständige Verbrennung von Eluenten (ersichtlich an signifikant veränderten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten der Working Standards) bemerkbar. Dem Oxidationsreaktor nachgeschaltet ist ein Reduktionsofen zur Reduktion von eventuell gebildeten Stickoxiden. Der Aufbau ist dem Verbrennungsofen analog, es wird hier lediglich bei 620°C mit einem Keramikrohr und 3 dünnen Kupferdrähten gearbeitet.

Des Weiteren sorgt der Reduktionsofen für die Entfernung von gebildetem Sauerstoffgas, was die „Lebensdauer“ der Ionenquelle positiv begünstigt. Verbrennungswasser wird schließlich durch eine mit Heliumgas umspülte Nafion[®]-Membran (perfluorierter Ionenaustauscher) entfernt. Das so aufbereitete Messgas kann *on line* über eine „open split“ Verbindung dem Massenspektrometer zugeführt werden. Referenzgaspulse, wie unter 2.4.1.1.1 beschrieben, ermöglichen die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte.

2.4.1.2.2 Gaschromatographie-Pyrolyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-P-IRMS)

Die gaschromatographische Isotopenverhältnismessung von Wasserstoff erfolgt mit Hilfe eines Pyrolyse-Interfaces, welches die zu analysierende organische Verbindungen in molekulares Wasserstoffgas überführt. Der Transfer von der Kapillarsäule auf den Pyrolysereaktor erfolgt analog der gaschromatographischen Kohlenstoffmessung über ein T-Stück mit Strömungsteiler („Backflush“-Ventil). Der Pyrolysereaktor besteht aus einem Heizelement, welches ein dünnes Keramikrohr (Al_2O_3 , $l = 320$ mm, $0,5$ mm innerer Durchmesser, $1,5$ mm äußerer Durchmesser) ohne weitere Katalysatoren beherbergt. Bei einer Temperatur von 1440°C erfolgt die quantitative Überführung von organisch gebundenem Wasserstoff in H_2 (Burgoyne und Hayes, 1998; Hilkert et al., 1999), auf eine weitere Gasreinigung kann im Gegensatz zur gaschromatographischen Kohlenstoffbestimmung verzichtet werden. Eine Überprüfung der Pyrolysequalität kann zusätzlich auch über die Detektion von Methylfragmenten mit $m/z = 15$ durchgeführt werden. Das so erhaltene Messgas wird über eine „open split“ Verbindung dem Massenspektrometer zugeführt. Referenzgaspulse, wie unter 2.4.1.1.2 beschrieben, ermöglichen die Bestimmung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte.

Ein weiteres, zu berücksichtigendes Kriterium bei der Bestimmung von D/H-Verhältnissen stellt neben dem H_3 -Faktor (siehe Kap. 2.4.1.1.2) vor allem bei der gaschromatographischen Analyse der lineare Messbereich von organischen Substanzen dar (Hör, 2001). Dieser kann für jede Verbindung unterschiedlich sein, da durch den unterschiedlichen Anteil an Wasserstoffatomen im Molekül eine unterschiedliche Anzahl an Wasserstoffmolekülen durch die Pyrolyse des Moleküls entsteht. Arbeiten von Burgoyne und Hayes (1998) deuten darauf hin, dass die Verweildauer der Probe im Reaktor hier von Bedeutung ist, die Autoren wiesen quantitative Ausbeuten an H_2 bei Temperaturen zwischen 1430 und 1460°C ohne Katalysator nach, wenn die Verweildauer des Eluenten länger als 300 ms im Reaktor betrug. In der Praxis hat sich die Vorgehensweise bewährt, Working Standards bzw. Referenzsubstanzen des zu untersuchenden Analyten in unterschiedlichen Konzentration über den gesamten Messbereich mittels HRGC-P-IRMS zu analysieren und die so ermittelten $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte mit denjenigen der EA-P-IRMS-Messung zu vergleichen, wo derartig dynamische Messbereiche nicht vorhanden bzw. deutlich weniger stark ausgeprägt sind. Im linearen Messbereich stimmen die gas-

chromatographisch ermittelten δ -Werte der Working Standards dann üblicherweise auch mit den mittels Elementaranalysator bestimmten δ -Werten überein.

2.4.2 Deuterium-Kernresonanzspektroskopie (SNIF-NMR[®])

Sowohl im Bereich der Authentizitätsprüfung von Aromastoffen als auch im Rahmen der amtlichen Weinüberwachung stellt die Deuterium-Kernresonanzspektroskopie eine leistungsfähige Technik dar, um Verfälschungen auf die Spur zu kommen. Wie auch andere „unsymmetrische“ Atome mit ungerader Protonen und/oder Neutronenzahl verfügt auch der Deuteriumkern über einen Spin und magnetisches Moment und kann daher mit Kernresonanztechniken untersucht werden. Der Deuteriumkern zeigt in einem Magnetfeld von 9,4 Tesla eine Resonanzfrequenz bei 61,402 Mhz, im Gegensatz dazu das Proton bei 400 Mhz. Diese Tatsache kann man sich zu nutze machen und die natürliche Deuterium-Häufigkeit positionsspezifisch auf intramolekularer Ebene untersuchen (Martin und Martin, 1981; Schmidt et al., 2007). So reizvoll diese Technik auch erscheint, ist sie doch mit massiven Einschränkungen verbunden und kann daher nur in Spezialfällen angewendet werden. Da Deuterium nur mit einer relativen Häufigkeit von 0,0145 atom-% anzutreffen ist, sind für dementsprechende Analysen hohe Substanzmengen und/oder hohe Messzeiten am NMR unausweichlich. Bei einer minimalen Probenmenge von ca. 500 mg resultiert eine benötigte Signalakkumulation von etwa 20 Stunden, wobei sich Messzeit und Probenmenge durch die Verwendung stärkerer Magnetfelder prinzipiell verringern lassen (Hanneguëlle, 1991). Schmidt et al. (2005a) nennen 150 mg Substanz und 10 Std. Messzeit als derzeitigen Stand der Technik. Während der Routinebetrieb von IRMS-Massenspektrometern dagegen mit wenigen mg pro Analyse auskommt, sind für einen vergleichbaren Betrieb mittels SNIF-NMR[®] also üblicherweise Probenmengen von 1-1,5 g erforderlich. Im Gegenzug erhält man aber auch nicht nur globale Isotopenwerte, sondern bei entsprechender Auflösung detaillierte Informationen über die intramolekulare Deuteriumverteilung eines Moleküls, den „Finderabdruck der Herkunft und Synthesegeschichte einer Verbindung“ (Schmidt et al., 2005a). Reinsubstanzen müssen ebenfalls vorliegen, davon kann lediglich unter sehr günstigen Bedingungen (keine Signalüberlagerung) abgesehen werden.

Die SNIF-NMR[®] Spektren werden ausgewertet, indem der zu untersuchenden Probe ein interner Standard (i.d.R. Tetramethylharnstoff, TMU) mit bekanntem Deuteriumgehalt beigefügt wird und die erhaltenen Signale anhand dieses Standards beurteilt werden. Es existieren zertifizierte Standards, es können aber auch Standards mittels separater IRMS-Analyse validiert werden. Die resultierenden Signale sind einfache Peaks ohne weitere Aufspaltung, da es bei einer relativen Deuteriumhäufigkeit von 0,0145 atom-% einfach nicht oder nicht häufig genug vorkommt, dass innerhalb eines Moleküls an zwei benachbarten C-Atomen auch zwei Deuterium-Atome vorliegen (Schmidt et al., 2007). Die Zuordnung der Signale zu entsprechenden Positionen im Molekül erfolgt anhand von Protonen-

spektren, die chemischen Verschiebungen sind gleich. Routinemäßige Anwendung findet die Deuterium-Kernresonanzspektroskopie in der amtlichen Weinüberwachung (siehe auch Kap. 2.4.3.2) (Schmidt et al., 2007).

2.4.3 Anwendungsgebiete der Stabilisotopenanalytik

In der lebensmittelchemischen Analytik haben IRMS und SNIF-NMR[®] bisher zwar zunehmend Einzug gehalten, dennoch aber bleiben die Anwendungen auf wenige Bereiche begrenzt, auf die in den folgenden Abschnitten etwas näher eingegangen werden soll. Es zeigt sich dabei schnell, dass die Anwendungsgebiete jene Fragestellungen umfassen, für die es in der klassischen Analytik keine Lösungen gibt oder schlichtweg „nicht mehr“ gibt. Zu nennen sei hier vor allem die Fruchtsaft-, Zucker- und Weinanalytik, bei der der Verbraucher vor unerlaubten Zusätzen und/oder gestreckten Lebensmitteln bewahrt werden soll, sowie die Multielement-Isotopenanalytik zur Herkunftskontrolle von Lebensmitteln, die vor allem bei Wein, Fleisch, Käse und Butter Anwendung findet (siehe Kap. 2.4.3.2). Ein weiterer, großer Einsatzbereich ist die Authentizitätsprüfung von Aromastoffen, auf die in Kapitel 2.4.3.1 näher eingegangen wird. Neuere Untersuchungen prüfen u. a. die Aussagekraft von Stabilisotopendaten zu Nahrungsketten und den damit verbundenen Fütterungsarten von Nutztieren, oder aber die Unterscheidungsfähigkeit von konventionellen zu ökologischen Landbauprodukten (Empfehlung der AG Isotopen, 2007).

2.4.3.1 Authentizitätskontrolle von Aromastoffen

Bezüglich der Verwendung von Aromastoffen bei der Herstellung von Lebensmitteln gelten sowohl in Deutschland als auch in der Europäischen Union klare Vorgaben. Die Verwendung wird auf EU-Ebene durch die Richtlinie 88/388/EWG geregelt, des weiteren erfolgt im Sinne der VO (EG) Nr. 2232/96 die Festlegung eines europäischen Gemeinschaftsverzeichnisses für Aromastoffe, die in oder auf Lebensmitteln verwendet oder verwendet werden sollen. Der derzeitige Stand dieser „Positivliste“ ist im Aromastoffverzeichnis E 1999/217/EWG der Kommission gelistet und wird, einmal in Aktion getreten, schätzungsweise ca. 2000 Substanzen enthalten. Unabhängig davon regelt in Deutschland die Aromenverordnung (in der Fassung der Bekanntmachung vom 15.05.2006, BGBl. I S.1127) die Verkehrsfähigkeit und Kennzeichnung von Aromen im Handel. Anlage 1 der Aromenverordnung listet die Begriffsbestimmungen für Aromen und unterscheidet hier u. a. zwischen den „natürlichen“, „naturidentischen“ und „künstlichen“ Aromastoffen. Von dieser legislativen Seite her ist dabei eindeutig geregelt, welches Aroma als „natürlich“ bezeichnet werden darf und welches nicht. Demnach defi-

niert als „natürlich“ sind lediglich Aromastoffe oder Aromaextrakte, welche mittels geeigneter physikalischer Prozesse wie etwa Destillation und Extraktion, aber auch durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren, aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft gewonnen werden. Als „naturidentisch“ gelten dagegen Aromastoffe, welche von ihrer Molekülstruktur her betrachtet so zwar auch in der Natur vorkommen, allerdings nicht wie oben beschrieben isoliert bzw. produziert sind, sondern auf dem chemischen Weg der Synthese dargestellt wurden. Es versteht sich von selbst, dass hier gerade aufgrund der identischen chemischen Struktur von natürlichem und naturidentischem Aroma, aber Preisunterschieden in bis zu höhere dreistellige Prozentbereiche, das Potential für Verfälschungen gegeben ist (Serra et al., 2005). Demgegenüber haben „künstliche“ Aromastoffe kein natürliches Vorbild in der Natur und werden ausschließlich auf chemischen Wege hergestellt. Die Aromenverordnung listet derzeit 17 Substanzen, die als „künstliche“ Aromastoffe ausschließlich für gewisse Produktgruppen zugelassen sind.

Eine klassische Methode zur Unterscheidung von „natürlichen“ und „naturidentischen“ Aromastoffen stellt die Ermittlung der *ee*-Werte (*enantiomeric excess*) bei chiralen Verbindungen dar. Diese macht sich die Tatsache zu Nutze, dass in biologischen Systemen üblicherweise ein Enantiomer dem anderen gegenüber bevorzugt oder gar ausschließlich gebildet wird. Der Überschuss an einem spezifischen Enantiomer, auch *ee*-Wert genannt, ist inzwischen für viele Pflanzen in natürlichen Schwankungsbreiten bekannt und dient daher als Kriterium für die Authentizität, wohingegen bei dem Vorliegen eines Racemats die chemische Synthese als Ursprung angenommen werden kann (Mosandl, 2004). Diese Art der Authentizitätsprüfung ist jedoch naturgemäß auf den geringen Teil chiraler Aromamoleküle beschränkt, zudem schwächt die prinzipielle Möglichkeit enantioselektiver Synthesen und/oder selektiver Aufreinigungsschritte das volle Potential dieser Methode. Seit Beginn der 1990er Jahre wurde zunehmend GC-C-IRMS für die Authentizitätsprüfung von Aromastoffen eingesetzt, jedoch musste sich diese Anwendung auf ausgesuchte Verbindungen beschränken, da die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte „natürlicher“ Aromastoffe überwiegend die Isotopensignatur von C_3 -Pflanzen aufweisen. Da sich diese jedoch häufig mit denjenigen synthetischer Moleküle überschneiden, eignet sich diese Methode hauptsächlich für die Authentizitätsprüfung von C_4 -Aromastoffen (Ruff, 2001). Die Verwendung genuin interner Isotopenstandards bzw. intermolekularer Isotopenkorrelationen als $\delta^{13}\text{C}$ -„Fingerabdruck“ von ätherischen Ölen könnte auch in Zukunft die Leistungsfähigkeit dieser Einzelelement-Methode weiter ausschöpfen (Braunsdorf et al., 1993; Mosandl et al., 1994; Mosandl, 1995).

Die kommerzielle Verfügbarkeit von Systemen zur Bestimmung von $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten Ende der 1990er Jahre (Werner et al., 1996; Hener et al., 1998; Hilkert et al., 1999) gab den Weg frei für Multielement-Isotopenverhältnis-Analysen. Bis heute konnten so umfangreiche empirische Datenbanken für die Authentizitätsbewertung erarbeitet werden. Die Möglichkeit zur Unterscheidung von „natürlichen“ und synthetischen, gegebenenfalls auch biotechnologisch erzeugten Aromastoffen wird dabei durch die Tatsache begünstigt, dass die Isotopenwerte einzelner Verbindungen von der Herkunft (petrochemische oder natürliche Quelle, vgl. Abb. 1 und 2) und eventuell auch der Verarbeitung abhängig sind. Bei der Datenaquisition müssen daher stets eine umfangreiche Zahl authentischer Referenzproben erfasst werden, um beim Vorliegen zu prüfender Verbindungen gesicherte

Aussagen treffen zu können. Aufgrund ihrer Bedeutung wurden vor allem *key compounds* bis heute am intensivsten untersucht, darunter unter anderem Vanillin (Kaunzinger et al., 1997; Hör, 2001; Scharrer und Mosandl, 2002), Benzaldehyd (Culp und Noakes, 1990; Ruff et al., 2000), Linalool und Linalylacetat (Hör et al., 2001a; Jung et al., 2005), Citral (Hör et al., 2001b; Bilke und Mosandl, 2002; Nhu-Trang et al., 2006), α - und β -Ionon (Sewenig et al., 2005; Mar Caja, 2007), γ - und δ -Decalacton (Tamura et al., 2005), Zimtaldehyd (Culp und Noakes, 1990; Sewenig et al., 2003), Zimtsäure und -derivate (Schmidt et al., 2007; Fink et al., 2004), aliphatische und fruchteigene Ester (Schmidt et al., 2007; Preston et al., 2003 und 2004; Kahle et al., 2005) sowie C_6 -Alkenale und Alkenole (Bréas et al., 1994; Hör et al., 2001a; Elss et al., 2006).

2.4.3.2 Weitere Anwendungsgebiete

In der lebensmittelchemischen Analytik haben Techniken und Methoden zur Verhältnisbestimmung von stabilen Isotopen einen festen Platz und konzentrieren sich in einigen wenigen Bereichen. Neben der Authentizitätsbewertung von Aromastoffen findet die Stabilisotopenanalytik vor allem dort Anwendung, wo eine Verfälschung des Lebensmittels durch den illegalen Zusatz bereits endogen vorhandener Komponenten gegeben ist, oder aber Aussagen zur Herkunft des Lebensmittels überprüft werden sollen. So wird im Rahmen der Weinanalytik unter anderem der positionelle Deuteriumgehalt in der Methylgruppe des Gärungs-Ethanol (D/H_T -Wert) mittels Deuterium-Kernresonanzspektroskopie (SNIF-NMR[®]) bestimmt. Dieser spiegelt maßgeblich den vergorenen Zucker und ermöglicht über die Korrelation des $\delta^{13}C_{V-PDB}$ -Wertes des Gärungs-Ethanol eine Überprüfung auf unzulässige Zuckering (Bauer-Christoph et al., 1997). Eine Kontrolle auf Wässerung des Weins erfolgt über die Bestimmung des $\delta^{18}O$ -Gehaltes des Wassers nach Äquilibration mit CO_2 , dieser kann im Zusammenspiel mit den Daten der europäischen Weindatenbank (VO (EG) 2729/2000; Joint Research Centre, Ispra) oder der Drittländersweindatenbank (BfR, Berlin) ebenfalls zur Herkunftsbestimmung herangezogen werden (vgl. Kap. 2.2.1) (Schmidt et al., 2005a).

Bei der Fruchtsaftanalytik kann der Nachweis für einen unzulässigen Zusatz von Zitronensäure über die Bestimmung des δ^2H_{V-SMOW} -Wertes von Calciumcitrat erfolgen, da fruchteigene Zitronensäure höhere Deuteriumgehalte aufweist als die aus der biotechnologischen Zuckerfermentation (Jamin et al., 2005). Der Nachweis einer Zuckering kann ebenfalls über Ethanol nach Vergärung geführt werden. Bei der Honig-Authentizitätsprüfung wird über die Bestimmung des $\delta^{13}C_{V-PDB}$ -Wertes von Probe und den darin enthaltenen Proteinen auf den Verschnitt mit C_3 -Zuckern geprüft, wonach sich diese um nicht mehr als 1‰ unterscheiden dürfen (Schmidt et al., 2005a). Noch genauere Ergebnisse lassen sich hier mittels HPLC-IRMS über die Korrelation der $\delta^{13}C_{V-PDB}$ -Werte der einzelnen Zucker erhalten (Cabañero et al., 2006). Bei Ahornsirup kann die darin enthaltene Äpfelsäure als Pb-Salz quantitativ gefällt und als intrinsischer $\delta^{13}C$ -Standard herangezogen werden, um auf eine unzulässige Zuckering zu

prüfen (Tremblay und Paquin, 2007). Eine Unterscheidung von natürlichen und synthetischen Coffein ist mittels EA-P-IRMS über den $\delta^{18}\text{O}$ -Wert möglich (Richling et al., 2003).

Ein weiteres großes Gebiet für die Stabilisotopenanalytik stellt die Bestimmung der geographischen Herkunft dar, wenngleich hier erst die Kombination mehrerer Isotopendaten, gegebenenfalls gepaart mit zusätzlichen chemischen Parametern und statistischen Methoden, eine zunehmend sichere geographische Einordnung ermöglicht. So erlaubt beispielsweise bei Käse die Bestimmung von $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ und $\delta^{34}\text{S}$ von Casein, gepaart mit den $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^{18}\text{O}$ -Werten von Glycerin, eine Unterscheidung von französischen, italienischen und spanischen Käsesorten (Camin et al., 2004). Lammfleisch unterschiedlicher Herkunft aus Europa kann über die Bestimmung von $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ und $\delta^{34}\text{S}$ recht zuverlässig eingeordnet werden (Camin et al., 2007). Untersuchungen zur Unterscheidungsmöglichkeit von ökologisch und konventionell produzierten Landbauprodukten liegen vereinzelt, bisher leider jedoch ohne klare Aussagen, vor (Schmidt et al., 2005b; Georgi et al., 2005). Bei Eiern können $\delta^{13}\text{C}$ -Werte kleiner -24‰ und $\delta^{15}\text{N}$ -Werte größer $+10\text{‰}$ einen Hinweis, wenngleich keinen Nachweis, auf Freilandhaltung geben (Schmidt et al., 2005a). Rindfleisch aus ökologischer Produktion zeigt verhältnismäßig niedrige $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (kleiner -20‰), da die Tiere hauptsächlich C_3 -Pflanzen als Nahrung erhalten (Boner und Förstel, 2004).

2.5 Aromawirksame C₆-/C₉-Aldehyde und -Alkohole („Grünnoten“)

2.5.1 Allgemeines

In unserem Alltag begegnen wir ihm praktisch ständig, dem „Duft“ der grünen Pflanzen. Sei es nun der frisch geschnittene Rasen, ein Spaziergang bei Regen, eine Tasse Tee oder das frisch zerriebene grüne Blatt an den Händen, der Geruch der sogenannten „Grünnoten“ ist stetig und in nahezu allen Pflanzen präsent. Umso erstaunlicher ist es dabei, dass für diesen einprägsamen Geruchseindruck gerade einmal eine handvoll Aromakomponenten verantwortlich sind. Einige dieser Verbindungen sind auch für die Industrie äußerst wertgebende Bestandteile, um sowohl in Aromaformulierungen als auch Parfums die gewünschten „grünen“ organoleptischen Sinneseindrücke zu gewährleisten. Am dominierendsten sind hierbei die beiden Verbindungen (*Z*)-3-Hexenol und (*E*)-2-Hexenal, von denen jährlich ca. 300 t allein durch chemische Synthese hergestellt werden und über 80% dieser produzierten Menge zugunsten des Alkohols ausfällt (Hatanaka, 1996). Nur etwa ein Viertel des produzierten (*Z*)-3-Hexenols wird als solches weiter genutzt, der Rest entfällt auf seine Derivate in Form von Estern (Clark, 1990). Im Gegensatz dazu beträgt der geschätzte Markt an natürlichen „Grünnoten“ 5-10 t pro Jahr (Schrader et al., 2004).

(*Z*)-3-Hexenol, oder auch *Blätteralkohol* genannt, wurde erstmals 1933 aus unfermentierten Teeblättern isoliert und wird seitdem intensiv erforscht. Die Verbindung riecht fruchtig sowie intensiv nach frisch geschnittenem Gras (Hatanaka et al., 1992). Der Geruchsschwellenwert in Wasser beträgt 70 ppb. Die traditionelle Art der Gewinnung von natürlichem (*Z*)-3-Hexenol stellt dessen destillative Gewinnung aus ätherischen Ölen dar, insbesondere der aus Minzeölen (Schrader et al., 2004). Der *Blätteraldehyd* (*E*)-2-Hexenal wurde bereits zuvor 1912 erstmals aus den Blättern von Sträuchern isoliert. In verdünnter Form riecht (*E*)-2-Hexenal intensiv nach Apfel und wird für diesen sogar als *impact compound* bewertet. Im Allgemeinen wird der Geruchseindruck als „fruchtig, frisch und süß“ beschrieben (Hatanaka, 1992), der Geruchsschwellenwert in Wasser beträgt 17 ppb. Der dem Blätteraldehyd korrespondierende Alkohol, (*E*)-2-Hexenol, wird von seiner Geruchsqualität dem Aldehyd gegenüber als weniger frisch und weniger „grün“ beschrieben, im Vergleich zu (*Z*)-3-Hexenol zwar als süßer, jedoch weniger „grün“ (Hatanaka, 1992). Die Verbindung 1-Hexanol wird aufgrund der gleichsinnigen Biogenese zwar auch zu den „Grünnoten“ gezählt, spielt jedoch für die o.g. Geruchseindrücke keine Rolle, sondern lediglich in Form seiner Ester in Früchten und Fruchtaromen. Reines 1-Hexanol wird als „leicht fettig-fruchtig“ beschrieben und soll schwach nach Pilzen riechen. Im Gegensatz zu (*E*)-2-Hexenal kommen die „Grünnoten“-Aldehyde Hexenal und (*Z*)-3-Hexenal weniger häufig vor, sie bewirken einen deutlichen heuartigen, fast brenzligen Geruchseindruck, der auch als „Insekten-ähnliches Grün“ beschrieben wird (Hatanaka, 1992).

Neben den C₆-Verbindungen finden sich die C₉-Alkenale und Alkenole in deutlich geringeren Konzentrationen in der Pflanzenwelt, doch erreichen sie vor allem in der Familie der *Cucurbitaceae*

durchaus beachtliche Mengen. So sind für das Aroma von Gurken maßgeblich die Verbindungen (Z)-3-Nonenal, (E,Z)-2,6-Nonadienal (*Veilchenblatt-Aldehyd*) und (E,Z)-2,6-Nonadienol (*Gurkenalkohol*) verantwortlich, wohingegen (Z,Z)-3,6-Nonadienal und (Z,Z)-3,6-Nonadienol das Melonenaroma prägen (Hatanaka, 1996; Gargouri und Legoy, 1998; Häusler et al., 2000).

2.5.2 Biogenese von C₆-/C₉-Aldehyden und -Alkoholen im Lipidstoffwechsel

2.5.2.1 Lipoxygenase-katalysierte Dioxygenierung ungesättigter Fettsäuren

Die Biogenese der aromawirksamen „Grünnoten“-Komponenten findet praktisch ubiquitär bei der mechanischen Zerstörung von pflanzlichem Gewebe infolge einer Reihe enzymatischer Reaktionen statt, insbesondere bei der von grünem Pflanzenmaterial. Ausgehend von dieser Stimulation werden dabei zunächst durch Acylhydrolasen die Fettsäuren Linol- und Linolensäure aus den in der Chloroplastenmembran befindlichen Lipiden (Galakto-, Phospho- und Neutrallipide) freigesetzt (Hatanaka und Harada, 1973; Sekiya et al., 1976). Neuere Untersuchungen gehen von einer spezifischen Hydrolyse von Galactolipiden aus (Matsui et al., 2000). Linol- und Linolensäure werden anschließend durch die nicht-hämeisenhaltige Dioxygenase Lipoxygenase (LOX, EC 1.13.11.12) und Sauerstoff als Cosubstrat mit unterschiedlicher Regio- und Stereoselektivität zu den entsprechenden Fettsäurehydroperoxiden umgesetzt, je nach Vorkommen und Art der Lipoxygenase (Axelrod, 1974). Gemeinsames Element für die Lipoxygenasen ist deren Substratspezifität für 1,4-Z,Z-Pentadiensysteme, welche bei der Bildung des Hydroperoxids zu einem konjugierten 2,4-E,Z-Diensystem umgelagert werden. Einen schematischen Überblick zur unterschiedlichen Regio- und Stereoselektivität von Lipoxygenasen am Beispiel der Sojabohnen- und Tomaten-Lipoxygenase zeigt Abbildung 5. Beim Mechanismus der Lipoxygenase-Reaktion (Abb. 6) durchläuft das Zentralatom Eisen einen Redoxzyklus zwischen seiner Fe²⁺- und Fe³⁺-Form, wobei das Fe³⁺-Ion die aktive Form des Enzyms darstellt und durch Produktaktivierung mit katalytischen Mengen an Hydroperoxid aus der inaktiven Fe²⁺-Form gebildet wird (Gardner, 1991)

Für den weiteren Metabolismus der so gebildeten Fettsäurehydroperoxide steht den Pflanzen eine umfangreiche Enzymausstattung zur Verfügung, wobei die Bildung der aromawirksamen C₆- und C₉-Verbindungen dabei lediglich eine Möglichkeit für den Verlauf des Stoffwechsels darstellt. Die Biosynthese von C₆- und C₉-Verbindungen erfolgt dabei im Rahmen der „Linol(en)säurekaskade“ aus den zuvor durch die Lipoxygenasen gebildeten Fettsäurehydroperoxiden. Eine parallel ablaufende Metabolisierung der Fettsäurehydroperoxide findet u. a. im Lipoxygenase-Allenoxidsynthase-Stoffwechselweg statt, der in Pflanzen zur Bildung von Jasmonsäure sowie davon abgeleiteten Phytohormonen führt (Blee, 1998).

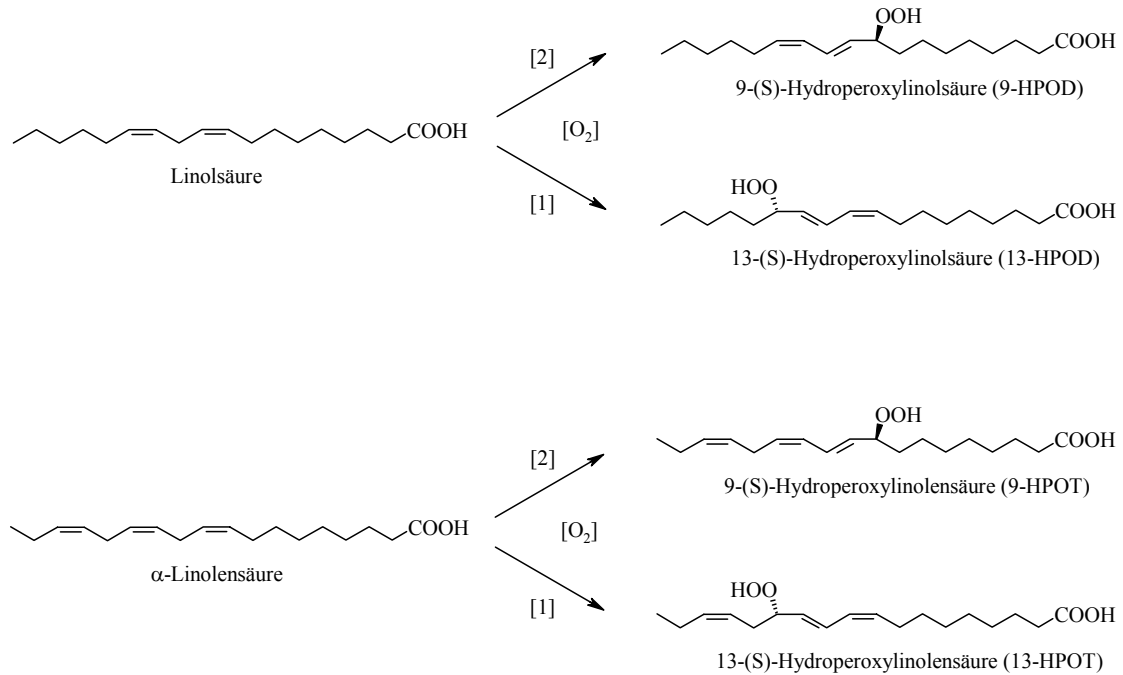


Abb. 5: Regio- und Stereoselektivität bei der Lipoxygenase-katalysierten Dioxygenierung am Beispiel der ungesättigten Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure. [1] Sojabohnen-Lipoxygenase Typ 1, [2] Tomaten-Lipoxygenase (nach Gardner, 1991)

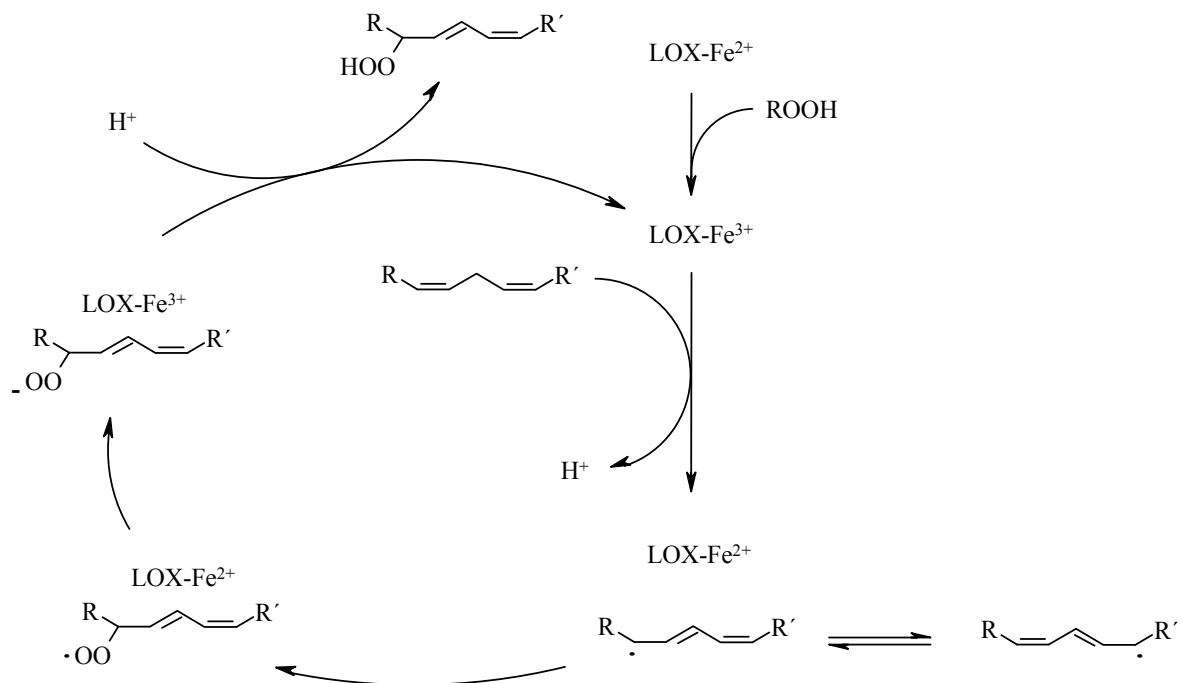


Abb. 6: Schematischer Reaktionsablauf der Lipoxygenase-Katalyse (LOX-1) bei der Dioxygenierung ungesättigter Fettsäuren (verändert, nach De Groot et al. 1975)

2.5.2.2 „Hydroperoxidlyase“-katalysierte Spaltung ungesättigter Fettsäurehydroperoxide

Die Biogenese von C₆-/C₉-Verbindungen aus Fettsäurehydroperoxiden durch deren enzymatischen Abbau, insbesondere der von C₆-Aldehyden und -Alkoholen, ist praktisch ubiquitär im Pflanzenreich vorzufinden. Die Spaltung der Hydroperoxide in zwei Aldehydfragmente wird dabei zunächst durch das Enzym Hydroperoxidlyase (HPL) initiiert, der dadurch ausgelöste „Lyase Pathway“ trägt in Pflanzen bedeutende Funktionen bei der Wundantwort sowie der Pathogenabwehr (Noordermeer et al., 2001). In höheren Pflanzen spalten die Hydroperoxidlyasen das Fettsäurehydroperoxid überwiegend zwischen dem Hydroperoxy- und dem olefinischen Kohlenstoff („heterolytische“ Hydroperoxidlyasen), in niederen Pflanzen, Algen und Pilzen dagegen bevorzugt zwischen Hydroperoxy- und der daneben liegenden Methylengruppe („homolytische“ Hydroperoxidlyase) (Gardner, 1991). Die Bezeichnung „heterolytisch“ resultiert dabei aus der Tatsache, dass die Produkte der Enzymkatalyse die gleichen sind wie bei der säurekatalysierten Spaltung von Hydroperoxiden, wohingegen die Reaktionsprodukte der „homolytischen“ Lyase an eine β -Spaltung von Alkoxyradikalen erinnert. Bezüglich ihrer Substratspezifität können heterolytische Hydroperoxidlyasen in zwei Klassen eingeteilt werden. Während die Lyase der meisten Pflanzen spezifisch bzw. bevorzugt die Spaltung des 13-HPOD und 13-HPOT in 12-Oxo-(9Z)-dodecensäure und Hexanal bzw. 12-Oxo-(9Z)-dodecensäure und (Z)-3-Hexenal katalysiert (Abbildung 7), reagiert die andere vorwiegend mit den isomeren Fettsäurehydroperoxiden 9-HPOD bzw. 9-HPOT unter Bildung von 9-Oxononansäure und (Z)-3-Nonenal bzw. 9-Oxononansäure und (Z,Z)-3,6-Nonadienal (Abbildung 8). Bei den gebildeten Aldehyden kann anschließend eine Umlagerung an der Doppelbindung stattfinden sowie die Aldehydfunktion durch das Enzym Alkohol-Dehydrogenase zum Alkohol reduziert werden (Hatanaka, 1996).

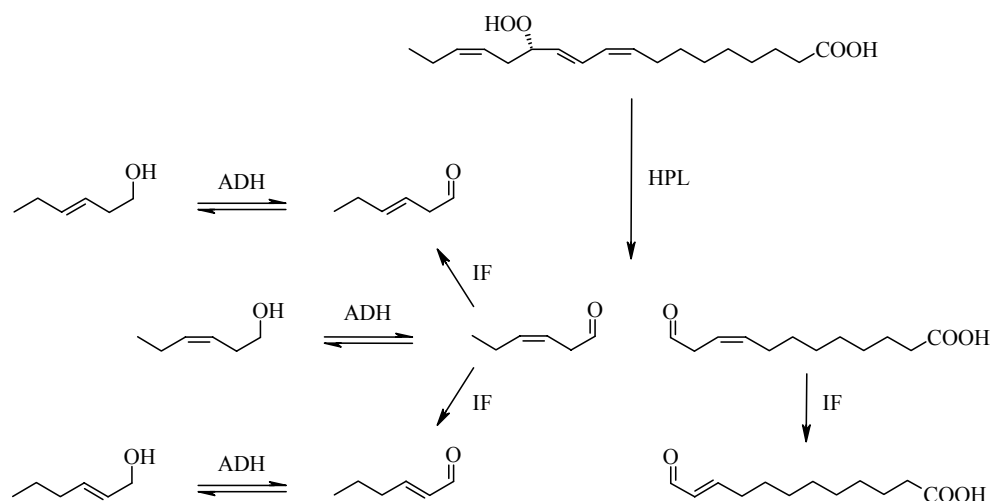


Abb. 7: Vereinfachtes Schema der Spaltung von 13-(S)-Hydroperoxiden durch Hydroperoxidlyase am Beispiel von 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid (verändert, nach Hatanaka, 1996). Verwendete Abkürzungen: HPL (Hydroperoxidlyase), ADH (Alkohol-Dehydrogenase), IF (Isomerisierungsfaktor). Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Die Umlagerung der Doppelbindung bei den (Z)-3-Alkenalen unter Bildung der entsprechenden (E)-2-Alkenale findet dabei durch den sogenannten „Isomerisierungsfaktor“ statt (Hatanaka, 1996), welcher bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. Die Fragestellung hierbei ist, ob die Isomerisierung zu den thermodynamisch stabileren (E)-2-Alkenalen überwiegend spontan oder enzymkatalysiert abläuft. Phillips et al. (1979) beschrieben bisher als einzige eine partiell gereinigte 3Z:2E-Enal-Isomerase aus Gurkenfrüchten. Das Enzym wurde seitdem nicht mehr genauer untersucht, allerdings deuten einige Ergebnisse auf dessen allgemeines Vorkommen hin. Die Resultate sollten aber nach wie vor vorsichtig betrachtet werden, da vor allem die Methoden im Rahmen der Probenvorbereitung starken Einfluß auf die Ergebnisse haben können (Gargouri und Legoy, 1998).

So untersuchten beispielsweise Gargouri und Legoy (1998) die 9-HPL Aktivität von Birnen, Birnenblättern und Gurkenfrüchten und achteten im Rahmen ihrer Probenvorbereitung auf möglichst geringfügige thermische Belastungen. Dabei inkubierten die Autoren die genannten Pflanzenhomogenate mit 9-HPOD für 30 min bei 25°C, überspülten die gebildeten Nonenale mit Heliumgas auf eine Tenax-Kartusche und desorbierten diese (200°C/4 min) in eine mit flüssigem Stickstoff gefüllte Kühlfalle (-150°C), von wo aus die Übertragung auf den Gaschromatographen erfolgte („Purge and Trap“). Das nicht isomerisierte (Z)-3-Nonenal konnte dabei in Anteilen von 94,1-82,7% gegenüber (E)-2-Nonenal detektiert werden. Hatanaka et al. (1975) untersuchten das Isomerisierungsverhalten von (Z,Z)-3,6-Nonadienal in homogenisierten Gurkenfrüchten und ermittelten für T₀ einen Gehalt von 39,2% (Z,Z)-3,6- und 60,8% (E,Z)-2,6-Nonadienal. Diese Mengen veränderten sich im Laufe von 20 min zu 22,3% (Z,Z)-3,6- und 77,7% (E,Z)-2,6-Nonadienal. Das Gurkenhomogenat wurde jeweils durch die Zugabe von Lösungsmittel inaktiviert und der gewonnene Extrakt einer Hochvakuumdestillation unterworfen, bevor dieser mittels Gaschromatographie ausgewertet wurde. Kim und Grosch (1981) fanden mit partiell gereinigter Birnenlyase dagegen nur geringe Mengen an isomerisierten (E)-2-Nonenal. Die Autoren analysierten die gebildeten Aldehyde erst nach Derivatisierung mit 2,4-DNPH und arbeiteten vorher stets bei maximal 25°C.

Einen deutlicheren Hinweis gaben dagegen Noordermeer et al. (1999). Diesen Autoren gelang es, bei der HPL-Aufreinigung aus Alfalfa-Keimlingen den Isomerisierungsfaktor von der HPL-Aktivität zu trennen. Sie verglichen die Reaktionsprodukte bei der 13-HPOT-Umsetzung der teilweise gereinigten HPL mit der eines Rohextrakts jeweils als 2,4-DNPH-Derivate. Dabei stellten sie fest, dass der Rohextrakt bereits nach 30 min Inkubationszeit mit 13-HPOT den größten Teil des primären Spaltprodukts (Z)-3-Hexenal in (E)-2-Hexenal umgelagert hatte, wohingegen das teilweise gereinigte Enzym auch noch nach 60 min Inkubationszeit ausschließlich (Z)-3-Hexenal erbrachte. Kuroda et al. (2005) zeigten bei ihren Untersuchungen zur Biogenese von (E)-2-Nonenal in keimender Gerste den signifikanten Unterschied zwischen der Probenanreicherung mittels Headspace und einfacher Lösungsmittelextraktion, wobei typische Headspace-Bedingungen (40°C, 15 min) eine schnellere Isomerisation herbeiführten. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass bei Zugabe von synthetischem (Z)-3-Nonenal zu deren teilweise gereinigten Enzym, eine 9-HPL und 3Z:2E-Enal Isomerase-Aktivität, keine Umlagerung mehr stattfand, wenn dieses zuvor thermisch inaktiviert worden war.

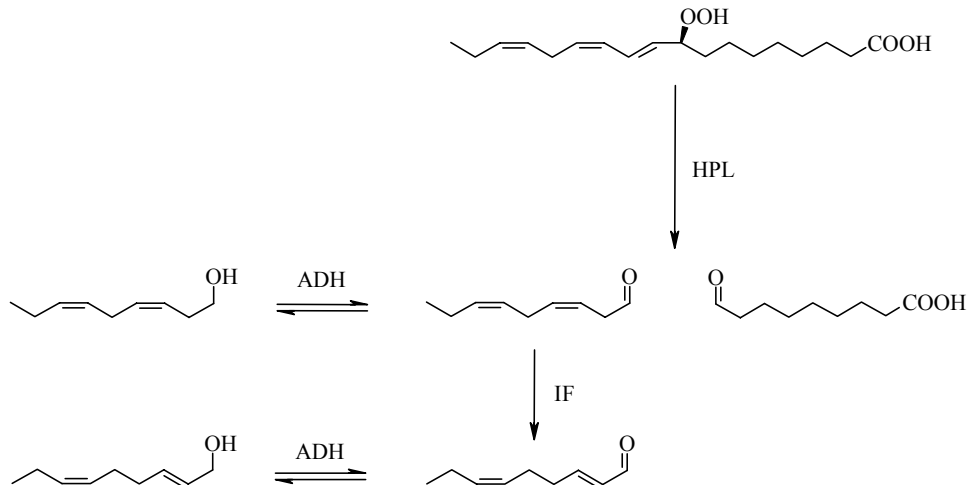


Abb. 8: Vereinfachtes Schema der Spaltung von 9-(S)-Hydroperoxiden durch Hydroperoxidlyase am Beispiel von 9-(S)-Linolensäurehydroperoxid (verändert, nach Hatanaka, 1996). Verwendete Abkürzungen: HPL (Hydroperoxidlyase), ADH (Alkohol-Dehydrogenase), IF (Isomerisierungsfaktor). Für nähere Erläuterungen siehe Text.

2.5.2.2.1 Vorkommen und Eigenschaften von Hydroperoxidlyasen

Da Hydroperoxidlyasen praktisch in jeder Pflanze vorkommen, konnten schon einige Enzyme zumindest teilweise gereinigt und genauer untersucht werden. Aktivität einer 13-Hydroperoxidlyase wurde so unter anderem in Wassermelonenkeimlingen (Vick und Zimmermann, 1976), Teeblättern (Hatanaka et al., 1982; Matsui et al., 1991), Tomaten und Äpfeln (Galliard und Matthew, 1977; Suurmeijer et al., 2000; Schreier und Lorenz, 1982), Tomatenblättern (Fauconnier et al., 1997), Tabak-Zellkulturen (Sekiya et al., 1984), Spinat (Vick und Zimmermann, 1987), Sojabohnen (Matoba et al., 1985), reifenden Erdbeeren (Pérez et al., 1999), Sonnenblumen (Itoh und Vick, 1999) grünen Paprika (Shibata et al., 1995a; Husson und Belin, 2002) und Minze (Gargouri et al., 2004) detailliert beschrieben.

Erbsensamen und -keimlinge, Sojabohnensamen und -keimlinge sowie Alfalfakeimlinge (*Medicago sativa* L.) verfügen sowohl über 13- als auch 9-Hydroperoxidlyase-Aktivität (Hornostaj und Robinson, 2000; Gardner et al., 1991a und 1991b; Noordermeer et al., 1999), ebenso Bohnenblätter (Matthew und Galliard, 1978). Auch Gurkenkeimlinge sowie -früchte zeigten diese beiden Hydroperoxidlyase-Aktivitäten. Aus Gurkenkeimlingen konnten erstmals die Aktivitäten getrennt und somit zwei Isoformen des Enzyms nachgewiesen werden (Galliard et al., 1976a und 1976b; Matsui et al., 1989). Aus Gerstenkeimlingen hat man eine 9-Hydroperoxidlyase-Aktivität partiell gereinigt und untersucht. Deren Aktivität in 20 kommerziellen Malzproben ist mit der Entwicklung des sog. „cardboard flavor“

von gelagertem Bier in Korrelation gebracht worden, ein off-flavor, für den u. a. (E)-2-Nonenal verantwortlich gemacht wird (Kuroda et al., 2005a). Des Weiteren scheinen Birnen ausschließlich über die Aktivität einer 9-Hydroperoxidlyase zu verfügen (Kajiwara et al., 1977; Kim und Grosch, 1981; Gargouri und Legoy, 1998).

Die das Enzym codierenden Gene sind bereits aus mehreren Pflanzen bekannt, das Protein ist inzwischen rekombinant verfügbar. Diesbezügliche Untersuchungen wurden durchgeführt anhand von grünem Paprika (Matsui et al., 1996), Banane (Haeusler et al., 1997), Guave (Tijet et al., 2000), Alfalfa (Noordermeer et al., 2000), *Arabidopsis* (Bate et al., 1998; Matsui et al., 1999), Gurke (Matsui et al., 2000a), Tomate (Howe et al., 2000; Matsui et al., 2000b), Melone (*Cucumis melo*) (Tijet et al., 2001) Wassermelone (*Citrullus lanatus*) (Fukushige und Hildebrand, 2005), Gerste (Koeduka et al. 2003), Mandel (Mita et al., 2005) und Reis (Kuroda et al., 2005b).

