

Zuckerphosphate als Vorläufer von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen

**Biochemische Transformation durch die Hefe
Zygosaccharomyces rouxii
und
chemische Bildung unter physiologischen Bedingungen**

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

vorgelegt von
Tobias Hauck
aus Würzburg

Würzburg 2003

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Promotionskolloquiums

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

*Für Birgit,
Simon und Susanne*

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2000 bis Dezember 2002 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt.

Herrn PD Dr. Wilfried Schwab gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, die wissenschaftliche Betreuung und die vielfältige Unterstützung.

Prof. Dr. P. Schreier gilt mein Dank für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl zu promovieren, und für die dort herrschenden hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Bei Thomas Raab möchte ich mich für seine Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung sowie für die gute Zusammenarbeit und die unvergessliche gemeinsame Zeit im „Bubenlabor“ bedanken. Bei Walli Seefelder bedanke ich mich für das gute Teamwork bei der Betreuung des NMR-Spektrometers.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitskreises bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die stete Hilfsbereitschaft.

Ich danke Elfi Ruckdeschel, Dr. Matthias Grüne und Dr. Curd Schollmayer für die Aufnahme von NMR-Spektren. Ein herzliches Dankeschön gilt der LC-MS-Crew Stefanie Diem, Diana Kemmer, Dominique Kavvadias und Walli Seefelder für ihre tatkräftige Unterstützung. Beim GC-MS Team Bernhard Weckerle und Frank Heckel bedanke ich mich für zahlreiche „Schwabsche Sonderinjektionen“ und die stets schnelle Durchführung von Messungen.

Ulrich Schmitt und Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, danke ich für Hilfsbereitschaft und Arbeitseinsatz bei den Kapillarzonenelektrophorese-Messungen.

Prof. Dr. G. Krohne und Claudia Gehrig, Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg, gebührt mein Dank für elektronenmikroskopische Aufnahmen.

Für die Möglichkeit, im Isotopenlabor arbeiten zu können, danke ich Prof. Dr. G. Bringmann, Institut für organische Chemie der Universität Würzburg.

PD Dr. Marcus A. Glomb, Institut für Lebensmittelchemie der technischen Universität Berlin, gebührt mein Dank für die Bereitstellung einer (1*S*,2*R*)-1-(3-Methyl-2-quinoxalinyloxy)-1,2,3-propantriol-Referenz.

Für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums danke ich Thomas Dahlen, Christian Landmann und Yvonne Hübner.

Bei den Korrekturlesern bedanke ich mich für die fachlichen und grammatikalischen Verbesserungsvorschläge.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mich in all den Jahren in vielfältiger Weise unterstützt hat, sowie Steffi für ihre Geduld und moralische Unterstützung.

Dr. Fredi Brühlmann gilt mein Dank für die sorgfältige und kritische Durchsicht meiner Publikations-Manuskripte.

Schließlich danke ich der Firma Firmenich SA in Genf (Schweiz), die durch die Bereitstellung der finanziellen Mittel diese Arbeit ermöglicht hat.

Publikationsliste

Veröffentlichungen

„Metabolism of ethyl tiglate in apple fruits leads to the formation of small amounts of (*R*)-ethyl 2-methylbutanoate“

T. Hauck, B. Weckerle, W. Schwab,
Enantiomer **2000**, 5, 505-512.

„2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone as a secondary metabolite from D-fructose-1,6-diphosphate metabolism by *Zygosaccharomyces rouxii*“

T. Dahlen, T. Hauck, M. Wein, W. Schwab,
J. Biosci. Bioeng. **2001**, 91 (4), 352-358.

„Chemical formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone from D-fructose-1,6-diphosphate“

T. Hauck, C. Landmann, T. Raab, F. Brühlmann, W. Schwab,
Carbohydr. Res. **2002**, 337, 1184-1190.

„Formation of 5-methyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone in cytosolic extracts obtained from *Zygosaccharomyces rouxii*“

T. Hauck, C. Landmann, F. Brühlmann, W. Schwab,
J. Agric. Food Chem. **2003**, zur Veröffentlichung angenommen.

„4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone formation by *Zygosaccharomyces rouxii*. Effect of the medium“

T. Hauck, F. Brühlmann, W. Schwab,
J. Agric. Food Chem. **2003**, zur Veröffentlichung eingereicht.

„Capillary electrophoretic resolution of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone enantiomers, the key flavour compound in strawberry fruits“

T. Raab, U. Schmitt, T. Hauck, A. Knecht, U. Holzgrabe, W. Schwab,
Chromatographia **2003**, zur Veröffentlichung angenommen.

„Formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*: Identification of an Intermediate“

T. Hauck, F. Brühlmann, W. Schwab,
Appl. Environ. Microbiol. **2003**, zur Veröffentlichung eingereicht.

„Tautomerism of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone – Evidence for its enantioselective biosynthesis”

T. Raab, T. Hauck, A. Knecht, U. Schmitt, U. Holzgrabe, W. Schwab,
Chirality **2003**, zur Veröffentlichung eingereicht.

Vorträge

„Biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanon (Furaneol[®]) in strawberry fruits and the yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: First evidence for an enzymatic formation”

W. Schwab, T. Hauck, T. Raab,
Firmenich SA, Genf, Schweiz, **23.3.2001**.

„Bildung von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanon (DMHF, Furaneol[®]) aus D-Fructose-1,6-diphosphat unter physiologischen Bedingungen“

T. Hauck, W. Schwab,
53. Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der lebensmittelchemischen Gesellschaft,
Erlangen, **7.3.2002**.

Posterbeiträge

“Bioformation of aroma-active 4-hydroxy-3(2*H*)-furanones by the yeast *Zygosaccharomyces rouxii*”

W. Schwab, T. Dahlen, M. Wein, T. Hauck, T. Raab,
GDCh-Jahrestagung Chemie 2001,
Universität Würzburg, **23. - 29.09.2001**.

„First chiral phase CE method for the enantiomeric analysis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, the key aroma compound in strawberry fruits”

U. Schmitt, T. Raab, T. Hauck, W. Schwab, U. Holzgrabe,
16th International Symposium on Microscale Separations and Analysis,
San Diego, California USA, **17. - 22.01.2003**.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

A Einleitung	1
B Kenntnisstand und Problemstellung	3
1 4-Hydroxy-3(2<i>H</i>)-furanone	3
1.1 Historie, Vorkommen und Bedeutung	3
1.1.1 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon (HDMF, Furaneol®)	3
1.1.2 4-Hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon (HMF, Norfuraneol)	5
1.1.3 4-Hydroxy-2(oder 5)-ethyl-5(oder 2)-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon (HEMF, Homofuraneol)	6
1.2 Eigenschaften der 4-Hydroxy-3(2 <i>H</i>)-furanone	7
1.2.1 Keto-Enol-Tautomerie	7
1.2.2 Sensorische Eigenschaften	9
1.2.3 Wichtige physikalisch-chemische Eigenschaften und Stabilität	11
1.3 Bildung der 4-Hydroxy-3(2 <i>H</i>)-furanone in der Maillard-Reaktion	13
1.3.1 Maillard-Reaktion	13
1.3.2 Bildung von 4-Hydroxy-3(2 <i>H</i>)-furanonen aus Zuckern	13
1.3.3 Bildung von 4-Hydroxy-3(2 <i>H</i>)-furanonen aus Zuckerphosphaten	15
1.4 Biosynthese	17
1.4.1 Bildung und Metabolismus von 4-Hydroxy-3(2 <i>H</i>)-furanonen in Pflanzen	17
1.4.2 Bildung von 4-Hydroxy-3(2 <i>H</i>)-furanonen durch Mikroorganismen	22
1.4.2.1 Hefen	22
1.4.2.2 Bakterien	25

1.4.3	Enzymatische Bildung von 4-Hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	25
1.4.3.1	Bildung von HMF aus D-Ribose-5-phosphat	25
1.4.3.2	Bildung von HMF aus S-Ribosylhomocystein	26
2	Die Hefe <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>.....	28
2.1	Allgemeines.....	28
2.2	Eigenschaften und Vorkommen	29
2.3	Verwendung von <i>Z. rouxii</i>	31
2.3.1	Einsatz in der Nahrungsmittelherstellung.....	31
2.3.2	Einsatz als Biokatalysator in der chemischen Synthese.....	31
2.4	Osmoregulation von <i>Z. rouxii</i>	32
2.4.1	Hyperosmotischer Stress	32
2.4.2	Hypoosmotischer Stress	34
3	Problemstellung	35
C	Ergebnisse und Diskussion	37
1	Versuche mit intakten Zellen der Hefe <i>Z. rouxii</i>	37
1.1	Einfluss des Nährmediums auf die HDMF-Bildung durch <i>Z. rouxii</i>	38
1.1.1	Einfluss der Natriumchloridkonzentration.....	38
1.1.2	Einfluss des pH-Wertes	40
1.1.3	Einfluss von Glycerin.....	42
1.1.4	Einfluss von Xylose.....	42
1.2	Metabolismus von isotopenmarkierten HDMF-Vorläufern durch <i>Z. rouxii</i>	43
1.2.1	Metabolismus von 1- ¹³ C-D-Fructose-1,6-diphosphat	43
1.2.2	Metabolismus von [U- ¹⁴ C]-D-Fructose-1,6-diphosphat	45
1.2.3	Metabolismus von ¹³ C ₆ -D-Glucose.....	45
1.2.4	Diskussion der Ergebnisse	47
1.3	Analyse der HDMF-Enantiomere	48
1.3.1	Einführung	48
1.3.2	Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit mittels ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	49

1.3.3	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von HDMF mittels Chiralphasen-Kapillarzonenlektrophorese (cKZE)	52
1.3.3.1	Grundlagen der cKZE.....	52
1.3.3.2	Analyse einer HDMF-Referenz mittels cKZE.....	54
1.3.4	Enantiomerenanalytik von durch <i>Z. rouxii</i> gebildetem HDMF	55
1.3.4.1	Analyse mittels Chiralphasen-HPLC	56
1.3.4.2	Analyse mittels cKZE.....	57
1.3.5	Diskussion der Ergebnisse.....	59
2	Untersuchungen zur Bildung von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen in Rohproteinextrakten aus <i>Z. rouxii</i>.....	61
2.1	Gewinnung von Rohproteinextrakten aus Hefen.....	61
2.1.1	Aufbau einer Hefezelle.....	61
2.1.2	Extraktion von cytosolischen Proteinen und Membranproteinen	62
2.1.3	Extraktion von Zellwandproteinen.....	63
2.2	Inkubation von Rohproteinextrakten mit [U- ¹⁴ C]-D-Fructose-1,6-diphosphat	64
2.3	Nachweis der Bildung von HDMF und Identifizierung der unbekanntenen Verbindung.....	66
2.3.1	HPLC-DAD-Analysen	66
2.3.2	Massenspektrometrische Charakterisierung	66
2.4	Untersuchungen zur Bildung von HMF und HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat	68
2.5	Diskussion der Ergebnisse.....	70
3	Untersuchungen zur Bildung von 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (HMF) unter physiologischen Bedingungen	71
3.1	Bildung von HMF in cytosolischen Proteinextrakten aus <i>Z. rouxii</i>	71
3.1.1	Studien zum Bildungsmechanismus	71
3.1.1.1	Substratstudien.....	71
3.1.1.2	Nachweis von Enzymaktivitäten	72
3.1.1.3	Modellversuch mit 6- ¹³ C-D-Glucose-6-phosphat.....	73
3.1.2	Charakterisierung der HMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat in cytosolischen Proteinextrakten aus <i>Z. rouxii</i>	74
3.1.3	Diskussion der Ergebnisse.....	74