Diese genetischen Ansätze erbrachten neue Erkenntnisse über die Natur dieser Enzyme, wonach Hydroperoxidlyasen einer speziellen Unterfamilie innerhalb der großen Familie der Cytochrom P-450 Enzyme zugeordnet werden (CYP74B und CYP74C) (Noordermeer et al., 2001). Zwei weitere Mitglieder dieser Unterfamilie sind ebenfalls am Metabolismus von Fettsäurehydroperoxiden in Pflanzen beteiligt, die Allenoxidsynthase (CYP74A) sowie die Divinylether Synthase (CYP74D) (Song et al., 1993; Howe et al., 2000; Itoh und Howe, 2001). Die beschriebenen Gene codieren für Proteine mit 55kDa, was den Molekularmassen für die aus Pflanzen isolierten Hydroperoxidlyasen mit 55-60 kDa entspricht. Versuche mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese deuten jedoch darauf hin, dass das Enzym in der Natur als Tri- oder Tetramer vorliegt. Die prosthetische Gruppe ist wie auch bei anderen Cytochrom P-450 Enzymen das Protoporphyrin IX (Häm b) (Shibata et al., 1995b), die Hydroperoxidlyase unterscheidet sich aber von diesen aufgrund der geringeren Affinität gegenüber CO und der damit verbundenen Abwesenheit eines Absorptionsmaxima bei 450 nm, was eigentlich typisch für Cytochrom P-450 Enzyme ist (Noordermeer et al., 2001). Dass die Hydroperoxidlyase sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die biotechnologische Gewinnung natürlicher Aromastoffe ein äußerst interessantes Enzym darstellt, erklärt sicherlich die gestiegene Anzahl an Veröffentlichungen zu diesem Thema.

Daneben wurden im Laufe der Zeit auch eine Reihe von ungewöhnlichen Lyaseaktivitäten entdeckt, deren verantwortliche Enzymreaktionen häufig noch unbekannt sind. So sind Algen beispielsweise ebenfalls in der Lage, aus Fettsäuren C₆- und C₉-Alkenale zu synthetisieren. Untersuchungen mit einem Homogenat der Braunalge *Laminaria angustata* ergaben eine Erhöhung des Gehaltes an (Z)-3- und (E)-2-Nonenal, sobald mit Arachidonsäure inkubiert wurde; der Anteil an C₆-Aldehyden stieg durch die Zugabe von Linolsäure. Als Intermediate konnten durch die *in situ* Reduktion zu den entsprechenden Hydroxyfettsäuren mit Glutathion-Peroxidase (GSH-GPx) das 12-(S)-Arachidonsäurehydroperoxid sowie das 13-(S)-Linolsäurehydroperoxid ausgemacht werden, welche heterolytisch zu den Nonenalen bzw. Hexenalen gespalten wurden (Boonprab et al., 2003a und 2003b). Die Grünalge *Ulva conglobata* spaltete daneben homolytisch und stereoselektiv das 11-(R)-Arachidonsäurehydroperoxid in 2,4-Decadienal (Akakabe et al., 2003). In Pilzen (*Psalliotia bispora*) führte die Zugabe von

Linolsäure bzw. 10-(S)-Linolsäurehydroperoxid zu einer gesteigerten homolytischen Bildung von (R)-1-Octen-3-ol (Wurzenberger und Grosch, 1984a, 1984b und 1984c), die Zugabe von Linolensäure entsprechend zu einer Bildung von (Z)-1,5-Octadien-3(R)-ol und (Z,Z)-2,5-Octadien-1-ol (Wurzenberger und Grosch, 1986). Durch Inkubation von Linolsäure mit den Pilzen *Lentinula edodes* bzw. *Tricholoma matsutake* wurde ebenfalls (R)-1-Octen-3-ol gebildet, als Intermediat konnte durch die *in situ* Reduktion mit Glutathion-Peroxidase (GSH-GPx) zu der entsprechenden Hydroxyfettsäure das 10-(S)-Linolsäurehydroperoxid ausgemacht werden (Matsui et al., 2003; Akakabe et al., 2005). Es ist dabei nach wie vor unklar, welches Enzym für die homolytische Spaltung verantwortlich ist. In dem Moos *Physcomitrella patens* wurde eine unspezifische Lyase (PpHPL) mit Präferenz für die 9-(S)-Hydroperoxide von C₁₈-Fettsäuren sowie mit gesteigerter Aktivität bei der Wundantwort entdeckt (Stumpe et al., 2006). Das Enzym spaltet sein endogenes Substrat 12-(S)-Arachidonsäurehydroperoxid heterolytisch unter Freisetzung von (Z)-3-Nonenal, das Moos selber produziert bei Zugabe von Arachidonsäure sowohl vermehrt C₉-, als auch C₈-Verbindungen. Transgene Pflanzen ohne PpHPL konnten im Rahmen der Wundantwort kein (Z)-3-Nonenal mehr produzieren, die Konzentration an den C₈-Verbindungen blieb jedoch auch in den transgenen Pflanzen unverändert. Die Autoren schreiben diese Tatsache einer ebenfalls in dem Moos vorkommenden, multifunktionalen Lipoxygenase mit Hydroperoxid-spaltender Aktivität zu (Senger et al., 2005).

2.5.2.2.2 Der Mechanismus der Hydroperoxidlyase-Katalyse

Der Mechanismus der Hydroperoxidlyase-Katalyse fand bisher nur wenig Beachtung, es konnten aber gerade in jüngster Zeit neue und bedeutende Informationen gewonnen werden. Erstmals schlugen Gardner und Plattner (1984) einen Bildungsweg über eine Hock-Umlagerung am Sauerstoff vor, den sie anhand von Untersuchungen an dem aprotischen System 13-(S)-Linolsäurehydroperoxidmethyl-ester-BF₃ ableiteten. In ihrem Modell polarisiert die starke Lewis-Säure Bortrifluorid (BF₃) die Hydroperoxy-Funktion am Fettsäurehydroperoxid und abstrahiert ein Hydroxidion unter Bildung von Hydroxyfluoroborat [BF₃OH], wobei simultan die Umlagerung des olefinischen Kohlenstoffs zum Sauerstoff stattfindet. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen von Grosch et al. (1981), bei der die Spaltung von 9-(S)- und 13-(S)-Linolsäurehydroperoxid in dem aprotischen System Trichloressigsäure/Benzol nur zu geringen Ausbeuten an C₆-/C₉-Aldehyden führte (max. 6.9 mol-%), berichteten Gardner und Plattner (1984) von Umsetzungen über 90%. Sie schlugen ihr System daher als Modell für die Hydroperoxidlyase-Katalyse vor, da die beobachteten Spaltprodukte in hoher Ausbeute den (bereits isomerisierten) Produkten der enzymatischen Umsetzung entsprachen.

Hatanaka et al. (1986) fanden in darauf folgenden Untersuchungen mit ¹⁸O₂-markiertem 13-(S)-Hydroperoxylinoleylalkohol und Hydroperoxidlyase aus Tee einen Einbau von ¹⁸O in der Carbonylfunktion der 12-Oxocarbonsäure, nicht jedoch in dem gebildeten Hexanal. Durch die Reduktion mit NaBH₄

fingen die Autoren die im Rahmen der enzymkatalysierten Reaktion gebildeten Aldehyde in Form ihrer korrespondierenden Alkohole ab, um einen Austausch des carbonylgebundenen Sauerstoffs mit dem Reaktionsmedium Wasser zu verhindern. Einen ähnlichen Austausch hatten zuvor Wurzenberger und Grosch (1984a) im Rahmen ihrer Untersuchungen zur enzymkatalysierten Bildung von (R)-1-Octen-3-ol beschrieben, bei der bereits nach 30-minütiger Lagerung von 10-Oxo-(8Z)-decensäure in H_2^{18}O 90% des Sauerstoffs an Position 10 ausgetauscht hatten. Hatanaka et al. (1986) schlugen aufgrund ihrer Untersuchungen einen Reaktionsmechanismus vor, der dem heterolytischen Modell von Gardner und Plattner (1984) entsprach und den Einbau von Wasser als Quelle des Sauerstoffs für die gebildeten C_6 -/ C_9 -Aldehyde vorsah. Wurzenberger und Grosch (1984a) vermuteten dagegen einen kompletten Einbau von atmosphärischem Sauerstoff in die beiden Spaltprodukte ohne Beteiligung von Wasser, konnten dies allerdings nicht eindeutig beweisen.

Dieser Bildungsweg war lange Zeit akzeptiert, doch spätestens seit der Entdeckung von Hydroperoxidlyase als Cytochrom P-450 Enzym (Shibata et al., 1995b) kamen verstärkt Zweifel bezüglich des bis dahin angenommenen Reaktionsmechanismus auf (Noordermeer et al., 2000). Dies, ebenso wie die Tatsache, dass Hydroperoxidlyase durch Antioxidantien inhibiert werden kann, legte ferner die Vermutung nahe, dass es sich um einen radikalischen Katalyseprozess handelt (Matsui et al., 1996). Erstmals schlugen Noordermeer et al. (2000) einen zyklischen Mechanismus über das Zentralatom Eisen sowie ein Alkoxyradikal vor, berücksichtigten dabei aber auch die Ergebnisse von Hatanaka et al. (1986) bezüglich der Rolle des Wassers bei der Katalyse.

Grechkin und Hamberg (2004) erweiterten schließlich die Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus durch eine Reihe von zeitlich streng kontrollierten Experimenten mit Guavenhomogenat und 13-(S)-HPOT sowie den markierten Substraten $[\text{}^{18}\text{O}_2]\text{13-(S)-HPOT}$ bzw. $[\text{}^9,10,12,13,15,16\text{-}^2\text{H}_6]\text{13-(S)-HPOT}$. Die Autoren erhielten ein anderes Ergebnis als Hatanaka et al. (1986) und konnten dabei zeigen, dass bei der Hydroperoxidlyase-katalysierten Spaltung von 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid beide Sauerstoffatome der Hydroperoxygruppe in die Aldehydgruppen der entstehenden C_6 - und C_{12} -Verbindung überführt werden, und Sauerstoff aus H_2^{18}O nicht eingebaut wird (Abb. 9). Das primäre Reaktionsprodukt der Umsetzung ist dabei ein instabiles Halbacetal, welches nach Angabe der Autoren mit einer Halbwertszeit von ca. 20 Sekunden zerfällt und so letztendlich die beiden kurzkettigen Aldehyde generiert werden (Abb. 10). Demzufolge sei die Hydroperoxidlyase strenggenommen auch keine „Lyase“, sondern vielmehr eine Isomerase. In weiteren Untersuchungen mit rekombinanter Melonen-Hydroperoxidlyase und 9-HPOD zeigten Grechkin et al. (2006) einen Reaktionsmechanismus analog zu dem, den sie bereits kurz zuvor 2004 vorgestellt hatten. Des Weiteren analysierten sie die Produktverteilung der Umsetzungen von 13-HPOD und 13-HPOT mit den rekombinanten Enzymen von Alfalfa, Guave und Melone und konnten diese in Einklang mit ihren bisherigen Ergebnissen bringen.

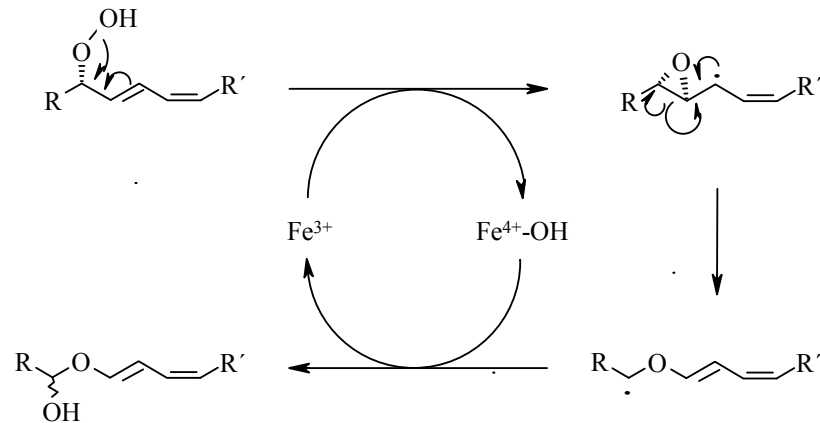


Abb. 9: Mechanismus der Hydroperoxidlyase-Katalyse. Formal erfolgt eine Isomerisierung des Fettsäurehydroperoxids zu einem instabilen Halbacetal (nach Grechkin und Hamberg, 2004). R = -CH₂-CH=CH-CH₂-CH₃ und R' = -(CH₂)₇-COOH für Linolensäure.

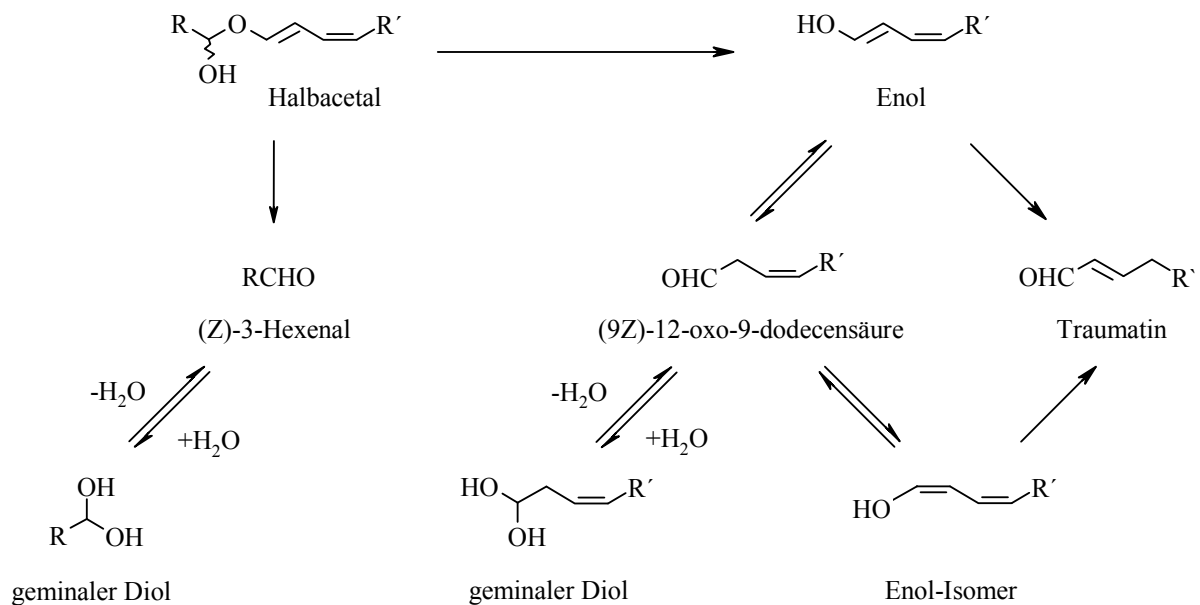


Abb. 10: Spontaner Zerfall des durch die Hydroperoxidlyase gebildeten Halbacetals sowie die anschließend erfolgenden Umlagerungen mit reversibler Bildung geminaler Dirole (verändert, nach Grechkin und Hamberg, 2004; Grechkin et al., 2006). R = -CH₂-CH=CH-CH₂-CH₃ und R' = -(CH₂)₇-COOH für Linolensäure

2.5.3 Biotechnologische Produktion von C₆-/C₉-Aldehyden und -Alkoholen

Wurden bis vor einigen Jahren biotechnologische Verfahren zur Aromastoffproduktion von der Industrie vor allem auch zu dem Zweck eingesetzt, kostengünstiger „natürliche“ Aromastoffe gegenüber der traditionellen Art mittels extraktiver oder destillativer Verfahren zu produzieren, so hat sich das Bild in den letzten Jahren gewandelt. Maßgebender Faktor ist vor allem der Kunde und Konsument von Nahrungsmitteln und Getränken, aber auch Kosmetikprodukten, welcher zunehmend im Zuge des ökologisch sensibilisierten Zeitgeistes nach mehr „natürlichen“ oder wenigstens umweltfreundlich hergestellten Produkten verlangt, und dafür auch bereit ist, einen höheren Preis zu bezahlen. Gerade aus dem Grund der Kostenfrage werden daher wohl auch in näherer Zukunft chemisch produzierte und kostengünstig hergestellte Aromastoffe nach wie vor den dominierenden Anteil auf diesem Gebiet ausmachen, jedoch möchte der Markt die zunehmende Nachfrage nach „natürlichen“ Produkten auch gerne bedienen (Schrader et al., 2004).

Die Produktion von „natürlichen“ Aromastoffen mittels biotechnologischer Verfahren spielt allerdings nicht nur im Sinne der Kostenfrage eine wichtige Rolle, auch andere Faktoren sind von großer Bedeutung. So ermöglichen biotechnologische Verfahren gegenüber den chemischen üblicherweise einen ökologisch weniger strapazierenden Produktionsprozess, sie sind in ihrer Ausbeute unabhängig von Umwelteinflüssen wie dies gegebenenfalls bei den zur Aromagewinnung kultivierten Pflanzen der Fall ist, und liefern den gewünschten Aromastoff am Ende eines Prozesses üblicherweise in enantiomerenreiner Form (Serra et al., 2005). Gerade die enantioselektive Katalyse ist es, welche biotechnologischen Verfahren den chemischen gegenüber Überlegenheit verschafft. Chemische Verfahren führen bei chiralen Verbindungen nahezu immer zu Racematen, doch sind diese nicht immer erwünscht. Häufig zeigen Enantiomere von chiralen Aromastoffmolekülen unterschiedliche sensorische Eigenschaften, und Racemate entsprechen gegebenenfalls nicht den hohen sensorischen Qualitätsanforderungen. Auch in der Natur bilden sich chirale Aromastoffmoleküle in der Regel in enantiomerenreiner oder zumindest -angereicherter Form. Der gezielte Einsatz von Mikroorganismen oder Enzymen bietet daher nicht nur der Aromaindustrie vielfältige Möglichkeiten, die mit hohem Aufwand verbundenen enantioselektiven chemischen Synthesen zu umgehen (Serra et al., 2005). Probleme bereiten bei der biotechnologischen Produktion bzw. der Entwicklung von Produktionsprozessen dagegen eingeschränkte Kenntnisse über relevante biochemische Stoffwechselprozesse und Produktflüsse, sowie die häufig zu beobachtenden toxischen bzw. inhibierenden Effekte der Produkte in höheren Konzentrationen (Vandamme und Soetaert, 2002).

Spätestens seit Ende der 1980er Jahre existieren eine Reihe von patentierten und publizierten Verfahren, um aromaaktive „Grünnoten“ biotechnologisch darzustellen. Die diesbezügliche Zahl an Veröffentlichungen ist seitdem stetig gestiegen, in jüngster Zeit beobachtet man vermehrt die Aufklärung der relevanten molekularen Stoffwechselprozesse und die daran beteiligten codierenden Gensequenzen. Dies hat dazu geführt, dass eine zunehmende Zahl an rekombinanten Enzymen aus unter-

schiedlichen Quellen Einzug in die Patentliteratur gefunden hat. Für die Zukunft verspricht sich die Industrie vor allem auf diesem Sektor mehr Möglichkeiten, die Ausbeute an „Grünnoten“ in damit verbundenen Prozessen zu steigern (Schrader et al., 2004). Die vielen beschriebenen biotechnologischen Verfahren zur Produktion von „Grünnoten“, hauptsächlich von C₆-Aldehyden und -Alkoholen, sind dabei im Grunde genommen recht ähnlich strukturiert. Sie beziehen sich entsprechend der Biogenese in der Natur auf die Reaktion ungesättigter Fettsäuren mit einer Lipoxygenasequelle sowie Sauerstoff, wodurch ungesättigte Fettsäurehydroperoxide gebildet werden. Diese werden anschließend durch die Aktivität einer Hydroperoxidlyase, meistens in Form von homogenisiertem Pflanzenmaterial, zu den entsprechenden C₆-Alkenalen umgesetzt. Zur anschließenden Reduktion der gebildeten Aldehyde wird das Enzym Alkohol-Dehydrogenase in Form von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) eingesetzt, wobei aus Kostengründen der Einsatz von isoliertem Enzym nicht praktiziert wird (Schrader et al., 2004). Eine hohe Ausbeute an (Z)-3-Hexenol ist in der Regel das Ziel solcher Verfahren, da der „Blätteralkohol“, wie bereits erwähnt (Kap. 2.5.1), die wichtigste Verbindung unter den „Grünnoten“ darstellt.

Brunerie und Koziat (1997) beschrieben beispielsweise die Produktion eines (Z)-3-Hexenol-reichen Aromaextraktes durch das Einwirken homogenisierten Pflanzenmaterials (Fenchelblätter, *Foeniculum vulgare*) als Lipoxygenase- und Hydroperoxidlyase-Quelle auf zugesetztes Leinsamenöl-Hydrolysat mit einem Gewichtsanteil von 0,1-2%, bezogen auf das Blatthomogenat. Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) werden in ihrer Wachstumsphase dem Ansatz beigefügt, ausdrücklich jedoch nicht später als 45 min nach Beginn der Homogenisation. Durch diese Zeitvorgabe wird gewährleistet, dass der Großteil des gebildeten (Z)-3-Hexenals nicht zu (E)-2-Hexenal isomerisiert und durch die Alkohol-Dehydrogenase der Hefe zu (Z)-3-Hexenol reduziert wird. Durch Wasserdampfdestillation wird das Produkt schließlich abgetrennt. Auf diese Art und Weise sollen sich bis zu 400 ppm (Z)-3-Hexenol, bezogen auf die Menge an zugesetzten Fenchelblättern, gewinnen lassen. Eine Reihe weiterer Verfahren beschreibt die Produktion von (Z)-3-Hexenol in ähnlicher Art und Weise, Variationen finden sich vor allem in der Art des zugesetzten Pflanzenhomogenates als Lyase-Quelle, der Lipoxygenase-Quelle (häufig Sojamehl) sowie der zeitlichen Reaktionsführung (Kanisawa et al., 1988; Goers et al., 1989; Belin et al., 1998; Holtz et al., 2001).

Die größten Ausbeuten und damit auch ein für industrielle Zwecke geeignetes Vorgehen beschreibt die Fa. Firmenich (Muller et al., 1995). Im Gegensatz zu den o.g. Verfahren wurden mit diesem Ausbeuten von bis zu 5,1 g Hexenal, 4,1 g 1-Hexanol, 4,2 g (Z)-3-Hexenol, 1,8 g (E)-2-Hexenal und 1,2 g (E)-2-Hexenol dokumentiert. Abbildung 11 zeigt eine schematische Übersicht: Der Prozess beginnt mit der Inkubation von Linolensäure bzw. einem geeigneten Speiseölydrolysat (z.B. Leinsamenöl) mit Sojamehl als Lipoxygenase-Quelle bei pH 9,0-9,5, da bei diesem pH-Wert das 13-HPOT durch Sojabohnen-Lipoxygenase nahezu ausschließlich gebildet wird (Gardner, 1989). Bei einem pH-Wert von 7-9 erfolgt im Anschluß die simultane Zugabe von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Guavenhomogenat als Hydroperoxidlyase-Quelle, diese gleichzeitige Zugabe sichert, wie bereits geschildert, eine hohe Ausbeute an (Z)-3-Hexenol. Durch Rektifikation des Wasserdampfdestillats erhält man reines (Z)-3-Hexenol. (Z)-3-Hexenal kann erhalten werden, indem auf die Zugabe von Hefe verzichtet

und die Reaktion des Guavenhomogenats durch die unmittelbare Zugabe von Lösungsmittel unterbrochen wird. (E)-2-Hexenal wird dagegen erhalten, wenn ebenfalls auf die Zugabe von Hefe verzichtet und das Reaktionsprodukt des Guavenhomogenats, (Z)-3-Hexenal, bei pH 6,5 einer Wasserdampfdestillation unterworfen wird, wobei in diesem Reaktionsschritt das (Z)-3-Hexenal zum (E)-2-Hexenal isomerisiert. (E)-2-Hexenol schließlich kann als Hauptprodukt gewonnen werden, indem das intermediäre (Z)-3-Hexenal zunächst zur Isomerisierung bei pH 6,5 und 50°C für 90 min gehalten, anschließend eine geringere Menge Hefe zugesetzt und bereits nach kurzer Reaktionszeit der Ansatz der Wasserdampfdestillation unterworfen wird. Die Produktion von Hexenal bzw. 1-Hexanol geht entsprechend von Linolsäure oder einem geeigneten Speiseölhydrolysat aus (z. B. Sonnenblumenöl), ein Isomerisierungsschritt tritt hier aufgrund der Abwesenheit einer Doppelbindung nicht auf. Je nach Wahl der Prozessführung können somit alle Verbindungen aus der Gruppe der C₆-„Grünnoten“ dargestellt werden.

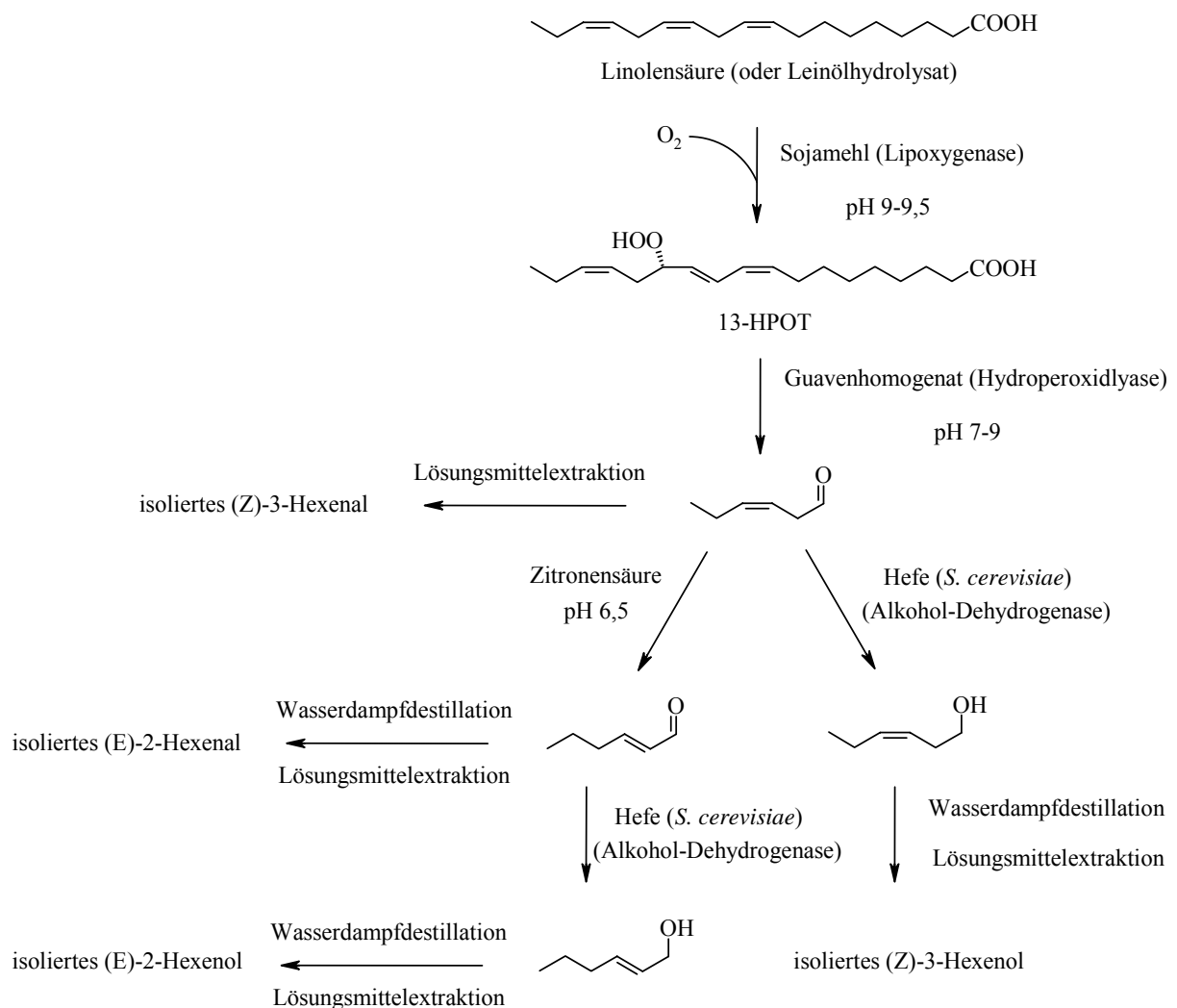


Abb. 11: Schema der biotechnologischen Produktion von C₆-„Grünnoten“ ausgehend von Linolensäure (nach Muller et al., 1995). Verwendete Abkürzungen: 13-HPOT (13-(S)-Hydroperoxylinolensäure).

Biotechnologische Verfahren zur Darstellung aromaaktiver C₉-Verbindungen sind bisher nur vereinzelt publiziert worden, was wohl auch den wesentlich geringeren Aktivitäten und Vorkommen spezifischer 9-Hydroperoxidlyasen zuzuschreiben ist. Natürliche C₉-Verbindungen, wie etwa (E,Z)-2,6-Nonadienal und (E,Z)-2,6-Nonadienol, sind als solche nur schwer auf dem Markt erhältlich und können z. B. in Form von Veilchenblatt-Absolue (*Viola odorata* L.) in Aromakompositionen eingesetzt werden (Häusler et al., 2000). In diesen kommen sie neben 1-Octen-3-ol, (Z)-3-Hexenol und (Z)-3-Hexenylacetat vor, die gewonnenen Veilchenblatt-Extrakte werden mit einer typischen, grünlich-fetten und Gurken-ähnlichen Note beschrieben. Sie finden hauptsächlich Anwendung in der Parfümerie, können jedoch auch in „natürlichen“ Aromen tropischer Fruchtkompositionen eingesetzt werden, wobei die ebenfalls enthaltenen Nebenbestandteile wie Fettsäuren und Ionone den Anwendungsbereich eingrenzen. Das Verfahren von Givaudan Roure (Häusler et al., 2000) beschreibt die Produktion von (E,Z)-2,6-Nonadienal ausgehend von Leinsamenölhydrolysat und Veilchenblättern als Lipoxygenase- und Hydroperoxidlyase-Quelle. Das Wasserdampfdestillat der Reaktion von 1,367 kg Leinölhydrolysat mit 24 kg vorbehandelten Veilchenblättern erbrachte 7,9 g etherisches Öl mit einem Gehalt von 75 % (E,Z)-2,6-Nonadienal, entsprechend 30,4 mg (E,Z)-2,6-Nonadienal pro kg Reaktionsansatz. Durch die entsprechende Reaktionsführung ist es auch möglich, die Aromastoffzusammensetzung des Veilchenblatt-Absolue zu modifizieren.

Bei allen aufgezeigten Verfahren ist die Reaktion der Hydroperoxidlyase ein kritischer Schritt im Reaktionsgeschehen, und die Ausbeute kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. So ist in den jeweiligen Ansätzen die Konzentration an aktiver HPL meist sehr niedrig, man ist häufig auf spezielles Pflanzenmaterial angewiesen und zu hohe Substratkonzentrationen an Fettsäurehydroperoxiden inaktivieren das Enzym (Matsui et al., 1992). Nicht zuletzt muss die Produktion in Ansatzverfahren erfolgen und kann nicht kontinuierlich durchgeführt werden. Zukünftige Entwicklungen zielen daher zunächst daraufhin ab, die Aktivität der Hydroperoxidlyase mittels gentechnischer Methoden zu steigern. Dies kann in Form von Bakterienlysaten exprimierender *E. coli* erfolgen (Brash et al., 2006; Whitehead et al., 2004; Brash et al., 2001), den Einsatz transgener Tabak- oder Maispflanzen (Hildebrand und Fukushige, 2006; Duvick und Gilliam, 2002) als Homogenate einschließen, sowie nicht zuletzt auch gentechnisch veränderte *Saccharomyces cerevisiae* beinhalten (Häusler et al., 2001; Bourela et al., 2004). Letztgenannter Ansatz wird u. a. von Givaudan Roure verfolgt. So wird die Konstruktion transgener Hefezellen beschrieben, welche in der Lage sind, eine Hydroperoxidlyase aus Banane zu exprimieren. Mittels hefeeigener Alkoholdehydrogenase kann auf diese Art und Weise ohne zusätzliches Pflanzenhomogenat direkt (Z)-3-Hexenol gebildet werden.

2.5.4 Problemstellung bei der Untersuchung von Isotopenfraktionierungen während der Biogenese von C₆-/ C₉-Aldehyden und -Alkoholen

Während die Authentizitätsprüfung von achiralen Aromastoffen im Hinblick auf deren natürliche oder synthetische Herkunft mit Stabilisotopen-analytischen Methoden bis auf wenige Ausnahmen heute de facto etabliert ist (siehe Kap. 2.4.1.2 und 2.4.3.1), stellt sich bei der Untersuchung von Aromastoffen auch unweigerlich die Frage, ob sich biotechnologisch produzierte Aromastoffe sowohl von synthetischen, als auch von denjenigen natürlicher („ex plant“) Herkunft unterscheiden lassen. Eine elegante Lösung ist sicherlich die Erweiterung von bestehenden Stabilisotopen-Datenbanken mit entsprechendem Referenzmaterial, sie scheitert jedoch häufig an der limitierten Verfügbarkeit bzw. Auswahl an authentischen Proben. Des weiteren können Substanzproben, die zwar als „natürlich“ deklariert sind, nur selten mit einem entsprechenden Hinweis auf ihre Herkunft bzw. dem zugrundeliegenden Produktionsverfahren bezogen werden. Eine Alternative oder Ergänzung stellt hier die kontrollierte und somit auch authentische Produktion von ausgewählten Aromastoffen im Labormaßstab dar, die in Anlehnung an entsprechend publizierte bzw. patentierte Verfahren durchgeführt wird. Diese Methode hat zudem auch den Vorteil, das gegebenenfalls zusätzliche Informationen über mögliche Isotopenfraktionierungen in solchen Systemen ermittelt werden können, welche sich auch für die Authentizitätsprüfung als nützlich erweisen können. Bei der vorliegenden Arbeit galt es daher zunächst, im Labormaßstab unter definierten Bedingungen den Prozess der „Grünnoten“-Biogenese in Anlehnung an entsprechende biotechnologische Verfahren durchzuführen, Intermediate und Produkte zu isolieren und auf deren Stabilisotopengehalte hin zu untersuchen. Des weiteren sollten die dabei ermittelten Daten daraufhin geprüft werden, inwieweit sie in Verbindung mit literaturbekannten Stabilisotopendaten eine detailliertere Aussage zur Authentizitätsbewertung von „Grünnoten“ zulassen.

2.6 Die Gärungsnebenprodukte 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol

2.6.1 Vorkommen, Eigenschaften und Verwendung

Für die Flavor & Fragrance-Industrie stellen die Ehrlich-Alkohole 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol wichtige Komponenten in Aromaformulierungen dar, wenngleich letztgenannter praktisch ausschließlich in Form seiner Ester Anwendung findet. Der Geruchseindruck des gereinigten aromatischen Alkohols *2-Phenylethanol* wird mit einer milden bis schwachen, nach Honig und Rosen duftenden Note beschrieben (Wiegers und Sprecker, 1985). Diese sowie die günstigen Eigenschaften bezüglich Anwendungsmöglichkeiten und Stabilität haben 2-Phenylethanol zu einer der am weitesten verbreiteten Aromachemie in Fragrance- und Parfümkompositionen gemacht. Anwendungsmöglichkeiten bestehen auch, wenngleich bei weitem nicht so umfangreich, bei der Aromatisierung von Lebensmitteln mit diversen Fruchtaromen, allen voran Himbeer- und Erdbeeraromen, aber auch in Honig- und Karamellkompositionen (Wiegers und Sprecker, 1985). Anfangs der 1990er Jahre betrug die Weltjahresproduktion von 2-Phenylethanol geschätzte 7000 t, praktisch ausschließlich produziert auf chemisch-synthetischem Weg. Der Markt für „natürliches“ 2-Phenylethanol ist limitiert und noch im Wachstum begriffen, im Jahre 2002 wurden weltweit ca. 0,5 t zu einem Preis von etwa 1000 US\$ pro kg umgesetzt (Schrader et al., 2004). In der Natur kommt 2-Phenylethanol in nennenswerten Mengen (bis zu 60%) im Rosenöl vor, welches jedoch für die Verwendung als natürliche Quelle für die Lebensmittelaromatisierung schlichtweg zu kostbar ist (Schrader et al., 2004). In *Rosa damascena* Mill. wird 2-Phenylethanol aus L-Phenylalanin gebildet und bis zur Öffnung der Blüte als β -D-Glucopyranosid gespeichert (Watanabe et al., 2002; Oka et al., 1999). Industrielle Prozesse zur Gewinnung bzw. Darstellung von „natürlichem“ 2-Phenylethanol gehen von dessen extraktiver Gewinnung aus Destillationsrückständen bei der alkoholischen Gärung („Fuselöle“), oder aber von der biotechnologischen Produktion aus L-Phenylalanin aus (siehe Kap. 2.6.2).

Als Gärungsnebenprodukt kommt 2-Phenylethanol, wie auch 2-Methyl-1-propanol, neben weiteren Ehrlich-Alkoholen praktisch ubiquitär in durch Hefegärung produzierten alkoholischen Getränken vor (in der Summe 0,2-0,6% Fuselöle, bezogen auf Ethanol), wobei vor allem in Spirituosen wie etwa Whisky, Weinbrand, Cognac oder Steinobstbränden diese Mengen auch als aromagebende Komponenten erwünscht sind (Römpp, 2006). Im Wein ist 2-Methyl-1-propanol im Gegensatz zu 2-Phenylethanol für das Aroma unerwünscht, beide kommen hier sowohl frei als auch in Form ihrer Ester vor und werden in ihren Konzentrationen von den Gärbedingungen beeinflusst (Belitz et al., 2001). Während der alkoholischen Gärung erfolgt die Biogenese der Ehrlich-Alkohole als Nebenprodukte im Rahmen der Aminosäure-Biosynthese aus den 2-Oxocarbonsäure-Vorstufen bzw. über den enzymatischen Abbau von Aminosäuren, z. B. aus der Maische (Belitz et al., 2001). Die Abbildungen 12 und 13 geben eine Übersicht zu diesen biochemischen Stoffwechselwegen am Beispiel der Biogenese von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol.

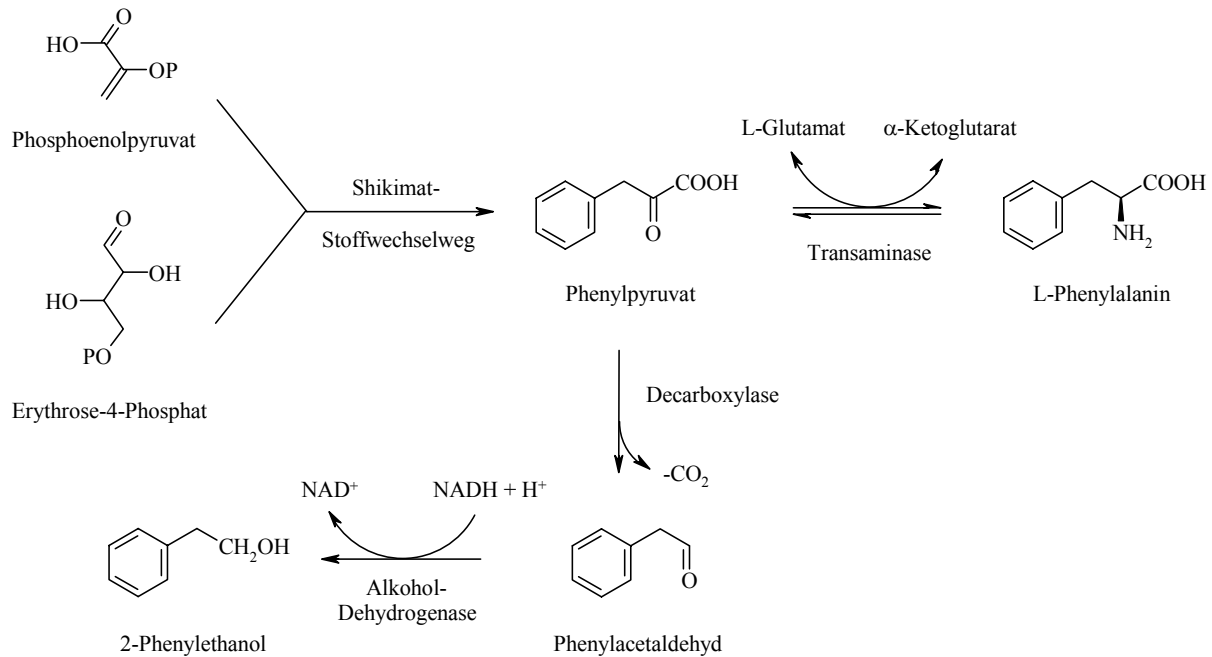


Abb. 12: Schematischer Bildungsweg für 2-Phenylethanol während der alkoholischen Gärung im L-Phenylalanin-Stoffwechsel (verändert, nach Stryer, 1999; Etschmann et al., 2004)

In Form seiner Ester mit kurzkettigen Fettsäuren stellt *2-Methyl-1-propanol* (Isobutylalkohol) für eine Vielzahl von Frucht-Aromakompositionen einen wertvollen Bestandteil dar (Vandamme und Soetaert, 2002; Schrader et al., 2004). Zusammen mit 2- und 3-Methyl-1-butanol macht Isobutylalkohol knapp 95% des Fuselöls aus, in dem es zu ca. 12% vorkommt (Vandamme und Soetaert, 2002). Nennenswerte Mengen des Alkohols finden sich vor allem in Bier, Wein und Spirituosen (Belitz et al., 2001). Da Isobutylalkohol in hohen Konzentrationen in Destillationsrückständen der Spirituosenproduktion vorhanden ist, kann so äußerst günstig ein natürlicher Rohstoff, z. B. mittels geeigneter Rektifikationsverfahren (Berg, 1999), für die weitere Produktion „natürlicher“ Aromastoffe gewonnen werden. Die Umsetzung zu den aromawirksamen und per Definition „natürlichen“ Fruchtestern kann dann entweder enzymatisch mit Lipasen in organischen Lösungsmitteln in hohen Ausbeuten erfolgen (Schrader et al., 2004), oder aber das Fuselöl wird direkt und ohne vorherige Aufreinigung mit Hefe zu den entsprechenden Acetaten umgesetzt (Vandamme und Soetaert, 2002). Im Falle einer säurekatalysierten und somit chemischen Veresterung muss das Produkt nach EU-Rechtslage, selbst bei der Verwendung von natürlichen Edukten, als „naturidentisch“ gekennzeichnet werden. 2-Methyl-1-propanol kann auf chemischen Weg durch Hydroformylierung oder Hydrocarbonylierung von Propen dargestellt werden (Römp, 2006).

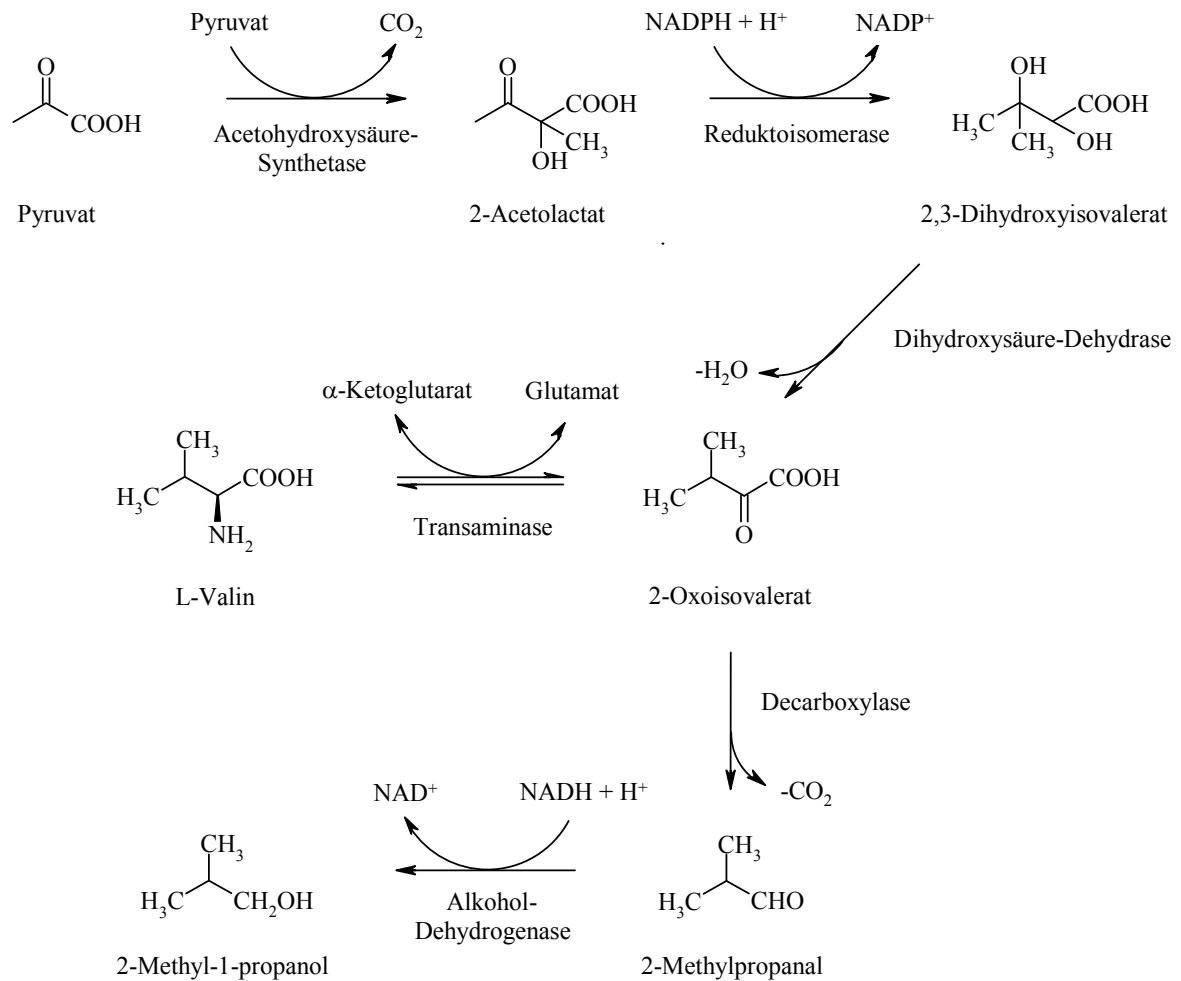


Abb. 13: Schematischer Bildungsweg für 2-Methyl-1-propanol während der alkoholischen Gärung im L-Valin-Stoffwechsel (verändert, nach Piendl, 1969).