3.2	Bildung von HMF aus D-Ribulose-5-phosphat	75
3.2.1	Wiederholung der Versuche von Knowles und Mitarbeitern (1980)	75
3.2.2	Identifizierung einer Zwischenverbindung	77
3.2.2.1	Nachweis von Dicarbonylverbindungen	77
3.2.2.2	Analyse von Referenzverbindungen	78
3.2.2.3	Nachweis und Identifizierung des HMF-Vorläufers als Quinoxalinderivat	79
3.2.2.4	Nähere Charakterisierung der Bildung von 2-Methyl-3-(1,2- dihydroxyethyl)-quinoxalin	81
3.2.3	Bildung von DPD aus D-Ribulose-5-phosphat	82
3.2.3.1	Nachweis der DPD-Bildung in Abwesenheit von <i>o</i> -Phenylendiamin	82
3.2.3.2	Untersuchungen zum Bildungsmechanismus	85
3.2.4	Nachweis von DPD in Pflanzen	90
3.2.4.1	Nachweis von HMF im natürlichen Aroma von Tomaten	90
3.2.4.2	Nachweis von DPD in Tomaten	90
3.2.5	Diskussion der Ergebnisse	91
4	Untersuchungen zur Bildung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2<i>H</i>)- furanon (HDMF) unter physiologischen Bedingungen	94
4.1	Chemische Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat unter physiologischen Bedingungen	94
4.1.1	Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat und NAD(P)H	94
4.1.2	Charakterisierung der Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat und NAD(P)H	95
4.1.2.1	Einfluss der Temperatur	95
4.1.2.2	Einfluss des pH-Wertes und der chemischen Beschaffenheit des Puffers	96
4.1.2.3	Einfluss von Substratkonzentration und Reaktionszeit	96
4.1.3	Untersuchungen zum Bildungsmechanismus	98
4.1.3.1	Darstellung von stabil markierten Nicotinamidadenin-dinucleotiden	98
4.1.3.2	Inkubation von D-Fructose-1,6-diphosphat mit stabil markierten Nicotinamidadenin-dinucleotiden	100
4.1.3.3	Inkubation von 1- ¹³ C-D-Fructose-1,6-diphosphat mit NADH und [4 <i>R</i> , <i>S</i> - ² H ₂]-NADH	101
4.1.4	Diskussion der Ergebnisse	103

4.2 Identifizierung einer Zwischenverbindung der HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat	105
4.2.1 Nachweis von Dicarbonylverbindungen abgeleitet aus D-Fructose-1,6-diphosphat im Nährmedium von <i>Z. rouxii</i>	105
4.2.1.1 HPLC-DAD-Analysen.....	105
4.2.1.2 Massenspektrometrische Charakterisierung	107
4.2.2 NMR-spektroskopische Identifizierung von Q1, Q2 und Q3	108
4.2.3 Inkubation von Proteinextrakten aus <i>Z. rouxii</i>	111
4.2.3.1 Periplasma-Extrakt.....	111
4.2.3.2 Cytosolischer Extrakt.....	113
4.2.4 Diskussion der Ergebnisse.....	114
D Experimentalteil	118
1 Material	118
1.1 Chemikalien	118
1.2 Enzyme.....	118
1.3 Mikroorganismus	119
1.4 Pflanzenmaterial	119
1.5 Füllmaterialien für die Säulenchromatographie.....	119
1.6 Membranfiltration.....	119
1.7 Festphasenextraktion	120
1.8 Dialyse.....	120
2 Geräte.....	121
2.1 Schüttelinkubator	121
2.2 Autoklav.....	121
2.3 UV-VIS-Spektralphotometer.....	121
2.4 Flüssigchromatographie (LC).....	121
2.5 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	122
2.6 Hochleistungsflüssigchromatographie – Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS).....	125
2.7 Kapillargaschromatographie – Massenspektrometrie (HRGC-MS).....	126
2.8 Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	127

2.9 Chiralphasen – Kapillarzonenelektrophorese (cKZE).....	127
2.10 Flüssigszintillationszähler (LSC, Liquid-Scintillation-Counting)	128
2.11 Sonstige Geräte	128
3 Methoden	129
3.1 Pufferherstellung.....	129
3.2 Herstellung des Nährmediums	129
3.3 Wachstumsbedingungen	129
3.4 Durchführung der Experimente mit intakten <i>Z. rouxii</i> -Zellen	130
3.4.1 Bestimmung der Zellzahl	130
3.4.2 Bestimmung der HDMF-Konzentration	130
3.4.3 Metabolismus von 1- ¹³ C-D-Fructose-1,6-diphosphat	130
3.4.4 Metabolismus von ¹³ C ₆ -D-Glucose.....	130
3.4.5 Metabolismus von [U- ¹⁴ C]-D-Fructose-1,6-diphosphat	131
3.4.6 Einfluss der Natriumchloridkonzentration.....	131
3.4.7 Einfluss des pH-Wertes	131
3.4.8 Einfluss von Glycerin.....	131
3.4.9 Einfluss von Xylose.....	132
3.4.10 Probenvorbereitung für Chiralphasen-HPLC.....	132
3.4.11 Probenvorbereitung für Chiralphasen-KZE	132
3.5 Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit von HDMF mittels ¹ H-NMR-Spektroskopie	132
3.6 Durchführung der Experimente mit Proteinextrakten aus <i>Z. rouxii</i>	133
3.6.1 Darstellung des cytosolischen Proteinextraktes und des Membranproteinextraktes.....	133
3.6.2 Darstellung des Periplasma-Extraktes	134
3.6.3 Inkubation des cytosolischen Proteinextraktes.....	134
3.6.4 Extraktion und Analyse	135
3.6.5 Quantifizierung von HMF und HDMF	135
3.6.6 Bestimmung der Proteinkonzentration	136
3.7 Untersuchungen zur HMF-Bildung in cytosolischen Proteinextrakten aus <i>Z. rouxii</i>	136
3.7.1 Substratstudie.....	136

3.7.2 Extraktion und Analyse	136
3.7.3 Enzymassays.....	137
3.7.4 Einfluss des pH-Wertes	138
3.7.5 Einfluss der Temperatur	138
3.7.6 Einfluss der Extraktkonzentration.....	138
3.8 Untersuchungen zur Bildung von HMF aus D-Ribulose-5-phosphat.....	139
3.8.1 Inkubation und Analyse.....	139
3.8.2 Darstellung und Charakterisierung von Quinoxalinderivaten.....	139
3.8.3 Modifizierte Inkubation.....	140
3.8.4 Analyse von Quinoxalinderivaten.....	140
3.8.5 Isolierung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin	140
3.8.6 Charakterisierung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin.....	141
3.8.7 Synthese von Alditolacetaten	141
3.9 Untersuchungen zum HMF-Bildungsmechanismus.....	142
3.9.1 Darstellung und Isolierung von 2- ¹³ C-D-Glucose-6-phosphat und 6- ¹³ C-D-Glucose-6-phosphat	142
3.9.2 Modelexperiment zur Darstellung von ¹³ C-markiertem HMF	142
3.9.3 Modelexperiment zur Darstellung von ¹³ C-markiertem 2-Methyl-3- (1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin.....	143
3.10 Untersuchungen an Tomaten.....	144
3.10.1 Aufarbeitung und Analyse von unbehandelten Tomaten.....	144
3.10.2 Applikation von <i>o</i> -Phenylendiamin an Tomaten.....	144
3.10.3 Aufarbeitung und Analyse der mit <i>o</i> -Phenylendiamin behandelten Tomaten.....	144
3.11 Untersuchungen zur HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6- diphosphat und NAD(P)H.....	145
3.11.1 Inkubation	145
3.11.2 Extraktion und Analyse	145
3.11.3 Einfluss des pH-Wertes	145
3.11.4 Einfluss der Temperatur	146
3.11.5 Einfluss der Inkubationszeit	146
3.11.6 Einfluss von Protein und Aminosäuren	146
3.12 Darstellung von stabil markiertem NADH	147

3.12.1	Darstellung und Charakterisierung von [4 <i>R</i> - ² H]-NADH.....	147
3.12.2	Darstellung und Charakterisierung von [4 <i>S</i> - ² H]-NADH	147
3.12.3	Darstellung und Charakterisierung von [4 <i>R,S</i> - ² H ₂]-NADH.....	148
3.13	Inkubationen mit stabil markiertem NADH	148
3.14	Untersuchungen zur Bildung von Dicarbonylverbindungen aus D-Fructose-1,6-diphosphat	149
3.14.1	Inkubation	149
3.14.2	Extraktion.....	149
3.14.3	Isolierung von Q1 , Q2 und Q3	150
3.14.4	Charakterisierung von Q1 , Q2 und Q3	151
E	Literaturverzeichnis	152

Erläuterungen

- Bezüglich der Identifizierung von Verbindungen mittels HRGC-MS- bzw. HPLC-MS/MS-Analytik wurden die international gültigen Anforderungen eingehalten, d. h. Voraussetzung für die gesicherte Identifizierung einer Verbindung ist eine Übereinstimmung der massenspektrometrischen und der chromatographischen Daten der Probe mit denen einer Referenzsubstanz. Neben selbst synthetisierten und isolierten Verbindungen wurden die in der Referenzsammlung des Arbeitskreises vorhandenen Vergleichsproben verwendet.
- Zur Benennung von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen werden die Abkürzungen der entsprechenden systematischen Namen nach IUPAC-Nomenklatur verwendet.
- In den Abbildungen der Kapitel B und C steht \textcircled{P} für PO_3^{2-} .
- Die abgebildeten Chromatogramme und Massenspektren wurden von den Originalvorlagen abgescannt oder unter Verwendung von Originaldaten erstellt.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AEDA	Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (<i>Aroma Extract Dilution Analysis</i>)
AI	Autoinducer
amu	atomare Masseneinheit
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AU	Absorptionseinheit
BOC	Butoxycarbonyl
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>Collision Induced Dissociation</i>)
cKZE	Chiralphasen-Kapillarzonenelektrophorese
^{13}C -NMR	^{13}C -magnetische Kernresonanzspektroskopie

COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
D	Deuterium
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DAD	Diodenarray-Detektor
DEAE	Diethylaminoethan
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
dest.	destilliert
DMMF	2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2 <i>H</i>)-furanon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion
dpm	Zerfälle pro Minute (<i>desintegrations per minute</i>)
dq	Dublett vom Quartett
DTT	Dithiothreitol
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
EC	Enzym Klassifizierungsnummer (<i>Enzyme Commission</i>)
ee	Enantiomerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
EI	Elektronenstoßionisierung
ELSD	Verdampfungslichtstredetektor (<i>Evaporation Light Scattering Detector</i>)
ESI	Elektrosprayionisierung
FD	Aroma-Verdünnung (<i>Flavour Dilution</i>)
GC	Gaschromatographie
HDMF	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon, Furaneol [®]
HEMF	4-Hydroxy-2(oder 5)-ethyl-5(oder 2)-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity</i>
HMF	4-Hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon
HMQC	¹ H-Detected Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
¹ H-NMR	¹ H-magnetische Kernresonanzspektroskopie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HRGC	Kapillargaschromatographie (<i>High Resolution Gas Chromatography</i>)
Hz	Hertz
i.d.	innerer Durchmesser
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
KZE	Kapillarzonenelektrophorese
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)

LSC	Flüssigszintillationszmesung (<i>Liquid Scintillation Counting</i>)
λ	Wellenlänge
M	molar oder Molekulargewicht oder Molekulation
m	Multipllett
m/z	Quotient aus Ionenmasse und Ionenladung
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NAD	Nicotinamidadenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenin-dinucleotid-phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NMR	Magnetische Kernresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NP	Normalphase (<i>normal phase</i>)
OMT	<i>O</i> -Methyltransferase
ppm	Anteile pro Million (<i>parts per million</i>)
ppb	Anteile pro Milliarde (<i>parts per billion</i>)
RIC	Totalionenchromatogramm (<i>Reconstructed Ion Chromatogram</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RP18	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>) mit C18-Alkylketten
s	Singulett
SDS	Sodiumdodecylsulfat
t	triplett
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
U- ^{14}C	Molekül uniform mit ^{14}C markiert
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
XAD	Spezialadsorberharz aus Amberlite [®] XAD
YPD	<i>Yeast-Peptide-Dextrose</i>

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden instrumentell-analytische Studien zur enzymatischen und chemischen Bildung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF) und 4-Hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon (HMF) – zwei wichtigen Aromakomponenten zahlreicher Früchte und verarbeiteter Lebensmittel – vorgestellt. Die Studien demonstrieren zum ersten Mal die Bildung dieser Verbindungen aus Zuckerphosphaten unter physiologischen Reaktionsbedingungen. Ein Schwerpunkt der Arbeiten lag dabei auf der Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch den Hefestamm *Zygosaccharomyces rouxii*. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Der Zusatz von isotope markiertem 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat zum Nährmedium der Hefe *Z. rouxii* und anschließende Inkubation führte zur ausschließlichen Bildung von ¹³C-markiertem HDMF. In Gegenwart von ¹³C₆-D-Glucose wurde hingegen nur unmarkiertes HDMF gebildet, woraus eine Bildung des Hydroxyfuranons aus exogen zugesetztem D-Fructose-1,6-diphosphat abgeleitet werden konnte. Untersuchungen, in denen der Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf die HDMF-Bildung durch *Z. rouxii* getestet wurde, zeigten, dass Zellwachstum und HDMF-Produktion sehr stark vom pH-Wert und der NaCl-Konzentration des Nährmediums abhängen. Eine Erhöhung des pH-Wertes führte zu verzögertem Zellwachstum und gesteigerter HDMF-Produktion. Im Hinblick auf die HDMF-Ausbeuten wurde ein pH-Optimum bei pH 5.1 bestimmt (0.096 mg/ml HDMF). Die gebildeten HDMF-Konzentrationen korrelierten des Weiteren direkt mit den eingesetzten NaCl-Konzentrationen. Demnach wirkt sich osmotischer Stress stimulierend auf die HDMF-Bildung aus. Eine maximale Produktivität der Zellen bezogen auf die HDMF-Bildung wurde bei einer NaCl-Konzentration von 20 % beobachtet.

Die Enantiomerenanalytik von HDMF wurde mit Hilfe einer neu entwickelten Chiralphasen-Kapillarzonenlektrophorese-Methode durchgeführt. Anhand dieser Methode konnte bei HDMF, welches durch *Z. rouxii* gebildet wurde, eine Enantiomerenanreicherung von 27 % *ee* bestimmt werden. Der erstmalige Nachweis von enantiomerenangereichertem HDMF impliziert eine enantioselektive Biosynthese durch Enzymsysteme der Hefe *Z. rouxii*. Als Grundvoraussetzung für den Nachweis einer Enantiomerenanreicherung im HDMF-Molekül stellte sich ein schwach-saurer bis saurer pH-Wert des wässrigen Mediums heraus. Dies konnte durch Ermittlung der Geschwindigkeit, der durch Keto-Enol-Tautomerie bedingten Racemisierung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie eindeutig belegt werden.

In weiterführenden Arbeiten wurden zellfreie cytosolische Rohproteinextrakte aus *Z. rouxii* mit D-Fructose-1,6-diphosphat und den Nicotinamidadenin-dinucleotiden NAD, NADH, NADP und NADPH inkubiert. Anhand von HPLC-DAD- und HPLC-MS/MS-

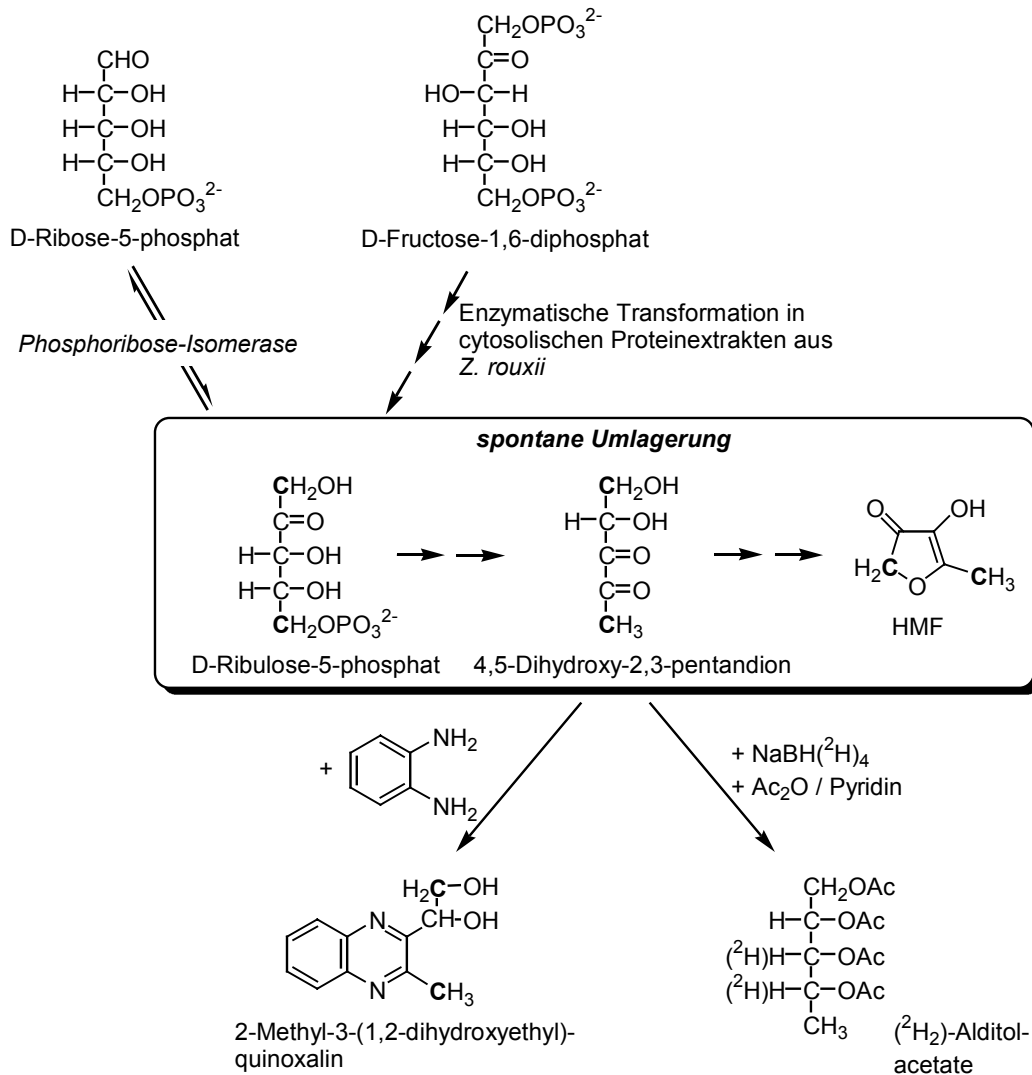
Analysen wurde die Bildung von HDMF und HMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in den Extrakten nachgewiesen. Während im Falle von HMF die Ergebnisse weiterer Inkubationsexperimente auf eine enzym-katalysierte Bildung schließen ließen, deuteten die entsprechenden Ergebnisse für HDMF eindeutig auf einen rein chemischen Bildungsmechanismus hin. Die Cofaktoren waren für die Bildung beider Hydroxyfuranone von entscheidender Bedeutung. Da in beiden Fällen von bislang nicht bekannten Bildungsmechanismen ausgegangen werden konnte, fokussierten sich die nachfolgenden Untersuchungen auf die Aufklärung der Bildungsmechanismen beider Furanonderivate.

In Substratstudien wurde HMF nach Applikation von D-Fructose-1,6-diphosphat, D-Fructose-6-phosphat, D-Glucose-6-phosphat, 6-Phosphogluconsäure, D-Ribose-5-phosphat und D-Ribulose-1,5-diphosphat an cytosolische Proteinextrakte nachgewiesen. Da für die HMF-Bildung die Hexosephosphate zunächst zu einen C5-Zucker abgebaut werden müssen, wurde die enzymatische Umwandlung der Hexosephosphate zu D-Ribulose-5-phosphat über D-Glucose-6-phosphat vermutet. Die für die Transformationen benötigten Enzyme Fructose-1,6-diphosphatase, Phosphohexose-Isomerase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase konnten mittels spezifischer Enzymassays in den cytosolischen Extrakten nachgewiesen werden. Dadurch gebildetes D-Ribulose-5-phosphat wird im Folgenden spontan in HMF umgelagert. Die Inkubation von 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat mit kommerziell erhältlichen Enzympräparaten bestätigte eindeutig die vermutete Reaktionsfolge. Über 1 % von in Puffer gelöstem D-Ribulose-5-phosphat wurde zu HMF umgelagert.

Weiterführende Arbeiten beschäftigten sich intensiv mit der beobachteten spontanen Umlagerung von *in situ* gebildetem D-Ribulose-5-phosphat zu HMF und der Identifizierung eines Zwischenproduktes. Aufgrund höherer Ausbeuten und einer schnelleren und einfacheren Durchführung der Experimente wurde diese Transformation in Inkubationsansätzen bestehend aus D-Ribose-5-phosphat und kommerziell erworbener Phosphoribose-Isomerase untersucht. Die Inkubation in Gegenwart des Abfangreagenzes *o*-Phenylendiamin führte zur Bildung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin, das anhand seiner UV-, MS- und NMR-Daten eindeutig identifiziert wurde. Daraus konnte die Bildung von 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion, einem oftmals postulierten HMF-Vorläufer, aus D-Ribulose-5-phosphat in den Reaktionsansätzen abgeleitet werden. Die Bildung dieser Verbindung ist durch die Synthese der entsprechenden deuterierten bzw. unmarkierten Alditolacetat-Derivate und anschließende HRGC-MS-Analyse abgesichert worden. Zur Aufklärung des Bildungsmechanismus wurden 1-¹³C-D-Ribulose-5-phosphat bzw. 5-¹³C-D-Ribulose-5-phosphat mit *o*-Phenylendiamin inkubiert und die entstandenen Quinoxalinderivate mittels HPLC-MS/MS analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Methylgruppe infolge einer nicht-enzymatischen Phosphat-Eliminierung am C-5 des Zuckerphosphates gebildet wird.

Nach Applikation von *o*-Phenylendiamin an reife Tomaten konnte mittels HPLC-MS/MS ebenfalls 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin detektiert werden. Dieses Ergebnis impliziert ein genuines Vorkommen von 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion in Tomaten, in

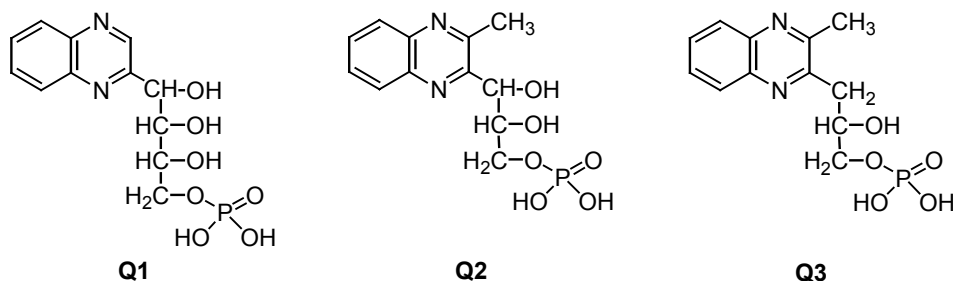
deren Aromaextrakten auch HMF nachgewiesen wurde. Somit ist in natürlichen Systemen ebenfalls von einer HMF-Bildung über 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion auszugehen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bildung von HMF sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



Anhand von HPLC-DAD- und HPLC-UV-MS/MS-Analysen konnte eine selektive Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in Gegenwart von Nicotinamid-adenin-dinucleotiden unter physiologischen Reaktionsbedingungen (neutraler pH-Wert; 30 °C) nachgewiesen werden. Zur näheren Charakterisierung dieser HDMF-Bildung wurden die Einflüsse von Temperatur, pH-Wert, Substratkonzentrationen, Reaktionszeit, exogen zugesetzten Proteinen und Aminosäuren auf die HDMF-Ausbeuten untersucht. Die erhaltenen Daten widersprachen einer Bildung im Rahmen einer ablaufenden Maillard-Reaktion. Sie deuteten vielmehr auf eine Bildung infolge einer Reduktion durch einen nicht-enzymatischen Hydrid-Transfer von NADH auf eine aus D-Fructose-1,6-