2.6.2 Industrielle Prozesse zur Darstellung von 2-Phenylethanol

Für die industriell-chemische Produktion von 2-Phenylethanol existieren eine Reihe von Verfahren, bei denen jeweils das entstehende Produkt umfangreich gereinigt werden muss, bevor es für eine Verwendung als Duft- bzw. Aromakomponente die erforderlichen sensorischen Qualitäten aufweist (Nienhaus und Hopp, 1987; Kamaya und Onodera, 2001). Anwendung findet dabei überwiegend die katalytische Hydrierung von Styroloxid, weitere Methoden wie etwa Friedel-Crafts-Alkylierung von Benzol mit Ethylenoxid, Grignard-Reaktion von Phenylmagnesiumchlorid mit Ethylenoxid oder Reduktion von Phenylessigsäure wurden ebenfalls beschrieben (Kamaya und Onodera, 2001; Rode et al., 2005). Des Weiteren kann 2-Phenylethanol als Nebenprodukt in industriellen Prozessen anfallen, wie

etwa der Oxidation von Ethylbenzol oder der Epoxidierung von Olefinen (Nienhaus und Hopp, 1987). Die Aufreinigung technischer Produkte erfolgt fraktioniert-destillativ unter Verwendung geeigneter Schleppmittel. Auf diese Art können Reinheiten von bis zu 99,9% erhalten werden (Nienhaus und Hopp, 1987; Kamaya und Onodera, 2001).

Da die Gewinnung von „natürlichem“ 2-Phenylethanol durch dessen Isolierung aus Blütenölen von Anfang an ungeeignet erschien, wurden im Verlauf der letzten Dekade andere Wege erarbeitet, um dieses unter ökonomischen Verhältnissen in verhältnismäßig größeren Mengen verfügbar zu machen. Bei dem Verfahren von Pernod Ricard (Savina et al., 1999) werden zu diesem Zweck Destillationsrückstände aus der Cognacproduktion herangezogen, in denen 2-Phenylethanol in Mengen von 100-150 mg/l enthalten ist. Ausgangsrohstoff ist hier der Rückstand der traditionellen doppelten Blasendestillation am Ende der zweiten Destillation, welcher zunächst mittels tangentialer Mikrofiltration von unlöslichen Bestandteilen befreit und anschließend wahlweise unter Verwendung von lipophilen Ionenaustauscherharzen oder Umkehrosmosemembranen aufkonzentriert wird. Die hierbei berichteten Ausbeuten belaufen sich auf 100 g 85%-iges 2-Phenylethanol aus 250 l Destillationsrückstand mittels Festphasenextraktion bzw. 155 g 2-Phenylethanol in 17 l Retentat nach Umkehrosmose von 1650 l Destillationsrückstand, welche anschließend weiter aufgereinigt werden können (Savina et al., 1999).

Die biotechnologische Produktion von 2-Phenylethanol nutzt *Saccharomyces cerevisiae*, um über den in Kapitel 2.6.1 beschriebenen Ehrlich-Stoffwechselweg (siehe Abb. 12) aus supplementierten L-Phenylalanin größere Mengen an 2-Phenylethanol zu produzieren. Das Verfahren wird jedoch durch die Tatsache erschwert, dass es bei der Akkumulation von 2-Phenylethanol zu einer Produktinhibition der Hefekulturen kommt, so daß *in situ* Produktentfernung erforderlich ist (Schrader et al., 2004). Experimente mit Oleylalkohol und Ölsäure in Zwei-Phasensystemen ergaben bereits Ausbeuten von 5,6 g/l bzw. 12,6 g/l, der Einsatz von Membrantechnologie ist Gegenstand der Forschung (Etschmann et al., 2004; Stark et al., 2002). Das Verhältnis der erwünschten Produkte 2-Phenylethanol und 2-Phenylacetat kann prinzipiell durch die Bedingungen bei der Biokatalyse beeinflusst werden (Etschmann et al., 2004). Die Aminosäure L-Phenylalanin selbst wird praktisch ausschließlich biotechnologisch in großem Umfang mit einer geschätzten Weltjahresproduktion von 10000 t mittels *Escherichia coli*- und *Corynebacterium glutamicum*-Stämmen produziert, das Racemat wird synthetisch hergestellt (Krämer, 2004).

2.6.3 Problemstellung bei der Untersuchung von Isotopenfraktionierungen während der Bildung von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol

Um anhand der Stabilisotopenwerte von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol gesicherte Aussagen über deren Authentizität zu treffen, ist es zunächst von großer Bedeutung, eine gesicherte Datengrundlage mit authentischem Referenzmaterial zu erstellen. Wie bereits unter 2.5.4 geschildert, kann die limitierte Verfügbarkeit von authentischen „natürlichen“ Proben in diesem Fall dadurch behoben werden, indem innerhalb von kontrollierten Modellgärungen im Labormaßstab *de novo* Gärungsalkohole dargestellt und auf ihre Isotopenwerte hin untersucht werden. Des Weiteren wurden bislang systematische Untersuchungen zu Isotopenfraktionierungen bei der Biogenese von Alkoholen im Rahmen der alkoholischen Gärung hauptsächlich bei Ethanol und Glycerin durchgeführt, wohingegen bei höheren Gärungsalkoholen vereinzelt praktisch nur $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in der Literatur vorhanden sind (Schmidt et al., 2007). Vor allem im Hinblick auf die $\delta^2\text{H}$ -, aber auch $\delta^{18}\text{O}$ -Werte, besteht daher grundlegender Forschungsbedarf.

3 Untersuchungen zur ²H/¹H- und ¹³C/¹²C-Isotopenfraktionierung während der Biogenese von C₆-Aldehyden und -Alkoholen

3.1 ²H/¹H- und ¹³C/¹²C-Isotopenfraktionierung bei der Lipoxygenase-katalysierten Darstellung von 13-(S)-Linol- und 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid

Um das 13-(S)-Linol- (13-HPOD) und 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid (13-HPOT) in ausreichender Menge für die Bestimmung von $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten mittels EA-C/P-IRMS zu erhalten, wurde von uns die präparative Darstellung mit Sojabohnen-Lipoxygenase in 0,1 M Boratpuffer bei pH 9,0 und 0-4°C gewählt, da bei diesen Reaktionsbedingungen die Produktselektivität überwiegend auf das 13-HPO(D)T gerichtet ist und in hohen Ausbeuten erfolgt (Gardner, 1989). Da bei der EA-C/P-IRMS lediglich Reinsubstanzen auf ihre Isotopenverhältnisse hin untersucht werden können, galt es zunächst, das jeweilige 13-(S)-Fettsäurehydroperoxid möglichst quantitativ aus den individuellen Rohprodukten zu isolieren. Nach beendeter enzymatischer Umsetzung mit einem kommerziellen Lipoxygenasepräparat erfolgte die Abtrennung von den in geringer Menge gebildeten, aber dennoch vorhandenen isomeren Fettsäurehydroperoxiden durch Chromatographie an Kieselgel sowie unter Fraktionskontrolle mittels Normal-Phase-HPLC und DC. Die erfolgreiche Isolierung wurde im Abschluss jeweils mittels ¹H-NMR bestätigt. Die Isolierung von 13-HPO(D)T wurde lediglich für die EA-C/P-IRMS Analyse durchgeführt, da für die weiteren Abbauxperimente das Rohprodukt auch direkt eingesetzt werden konnte. Abbildung 14 zeigt das Arbeitsschema für die enzymatische Darstellung von 13-HPO(D)T sowie der Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Fettsäuren und korrespondierenden Hydroperoxiden.

Um die Einflüsse des Reaktionsmediums, der Reaktionsbedingungen sowie der chromatographischen Aufreinigung auf die resultierenden Isotopenwerte bewerten zu können, wurden zusätzlich Blindwerte ohne Enzympräparat angesetzt und die hier nach der Chromatographie an Kieselgel wieder erhaltene Linol- und Linolensäure ebenfalls mittels EA-C/P-IRMS vermessen. Bis auf das verwendete Wasser für den Boratpuffer sowie die Lösungsmittel bei der Chromatographie wurden dabei grundsätzlich dieselben Reagenzien verwendet. Des Weiteren hat es sich als wichtig erwiesen, die EA-C/P-IRMS Analyse der Hydroperoxide praktisch unmittelbar nach deren Reindarstellung durchzuführen, da diese Verbindungen von Natur aus trotz Lagerung unter Argon nur über eine begrenzte Haltbarkeit verfügen und bereits minimale Zersetzungserscheinungen durch die sensorisch hoch aktiven Aldehydfragmente erkennbar werden. Im Verlauf der Arbeit stellte es sich des Weiteren heraus, dass die Haltbarkeit der Fettsäurehydroperoxide neben der obligatorischen Lagerung unter Argon durch das Einfrieren in Cyclohexan (-18°C) deutlich verlängert werden konnte, so dass für die weiteren Abbauxperimente je nach Bedarf Aliquote der eingefrorenen Rohprodukte zur Verfügung standen.

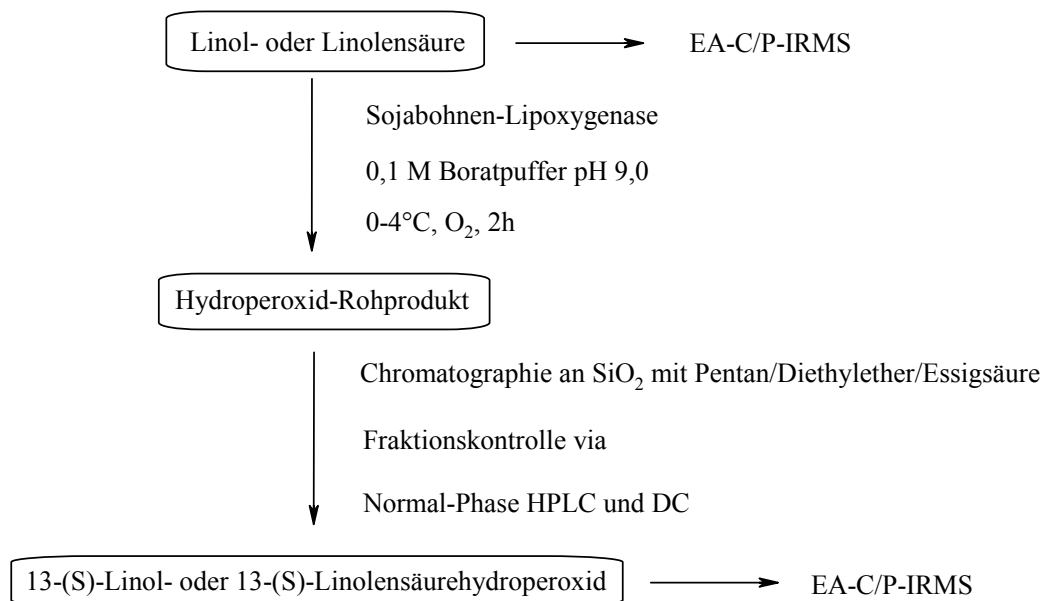


Abb. 14: Arbeitsschema zur Darstellung von 13-(S)-Linol- (13-HPOD) und 13(S)-Linolensäurehydroperoxid (13-HPOT) sowie zur Ermittlung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von Linol-, Linolensäure und 13-HPO(D)T mittels EA-C/P-IRMS.

Die Bestimmung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von Linol-, Linolensäure sowie 13-HPO(D)T erfolgte im Rahmen der Überprüfung des linearen Messbereichs der jeweiligen Verbindungen, was ein gängiges Verfahren bei der $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenverhältnismessung darstellt (Ruff, 2001; Hör, 2001). Zu diesem Zweck wurden die Fettsäuren Linol- und Linolensäure im Volumenbereich von 0,25-1,5 μl (Linolensäure) bzw. 0,25-2,0 μl (Linolensäure) im Elementaranalysator pyrolysiert, womit jeweils der gesamte Messbereich abgedeckt werden konnte. Über die Korrelation der eingesetzten Volumina bzw. der resultierenden massenspektrometrischen Signalflächen mit den ermittelten $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten kann der lineare Messbereich ermittelt werden. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der Bestimmung des linearen Messbereichs von Linolensäure, Abbildung 16 entsprechend für Linolensäure. Es wurde in diesem Fall die Korrelation von resultierender massenspektrometrischer Signalfläche mit den ermittelten $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten gewählt, da bei der Pipettierung der viskosen Substanzen naturgemäß Schwankungen auftraten. Mit Hilfe der grafischen Darstellung läßt sich erkennen, dass sich Linolensäure über den gesamten Messbereich hin linear verhält, wie dies auch bei der elementaranalytischen $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenverhältnismessung üblicherweise der Fall ist (siehe Kap. 2.4.1). Auf diese Art ist für die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Linolensäure ein $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von $-221 \pm 4\%$ ermittelt worden.

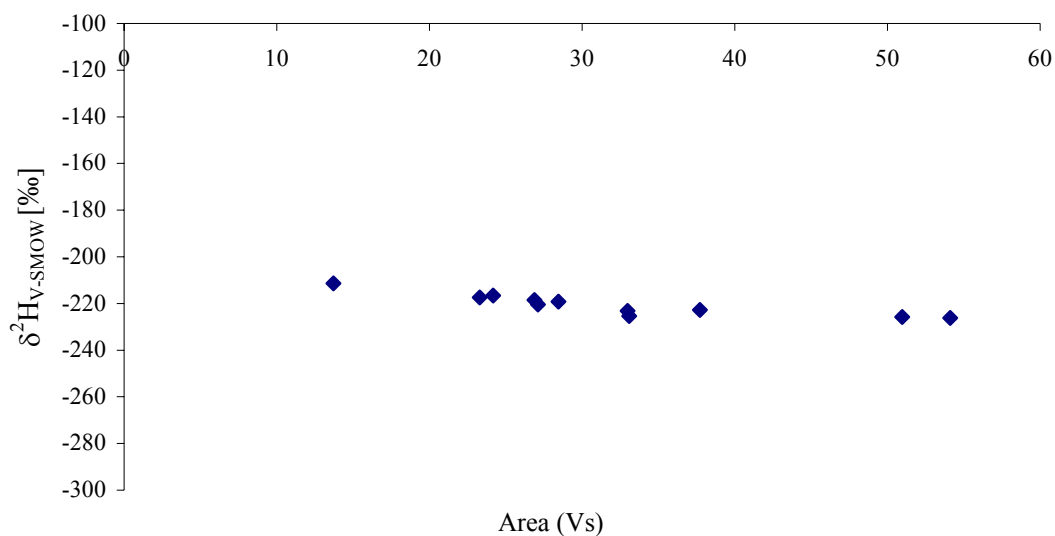


Abb. 15: Überprüfung des linearen Messbereichs zur $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Bestimmung von Linolsäure.

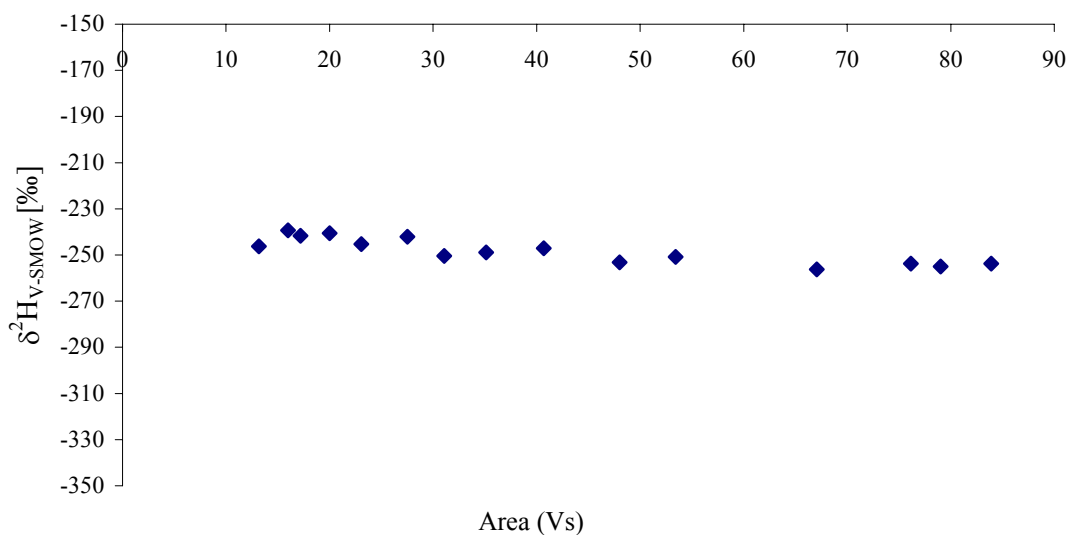


Abb. 16: Überprüfung des linearen Messbereichs zur $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Bestimmung von Linolensäure.

Auch bei Linolensäure lässt sich anhand der grafischen Darstellung (Abb. 16) erkennen, dass hier der Linearitätsbereich über den gesamten Messbereich verläuft. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Linolensäure konnte so ein $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von $-248 \pm 5\text{‰}$ ermittelt werden. Eine Zusammenfassung der mittels EA-C/P-IRMS ermittelten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von Fettsäuren und enzymatisch gebildeten 13-HPO(D)T gibt Tabelle 3.

Tab. 3: Übersicht über die im Verlauf der Sojabohnen-Lipoxygenase katalysierten Dioxygenierung von Linol- und Linolensäure ermittelten $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse

Verbindung	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰]
Linolsäure	-221 ± 4 (n = 11) ^{a)}	$-29,2 \pm 0,1$ (n = 5)
13-(S)-Linolsäurehydroperoxid	-193 ± 4 (n = 19) ^{b)}	$-29,0 \pm 0,2$ (n = 6)
Linolsäure Blindwert	-213 ± 3 (n = 6)	$-29,3 \pm 0,2$ (n = 6)
Linolensäure	-248 ± 5 (n = 15)	$-29,7 \pm 0,1$ (n = 6)
13-(S)-Linolensäurehydroperoxid	-213 ± 3 (n = 6)	$-29,8 \pm 0,1$ (n = 6)
Linolensäure Blindwert	-244 ± 4 (n = 6)	$-29,6 \pm 0,1$ (n = 6)

^{a)} n = Probenanzahl für die Analyse mittels EA-C/P-IRMS

^{b)} Für die Überprüfung auf mögliche Isotopenfraktionierungen im Rahmen der chromatographischen Aufreinigung wurden mehrere der erhaltenen Fraktionen individuell analysiert

Wie aus den in Tabelle 3 oben dargestellten Daten ersichtlich ist, führt die Lipoxygenase-katalysierte Dioxygenierung von Linol- und Linolensäure zu einer Deuteriumanreicherung von 20-30‰ innerhalb der gebildeten Fettsäurehydroperoxide, wohingegen die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte praktisch unverändert bleiben. Der beobachtete Effekt der Deuterium-Anreicherung lässt sich nicht allein über mögliche Austauschreaktionen zufriedenstellend erklären, sondern ist wohl auch weiteren Ursachen zuzuschreiben. Mögliche Austauschreaktionen oder Isotopendiskriminierungen während der präparativen Darstellung lassen sich gut anhand der analysierten Blindwerte beurteilen. Die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Blindwerte für Linol- und Linolensäure bei identischer Präparation ohne Enzym zeigen eine Deuterium-Anreicherung von 8‰ bzw. 4‰ und bewegen sich somit im Rahmen der allgemeinen Messgenauigkeit. Dies zeigt weiterhin, dass sich der stattfindende Wasserstoffaustausch an der Carboxylgruppe während der präparativen Darstellung der Fettsäurehydroperoxide angesichts der Mehrzahl an nicht-austauschbaren Wasserstoffatomen nicht bemerkbar macht. Folglich erschließt sich für die gebildeten Hydroperoxide, dass das zusätzlich an der Peroxyfunktion eingeführte und Austausch unterliegende Wasserstoffatom, auch gemeinsam mit der austauschenden Carboxylfunktion, nicht ausreichend genug ist, um die beobachteten Anreicherungen alleine zu erklären. Für eine mögliche Erklärung der beobachteten Deuteriumanreicherungen kann der bereits bekannte und gut dokumentierte, große kinetische Isotopeneffekt der Sojabohnen-Lipoxygenase dienlich sein. So beobachteten Hwang und Grissom (1994) anhand von Substratstudien mit Sojabohnen-Lipoxygenase und $[11,11\text{-}^2\text{H}_2]$ -Linolsäure sowie Glickmann und Klinman (1995) mit $[^2\text{H}_{31}]$ -Linolsäure einen sehr großen kinetischen Isotopeneffekt bei der Abstrak-

tion des allylständigen Protons während der enzymatischen Katalyse, mit der Bevorzugung für ¹H. Da kinetische Isotopeneffekte bei enzymkatalysierten Reaktionen vor allem bei nicht-quantitativen Umsetzungen in Erscheinung treten (Schmidt et al., 2003a), kann dies auch die hier beobachteten Unterschiede bei der Anreicherung von 13-HPOD und 13-HPOT erklären. Während die Umsetzung von Linolsäure eine Ausbeute von etwa 90% an 13-HPOD erbrachte, wurde bei der Umsetzung von Linolensäure lediglich etwa 60% an 13-HPOT gebildet, mit deutlichen Anteilen an 9-HPOT sowie Spuren nicht umgesetzter Linolensäure. Parallel konnte bei 13-HPOD eine Deuteriumanreicherung von etwa 20‰, sowie bei 13-HPOT eine größere Deuteriumanreicherung von etwa 30‰ beobachtet werden, was auch im Einklang mit dem bereits beschriebenen kinetischen Isotopeneffekt sowie den jeweiligen Umsatzraten steht. Abbildung 17 zeigt zusammenfassend die beobachteten Isotopenveränderungen während der Lipoxygenase-katalysierten Dioxygenierung von Linol- und Linolensäure. In weiterführenden Studien wäre es hier sicherlich interessant herauszufinden, inwieweit sich die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 13-HPO(D)T in Abhängigkeit von den gebildeten Mengen unterscheiden, vor allem auch im Rahmen der Bildung der regioisomeren 9-HPO(D)T, da sich hier im Gegensatz zu den 13-Hydroperoxiden das C-Atom der H-Abstraktion auch in den aromawirksamen Alkenalen und Alkenolen wiederfindet.

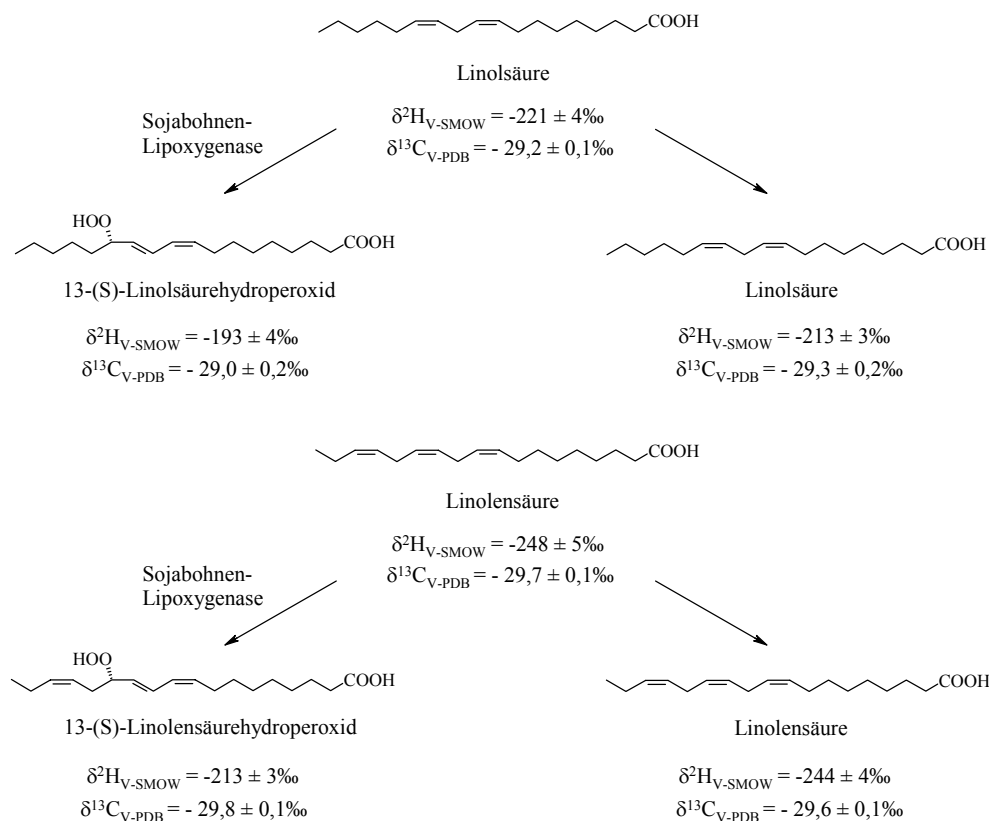


Abb. 17: Schematische Darstellung der beobachteten Isotopenveränderungen während der Lipoxygenase-katalysierten Dioxygenierung von Linol- und Linolensäure zu 13-(S)-Linol- und 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid sowie der entsprechenden Isotopenwerte für die Blindversuche ohne Enzym. Daten stellen je Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

3.2 $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung bei der enzymatischen und chemischen Spaltung von 13-HPOD

In der folgenden Studie sollte zunächst untersucht werden, welche $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte das enzymatisch mittels Hydroperoxidlyase freigesetzte Hexanal aufweist und ob sich diese Werte von denen des auf chemischen Wege freigesetzten Hexanals unterscheiden. Dies ist insofern von Bedeutung, als im Falle einer chemischen Spaltung von Fettsäurehydroperoxiden die resultierenden Alkenale von Rechtswegen her nicht mehr als „natürlich“ bezeichnet werden dürfen, sondern dies lediglich im Falle einer enzymatischen bzw. mikrobiologischen Methode zulässig ist (siehe Kap. 2.4.3.1). Ob bereits die thermische Zersetzung von Fettsäurehydroperoxiden einer chemischen Methode gleichkommt, oder aber diese noch zu den „natürlichen“ Prozessen, beispielsweise im Rahmen einer Destillation (Kerler et al., 2005), gezählt werden kann, ist sicherlich eine interessante Fragestellung.

Für die enzymatische Hydroperoxidlyase-katalysierte Spaltung der Fettsäurehydroperoxide galt es zunächst, eine aktive Proteinfraction frei von endogen gebildeten „Grünnoten“ zu gewinnen, da bei deren Vorliegen unter Umständen die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der aus dem 13-HPO(D)T gebildeten Aldehyde verfälscht werden konnten. Zu diesem Zweck sollte das Protein aus einem Pflanzen-Rohextrakt mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ präzipitiert werden sowie nach Wiederaufnahme in einem Puffer ausreichende Hydroperoxidlyase-Aktivität ohne endogen vorliegende C_6 -Aldehyde zur Verfügung stehen. Dies konnte anhand einer Proteinfraction aus Lauch (*Allium porrum* L.) realisiert werden. Abbildung 18 a) zeigt dazu beispielhaft ein HRGC-MS-Chromatogramm, welches die Abwesenheit von endogenen C_6 -Alkenalen aus dem Lauch dokumentiert. Es konnten lediglich Spuren an C_5 - und nicht näher qualifizierten Thioverbindungen nachgewiesen werden. In Abbildung 18 c) ist des weiteren ein Chromatogramm der Umsetzung der aktiven Proteinfraction mit 13-HPOD abgebildet. Abb. 18 b) zeigt den entsprechenden Blindwert ohne Enzym.

Für die chemische Spaltung wurde die Umsetzung der Fettsäurehydroperoxide in Diethylether mit Bortrifluorid nach Gardner und Plattner gewählt (1984), als Modell für die rein thermische Zersetzung die Spaltung an Bentonit in einem geschlossenen Glasröhrchen bei 120°C nach Kimoto und Gaddis (1969). Die genannten Methoden wurden gewählt, da sie hohe Produktkonzentrationen bei möglichst wenig Nebenreaktionen in Aussicht stellten. Abbildung 19 zeigt die beiden HRGC-MS-Chromatogramme der chemischen Umsetzungen.

Die so gewonnenen Hexanale wurden mittels HRGC-C/P-IRMS auf ihre $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte untersucht, Abbildung 20 zeigt zusammenfassend die hierbei erhaltenen Ergebnisse. Bei der Betrachtung der resultierenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von Hexanal zeichneten sich dabei deutliche Gemeinsamkeiten heraus.

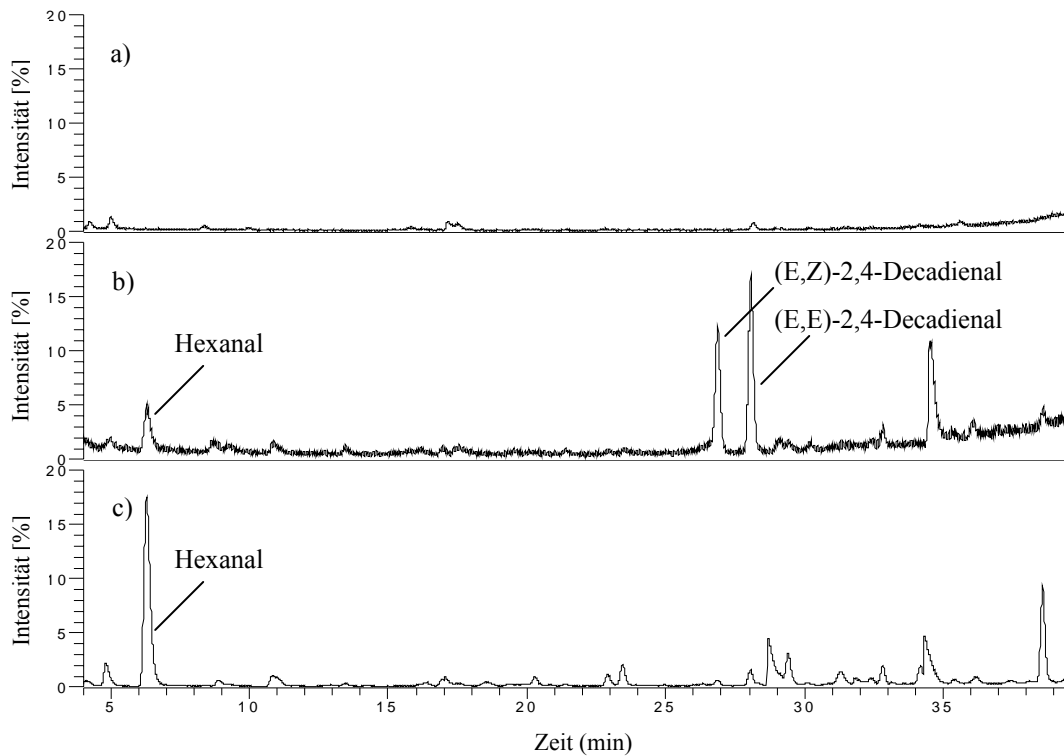


Abb. 18: Vergleich der HRGC-MS-Totalionen chromatogramme der enzymatischen Umsetzung des 13-HPOD-Rohprodukts mit einem Hydroperoxidlyase-aktiven Proteinpräzipitat aus Lauch.

- a) Diethylether-Extrakt des in Puffer aufgenommenen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Proteinpräzipitats aus Lauch
- b) Blindwert der Umsetzung von 13-HPOD ohne Proteinfraction (die gezeigten 2,4-Decadienale sind auf thermische Zersetzung von 13-HPOD im Injektorblock zurückzuführen)
- c) Umsetzung von 13-HPOD mit Proteinfraction

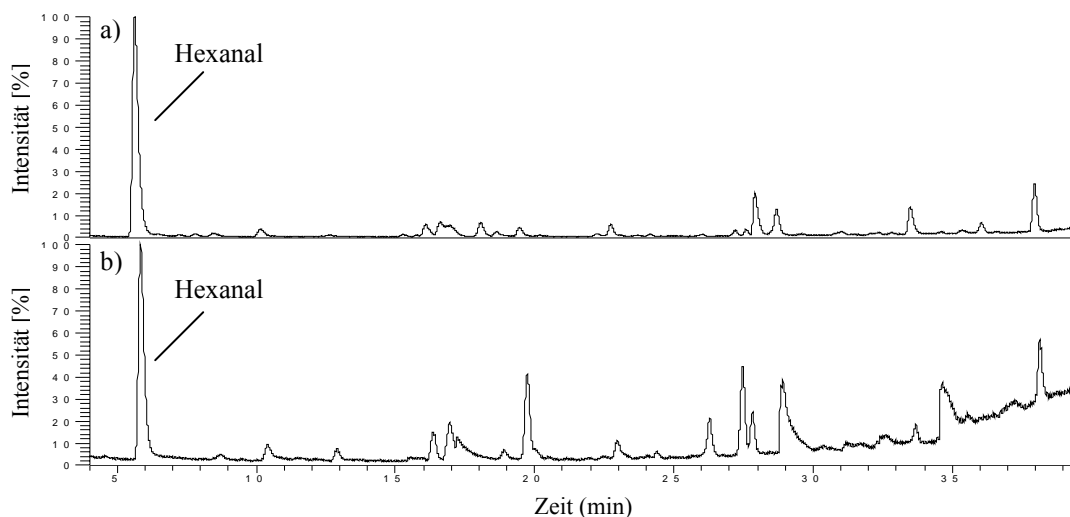


Abb. 19: HRGC-MS-Totalionen chromatogramme der chemischen Umsetzung von 13-HPOD

- a) Spaltung mit Bortrifluorid
- b) Thermische Zersetzung an Bentonit in geschlossenem Glasröhrchen

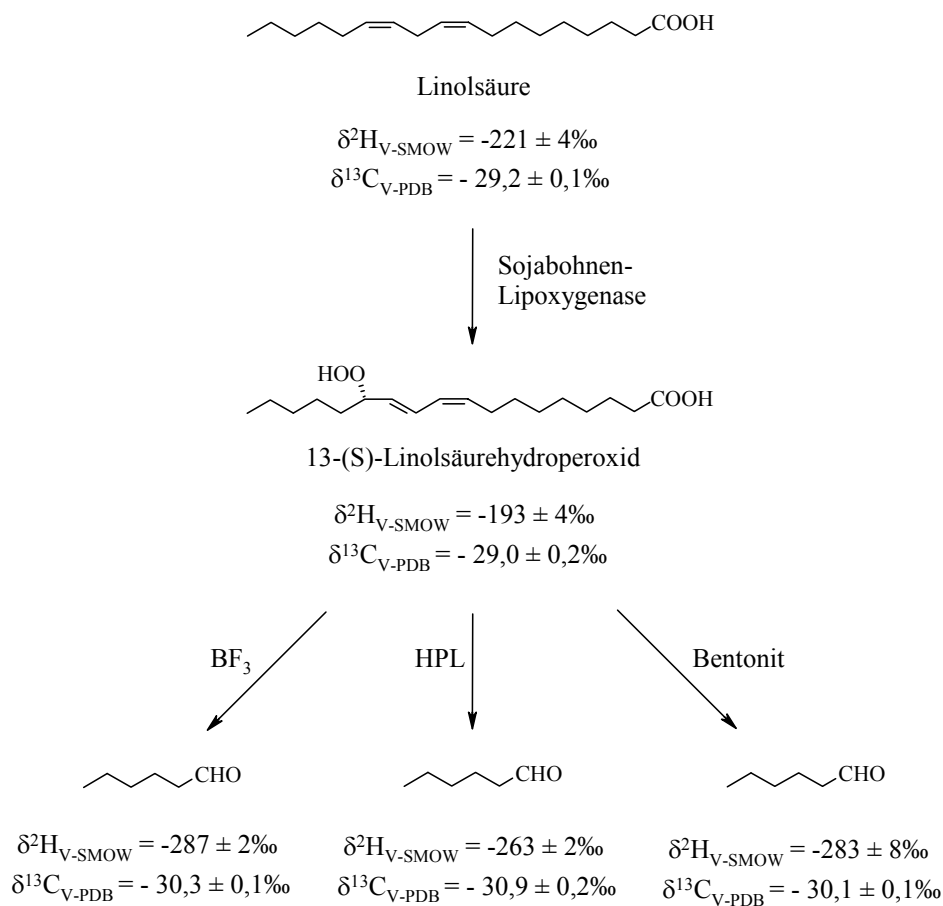


Abb. 20: Übersicht über die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von Hexanal aus der enzymatischen und chemischen Spaltung von 13-HPOD. Daten stellen je Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

Das nach allen drei beschriebenen Methoden abgespaltete Hexanal zeigte im Vergleich zum Intermediat 13-HPOD als auch zum Edukt Linolsäure eine deutliche Abreicherung im $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert sowie auch eine signifikante Abreicherung im $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert. Die Begründung ist hier vor allem in der nicht-statistischen intramolekularen Isotopenverteilung zu finden, welche für Deuterium anhand von SNIF-NMR[®] Untersuchungen für eine Reihe von Fettsäuren bekannt ist und eine unterschiedlich stark ausgeprägte Deuteriumabreicherung am Kettenende von Fettsäuren aufweist (Billault et al., 2001; Billault et al., 2005). Die Ursache für diese nicht-statistische $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverteilung kann zufriedenstellend mit Isotopendiskriminierungen im Rahmen der Kettenelongation, der Quelle für Acetyl-CoA, der unterschiedlichen Enzymaktivitäten beim Einbau verschiedener Wasserstoffatome sowie der kinetischen Fraktionierung durch die Desaturasen und Enoylreduktasen erklärt werden (Schmidt et al., 2003a). Wie hier gezeigt werden konnte, bleibt diese „Information“ auch bei der enzymatischen Freisetzung von Hexanal aus Linolsäure über das 13-HPOD erhalten.

Gegenüber den chemischen Spaltungen von 13-HPOD zeigt das Hexanal aus der enzymatischen Spaltung eine Deuteriumanreicherung von $\sim +20\%$, was jedoch nur schwer über mögliche enzymatische Isotopendiskriminierungen erklärt werden kann. Vielmehr scheint es hier im Gegensatz zu den in aprotischen Medien durchgeführten chemischen Spaltungen zu einer Äquilibration mit dem Reaktionsmedium Wasser gekommen zu sein. Wie jedes Keton oder Aldehyd unterliegt Hexanal der Keto-Enol-Tautomerie, und kann darüber an C-2 mit dem umliegenden Medium austauschen. Analog berichten Sessions et al. (2002) und Chikaraishi et al. (2004) von einem potentiellen Wasserstoffaustausch der acetogenen n-Alkylipide mit dem umgebenden Wasser durch Keto-Enol-Tautomerie im Rahmen ihrer Biosynthese, was letztlich zu den unterschiedlichen Deuteriumgehalten von n-Alkylipiden und Isoprenoiden führen soll. Da das verwendete Wasser hier einen durchschnittlichen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von -60% aufweist, kann so die beobachtete Deuteriumanreicherung zufriedenstellend erklärt werden. Zusammenfassend muss jedoch auch gesagt werden, dass anhand der für Hexanal ermittelten Werte keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen chemischer und enzymatischer Spaltung gegeben ist, da der beobachtete Unterschied im $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert zu klein im Sinne einer analytischen Relevanz ist.

3.3 $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung bei der enzymatischen und chemischen Spaltung von 13-HPOT

Entsprechend der zuvor durchgeführten Studie sollten die Untersuchungen bezüglich der $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung während des enzymatischen Abbaus von 13-HPOD auch auf das 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid ausgedehnt werden, welches ebenfalls bereits mittels EA-C/P-IRMS analysiert werden konnte (siehe Kap. 3.1). Auch hier sollte der Abbau daneben auf chemischen Weg durchgeführt und analysiert werden, um gegebenenfalls anhand der resultierenden $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte Aussagen bezüglich der verwendeten Spaltmethode zu treffen. Entsprechend Angaben im Kap. 3.2 erfolgten die enzymatische Umsetzung mit dem Proteinpräzipitat aus Lauch (*Allium porrum* L.) sowie die chemischen Spaltungen mittels Bortrifluorid in Diethylether und thermisch an Bentonit in einem geschlossenen Gefäß. Abbildung 21 zeigt ein repräsentatives HRGC-MS-Chromatogramm der enzymatischen Spaltung sowie den entsprechenden Blindwert.

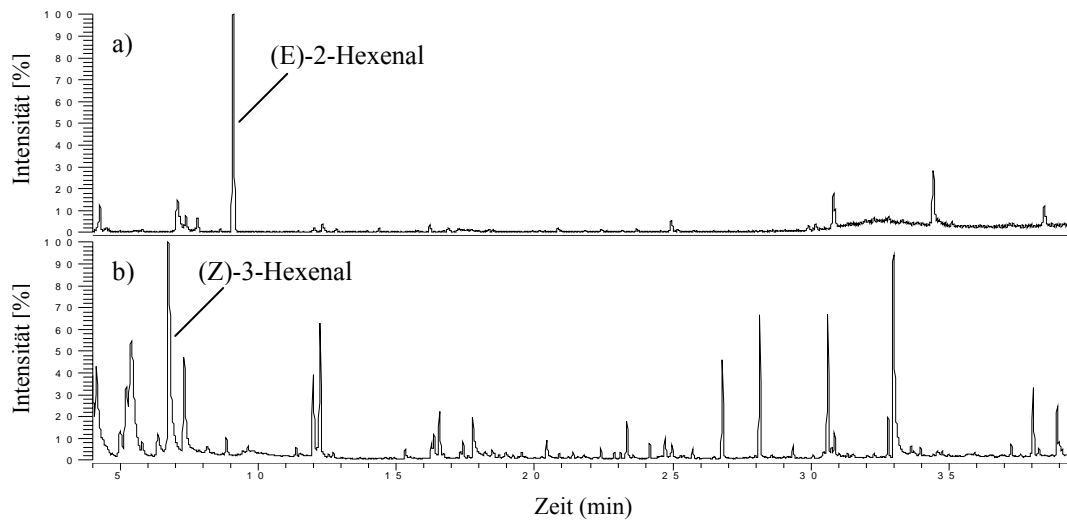


Abb. 21: HRGC-MS-Totalionen chromatogramme der enzymatischen Umsetzung von 13-HPOT mit einem Hydroperoxidlyase-aktiven Proteinpräzipitat aus Lauch.

- a) Isoliertes 13-HPOT mit thermisch inaktiver Proteinfraktion
 b) 13-HPOT-Rohprodukt mit HPL-aktiver Proteinfraktion

Die chemische Umsetzung von 13-HPOT mit Bortrifluorid in Diethylether erbrachte im Gegensatz zu der von Gardner und Plattner (1984) beschriebenen ausschließlichen Bildung von (E)-2-Hexenal bei unseren Versuchen äquimolare Mengen von (Z)-3- und (E)-2-Hexenal (Abb. 22 a), wobei diese Differenz auf den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen beruhen dürfte. Die thermische Spaltung an Bentonit (Abb. 22 b) lieferte dagegen praktisch ausschließlich das isomere (E)-2-Hexenal.

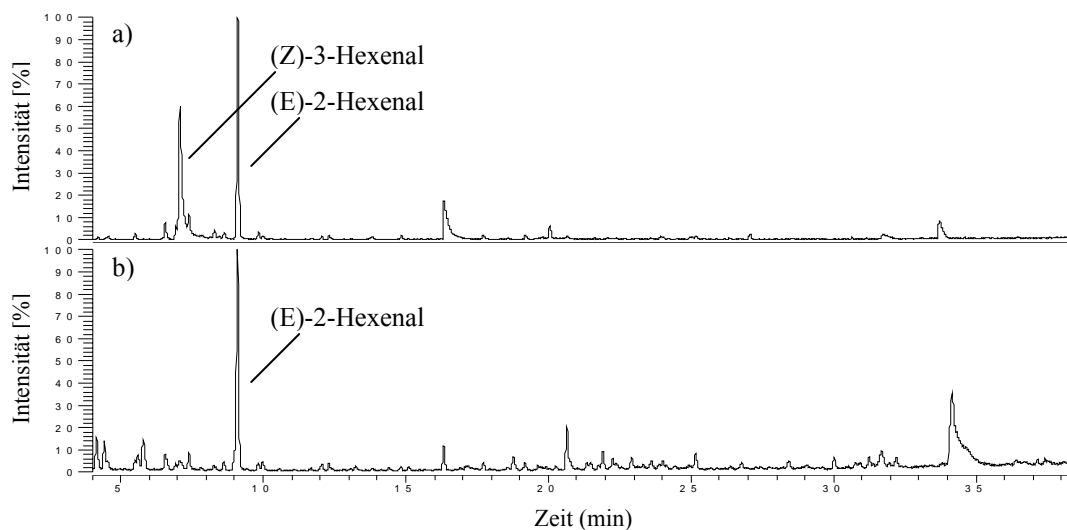


Abb. 22: HRGC-MS-Totalionen chromatogramme der chemischen Umsetzung von 13-HPOT.

- a) Isoliertes 13-HPOT mit Bortrifluorid in Diethylether
 b) Thermische Spaltung des 13-HPOT-Rohprodukts an Bentonit in geschlossenem Glasröhrchen

Die nach den beschriebenen Methoden gewonnenen isomeren Hexenale wurden mittels HRGC-C/P-IRMS auf ihre $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte hin untersucht, Abbildung 23 zeigt zusammenfassend die hierbei erhaltenen Ergebnisse. Bei der Betrachtung der Ergebnisse zeigten sich sowohl Ähnlichkeiten mit den bereits zuvor angestellten Untersuchungen an 13-HPOD, als auch bemerkenswerte Besonderheiten, die wohl der Natur des primären Spaltprodukts (Z)-3-Hexenal zuzuschreiben sind. Die enzymatische Spaltung von 13-HPOT erbrachte ein (Z)-3-Hexenal, welches mit einem $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von $-286 \pm 6\text{‰}$ ebenso wie das enzymatisch gebildete Hexenal aus 13-HPOD in ^2H gegenüber seinem Edukt Linolensäure abgereichert war und somit die bereits beobachteten Tendenzen beim Fettsäureaufbau widerspiegelte (siehe 3.2). Anhand eines Vergleichs mit positionsspezifischen SNIF-NMR[®] Deuteriummustern von Linolensäure (Aursand et al., 1997) konnte so gezeigt werden, dass auch hier im Falle der enzymatischen Spaltung von 13-HPOT die „Information“ der nicht-statistischen intramolekularen Deuteriumverteilung von Fettsäuren unverändert weitergegeben wird.