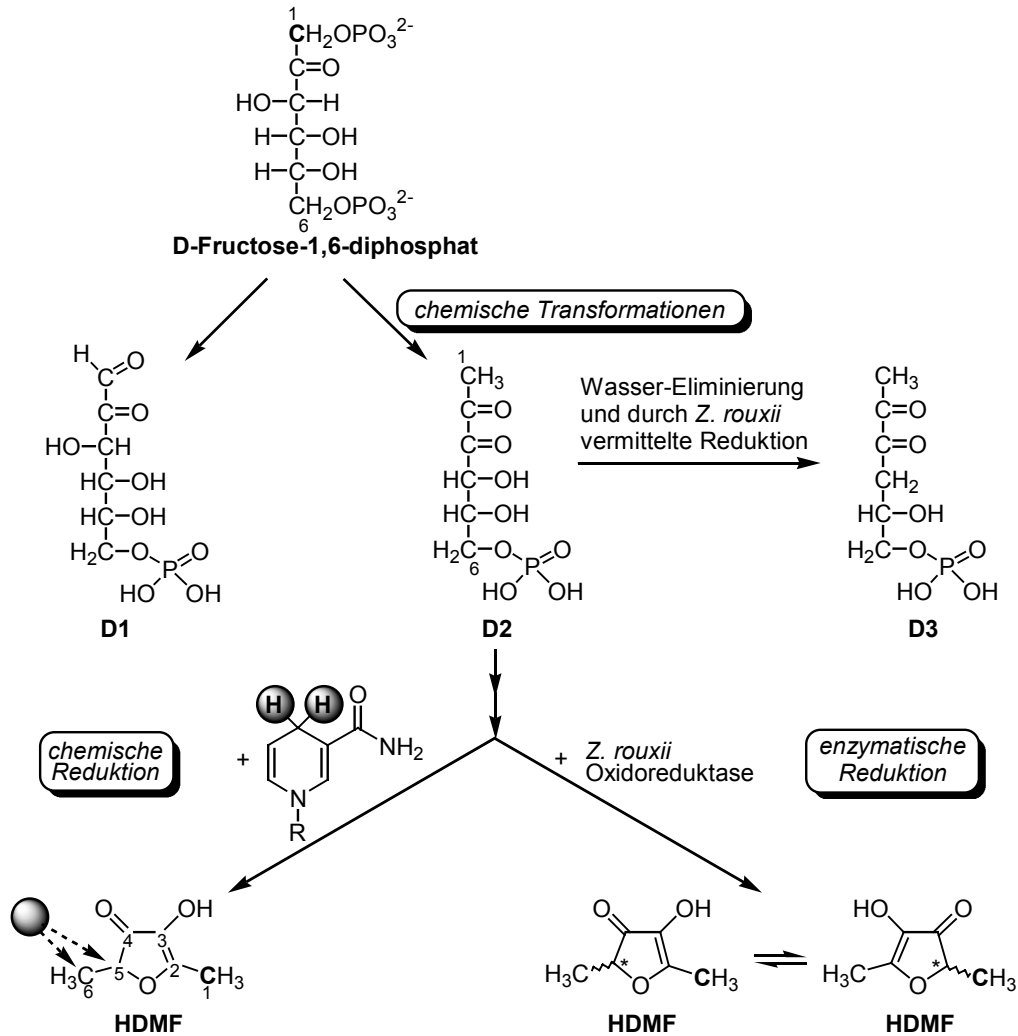
diphosphat abgeleitete Zwischenverbindung hin. Nach Applikation von einfach- und doppelt-deutertem NADH wurden für das gebildete HDMF mittels HRGC-MS-Analyse Markierungsgrade von 30 bzw. 66 % ermittelt, wodurch diese Annahme eindeutig bestätigt wurde. Durch Inkubation von 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat mit [4R,S-²H₂]-NADH und anschließender HRGC-MS-Analyse des gebildeten isotonenmarkierten HDMF konnte gezeigt werden, dass das Hydrid-Ion selektiv auf C-5 oder C-6 des Kohlenhydratgrundgerüsts des Zuckerphosphates übertragen wird. Diese Ergebnisse bewiesen eine nicht-enzymatische Bildung eines D-Fructose-1,6-diphosphatmetaboliten, dessen Reduktion zur selektiven Bildung von HDMF führen kann.

Für die HDMF-Bildung durch die Hefe *Z. rouxii* wurde von einer analogen initiierten nicht-enzymatischen Bildung einer HDMF-Vorstufe ausgegangen, die dann durch die Hefe zu HDMF metabolisiert wird. Der Zusatz von *o*-Phenylendiamin zum *Z. rouxii*-Nährmedium und anschließende HPLC-DAD-Analyse führte zur Detektion von drei Quinoxalinderivaten, die aus D-Fructose-1,6-diphosphat-Metaboliten gebildet wurden. Nach ihrer Isolierung sind die Verbindungen anhand von MS/MS-Daten und ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren (¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR, DEPT, ¹H-¹H-COSY, HMQC, HMBC) als Phosphorsäure-mono-(2,3,4-trihydroxy-4-quinoxalin-2-yl-butyl)-ester (**Q1**), Phosphorsäure-mono-[2,3-dihydroxy-3-(3-methyl-quinoxalin-2-yl)-propyl]-ester (**Q2**) und Phosphorsäure-mono-[2-hydroxy-3-(3-methyl-quinoxalin-2-yl)-propyl]-ester (**Q3**) identifiziert worden.



Während **Q1** und **Q2** auch in Nährmedien ohne Hefezellen nachgewiesen wurden, konnte **Q3** nur in Gegenwart der Hefezellen detektiert werden. Aus den identifizierten Quinoxalinderivaten wird die Bildung von 2-Hexosulose-6-phosphat (**D1**), 1-Deoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (**D2**) und 1,4-Dideoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (**D3**) in den Nährmedien abgeleitet. Somit gelang erstmals der Beweis der Bildung von 1-Deoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (**D2**) im Nährmedium, einem vielfach postulierten, aber nie nachgewiesenen Intermediat der HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat. Aufgrund der enantioselektiven Bildung von HDMF durch die Hefen wird daher bei der HDMF-Biosynthese durch *Z. rouxii* von einer Kombination aus nicht-enzymatischen Reaktionsschritten und einer durch Oxidoreduktasen der Hefezellen vermittelten Reduktion ausgegangen. Diese Annahme wurde unterstützt durch die Detektion von HDMF nach Inkubation von cytosolischen und periplasmatischen Proteinextrakten mit

einem deutlichen Überschuss an D-Fructose-1,6-diphosphat. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bildung von HDMF sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



Summary

The present work represents instrumental-analytical studies on the enzymatic and chemical formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF) and 4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone (HMF), two important flavour compounds in many fruits and processed food. The performed studies demonstrate for the first time the formation of these compounds from carbohydrate phosphates under physiological reaction conditions. Of special interest during these studies was the formation of HDMF by the yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. In detail the following results were obtained:

Only singly ^{13}C -labelled HDMF was formed after addition of 1- ^{13}C -D-fructose-1,6-diphosphate to the nutrient medium of *Z. rouxii* and subsequent incubation with *Z. rouxii* cells. However, only unlabelled HDMF was formed in the presence of $^{13}\text{C}_6$ -D-glucose, implying an exclusive formation of the hydroxyfuranone from exogenously supplied D-fructose-1,6-diphosphate. The formation of HDMF by *Z. rouxii* was studied under various culture conditions. The performed studies revealed that cell growth and HDMF production were heavily dependent on medium pH and sodium chloride concentration. Higher pH values of the nutrient medium retarded cell growth, but had a positive effect on HDMF formation resulting in an optimal pH value of 5.1 with regard to the yield of HDMF (0.096 mg/ml HDMF). Osmotic stress stimulated HDMF formation by *Z. rouxii*, as HDMF yields correlated with the employed sodium chloride concentrations. HDMF formation per yeast cell peaked at 20 % sodium chloride in the nutrient medium.

The analysis of the HDMF enantiomers was performed by means of a newly developed chiral phase capillary electrophoretic method. Application of this method to HDMF formed by *Z. rouxii* led to the detection of enantiomerically enriched HDMF exhibiting an enantiomeric excess value of 27 % *ee*. Thus, for the first time enantiomerically enriched HDMF was demonstrated, implying an enantioselective biosynthesis catalysed by enzymes of the yeast *Z. rouxii*. A slightly acidic pH value of the aqueous medium turned out to be essential for the detection of an enantiomeric enrichment in the HDMF molecule. This was unequivocally proved by the determination of the racemisation velocity due to keto-enol tautomerisation of HDMF by means of ^1H -NMR spectroscopy.

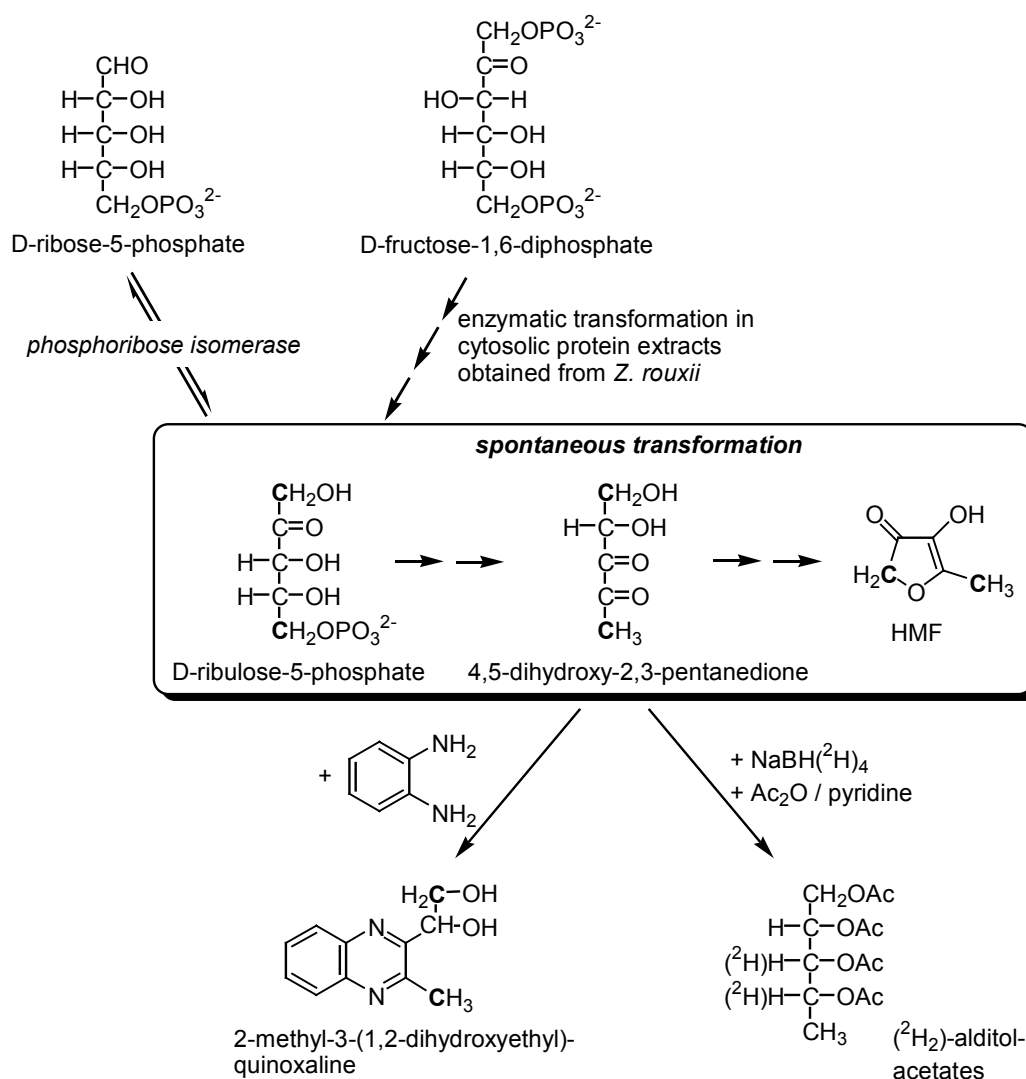
In further studies cell-free cytosolic protein extracts obtained from *Z. rouxii* were incubated with D-fructose-1,6-diphosphate and the nicotinamide adenine dinucleotides NAD, NADH, NADP and NADPH. The formation of HDMF and HMF from D-fructose-1,6-diphosphate in the protein extracts was detected by means of HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis. In case of the HMF formation the results of further incubation experiments suggested an enzyme-catalysed formation. However, the corresponding data for HDMF indicated a purely chemical formation pathway. The cofactors turned out to be essential for the formation of both hydroxyfuranones. Because the formation pathways

were unknown in both cases the subsequent investigations focused on the elucidation of the formation pathways of both furanone derivatives.

HMF was produced from D-fructose-1,6-diphosphate, D-fructose-6-phosphate, D-glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate, D-ribose-5-phosphate and D-ribulose-1,5-diphosphate after application to cytosolic protein extracts. Since a transformation of the hexose phosphates to a five carbon sugar is mandatory for HMF formation, an enzymatic transformation of the hexose phosphates to D-ribulose-5-phosphate via D-glucose-6-phosphate was assumed. Specific enzyme assays revealed activity of the required enzymes fructose-1,6-diphosphatase, phosphohexose isomerase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the cytosolic extracts. Formed D-ribulose-5-phosphate is spontaneously converted to HMF. This reaction pathway was evidenced by the production of HMF in solutions containing commercially available enzymes and 6-¹³C-D-glucose-6-phosphate. Furthermore, more than 1 % of D-ribulose-5-phosphate were transformed to HMF in a buffer solution.