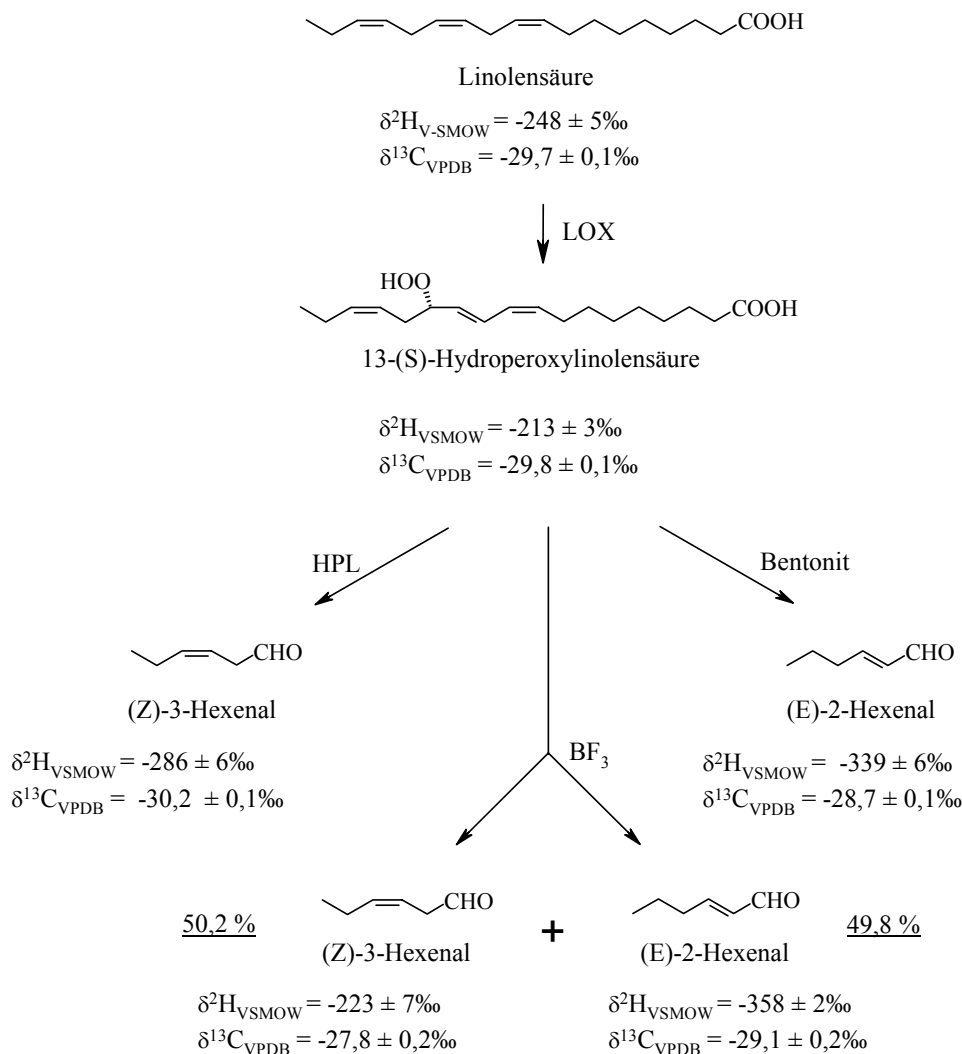


Abb. 23: Übersicht über die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte der Hexenale aus der enzymatischen und chemischen Spaltung von 13-HPOT. Daten stellen je Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

Die Analyse der mittels Bortrifluorid aus 13-HPOT äquimolar gebildeten Spaltprodukte (Z)-3- und (E)-2-Hexenal erbrachte dagegen eine ^2H - und ^{13}C -Isotopendiskriminierung gegenüber (E)-2-Hexenal, wohingegen das nicht-isomerisierte (Z)-3-Hexenal die schwereren Isotope konservierte. Dies kann formal dadurch erklärt werden, dass Atombindungen an schwereren Isotopen in der Regel stabiler sind (siehe Kap. 2.1) und hier zunächst eine Umlagerung der leichteren isotopomeren (Z)-3-Hexenal Moleküle stattgefunden hat. Betrachtet man des weiteren den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Mittelwert der gebildeten Hexenale entsprechend ihrer quantitativen Bildung (siehe Abb. 22 a) und 23) bei der Spaltung mit Bortrifluorid nach

$$(8) [50,2 \times (-223\text{‰}) + 49,8 \times (-358\text{‰})] : 100 = -290\text{‰},$$

so erhält man mit -290‰ einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert für ein theoretisch „nicht-isomerisiertes“ (Z)-3-Hexenal mit sehr guter Übereinstimmung zu dem experimentell für die enzymatische Spaltung vorgefundenen Wert von $-286 \pm 6\text{‰}$. Demgegenüber zeigt die Berechnung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Mittelwerts nach

$$(9) [50,2 \times (-27,8\text{‰}) + 49,8 \times (-29,1\text{‰})] : 100 = -28,4\text{‰}$$

eher eine Übereinstimmung mit dem experimentell bei der thermischen Spaltung an Bentonit ermittelten Wert von $-28,7 \pm 0,1\text{‰}$, bei dem, wie bereits erwähnt, ausschließlich das isomere (E)-2-Hexenal gebildet, aber mit einem $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von $-339 \pm 6\text{‰}$ deutliche Abweichungen aufgezeigt wurden. $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte für das interessante (E)-2-Hexenal aus Pflanzen und Früchten sind aus früheren Studien in unserem Arbeitskreis im Bereich von -219 bis -372‰ bzw. $-31,5$ bis $-40,9\text{‰}$ dokumentiert (Ruff, 2001; Elss et al., 2006), so dass anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden kann, dass es auch im Rahmen der Isomerisierung von (Z)-3-Hexenal zu (E)-2-Hexenal in Pflanzen und Früchten zu einer Deuteriumanreicherung kommt. Hier müssten allerdings erst noch weitere systematische Studien anhand der endogen in den Pflanzen vorhandenen Edukt-Fettsäuren angestellt werden, um letztlich gesicherte Aussagen treffen zu können.

Bezüglich der Authentizitätsbewertung von (E)-2-Hexenal kann jedoch die Feststellung hilfreich sein, dass es im Rahmen der enzymatischen Spaltung von 13-HPOT, wie auch bei derjenigen von 13-HPOD, zu keiner signifikanten Änderung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wertes zwischen Edukten und Produkten kommt. Es konnte hier lediglich eine geringfügige Abreicherung im $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von $0,5$ bis $1,7\text{‰}$ beobachtet werden, deren Ursache jedoch unklar ist. Da biotechnologische Verfahren zur Darstellung aromaaktiver C_6 -Verbindungen Öle bzw. Fettsäuren aus Ölsaaten heranziehen und diese in der Regel $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte um die -28 bis -33‰ aufweisen (Aursand et al., 1997), können $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von (E)-2-Hexenal in diesem Bereich, gekoppelt mit $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten kleiner -300‰ , auf eine biotechnologische Herkunft hinweisen, jedoch nicht ausschließlich nahelegen (Schreier, 2004). Ein ähnliches Phänomen ist von unserer Arbeitsgruppe auch bei der Authentizitätsbewertung von γ - und δ -Decalacton aufgezeigt worden, was die Unterscheidung der natürlichen „ex fruit“ von den synthetischen und biotechnologischen Verbindungen betrifft (Tamura et al., 2005).

3.4 ²H/¹H- und ¹³C/¹²C-Isotopenfraktionierung bei der durch *S. cerevisiae* katalysierten Reduktion von C₆-Aldehyden zu C₆-Alkoholen

In den folgenden Untersuchungen sollte anhand der Alkohol-Dehydrogenase-(ADH) katalysierten Reduktion von C₆-Aldehyden mit *Saccharomyces cerevisiae* untersucht werden, inwieweit und mit welchem Ausmaß sich dieser Reduktionsschritt auf die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte der gebildeten C₆-Alkohole auswirkt. Es sollten hierbei zum einen Informationen über die Isotopenfraktionierung im Rahmen der biotechnologischen „Grünnoten“-Produktion gewonnen (Muller et al., 1995) sowie grundlegenden Fragestellungen bezüglich des Hydrid-Transfers während der Reduktion von C₆-Aldehyden nachgegangen werden. In der Literatur wird generell auf die Übertragung von stark ²H-abgereicherten Wasserstoffatomen in biologischen Systemen hingewiesen (Schmidt et al., 2007; Schmidt et al. 2003a), allerdings zeigten Untersuchungen von Hör et al. (2001), dass bei dem gleichzeitigen Vorliegen von (E)-2-Hexenal und (E)-2-Hexenol in unterschiedlichen Pflanzenproben der Alkohol durchschnittlich um 35-45% in Deuterium gegenüber seinem Vorläufer angereichert ist. In Blättern stieg dieser Unterschied sogar auf durchschnittlich 85%, jedoch konnten die genannten Autoren hierfür keine mögliche Erklärung geben. Um hier weitergehende Informationen zu erhalten, sollten in der vorliegenden Arbeit zum einen die enzymatisch aus den Fettsäuren gewonnenen Aldehyde weiter zu den korrespondierenden Alkoholen umgesetzt, als auch Studien mit konventionell erhältlichen Aldehyden unterschiedlicher Isotopensignatur durchgeführt werden.

3.4.1 ²H/¹H- und ¹³C/¹²C-Isotopenfraktionierung bei der durch *S. cerevisiae* katalysierten Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol

3.4.1.1 Fermentative Reduktion von Hexanal aus 13-HPOD

Für die fermentative Reduktion von Hexanal wurde zunächst in Vorversuchen ein kommerzielles und als „natürlich“ deklariertes Hexanal bei pH 4,0 und pH 7,0 mit der Trockenreinzuchtheife Fermivin[®] zu dem entsprechenden Alkohol 1-Hexanol reduziert. Die hierbei ermittelten $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte zeigten, wie auch bei einer entsprechenden Umsetzung von (E)-2-Hexenal, keine pH-abhängigen Unterschiede, so dass alle nachfolgenden Umsetzungen bei der schneller verlaufenden fermentativen Reduktion bei pH 4,0 durchgeführt wurden. Für die Reduktion des enzymatisch aus 13-HPOD gebildeten Hexanals wurde dieses nach HRGC-C/P-IRMS Analyse direkt für die weitere Reduktion eingesetzt. Abbildung 24 zeigt ein repräsentatives HRGC-MS-Chromatogramm nach der fermentativen Umsetzung der in Abb. 18 c) dargestellten Enzymkatalyse von 13-HPOD mit HPL (aus Lauch), sowie die dabei ermittelten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 1-Hexanol.

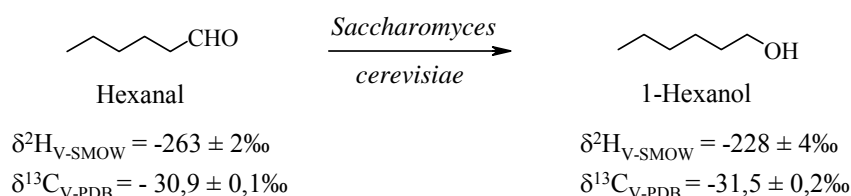
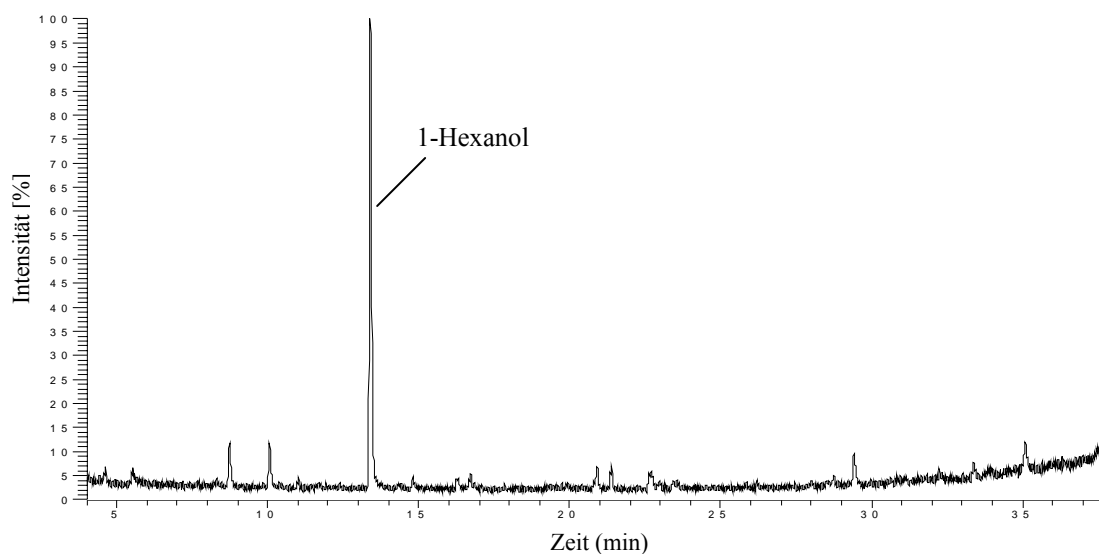


Abb. 24: HRGC-MS Totalionenchromatogramm der fermentativen Reduktion von enzymatisch aus Linolsäure über 13-HPOD dargestelltem Hexanal (siehe Abb. 18c) zu 1-Hexanol sowie die jeweils bestimmten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte für Hexanal und 1-Hexanol.

3.4.1.2 Modellstudien zur fermentativen Reduktion von Hexanal

In zusätzlichen Modellstudien sollte die fermentative Reduktion auf weitere Hexanale ausgedehnt werden, da hier zusätzliche Substrate über einen breiten Isotopenbereich umgesetzt werden konnten. Zu diesem Zweck wurden zwei kommerzielle Hexanal-Proben mit unterschiedlichen Isotopenwerten in 20%-Stufen vermischt und dadurch Hexanale mit definierten Isotopenwerten „generiert“. Zur Anwendung kamen dabei ein synthetisches Hexanal mit $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -24,6 \pm 0,1\text{‰}$ (EA) und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -50 \pm 2\text{‰}$ (EA) sowie ein als „natürlich“ deklariertes Hexanal mit $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -33,6 \pm 0,1\text{‰}$ (EA) und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -243 \pm 3\text{‰}$ (EA). Diese Proben wurden fermentativ mit Hefe reduziert und parallele Blindwerte ohne Hefe angesetzt. Wiederfindungs-Ansätze mit sechs „Grünnoten“-Standards schlossen eine Isotopenfraktionierung im Rahmen der Probenaufarbeitung aus (siehe Anhang). Die Analyse der Blindwerte als auch der korrespondierenden Hefe-Umsetzung erfolgte mittels HRGC-C/P-IRMS unter Wahrung der linearen Messbereiche der individuellen Verbindungen (siehe Anhang). Bis auf das verwendete Wasser wurden dabei grundsätzlich dieselben Reagenzien sowie identische Reaktionsbeding-

ungen verwendet. In Tabelle 4 sind die dabei ermittelten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte, in Tabelle 5 die entsprechenden $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte zusammengestellt.

Tab. 4: Bei der fermentativen Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol ermittelte $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte

Anteil Hexanal ^{a)}		Hexanal	Hexanal	1-Hexanol
		$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰] ^{c)}	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰] ^{c)}
		(berechnet) ^{b)}	(Blindwert)	
synthetisch	natürlich			
100%	0%	-24,6	-24,4 ± 0,1	-24,9 ± 0,1
80%	20%	-26,5	-26,4 ± 0,2	-26,2 ± 0,2
60%	40%	-28,3	-28,1 ± 0,1	-27,8 ± 0,4
40%	60%	-30,2	-29,5 ± 0,1	-30,3 ± 0,4
20%	80%	-31,8	-31,9 ± 0,1	-31,1 ± 0,2
0%	100%	-33,6	-33,6 ± 0,1	-33,0 ± 0,1

^a $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (synthetisch) = -24,6 ± 0,1‰ (EA); $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (natürlich) = -33,6 ± 0,1‰ (EA)

^b die Berechnung der jeweiligen Isotopenwerte dient als Orientierung sowie dem Vergleich mit dem analysierten Blindwert, die Berechnung erfolgt anhand der EA-Werte nach:

$$[(\text{Anteil Hexanal synthetisch}) \times (-24,6\text{‰}) + (\text{Anteil Hexanal natürlich}) \times (-33,6\text{‰})] : 100$$

^c Mittelwerte von Mehrfachmessungen sowie die dabei ermittelte Standardabweichung

Anhand der in Tabelle 4 aufgeführten Daten ist gut zu erkennen, dass es im Rahmen der fermentativen Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol zu keinen signifikanten Veränderungen im $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert gekommen ist, wie dies auch bereits bei der Hefereduktion des enzymatisch aus 13-HPOD gebildeten Hexanals (siehe Abb. 24) beobachtet wurde. Die parallel durchgeführten Blindwerte bestätigen über ihre $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte (Tab. 5) die theoretische Vorbetrachtung und zeigen, dass im Rahmen der Probenvorbereitung mit keinen größeren Abweichungen gerechnet werden muss. Bei der Betrachtung der in Tabelle 5 zusammengestellten Daten kann ferner festgestellt werden, dass es in allen Fällen der durchgeführten Reduktionen von Hexanal zu 1-Hexanol zu einer durchgehenden Anreicherung im $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert gekommen ist, wobei jedoch diese Anreicherungen unterschiedliche Ausmaße je nach dem zuvor vorliegenden $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von Hexanal annehmen. Da es sich hier um praktisch quantitative Umsetzungen handelt, können weitere Überlegungen bezüglich der beobachteten Anreicherungs-Differenzen angestellt werden. Für diese Beurteilung bietet sich die Korrelation der beobachteten Anreicherungs-Differenzen mit den jeweiligen Blindwerten an, Abbildung 25 zeigt diese Gegenüberstellung.

Tab. 5: Bei der fermentativen Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol ermittelte $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte

Anteil Hexanal ^{a)}		Hexanal $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰] (berechnet) ^{b)}	Hexanal $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰] ^{c)} (Blindwert)	1-Hexanol $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰] ^{c)}	Beobachtete Anreicherung ^{d)}
synthetisch	natürlich				
100%	0%	-50	-64 ± 5	-48 ± 1	+16‰
80%	20%	-90	-83 ± 1	-59 ± 1	+24‰
60%	40%	-129	-133 ± 1	-109 ± 1	+24‰
40%	60%	-169	-174 ± 1	-142 ± 1	+32‰
20%	80%	-208	-209 ± 1	-164 ± 1	+45‰
0%	100%	-243	-252 ± 1	-204 ± 1	+48‰

^a $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ (synthetisch) = $-50 \pm 2\text{‰}$ (EA); $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ (natürlich) = $-243 \pm 3\text{‰}$ (EA)

^b die Berechnung der jeweiligen Isotopenwerte dient als Orientierung sowie dem Vergleich mit dem analysierten Blindwert, die Berechnung erfolgt anhand der EA-Werte nach:

$$[(\text{Anteil Hexanal synthetisch}) \times (-50\text{‰}) + (\text{Anteil Hexanal natürlich}) \times (-243\text{‰})] : 100$$

^c Mittelwerte von Mehrfachmessungen sowie die dabei ermittelte Standardabweichung

^d Differenz umgesetztes 1-Hexanol - Blindwert

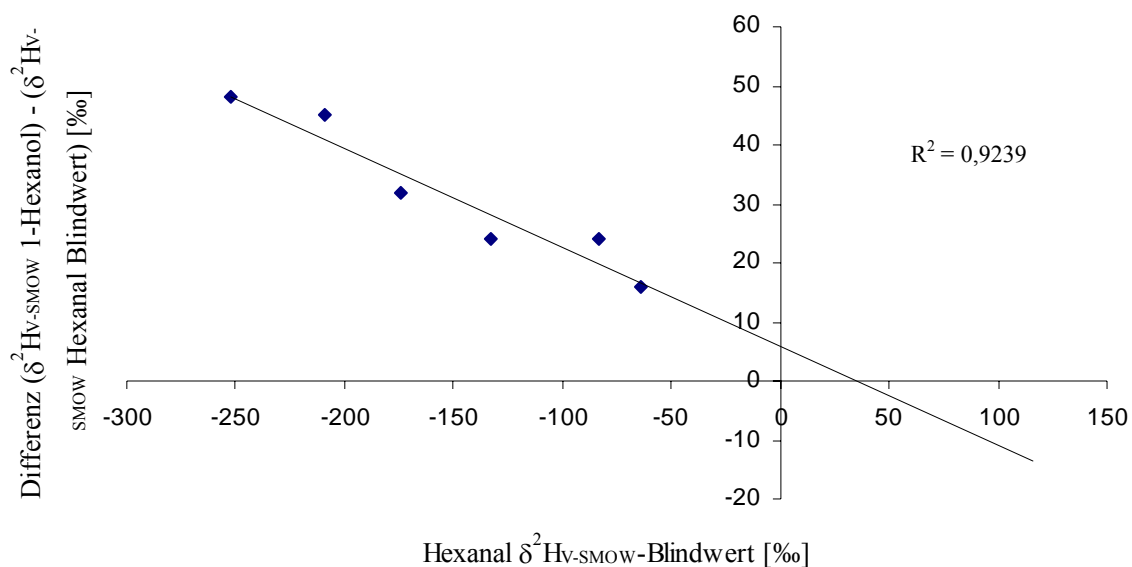


Abb. 25: Fermentative Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol mittels *S. cerevisiae*: Korrelation der beobachteten Deuterium-Anreicherungen in 1-Hexanol zu den jeweiligen Hexanal-Blindwerten (siehe Tab. 5).

Durch die gewählte Gegenüberstellung der Ergebnisse der fermentativen Modellumsetzungen (siehe Tab. 5) lässt sich ein linearer Zusammenhang bei der Hefe-katalysierten Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol zeigen. Dieser lineare Zusammenhang bleibt mit $R^2=0,8905$ auch bei der entsprechenden Gegenüberstellung mit den Werten für 1-Hexanol (siehe Tab. 5) erhalten. Die beobachteten Anreicherungen wurden demnach formal durch die Übertragung von Wasserstoffatomen mit konstant angereichertem $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert verursacht, der sich in Abhängigkeit von dem $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert des als Edukt eingesetzten Hexanals unterschiedlich stark auswirkt. Der Schnittpunkt des in Abbildung 25 dargestellten linearen Verlaufs mit der X-Achse stellt folglich den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert eines Hexanals dar ($\sim +35\%$), bei dem durch die in der Hefereduktion stattfindende Wasserstoffübertragung keine Veränderung mehr beobachtet werden kann, da hier der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert mit dem der übertragenen Wasserstoffatome identisch ist.

3.4.1.3 Fermentative Reduktion von Hexanal in D₂O

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse stellte sich unweigerlich die Frage, wie es zu einer derartigen Anreicherung innerhalb der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte kommen konnte, da einerseits die übliche Lehrmeinung doch von einer generellen Übertragung stark abgereicherter Wasserstoffatome in biologischen Systemen ausgeht (Schmidt et al., 2007; Schmidt et al., 2003a), aber andererseits bereits Hör et al. (2001) von einer Deuteriumanreicherung in (E)-2-Hexenol gegenüber (E)-2-Hexenal berichteten (siehe 3.4.2). Vergleichbare Untersuchungen von Martin et al. (1986) und Zhang et al. (1995 und 2003) im Rahmen von Ethanol- und Milchsäurefermentationen hatten zudem ergeben, dass es dabei zu einem Einbau von Wasserstoffatomen aus dem Wasser an C-1 in Ethanol sowie an C-2 von Milchsäure kommt, was ebenfalls zu einer Anreicherung der Edukt-Moleküle Acetaldehyd und Pyruvat führte.

Für weitergehende Untersuchungen wurde daher ein zusätzliches Experiment durchgeführt, bei dem Hexanal mittels *S. cerevisiae* (im verkleinerten Maßstab) in D₂O umgesetzt und das dabei gebildete 1-Hexanol massenspektrometrisch untersucht wurde. Da das Fragmentierungsverhalten von 1-Hexanol bei 70 eV bereits gut dokumentiert in der Literatur vorliegt (Friedel et al., 1956; Derrick et al., 1973), erhofften wir uns dadurch zusätzliche Informationen, um das Anreicherungsverhalten von Hexanal zu 1-Hexanol während der fermentativen Hefereduktion besser zu beurteilen. Abbildung 26 zeigt die entsprechenden Massenspektren von 1-Hexanol aus der Umsetzung in D₂O sowie H₂O.

Anhand des Vergleichs der Molekülfragmente nach Wasserverlust, $m/z = 84$ und $m/z = 85$, innerhalb der beiden Massenspektren wird deutlich, dass bei der fermentativen Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol in D₂O formal der Einbau eines Wasserstoffatoms aus dem Wasser stattgefunden hat.

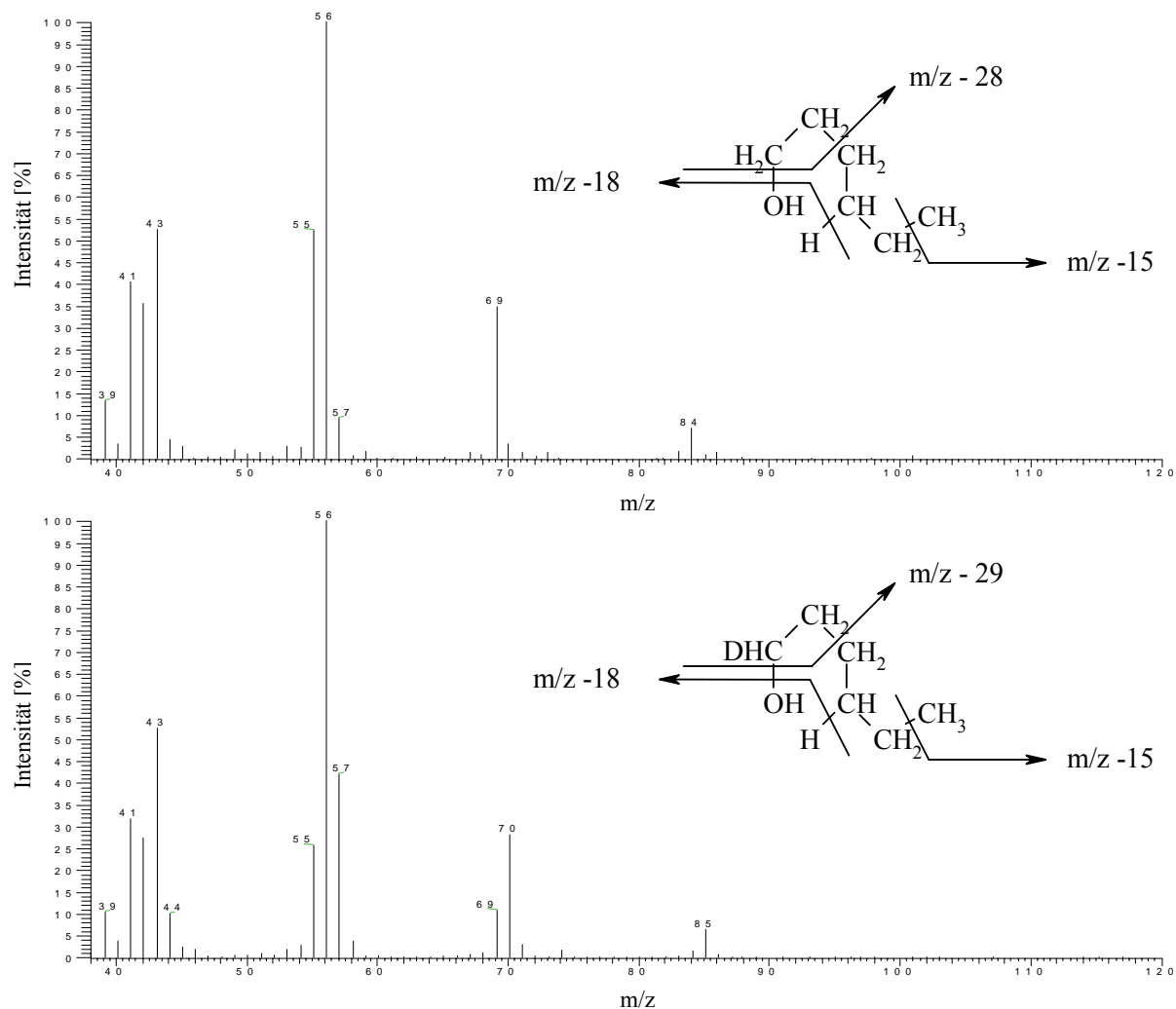


Abb. 26: EI-Massenspektren von 1-Hexanol (70 eV), oben aus der fermentativen Reduktion von Hexanal in H₂O, unten aus der fermentativen Reduktion von Hexanal in D₂O. Fragmentierung von 1-Hexanol nach Friedel et al. (1956) und Derrick et al. (1973).

Die Massenfragmente $m/z = 70$ und $m/z = 56$ im Spektrum des 1-Hexanols aus der Umsetzung in D₂O machen jedoch deutlich, dass als Position des Deuteriumeinbaus C-1 oder C-2 zu nennen ist, da sie hier keine Unterscheidung zulassen, wenngleich von der mechanistischen Betrachtung der Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion (Leskovac et al., 2002) C-1 als Position in Frage kommt. Die Massenspektren können daher dahingehend interpretiert werden, dass zum einen das Hydrid des reduzierten NADH-Cofaktors, wie bereits von Fronza et al. (1995a) beschrieben, mit dem umgebenden Wasser austauscht und somit an C-1 der Einbau von Deuterium erfolgt, oder aber auch der Austausch von Wasserstoffatomen an C-2 von Hexanal durch die Keto-Enol-Tautomerie stattfindet.

Positionsspezifische SNIF-NMR[®] Untersuchungen von Fronza et al. (1996) ergaben als Authentizitätskriterium für 1-Hexanol die Korrelation der Deuteriumgehalte von C-1 mit C-3 bis C-5. Letztere konnten in den Spektren nicht aufgelöst werden. Die genannten Autoren untersuchten jedoch nicht die

Hefe-katalysierte Reduktion von Hexanal, sondern neben chemischen Reduktionsmöglichkeiten von Hexansäure diejenige durch den Pilz *Colletotrichum gloeosporides* (Fronza et al., 1995a). Im Rahmen der mikrobiellen Reduktion von Hexansäure stellten sie dabei fest, dass es sowohl an C-1 als auch C-2 zu einem Einbau von Wasser kommt. Mit Hefe führten Fronza et al. (1996) einen Versuch durch, indem sie über 20 h 1-Hexanol in einem Fermentationsansatz inkubierten. Dabei stellten die Autoren eine Deuteriumanreicherung von 12,6 ppm an Position C-1 fest, was in etwa einem $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von $\sim +80\text{‰}$ entspricht. Dies ist insofern interessant, als dieser Effekt einzig und allein der Alkohol-Dehydrogenase-katalysierten Äquilibrierung mit Wasser über den Aldehyd zuzuschreiben ist, was auch in anderer Weise von Gramatica et al. (1981) bei der Reduktion von perdeuterierten Zimtalkohol-derivaten mit *S. cerevisiae* nachgewiesen wurde. Untersuchungen von Rabiller et al. (1990) und Zhang et al. (2003) zeigten daneben, dass es bei der alkoholischen Gärung zu einem vermehrten Einbau von Deuterium in das (R)-[1-²H₁]-Isotopomer von Ethanol kommt.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten zeigen nun ergänzend, dass es auch bei der fermentativen Reduktion von Hexanal zu einer Deuteriumanreicherung sowie zu einem signifikanten Einbau von Wasser kommt. Da dieses üblicherweise höhere Deuteriumgehalte aufweist und in den hier durchgeführten Studien Wasser mit einem durchschnittlichen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von -60‰ verwendet wurde, lassen sich zumindest teilweise die beobachteten Anreicherungen in den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten erklären. Es konnte ferner gezeigt werden, dass diese Anreicherung unter den gewählten Bedingungen konstant ist und in keiner Abhängigkeit zu den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten der Edukte steht, sich jedoch dementsprechend unterschiedlich stark auswirkt. Dadurch können auch die von Hör et al. (2001) beobachteten Anreicherungen in den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten von (E)-2-Hexenal zu (E)-2-Hexenol erklärt werden, ebenso die beobachtete Differenz der Anreicherung in Früchten ($\sim +45\text{‰}$) gegenüber Blättern ($\sim +85\text{‰}$), da das Wasser von Blättern generell höhere Deuteriumgehalte aufweist als das von Früchten (siehe Kap. 2.2.2). Es ist denkbar, dass die beobachtete Anreicherung durch weitere Faktoren (außer dem Wasser) beeinflusst werden kann, wie etwa der Inkubationszeit oder gar der Kohlenhydratquelle. Es bleibt jedoch die Frage, ob diese Anreicherung durch eine *einmalige* Übertragung angereicherter Wasserstoffatome erfolgt, oder erst *sekundär* im Rahmen der Gleichgewichtsreaktion der ADH sukzessiv erfolgt bzw. welchen Anteil die jeweiligen Prozesse hierbei haben. Kinetische Isotopeneffekte bei der ADH-Reaktion sind in der Literatur zwar bereits mehrfach beschrieben (Blanchard und Wong, 1991), zeigen jedoch deren Bevorzugung für das leichtere ¹H. Daher stellt sich unmittelbar die Frage, welcher Prozess letztendlich zu der beobachteten Anreicherung der Wasserstoffatome aus dem Wasser führt. Potentielle Möglichkeiten ergeben sich hier sicherlich zum einen bei dem Hydridaustausch des NADH-Cofaktors mit dem umgebenden Wasser (Fronza et al., 1995a) sowie *sekundär* im Verlauf der ADH-Äquilibrierung.

Auf die Authentizitätsbewertung von 1-Hexanol mittels HRGC-P/C-IRMS Analytik haben die ermittelten Daten indes keinen Einfluß, wenngleich die Tatsache, dass es im Rahmen der Biogenese von Linolsäure zu 1-Hexanol zu keiner nennenswerten Veränderung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte kommt (siehe Kap. 3.2, 3.4.1.1 und 3.4.1.2), für die Zuordnung biotechnologisch produzierten 1-Hexanols aus Ölsaaten-Fetten sicherlich hilfreich sein kann (vgl. Kap. 3.3). Dazu bietet sich nach wie vor die Korrela-

tion der globalen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte an (Hör, 2001; Elss et al., 2006). Diese sind besonders gut anhand von Äpfeln untersucht und ermöglichen hier eine Unterscheidung von synthetischen, natürlichen „ex fruit“ und „natürlichen“, also biotechnologisch gewonnenen 1-Hexanol-Proben.

Eine Authentizitätsbewertung ermöglichen die charakteristischen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 1-Hexanol aus Äpfeln. Diese sind in der Literatur in den Bereichen von $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -45,8$ bis $-37,3\text{‰}$ sowie $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -176$ bis $+73\text{‰}$ (!) angegeben (Hör, 2001; Elss et al., 2006) und wecken so Zweifel bezüglich der Biogenese aus Fettsäurehydroperoxiden (siehe Kapitel 3.4.1.1 und 3.4.1.2). Bekanntlich können kurzkettige Fettsäuren in Pflanzen auch über die β -Oxidation höherer Homologer oder die *de novo* Synthese aus Acetyl-CoA gebildet werden (Stryer, 1999). Bei Untersuchungen zur Aromastoffbiosynthese in Äpfeln stellte Paillard (1979) fest, das 1-Hexanol vorwiegend über die geradkettigen C₆-C₁₂ Fettsäuren via β -Oxidation gebildet wird, wohingegen der Zusatz von Linolsäure, dem Edukt der Hydroperoxid-Hydroperoxidlyase Kaskade, nur deutlich geringere Mengen an 1-Hexanol zur Folge hatte. Zu den gleichen Ergebnissen kamen u. a. auch Rowan et al. (1999) anhand von Untersuchungen mit perdeutierten Precursormolekülen.

Die Biosynthese von 1-Hexanol in Äpfeln im Rahmen der β -Oxidation kann auch anhand der dokumentierten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte hypothetisch nachvollzogen werden. Demnach führen die Pyruvat-Decarboxylase-Reaktionen während des Fettsäureabbaus zu Acetyl-CoA zu einer zusätzlichen Abreicherung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte gegenüber den bereits abgereicherten Edukt-Fettsäuren (siehe Kap. 2.3.2), der parallele Wasserstoff-Austausch mit dem umliegenden und angereicherten Fruchtwasser (siehe Kap. 2.2.2) bedingt die hohen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte, wie dies auch bereits von Sessions et al. (2002) bei Untersuchungen mit mikrobiell produzierten Fettsäuren nachgewiesen werden konnte. Die extrem angereicherten $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 1-Hexanol bis in den positiven Bereich legen gar die Vermutung nahe, dass hier eine *de novo* Synthese von 1-Hexanol aus dem Acetyl-CoA der β -Oxidation stattfindet, denn nur so bietet sich auch die Möglichkeit eines umfassenden Wasserstoffaustauschs mit dem umliegenden Wasser.

3.4.2 ²H/¹H- und ¹³C/¹²C-Isotopenfraktionierung bei der durch *S. cerevisiae* katalysierten Reduktion von (Z)-3- und (E)-2-Hexenal

3.4.2.1 Fermentative Reduktion von (Z)-3-Hexenal zu (Z)-3-Hexenol

In Erweiterung der Untersuchungen zur fermentativen Reduktion von C₆-Aldehyden wurde auch das aus Linolensäure via 13-HPOT dargestellte (Z)-3-Hexenal nach HRGC-P/C-IRMS Analyse umgesetzt, dergleichen auch eine zur Verfügung stehende und als „natürlich“ deklarierte Referenzverbindung.

Abbildung 27 zeigt ein repräsentatives HRGC-MS-Chromatogramm nach der fermentativen Umsetzung der in Abb. 21 b) dargestellten Enzymkatalyse von 13-HPOT mit HPL (aus Lauch). In Tabelle 6 sind die dabei ermittelten $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von (Z)-3-Hexenal als auch die der entsprechenden Umsetzung der Referenzverbindung gelistet.

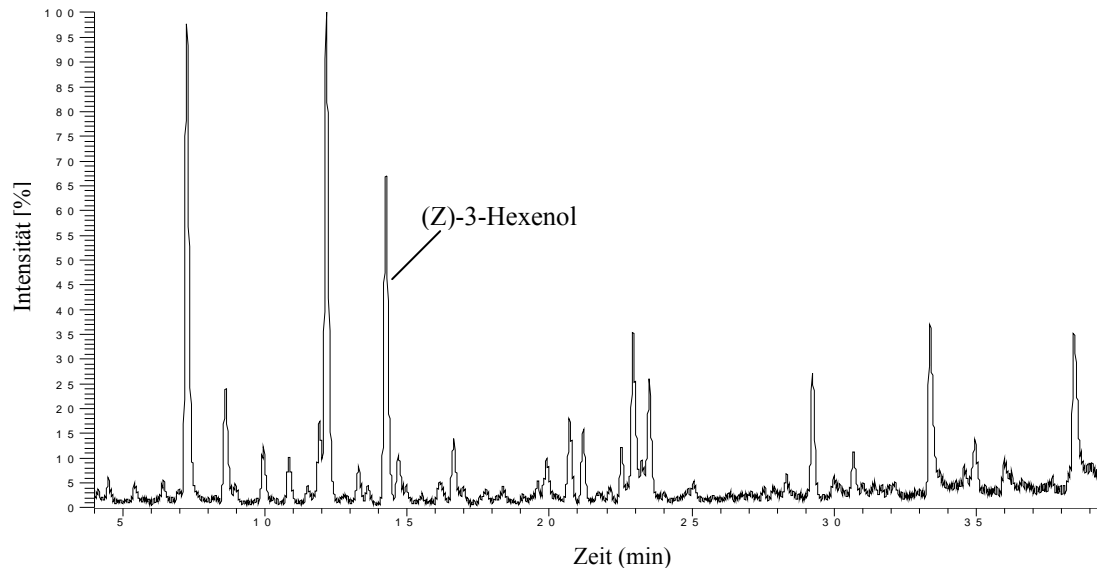


Abb. 27: HRGC-MS Totalionenchromatogramm der fermentativen Reduktion von enzymatisch aus Linolensäure über 13-HPOT dargestelltem (Z)-3-Hexenal (siehe Abb. 21 b) zu (Z)-3-Hexenol.

Tab. 6: Bei der fermentativen Reduktion von (Z)-3-Hexenal zu (Z)-3-Hexenol ermittelte $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte

fermentativ umgesetztes	(Z)-3-Hexenal ^{a)}	(Z)-3-Hexenol ^{a)}
(Z)-3-Hexenal	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰]
	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]
(Z)-3-Hexenal	-60 ± 1	-54 ± 2
(als „natürlich“ deklariert)	$-25,3 \pm 0,2$	$-25,3 \pm 0,2$
(Z)-3-Hexenal	-286 ± 6	-235 ± 5
(via 13-HPOT)	$-30,2 \pm 0,1$	$-30,0 \pm 0,3$

^{a)} Mittelwerte von Mehrfachmessungen sowie die dabei ermittelte Standardabweichung

Wie bereits bei der fermentativen Reduktion von Hexanal festgestellt (siehe Kap. 3.4.1.1 und 3.4.1.2), fand auch hier bei der Umsetzung von (Z)-3-Hexenal zu (Z)-3-Hexenol eine Anreicherung im $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert statt. Die beobachteten Anreicherungsunterschiede (Tabelle 6) sind in etwa mit denen in Abb. 24 und Tabelle 5 aufgeführten vergleichbar, so dass ein ähnlicher Mechanismus bezüglich der Deuterium-Anreicherung aus dem Wasser im Rahmen der Alkohol-Dehydrogenase-Gleichgewichtsreaktion angenommen werden kann (vgl. Kap. 3.4.1.3). Detaillierte Untersuchungen wie etwa bei 1-Hexanol (Kap. 3.4.1) oder (E)-2-Hexenal (Kap. 3.4.2.2) konnten von uns jedoch nicht angestellt werden, da weder zusätzliches kommerzielles Referenzmaterial noch ausreichende Probenmengen von (Z)-3-Hexenal aus der enzymatischen Darstellung aus Linolensäure via 13-HPOT für etwaige Aufsatzversuche zur Verfügung standen. Da die Alkohol-Dehydrogenase kurzkettige Aldehyde mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umsetzt (Fauconnier et al., 1999; Leskovac et al., 2002), ist es sicherlich interessant zu untersuchen, ob die bei der Umsetzung von Hexanal zu 1-Hexanol beobachteten Anreicherungsunterschiede in einer vergleichbaren Größenordnung auch bei der Umsetzung von (Z)-3-Hexenal zu (Z)-3-Hexenol auftreten. Die in Tabelle 6 aufgeführten Daten legen dies zwar nahe, jedoch ist die Probenzahl mit lediglich zwei Umsetzungen einfach zu gering, um detailliertere Vergleiche anzustellen.

Bei einer Authentizitätsbewertung von (Z)-3-Hexenol erlaubt die HRGC-P-IRMS-Messungen des $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}}$ -Wertes eine eindeutige Unterscheidung zwischen Synthese- und natürlichem Material, wohingegen bei der Korrelation von $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten bereits Überschneidungen auftreten (Ruff, 2001). Untersuchungen von Ruff (2001) zeigen des Weiteren, dass sich die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der kommerziellen, als „natürlich“ deklarierten und somit (potentiell) biotechnologisch erzeugten (Z)-3-Hexenole im Bereich von -31,4 bis -34,6‰ sammeln, wohingegen (Z)-3-Hexenol aus authentischem Pflanzenmaterial einen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Bereich von -35,4 bis -45,1‰ abdeckt. Die Autorin vermutete daher den $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert als ein wichtiges Kriterium für die Unterscheidung von biotechnologisch gewonnenem (Z)-3-Hexenol gegenüber den natürlichen „ex plant“ Materialien, konnte dies jedoch aufgrund des Fehlens von authentischen, biotechnologisch hergestellten Proben nicht weiter festigen. Wie bereits in Kap. 3.3 und 3.4.1.3 angesprochen wurde, können die dokumentierten und verschiedenen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von (Z)-3-Hexenol den unterschiedlichen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten der Fettsäure-Edukte sowie konkurrierender Stoffwechselprozesse bei der pflanzlichen C₆-Biogenese zugeschrieben werden. Die biotechnologische Produktion stellt dagegen einen gerichteten Prozess dar, bei dem Nebenreaktionen soweit wie möglich ausgegrenzt werden. Wie gezeigt werden konnte, ist daher auch nicht mit einer signifikanten Veränderung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wertes zu rechnen (siehe Abb. 17, 20, 23 und 24 sowie Tab. 4, 5 und 6), welcher den entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der Edukt-Fettsäure widerspiegelt.

3.4.2.2 Modellstudien zur fermentativen Reduktion von (E)-2-Hexenal

3.4.2.2.1 Fermentative Totalreduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol

Abschließende Untersuchungen zur fermentativen Reduktion von C₆-Aldehyden wurden von uns anhand von Modellumsetzungen mit dem Alkenal (E)-2-Hexenal angestellt. Wie bereits bei den Modellumsetzungen mit Hexanal (siehe Kap. 3.4.1.2) sind auch hier durch das Vermischen zweier kommerzieller (E)-2-Hexenale definierte Isotopenwerte „generiert“ worden. Zur Anwendung kamen dabei ein synthetisches (E)-2-Hexenal mit $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -21 \pm 5\text{‰}$ (EA) und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -28,4 \pm 0,1\text{‰}$ (EA) sowie ein als „natürlich“ deklariertes (E)-2-Hexenal mit $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -365 \pm 1\text{‰}$ und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -27,7 \pm 0,1\text{‰}$ (EA). Zugunsten möglichst großer Unterschiede in den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten musste hier leider von einer großen Differenz in den $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten abgesehen werden, da ansonsten kein geeignetes Paar zustande gekommen wäre. Auch hier erfolgte die Umsetzung neben parallel durchgeführten Blindwerten und anschließender Analyse mittels HRGC-P/C-IRMS (vgl. 3.4.1.2).

(E)-2-Hexenal wurde von *S. cerevisiae* dabei glatt zu 1-Hexanol umgesetzt, wovon zunächst nicht ausgegangen war. In ihren Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Verlauf der Hefebasierten „Grünnoten“-Reduktion wiesen Fauconnier et al. (1999) nicht auf diesen Umstand hin, allerdings setzten sie lediglich (Z)-3-Hexenal mit lebenden Hefezellen um, wohingegen sie die Reduktion der anderen Aldehyde Hexanal, (E)-2-Hexenal, (E)-2-Nonenal und (E,Z)-2,6-Nonadienal mit kommerzieller ADH und dem NADH-Cofaktor studierten. Im Laufe der von uns angestellten Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass das eigentliche Ziel der Umsetzung von (E)-2-Hexenal, (E)-2-Hexenol, mit „whole cell“ Hefefermentationen nur mittels Kurzzeit-Fermentationen bei unvollständiger Umsetzung von (E)-2-Hexenal erhalten werden kann (siehe Kap. 3.4.2.2.3). Tabelle 7 zeigt eine Zusammenfassung der bei den vollständig reduktiven Modellumsetzungen von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol ermittelten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte. In Tabelle 8 sind die entsprechenden $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte zusammengestellt.

Bei der Betrachtung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte (Tab. 7) wird deutlich, dass es auch bei der vollständigen fermentativen Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol zu keiner signifikanten Veränderung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wertes kommt, wie dies auch in den vorangegangenen Kapiteln bei der entsprechenden Reduktion von Hexanal und (Z)-3-Hexenal festgestellt worden ist (siehe Kap. 3.4.1.1, 3.4.1.2 und 3.4.2.1). Ein anderes Bild ergibt sich aber bei der Betrachtung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte (Tab. 8): hier zeigten sich deutliche Unterschiede gegenüber der *S. cerevisiae*-katalysierten Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol (Kap. 3.4.1.2, Tab. 5). Während dort über den gesamten analysierten Bereich eine Anreicherung beobachtet wurde, erfolgte bei der fermentativen Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol in einem $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Bereich von -17 bis -140‰ zunächst eine Abreicherung. Dies änderte sich bei der entsprechenden Umsetzung von (E)-2-Hexenal in einem $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Bereich von -225 bis -354‰, bei dem ausschließlich eine Anreicherung feststellbar war und die somit auch den zuvorangegangenen Beobachtungen an Hexanal und (Z)-3-Hexenal entspricht.