Additional studies intensively dealt with the observed spontaneous conversion of *in situ* formed D-ribulose-5-phosphate to HMF and the identification of an intermediate. Due to higher yields and the faster and simpler procedure the transformation was studied in incubations containing commercially available ribosephosphate isomerase and D-ribose-5-phosphate. The incubation in presence of the trapping reagent *o*-phenylenediamine led to the formation of 2-methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxaline, which was unequivocally identified by its UV-, MS- and NMR-data. Thus, the formation of 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, an often postulated HMF precursor, from D-ribulose-5-phosphate in the incubation mixtures could be deduced. The formation of this compound was ensured by its conversion to the respective deuterium labelled or unlabelled alditol acetate derivatives and subsequent HRGC-MS analysis. The elucidation of the formation pathway was achieved by incubation of 1-¹³C-D-ribulose-5-phosphate as well as 5-¹³C-D-ribulose-5-phosphate with *o*-phenylenediamine and analysis of the respective quinoxaline derivatives by means of HPLC-ESI-MS/MS analysis. The obtained results clearly demonstrated the formation of the methyl-group at C-5 of the carbohydrate phosphate in consequence of a non-enzymatic phosphate elimination.

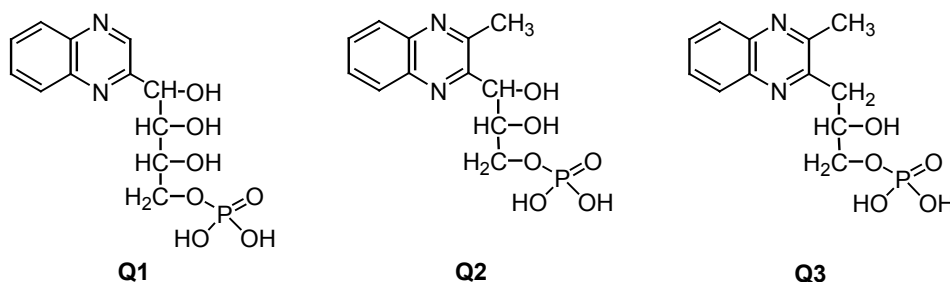
Application of *o*-phenylenediamine to ripe tomatoes led to the detection of 2-methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxaline by means of HPLC-MS/MS analysis, implying the genuine occurrence of 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione in tomatoes. Since HMF was also detected in aroma extracts obtained from tomatoes of the same sample HMF formation in natural systems via 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione is quite possible as well. The results of the studies on the formation of HMF are summarized in the following figure.



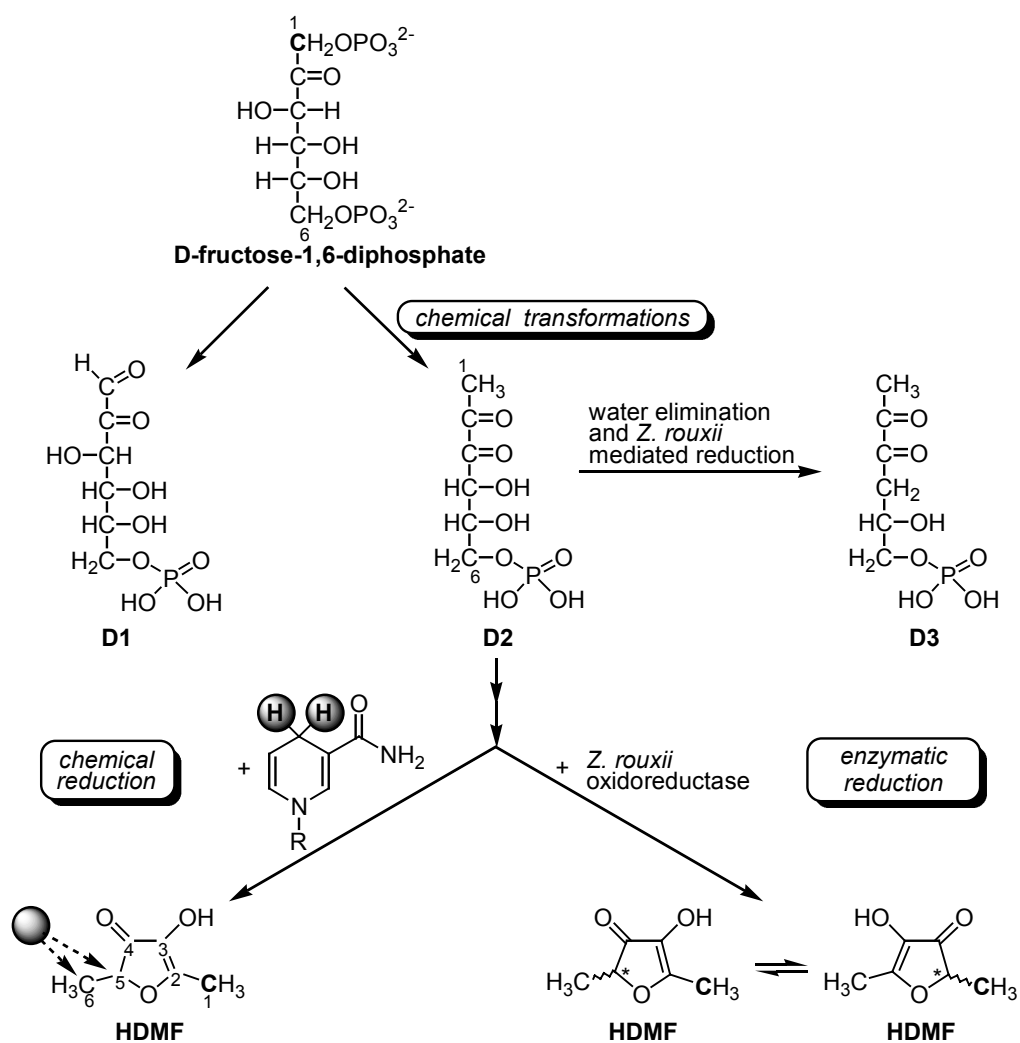
A selective chemical formation of HDMF from D-fructose-1,6-diphosphate in the presence of nicotinamide adenine dinucleotides under physiological reaction conditions (neutral pH value; 30 °C) was detected by means of HPLC-DAD and HPLC-UV-MS/MS analysis. For further characterization of this reaction the influences of temperature, pH value, substrate concentration, reaction time, exogenously added proteins and amino acids were studied with regard to the HDMF yields. The obtained data contradicted the formation due to a Maillard reaction, but indicated a formation in consequence of a reduction mediated by a non-enzymatic hydride-transfer from NADH to an unknown intermediate derived from D-fructose-1,6-diphosphate. The hydride-transfer was confirmed by the application of singly and doubly deuterium labelled NADH resulting in the formation of HDMF exhibiting a deuterium labelling of approx. 30 % and 66 %, respectively, as determined by HRGC-MS analysis. The incubation of 1-¹³C-D-fructose-1,6-diphosphate with [4R,S-²H₂]-NADH followed by HRGC-MS analysis of the formed

isotopically labelled HDMF revealed, that the hydride-ion is selectively transferred to C-5 or C-6 of the carbohydrate skeleton of the sugar phosphate. Thus, the non-enzymatic formation of a D-fructose-1,6-diphosphate metabolite, which can selectively be converted to HDMF by reduction was proved.

Analogously as initial step for the HDMF formation by *Z. rouxii* a non-enzymatic formation of an HDMF precursor, which can be metabolised to HDMF by the yeast was assumed. The addition of *o*-phenylenediamine to *Z. rouxii* culture medium and subsequent analysis by means of HPLC-DAD revealed the formation of three quinoxaline derivatives derived from D-fructose-1,6-diphosphate metabolites. Isolation and characterization of these compounds by means of tandem mass spectrometry and one- and two-dimensional NMR spectroscopy (^1H -, ^{13}C - and ^{31}P -NMR, DEPT, ^1H - ^1H -COSY, HMQC, HMBC) led to the identification of phosphoric acid mono-(2,3,4-trihydroxy-4-quinoxaline-2-yl-butyl) ester (**Q1**), phosphoric acid mono-[2,3-dihydroxy-3-(3-methyl-quinoxaline-2-yl)-propyl] ester (**Q2**) and phosphoric acid mono-[2-hydroxy-3-(3-methyl-quinoxaline-2-yl)-propyl] ester (**Q3**).



Q1 and **Q2** were formed independently of *Z. rouxii* cells in the nutrient medium, whereas **Q3** was only detected in incubation systems containing the yeast. From the identified quinoxaline derivatives the formation of 2-hexosulose-6-phosphat (**D1**), 1-deoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphate (**D2**) and 1,4-dideoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphate (**D3**) in the culture medium was deduced. The identification of **Q2** demonstrated for the first time the chemical formation of 1-deoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphate (**D2**) in the culture medium, a generally expected but never identified intermediate in the formation pathway of HDMF from D-fructose-1,6-diphosphate. Due to the enantioselective formation of HDMF by the yeast an HDMF biosynthesis by *Z. rouxii* consisting of non-enzymatic reaction steps and a reduction mediated by oxidoreductases of the yeast cells was anticipated. This assumption was supported by the detection of HDMF after incubation of cytosolic and periplasmic protein extracts with an excess of D-fructose-1,6-diphosphate. The results of the studies on the formation of HDMF are summarized in the following figure.



A Einleitung

Die Schwerpunkte der Aromaforschung lagen in den letzten Jahrzehnten in der qualitativen Bestandsaufnahme von Aromastoffen in Lebensmitteln sowie in der Bewertung der sensorischen Relevanz einzelner geruchsaktiver Verbindungen (Schreier und Mosandl, 1985). Bis heute wurden mehr als 6200 flüchtige Substanzen in ca. 400 Lebensmitteln identifiziert (Maarse und Visscher, 1992). In vielen Fällen ist jedoch nur eine beschränkte Anzahl an Verbindungen für das tatsächliche Aroma eines Lebensmittels von Bedeutung. Besondere Beachtung verdienen sog. „character impact“-Verbindungen, die das charakteristische Aroma eines Lebensmittels prägen.

In zahlreichen unverarbeiteten und verarbeiteten Lebensmitteln wurden Derivate der 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone als wichtige Aromakomponenten identifiziert, die im Allgemeinen einen süßen, fruchtigen oder karamelligen Geruchseindruck vermitteln. Als bekannteste Vertreter seien 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF, Furaneol[®]), 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF, Methoxyfuraneol), 4-Hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon (HMF, Norfuraneol) und 4-Hydroxy-2(oder 5)-ethyl-5(oder 2)-methyl-3(2*H*)-furanon (HEMF, Homofuraneol) genannt (Abb. B-1, B-2, B-3) (Schwab und Roscher, 1997). Aufgrund seiner einzigartigen organoleptischen Eigenschaften und seines sehr breiten Vorkommens in Früchten und verarbeiteten Lebensmitteln zählt HDMF heute zu den wichtigsten Aromakomponenten (Cheetham, 1997). Diese Substanz wurde als „character impact“-Verbindung von Erdbeeren beschrieben (Larson und Mitarbeiter, 1992). Sie zählt außerdem zu den wichtigen Aromakomponenten in Lebensmitteln, die während der Herstellung einer thermischen Behandlung unterzogen werden, wie z. B. Weißbrot (Schieberle und Grosch, 1994). Trotz des weit verbreiteten Anbaus von Erdbeeren würde nach den Recherchen von Grimm (1997) die Welterdbeerernte gerade reichen, um 5 % des US-amerikanischen Bedarfs an Erdbeeraroma zu decken. Zur Deckung der Nachfrage wurden daher chemische Synthesen entwickelt, um HDMF großtechnisch produzieren zu können. Das Produktionsvolumen von HDMF, das in erster Linie zur Aromatisierung von Marmeladen, Gelees, Getränken, Süßwaren und Milchprodukten eingesetzt wird, umfasst derzeit ca. 100 Jahrestonnen (Hirvi und Mitarbeiter, 1980; Brühlmann, 2002). Der Preis für synthetisches HDMF lag 1998 bei ca. 143 US\$ pro Kilogramm (Grab, 1998)¹.

In den letzten Jahren zeichnete sich ein stetig zunehmender Trend ab hin zu „natürlichen“ Produkten, insbesondere auch zu natürlichen Aromen, der auf ein erhöhtes Gesundheits- und Ernährungsbewusstsein des Verbrauchers zurückzuführen ist. Aromastoffe gelten auch dann als natürlich, wenn sie enzymatisch oder mikrobiologisch aus Ausgangsstoffen pflanzlicher und tierischer Herkunft gewonnen wurden (Anlage 1 der Aromenverordnung,

¹ Grab, W. (1998). Costs of flavourings.
http://courses.che.umn.edu/02fscn4345-1f/costs_of_flavourings.htm.