Tab. 7: Bei der fermentativen Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol ermittelte $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte

Anteil (E)-2-Hexenal ^{a)}		(E)-2-Hexenal $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰] (berechnet) ^{b)}	(E)-2-Hexenal $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰] ^{c)} (Blindwert)	1-Hexanol $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰] ^{c)}
synthetisch	natürlich			
100%	0%	-28,4	-28,7 ± 0,1	-28,7 ± 0,2
80%	20%	-28,3	-28,6 ± 0,2	-28,5 ± 0,1
60%	40%	-28,1	-28,2 ± 0,1	-27,9 ± 0,1
40%	60%	-28,0	-27,9 ± 0,1	-27,8 ± 0,1
20%	80%	-27,8	-27,7 ± 0,1	-27,8 ± 0,1
0%	100%	-27,7	-27,4 ± 0,2	-27,3 ± 0,1

^a $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (synthetisch) = -28,4 ± 0,1‰ (EA); $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (natürlich) = -27,7 ± 0,1‰ (EA)

^b die Berechnung der jeweiligen Isotopenwerte dient als Orientierung sowie dem Vergleich mit dem analysierten Blindwert, die Berechnung erfolgt anhand der EA-Werte nach:

$$[(\text{Anteil (E)-2-Hexenal synthetisch}) \times (-28,4\text{‰}) + (\text{Anteil (E)-2-Hexenal natürlich}) \times (-27,7\text{‰})] : 100$$

^c Mittelwerte von Mehrfachmessungen sowie die dabei ermittelte Standardabweichung

Tab. 8: Bei der fermentativen Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol ermittelte $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte

Anteil (E)-2-Hexenal ^{a)}		(E)-2-Hexenal $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰] (berechnet) ^{b)}	(E)-2-Hexenal $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰] ^{c)} (Blindwert)	1-Hexanol $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰] ^{c)}	Beobachtete Veränderung ^{d)}
synthetisch	natürlich				
100%	0%	-21	-17 ± 1	-57 ± 1	-40‰
80%	20%	-90	-76 ± 1	-101 ± 1	-25‰
60%	40%	-159	-140 ± 2	-148 ± 1	-8‰
40%	60%	-227	-225 ± 1	-197 ± 2	+28‰
20%	80%	-296	-273 ± 1	-248 ± 2	+25‰
0%	100%	-365	-354 ± 1	-303 ± 1	+51‰

^a $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ (synthetisch) = -21 ± 5‰ (EA); $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ (natürlich) = -365 ± 1‰ (EA)

^b die Berechnung der jeweiligen Isotopenwerte dient als Orientierung sowie dem Vergleich mit dem analysierten Blindwert, die Berechnung erfolgt anhand der EA-Werte nach:

$$[(\text{Anteil (E)-2-Hexenal synthetisch}) \times (-21\text{‰}) + (\text{Anteil (E)-2-Hexenal natürlich}) \times (-365\text{‰})] : 100$$

^c Mittelwerte von Mehrfachmessungen sowie die dabei ermittelte Standardabweichung

^d Differenz umgesetztes 1-Hexanol - Blindwert

Abbildung 28 zeigt die für eine weitere Beurteilung sich anbietende Korrelation der beobachteten An- bzw. Anreicherungsunterschiede von 1-Hexanol gegenüber den (E)-2-Hexenal-Edukten (vgl. Abb. 25).

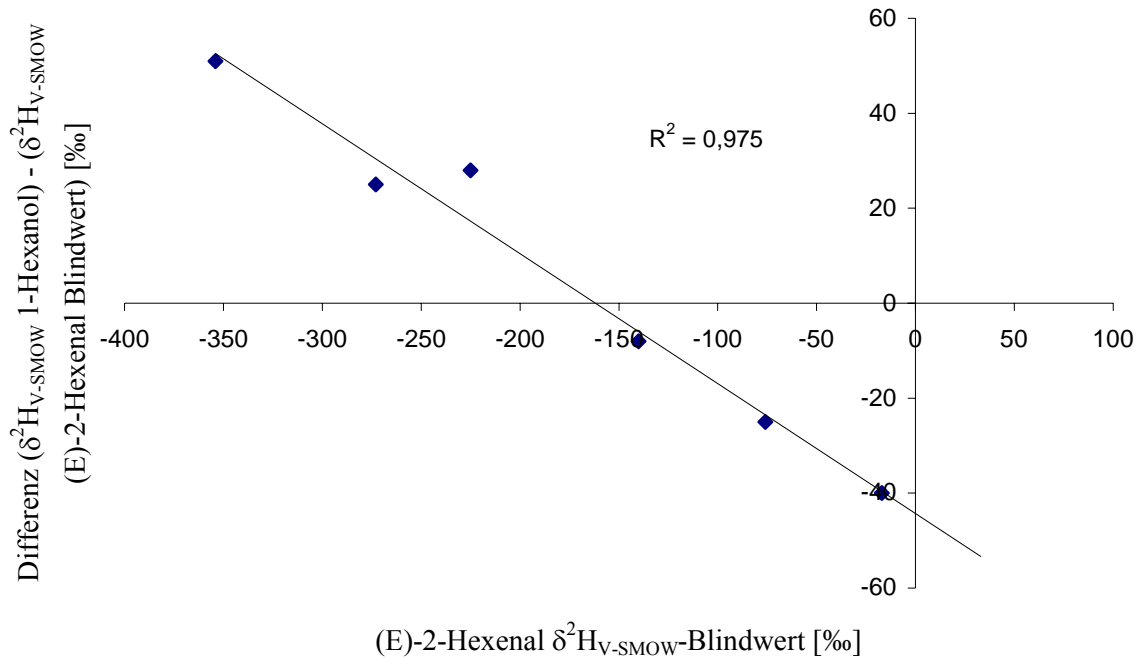


Abb. 28: Fermentative Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol mittels *S. cerevisiae*: Korrelation der beobachteten Deuterium-An- bzw. Anreicherungen in 1-Hexanol zu den jeweiligen (E)-2-Hexenal-Blindwerten (siehe Tab. 8).

Wie bereits bei den Modellumsetzungen von Hexenal (Abb. 25, Kap. 3.4.1.2) kann auch hier durch die gewählte Gegenüberstellung (siehe Tab. 8) ein linearer Zusammenhang bei der Hefe-katalysierten Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol gezeigt werden, wobei dieser mit $R^2 = 0,9529$ auch beim entsprechenden Vergleich mit den Werten für 1-Hexanol erhalten bleibt. Auch in diesem Fall lässt sich die beobachtete An- bzw. Anreicherung dadurch erklären, dass es formal zu einer Übertragung von Wasserstoffatomen mit einem konstanten $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert kam, der sich in Abhängigkeit vom $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert des als Edukt eingesetzten (E)-2-Hexenals unterschiedlich stark auswirkt. Der Schnittpunkt des in Abbildung 28 dargestellten linearen Verlaufs mit der X-Achse stellt folglich den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert eines (E)-2-Hexenals dar ($\sim -162\text{‰}$), bei dem durch die bei der Hefereduktion stattfindende Wasserstoffübertragung keine Veränderung mehr beobachtet werden kann, da der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert mit dem der übertragenen Wasserstoffatome identisch ist.

Im Gegensatz zur fermentativen Reduktion von Hexanal, bei der es zu einer Netto-Übertragung von Wasserstoffatomen mit einem $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von $\sim +35\%$ kam, wurde hier interessanterweise eine Netto-Übertragung von Wasserstoffatomen mit $\sim -162\%$ beobachtet. Da die Anreicherung mit dem umliegenden Wasser durch die Alkohol-Dehydrogenase bereits an mehreren Stellen nachgewiesen werden konnte (siehe Kap. 3.4.1.3) lag daher die Vermutung nahe, dass beim Vorliegen von zwei unterschiedlichen funktionellen Gruppen in (E)-2-Hexenal auch zwei verschiedene Enzyme für deren Reduktion verantwortlich sind, und dass deren übertragene Wasserstoffatome unterschiedliche $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte aufweisen. Auch in diesem Fall erhofften wir uns zusätzliche Informationen aus einer fermentativen Reduktion von (E)-2-Hexenal in D₂O, um zumindest den Einfluss des Wassers genauer darlegen zu können. Abbildung 29 (Kap. 3.4.2.2.2) zeigt die entsprechenden Massenspektren von 1-Hexanol, wie sie aus der Umsetzung in D₂O sowie H₂O erhalten worden sind.

3.4.2.2.2 Fermentative Totalreduktion von (E)-2-Hexenal in D₂O

Wie bereits mit Hexanal (Kap. 3.4.1.3) erfolgte die Umsetzung von (E)-2-Hexenal mit *S. cerevisiae* im verkleinertem Maßstab in D₂O. Anhand des Vergleichs der Molekülfragmente nach Wasserverlust, $m/z = 84$ und $m/z = 86$, wird deutlich, dass bei der fermentativen Totalreduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol in D₂O formal der Einbau von zwei Wasserstoffatomen aus dem Wasser stattgefunden hat. Durch das Molekülfragment $m/z = 56$ zeigt sich des weiteren, dass beide Deuteriumatome an Position C-1 und C-2 zu finden sind, wenngleich das Molekülfragment $m/z = 57$ ein Vorkommen von Deuterium an den Positionen C-3, C-4 oder C-5, nicht vollständig ausschließt.

Unter der Annahme, dass bei der Alkohol-Dehydrogenase-katalysierten Reduktion der Carbonylfunktion von (E)-2-Hexenal zu (E)-2-Hexenol Wasserstoffatome mit dem bei der Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol ermittelten Netto-Wasserstoffwert von $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = \sim +35\%$ übertragen werden (siehe 3.4.1.2), lässt sich der entsprechende $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert der Wasserstoffatome bei der Anlagerung an die Doppelbindung im Verlauf der fermentativen Reduktion von (E)-2-Hexenal berechnen.

Entsprechend Abbildung 28 zeigt ein (E)-2-Hexenal mit $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -162\%$ keine Veränderung seines $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wertes im Rahmen der fermentativen Reduktion zu 1-Hexanol, daher gilt hier:

$$(10) 2 * (x\%) + 2 * (+35\%) = 4 * (-162\%)$$

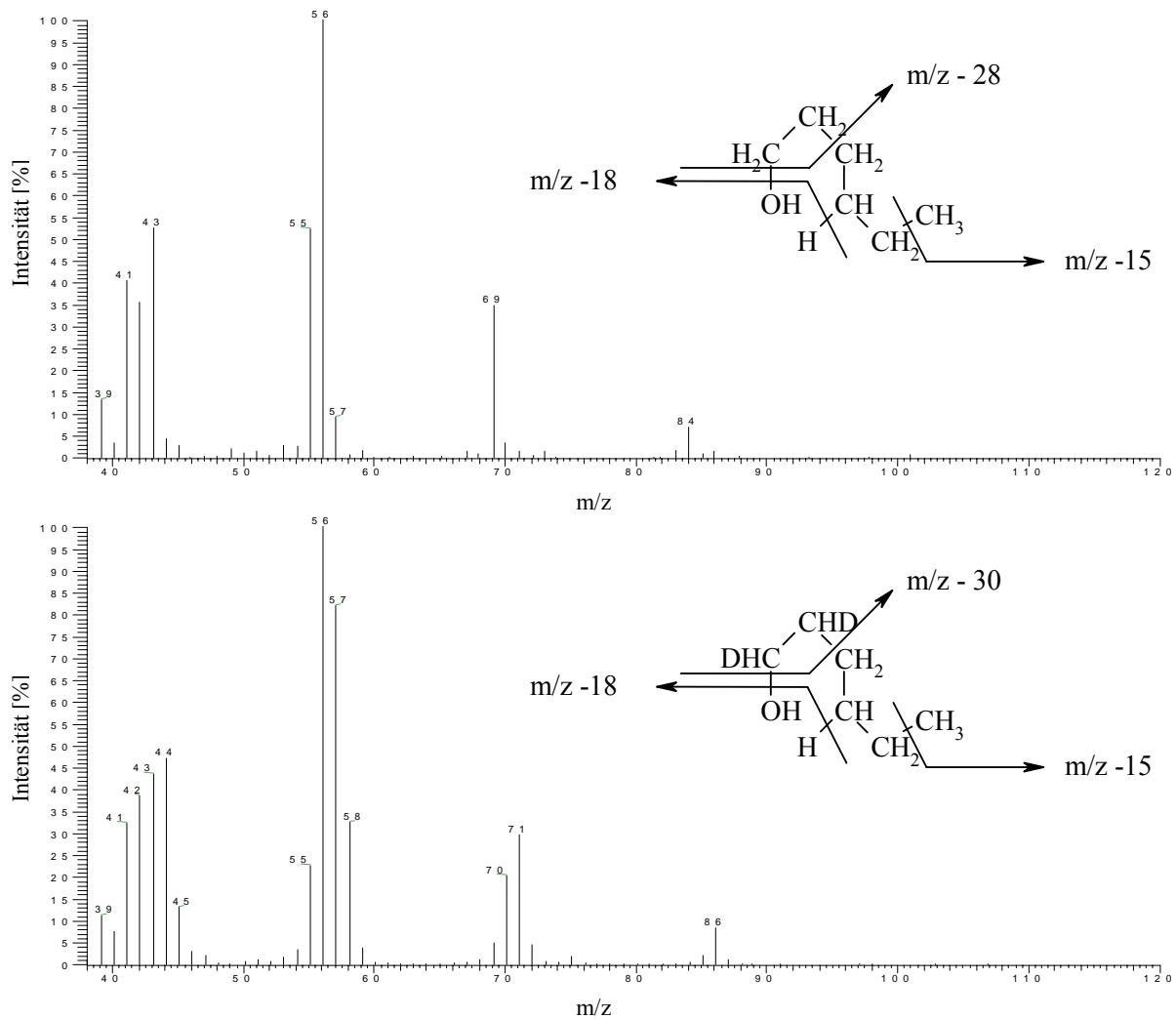


Abb. 29: EI-Massenspektren von 1-Hexanol (70 eV), oben aus der fermentativen Reduktion von E-2-Hexenol in H₂O, unten aus der fermentativen Reduktion von E-2-Hexenol in D₂O. Fragmentierung von 1-Hexanol nach Friedel et al. (1956) und Derrick et al. (1973).

Formal werden bei der Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol vier Wasserstoffatome übertragen - deren Durchschnitt stellt $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = \sim -162\text{‰}$ dar (siehe Abb. 28) - wohingegen bei der ADH-katalysierten Reduktion der Carbonylfunktion eine Übertragung von zwei Wasserstoffatomen mit einem Durchschnitt von $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = \sim +35\text{‰}$ (siehe Abb. 25) erfolgt. Die Unbekannte x stellt demnach den Durchschnittswert der beiden an die Doppelbindung angelagerten Wasserstoffatome dar und beträgt $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = \sim -359\text{‰}$, also $\sim -360\text{‰}$. Dieser Wert entspricht dem von Schmidt et al. (2003a) aus theoretischen Überlegungen hergeleiteten Wert für das Reduktionsäquivalent von Flavoproteinen von $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = \sim -350\text{‰}$. Tatsächlich ist es sehr wahrscheinlich, dass für die Reduktion der Doppelbindung von (E)-2-Hexenal durch *S. cerevisiae* Flavin-abhängige Reduktasen verantwortlich sind, hier vor allem die ausführlich beschriebenen und relativ unspezifischen Enon-Reduk-

tasen (Williams und Bruce, 2002; Wanner und Tressl, 1998; Kawai et al., 1998) oder aber auch die Enoyl-Reduktasen des Fettstoffwechsels (Stryer, 1999).

Vereinzelte Hinweise auf eine Übertragung von stark abgereicherten Wasserstoffatomen bei der fermentativen Reduktion von Doppelbindungen in α,β -ungesättigten Carbonylen finden sich auch in der Literatur, wie dies etwa bei der positionsspezifischen SNIF-NMR[®] Analyse zur Herkunft von Himbeerketon (Fronza et al., 1998) oder bei der positionsspezifischen SNIF-NMR[®] Analyse zur Herkunft von Dihydrocoumarin (Brenna et al., 2005) tendenziell gezeigt werden konnte. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Vorgehensweise ermöglichte eine experimentelle Bestimmung dieses Wertes für die fermentative Reduktion von (E)-2-Hexenal mittels *S. cerevisiae*. Größere Probenzahlen können hier sicherlich noch zu einer exakteren Eingrenzung führen.

3.4.2.3 Fermentative Partialreduktion von (E)-2-Hexenal zur Darstellung von (E)-2-Hexenol

Da die fermentative Reduktion von (E)-2-Hexenal mit *S. cerevisiae* zu einer Totalreduktion des Alkenals zum Alkohol 1-Hexanol führt, wurden von uns Kurzzeit-Fermentationen unternommen, um auf diese Weise das gewünschte Produkt (E)-2-Hexenol dennoch zu erhalten und mittels HRGC-P/C-IRMS analysieren zu können. Auch das entsprechende biotechnologische Verfahren nach Muller et al. (1995) weist darauf hin, die *S. cerevisiae*-katalysierte Reduktion zeitig abubrechen, um letztlich (E)-2-Hexenol präparativ darzustellen, wengleich die Notwendigkeit dieses Schritts, d. h. die unerwünschte Reduktion zu 1-Hexanol, explizit nicht genannt wird. Im Vergleich zu den anderen „Grünnoten“ resultiert bei der biotechnologischen Darstellung von (E)-2-Hexenol jedoch prinzipiell die geringste Ausbeute (siehe Kap. 2.5.3), da hier (E)-2-Hexenol im besten Fall nur angereichert gegenüber (E)-2-Hexenal und 1-Hexanol erhalten werden kann (siehe Abb. 30 und Tab. 9). Die Abzweigung des Produktflusses im Rahmen der Biokatalyse führt zwangsläufig zu signifikanten Isotopenfraktionierungen, da die kinetischen Isotopeneffekte der beteiligten Enzyme im Gegensatz zu den vollständigen Umsetzungen (siehe Kap. 3.4.1.2 und 3.4.2.2.1) voll wirksam werden können (Schmidt et al., 2003a; Schmidt et al., 2003b).

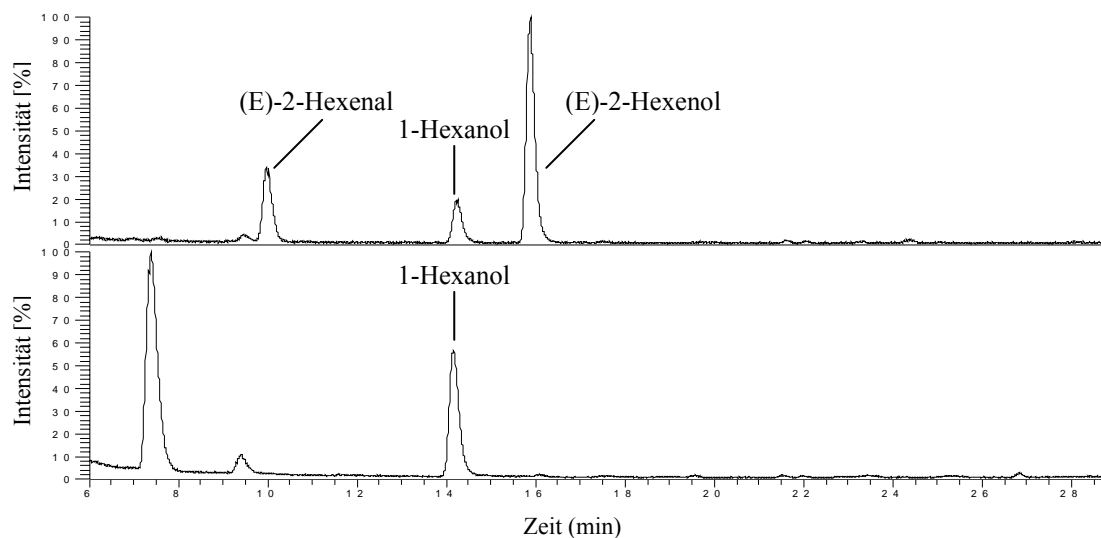


Abb. 30: HRGC-MS Totalionenchromatogramme der fermentativen Reduktion von (E)-2-Hexenal. Totalreduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol (unten) sowie Partialreduktion von (E)-2-Hexenal in einer Kurzzeit-Fermentation zur Darstellung von (E)-2-Hexenol (oben).

Tab. 9: Bei der fermentativen Darstellung von (E)-2-Hexenol aus (E)-2-Hexenal ermittelte $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der vorliegenden Produkte (E)-2-Hexenal, 1-Hexanol und (E)-2-Hexenol

(E)-2-Hexenal vor Umsatz ^{a)}	(E)-2-Hexenal	1-Hexanol	(E)-2-Hexenol		Durchschnitt ^{c)}
$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ [‰]	Verhältnis ^{b)}	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -
$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]		Wert [‰]
-17 ± 1	n.b.	n.b.	n.b.		
-28,7 ± 0,1	n.b.	-31,5 ± 0,2	-24,6 ± 0,3	1/3,4/1,5	---
-17 ± 1	n.b.	n.b.	n.b.		
-28,7 ± 0,1	n.b.	-32,1 ± 0,1	-26,9 ± 0,2	1/3,7/1,7	---
-354 ± 1	-345 ± 1	-323 ± 2	-240 ± 1		
-27,4 ± 0,2	-22,6 ± 0,2	-30,5 ± 0,2	-26,8 ± 0,1	1/1,9/2,0	-27,4
-354 ± 1	-329 ± 1	-321 ± 1	-207 ± 4		
-27,4 ± 0,2	-22,6 ± 0,1	-30,4 ± 0,1	-26,3 ± 0,1	1/3,0/2,1	-27,7

^{a)} Es wurden zwei verschiedene (E)-2-Hexenale umgesetzt

^{b)} die relativen Verhältnisse von (E)-2-Hexenal/1-Hexanol/(E)-2-Hexenol nach partieller Reduktion

^{c)} berechnet anhand der relativen Verhältnisse von (E)-2-Hexenal/1-Hexanol/(E)-2-Hexenol mit den korrespondierenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten; n.b. = nicht bestimmt

Wie aus den in Tabelle 9 zusammengestellten Daten ersichtlich ist, führt die fermentative Partialreduktion von (E)-2-Hexenal zu (E)-2-Hexenol zu einer signifikanten ¹³C/¹²C-Isotopenfraktionierung. Erkennbar wird dies bei der Betrachtung der jeweiligen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von (E)-2-Hexenal, 1-Hexanol und (E)-2-Hexenol sowie den anhand der relativen Verhältnissen berechneten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Durchschnittswerten, welche mit dem des als Edukt eingesetzten (E)-2-Hexenal übereinstimmen. Die beobachteten Unterschiede in den $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten legen ferner die Vermutung nahe, dass zunächst die leichteren (E)-2-Hexenal-Moleküle fermentativ Schritt für Schritt zu 1-Hexanol umgesetzt werden, welches letztlich auch die niedrigsten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte aufweist. Auch (E)-2-Hexenol wurde durchschnittlich um 0,6 bis 1,8‰ in ¹³C angereichert (Ausnahme: +4,1‰), die deutlichsten Effekte sind jedoch bei (E)-2-Hexenal mit +4,8‰ sowie 1-Hexanol mit -2,8 bis -3,4‰ zu beobachten. Interessanterweise zeigen die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von (E)-2-Hexenol eine stärkere Anreicherung gegenüber dem $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert des eingesetzten (E)-2-Hexenals als diejenigen von 1-Hexanol aus der fermentativen Reduktion von Hexenal und (Z)-3-Hexenal (siehe Kap. 3.4.1.2 und 3.4.2.1). Dieser Unterschied lässt sich insofern erklären als im Rahmen der Kurzzeit-Fermentationen der Äquilibrierungsprozess der Alkohol-Dehydrogenase-Gleichgewichtsreaktion (Fronza et al., 1996) noch nicht abgeschlossen war und somit deren primäre Anreicherung (vgl. Kap. 3.4.1.3) deutlicher in Erscheinung trat. Die vorliegenden Daten sind jedoch in ihrer Anzahl begrenzt und geben daher nur tendenzielle Hinweise auf die auftretenden Fraktionierungen. Weitergehende systematische Untersuchungen entsprechend der in Kap. 3.4.1.2 und 3.4.2.2.1 geschilderten Vorgehensweise sind daher unumgänglich, um vor allem die Bedeutung dieser Fraktionierungen für die Authentizitätsbewertung von (E)-2-Hexenol detaillierter zu betrachten.

Bei der Authentizitätsbewertung von (E)-2-Hexenol kann über eine Korrelation der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte eine eindeutige Differenzierung zwischen „natürlichen“ und synthetischen Verbindungen getroffen werden (Ruff, 2001; Hör et al., 2001; Elss et al., 2006). Für (E)-2-Hexenol aus Pflanzen, vor allem Äpfeln, nennen die genannten Autoren einen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Bereich von -219 bis -348‰ sowie eine $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Spanne von -36,8 bis -45,9‰. Die Unterscheidung von natürlichem „ex fruit“ und biotechnologisch produziertem (E)-2-Hexenol wird bisweilen allerdings durch die Tatsache erschwert, dass nur unzureichend biotechnologisches Referenzmaterial zur Verfügung steht. Im Rahmen dieser Arbeit waren lediglich zwei Proben mit $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -289$ bzw. -328 ‰ und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -27,2$ bzw. $-29,1$ ‰ verfügbar. Tatsächlich fällt bei diesen biotechnologischen Proben ein erhöhter ¹³C-Gehalt auf. Wie in Tab. 9 gezeigt wurde, kann diese Anreicherung mit der Fraktionierung im Rahmen der Hefe-katalysierten Reduktion von (E)-2-Hexenal zu (E)-2-Hexenol verbunden werden. Da diese Anreicherung grundsätzlich stattfindet, bestimmen letztendlich die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte des Edukts (E)-2-Hexenal darüber, in welche Bereiche die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte des gebildeten (E)-2-Hexenols vorstoßen können. Die hier vorgestellten Ergebnisse bieten daher eine mögliche Erklärung für die in den biotechnologischen Referenzproben beobachteten erhöhten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte. Eine Unterscheidung zwischen natürlichen „ex plant“ und biotechnologischen Material sollte daher möglich sein, zumindest noch so lange, bis industrielle Prozesse für die biotechnologische Produktion von (E)-2-Hexenol auf ein isoliertes Alkohol-Dehydrogenase-Enzymsystem mit Cofaktor-Regenerierung ausgerichtet sind. Es sollte dann nicht mehr zu einer derartigen Anreicherung in den $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten kommen, da die Produkt-

ausbeuten ganz auf die Seite von (E)-2-Hexenol verschoben werden. Soweit uns bekannt, ist ein derartiger industrieller Prozess bis jetzt jedoch noch nicht verfügbar.

4 Untersuchungen zur $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung bei der fermentativen Bildung von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol

4.1 $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung bei der fermentativen Bildung von 2-Phenylethanol

4.1.1 Modellgärungen mit C_3 - und C_4 -Zuckern zur Darstellung von 2-Phenylethanol

Die Modellgärungen zur Darstellung von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol erfolgten jeweils doppelt in 1 l-Ansätzen mit C_3 - und C_4 -Zuckern sowie Mischungen von Rübenzucker (A) und Rohrzucker (C) in 10%-Schritten (siehe Tab. 10). Des Weiteren wurden verschiedene Rohrzucker-Varietäten unterschiedlicher Raffinationsqualitäten und geographischer Herkunft vergoren, ebenso wie hydrolysierte Kartoffel- und Maisstärke (nur einfache Ansätze) sowie ein handelsüblicher Agavendicksaft als CAM-Kohlenhydratquelle. Die Ansätze wurden jeweils mit der Weinhefe Lalvin W[®] vergoren. Nach beendeter Gärung wurde die Hefe mittels Zentrifugation abgetrennt. Die Extraktion der gebildeten Gärungsnebenprodukte erfolgte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion, in parallel durchgeführten Versuchsreihen zur Ermittlung von Wiederfindungen konnte dabei sichergestellt werden, dass es im Rahmen der Probenvorbereitung zu keinen Isotopendiskriminierungen kam (siehe Anhang). Die Analyse der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol erfolgte anschließend mittels HRGC-P/C-IRMS unter Wahrung der ermittelten Linearitätsbereiche der jeweiligen Verbindung (siehe Anhang). Tabelle 10 listet die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der im Rahmen dieser Untersuchungen vergorenen Zucker. Abbildung 31 zeigt die Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Phenylethanol aus den einzelnen Fermentationen, Abbildung 32 die entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte.

Bei Betrachtung der in Tab. 10 aufgeführten Daten fällt der für ein CAM-Kohlenhydrat stark angereicherte $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert auf. In der Tat sind in der Literatur meist weniger angereicherte Werte dokumentiert, allerdings finden sich bezüglich CAM-Biomasse auch Daten bis zu $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -9,6\text{‰}$ (Kluge et al., 1995), und Versuche mit ausschließlicher Nachfixierung führten auch schon zu $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -8,7\text{‰}$ (Winter und Holtum, 2002). Für Cellulosenitrat von *Agave lecheguilla* ist ein $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert von $-11,0\text{‰}$ dokumentiert (Sternberg et al., 1984b), und für Bulkmaterial von *Agave americana* L. wird $-12,6\text{‰}$ genannt (Ziegler, 1996).

Tab. 10: $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der für die Gärungsexperimente verwendeten Kohlenhydratquellen

Kohlenhydratquelle	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰] ^{a)}
Rübenzucker (A), Herkunft (?) (C ₃)	-24,0 ± 0,2
Kartoffelstärke (B), Herkunft (?) (C ₃)	n.b.
Rohrzucker (C), Herkunft (?) (C ₄)	-11,3 ± 0,2
Rohrzucker (D), Paraguay (C ₄)	-10,8 ± 0,2
Rohrzucker (E), Herkunft (?) (C ₄)	-11,0 ± 0,3
Rohrzucker (F), Jamaika (C ₄)	-11,4 ± 0,3
Rohrzucker (G), Mauritius (C ₄)	-10,7 ± 0,3
Rohrzucker (H), USA (C ₄)	-10,7 ± 0,2
Maisstärke (I), Herkunft (?) (C ₄)	n.b.
Agavendicksaft, Herkunft (?) (CAM)	-10,2 ± 0,1

^{a)} Mittelwerte der Mehrfachmessungen mittels EA-C-IRMS sowie die dabei ermittelte Standardabweichung, n.b. = nicht bestimmt

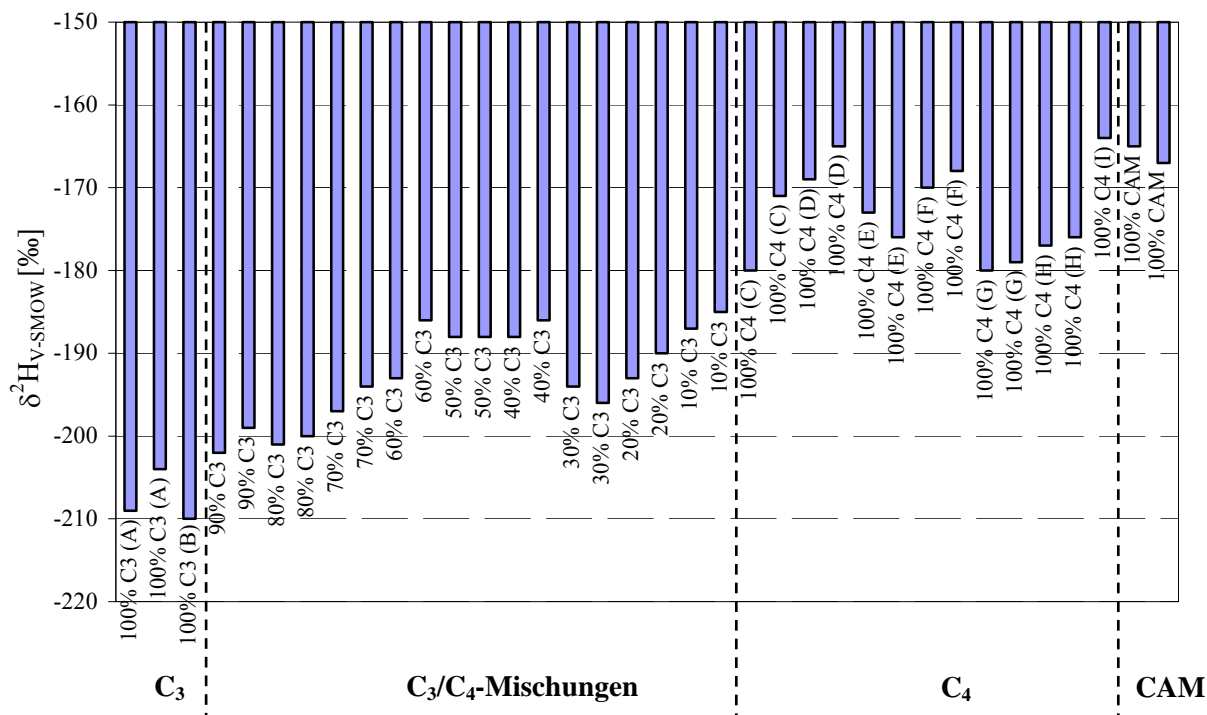


Abb. 31: Zusammenfassung der in den Modellgärungen von C₃- und C₄-Zuckern sowie Mischungen dieser in 10%-Schritten erhaltenen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Phenylethanol. Für die Zuordnung der bei den Zuckern angegebenen Buchstaben in Klammern siehe Tab. 10.

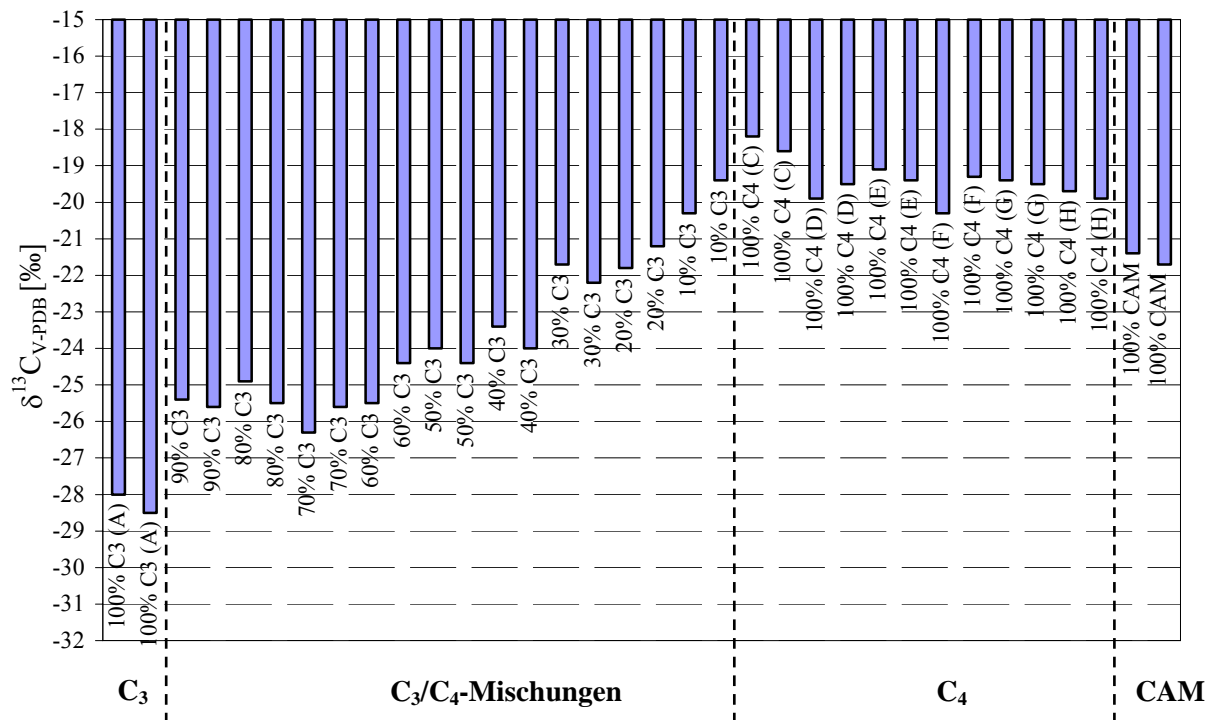


Abb. 32: Zusammenfassung der in den Modellgärungen von C₃- und C₄-Zuckern sowie Mischungen dieser in 10%-Schritten erhaltenen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol. Für die Zuordnung der bei den Zuckern angegebenen Buchstaben in Klammern siehe Tab. 10.

Wie anhand der Abbildungen 31 und 32 ersichtlich wird, führt die Vergärung verschiedener Kohlenhydratquellen (C₃, C₄, CAM) entsprechend auch zu unterschiedlichen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten von 2-Phenylethanol. Bei der Betrachtung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Phenylethanol in Abbildung 31 zeigt sich ein Unterschied von den aus den C₃-Zuckern resultierenden Werten von $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -204$ bis -210‰ mit den aus den C₄-Zuckern resultierenden Werten von $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -164$ bis -180‰ . Daneben betragen die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Phenylethanol aus der CAM-Kohlenhydratquelle -165 und -167‰ . Dass Zucker je nach Photosynthesetyp der sie bildenden Pflanze eine unterschiedliche intramolekulare Deuteriumverteilung aufweisen, konnten u. a. Zhang et al. (2002) anhand von positionsspezifischen SNIF-NMR[®] Untersuchungen an Glucose als 3,6-Anhydro-1,2-O-isopropyliden- α -D-glucufuranose-Derivat zeigen. Demnach zeigt Glucose von C₃-Pflanzen die höchsten Deuteriumgehalte an den Positionen C-4 und C-5 und die niedrigsten an C-6 („konvex“), demgegenüber Glucose von C₄-Pflanzen die höchsten Deuteriumgehalte an den Positionen C-1 und C-6 mit einer Abreicherung an den Positionen C-4 und C-5 („konkav“). Diese nicht-statistische intramolekulare Deuteriumverteilung konnte bisher noch nicht zufriedenstellend erklärt werden, da der Kohlenhydratstoffwechsel in Pflanzen dafür schlichtweg zu komplex gestaltet ist (Schmidt et al., 2003a).

Seit langem ist bekannt, dass die Deuteriumgehalte von Ethanol aus der alkoholischen Gärung einen direkten Zusammenhang mit der jeweiligen Kohlenhydratquelle zeigen (Martin und Martin, 1990;

Zhang et al., 1995; Pionnier et al., 2003). Wie nunmehr von uns gezeigt werden konnte, führt diese unterschiedliche intramolekulare Deuteriumverteilung in Kohlenhydraten auch zu unterschiedlichen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten von 2-Phenylethanol. Die Mischungen spiegeln anhand des $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wertes von 2-Phenylethanol auch die jeweiligen Anteile von C_3 - und C_4 -Zucker wieder. Letztgenannter Gesichtspunkt ist vor allem bei aromatischen Verbindungen aus Pflanzen gut untersucht, entsprechend ihrer Biogenese aus Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat zeigen in Phenylpropanoiden die Deuteriumgehalte an den individuellen Positionen des aromatischen Ringes auch deutlich diejenigen Gehalte der Vorläufer-Kohlenhydrate an. Insgesamt findet keine starke Deuteriumanreicherung statt (Schmidt et al., 2003a).

Bei der Betrachtung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol (Abbildung 32) zeigt sich ebenfalls ein Unterschied bei der Biogenese aus den C_3 - und C_4 -Zuckern. Dieser wird primär und dominant von den unterschiedlichen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten der C_3 - und C_4 -Zucker bedingt (siehe Tabelle 10), welcher auf den jeweiligen CO_2 -Fixierungsmechanismen bei C_3 - und C_4 -Photosynthesytopen beruht (siehe Kap. 2.3.2). 2-Phenylethanol aus Rübenzucker (C_3) zeigt dabei mit $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -28,0$ und $-28,5\%$ die niedrigsten ^{13}C -Gehalte, wohingegen bei den Rohrzuckerproben ein Bereich von $-18,2$ bis $-20,3\%$ resultiert. Die schrittweise stattfindende ^{13}C -Anreicherung von Phenylpropan-Derivaten in biologischen Stoffwechselprozessen ist ein gut bekanntes, ausreichend dokumentiertes Phänomen und kann prinzipiell über thermodynamische Fraktionierungsprozesse erklärt werden (Schmidt et al., 2007; Ivlev, 2001). Für 2-Phenylethanol kommt als zusätzlicher und signifikanter Anreicherungsprozess des weiteren hinzu, dass es im Rahmen der Biogenese aus Phenylpyruvat bei der enzymatischen Decarboxylierung zu einem deutlichen Verlust an ^{13}C kommt, da das Carboxyl-Kohlenstoffatom in Phenylpyruvat - als auch in L-Phenylalanin und allen anderen Aminosäuren - an ^{13}C angereichert ist (Abelson und Hoering, 1961). Die Anreicherung von ^{13}C an C-1 von Pyruvat, welches auch den Propankörper in Phenylpyruvat stellt (Stryer, 1999), ist ein ebenso bekanntes Phänomen, dessen Ursache der nicht-statistischen intramolekularen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verteilung in Kohlenhydraten aufgrund der Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase-Äquilibration zugeschrieben wird (Rossmann et al., 1991; Gleixner und Schmidt, 1997).

Ferner ist bei Betrachtung der in Abbildung 32 aufgeführten Ergebnisse auffällig, dass die beobachteten ^{13}C -Anreicherungen von 2-Phenylethanol gegenüber den Edukten Kohlenhydraten bei C_3 - und C_4 -Zuckern unterschiedlich ist. So zeigt 2-Phenylethanol aus C_3 -Rübenzucker eine Anreicherung von $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = \sim 4,3\%$, das Produkt aus C_4 -Rohrzuckern gar eine Anreicherung von $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = \sim 8,3\%$. Da bei den Gärungsexperimenten mit der Hefe *Lalvin W*[®] lediglich die Kohlenhydratquelle variiert wurde, muss dieser Unterschied also in einer unterschiedlichen nicht-statistischen intramolekularen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verteilung von C_3 - und C_4 -Zuckern begründet sein. Die Untersuchungen von Rossmann et al. (1991) weisen bereits auf diesen Umstand hin, ebenso wie die unterschiedlichen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Ethanol und CO_2 aus der Vergärung von C_3 - und C_4 -Zuckern, wenngleich die Ursache dieses Unterschieds zwischen den C_3 - und C_4 -Zuckern noch nicht geklärt ist (Hobbie und Werner, 2004). In diesem Zusammenhang sind auch die von uns bestimmten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte für 2-Phenylethanol aus der CAM-Kohlenhydratquelle interessant, da sie sich mit $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -21,4$ und $-21,7\%$ deutlich von denen der C_3 - und C_4 -Zucker abgrenzen (siehe Abbildung 32) und daher auch auf eine andersgestal-

tete intramolekulare ^{13}C -Verteilung in CAM- gegenüber C_3 - und C_4 -Pflanzen hinweisen. Ein solcher Unterschied wurde, soweit uns bekannt ist, bisher noch nicht beschrieben.

4.1.2 Traubensaftgärungen mit C_3 - und C_4 -Zuckern zur Darstellung von 2-Phenylethanol

Zusätzlich zu den in Kap. 4.1.1 beschriebenen Modellgärungen mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen zur Darstellung von 2-Phenylethanol wurden diese auf Traubensaftgärungen ausgeweitet. Zu diesem Zweck wurde ein handelsüblicher Traubensaft mit C_3 -Rübenzucker (A), C_4 -Rohrzucker (C) (siehe Tab. 10) oder Mischungen dieser beiden dotiert und mittels Lalvin W[®] vergoren. Aus den Ergebnissen erhofften wir uns Erkenntnisse darüber, inwieweit ein Zuckerzusatz zu Traubensaft die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol gegenüber den naturbelassenen Werten beeinflusst. Abbildung 33 zeigt eine Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Phenylethanol aus den einzelnen Traubensaftgärungen, Abbildung 34 die entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte.

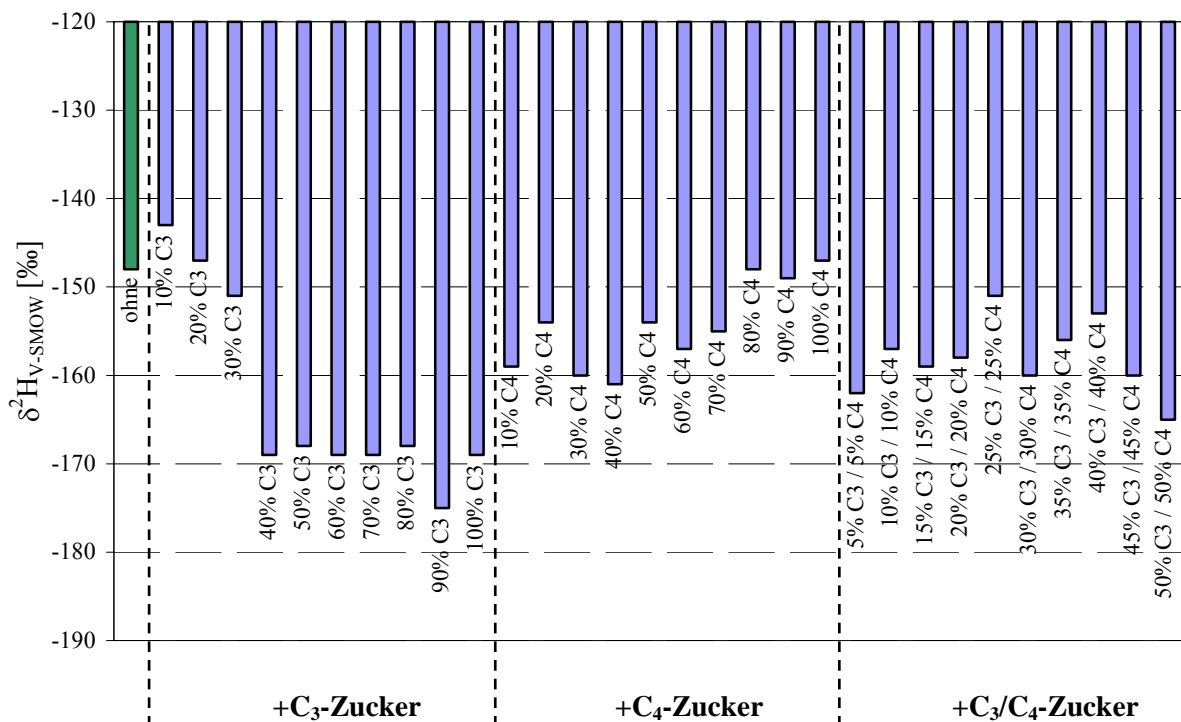


Abb. 33: Zusammenfassung der in den Traubensaftgärungen mit C_3 - und C_4 -Zuckerdotierung (Schritte von jeweils +10%) sowie Mischungen dieser beiden (Schritte von jeweils +10% je 5% C_3 - und C_4 -Zucker) erhaltenen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Phenylethanol. Für die Dotierung wurde der C_3 -Rübenzucker (A) sowie der C_4 -Rohrzucker (C) verwendet (siehe Tab. 10).

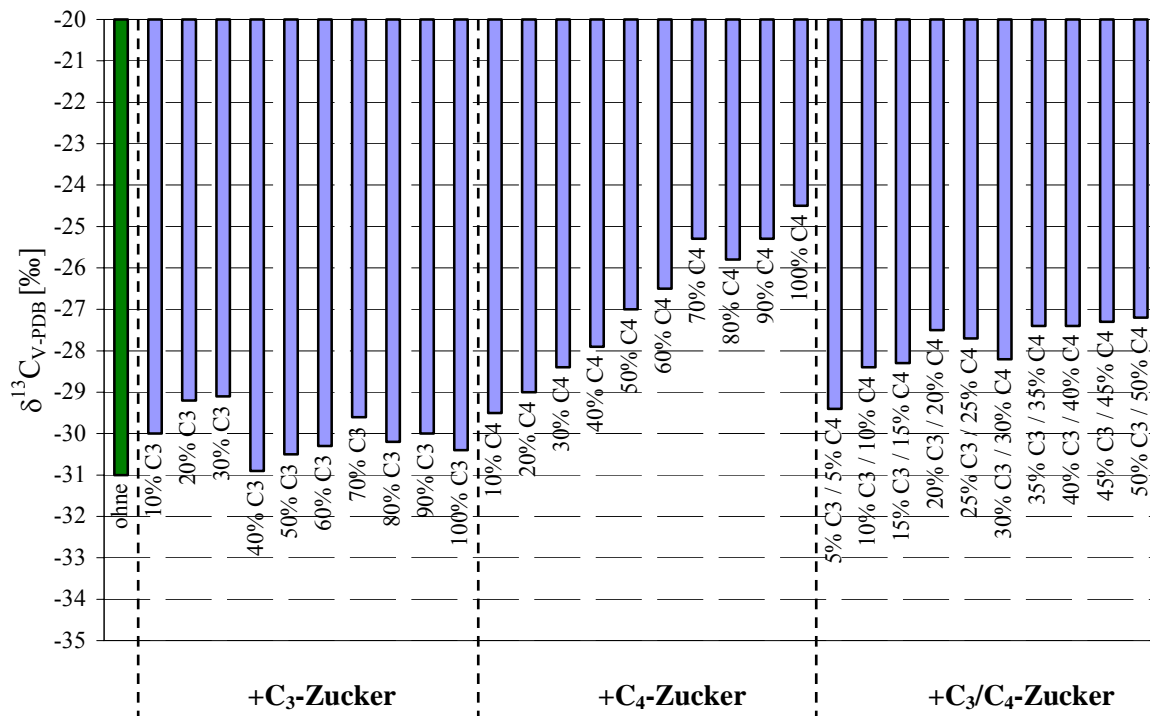


Abb. 34: Zusammenfassung der in den Traubensaftgärungen mit C₃- und C₄-Zuckerdotierung (Schritte von jeweils +10%) sowie Mischungen dieser beiden (Schritte von jeweils +10% je 5% C₃- und C₄-Zucker) erhaltenen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol. Für die Dotierung wurde der C₃-Rübenzucker (A) sowie der C₄-Rohrzucker (C) verwendet (siehe Tab. 10).

Wie aus den Abbildungen 33 und 34 ersichtlich ist, führte die Zuckerdotierung zu Traubensaft zu einer Veränderung des $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wertes von fermentativ produziertem 2-Phenylethanol, für das aus einem naturbelassenen Traubensaft $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -148\text{‰}$ und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -31,0\text{‰}$ ermittelt werden konnte. Bezüglich des $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wertes ergab der Zusatz von C₄- und C₃/C₄-Zuckermischungen keine nennenswerte Veränderung, wohingegen der Zusatz von C₃-Rübenzucker ab einem Zusatz von 40% mit einer einhergehenden Abreicherung von 2-Phenylethanol von ~ 20 bis 25% zunehmend ersichtlich wurde. Bezüglich der resultierenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol führte bereits der Zusatz von 20% C₄-Zucker zu einer merklichen Anreicherung, welche auch bei den entsprechenden C₃/C₄-Zuckermischungen mit zunehmenden C₄-Kohlenhydratanteil erkennbar wird. Zusammen mit den Daten der Modellgärungen aus Kap. 4.1.1 existiert nun eine gute Datengrundlage für die Authentizitätsbewertung von 2-Phenylethanol, auf die in Kap. 4.1.3 abschließend eingegangen wird.

4.1.3 Auswertung der Ergebnisse von 2-Phenylethanol unter Anwendung einer $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Multielementkorrelation

Ausgehend von den in Kap. 4.1.1 und 4.1.2 erhaltenen Daten sollte anhand einer Korrelation der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol geprüft werden, ob sich die bestehende Datenlage eignet, eine Authentizitätsbewertung von 2-Phenylethanol zuzulassen. Zu diesem Zweck wurden die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol aus den Modell- und Traubensaftgärungen gegeneinander aufgetragen, ebenso diejenigen von kommerziellen Referenzen als auch ein Wert für 2-Phenylethanol aus der fermentativen Umsetzung von L-Phenylalanin mittels *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Kap. 5.3.10). Abbildung 35 zeigt diese Zusammenfassung und Korrelation der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol.

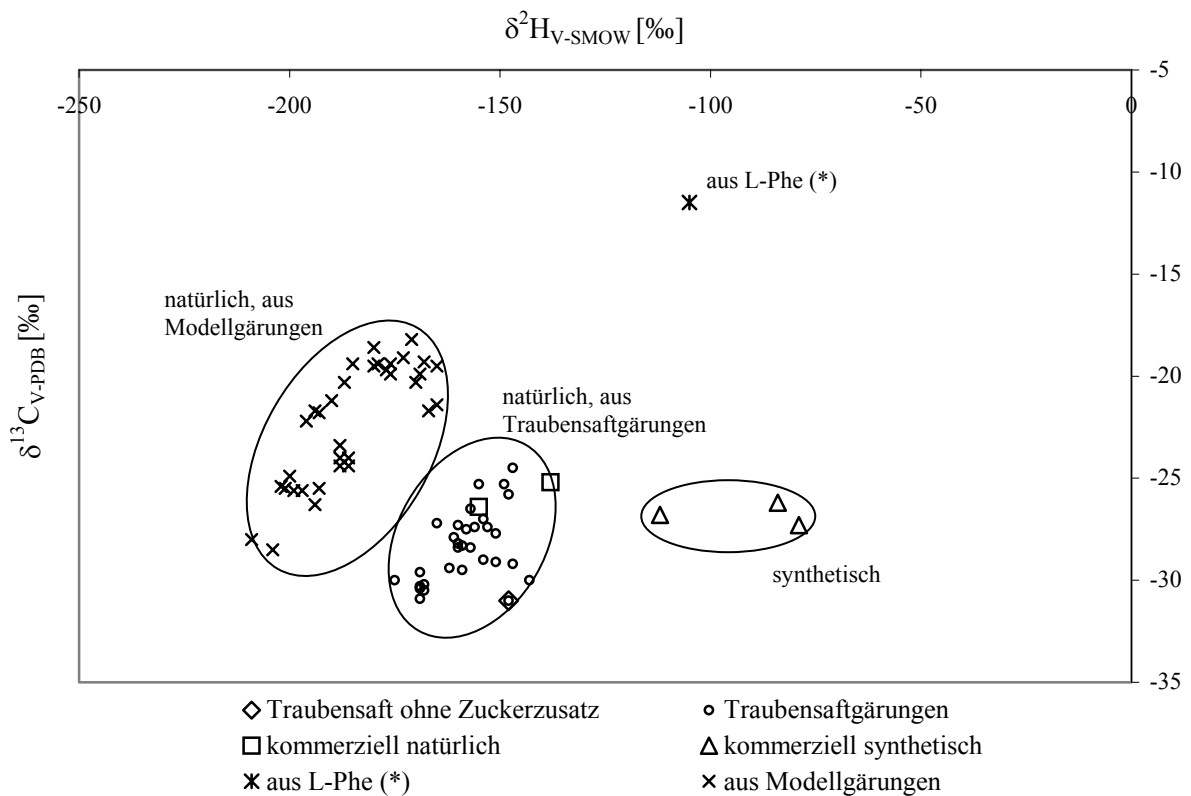


Abb. 35: Zusammenfassung und Korrelation der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Phenylethanol aus den Modell- (siehe Kap. 4.1.1) und Traubensaftgärungen (siehe Kap. 4.1.2), kommerzieller Referenzen sowie aus der fermentativen Darstellung aus L-Phenylalanin [(*) $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -11 \pm 1\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -10,0 \pm 0,1\text{‰}$].

Aus Abbildung 35 wird ersichtlich, dass sich die erarbeitete Datengrundlage für eine Unterscheidung von natürlichem und synthetischen 2-Phenylethanol prinzipiell eignet. Zwar ist der Datenumfang mit fermentativ produziertem 2-Phenylethanol ausreichend, jedoch besteht bezüglich synthetischer Referenzen sowie vor allem auch hinsichtlich natürlichem, aus L-Phenylalanin mittels *S. cerevisiae* produziertem 2-Phenylethanol Bedarf für eine Erweiterung. Synthetisches 2-Phenylethanol unterscheidet sich von auf fermentativ produziertem Wege erhaltenen Produkten durch einen verhältnismäßig höheren $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von -79 bis -112‰. Allein aufgrund des $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wertes ist keine Unterscheidung möglich. Dieser Unterschied in den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten muss jedoch vorsichtig betrachtet werden, da es denkbar ist, dass es im Rahmen von technologischen Destillationsprozessen bei der Reinigung von 2-Phenylethanol zu Isotopenfraktionierungen kommt. Bisherige Untersuchungen zeigen zwar üblicherweise eine Abreicherung in den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten von Alkoholen u. a. Verbindungen bei einfachen Verdampfungsprozessen (Elss et al., 2006), allerdings können fraktionierte Destillationen auch den gegenteiligen inversen Isotopeneffekt haben (Moussa et al., 1990; Kahle et al., 2005). Da 2-Phenylethanol vor einer Verwendung als Aromakomponente umfangreich destillativ gereinigt wird (Nienhaus und Hopp, 1987; Kamaya und Onodera, 2001) ist es daher unbedingt notwendig, die Datenlage vor allem mit authentischem (z. B. synthetischem) Referenzmaterial zu erweitern und dahingehend zu prüfen, ob es hier zu Überschneidungen mit den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten von fermentativ produziertem 2-Phenylethanol kommt. Die Unterscheidung von „natürlichen“ und synthetischen 2-Phenylethanol gelingt auch über positionsspezifische SNIF-NMR[®] Analysen (Fronza et al., 1995b), „natürliches“ 2-Phenylethanol zeigt gegenüber synthetischem Material einen höheren Deuteriumgehalt in der Hydroxymethylengruppe sowie einen geringeren Deuteriumgehalt in der phenylständigen Methylengruppe.

Das fermentativ aus L-Phenylalanin dargestellte 2-Phenylethanol spiegelt mit $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -11,5\text{‰}$ den Wert des Edukt-L-Phenylalanins mit $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -10,0\text{‰}$ wieder, bei der Umsetzung wurde folglich eine ¹³C-Abreicherung von $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = +1,5\text{‰}$ festgestellt. Diese Abreicherung entspricht den von Abelson und Hoering (1961) ermittelten Verlusten bei der Decarboxylierung von L-Phenylalanin mit +1,5 und +2,0‰. Dies, sowie die Tatsache, dass kommerzielles L-Phenylalanin praktisch ausschließlich biotechnologisch gewonnen wird (Krämer, 2004) legt die Vermutung nahe, dass das von uns verwendete L-Phenylalanin biotechnologisch aus einem C₄-Kohlenhydrat, eventuell einem kostengünstigen Maisstärkehydrolysat, gewonnen wurde. Es sollten daher weitere kommerzielle L-Phenylalaninproben dahingehend untersucht werden, welche $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte auf diesem Sektor vorherrschen und in welchem Bereich das resultierende 2-Phenylethanol vorliegen kann, da es sich hier per se auch um natürliche Produkte handelt.

4.2 $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung bei der fermentativen Bildung von 2-Methyl-1-propanol

4.2.1 Modellgärungen mit C_3 - und C_4 -Zuckern zur Darstellung von 2-Methyl-1-propanol

Die in Kap. 4.1.1 beschriebenen Modellgärungen zur Darstellung von 2-Phenylethanol dienten ebenso der HRGC-P/C-IRMS Analytik von 2-Methyl-1-propanol, welches als Gärungsnebenprodukt neben 2-Phenylethanol und anderen höheren Alkoholen bei der alkoholischen Gärung gebildet wird. Abbildung 36 zeigt eine Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol aus den einzelnen Fermentationen, Abbildung 37 die entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte.

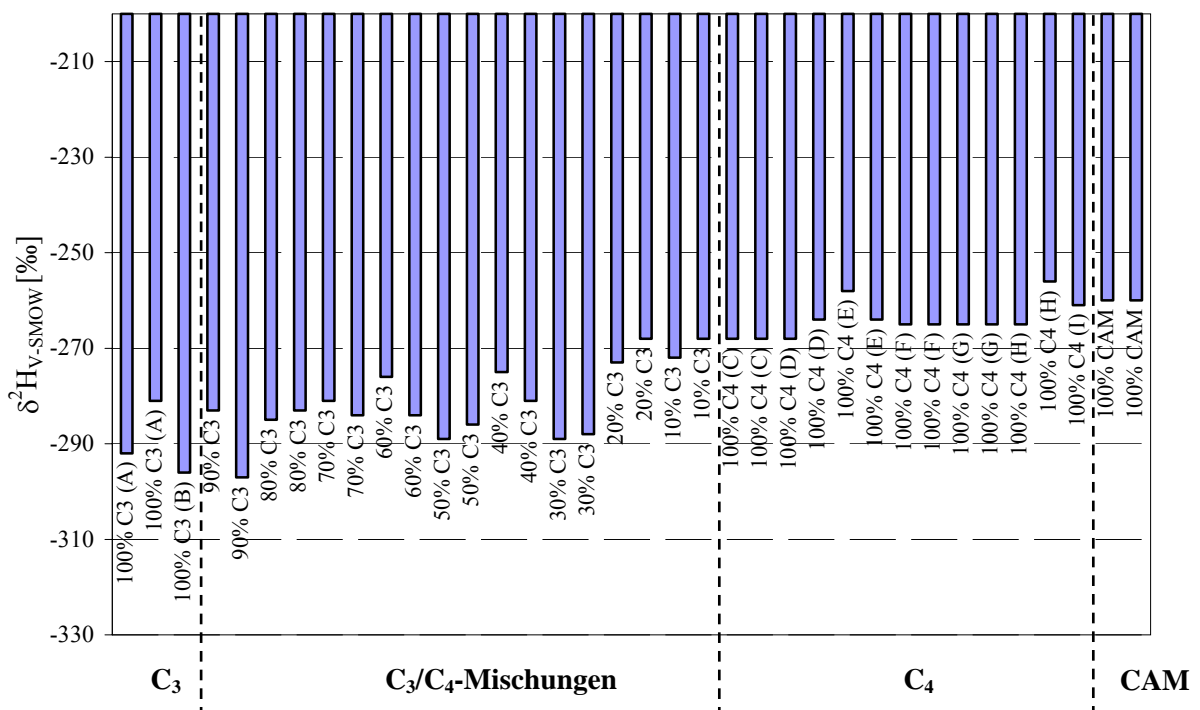


Abb. 36: Zusammenfassung der in den Modellgärungen von C_3 - und C_4 -Zuckern sowie Mischungen dieser in 10%-Schritten erhaltenen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol. Für die Zuordnung der bei den Zuckern angegebenen Buchstaben in Klammern siehe Tab. 10.

Im Gegensatz zu 2-Phenylethanol aus den Modellgärungen mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen (siehe Kap. 4.1.1) führten die Modellgärungen bei 2-Methyl-1-propanol zu keiner deutlichen Veränderung des $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wertes (vgl. Abb. 31 und 36), wenngleich die Tendenz zur Anreicherung mit steigenden C_4 -Kohlenhydratanteil - entsprechend der Beobachtung bei 2-Phenylethanol - durchaus erkennbar wird, jedoch bei weitem nicht so stark ausgeprägt ist.

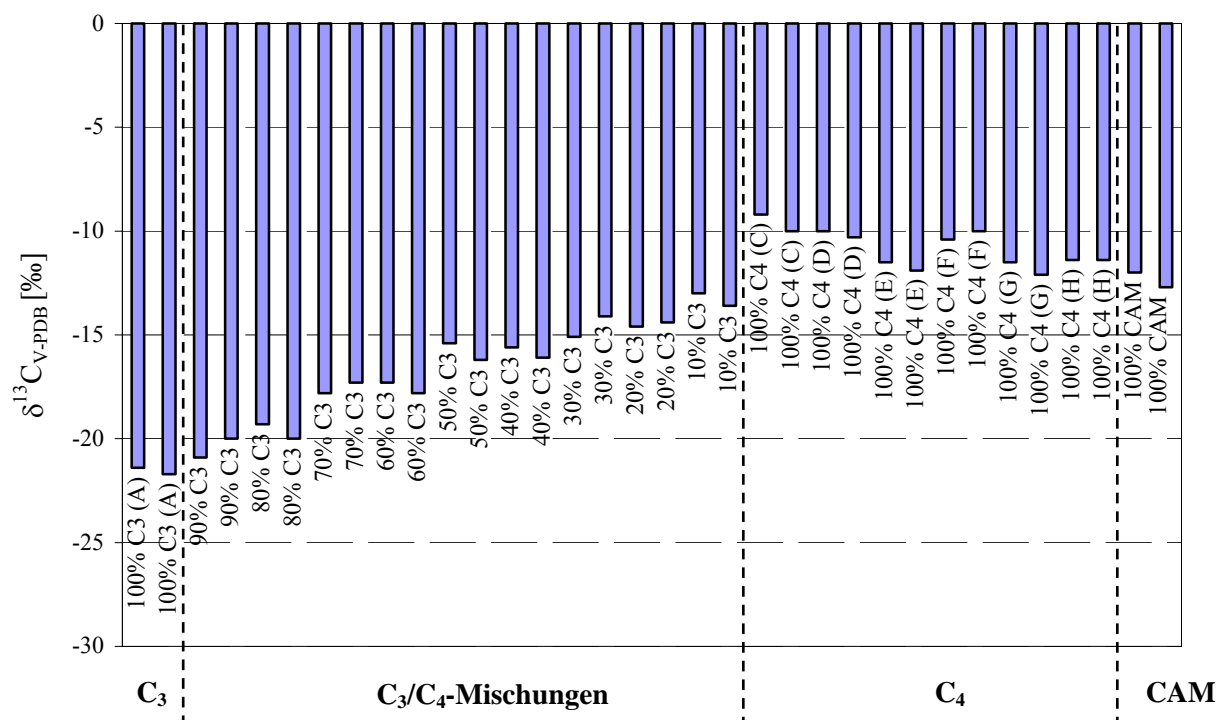


Abb. 37: Zusammenfassung der in den Modellgärungen von C₃- und C₄-Zuckern sowie Mischungen dieser in 10%-Schritten erhaltenen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol. Für die Zuordnung der bei den Zuckern angegebenen Buchstaben in Klammern siehe Tab. 10.

Die bei 2-Methyl-1-propanol ermittelten $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von -256 bis -297‰ sind deutlich gegenüber denjenigen von 2-Phenylethanol mit $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -210$ bis -164‰ erniedrigt, folglich kommt es im Rahmen der Biogenese von 2-Methyl-1-propanol als Nebenprodukt des Aminosäure-Stoffwechsels zu signifikanten $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenfraktionierungen, wenngleich hier eine $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierung praktisch nicht stattfindet (siehe Abb. 37). Diese Abreicherung von Deuterium in höheren Alkoholen ist vereinzelt an anderen Beispielen zwar grundsätzlich bekannt, jedoch steht hierfür kein allgemeingültiges Erklärungsmodell zur Verfügung (Schmidt et al., 2007). Eine mögliche Begründung für diesen Unterschied zwischen 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol ist letztlich in den unterschiedlichen Mechanismen der Biogenese zu suchen. Während 2-Methyl-1-propanol direkt aus zwei Einheiten Pyruvat aus 2-Oxo-isovalerat über 2-Acetylactat und 2,3-Dihydroxyisovalerat gebildet wird, erfolgt die Bildung von 2-Phenylethanol erst in dem entfernteren Shikimat-Stoffwechselweg, der, wie bereits in Kap. 4.1.1 beschrieben, zu einem Großteil die Deuteriumgehalte der Kohlenhydratvorstufen konserviert. Pyruvat dagegen wird aus Phosphoenolpyruvat unter Katalyse der Phosphoenolpyruvat-Kinase gebildet, wobei es im Rahmen dieser enzymatischen Reaktion aufgrund einer kinetischen $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Fraktionierung zu einem Einbau von stark abgereicherten Wasserstoffatomen aus dem Wasser kommt (Schmidt et al., 2007). Einen weiteren Einfluss könnte in diesem Zusammenhang auch der oxidative Pentosephosphat-Stoffwechselweg haben, welcher u. a. Erythrose-4-phosphat für den Shikimat-Stoffwechselweg bildet und von dem schon seit langem vermutet wird, dass hier gebildete Reduk-

tionsäquivalente ein differentes $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenverhältnis aufweisen (Schmidt et al., 2003a). Bei Betrachtung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol (Abbildung 37) zeigt sich dagegen deutlich, dass es im Rahmen der Biogenese aus den C_3 - und C_4 -Zuckern zu keiner signifikanten $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung kommt und somit die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol eine direkte Aussage über das verwendete Kohlenhydrat zulassen. Die von uns ermittelten $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte erweitern frühere Angaben von Schmidt et al. (2007) und erfordern keine weitergehende Diskussion.

4.2.2 Traubensaftgärungen mit C_3 - und C_4 -Zuckern zur Darstellung von 2-Methyl-1-propanol

Die in Kap. 4.1.2 beschriebene Vorgehensweise zur Darstellung von 2-Phenylethanol im Rahmen von Traubensaftgärungen mit Zuckerdotierung wurde auch für die HRGC-P/C-IRMS Analytik von 2-Methyl-1-propanol herangezogen. Wie bei 2-Phenylethanol erhofften wir uns aus den Ergebnissen Erkenntnisse darüber, inwieweit ein Zuckerzusatz zu Traubensaft die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol gegenüber den naturbelassenen Wert beeinflusst. Abbildung 38 zeigt die Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol aus den einzelnen Fermentationen, Abbildung 39 die entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte.

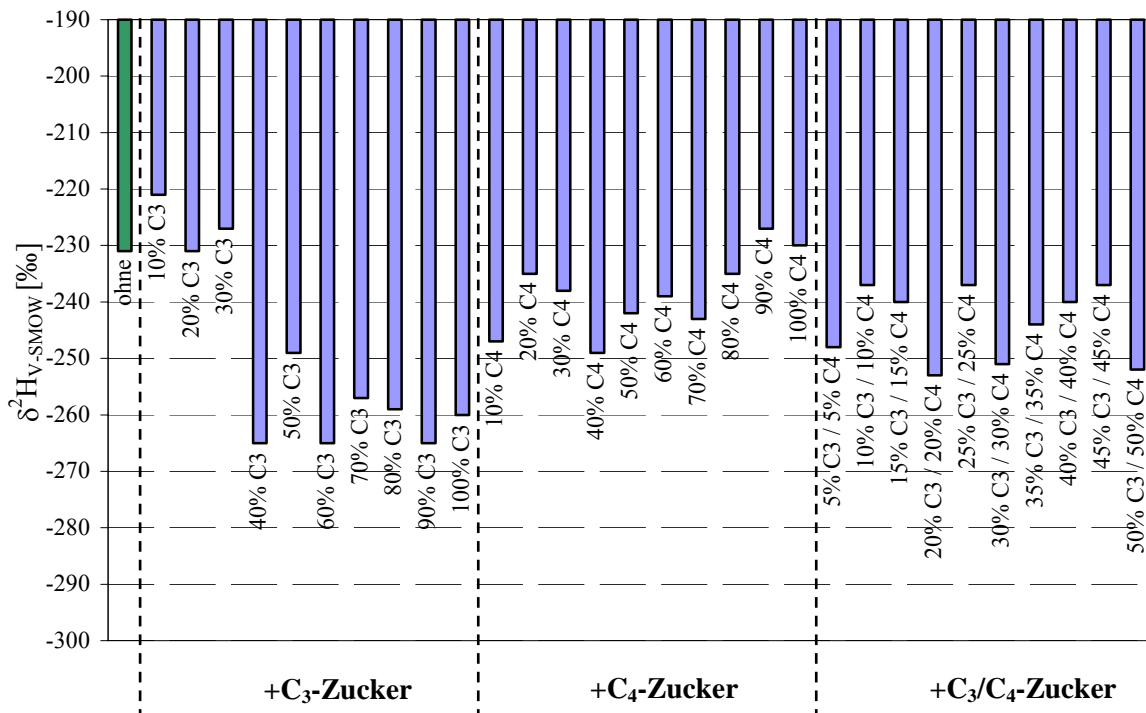


Abb. 38: Zusammenfassung der in den Traubensaftgärungen mit C_3 - und C_4 -Zuckerdotierung (Schritte von jeweils +10%) sowie Mischungen dieser beiden (Schritte von jeweils +10% je 5% C_3 - und C_4 -Zucker) erhaltenen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol. Für die Dotierung wurde der C_3 - Rübenzucker (A) sowie der C_4 -Rohrzucker (C) verwendet (siehe Tab. 10).

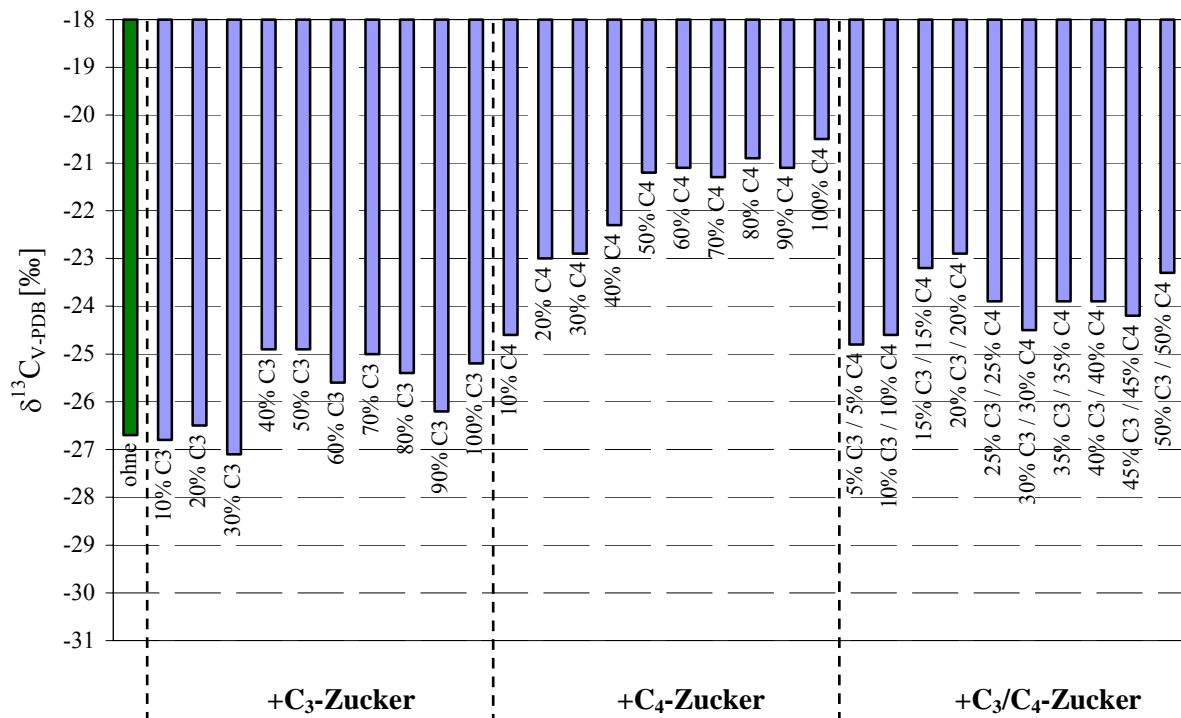


Abb. 39: Zusammenfassung der in den Traubensaftgärungen mit C₃- und C₄-Zuckerdotierung (Schritte von jeweils +10%) sowie Mischungen dieser beiden (Schritte von jeweils +10% je 5% C₃- und C₄-Zucker) erhaltenen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol. Für die Dotierung wurde der C₃- Rübenzucker (A) sowie der C₄-Rohrzucker (C) verwendet (siehe Tab. 10).

Wie anhand der in den Abbildungen 38 und 39 zusammengestellten Ergebnissen ersichtlich ist, ergab die Zuckerdotierung zu Traubensaft eine Veränderung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von fermentativ produziertem 2-Methyl-1-propanol, für das aus einem naturbelassenen Traubensaft $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -231\text{‰}$ und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -26,7\text{‰}$ ermittelt worden ist. Hinsichtlich des $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wertes führte entsprechend den Beobachtungen bei 2-Phenylethanol (siehe Kap. 4.1.2) der Zusatz von C₄- und C₃/C₄-Zuckermischungen zu keiner nennenswerten Veränderung, wohingegen der Zusatz von C₃-Rübenzucker ab einem Zusatz von 40% mit einer einhergehenden Abreicherung von 2-Methyl-1-propanol von ~ 20 bis 25‰ ersichtlich wurde. Bezüglich der resultierenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol führte im Gegensatz zu den Beobachtungen bei 2-Phenylethanol lediglich der Zusatz von C₄-Zuckern zu einer merklichen Anreicherung, wohingegen dieser Effekt bei den entsprechenden Zuckermischungen mit zunehmenden C₄-Kohlenhydratanteil nicht so deutlich erschien. Zusammen mit den Daten der Modellgärungen aus Kap. 4.2.1 existiert nun auch für 2-Methyl-1-propanol eine gute Datengrundlage für die Authentizitätsbewertung, auf die in Kap. 4.2.3 abschließend eingegangen wird.

4.2.3 Auswertung der Ergebnisse von 2-Methyl-1-propanol unter Anwendung einer $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Multielementkorrelation

Ausgehend von den in Kap. 4.2.1 und 4.2.2 erhaltenen Daten sollte, wie bereits bei 2-Phenylethanol erfolgt (siehe Kap. 4.1.3), anhand einer Korrelation der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol geprüft werden, ob sich die erarbeitete Datenlage dahingehend eignet, eine Authentizitätsbewertung von 2-Methyl-1-propanol zuzulassen. Zu diesem Zweck wurden die $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol aus den Modell- und Traubensaftgärungen gegeneinander aufgetragen, ebenso diejenigen von kommerziellen Referenzen als auch ein 2-Methyl-1-propanol aus der fermentativen Umsetzung von L-Valin mittels *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Kap. 5.3.10). Abbildung 40 zeigt diese Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol.

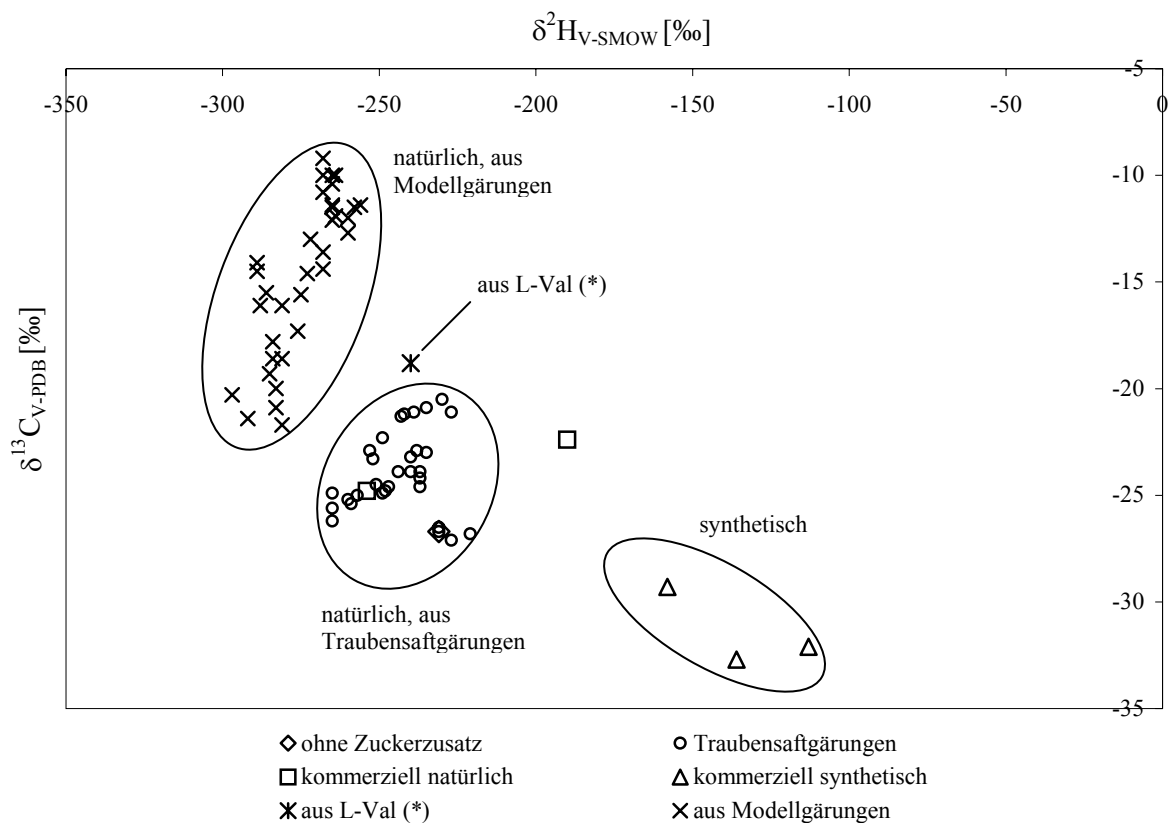


Abb. 40: Zusammenfassung und Korrelation der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 2-Methyl-1-propanol aus den Modell- (siehe Kap. 4.2.1) und Traubensaftgärungen (siehe Kap. 4.2.2), kommerzieller Referenzen sowie aus der fermentativen Darstellung aus L-Valin [(*) $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -126 \pm 4\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -15,1 \pm 0,1\text{‰}$].

Aus Abbildung 40 wird ersichtlich, dass sich die bestehende Datengrundlage für eine Unterscheidung von natürlichen und synthetischen 2-Methyl-1-propanol eignet. Wie bei 2-Phenylethanol ist es jedoch angebracht, den Datenumfang bezüglich authentischer synthetischer und „natürlicher“ Referenzverbindungen zu erweitern. Synthetisches 2-Methyl-1-propanol unterscheidet sich von den auf fermentativ produziertem Wege erhaltenen Produkten sowohl durch einen niedrigeren $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert von -29,3 bis -32,7‰, als auch durch einen signifikant höheren $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert von -113 bis -158‰. Als zusätzlichen Wert für ein synthetisches 2-Methyl-1-propanol nennen Schmidt et al. (2007) $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -28,2\text{‰}$ und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -172\text{‰}$, was den Werten der hier analysierten synthetischen Referenzverbindungen entspricht. Hinsichtlich der beiden als „natürlich“ deklarierten Referenzverbindungen mit $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -24,8\text{‰}$ und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -254\text{‰}$ bzw. $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -22,4\text{‰}$ und $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -190\text{‰}$ zeigt sich ein interessanter Unterschied, der eventuell auf einen inversen sekundären Isotopeneffekt bei einer fraktioniert-destillativen Aufreinigung hinweist (vgl. Kap. 4.1.3). Sollte es sich hierbei tatsächlich um einen technologischen Effekt handeln, unterstreicht dies noch einmal deutlich die in Kap. 4.1.3 bei 2-Phenylethanol gestellten Bedenken bezüglich einer eindeutigen Abgrenzung von „natürlichem“ und synthetischem Material, wenngleich es in diesem Fall bei 2-Methyl-1-propanol zu keinen falsch-negativen Bewertungen führen würde. Die hier vorgestellte Datengrundlage ermöglicht daher die Authentizitätsbewertung von 2-Methyl-1-propanol. Dieser Alkohol findet allerdings fast ausschließlich in Form seiner Ester Anwendung zur Aromatisierung. Da Ester jedoch ohne nennenswerte $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung enzymatisch oder chemisch hydrolysiert werden können, und somit das freigesetzte 2-Methyl-1-propanol hinsichtlich seiner Isotopenwerte hin analysiert werden kann (Preston et al., 2004), bietet sich die vorgestellte Datengrundlage prinzipiell auch zur Authentizitätsbewertung von 2-Methyl-1-propylestern an.

Das von uns zusätzlich fermentativ aus L-Valin dargestellte natürliche 2-Methyl-1-propanol wird, soweit bekannt, industriell nicht auf diesem Wege hergestellt. Es wurde jedoch entsprechend der Umsetzung von L-Phenylalanin zu 2-Phenylethanol (vgl. Kap. 4.1.3) in unsere Studien mit aufgenommen. Das aus der Umsetzung resultierende 2-Methyl-1-propanol zeigt mit einem $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert von -18,8‰ gegenüber dem Edukt-L-Valin (siehe Abb. 40) eine ^{13}C -Abreicherung von $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = 3,7\text{‰}$. Die umfangreichen Untersuchungen von Abelson und Hoering (1961) beinhalten für diesbezügliche Vergleichszwecke keine Daten zu L-Valin, da die Autoren diese Aminosäure nicht in ihre Studien mit aufgenommen hatten. Abreicherungen in dieser Größenordnung im Rahmen der Decarboxylierung von Aminosäuren wurden von ihnen aber bei vielen anderen Aminosäuren nachgewiesen. L-Valin wird industriell auf fermentativem Weg überwiegend für pharmazeutische Rohstoffe mit etwa 500 t/a produziert (Krämer, 2004), daher ist eine biotechnologische Produktion von natürlichem 2-Methyl-1-propanol entsprechend der Produktion von 2-Phenylethanol aus L-Phenylalanin (Etschmann et al., 2004; Stark et al., 2002) durchaus denkbar.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma, Acros, Merck, Roth, Fluka, Lancaster und Aldrich bezogen. Lösungsmittel wurden zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Die Identifizierung und Auswertung der nachgewiesenen und zu untersuchenden Komponenten erfolgte anhand authentischer Referenzverbindungen, auch anhand der in der Referenzensammlung des Arbeitskreises vorhandenen Vergleichsproben.

Reinstgase stammten von den Firmen Linde (Unterschleißheim) und Messer Griesheim (Frankfurt). Es wurden folgende Gase mit unterschiedlichen Reinheitsgraden verwendet: Als Trägergas für die $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^2\text{H}$ -Analysen diente Helium 5.3, für die $\delta^{13}\text{C}$ -Untersuchungen wurde für die Oxidation O_2 -Gas mit dem Reinheitsgrad 5.0 (Linde AG, Unterschleißheim) verwendet.

Internationale Isotopen-Standards stammten von der Internationalen Atomenergiebehörde (IAEA, Wien, Österreich) und dem früheren National Bureau of Standards (NBS, Gaithersburg, Maryland, USA), das jetzt unter der Bezeichnung N.I.S.T. (National Institute of Standards and Technology) geführt wird.

Von der Firma Messer Griesheim (Frankfurt) standen CO_2 -Gase (ISOTOP, Messer-Griesheim, Krefeld) mit den zertifizierten Isotopenverhältnissen $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -24,9\text{‰}$ bzw. $-25,9\text{‰}$ zur Verfügung, auch wurden H_2 -Gase (Reinheitsgrad 6.0) mit den zertifizierten Isotopenverhältnissen $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -200\text{‰}$, -280‰ , -255‰ und -149‰ von dieser Firma bezogen.

5.1.2 Verbrauchsmaterialien Elementaranalyse-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (EA-IRMS)

Von der Firma HEKATech (Wegberg) wurden das für die Messungen mit den Elementaranalysatoren nötige Zubehör bezogen, dabei handelte es sich für die $\delta^2\text{H}$ -Messungen um Nickelwolle, Glaskohlenstoffsplitter, nickelbelegte Kohle, Silberkapseln (2 x 5 mm) und Silberkartuschen (3,5 x 5 mm, 5 x 9 mm), sowie für die $\delta^{13}\text{C}$ -Messungen um gepackte CNS-Reaktoren und Zinnkartuschen (3,5 x 5 mm, 5 x 9 mm). Wasserfallen wurden mit Magnesiumperchlorat und Quarzwolle gefüllt, Carbosorb (CO_2 -Adsorbens) und Quarzsplitter zusätzlich bei den $\delta^2\text{H}$ -Messungen. Ersatz- und Zusatzteile des Massenspektrometers stammten von der Firma ThermoQuest (Egelsbach), die für den Anschluss der Peri-

pherie-Geräte an das Massenspektrometer verwendeten Bauteile („Ferrules“, „Fused Silica“ etc.) wurden von der Firma CZT (Kriftel) bezogen.

5.1.3 Enzyme und Hefen

Die gekaufte Lipoxygenase stammte von der Firma Sigma (L-8383, Type I-S) und war wie folgt spezifiziert: Lipoxygenase aus Sojabohnen, 88000 U/mg Protein (1U = Absorptionsanstieg von 0,001/min bei 234 nm mit Linolsäure als Substrat gemessen in 0,1 M Natriumboratpuffer pH 9,0 bei 25°C, Lichtweg 1 cm).

Lauch (*Allium porrum* L.) zur Enzymextraktion wurde im örtlichen Handel erworben.

Bei den verwendeten Trockenreinzuchthefen handelte es sich um Fermivin[®] (*Saccharomyces cerevisiae* No. 7013 I.N.R.A. Narbonne; Gist-Brocades, Food Ingredient Division BP 239, 59472 Seclin cedex-France), sowie Lalvin W[®] (*Saccharomyces cerevisiae* LWG Bayern, Veitshöchheim; E. Begerow GmbH & Co., Langenlonsheim).

5.1.4 Untersuchungsmaterial

Für die Gärungsexperimente wurde handelsüblicher Haushaltszucker (Saccharose) der Firmen Südzucker AG (Mannheim/Ochsenfurt; Rübenzucker, Raffinade) und Alnatura Produktions- und Handels GmbH (Bickenbach; Rohrohrzucker, Raffinade) verwendet. Ferner wurden freundlicherweise fünf weitere authentische Rohrzuckerproben unterschiedlicher geographischer Herkunft und Raffinationsschritte von Herrn Dr. Müller (Firma Takasago, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Bei den dotierten Traubensaftgärungen wurde handelsüblicher weißer Traubensaft der Firma Bayla (Würzburg) einer einheitlichen Charge als Ausgangssubstrat verwendet.

Die verwendete Maisstärke stammte von der Firma Unilever Deutschland (Hamburg) und wurde im lokalen Handel bezogen, ebenso die Kartoffelstärke der Firma Südstärke GmbH (Schrobenhausen) sowie der Agavendicksaft (Fructose-Glucose-Sirup) der Firma Eden Waren (Hünfeld).

5.1.5 Adsorptionsmaterial

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 verwendet (Korngröße 0,063-0,2 mm SiO₂, Fa. Merck), Glassäule 75 x 5 cm.

5.1.6 Dünnschichtchromatographie

- Träger: Kieselgel-Fertigplatten Alu GF₂₅₄ (Merck)
- Detektion: UV₂₅₄ und Sprühreagenzien:
- 2 g Vanillin und 2 g konz. Schwefelsäure werden auf 250 ml mit 96%-igem Ethanol aufgefüllt. Die besprühte Platte wird im Trockenschrank bei 120°C 10 min lang erhitzt.
 - 10%-ige Kaliumiodid-Lösung (Sprühreagenz auf Hydroperoxide); die besprühte Platte wird leicht bis zur optimalen Farbtintensität erhitzt.

5.2 Geräte

5.2.1 UV-VIS-Spektralphotometer

- Gerät: Spectronic® Genesys™ Spectrophotometers 2PC
Firma Harwardt, Weyarn, Deutschland
- Messbereich: 200 – 700 nm

5.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

- HPLC: Analytische HPLC von Knauer
- Pumpe: Knauer HPLC Pumpe K-1001
- Mischkammer: Dynamische Mischkammer, Knauer
- Injektor: Rheodyne 7125 mit 50 µl Probenschleife
- Trennsäule: Eurospher Si 100, Knauer, 5 µm Partikelgröße (250 x 4,0 mm)
- Fließmittel: Hexan/Diethylether/Essigsäure (90/10/1); Fluß 0,5 bzw. 1,0 ml/min
- Detektor: Knauer UV-Spektralphotometer Nr. 72387
mit analytischer Messzelle (10 mm)
- Ausgabe: Datenverarbeitungsprogramm Eurochrom 2000 (Knauer)

5.2.3 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

- HRGC 1:** Agilent 6890 Series GC System
(Agilent Technologies, Wilmington, USA)
- Injektor: Split/Splitless Injektor (1:20), 220°C
- Autosampler: Agilent 7683 Series Injektor
- Trennsäule: J&W DB-WAX (30 m x 0.25 mm, df = 0.25 µm)

Trägergas: 2 ml/min Helium 5.0, constant flow
 Temperaturprog.: 50°C, 3 min isotherm, 4°C/min, 220°C, 10 min isotherm

MS: Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD
 (Agilent Technologies, Wilmington, USA)

Ionenquelle: Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
 Temperatur 150°C
 Quellendruck 10^{-5} mbar
 Kathodenstrom 1,5 mA

Photomultiplier: 1300 V

Massenbereich: 38-450 u

Datenverwaltung und Auswertung erfolgte mit der PC-Software Xcalibur der Fa. Fisons Instruments, der Mass Spectral Database des National Institute of Standards and Technology (NIST MS Search 1.7) sowie der am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie erstellten Datenbank.