Stand: 18.6.2001²). Der wachsende Markt für natürliche Lebensmittelaromen revolutionierte daher die Entwicklung in der Lebensmittelindustrie, da die Hersteller in alternativen Gewinnungsmöglichkeiten neue Wachstumsmärkte sahen. Der biotechnologischen Gewinnung von Aromastoffen kommt hierbei immer größere Bedeutung zu. Durch Nachahmung pflanzlicher Sekundärstoffwechselwege in mikrobiellen Systemen können mittels fermentativer Verfahren Aromen gewonnen werden, die als „natürlich“ deklariert werden dürfen, was einen erheblichen Marketingvorteil mit sich bringt (Krings und Berger, 1998). Die Preisunterschiede zwischen einem natürlichen Aromastoff und seinem synthetischen Analogon sind zum Teil äußerst beträchtlich. Während beispielsweise synthetisches Vanillin nur ca. 12 US\$/kg kostet, muss für natürliches, aus Vanilleschoten extrahiertes Vanillin bis zu 4000 US\$/kg gezahlt werden (Feron und Mitarbeiter, 1996). Biotechnologische Produktionsmethoden sind heute mit Hilfe von Enzymen, Mikroorganismen und Zellkultur-Techniken bei der Produktion zahlreicher Aromastoffe erfolgreich im Einsatz (Cheetham, 1997; Schreier, 1997; Scragg, 1997). Der industriell sehr wichtige Aromastoff γ -Decalacton wird beispielsweise mit Hilfe des Pilzstammes *Yarrowia lipolytica* aus Ricinolsäure durch β -Oxidation gewonnen (Tyrell, 1990). Eine Simulation der pflanzlichen Aromastoffproduktion setzt jedoch detaillierte Kenntnisse bezüglich der Biosynthese der entsprechenden Aromakomponente voraus. Die moderne Aromastoffforschung beschäftigt sich daher zunehmend mit der Aufklärung der Bildungsmechanismen wichtiger Aromakomponenten. Im Falle der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone ist dieses Wissen trotz intensiver Forschungsarbeiten jedoch noch sehr lückenhaft. Im Jahre 1996 beschrieben Hecquet und Mitarbeiter die Bildung von HDMF durch den Hefestamm *Zygosaccharomyces rouxii*. Nach Applikation von D-Fructose-1,6-diphosphat wurden HDMF-Konzentrationen von bis zu 100 ppm im Nährmedium detektiert. Über den Metabolismus des Zuckerphosphates zu HDMF durch die Hefe wurden bislang jedoch keine weiteren Studien durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neue Erkenntnisse zur natürlichen Entstehung von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen aus Zuckerphosphaten, insbesondere zur Bildung von HDMF durch den Hefestamm *Z. rouxii*, zu sammeln. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Identifizierung von Zwischenprodukten der Hydroxyfuranon-Bildung sowie die Identifizierung von beteiligten Enzymsystemen des Hefestammes. Des Weiteren galt es, aufbauend auf den Ergebnissen von Hecquet und Mitarbeitern (1996), die HDMF-Produktion durch *Z. rouxii* zu optimieren. Im Zusammenhang mit diesem Hefestamm, der industriell zur Fermentation von Sojasoße eingesetzt wird, wurden des Weiteren auch die Vorkommen der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone HMF und HEMF beschrieben (Sasaki und Mitarbeiter, 1991). In beiden Fällen wurden ebenfalls Zuckerphosphate als Vorläufermoleküle identifiziert, weshalb prinzipiell von ähnlichen Bildungsmechanismen ausgegangen wird. Der nachfolgende Kenntnisstand beschränkt sich daher in erster Linie auf Vorkommen, Eigenschaften und Bildungsmechanismen von HDMF, HMF und HEMF.

² Aromenverordnung (Stand: 18.6.2001). <http://www.aromenhaus.de/recht/verordnung.html>.

B Kenntnisstand und Problemstellung

1 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone

1.1 Historie, Vorkommen und Bedeutung

1.1.1 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF, Furaneol[®])

Im Rahmen seiner Untersuchungen zur Maillard-Reaktion gelang Hodge im Jahre 1960 erstmals der Nachweis von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF, Furaneol[®]). HDMF entstand als Reaktionsprodukt bei der Erhitzung der 6-Desoxyhexose Rhamnose in Gegenwart von Piperidinacetat (Hodge, 1960). Die isolierte Verbindung wurde als bei Raumtemperatur flüchtig beschrieben und vermittelt laut den Autoren einen ausgeprägten karamellartigen bis fruchtigen Geruchseindruck. Es wurden allerdings keine Angaben zu den spektroskopischen Daten geliefert (Hodge und Mitarbeiter, 1963). Zwei Jahre später gelang Rodin und Mitarbeitern (1965) die Isolierung einer instabilen, intensiv nach „verbrannter Ananas“ riechenden Verbindung aus dem Diethyletherextrakt von frisch gepresstem Ananassaft, die anhand ihrer NMR-, UV-, Infrarot-, und Massenspektren als HDMF (Abb. B-1) identifiziert wurde. Daher rührt der noch heute zum Teil für HDMF gebräuchliche Trivialname „Ananasketon“. Noch im selben Jahr wiederholten daraufhin Willhalm und Mitarbeiter (1965) die von Hodge (1960) beschriebene Synthese von HDMF und bestätigten aufgrund der erhaltenen spektralen Daten (NMR, UV, IR und MS) die von Rodin und Mitarbeitern (1965) vorgeschlagene Struktur. Das Vorliegen des Moleküls in der Enol-Struktur konnte zusätzlich durch Derivatisierungen der Hydroxylgruppe (Methylierung und Acetylierung) bestätigt werden (Willhalm und Mitarbeiter, 1965). In der darauf folgenden Zeit erreichte die rasche Entwicklung auf dem Gebiet der Kapillargaschromatographie vor allem in Kombination mit der Massenspektrometrie (HRGC-MS) einen hohen Standard bei der Analyse komplexer Gemische flüchtiger Verbindungen (Schomburg und Mitarbeiter, 1984). Dies führte zum Nachweis von HDMF in einer Vielzahl von weiteren Früchten wie z. B. in der arktischen Moosbeere (Kallio, 1976), Weintrauben (Rapp und Mitarbeiter, 1980), Himbeeren (Honkanen und Mitarbeiter, 1980), Mangos (Pickenhagen und Mitarbeiter, 1981) und Tomaten (Buttery und Mitarbeiter, 1994). Neben seinem Vorkommen in Ananas (Rodin, 1965) kommt HDMF sehr große Bedeutung als eine der wichtigsten Aromakomponenten in der Erdbeerfrucht zu (Ohloff, 1969; Sundt, 1970; Larson und Poll, 1992; Schieberle und Hofmann, 1997).

Zusätzlich trägt in vielen Früchten wie z. B. Mango und Erdbeere auch der Methylether des HDMF (2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon; Methoxyfuraneol; Mesifuran) wesentlich zum Aroma bei (Hunter und Mitarbeiter, 1974; Pyysalo und Mitarbeiter, 1979) (Abb. B-1). Darüber hinaus liegt HDMF in vielen Früchten auch in gebundener Form als HDMF- β -D-glucopyranosid (Mayerl und Mitarbeiter, 1989; Honkanen und Mitarbeiter, 1994) und HDMF-6'-*O*-malonyl- β -D-glucopyranosid (Abb. B-1) (Roscher und Mitarbeiter, 1996; Withopf und Mitarbeiter, 1997) vor. Bemerkenswert ist, dass HDMF und seine Derivate bislang ausschließlich in den Blüten und Früchten von Pflanzen nachgewiesen wurden (Schwab und Roscher, 1997).

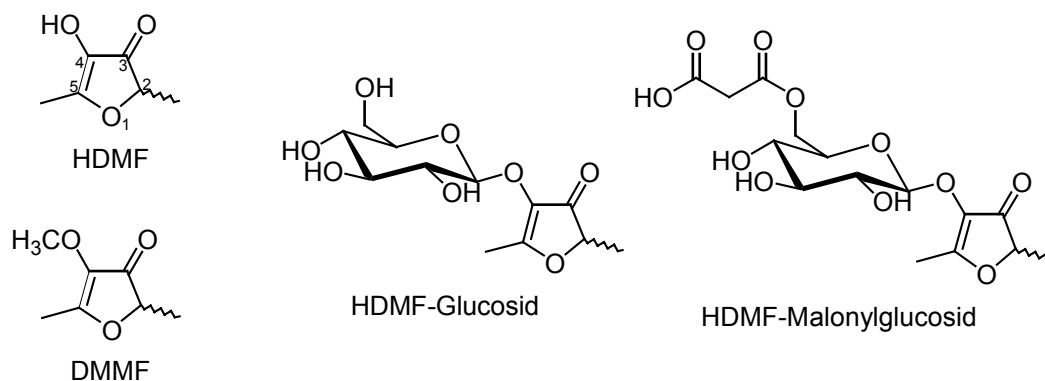


Abb. B-1: Strukturformeln von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF, Furaneol[®]), 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF, Methoxyfuraneol), HDMF- β -D-glucopyranosid (HDMF-Glucosid), HDMF-6'-*O*-malonyl- β -D-glucopyranosid (HDMF-Malonylglucosid).

Eine nicht minder wichtige Rolle spielt HDMF im flüchtigen Anteil zahlreicher verarbeiteter Lebensmittel. Während des Verarbeitungsprozesses reagieren im Rahmen der so genannten Maillard-Reaktion oder nicht-enzymatischen Bräunung unter Hitze einwirkung reduzierende Zucker mit Aminoverbindungen in komplex ablaufenden Reaktionsfolgen (Ledl und Schleicher, 1990). In Folge von Dehydratisierungen und Zyklisierungen entsteht eine Vielzahl an aromawirksamen Verbindungen, unter ihnen auch HDMF. Die Maillard-Reaktion wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch genauer beleuchtet werden. Das Hydroxyfuranon wurde im flüchtigen Anteil einer Vielzahl gekochter und gerösteter Lebensmittel identifiziert. Beispielhaft seien Fleischprodukte wie Rindfleischbrühe (Tonsbeek und Mitarbeiter, 1968), gekochtes und geschmortes Rindfleisch (Cerny und Grosch, 1992; Guth und Grosch, 1994), Backwaren wie Brot und Brotkruste (Schieberle und Grosch, 1994) sowie Popcorn (Schieberle, 1991a), Bier (Schieberle, 1991b) und Tee (Guth und Grosch, 1993) genannt.

Des Weiteren spielt HDMF eine wichtige Rolle in Lebensmitteln, die im Laufe der Herstellung einem fermentativen Prozess unterliegen. So wurde es in Sojasoße (Nunomura und Mitarbeiter, 1980; Sasaki und Mitarbeiter, 1991), in Schweizer

Emmentaler und Cheddar-Käse nachgewiesen (Preininger und Mitarbeiter, 1994a, 1994b; Preininger und Grosch, 1994; Milo und Reineccius, 1997). Auf die Beteiligung von Mikroorganismen an der Bildung des Hydroxyfuranons wird in Abschnitt B 1.4.2 noch detailliert eingegangen.

Als Besonderheit muss das Vorkommen von HDMF in dem männlichen Sexualpheromon der Schabe *Eurycotis floridana* angesehen werden (Farine und Mitarbeiter, 1993). So stellt dies bislang den einzigen Nachweis von HDMF als natürliches Produkt von Insekten dar.

1.1.2 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (HMF, Norfuraneol)

Die Bildung von HMF (Abb. B-2) wurde erstmals von Severin und Seilmeier im Jahre 1967 bei der Erhitzung von Aldopentosen (D-Ribose, D-Xylose, D-Arabinose) in Gegenwart von Acetaten primärer Amine beobachtet. Im darauf folgenden Jahr machten Peer und Van den Ouweland die gleiche Beobachtung beim Einsatz von ^{14}C -markiertem D-Ribose-5-phosphat bzw. D-Ribose in Gegenwart von sekundären Aminen, wodurch zusätzlich Informationen über den Reaktionsmechanismus gewonnen wurden (Peer und Van den Ouweland, 1968; Peer und Mitarbeiter, 1968). In Lebensmitteln wurde HMF erstmals als wichtige Aromakomponente von Rindfleischbrühe nachgewiesen (Tonsbeek und Mitarbeiter, 1968). Es vermittelt einen karamellartigen, verbrannten oder an geröstete Zichorienwurzeln erinnernden Geruchseindruck (Tonsbeek und Mitarbeiter, 1968). Im Folgenden wurde HMF als genuiner Bestandteil im Aroma von Sojasoße (Nunomura und Mitarbeiter, 1979), Himbeeren (Honkanen und Mitarbeiter, 1980), Guaven (Idstein und Schreier, 1985) und Tomaten (Buttery und Mitarbeiter, 1994) beschrieben. Der Nachweis von HMF in Kiefernnadeln (Boo und Mitarbeiter, 1994) bewies erstmals das natürliche Vorkommen eines Hydroxyfuranons in einem anderen Pflanzenteil als Blüte bzw. Frucht. Nahrstedt und Mitarbeitern gelang 1995 die Isolierung des 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon-glucosids Psydrin (Abb. B-2) aus den Blättern von *Psydrax livida* (Nahrstedt und Mitarbeiter, 1995) während Comte und Mitarbeiter im darauf folgenden Jahr die gleiche Verbindung aus den Blättern von *Jupernicus phoeniciae* extrahieren und aufreinigen konnten (Comte und Mitarbeiter, 1996).