5.2.4 Kapilargaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS)

HRGC 2: Hewlett Packard 6890 Series
 Injektor: Split/Splitless Injektor, 250°C
 Injektionsvolumen: 1 µl splitless-Injektion
 Autosampler: CTC A 200 S (Zwingen, Schweiz)
 Trennsäule: J&W DB-WAX (60 m x 0.32 mm, df = 0.25 µm)
 Trägergas: 2 ml/min Helium 5.3
 Temperaturprog.: 50°C, 5°C/min, 220°C, 10 min isotherm

IRMS: Finnigan MAT Delta^{plus} XL (ThermoElectron, Dreieich)
 Ionenquelle: Kathodenspannung 3 kV
 Detektor: Kollektorsystem (Faraday-Cups) zur Detektion der Massen
 m/z 2 und 3 ($\delta^2\text{H}$ -Analysen); H_2
 m/z 44, 45 und 46 ($\delta^{13}\text{C}$ -Analysen); CO_2
 Massenbereich: 2-70 u

Interface 1 ($^2\text{H}/^1\text{H}$): Pyrolysereaktor (Al_2O_3 , 0,5 mm i.d., 320 mm)
 Temperatur 1440°C

Interface 2 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$): Oxidationsreaktor (Al_2O_3 , 0,5 mm i.d., 1,5 mm o.d., 320 mm)
 3 Drähte (Kupfer, Nickel, Platin; je 240 mm x 0,125 mm),
 Temperatur: 940°C

	Reduktionsreaktor (Al_2O_3 , 0,5 mm i.d., 1,5 mm o.d., 320 mm)
	3 Kupferdrähte (0,125 mm o.d.)
	Temperatur 620°C
Wassereparator:	für $\delta^{13}\text{C}$ -Analysen: Nafion [®] -Membran (Permapure, Toms River, NJ)
	0,6 mm i.d., 0,8 mm o.d., 20 cm in Glasrohr)
Kopplung:	'offene Kopplung' via 'open split' (druckluftgesteuert)

Datenverwaltung und Auswertung erfolgte mit der PC-Software ISODAT NT der Fa. ThermoFinnigan

5.2.5 Elementaranalysatoren (EA)

EA 1 ($\delta^2\text{H}$-Analysen):	HT Sauerstoff Analysator (HEKATech, Wegberg)
Pyrolysereaktor:	Keramikrohr, darin Glaskohlenstoffrohr gefüllt mit Nickelwolle, Glaskohlenstoffsplittern und Nickelkohle; Temperatur: 1440°C
Trärgas:	Helium 5.3
Carrier-Druck:	70 kPa
Autosampler:	Eurocap
Trennsäule:	5 Å Molekularsieb
Ofentemperatur:	85°C
Detektor:	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)
Kopplung an IRMS:	Nadelventil
EA 2 ($\delta^{13}\text{C}$-Analysen):	Euro Vector EA 3000 (Mailand, Italien)
Oxidationsreaktor:	Quarzrohr gefüllt mit Kupfer, Quarzwolle und Wolframoxid Temperatur: 1000°C
Trärgas:	Helium 5.3
Carrier-Druck:	75 kPa
Sauerstoff:	Sauerstoff 5.0, 15 kPa, 8 Sekunden
Autosampler:	Eurocap
Trennsäule:	Poropak QS
Ofentemperatur:	60°C
Detektor:	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)
Kopplung an IRMS:	Nadelventil

Datenverwaltung und Auswertung erfolgte mit der PC-Software ISODAT NT der Fa. ThermoFinnigan

5.2.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Gerät:	Bruker WM 400 (400 MHz)
Lösungsmittel:	CDCl_3
Standard:	CHCl_3 (^1H : $\delta = 7.26$ ppm; ^{13}C : $\delta = 77.0$ ppm)

Zur Kalibrierung der ^1H -Spektren diente das Lösungsmittelsignal bei dem o.g. Wert als interner Standard.

5.2.7 Sonstige Geräte

pH-Meter:	Labor pH-Meter, Fa. Schott Einstabmesselektrode, Ingold
Waagen:	Analysenwaage Satorius BP 210 S Mettler PL 300, Mettler 1200 N (Mettler Waagen GmbH, Gießen)
Ultraschallbad:	Bandelin SONOREX TK 52
Rotationsverdampfer:	Büchi Rotavapor Büchi Vacuum Controller B-270 Büchi Vacuum System B-173
Kühlzentrifugen:	Typ J2-21, Beckmann (Rotor JA 10) Typ RC2-B, Sorvall (Rotor GSA) Typ Universal 16R, Hettich (Rotor 1616)
Mixer:	Haushaltsmixer, Braun
UV-Lampe:	Minuvis, Wellenlänge 254 und 366 nm, Desaga, Heidelberg

5.3 Methoden

5.3.1 Pufferherstellung

Die Herstellung von Phosphatpuffern erfolgte durch Verdünnen von 1 molaren Stammlösungen (K_2HPO_4 und KH_2PO_4) auf die gewünschte Molarität und Mischen der verdünnten Lösungen, bis der entsprechende pH-Wert erreicht ist. Boratpuffer wurden durch Titration der entsprechenden Menge an Borsäure mit NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

Die Herstellung des Phosphatpuffers Triton X-100 pH 7,0 zur Extraktion der Hydroperoxidlyase aus Lauch erfolgte in Anlehnung an Fauconnier et al. (1997). Dazu werden für einen Liter Puffer 0,05 m NaH_2PO_4 , 0,005 m Glutathion, 0,005 m EDTA und 0,7% (w/v) Triton X-100 in Wasser gelöst und

nach dem Einstellen des pH-Werts mit NaOH auf pH 7,0 zu einem Liter aufgefüllt. Der Puffer ist stets frisch herzustellen.

5.3.2 Gewinnung einer Hydroperoxidlyase-aktiven Proteinfraction aus Lauch

Für die Gewinnung der Hydroperoxidlyase aus Lauch werden 100 g gekühlter, gewaschener und grob zerkleinerter Lauch in einem Haushaltsmixer mit 200 ml Phosphatpuffer Triton X-100 pH 7,0 für 0,5 bis 1 min bei 4°C homogenisiert. Das Homogenat wird durch zwei Lagen Baumwollwindeln filtriert und anschließend für 20 min bei 9000 Upm zentrifugiert. Das Protein im Überstand wird durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis 68% Sättigung ausgefällt. Nach einer Stunde Rühren bei 4°C wird zentrifugiert, und das ausgefällte Protein in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 (mit 0,7% (w/v) Triton X-100) aufgenommen. Der mittels HRGC-MS analysierte Etherextrakt dieser Enzympräparation ist frei von endogen gebildeten „Grünnoten“ aus dem Lauch und wurde direkt als Hydroperoxidlyase-Quelle eingesetzt.

5.3.3 Darstellung von 13-(S)-Linol- und 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid

Bei den folgenden Arbeitsschritten ist stets auf eine Abschirmung von Licht bzw. Sonneneinstrahlung zu achten, z. B. durch das Umwickeln der verwendeten Glasgefäße mit Aluminiumfolie. Für die präparative Darstellung des 13-(S)-Linolensäure- bzw. 13-(S)-Linolensäurehydroperoxids wird zunächst in einem 2 l-Dreihalskolben mit Thermometer und Rührer 850 ml 0,1 M Boratpuffer pH 9,0 vorgelegt und auf ca. 0°C abgekühlt. 1,0 g Fettsäure werden in 7-9 ml Ethanol gelöst und zu dem Puffer gegeben, wodurch eine trübe Suspension entsteht. Der gekühlte Kolben wird anschließend für 10 min mit Sauerstoff (Druckluft) durchspült. Nach Sauerstoffsättigung werden ca. 70-80 mg des kommerziellen Lipoxygenasepräparates in wenig Puffer gelöst zugesetzt. Während der Dauer der Reaktion (ca. 2 Stunden) wird weiterhin ununterbrochen Sauerstoff durchgeleitet und die Temperatur auf ca. 0°C gehalten. Das Ende der Reaktion kann photometrisch über die Dienabsorption bei UV 234 nm bestimmt werden, im Allgemeinen ist die Reaktion dann beendet, wenn die trübe Substratlösung klar geworden ist und kaum mehr schäumt. Durch die Zugabe von 6 N HCl wird die Reaktion abgebrochen und der pH-Wert des Ansatzes auf pH 3 eingestellt. Die Lösung wird mit Natriumchlorid gesättigt und mit drei 150 ml-Portionen Diethylether ausgeschüttelt. Der Etherextrakt wird mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum bei maximal 30°C abrotiert. Die Umsetzung verläuft nahezu quantitativ, eine Aufreinigung ist nur für die Analyse der Hydroperoxide mittels EA-C/P-IRMS notwendig, für weitere chemische und enzymatische Umsetzungen kann das Rohprodukt direkt verwendet werden.

Die Abtrennung der 13-(S)-Hydroperoxide von den ebenfalls gebildeten, wenn auch nur gering vorhandenen Regioisomeren, gelingt mittels Aufreinigung an Kieselgel. Die Chromatographie erfolgt in

einer Glassäule 75 x 5 cm mit einer Mischung aus Pentan/ Diethylether/Essigsäure 70/30/1. Es werden Fraktionen zu ca. 100 ml gesammelt und diese mittels DC (Fließmittel ebenfalls Pentan/ Diethylether/Essigsäure 70/30/1; Detektion UV sowie beide Sprühreagenzien) und NP-HPLC kontrolliert. Fraktionen, die nur das 13-(S)-Hydroperoxid enthalten werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum abgezogen. Durch den Zusatz von Cyclohexan kann die in den Fraktionen enthaltene Essigsäure azeotrop mit abdestilliert werden. Das 13-(S)-Fettsäurehydroperoxid kann direkt zur Isotopenanalyse mittels Elementaranalysator verwendet werden, wenn sorgfältig Fließmittel und Essigsäure entfernt wurden und kein Lösungsmittel- bzw. Essiggeruch mehr wahrnehmbar ist. Parallel werden Blindwerte ohne Enzym angesetzt, um auf etwaige Isotopendiskriminierungen bei der Probenbehandlung und -aufarbeitung zu prüfen. Bei der Lagerung als Reinsubstanzen bei -18°C und unter Argon zeigt das 13-(S)-Linolsäurehydroperoxid nach etwa 4 Wochen Zersetzungserscheinungen, das 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid bereits nach einer Woche. Eine Stabilitätssteigerung kann durch das Einfrieren der Hydroperoxide in Cyclohexan erreicht werden.

13(S)-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiensäure:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm):

δ = 0.87 (t, 3H, H18), 1.29 (m, 16H, H4-H8, H15-H17), 1.62 (m, 2H, H3), 2.17 (m, 2H, H14), 2.34 (t, 2H, H2), 4.37 (dt, 1H, H13), 5.49 (dt, 1H, H9), 5.56 (dd, 1H, H12), 6.00 (dd, 1H, H10), 6.56 (dd, 1H, H11).

13(S)-Hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm):

δ = 0.94 (t, 3H, H18), 1.29 (m, 8H, H4-H7), 1.61 (m, 2H, H3), 2.02 (q, 2H, H17), 2.16 (dt, 2H, H8), 2.33 (t, 2H, H2), 2.29 (m, 1H, H14a), 2.45 (m, 1H, H14b), 4.40 (dt, 1H, H13), 5.30 (dt, 1H, H9), 5.46 (m, 2H, H15, H16), 5.57 (dd, 1H, H12), 5.97 (dd, 1H, H10), 6.55 (dd, 1H, H11).

5.3.4 Abbau der Fettsäurehydroperoxide mittels Bortrifluorid

Die chemische Spaltung der Fettsäurehydroperoxide mittels Bortrifluorid erfolgte nach Gardner und Plattner (1984). Dazu werden ca. 50 mg Fettsäurehydroperoxid in 5 ml Diethylether gelöst, mit 250 µl BF₃-Etherat versetzt und bei Raumtemperatur eine halbe Stunde lang gerührt. Anschließend wird zweimal mit 2 ml Wasser gewaschen. Die Etherphase wird mit Natriumsulfat getrocknet und kann nach dem Einengen im Stickstoffstrom auf etwa 1 ml direkt mittels HRGC-MS bzw. HRGC-IRMS analysiert werden.

5.3.5 Abbau der Fettsäurehydroperoxide mittels Bentonit

Die chemisch-thermische Spaltung der Fettsäurehydroperoxide mittels Bentonit erfolgte nach Kimoto und Gaddis (1969). Dazu werden 5 g Bentonit zunächst mit fünf 70 ml-Portionen 6 N HCl gewaschen, filtriert, und mit destilliertem Wasser solange gewaschen, bis das Filtrat klar erscheint und keine Reaktion mehr mit Silbernitrat-Lösung eingeht. Nach dem Trocknen bei 120°C im Trockenschrank kann das so vorbereitete Bentonit zur Spaltung der Fettsäurehydroperoxide eingesetzt werden. Dazu werden ca. 100 mg Fettsäurehydroperoxid in einem schließbaren Glasröhrchen mit 20 mg gewaschenem Bentonit versetzt und geschlossen für 45 min bei 120°C im Ölbad erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 2 bis 3 ml Diethylether hinzugefügt, mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Die Etherlösung kann direkt mittels HRGC-MS bzw. nach weiterer Aufkonzentration im Stickstoffstrom auch mittels HRGC-IRMS analysiert werden.

5.3.6 Abbau der Fettsäurehydroperoxide mittels Hydroperoxidlyase aus Lauch

Die enzymatische Spaltung der Fettsäurehydroperoxide mittels Hydroperoxidlyase erfolgte in Anlehnung an Fauconnier et al. (2002). Dazu werden unter stetigem Rühren ca. 100 mg Fettsäurehydroperoxid in 20 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 (mit 0,7% (w/v) Triton X-100) suspendiert und für 90 min bei Raumtemperatur mit 3,0 ml der nach 5.3.2 gewonnenen Hydroperoxidlyase-Präparation aus Lauch umgesetzt. Nach Extraktion der gebildeten flüchtigen Bestandteile mit Diethylether wird der Etherextrakt getrocknet, filtriert und an einer Vigreux-Kolonnen schonend bei 45°C auf etwa 1 ml aufkonzentriert. Die so vorbereitete Probe kann direkt mittels HRGC-MS und HRGC-IRMS analysiert werden. Zur Überprüfung auf Enzymaktivität und zur Ermittlung des Anteils an rein thermischer Aldehyd-Produktion durch Hydroperoxid-Spaltung im Injektor des HRGC-MS Systems werden zusätzlich Ansätze mit 10 mg Fettsäurehydroperoxid und 200 bis 500 µl der nach 5.3.2 gewonnenen Hydroperoxidlyase-Präparation, sowie Ansätze ohne Enzympräparation bzw. mit thermisch inaktivierter Enzympräparation, durchgeführt.

5.3.7 Reduktion von C₆-Aldehyden zu C₆-Alkoholen mittels *S. cerevisiae*

5.3.7.1 Fermentative Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol

Die fermentative Reduktion von Hexanal zu 1-Hexanol erfolgte in Anlehnung an Fauconnier et al. (1999). Dazu werden in einem 500 ml Erlenmeyerkolben 50 g Glucose (Acros, $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -10,8 \pm 0,1\text{‰}$) und 0,4 g Ammoniumsulfat in 400 ml demineralisiertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der pH-Wert auf pH 4,0 eingestellt und 20 µl Aldehyd als Substrat zugegeben. Nach Zugabe von 15 g Trockenreinzuchthefermiviv[®] wird für 5 Stunden bei 25°C und 120 Upm inkubiert. Nach beendeter Inkubation wird die Hefe durch

Zentrifugation für 25 min. bei 9000 Upm abgetrennt und der Überstand mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert. Parallel wurden Blindwert ohne Hefezugabe angesetzt, um auf etwaige Isotopendiskriminierungen bei der Probenbehandlung und -aufarbeitung zu prüfen.

Als Substrate wurden aus der arbeitskreisinternen Referenzsammlung ein synthetisches Hexanal ($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -50 \pm 2\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -24,6 \pm 0,1\text{‰}$; EA-IRMS) und ein natürliches Hexanal ($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -243 \pm 3\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -33,6 \pm 0,1\text{‰}$; EA-IRMS) eingesetzt, bei der Auswahl der Substrate im Vorfeld waren möglichst große Unterschiede in den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten ausschlaggebend. Durch Mischung dieser beiden Proben in 20%-igen Schritten bei der Substratzugabe wurden weitere Hexanalproben mit definierten, globalen Isotopenwerten dargestellt. Mitgeführte Blindwerte dienten auch hier dem Vergleich zu den im Vorfeld durchgeführten theoretischen Berechnungen der Isotopenwerte dieser Verschnitte.

5.3.7.2 Fermentative Totalreduktion von (E)-2-Hexenal zu zu 1-Hexanol

Die fermentative Reduktion von (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol erfolgte wie unter 5.3.7.1 beschrieben. Als Substrate wurden ein in der arbeitskreisinternen Referenzsammlung vorhandenes synthetisches (E)-2-Hexenal ($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -21 \pm 5\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -28,4 \pm 0,1\text{‰}$; EA-IRMS) sowie ein natürliches (E)-2-Hexenal ($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -365 \pm 1\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -27,7 \pm 0,1\text{‰}$; EA-IRMS) ausgewählt, leider konnte in diesem Fall zugunsten eines möglichst großen Unterschieds in den $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Werten nur ein kleiner Unterschied in den $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten realisiert werden. Auch hier wurden Mischungen dieser beiden Proben in 20%-igen Schritten bei der Substratzugabe zur Darstellung weiterer (E)-2-Hexenalproben mit definierten Isotopenwerten herangezogen, mitgeführte Blindwerte ebenso mit den theoretisch berechneten Werten verglichen.

5.3.7.3 Fermentative Partialreduktion von (E)-2-Hexenal zur Darstellung von (E)-2-Hexenol

Da bei der Hefe-katalysierten Reduktion von (E)-2-Hexenal das zwischenzeitlich gebildete (E)-2-Hexenol rasch weiter zum 1-Hexanol umgesetzt wird, wurde die Inkubation frühzeitig abgebrochen und der Ansatz unmittelbar aufgearbeitet, wodurch ein einfacher Zugang zum (E)-2-Hexenol ermöglicht wurde. Die partielle Reduktion von (E)-2-Hexenal zu (E)-2-Hexenol erfolgte mit dem natürlichen (E)-2-Hexenal ($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -365 \pm 1\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -27,7 \pm 0,1\text{‰}$; EA-IRMS) wie unter 5.3.7.1 beschrieben, jedoch wurde in diesem Fall die Inkubation bereits nach 10 bis 30 min abgebrochen und die Reaktionsprodukte unmittelbar aufgearbeitet.

5.3.7.4 Fermentative Reduktion von (Z)-3-Hexenal zu (Z)-3-Hexenol

Als Substrat für die Hefereduktion stand lediglich ein (Z)-3-Hexenal (20 % in Triacetin) mit den Isotopenwerten $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -48 \pm 1\text{‰}$ und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -26,1 \pm 0,1\text{‰}$ (HRGC-P/C-IRMS) zur Verfügung. Für die Reduktion von (Z)-3-Hexenal aus dem enzymatischen Abbau des 13-(S)-Linolensäurehydroperoxids siehe 5.3.7.5. Die Umsetzung erfolgte direkt mit 60 μl der Triacetin-Lösung wie unter 5.3.7.1 beschrieben.

5.3.7.5 Fermentative Reduktion von Hexanal und (Z)-3-Hexenal aus dem enzymatischen Abbau von 13-(S)-Linol- und 13-(S)-Linolensäurehydroperoxid

Die nach 5.3.6 erhaltenen und mittels HRGC-MS und -IRMS analysierten Probe wurden vorsichtig im Stickstoffstrom weiter auf ca. 300 bis 400 μl eingengt und direkt als Substrat für die Hefereduktion nach 5.3.7.1 herangezogen. Nach Zugabe zum Nährmedium wurde der Rest Diethylether weitestgehend mit Stickstoff abgeblasen und schließlich bei pH 4,0 mit der Hefe umgesetzt.

5.3.7.6 Fermentative Reduktion von Hexanal und (E)-2-Hexenal zu 1-Hexanol in D_2O

Für die Umsetzung von Hexanal und (E)-2-Hexenal mittels Hefe in D_2O wurden je 3 μl Aldehyd in das autoklavierte Nährmedium bestehend aus 80 ml D_2O , 10 g Glucose (Acros, $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = -10,8 \pm 0,1\text{‰}$) und 0,1 g Ammoniumsulfat pipettiert. Der pH-Wert wurde mit möglichst wenig HCl auf pH 4,0 eingestellt und nach Zugabe von 3 g Trockenreinzuchtheife für 5 Stunden bei 25°C und 120 Upm inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde die Hefe durch Zentrifugation für 25 min. bei 9000 Upm abgetrennt und der Überstand im Scheidetrichter mit Diethylether extrahiert. An der Vigreux-Kolonne wurde das Lösungsmittel schonend bei 45°C auf etwa 1 ml aufkonzentriert, die so erhaltene Lösung direkt zur Messung mittels HRGC-MS verwendet.

5.3.8 Darstellung von Gärungsalkoholen mittels *S. cerevisiae* aus C_3 -/ C_4 -Zuckern

Die Darstellung der Gärungsalkohole 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol erfolgte durch die Vergärung von Saccharoselösungen (C_3 -Rübenzucker, C_4 -Rohrzucker) durch die Trockenreinzuchtheife Lalvin W[®] in einem einfachen Nährmedium. Dafür wurden insgesamt 160 g Saccharose, bestehend aus 100 % Rüben- oder Rohrzucker bzw. Mischungen dieser in 10%-igen Schritten (w/w), in 840 ml Nährmedium, bestehend aus 0,5 g/l MgSO_4 , 0,5 g/l KH_2PO_4 und 1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (mit KOH eingestellt auf pH 4,0), gelöst. Für die Vergärung des Agavendicksaftes wurden 230 g des 70%-igen Fructose-Glucose-Sirups in 800 ml Nährmedium gelöst. Die so vorbereitete Lösung wurde autoklaviert, nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 10 g Lalvin W[®] versetzt und mit einem Gärröhr-

chen verschlossen. Es wurde bei Raumtemperatur vollständig vergoren bis keine CO₂-Entwicklung mehr stattfand und die Hefe sich am Boden des Gefäßes abgesetzt hat, was üblicherweise 3 Tage in Anspruch nahm. Die vergorene Lösung wurde zum Abtrennen der Hefe für 25 min bei 9000 U_{pm} zentrifugiert und der Überstand mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert.

Für die Vergärung von Kartoffel- und Maisstärke wurde zunächst die Stärke hydrolysiert, entsprechend Hibbert und Percival (1930) mit verdünnter Schwefelsäure. Dafür wurden jeweils 160 g Stärke in 840 ml 2 N H₂SO₄ (enthält zusätzlich 0,5 g/l MgSO₄, 0,5 g/l KH₂PO₄ und 1 g/l (NH₄)₂HPO₄) gelöst und so lange bei 80-90°C temperiert, bis keine blaue Färbung mehr mit J₂/KI stattfand (ca. 1 Stunde). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit KOH auf pH 4,0 eingestellt, autoklaviert, und nach Zugabe von 10 g Lalvin W[®] bei Raumtemperatur vollständig vergoren. Nach beendeter Gärung erfolgte auch hier die Aufarbeitung der Probe mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion.

5.3.9 Darstellung von Gärungsalkoholen mittels *S. cerevisiae* aus Traubensaft und dotierten C₃-/C₄-Zuckern

Für die Gärungsexperimente mit Traubensaft und C₃-/C₄-Zuckerzusatz wurde handelsüblicher weißer Traubensaft einer Charge mit einem Zuckergehalt von 16% herangezogen, der ohne zusätzliche Nährsalzzugabe vergoren wurde. Dazu wurde 1 l Traubensaft in einem autoklavierten Gefäß mit 16 g * X (X = 1-10) C₃- bzw. C₄-Zucker (Rüben- und Rohrzucker) versetzt, und mit 10 g Lalvin W[®] bei Raumtemperatur wie unter 5.3.6 beschrieben vollständig vergoren. In gleicher Weise wurde auch Traubensaft mit jeweils 8 g * X (X = 1-10) C₃- und C₄-Zucker behandelt, nach beendeter Gärung erfolgte die Aufarbeitung wie unter 5.3.8 beschrieben.

5.3.10 Darstellung von Gärungsalkoholen mittels *S. cerevisiae* aus Aminosäuren

Für die Darstellung von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol aus L-Phenylalanin bzw. L-Valin wurden 0,1 g der betreffenden Aminosäure in 20 ml Nährlösung (siehe 5.3.8) ohne zusätzliche Stickstoffsupplementierung gelöst, mit 1,0 g Saccharose (C₃-Rübenzucker) versetzt und mit 0,2 g der Trockenreinzuchtheife Lalvin W[®] 18 h lang inkubiert. Der HRGC-MS Vergleich mit entsprechenden Blindversuchen ergab, dass 91,8-99,5% der gebildeten Alkohole den zugesetzten Aminosäuren entstammen. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend 5.3.8.

5.3.11 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die nach 5.3.7-5.3.9 erhaltenen Fermentationslösungen wurden mit demineralisiertem Wasser verdünnt (1+1, v/v) und für 48 h bei 35°C einer kontinuierlichen Flüssig-Flüssig-Extraktion mit 210

ml eines Gemisches aus Pentan/Dichlormethan (2+1, v/v) unterworfen. Nach Trocknung des jeweiligen organischen Extraktes über wasserfreiem Natriumsulfat erfolgte eine Aufkonzentrierung auf etwa 1 ml durch schonende Destillation (45°C) des Lösungsmittels an einer 40 cm langen Vigreux-Kolonne.

Literaturverzeichnis

- Abelson, P. H. und Hoering, T. C. (1961) Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **47**, 623-632.
- Akakabe, Y., Matsui, K. und Kajiwara, T. (2003) 2,4-Decadienals are produced via (R)-11-HPITE from arachidonic acid in Marine green alga *Ulva conglobata*. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 3607-3609.
- Akakabe, Y., Matsui, K. und Kajiwara, T. (2005) Stereochemical correlation between 10-hydroperoxyoctadecadienoic acid and 1-octen-3-ol in *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake* mushrooms, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1539-1544.
- Alvarez, F. J., Ermer, J., Hübner, G., Schellenberger, A. und Schowen, R. L. (1991) 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**, 8402-8409.
- Aursand, M., Mabon, F. und Martin, G. J. (1997) High-Resolution ¹H and ²H NMR spectroscopy of pure essential fatty acids for plants and animals, *Magn. Res. Chem.* **35**, 91-100.
- Axelrod, B. (1974) Lipoxygenases, *Adv. Chem. Ser.* **136**, 324-348.
- Barrie, A., Bricout, J. und Koziat, J. (1984) Gas chromatography-stable isotope ratio analysis at natural abundance levels, *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 583-588.
- Bate, N. J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J. M. C., Thompson, J. E. und Rothstein, S. J. (1998) Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P450 (CYP74B), *FEBS Lett.* **394**, 21-24.
- Bauer-Christoph, C., Wachter, H., Christoph, N., Roßmann, A. und Adam, L. (1997) Assignment of raw material and authentication of spirits by gas chromatography, hydrogen- and carbon-isotope ratio measurements. I. Analytical methods and results of a study of commercial products, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **204**, 445-452.
- Belin, J.-M., Dumont, B. und Ropert, F. (1998) Enzymatic process for the preparation of flavours, in particular the ionones and C₆ to C₁₀ aldehydes, United States Patent US 5,705,372
- Belitz, H.-D., Grosch, W. und Schieberle, A. (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

- Berg, L. (1999) Separation of t-amyl alcohol from 2-methyl-1-propanol by azeotropic distillation, United States Patent US 5,908,538
- Bilke, S. und Mosandl, A. (2002) Authenticity assessment of lavender oils using GC-P-IRMS: $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope ratios of linalool and linalyl acetate, *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 532-535.
- Billault, I., Guit, S., Mabon, F. und Robins, R. (2001) Natural deuterium distribution in long-chain fatty acids is nonstatistical: a site-specific study by quantitative ^2H NMR spectroscopy, *Chembiochem.* **2**, 425-431.
- Billault, I., Duan, J.-R., Guit, S. und Robins, R. J. (2005) Quantitative deuterium isotopic profiling at natural abundance indicates mechanistic differences for Δ^{12} -epoxidase and Δ^{12} -desaturase in *Vernonia galamensis*, *J. Biol. Chem.* **18**, 17645-17651.
- Blanchard, J. S. und Wong, K. K. (1991) Isotope effects on enzyme-catalyzed redox reactions, In: Cook, P. F. (Hrsg.): Enzyme mechanism from isotope effects. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 341-365.
- Blee, E. (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions, *Prog. Lipid. Res.* **37**, No. 1, 33-72.
- Boner, M. und Förstel, H. (2004) Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef, *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 301-310
- Boonprab, K., Matsui, K., Akakabe, Y., Yotsukura, N. und Kajiwara, T. (2003a) Hydroperoxy-arachidonic acid mediated n-hexanal and (Z)-3- and (E)-2-nonenal formation in *Laminaria angustata*, *Phytochemistry* **63**, 669-678.
- Boonprab, K., Matsui, K., Yoshida, M., Akakabe, Y., Chirapart, A. und Kajiwara, T. (2003b) C6-aldehyde formation by fatty acid hydroperoxide lyase in brown alga *Laminaria angustata*, *Z. Naturforsch.* **56c**, 207-214.
- Bourela, G., Nicaudb, J.-M., Nthangeni, B., Santiago-Gomez, P., Belina, J.-M. und Husson, F. (2004) Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in *Yarrowia lipolytica* and biogenesis of volatile aldehydes, *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 293-299.
- Brash, A., Tijet, N. und Whitehead, M. (2001) Muskmelon (*Cucumis melo*) hydroperoxide lyase and uses thereof, United States Patent US 6,271,018 B1
- Brash, A., Tijet, N. und Whitehead, I. M. (2006) Muskmelon (*Cucumis melo*) hydroperoxide lyase and uses thereof, United States Patent US 7,037,693 B2

- Braunsdorf, R., Hener, U., Stein, S. und Mosandl, A. (1993) Comprehensive cGC-IRMS analysis in the authenticity control of flavours and essential oils. Part I: Lemon Oil, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **197**, 137-141.
- Bréas, O., Fourel, F. und Martin, G. J. (1994) ^{13}C analysis of aromas and perfumes by a coupled GC-IRMS technique. The case of vanillin and leaf alcohol extracts, *Analisis* **22**, 268-272.
- Brenna, E., Fronza, G., Fuganti, C., Gatti, F. G., Grande, V., Serra, S., Guillou, C., Reniero, F. und Serra, F. (2005) Stable isotope characterization of the *ortho*-oxygenated phenylpropanoids: coumarin and melilotol, *J. Agric. Food Chem.* **53**, 9383-9388.
- Bricout, J. (1978) Recherches sur le fractionnement des isotopes stables de l'hydrogène et de l'oxygène dans quelques végétaux, *Rev. Cytol. Biol. Végét.-Bot.* **1**, 133-209.
- Brunerie, P. und Koziat, Y. (1997) Process for producing natural cis-3-hexenol from unsaturated fatty acids, United States Patent US 5,620,879
- Burgoyne, T. W. und Hayes, J. M. (1998) Quantitative production of H_2 by pyrolysis of gas chromatographic effluents, *Anal. Chem.* **70**, 5136-5141.
- Cabañero, A. I., Recio, J. L. und Rupérez, M. (2006) Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: a new perspective on Honey adulteration detection, *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9719-9727.
- Camin, F., Wietzerbin, K., Blanch Cortes, A., Haberhauer, G., Lees, M. und Versinit, G. (2004) Application of multielement stable isotope ratio analysis to the characterization of french, italian, and spanish ceeses, *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6592-6601.
- Camin, F., Bontempo, L., Heinrich, K., Horacek, M., Kelly, S. D., Schlicht, C., Thomas, F., Monahan, F. J., Hoogewerff, J. und Roßmann, A. (2007) Multi-element (H, C, N, S) stable isotope characteristics of lamb meat from different european regions, *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 309-320.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H. und Poulson, S. R. (2004) Carbon and hydrogen isotopic fractionation during lipid biosynthesis in a higher plant (*Cryptomeria japonica*), *Phytochemistry* **65**, 323-330.
- Christeller, J. T., Laing, W. A. und Troughton, J. H. (1976) Isotope discrimination by ribulose-1,5-diphosphat carboxylase, *Plant Physiol.* **57**, 580-582.
- Clark, G. S. (1990) Leaf Alcohol, *Perfumer & Flavorist* 15 (Juli/August), 47-52.

- Collister, J. W., Rieley, G., Stern, B., Eglinton, G. und Fry, B. (1994) Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms, *Organic Geochemistry* **21**, 619-627.
- Conte, M. H., Weber, J. C., Carlson, P. J. und Flanagan, L. B. (2003) Molecular and carbon isotope composition of leaf wax in vegetation and aerosols in a northern prairie ecosystem, *Oecologia* **135**, 67-77.
- Cooper, T. G. und Wood, H. G. (1971) The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate, *J. Biol. Chem.* **246**, 5488-5490.
- Craig, H. (1961) Isotopic variations in meteoric waters, *Science* **133**, 1702-1703.
- Culp, R. A. und Noakes, J. E. (1990) Identification of isotopically manipulated cinnamic aldehyde and benzaldehyde, *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1249-1255.
- Dansgaard, W. (1964) Stable Isotopes in precipitation, *Tellus* **16**, 436-468.
- De Groot, J. J. M. C., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F. G., Boldingh, J., Wever, R. und van Gelder, B. F. (1975) Demonstration by EPR Spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-1, *Biochim. Biophys. Acta* **377**, 71-79.
- DeNiro, M. J. und Epstein, S. (1977) Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis, *Science* **197**, 261-263.
- Derrick, P. J., Falick, A. M. und Burlingame, A. L. (1973) Elimination of water from hexanol at 10^{-11} to 10^{-5} second following field ionisation, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 437-443.
- Deuser, W. G. und Degens, E. T. (1967) Carbon isotope fractionation in the system CO_2 (gas) – CO_2 (aqueous) – HCO_3^- (aqueous), *Nature* **215**, 1033-1035.
- Downton, W. J. S., Grant, W. J. R. und Robinson, S. P. (1985) Photosynthetic and stomatal response of spinach leaves to salt stress, *Plant Physiol.* **77**, 85-88.
- Duvick, J. und Gilliam, J. (2002) Hydroperoxide lyase gene from maize and methods of use, United States Patent US 6,444,874 B1
- Ehleringer, J. R., Field, C. B., Lin, Z. und Kuo, C. (1986) Leaf carbon isotope and mineral composition in subtropical plants along an irradiance cline, *Oecologia* **70**, 520-526.

- Elss, S., Preston, C., Appel, M., Heckel, F. und Schreier, P. (2006) Influence of technological processing on apple aroma analysed by high resolution gas chromatography-mass spectrometry and on-line gas-chromatography-combustion/pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry, *Food Chem.* **98**, 269-276.
- Empfehlung der Arbeitsgruppe Stabilisotopenanalytik, Positionspapier der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (2007) Aufgaben und Möglichkeiten der Isotopenverhältnisanalytik in der Herkunfts- und Authentizitätsuntersuchung von Fleisch, *Lebensmittelchemie* 61, 105-106.
- Epstein, S. und Mayeda, T. (1953) Variations of ^{18}O content of waters from natural sources, *Geochim. Cosmochim. Acta* **4**, 213-224.
- Estep, M. F., Tabita, F. R., Parker, P. L. und Van Baalen, C. (1978) Carbon isotope fractionation by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from various organisms, *Plant Physiol.* **61**, 680-687.
- Etschmann, M. M. W., Sell, D. und Schrader, J. (2004) „Rose aroma from the bioreactor“ – 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate production with yeasts: Screening, medium optimization and bioprocess design, In: Hofmann, T., Rothe M. und Schieberle, P. (Hrsg.): State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology, Proceedings of the 7th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, held in Eisenach, Germany on 21.-23. April 2004. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 248-253.
- Evans, J. R., Sharkey, T. D., Berry, J. A. und Farquhar, G. D. (1986) Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO_2 diffusion in leaves of higher plants, *Aust. J. Plant Physiol.* **13**, 281-292.
- Farquhar, G. D., O'Leary, M. H. und Berry, J. A. (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves, *Aust. J. Plant Physiol.* **9**, 121-137.
- Fauconnier, M.-L., Perez, A. G., Sanz, C. und Marlier, M. (1997) Purification and characterization of tomato leaf (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hydroperoxide lyase, *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4232-4236.
- Fauconnier, M.-L., Mpambara, A., Delcarte, J., Jacques, P., Thonart, P. und Marlier, M. (1999) Conversion of green note aldehydes into alcohols by yeast alcohol dehydrogenase, *Biotechnol. Letters* **21**, 629-633.
- Fauconnier, M.-L., Delcarte, J., Jaziri, M., du Jardin, P. und Marlier, M. (2002) Fatty acid hydroperoxides biotransformation by potato tuber cell-free extracts, *J. Plant Physiol.* **159**, 1055-1060.

- Fink, K., Richling, E., Heckel, F. und Schreier, P. (2004) Determination of $^2\text{H}/^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of (E)-methyl cinnamate from different sources using isotope ratio Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3065-3068.
- Flanagan, L. B., Bain, J. F. und Ehleringer, J. R. (1991) Stable oxygen and hydrogen isotope composition of leaf water in C_3 and C_4 plant species under field conditions, *Oecologia* **88**, 394-400.
- Fogel, M. J. und Cifuentes, L. A. (1993) Isotope fractionation during primary production, In: Engel, M. H. und Macko, S. (Hrsg.): *Organic Geochemistry, Principles and Application*, Plenum Press, New York, 73-98.
- Freyer, H. D. (1979) On the ^{13}C record in tree rings II, Registration of microenvironmental CO_2 and anomalous pollution effects, *Tellus* **31**, 308-312.
- Friedel, R. A., Shultz, J. L. und Sharkey, A. G. (1956) Mass spectra of alcohols, *Analytical Chemistry* **28**, 926-934.
- Friedmann, I. (1953) Deuterium content of natural waters and other substances, *Geochim. Cosmochim. Acta* **4**, 89-103.
- Fronza, G., Fuganti, C., Grasselli, P., Servi, S., Zucchi, G., Barbeni, M. und Villa, M. (1995a) Reduction of carboxylates to alkanols catalyzed by *Colletotrichum gloeosporoides*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 439-440.
- Fronza, G., Fuganti, C., Grasselli, P., Servi, S. und Zucchi, G. (1995b) Natural abundance ^2H nuclear magnetic resonance study of the origin of 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate, *J. Agric. Food Chem.* **43**, 439-443.
- Fronza, G., Fuganti, C. und Zucchi, G. (1996) Natural abundance ^2H nuclear magnetic resonance study of the origin of n-hexanol, *J. Agric. Food Chem.* **44**, 887-891.
- Fronza, G., Fuganti, C., Guillou, C., Reniero, F. und Joulain, D. (1998) Natural abundance ^2H nuclear magnetic resonance study of the origin of raspberry ketone, *J. Agric. Food Chem.* **46**, 248-256.
- Fukushige, H. und Hildebrand, D. (2005) Watermelon (*Citrullus lanatus*) hydroperoxide lyase greatly increases C_6 aldehyde formation in transgenic leaves, *J. Agric. Food Chem.* **53** (6), 2046-2051.
- Galliard, T., Phillips, D. R. und Reynolds, J. (1976a) The formation of cis-3-nonenal and hexanal from linoleic acid hydroperoxide isomers by a hydroperoxide cleaving enzyme system in cucumber (*Cucumis sativus*) fruits, *Biochem. Biophys. Acta* **441**, 181-192.

- Galliard, T., Matthew, J. A., Fishwick, M. J. und Wright, A. J. (1976b) The enzymatic degradation of lipids resulting from physical disruption of cucumber (*Cucumis sativus*) fruit, *Phytochemistry* **15**, 1647-1650.
- Galliard, T. und Matthew, J. A. (1977) Lipoxygenase-mediated cleavage of fatty acids to carbonyl fragments in tomato fruit, *Phytochemistry* **16**, 339-343.
- Gardner, H. W. und Plattner, R. D. (1984) Linoleate hydroperoxides are cleaved heterolytically into aldehydes by a Lewis acid in aprotic solvent, *Lipids* **19**, 294-301.
- Gardner, H. W. (1989) Soybean lipoxygenase-1 enzymatically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism, *Biochim. Biophys. Acta* **1001**, 274-281.
- Gardner, H. W. Recent Investigations into the lipoxygenase pathway of plants (1991), *Biochim. Biophys. Acta* **1084**, 221-239.
- Gardner, H. W., Weisleder, D. und Plattner, R. D. (1991a) Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide-metabolizing activity in tissues of soybean, *Glycine max*, *Plant Physiol.* **97**, 1059-1072.
- Gardner, H. W., Weisleder, D. und Plattner, R. D. (1991b) An enzyme preparation from seeds of soybean *Glycine max* converts 9-(S)-hydroperoxide of linoleic acid into 4-hydroxy-2(E)-nonenal, *Plant Physiol.* (1. Suppl.) **96**, 137.
- Gargouri, M. und Legoy, M.-D. (1998) Biosynthesis and analysis of 3Z-nonenal, *Biotechnol. Letters* **20**, 23-26.
- Gargouri, M., Drouet, P. und Legoy, M. D. (2004) Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves. Volatile C₆-aldehyde production from hydroperoxy-fatty acids, *J. Biotechnol.* **111** (1), 59-65.
- Gat, J. R. (1971) Comments on the stable isotope method in the regional groundwater investigations. *Water Resour. Res.* **7**, 980-993.
- Georgi, M., Voerkelius, S., Roßmann, A., Graßmann, J. und Schnitzler, W. H. (2005) Multielement isotope ratios of vegetables from integrated and organic production, *Plant and Soil* **275**, 93-100.
- Gleixner, G. und Schmidt, H.-L. (1997) Carbon isotope effects on the fructose-1,6-bisphosphate aldolase reaction, Origin for non-statistical ¹³C-distributions in carbohydrates, *J. Biol. Chem.* **272**, No. 9, 5382-5387.

- Glickman, M. H. und Klinman, J. P. (1995) Nature of rate-limiting steps in the soybean lipoxygenase-1 reaction, *Biochemistry* **34**, 14077-14092.
- Goers et al. (1989) Process for preparing a green leaf essence, United States Patent, US 4,806,379
- Gramatica, P., Ranzi, B. M., und Manitto, P. (1981) Reduction of cinnamyl alcohols and cinnamaldehydes by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioorganic Chemistry* **10**, 22-28.
- Grechkin, A. N. und Hamberg, M. (2004) The „heterolytic hydroperoxide lyase“ is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal, *Biochim. Biophys. Acta* **1636**, 47-58.
- Grechkin, A. N., Brühlmann, F., Mukhtarova, L. S., Gogolev, Y. V. und Hamberg, M. (2006) Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the homolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals, *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 1419-1428.
- Grosch, W., Schieberle, P. und Laskawy, G. (1981) Model experiments about the formation of volatile carbonyl compounds from fatty acid hydroperoxides, In: Schreier, P. (Hrsg.): Flavor '81, Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 443-444.
- Habfast, K. (1997) Advanced isotope ratio mass spectrometry I: Magnetic isotope ratio mass spectrometers, In: Platzner, I. T. (Hrsg.): Modern isotope ratio mass spectrometry, Band 145, in: Winefordner, J. D. (Hrsg.): Chemical analysis (A series of monographs on analytical chemistry and its application), Wiley Verlag, Weinheim, 11-82.
- Häusler, A., Silke, N., Lerch, K. und Muheim, A. (1997) Hydroperoxide lyases, European Patent Application, Publication Number EP0801133
- Häusler, A., Ehret, C. und Binggeli, E. (2000) Process for the production of degradation products of fatty acids, United States Patent US 6,150,145
- Häusler, A., Lerch, K., Muheim, A. und Silke, N. (2001) Hydroperoxide lyases, United States Patent US 6,238,898 B1
- Hanneguelle, S. (1991) Etude de la biosynthese des monoterpenes par la mesure du fractionnement isotopique naturel spécifique en resonance magnetique nucleaire et spectrometrie de masse. Applications au controle d'origine et de qualite d'huiles essentielles, Dissertation, Universität Nantes
- Hatanaka, A. und Harada, T. (1973) Formation of *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal and *cis*-3-hexenol in macerated *Thea sinensis* leaves, *Phytochemistry* **12**, 2341-2346.

- Hatanaka, A., Kajiwara, T. und Harada, T. (1975) Biosynthetic pathway of cucumber alcohol: trans-2,cis-6-Nonadienol via cis-3,cis-6-nonadienal, *Phytochemistry* **14**, 2589-2592.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T., Sekiya, J., Imoto, M. und Inouye, S. (1982) Solubilization and properties of the enzyme-cleaving 13-hydroperoxylinolenic acid in tea leaves, *Phytochemistry* **21**, 13-17.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T., Sekiya, J. und Toyota, H. (1986) Oxygen incorporation in cleavage of ^{18}O -labeled 13-Hydroperoxylinoleyl Alcohol into 12-Hydroxy-(3Z)-dodecanal in Tea Chloroplasts, *Z. Naturforsch.* **41c**, 359-362.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T., Horino, H. und Inokuchi, K. (1992) Odor-structure relationships in n-hexenols and n-hexenals, *Z. Naturforsch.* **47c**, 183-189.
- Hatanaka, A. (1996) The fresh green odor emitted by plants, *Food Rev. Int.* **12** (3), 303-350.
- Hayes, J. M. (2001) Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes, In: Valley, J. W. und Cole, D. R. (Hrsg.): *Stable Isotope Geochemistry, Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **43**, Mineralogical Society of America, Washington DC, USA, 225-277.
- Hener, U., Brand, W. A., Hilkert, A. W., Juchelka, D., Mosandl, A. und Podebrad, F. (1998) Simultaneous on-line analysis of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of organic compounds using GC-pyrolysis-IRMS, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **206**, 230-232.
- Hibbert, H. und Percival, Edmund G. V. (1930) Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides, XXX, The comparative hydrolysis of some disaccharides and polysaccharides, *J. Am. Chem. Soc* **52**, 3995-4005.
- Hildebrand, D. und Fukushige, H. (2006) Recombinant watermelon (*Citrullus lanatus*) hydroperoxide lyase and uses thereof, United States Patent US 7,153,680 B2
- Hilkert, A. W., Douthitt, C. B., Schlüter, H. J. und Brandt, W. A. (1999) Isotope ratio monitoring gas chromatography/mass spectrometry of D/H by high temperature conversion isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1226-1230.
- Hobbie, E. A. und Werner, R. A. (2004) Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C_3 and C_4 plants: a review and synthesis, *New Phytologist* **161**, 371-385.
- Hoefs, J., *Stable Isotope Geochemistry*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1973
- Hör, K. (2001) Authentizitätskontrolle von Aromastoffen: $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Analytik mittels on-line Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) als Baustein einer Multiele-

- ment-Isotopenverhältnisanalyse. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T. und Schreier, P. (2001a) Flavor authenticity studies by $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratio determination using on-line gas chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **49**, 21-25.
- Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T. und Schreier, P. (2001b) $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratio analysis of flavor compounds by on-line gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry (HRGC-P-IRMS): Citral, *Flav. Fragr. J.* **16**, 344-348.
- Holtz, R. B., McCulloch, M. J., Garger, S. J., Teague, R. K. und Phillips, H. F. (2001) Method for providing green note compounds, United States Patent US 6,274,358 B1
- Hornostaj, A. R. und Robinson, D. S. (2000) Purification of hydroperoxide lyase from pea seeds , *Food Chem.* **71**, 241-247.
- Howe, G. A., Lee, G. I., Itoh, A., Li, L. und DeRocher, A. E. (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, *Plant Physiol.* **123**, 711-724.
- Husson, F. und Belin, J. M. (2002) Purification of hydroperoxide lyase from green bell pepper (*Capsicum annum* L.) fruits for the generation of C_6 -aldehydes in vitro, *J. Agric. Food Chem.* **50** (7), 1991-1995.
- Hwang, C.-C. und Grissom, C. B. (1994) Unusually large deuterium isotope effect in soybean lipoxygenase is not caused by a magnetic isotope effect, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 795-796.
- Itoh, A. und Vick, B. A. (1999) The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower, *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 531-540.
- Itoh, A. und Howe, G. A. (2001) Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450, *J. Biol. Chem.* **276**, 3620-3627.
- Ivlev, A. A. (2001) Carbon isotope effects ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in biological systems, *Separation Science and Technology* **36** (8 & 9), 1819-1914.
- Jamin, E., Martin, F., Santamaria-Fernandez, R. und Lees, M. (2005) Detection of exogenous citric acid in fruit juices by stable isotope ratio analysis, *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5130-5133.
- Jung, J., Sewenig, S., Hener, U. und Mosandl, A. (2005) Comprehensive authenticity assessment of lavender oils using multielement/multicomponent isotope ratio mass spectrometry analysis and

- enantioselective multidimensional gas chromatography-mass spectrometry, *Eur. Food Res. Technol.* **220**, 232-237.
- Kahle, K., Preston, C., Richling, E., Heckel, F. und Schreier, P. (2005) On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of major volatiles from pear fruit (*Pyrus communis*) and pear products, *Food Chem.* **91**, 449-455.
- Kajiwara, T., Sekiya, J., Odake, Y. und Hatanaka, A. (1977) Synthesis of 3Z,6Z-dienoic acids, *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1481-1484.
- Kamaya, K. und Onodera, Y. (2001) Method for purifying β -phenylethyl alcohol, United States Patent US 6,207,867
- Kanisawa et al. (1988) Method for preparing green aroma compounds, United States Patent, US 4,769,243
- Kaunzinger, A., Juchelka, D. und Mosandl, A. (1997) Progress in the authenticity assessment of vanilla. 1. Initiation of authenticity profiles, *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1752-1757.
- Kawai, Y., Hayashi, M., Inaba, Y., Saitou, K. und Ohno, A. (1998) Asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with a carbon-carbon double-bond reductase from baker's yeast, *Tetrahedron Letters* **39**, 5225-5228.
- Keeling, C. D., Mook, W. G. und Tans, P. P. (1979) Recent trends in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of atmospheric carbon dioxide, *Nature* **277**, 121-123.
- Kerler, J., Kohlen, E., van der Vliet, A., Fitz, W. und Winkel, C. (2005) Method for the enzymatical preparation of flavors rich in C_6 - C_{10} aldehydes, United States Patent US 6,864,072.
- Kim, I.-S. und Grosch, W. (1981) Partial purification and properties of a hydroperoxide lyase from fruits of pear, *J. Agric. Food Chem.* **29**, 1220-1225.
- Kimoto, W. I. und Gaddis, A. M. (1969) Precursors of alk-2,4-dienals in autoxidized lard, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **46**, 403-408.
- Kluge, M., Brulfert, J., Rauh, W., Ravelomanana D. und Ziegler, H. (1995) Ecophysiological studies on the vegetation of Madagascar: A $\delta^{13}\text{C}$ and δD survey for incidence of crassulacean acid metabolism (CAM) among orchids from montane forests and succulents from the xerophytic thorn-bush, *Isotopes Environ. Health Stud.* **31**, 191-210.

- Koeduka, T., Stumpe, M., Matsui, K., Kajiwar, T. und Feussner, I. (2003) Kinetics of barley FA hydroperoxide lyase are modulated by salts and detergents, *Lipids* **38** (11), 1167-1172.
- Krämer, R. (2004) Production of Amino Acids: Physiological and genetic approaches, *Food Biotechnology* **18**, 171-216.
- Kuroda, H., Kojima, H., Kaneda, H. und Takashino, M. (2005) Characterization of 9-fatty acid hydroperoxide lyase-like activity in germinating barley seeds that transforms 9-(S)-hydroperoxy-10(E), 12(Z)-octadecadienoic acid into 2-(E)-Nonenal, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69** (9), 1661-1668.
- Kuroda, H., Oshima, T., Kaneda, H. und Takashio, M. (2005) Identification and functional analysis of two cDNAs that encode fatty acid 9-/13-hydroperoxide lyase (CYP74C) in rice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1545-1554.
- Lesaint, C., Merlivat, L., Bricout, J., Fontes, J. C. und Gatheret, R. (1974) Sur la composition en isotopes stables de l'eau de la tomate et du maïs, *C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D* **278**, 2925-2930.
- Leskovac, V., Trivić, S. und Peričin, D. (2002) The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research* **2**, 481-494.
- Lieser, Einführung in die Kernchemie; Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 1991
- Luo, Y. und Sternberg, L. (1991) Deuterium heterogeneity in starch and cellulose nitrate of CAM and C₃ plants. *Phytochem.* **30**, 1095-1098.
- Luo, Y., Sternberg, L., Suda, S., Kumazawa, S. und Mitsui, A. (1991) Extremely low D/H ratios of photoproduced hydrogen by cyanobacteria, *Plant Cell Physiol.* **32**, 897-900.
- Mar Caja, M., Preston, C., Kempf, M. und Schreier, P. (2007) Flavor authentication studies of α -ionone, β -ionone and α -ionol from various Sources, *J. Agric. Food Chem.* **55**, 6700-6704.
- Marlier, J. F. und O'Leary, M. H. (1984) Carbon kinetic isotope effects on the hydration of carbon dioxide and the dehydration of bicarbonate ion, *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 5054-5057.
- Martin, B. und Sutherland, E. K. (1990) Air pollution in the past recorded in width and stable carbon isotope composition of annual growth rings of Douglas-fir. *Plant cell Environ.* **13**, 839-844.
- Martin, G. J. und Martin, M. L. (1981) Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative ²H NMR, *Tetrahed. Lett.* **22**, 3525-3528.

- Martin, G. J., Zhang, B. L., Naulet, N. und Martin, M. L. (1986) Deuterium transfer in the bioconversion of glucose to ethanol studied by specific isotope labeling at the natural abundance level, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5116-5122.
- Martin, M. L. und Martin, G. J. (1990) Deuterium NMR in the study of site-specific natural isotope fractionation (SNIF-NMR). In: Diehl, P., Fluck, E., Günther, H., Kosfeld, R. und Seeling, J. (Hrsg.): *NMR Basic Principles and Progress*, Springer Verlag, Berlin, 1-61.
- Martin, G. J. und Martin, M. L. (2003) Climate significance of isotope ratios, *Phytochemistry Reviews* **2**, 179-190.
- Matoba, T., Hideka, H., Kitamura, K., Kaizuma, N. und Kito, M. (1985) Contribution of Hydroperoxide Lyase Activity to n-Hexanal Formation in Soybean, *J. Agric. Food. Chem.* **33**, 856-858.
- Matsui, K., Shibata, Y., Kajiwara, T. und Hatanaka, A. (1989) Separation of 13- and 9-hydroperoxidase activities in cotyledons of Cucumber seedlings, *Z. Naturforsch.* **44c**, 883-885.
- Matsui, K., Toyota, H., Kajiwara, T., Kakuno, T. und Hatanaka, A. (1991) Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves, *Phytochemistry* **30**, 2109-2113.
- Matsui, K., Kajiwara, T. und Hatanaka, A. (1992) Inactivation of tea leaf hydroperoxide lyase by fatty acid hydroperoxide, *J. Agric. Food Chem.* **40**, 175-178.
- Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T. und Kajiwara, T. (1996) Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B), *FEBS Lett.* **394**, 21-24.
- Matsui, K., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V. und Kajiwara, T. (1999) Molecular cloning and expression of *Arabidopsis* fatty acid hydroperoxide Lyase, *Plant Cell Physiol.* **40** (5), 477-481.
- Matsui, K., Kurishita, S., Hisamitsu, A. und Kajiwara, T. (2000) A lipid-hydrolysing activity involved in hexenal formation, *Biochemical Society Transactions* **28** (6), 857-860.
- Matsui, K., Ujita, C., Fujimoto, S., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., Kajiwara, T. und Feussner, I. (2000a) Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber, *FEBS Lett.* **481**, 183-188.
- Matsui, K., Miyahara, C., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V. und Kajiwara, T. (2000b) Fatty acid hydroperoxide lyase in tomato fruits: Cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64** (6), 1189-1196.
- Matsui, K., Sasahara, S., Akakabe, Y. und Kajiwara, T. (2003) Linoleic acid 10-hydroperoxide as an intermediate during formation of 1-octen-3-ol from linoleic acid in *Lentinus decedetes*, *Biosci.*

- Biotechnol. Biochem.* **67** (10), 2280-2282.
- Matthew, J. A. und Galliard, T. (1978) Enzymic formation of carbonyls from linoleic acid in leaves of *Phaseolus vulgaris*, *Phytochemistry* **17**, 1043-1044.
- Matthews, D. E. und Hayes, J. M. (1978) Isotope ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry, *Anal. Chem.* **50**, 1465-1473.
- McKinney, C. R., McCrea, J. M., Epstein, S., Allen, H. A. und Urey, H. C. (1950) Improvements in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotope abundance ratios, *Rev. Sci. Instrum.* **21**, 724-730.
- Melzer, E. und Schmidt, H.-L. (1987) Carbon isotope effects on the pyruvate-dehydrogenase reaction and their importance for relative C-13 depletion in lipids, *Journal of Biological Chemistry* **262**, 8159-8164.
- Mita, G., Quarta, A., Fasano, P., Paolis, A. D., Sansebastiano, G. P. D., Perrotta, C., Iannacone, R., Belfield, E., Hughes, R., Tsesmetzis, N., Casey, R. und Santino, A. (2005) Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies, *J. Exp. Bot.* **56**, 2321-2333.
- Mook, W. G., Bommerson, J. C. und Staverman, W. H. (1974) Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide, *Earth Planet. Sci. Letters* **22**, 169-176.
- Mosandl, A., Braunsdorf, R., Dietrich, A., Faber, B., Karl, V., Köpke, T., Lehmann, D. und Maas, B. (1994) Recent development in the authenticity control of flavours and fragrances, In: Maarse, H. und van der Heij, D. G. (Hrsg.): Trends in Flavour Research, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 89-98.
- Mosandl, A. (1995) Enantioselective capillary gas chromatography and stable isotope ratio mass spectrometry in the authenticity control of flavors and essential oils, *Food Rev. Int.* **11**, 597-664.
- Mosandl, A. (2004) Authenticity assessment: A permanent challenge in food flavor and essential oil analysis, *J. Chromatogr. Sci.* **42**, 440-449.
- Moussa, I., Naulet, N., Martin, M. L. und Martin, G. J. (1990) A site-specific and multielement approach to the determination of liquid-vapor isotope fractionation parameters. The case of alcohols, *J. Phys. Chem.* **94**, 8303-8309.
- Muller, B., Gautier, A., Dean, C. und Kuhn, J.-C. (1995) Process for the enzymatic preparation of aliphatic alcohols and aldehydes from linoleic acid, linoleic acid, or a natural precursor, United

States Patent US 5,464,761

- Naraoka, H. und Chikaraishi, Y. (2001) Organic hydrogen-carbon isotope signatures of terrestrial higher plants during biosynthesis for distinctive photosynthetic pathways, *Geochemical Journal* **35**, 451-458.
- Nhu-Trang, T.-T., Casabianca, H. und Grenier-Loustalot, M.-F. (2006) Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 2141-2152.
- Nienhaus, J. und Hopp, R. (1987) Process for the purification of crude β -phenylethyl alcohol, United States Patent US 4,664,755
- Noordermeer, M. A., Veldink, G. A. und Vliegthart, J. F. G. (1999) Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z:2E-enal isomerase, *FEBS Lett.* **443**, 201-204.
- Noordermeer, M. A., van Dijken, A. J. H., Smekens, S. C. M., Veldink, G. A. und Vliegthart, F. G. (2000) Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics, *Eur. J. Biochem.* **267**, 2473-2482.
- Noordermeer, M. A., Veldink, G. A. und Vliegthart, J. F. G. (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant Cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance, *Chembiochem.* **2**, 494-504.
- Oka, N., Ohishi, H., Hatano, T., Hornberger, M., Sakata, K. und Watanabe, N. (1999) Aroma evolution during flower opening in *Rosa damascena* Mill., *Z. Naturforsch.* **54c**, 889-895.
- O'Leary, M. H. (1981) Carbon isotope fractionation in plants, *Phytochemistry* **20**, No. 4, 553-567.
- Paillard, N. M. M. (1979) Biosynthese des produits volatils de la pomme: formation des alcools et des esters a partir des acides gras, *Phytochemistry* **18**, 1165-1171.
- Park, R. und Epstein, S. (1960) Carbon isotope fractionation during photosynthesis, *Geochim. Cosmochim. Acta* **21**, 110-126.
- Penuelas, J. und Azcón-Bieto, J. (1992) Changes in leaf $\Delta^{13}\text{C}$ of herbarium plant species during the last 3 centuries of CO_2 increase, *Plant Cell Environ.* **15**, 485-489.
- Pérez, A. G., Sanz, C., Olías, R. und Olías, J. M. (1999) Lipoxygenase and hydroperoxide lyase

- activities in ripening strawberry fruits, *J. Agric. Food Chem.* **47**, 249-253.
- Phillips, D. R., Matthew, J. A., Reynolds, J. und Fenwick, G. R. (1979) Partial purification and properties of a cis-3:trans-2-enal isomerase from cucumber Fruit, *Phytochemistry* **18**, 401-404.
- Pionnier, S., Robins, R. J. und Zhang, B.-L. (2003) Natural Abundance hydrogen isotope affiliation between the reactants and the products in glucose fermentation with yeast, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2076-2082.
- Preston, C., Richling, E., Elss, S., Appel, M., Heckel, F., Hartlieb, A. und Schreier, P. (2003) On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of pineapple (*Ananas comosus*) volatiles, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 8027-8031.
- Preston, C., Kahle, K., Appel, M., Heckel, F., Richling, E. und Schreier, P. (2004) Ester Synthesis: authenticity assessment by stable isotope analysis, In: Hofmann, T., Rothe M. und Schieberle, P. (Hrsg.): State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology, Proceedings of the 7th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, held in Eisenach, Germany on 21.-23. April 2004. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 358-362.
- Rabiller, C., Mesbahi, M. und Martin, M. L. (1990) ²H-NMR resolution of the methylenic isotopomers of ethanol applied to the study of stereospecific enzyme-catalysed exchange, *Chirality* **2**, 85-89.
- Reibach, P. H. und Benedict, C. R. (1977) Fractionation of stable carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants, *Plant Physiol.* **59**, 564-568.
- Richling, E., Höhn, C., Weckerle, B., Heckel, F. und Schreier, P. (2003) Authentication analysis of caffeine-containing foods via elemental analysis combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (EA-C/P-IRMS), *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 544-548.
- Richling, E., Appel, M., Heckel, F., Kahle, K., Kraus, M., Preston, C., Hümmer, W. und Schreier, P. (2007) Flavor Authenticity Studies by Isotope Ratio Mass Spectrometry: Perspective and Limits, In: Ebeler, S. E., Takeoka, G. R. und Winterhalter, P. (Hrsg.): Authentication of Food and Wine, *ACS Symposium Series No. 952*, 75-86.
- Rode, C. V., Kshirsagar, V. S., Rane, V. H. und Chaudhari, R. V. (2005) Process for preparation of 2-phenylethanol, United States Patent US 6,979,753 B2
- Römpp CD Lexikon Chemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 2006
- Rossmann, A., Butzenlechner M. und Schmidt, H.-L. (1991) Evidence for a nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose, *Plant Physiol.* **96**, 609-614.

- Rowan, D. D., Allen, J. M., Fielder, S. und Hunt, M. B. (1999) Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labelled precursors, *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2553-2562.
- Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B. und Schreier, P. (2000) $^2\text{H}/^1\text{H}$ Ratio analysis of flavor compounds by on-line gas chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-P-IRMS): Benzaldehyde, *J. High Resol. Chromatogr.* **23**, 357-359.
- Ruff, C. (2001) Authentizitätskontrolle von Aromastoffen: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Analytik mittels on-line Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) als Baustein einer Multielement-Isotopenverhältnisanalyse. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Savina, J.-P., Kohler, D. und Brunerie, P. (1999) Method for extracting 2-phenylethanol, United States Patent US 5,965,780
- Sayed, O. H. (2001) Crassulacean acid metabolism 1975-2000, a check list, *Photosynthetica* **39** (3), 339-352.
- Scharrer, A. und Mosandl, A. (2002) Progress in the authenticity assessment of vanilla. 2. $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ correlations and methodical optimisations. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **98**, 117-121.
- Schmidt, H.-L. (1974) Analyse von stabil-isotop markierten Verbindungen, In: Simon, H. (Hrsg.): Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen, Band 2, Springer Verlag, Berlin, 291-400.
- Schmidt, H.-L., Winkler, F. J., Latzko, E. und Wirth, E. (1978) Photosynthetic carboxylation reactions and delta-C-13-values of plant material, *Isr. J. Chem.* **17**, 223-224.
- Schmidt, H.-L., Werner, R. A., Roßmann, A., Mosandl, A. und Schreier, P. (2007) Stable isotope ratio analysis in quality control of flavourings, In: H. Ziegler (Hrsg.): Flavourings, Wiley-VCH, Weinheim, 602-663.
- Schmidt, H.-L., Werner, R. A. und Eisenreich, W. (2003a) Systematics of ^2H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways, *Phytochemistry Reviews* **2**, 61-85.
- Schmidt, H.-L. (2003b) Fundamentals and systematics of the non-statistical distributions of isotopes in natural compounds, *Naturwissenschaften* **90**, 537-552.
- Schmidt, H.-L., Roßmann, A., Stöckigt, D. und Christoph, N. (2005a) Stabilisotopenanalytik – Herkunft und Authentizität von Lebensmitteln, *Chem. Unserer Zeit* (**39**), 90-99.

- Schmidt, H.-L., Roßmann, A., Voerkelius, S., Schnitzler, W. H., Georgi, M., Graßmann, J., Zimmermann, G. und Winkler, R. (2005b) Isotope characteristics of vegetables and wheat from conventional and organic production, *Isotopes in Environmental and Health Studies* **41**, 223-228.
- Schrader, J., Etschmann, M. M. W., Sell, D., Hilmer, J.-M. und Rabenhorst, J. (2004) Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds - current industrial processes and future prospects, *Biotechnology Letters* **26**, 463-472.
- Schreier, P. und Lorenz, G. (1982) Separation, Partial Purification and Characterization of a Fatty Acid Hydroperoxide Cleaving Enzyme from Apple and Tomato Fruits, *Z. Naturforsch.* **37c**, 165-173.
- Schreier, P. (2004) Innovations in analytical flavour research, In: Hofmann, T., Rothe M. und Schieberle, P. (Hrsg.): State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology, Proceedings of the 7th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, held in Eisenach, Germany on 21.-23. April 2004. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 115-122.
- Sekiya, J., Numa, S., Kajiwara, T. und Hatanaka, A. (1976) Biosynthesis of Leaf Alcohol Formation of 3Z-Hexenal from Linolenic Acid in Chloroplasts of *Thea Sinensis* Leaves, *Agric. Biol. Chem.* **40**, 185-190.
- Sekiya, J., Tanigawa, S., Kajiwara, T. und Hatanaka, A. (1984) Fatty acid hydroperoxide lyase in tobacco cells cultured *in vitro*, *Phytochemistry* **23** (11), 2439-2443.
- Senger, T., Wichard, T., Kunze, S., Göbel, C., Lerchl, J., Pohnert, G. und Feussner, I. (2005) A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*, *J. Biol. Chem.* **280**, 7588-7596.
- Serra, S., Fuganti, C. und Brenna, E. (2005) Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances, *Trends in Biotechnology* **23**, 193-198.
- Serra, F., Janeiro, A., Calderone, G., Rojas, J. M., Rhodes, C., Gonthier, L. A., Martin, F., Lees, M., Mosandl, A., Sewenig, S., Hener, U., Henriques, B., Ramalho, L., Reniero, F., Teixeira, A. J. und Guillou, C. (2007) Inter-laboratory comparison of elemental analysis and gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). Part I: delta13C measurements of selected compounds for the development of an isotopic Grob-test, *J. Mass Spectrom.* **42**, 361-369.
- Sessions, A. L., Jahnke, L. L., Schimmelmann, A. und Hayes, J. M. (2002) Hydrogen isotope fractionation in lipids of the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus*, *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 3955-3969.

- Sewenig, S., Hener, U. und Mosandl, A. (2003) Online determination of $^2\text{H}/^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of cinnamaldehyde from different sources using gas chromatography isotope ratio mass spectrometry, *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 444-448.
- Sewenig, S., Bullinger, D., Hener, U. und Mosandl, A. (2005) Comprehensive authentication of (E)- α (β)-Ionone from Raspberries, Using Constant Flow MDGC-C/P-IRMS and Enantio-MDGC-MS, *J. Agric. Food Chem.* **53**, 838-844.
- Shepard, A. T., Danielson, N. D., Pauls, R. E., Mahle, N. H., Taylor, P. J. und Rogers, L. B. (1976) Gas-chromatographic fractionations of stable isotopes of carbon and oxygen in carbon dioxide, *Separ. Sci.* **11**, 279-292.
- Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T. und Hatanaka, A. (1995a) Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits, *Plant Cell Physiol.* **36**, 147-156.
- Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T. und Hatanaka, A. (1995b) Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 438-443.
- Smith, B. N. und Ziegler, H. (1990) Isotopic fractionation of hydrogen in plants, *Bot. Acta* **103**, 335-342.
- Song, W.-C., Funk, C. D. und Brash, A. R. (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase: A Cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8519-8523.
- Stark, D., Münch, T., Sonnleitner, B., Marison, I. W. und von Stockar, U. (2002) Extractive bio-conversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanin by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Prog.* **18**, 514-523.
- Sternberg, L. O. und DeNiro, M. J. (1983) Isotopic composition of cellulose from C_3 , C_4 , and CAM plants growing near one another, *Science* **220**, 947-949.
- Sternberg, L. O., DeNiro, M. J. und Ajie, H. (1984a) Stable hydrogen isotope ratios of saponifiable lipids and cellulose nitrate from CAM, C_3 and C_4 plants, *Phytochemistry* **23**, No. 11, 2475-2477.
- Sternberg, L. O., DeNiro, M. J. und Johnson, H. B. (1984b) Isotope ratios of cellulose from plants having different photosynthetic pathways, *Plant Physiol.* **74**, 557-561.
- Sternberg, L. O., DeNiro, M. J. und Ting, I. P. (1984c) Carbon, hydrogen, and oxygen isotope ratios of cellulose from plants having intermediary photosynthetic modes, *Plant Physiol.* **74**, 104-107.

- Sternberg, L. O., DeNiro, M. J. und Johnson, H. B. (1986) Oxygen and hydrogen isotope ratios of water from photosynthetic tissues of CAM and C₃ plants, *Plant Physiol.* **82**, 428-431.
- Stryer, L. (1999) Biochemie, 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Stumpe, M., Bode, J., Göbel, C., Wichard, T., Schaaf, A., Frank, W., Frank, M., Reski, R., Pohnert, G. und Feussner, I. (2006) Biosynthesis of C₉-aldehydes in the moss *Physcomitrella patens*, *Biochim. Biophys. Acta* **1761** (3), 301-312.
- Sun, S., Duggleby, R. G. und Schowen, R. L. (1995) Linkage of catalysis and regulation in enzyme action. Carbon isotope effects, solvent isotope effects, and proton inventories for the unregulated pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7317-7322.
- Suurmeijer, C. N., Pérez-Gilabert, M., van Unen, D. J., van der Hijden, H. T., Veldink, G. A. und Vliegthart, J. F. (2000) Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxidlyase, *Phytochemistry* **53** (2), 177-185.
- Tamura, H., Appel, M., Richling, E. und Schreier, P. (2005) Authenticity assessment of γ - and δ -decalactone from Prunus fruits by gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (GC-C/P-IRMS), *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5397- 5401.
- Tijet, N., Wäspi, U., Gaskin, D. J. H., Hunziker, P., Muller, B. L., Vulfson, E. N., Slusarenko, A., Brash, A. R. und Whitehead, I. M. (2000) Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit, *Lipids* **35**, 709-720.
- Tijet, N., Schneider, C., Muller, B. L. und Brash, A. R. (2001) Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid, *Arch. Biochem. Biophys.* **386** (2), 281-289.
- Tremblay, P. und Paquin, R. (2006) Improved detection of sugar addition to maple syrup using malic acid as internal standard and in ¹³C isotope ratio mass spectrometry (IRMS), *J. Agric. Food Chem.* **55**, 197-203.
- Vandamme, E. J. und Soetaert, W. (2002) Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, 1323-1332.
- Vick, B. A. und Zimmerman, D. C. (1976) Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings, *Plant Physiol.* **57**, 780-788.

- Vick, B. A. und Zimmerman, D. C. (1987) Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts, *Plant Physiol.* **85**, 1073-1078.
- Wanner, P. und Tressl, R. (1998) Purification and characterization of two enone reductases from *Saccharomyces cerevisiae*, *European Journal of Biochemistry* **255**, 271-278.
- Watanabe, S., Hayashi, K., Yagi, K., Asai, T., MacTavish, H., Picone, J., Turnbull, C. und Watanabe, N. (2002) Biogenesis of 2-phenylethanol in rose flowers: Incorporation of [²H₈]L-phenylalanin and its β-D-glucopyranoside during the flower opening of *Rosa* 'Hoh-Jun' and *Rosa damascena* Mill., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 943-947.
- Werner, R. A., Kornexl, B. E., Roßmann, A. und Schmidt, H.-L. (1996) On-line determination of δ¹⁸O values of organic substances, *Anal. Chim. Acta* **319**, 159-164.
- Whelan, T., Sackett, W. M. und Benedict, C. R. (1970) Carbon isotope discrimination in a plant possessing the C₄ dicarboxylic acid pathway, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **41**, 1205-1210.
- Whelan, T., Sackett, W. M. und Benedict, C. R. (1973) Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants, *Plant Physiol.* **51**, 1051-1054.
- Whitehead, I. M., Slusarenko, A. J., Wäspi, U., Gaskin, D. J. H., Bras, A. R. und Tijet, N. (2004) Guava (*Psidium guajava*) 13-hydroperoxide lyase and uses thereof, United States Patent US 6,780,621 B2
- Wieggers, W. J. und Sprecker, M. A. (1985) Perfumery uses of phenyl alkanols, United States Patent US 4,512,918
- Willi (1983), Isotopeneffekte bei chemischen Reaktionen, Thieme Verlag, Stuttgart
- Williams, R. E. und Bruce, N. C. (2002) „New uses for an old enzyme“ – the old yellow enzyme family of flavoenzymes, *Microbiology* **148**, 1607-1614.
- Winkler, F. J., Kexel, H., Kranz, C. und Schmidt, H.-L. (1982) Parameters affecting the ¹³CO₂/¹²CO₂ isotope discrimination of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase reaction, In: Schmidt, H.-L., Förstel, H., Heinzinger, K. (Hrsg.): Stable Isotopes, Elsevier, Amsterdam, 83-89.
- Winkler, F. J. (1984) Application of natural abundance stable isotope mass spectrometry in food control, In: Frigerio, A., Milon, H. (Hrsg.): Chromatography and Mass Spectrometry in Nutrition Science and Food safety, Elsevier, Amsterdam, 173-190.

- Winter, K. und Holtum, A. M. (2002) How closely do the $\delta^{13}\text{C}$ values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO_2 fixed during day and night?, *Plant Physiol.* **129**, 1843-1851.
- Wurzenberger, M. und Grosch, W. (1984a) Origin of the oxygen in the products of the enzymatic cleavage reaction of linoleic acid to 1-octen-3-ol and 10-oxo-trans-8-decenoic acid in mushrooms (*Psalliota bispora*), *Biochim. Biophys. Acta* **794**, 18-24.
- Wurzenberger, M. und Grosch, W. (1984b) The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*), *Biochim. Biophys. Acta* **794**, 25-30.
- Wurzenberger, M. und Grosch, W. (1984c) Stereochemistry of the cleavage of the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid to 1-octen-3-ol by a hydroperoxide lyase from mushrooms (*Psalliota bispora*), *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 163-165.
- Wurzenberger, M. und Grosch, W. (1986) Enzymic oxidation of linoleic acid to 1,Z-5-octadien-3-ol, Z-2,Z-5-octadien-1-ol and 10-oxo-E-8-decenoic acid by a protein fraction from mushrooms (*Psalliota bispora*), *Lipids* **21**, 261-266.
- Yakir, D. und DeNiro, M. J. (1990) Oxygen and hydrogen isotope fractionation during cellulose metabolism in *Lemna gibba* L., *Plant Physiol.* **93**, 325-332.
- Zhang, B.-L., Yuniarta und Martin, M. L. (1995) Site-specific isotope fractionation in the characterization of biochemical mechanisms, *J. Biol. Chem.* **270**, 16023-16029.
- Zhang, B.-L., Billault, I., Li, X., Mabon, F., Remaud, G. und Martin, M. L. (2002) Hydrogen isotopic profile in the characterization of sugars. Influence of the metabolic pathway, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1574-1580.
- Zhang, B.-L., Fallourd, V., Role, C. und Martin, G. J. (2003) Comparison of isotopic fractionation in lactic acid and ethanol fermentations, *Bioorganic Chemistry* **31**, 227-236.
- Ziegler, H., Osmond, C. B., Stichler, W. und Trimborn, P. (1976) Hydrogen isotope discrimination in higher plants: Correlations with photosynthetic pathway and environment, *Planta* **128**, 85-92.
- Ziegler, H. (1996) Carbon- and hydrogen-isotope discrimination in Crassulacean acid metabolism, In: Winter, Smith (Hrsg.): Ecological Studies Vol. 114, Crassulacean Acid Metabolism, Springer, Berlin Heidelberg, 336-348.

Anhang

Tab. A1-A8: Linearitätsbereiche für die HRGC-P-IRMS-²H/¹H-Analytik der arbeitsrelevanten Aromastoffe

Tab. A1: Hexanal

Menge [ug on column]	Amplitude [V]	Peakfläche [Vs]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD
0,4	0,4	5	-254 \pm 9
1,1	1,0	13	-238 \pm 1
2,1	2,0	28	-234 \pm 5
3,2	2,6	37	-239 \pm 1
4,3	3,3	45	-237 \pm 1

Tab. A2: (Z)-3-Hexenal

Menge [ug on column]	Amplitude [V]	Peakfläche [Vs]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD
0,44	0,1	4	-29 \pm 7
1,1	0,4	13	-45 \pm 2
2,2	0,7	22	-44 \pm 1
3,3	1,1	32	-45 \pm 1
4,4	1,4	41	-47 \pm 1

Tab. A3: (E)-2-Hexenal

Menge [ug on column]	Amplitude [V]	Peakfläche [Vs]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD
0,5	1,1	7	-93 \pm 3
1,0	2,6	17	-81 \pm 3
1,5	3,7	25	-79 \pm 1
2,0	5	37	-64 \pm 2
2,5	5,1	39	-62 \pm 1

Tab. A4: 1-Hexanol

Menge [μg on column]	Amplitude [V]	Peakfläche [Vs]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD
0,3			-145 \pm 20
0,5			-145 \pm 10
0,6			-141 \pm 8
0,8			-134 \pm 6
1,0			-128 \pm 4
1,5			-108 \pm 1
2,0			-95 \pm 2
2,5			-94 \pm 3
3,0			-96 \pm 1

Tab. A5: (E)-2-Hexenol

Menge [μg on column]	Amplitude [V]	Peakfläche [Vs]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD
0,3	1,8	8	-83 \pm 10
0,5	2,7	12	-59 \pm 4
0,6	3,3	15	-52 \pm 7
0,8	3,9	18	-40 \pm 1
1,0	4,4	22	-22 \pm 3
1,5	6,0	35	-6 \pm 10
2,0	6,8	47	9 \pm 2
2,5	7,9	58	4 \pm 3
3,0	8,8	70	-24 \pm 2

Abb. A6: 2-Phenylethanol

Menge [μg on column]	Amplitude [V]	Peakfläche [Vs]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD
0,4	1,8	7	-35 \pm 5
1,0	4,1	15	-43 \pm 1
2,0	7,3	29	-49 \pm 1
3,2	12,1	56	-59 \pm 1

Tab. A7: (Z)-3-Hexenol

Menge [ug on column]	Amplitude [V]	Peakfläche [Vs]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD
0,3	1,6	7	-244 \pm 2
0,5	2,7	12	-240 \pm 6
0,6	3,7	17	-227 \pm 2
0,8	4,0	19	-216 \pm 4
1,0	6,4	40	-140 \pm 3
1,5	6,3	38	-148 \pm 3
2,0	7,2	51	-133 \pm 2
2,5	8,4	65	-136 \pm 1

Tab. A8: 2-Methyl-1-propanol

Menge [ug on column]	Amplitude [V]	Peakfläche [Vs]	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD
0,5	1,0	10	-275 \pm 1
1,0	2,0	20	-283 \pm 4
2,0	3,9	38	-286 \pm 2
3,1	6,0	61	-280 \pm 1
4,2	8,0	82	-280 \pm 1

Tab. A9-A12: Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Einzeldaten von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol aus der Vergärung von Zuckerlösungen und dotierten TraubensäftenTab. A9: 2-Phenylethanol aus der Vergärung von C₃-/C₄-Zuckerlösungen (HRGC-P/C-IRMS)

Anteil C ₃ -/C ₄ -Zucker		$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰] \pm SD
C ₃ [%]	C ₄ [%]		
100	-	-209 \pm 2	-28,0 \pm 0,4
100	-	-204 \pm 2	-28,5 \pm 0,1
90	10	-202 \pm 1	-25,4 \pm 0,5
90	10	-199 \pm 2	-25,6 \pm 0,5

80	20	-201 ± 3	-25,5 ± 0,4
80	20	-200 ± 3	-24,9 ± 0,5
70	30	-197 ± 2	-25,6 ± 0,5
70	30	-194 ± 3	-26,3 ± 0,4
60	40	-193 ± 3	-25,5 ± 0,3
60	40	-186 ± 2	-24,4 ± 0,5
50	50	-188 ± 2	-24,0 ± 0,3
50	50	-188 ± 2	-24,4 ± 0,1
40	60	-188 ± 3	-23,4 ± 0,1
40	60	-186 ± 1	-24,0 ± 0,2
30	70	-194 ± 3	-21,7 ± 0,5
30	70	-196 ± 2	-22,2 ± 0,1
20	80	-193 ± 1	-21,8 ± 0,5
20	80	-190 ± 2	-21,2 ± 0,2
10	90	-187 ± 2	-20,3 ± 0,2
10	90	-185 ± 2	-19,4 ± 0,1
-	100	-180 ± 2	-18,6 ± 0,5
-	100	-171 ± 2	-18,2 ± 0,2
-	100	-169 ± 2	-19,9 ± 0,2
-	100	-165 ± 2	-19,5 ± 0,2
-	100	-173 ± 2	-19,1 ± 0,1
-	100	-176 ± 1	-19,4 ± 0,4
-	100	-170 ± 2	-20,3 ± 0,3
-	100	-168 ± 2	-19,3 ± 0,3
-	100	-180 ± 1	-19,5 ± 0,3
-	100	-179 ± 1	-19,4 ± 0,2
-	100	-177 ± 1	-19,7 ± 0,5
-	100	-176 ± 1	-19,9 ± 0,5
	CAM	-165 ± 1	-21,4 ± 0,4
	CAM	-167 ± 1	-21,7 ± 0,5

Tab. A10: 2-Methyl-1-propanol aus der Vergärung von C₃-/C₄-Zuckerlösungen (HRGC-P/C-IRMS)

Anteil C ₃ -/C ₄ -Zucker		$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] ± SD	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰] ± SD
C ₃ [%]	C ₄ [%]		
100	-	-292 ± 1	-21,4 ± 0,2

100	-	-281 ± 4	-21,7 ± 0,4
90	10	-283 ± 1	-20,9 ± 0,4
90	10	-297 ± 1	-20,3 ± 0,1
80	20	-285 ± 1	-19,3 ± 0,4
80	20	-283 ± 2	-20,0 ± 0,3
70	30	-281 ± 2	-18,6 ± 0,1
70	30	-284 ± 3	-18,6 ± 0,2
60	40	-276 ± 4	-17,3 ± 0,2
60	40	-284 ± 4	-17,8 ± 0,4
50	50	-289 ± 2	-14,5 ± 0,3
50	50	-286 ± 1	-15,5 ± 0,1
40	60	-275 ± 2	-15,6 ± 0,1
40	60	-281 ± 1	-16,1 ± 0,5
30	70	-289 ± 2	-14,1 ± 0,1
30	70	-288 ± 6	-16,1 ± 0,2
20	80	-273 ± 1	-14,6 ± 0,1
20	80	-268 ± 3	-14,4 ± 0,1
10	90	-272 ± 2	-13,0 ± 0,1
10	90	-268 ± 2	-13,6 ± 0,1
-	100	-268 ± 3	-9,2 ± 0,1
-	100	-268 ± 1	-10,8 ± 0,1
-	100	-268 ± 2	-10,0 ± 0,3
-	100	-264 ± 2	-10,0 ± 0,5
-	100	-258 ± 7	-11,5 ± 0,3
-	100	-264 ± 1	-11,9 ± 0,1
-	100	-265 ± 3	-10,4 ± 0,5
-	100	-265 ± 1	-10,0 ± 0,2
-	100	-265 ± 1	-11,5 ± 0,1
-	100	-265 ± 3	-12,1 ± 0,3
-	100	-265 ± 3	-11,4 ± 0,5
-	100	-256 ± 1	-11,4 ± 0,1
	CAM	-260 ± 1	-12,0 ± 0,2
	CAM	-260 ± 1	-12,7 ± 0,5

Tab. A11: 2-Phenylethanol aus der Vergärung von C₃-/C₄-Zucker-dotierten Traubensaftgärungen (HRGC-P/C-IRMS)

Anteil C ₃ -/C ₄ -Zucker		$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰] \pm SD
C ₃ [%]	C ₄ [%]		
-	-	-148 \pm 5	-31,0 \pm 0,5
10	-	-143 \pm 1	-30,0 \pm 0,4
20	-	-147 \pm 2	-29,2 \pm 0,2
30	-	-151 \pm 2	-29,1 \pm 0,5
40	-	-169 \pm 2	-30,9 \pm 0,3
50	-	-168 \pm 2	-30,5 \pm 0,1
60	-	-169 \pm 3	-30,3 \pm 0,5
70	-	-169 \pm 2	-29,6 \pm 0,3
80	-	-168 \pm 2	-30,2 \pm 0,1
90	-	-175 \pm 2	-30,0 \pm 0,5
100	-	-169 \pm 1	-30,4 \pm 0,1
-	10	-159 \pm 3	-29,5 \pm 0,5
-	20	-154 \pm 1	-29,0 \pm 0,5
-	30	-160 \pm 3	-28,4 \pm 0,1
-	40	-161 \pm 3	-27,9 \pm 0,2
-	50	-154 \pm 2	-27,0 \pm 0,2
-	60	-157 \pm 1	-26,5 \pm 0,2
-	70	-155 \pm 3	-25,3 \pm 0,3
-	80	-148 \pm 1	-25,8 \pm 0,5
-	90	-149 \pm 2	-25,3 \pm 0,3
-	100	-147 \pm 1	-24,5 \pm 0,1
5	5	-162 \pm 3	-29,4 \pm 0,5
10	10	-157 \pm 2	-28,4 \pm 0,5
15	15	-159 \pm 1	-28,3 \pm 0,2
20	20	-158 \pm 2	-27,5 \pm 0,2
25	25	-151 \pm 1	-27,7 \pm 0,3
30	30	-160 \pm 2	-28,2 \pm 0,4
35	35	-156 \pm 3	-27,4 \pm 0,5
40	40	-153 \pm 1	-27,4 \pm 0,4
45	45	-160 \pm 4	-27,3 \pm 0,5
50	50	-165 \pm 1	-27,2 \pm 0,2

Tab. A12: 2-Methyl-1-propanol aus der Vergärung von C₃-/C₄-Zucker-dotierten Traubensaftgärungen (HRGC-P/C-IRMS)

Anteil C ₃ -/C ₄ -Zucker		$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰] \pm SD
C ₃ [%]	C ₄ [%]		
-	-	-231 \pm 3	-26,7 \pm 0,1
10	-	-221 \pm 4	-26,8 \pm 0,3
20	-	-231 \pm 2	-26,5 \pm 0,3
30	-	-227 \pm 5	-27,1 \pm 0,1
40	-	-265 \pm 5	-24,9 \pm 0,2
50	-	-249 \pm 2	-24,9 \pm 0,1
60	-	-265 \pm 3	-25,6 \pm 0,1
70	-	-257 \pm 1	-25,0 \pm 0,2
80	-	-259 \pm 2	-25,4 \pm 0,1
90	-	-265 \pm 2	-26,2 \pm 0,1
100	-	-260 \pm 7	-25,2 \pm 0,2
-	10	-247 \pm 3	-24,6 \pm 0,3
-	20	-235 \pm 2	-23,0 \pm 0,3
-	30	-238 \pm 4	-22,9 \pm 0,1
-	40	-249 \pm 3	-22,3 \pm 0,1
-	50	-242 \pm 1	-21,2 \pm 0,1
-	60	-239 \pm 1	-21,1 \pm 0,1
-	70	-243 \pm 3	-21,3 \pm 0,2
-	80	-235 \pm 5	-20,9 \pm 0,1
-	90	-227 \pm 3	-21,1 \pm 0,2
-	100	-230 \pm 1	-20,5 \pm 0,4
5	5	-248 \pm 1	-24,8 \pm 0,2
10	10	-237 \pm 2	-24,6 \pm 0,1
15	15	-240 \pm 1	-23,2 \pm 0,1
20	20	-253 \pm 2	-22,9 \pm 0,1
25	25	-237 \pm 2	-23,9 \pm 0,2
30	30	-251 \pm 2	-24,5 \pm 0,1
35	35	-244 \pm 1	-23,9 \pm 0,2
40	40	-240 \pm 1	-23,9 \pm 0,1
45	45	-237 \pm 7	-24,2 \pm 0,2
50	50	-252 \pm 2	-23,3 \pm 0,3

Tab. A13: Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Einzelwerten von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol aus der Vergärung von Kartoffel- und Maisstärkehydrolysat (HRGC-P-IRMS)

Hydrolysat von:	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD 2-Methyl-1-propanol	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD 2-Phenylethanol
Kartoffelstärke	-296 ± 3	-210 ± 2
Maisstärke	-261 ± 1	-164 ± 1

Tab. A14: Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Einzelwerten von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol aus der Umsetzung von Aminosäuren mittels *S. cerevisiae* (Bestimmung der Aminosäuren mittels EA-P/C-IRMS, resultierende Alkohole mittels HRGC-P/C-IRMS)

Verbindung	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰] \pm SD
L-Phenylalanin	-11 ± 1	$-10,0 \pm 0,1$
2-Phenylethanol aus L-Phenylalanin	-105 ± 4	$-11,5 \pm 0,3$
L-Valin	-126 ± 4	$-15,1 \pm 0,1$
2-Methyl-1-propanol aus L-Valin	-227 ± 5	$-18,8 \pm 0,4$

Tab. A15: Wiederfindungsansätze zur Überprüfung auf Isotopenfraktionierungen bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE). Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Einzelwerten der arbeitsrelevanten Grünnoten.

Verbindung	vor LLE ^{a)}	nach LLE ^{b)}
	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰] \pm SD	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] \pm SD $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰] \pm SD
Hexanal	-243 ± 3	-247 ± 2
	$-33,6 \pm 0,1$	$-33,6 \pm 0,2$
(E)-2-Hexenal	-353 ± 1	-346 ± 1
	$-27,4 \pm 0,1$	$-27,5 \pm 0,3$

(E)-2-Hexenol	-114 ± 5	-109 ± 2
	-36,6 ± 0,1	-36,3 ± 0,3
(Z)-3-Hexenal	-45 ± 2	-60 ± 1
	-25,1 ± 0,1	-25,3 ± 0,3
1-Hexanol	-248 ± 3	-245 ± 1
	-33,3 ± 0,1	-33,4 ± 0,4
(Z)-3-Hexenol	-170 ± 3	-169 ± 1
	-26,7 ± 0,1	-26,4 ± 0,2

^a EA-P/C-IRMS

^b HRGC-P/C-IRMS

Tab. A16: Wiederfindungsansätze zur Überprüfung auf Isotopenfraktionierungen bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE). Zusammenfassung der $\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ - und $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Einzel-daten von 2-Phenylethanol und 2-Methyl-1-propanol

Verbindung	vor LLE ^{a)}		nach LLE ^{b)}	
	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] ± SD	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰] ± SD	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}$ -Wert [‰] ± SD	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰] ± SD
2-Methyl-1-propanol	-158 ± 2		-164 ± 3	
	-29,3 ± 0,1		-29,5 ± 0,2	
2-Phenylethanol	-112 ± 3		-121 ± 2	
	-26,8 ± 0,1		-27,1 ± 0,3	

^a EA-P/C-IRMS

^b HRGC-P/C-IRMS

Publikationen, Posterpräsentationen und Vorträge

Publikationen:

- Richling, E., Appel, M., Heckel, F., Kahle, K., Kraus, M., Preston, C., Hümmer, W. und Schreier, P. (2007) Flavor Authenticity Studies by Isotope Ratio Mass Spectrometry: Perspective and Limits, In: Ebeler, S. E., Takeoka, G. R. und Winterhalter, P. (Hrsg.): Authentication of Food and Wine, *ACS Symposium Series No. 952*, 75-86.
- Elss, S., Preston, C., Appel, M., Heckel, F. und Schreier, P. (2006) Influence of technological processing on apple aroma analysed by high resolution gas chromatography-mass spectrometry and on-line gas chromatography-combustion/pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry, *Food Chemistry* **98** (2), 269-276.
- Tamura, H., Appel, M., Richling, E. und Schreier, P. (2005) Authenticity assessment of γ - and δ -decalactone from *Prunus* fruits by gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (GC-C/P-IRMS), *J. Agric. Food Chem.* **53** (13), 5397-5401.
- Preston, C., Kahle, K., Appel, M., Heckel, F., Richling, E. und Schreier, P. (2004) Ester Synthesis: authenticity assessment by stable isotope analysis, In: Hofmann, T., Rothe M. und Schieberle, P. (Hrsg.): State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology, Proceedings of the 7th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, held in Eisenach, Germany on 21.-23. April 2004. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 358-362.
- Preston, C., Richling, E., Elss, S., Appel, M., Heckel, F., Hartlieb, A. und Schreier, P. (2003) On-Line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) volatiles, *J. Agric. Food Chem.* **51**(27), 8027-8031.

Posterbeiträge:

- Preston, C., Elss, S., Kohlhepp, S., Appel, M., Heckel, F. und Schreier, P. (2005) Stabilisotopenanalytik: Erfassung und Bewertung von technologiebedingten Isotopeneffekten von Aromastoffen. 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Hamburg, 19.-21. September 2005.
- Elss, S., Preston, C., Appel, M., Heckel, F. und Schreier, P. (2005) Technologiebedingter Einfluss auf das Apfelaromaprofil: HRGC-MS und HRGC-C/P-IRMS-Studien. 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Hamburg, 19.-21.-September 2005

Preston, C., Kahle, K., Appel, M., Heckel, F., Richling, E. und Schreier, P. (2004) Ester Synthesis: authenticity assessment by stable isotope analysis. 7th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, Eisenach, 21.-23. April 2004

Elss, S., Richling, E., Preston, C., Appel, M., Heckel, F. und Schreier, P. (2003) Ananas-Aromastoffe: Aromaprofil und Stabilisotopenanalytik. 32. Deutscher Lebensmittelchemikertag, München, 08.-11. Oktober 2003

Vortrag:

Multielement ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ - $^2\text{H}/^1\text{H}$) Isotopenverhältnisanalyse zur Authentizitäts-Bestimmung aromawirksamer Ester, Jahrestagung Arbeitsgemeinschaft Stabile Isotope, Köln, Germany, Oktober 06.-08., 2003.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Untersuchungen zur $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenfraktionierung bei der Biogenese von Aromastoffen“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

(Markus Appel)