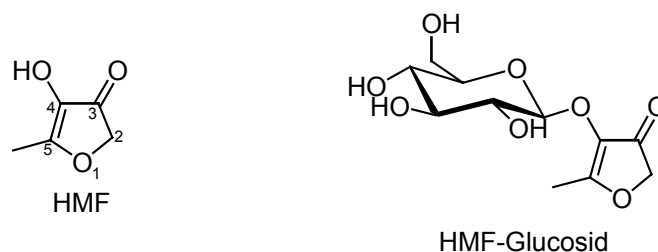


Abb. B-2: Strukturformeln von 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (HMF, Norfuraneol) und HMF- β -D-glucopyranosid (HMF-Glucosid; Psydrin).

Wie HDMF spielt auch HMF eine wichtige Rolle in der Maillard-Reaktion und liegt somit in zahlreichen erhitzten Lebensmitteln wie Rindfleischbrühe (Tonsbeek und Mitarbeiter, 1968), Kaffee (Tressl und Mitarbeiter, 1978) und Popcorn (Buttery und Mitarbeiter, 1997) vor.

Des Weiteren wurde HMF ebenfalls im männlichen Sexualpheromon der Schabe *Eurycotis floridana* identifiziert (Farine und Mitarbeiter, 1993).

Aufgrund seiner bei weitem geringeren Bedeutung als Aromastoff im Vergleich zu HDMF und HEMF (Abschnitt B 1.2.2) wird HMF jedoch nicht kommerziell vertrieben (Huber, 1992).

1.1.3 4-Hydroxy-2(oder 5)-ethyl-5(oder 2)-methyl-3(2H)-furanon (HEMF, Homofuraneol)

HEMF (Abb. B-3) fand erstmals in den Jahren 1967 und 1969 in zwei Patenten Erwähnung, die sich unter anderem mit der synthetischen Darstellung von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen befassten (Re und Ohloff, 1967; Tonsbeek und Eykelboom, 1969). Diesen Patenten folgten zwei Publikationen, welche sich ebenfalls dieser Problemstellung widmeten (Re und Mitarbeiter, 1973; De Rijke und Boelens, 1973). Allgemein besitzt HEMF eine ausgeprägte Geschmacksnote nach gekochten Früchten. Obwohl die Geruchsintensität im Vergleich zum HDMF stärker ist, vermittelt HEMF einen schwächer karamellartigen Sinneseindruck als HDMF (Re und Mitarbeiter, 1973). Der japanischen Gruppe um Nunomura gelang 1976 erstmals die Isolierung von HEMF aus Sojasoße (Nunomura und Mitarbeiter, 1976). Bereits hier wurde auf seinen bedeutenden Beitrag zum charakteristischen Aromaprofil von Sojasoße hingewiesen und einige Jahre später stellte sich HEMF sogar als „character impact“-Verbindung dieses Lebensmittels heraus (Nunomura und Mitarbeiter, 1980).

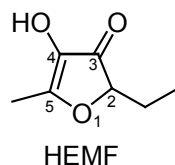


Abb. B-3: Strukturformel von 4-Hydroxy-2(oder 5)-ethyl-5(oder 2)-methyl-3(2H)-furanon (HEMF, Homofuraneol).

Im Jahre 1978 identifizierten Tressl und Mitarbeiter HEMF im Aroma von Röstkaffee (Tressl und Mitarbeiter, 1978), was auf seine Bildung im Rahmen der Maillard-Reaktion hindeutet. Darüber hinaus wurde es als natürlicher Bestandteil in Melonen (Huber, 1992), Liebstöckel-Extrakt (Blank und Schieberle, 1993) sowie in Schweizer Käse (Emmentaler) (Preininger und Mitarbeiter, 1994a; 1994b) nachgewiesen. Die japanische Arbeitsgruppe um Hayashida identifizierte HEMF im Jahre 1997 in fermentiertem dunklem Gerstenmalz

(Hayashida und Slaughter, 1997) und im Jahr darauf als eine der wertgebenden Aromakomponenten in japanischem Miso (Hayashida und Mitarbeiter, 1998a), welches in einem der Sojasoßenherstellung ähnlichen Prozess aus Reis produziert wird (Belitz und Mitarbeiter, 2001). Die Vorkommen in fermentativ gewonnenen Lebensmitteln weisen auf einen entscheidenden Beitrag der entsprechend eingesetzten Mikroorganismen hin, worauf in Abschnitt B 1.4.2 noch näher eingegangen wird.

Seit 1988 wird HEMF industriell vermarktet und in erster Linie zur Intensivierung von Fruchtaromen eingesetzt. Des Weiteren findet es Anwendung in der Aromatisierung von Karamell, Kaffee, Ahornsirup, Fleisch, Brot und Tabak (Huber, 1992).

1.2 Eigenschaften der 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone

1.2.1 Keto-Enol-Tautomerie

Die Analytik chiraler Verbindungen mittels multidimensionaler Methoden ist auf dem Gebiet der Aromaforschung ein häufig angewendetes Mittel zur Herkunftsbestimmung bzw. Authentizitätskontrolle von Aromastoffen. Nach den bisherigen Erfahrungen weisen natürlich vorkommende chirale Aromastoffe in der Regel charakteristische Enantiomerenüberschüsse auf, die auf eine stereoselektive, enzymkatalysierte Biogenese zurückzuführen sind (Bruche und Mitarbeiter, 1991). HDMF verfügt formal über ein Stereozentrum an C-2 bzw. C-5 (Abb. B-4) und ist somit als chirale Verbindung zu betrachten. Das Molekül unterliegt aufgrund der Enol-Carbonyl-Struktur jedoch der Keto-Enol-Tautomerie, wodurch diese Stereoinformation verloren geht.

Der Arbeitsgruppe um Mosandl gelang 1990 erstmals die Fraktionierung der HDMF-Enantiomere mittels Chiralphasen-HPLC-Analyse an einer Chiraspher NT[®] Phase (Abb. C-7). Dabei wurden zwei Fraktionen erhalten, deren Enantiomerenverhältnisse mittels gaschromatographischer Analyse an derivatisierten Cyclodextrinphasen bestimmt werden konnten (Mosandl und Mitarbeiter, 1990). Bruche und Mitarbeiter (1991) beschäftigten sich im Folgenden intensiv mit der Enantiomerenverteilung von HDMF in verschiedenen Früchten, konnten aber mittels multidimensionaler gaschromatographischer Methoden an chiralen Phasen ausschließlich racemisches HDMF detektieren (Bruche und Mitarbeiter, 1991). Dies führten die Autoren auf eine säure-katalysierte Racemisierung des Moleküls zurück, was anhand eines Modelversuchs bestätigt werden konnte. Dabei unterlag enantiomerenangereichertes HDMF in essigsaurem Diethylether schneller einer Racemisierung als in den Kontrollproben (ohne Essigsäurezusatz) (Bruche und Mitarbeiter, 1991). Dennoch beobachteten Mayerl und Mitarbeiter (1989) und Wintoch und Mitarbeiter (1991) das natürliche Vorkommen von diastereomeren HDMF- β -D-gluco-pyranosid im Verhältnis von ca. 3:1, was auf eine Enantiomerenanreicherung im Aglykon hindeutet. Nach enzymatischer Hydrolyse der glycosidischen Bindung konnte jedoch

wiederum nur racemisches HDMF mittels multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS) detektiert werden (Wintoch und Mitarbeiter, 1991).

Aufgrund der Keto-Enol-Stuktur des Moleküls ist die Verbindung in vier tautomeren Grenzstrukturen darstellbar (Abb. B-4), wobei jedoch weder die Diketo- noch die Dienol-Form bislang isoliert bzw. nachgewiesen wurden.

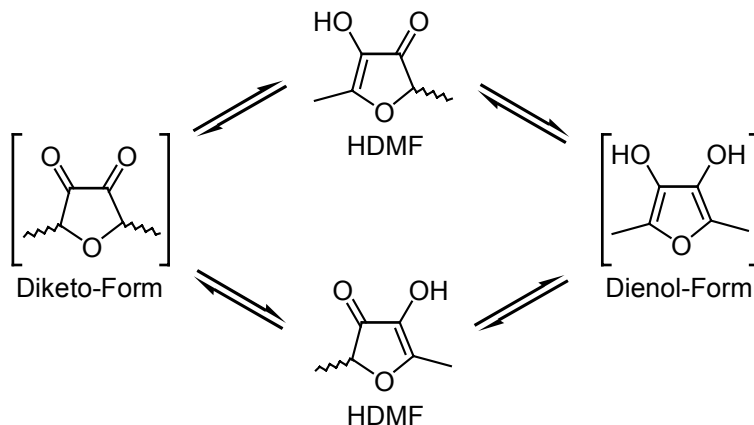


Abb. B-4: Tautomere Grenzstrukturen von HDMF.

HMF kann formal in zwei tautomeren Grenzstrukturen dargestellt werden, dem 4-Hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon und dem 4-Hydroxy-2-methyl-3(2*H*)-furanon (Abb. B-5 A). Bereits bei der Entdeckung von HMF und der ersten Strukturaufklärung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie beschrieben die Autoren ein Fehlen von Signalen für olefinische Protonen (Severin und Seilmeier, 1967). Des Weiteren beobachteten Hodge und Mitarbeiter (1972) bei der Durchführung einer HMF-Synthese eine spontane Umlagerung des 4-Hydroxy-2-methyl-Tautomers in das 4-Hydroxy-5-methyl-Tautomer, was ein überwiegendes Vorliegen des Moleküls als 4-Hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon bewies.

HEMF existiert generell als Gemisch zweier tautomerer Formen im Verhältnis von 3:1 bis 2:1 (Abb. B-5 B), wobei das 4-Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2*H*)-furanon bevorzugt vorliegt. Die beiden Tautomere stehen miteinander in einem sehr langsamen Gleichgewicht (Re und Mitarbeiter, 1973; Huber, 1992).

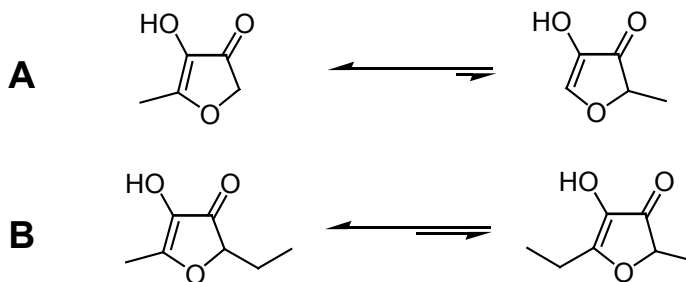


Abb. B-5: Tautomere Grenzstrukturen von HMF (A) und HEMF (B).

1.2.2 Sensorische Eigenschaften

4-Hydroxy-3(2H)-furanone gehören aufgrund ihrer strukturellen bifunktionellen Einheit und hohen Strukturabhängigkeit ihrer organoleptischen Eigenschaften der Gruppe der typischen Röstaromen (browned flavours) an. Als weitere Vertreter dieser Gruppe seien Maltol, Cycloten[®] und Sotolon genannt. Molekulare Voraussetzung für die Entwicklung karamell-ähnlicher Geruchsnoten ist die planare bzw. nahezu planare alicyclische bzw. heterocyclische Enol-Carbonyl-Struktur cyclischer Dicarboxylderivate, die in der Lage ist, starke Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden. Allgemein besitzen diese Aromastoffe aneinander angrenzend eine Carbonyl-, eine enolische Hydroxyl- und eine C-Alkyl-Gruppe. Jedes der drei genannten Strukturelemente und ihre Nachbarstellung zueinander ist von entscheidender Bedeutung, da sowohl die Substitution als auch der Verlust der Enol-Gruppe zu einem Verlust des typischen Karamellaromas führen (Hodge und Mitarbeiter, 1972; Ohloff, 1990). Für die olfaktorische Chemorezeption von Karamellaromen schlägt Ohloff (1990) ein Aromastoff-Rezeptor-Modell vor in Anlehnung an das Modell der Chemorezeption von Süßstoffen nach Shallenberger und Acree (1967). Demnach tritt eine spezifische Wechselwirkung ein, sobald die planare Enol-Carbonyl-Einheit des 4-Hydroxy-3(2H)-furanons auf eine komplementäre Proton-Donor- (AH) und Proton-Akzeptor-Gruppe (B) der aktiven Rezeptorstelle trifft, die beide zur Ausbildung starker Wasserstoffbrückenbindungen fähig sind (Abb. B-6). Form und Größe des übrigen Molekülteils bestimmen die Qualität, die lipophilen Eigenschaften die Intensität des Aromastoffs (Ohloff, 1990).

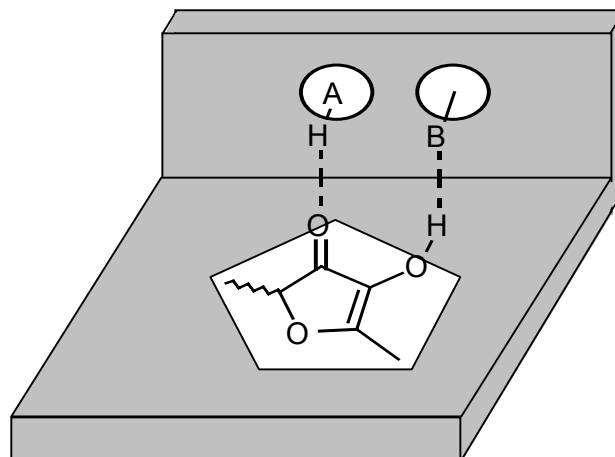


Abb. B-6: Dreipunkt-Bindungsmodell einer spezifischen Rezeptor-Interaktion von HDMF (Ohloff, 1990).

Das Aroma von HDMF wird in der Literatur als karamellartig, süß, fruchtig, nach „verbrannter Ananas“ oder nach „verbranntem Zucker“ riechend beschrieben (Rodin und Mitarbeitern, 1965; Blank und Fay, 1996; Schwab und Roscher, 1997). HDMF besitzt in hohen Konzentrationen eine karamellartige Geruchsqualität, die sich mit zunehmender Verdünnung in einen angenehm fruchtigen, an Erdbeeren und Ananas erinnernden Sinneseindruck wandelt. Die beiden Enantiomere, die sich sehr gut an derivatisierten β -Cyclodextrinphasen mittels Gaschromatographie trennen lassen, unterscheiden sich von ihren sensorischen Eigenschaften her nur geringfügig. Das (-)-Enantiomer besitzt eine süße, intensiv karamellartige Note, während das (+)-Enantiomer einen insgesamt etwas schwächeren, weniger süßen, dafür aber röstigen Geruchseindruck hinterlässt (Fischer und Hammerschmidt, 1992; Bruce und Mitarbeiter, 1995). HMF vermittelt einen stark an Karamell oder geröstete Zichorienwurzeln erinnernden Geruchseindruck mit einem unverwechselbaren Unterton, der an Ahornsirup denken lässt (Tonsbeek und Mitarbeiter, 1968; Schwab und Roscher, 1997). HEMF hingegen besitzt ein sehr süßes, fruchtiges, karamellartiges, an Buttergebäck erinnerndes Aroma (Huber, 1992). Bemerkenswerterweise ist nur ein Enantiomer des in geringeren Mengen vorkommenden 4-Hydroxy-5-ethyl-2-methyl-Tautomers (Abb. B-5) für den typischen Geruch von HEMF verantwortlich (Bruce und Mitarbeiter, 1995).

Als Maß für die Geruchsstärke einer Verbindung gelten seine Geruchsschwellenwerte. Definitionsgemäß unterscheidet man zwischen dem Entdeckungsschwellenwert (kleinste zur Wahrnehmung einer Verbindung erforderliche Konzentration, wobei die Aromqualität noch nicht eindeutig festgestellt werden kann) und dem Erkennungsschwellenwert (kleinste zur Erkennung einer Verbindung erforderliche Konzentration) (Belitz und Mitarbeiter, 2001). Beide Werte sind stark vom Lösungsmittel und pH-Wert abhängig und unterliegen darüber hinaus starken Schwankungen aufgrund von unterschiedlichen Geräten, Methoden und Testpersonen (Ohloff, 1990). Daher ist es wenig verwunderlich, dass für 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone Geruchsschwellenwerte veröffentlicht wurden, die über mehrere Größenordnungen streuen. Beispielsweise sind für in Wasser gelöstes HDMF Geruchsschwellenwerte von 0.03 – 0.04 ppb bis 1700 ppb publiziert worden (Schwab und Roscher, 1997). Durchschnittlich kann ein Wert von 10 – 100 ppb als realistisch betrachtet werden. Für HEMF sind die Geruchsschwellenwerte im Mittel um das Fünf- bis Sechsfache niedriger als die Werte für HDMF, während die Werte für HMF um ein bis zwei Zehnerpotenzen über denen für HDMF liegen (Schwab und Roscher, 1997; Roscher, 1998).

Eine Möglichkeit, den Beitrag, den eine Verbindung zum Aroma eines Lebensmittels leistet, zu spezifizieren, ist die Anwendung des sog. Aromawert-Konzeptes. Der Aromawert ist definiert als der Quotient aus der Konzentration des einzelnen Aromastoffes im Lebensmittel und seinem Geruchsschwellenwert (Grosch, 1990). Der Aromawert ist somit ein Maß für die Geruchswirksamkeit und ermöglicht den direkten Vergleich mehrerer flüchtiger Komponenten in einem Lebensmittel (Rothe und Thomas, 1963). Die Ermittlung der nötigen Daten zur Berechnung von Aromawerten ist jedoch

sehr fehleranfällig. Sämtliche Verbindungen in der flüchtigen Fraktion müssen identifiziert und quantifiziert und ihre jeweiligen Geruchs- und Geschmacksschwellenwerte bestimmt werden. Eine einfachere Möglichkeit zur Ermittlung der Bedeutung eines bestimmten Aromastoffes in einem Lebensmittel ist daher die sog. Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA). Dabei wird die flüchtige Fraktion eines Lebensmittels schrittweise mit dem Lösungsmittel verdünnt und jede Verdünnung mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie analysiert. Es wird der Verdünnungsfaktor (Flavour-Dilution-Faktor, FD-Faktor) ermittelt, bei dem eine Verbindung gerade noch erkennbar ist. Mit zunehmendem FD-Faktor steigt somit die Aromawirksamkeit einer Verbindung. Mithilfe derartiger Verfahren wurde HDMF als eine der Schlüsselaromakomponenten in Erdbeeren (Hirvi und Honkanen, 1982; Larson und Mitarbeiter, 1992) und einem Erdbeer-Modell-Saft (Schieberle und Hofmann, 1997) identifiziert. Des Weiteren stellte sich heraus, dass HDMF auch im Saft von geschmortem Rindfleisch als „character impact“-Verbindung anzusehen ist (Guth und Grosch, 1994) und zusammen mit HEMF für die süße Note im Aromaprofil von Emmentaler Käse verantwortlich ist (Preininger und Grosch, 1994; Preininger und Mitarbeiter, 1994a; Preininger und Mitarbeiter, 1994b; Preininger und Mitarbeiter, 1996).

1.2.3 Wichtige physikalisch-chemische Eigenschaften und Stabilität

4-Hydroxy-3(2H)-furanone sind in Wasser sehr gut löslich und reagieren aufgrund ihrer phenol-ähnlichen Struktur schwach sauer. Eine 2%ige Lösung von HDMF in Wasser weist einen pH-Wert von 2.8 auf (Buttery und Mitarbeiter, 1995) und die Titration mit 0.5 n NaOH ergab für HDMF einen pK_a -Wert von ca. 8.2. Somit ist HDMF als schwächere Säure als Essigsäure ($pK_a = 4 - 5$), aber stärkere Säure als Phenol ($pK_a = 9.9$) einzustufen (Buttery und Ling, 1996).

HDMF ist eine in Reinform kristalline Verbindung. Bei Raumtemperatur in Gegenwart von Luftsauerstoff ist sie jedoch äußerst instabil, was sehr schnell (ein bis zwei Tage) zur Verflüssigung der Kristalle und zu einem veränderten sensorischen Eindruck führt (Hodge und Mitarbeiter, 1963; Willhalm und Mitarbeiter, 1965; Hofmann und Eugster, 1966; Henry und Silverstein, 1966). Eine wesentliche Verlängerung der Lagerfähigkeit (mehrere Monate) konnte durch Lagern bei Temperaturen unter 0 °C in einer Stickstoffatmosphäre erreicht werden (Henry und Silverstein, 1966).

Die Stabilität von HDMF und seines Methyletherderivates DMMF in Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte (pH 2 - 8; 20 °C) und bei unterschiedlichen Temperaturen wurde von Hirvi und Mitarbeitern (1980) untersucht. Ein Stabilitätsoptimum beider Verbindungen wurde bei pH 4 beobachtet. Für HDMF und seinen Methylether wurden Halbwertszeiten von 100 bzw. 320 Tagen ermittelt, die sich bei Erhöhung der Temperatur auf 50 °C auf 13 bzw. 40 Tage reduzierten. (Hirvi und Mitarbeiter, 1980). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für HEMF beschrieben (Huber, 1992). So zeigte HEMF ebenfalls ein Stabilitätsoptimum bei pH 4 mit einer Halbwertszeit von 100 Tagen bei

20 °C. Unter Röstbedingungen hingegen stellte sich für HDMF eine erhöhte Stabilität im neutralen Milieu heraus (Shu und Mitarbeiter, 1985).

Chen und Mitarbeiter (1996) untersuchten den photooxidativen Abbau von HDMF in chlorophyllhaltigem Ethanol. Demnach greift der unter Lichteinwirkung in Gegenwart von Chlorophyll gebildete Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) an der Doppelbindung von HDMF (C-5) an, wodurch ein Hydroperoxid generiert wird. Nach Ringöffnung entstehen verschiedene Primärprodukte wie Milchsäure, Lactaldehyd, Pyruvat, Essigsäure, Acetaldehyd und Acetoinaldehyd, die in Folgereaktionen zu azyklischen Estern abreagieren. Für den oxidativen Abbau von HEMF wird ein analoger Reaktionsmechanismus angenommen (Huber, 1992).

HMF verfügt zusätzlich über eine sehr reaktive Methylengruppe, die in erster Linie mit Carbonylverbindungen zu farbigen Produkten kondensiert (Ledl und Severin, 1978). Das von Comte und Mitarbeitern (1996) identifizierte 5-Methyl-4-hydroxy-3(2-isopropylidenyl)-furanon könnte somit durch Reaktion von HMF mit Aceton, gefolgt von einer Wassereliminierung, erklärt werden (Schwab und Roscher, 1997).

Ein von der Oxidation durch Luftsauerstoff abweichendes Produktspektrum erhält man beim Abbau von HDMF unter Röstbedingungen (160 - 180 °C) (Shu und Mitarbeiter, 1985; Kunert-Kirchhoff und Baltés, 1990). Nach anfänglicher hydrolytischer Ringöffnung entstehen durch Retroaldolspaltungen Primärprodukte, die wiederum durch intermolekulare Reaktion Sekundärprodukte bilden. Dabei entstehen vor allem Aceton, 2,3-Pentandion, 1-Hydroxy-2-butanon und weitere kurzkettige Ketone und Aldehyde sowie einige Furanderivate.

Aufgrund seiner Anfälligkeit gegenüber Hitze und Oxidation galt die gaschromatographische Analyse von HDMF als besonders problematisch. Allgemein wurden die chromatographischen Verluste mit einem thermischen Abbau des Moleküls begründet (Flath und Forrey, 1981). Erst ein Vergleich des Verhaltens von HDMF bei der gaschromatographischen Analyse unter Verwendung verschiedener GC-Kapillarsäulen offenbarte eine Anfälligkeit des Moleküls gegenüber aktiven Oberflächen der Trennsäule. „Fused silica Kapillarsäulen“ erwiesen sich hierbei als Säulen der Wahl mit den niedrigsten Nachweisgrenzen für HDMF (Williams und Mottram, 1981).

1.3 Bildung der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone in der Maillard-Reaktion

1.3.1 Maillard-Reaktion

Die Maillard-Reaktion oder nicht-enzymatische Bräunung wurde erstmals im Jahre 1912 von L.C. Maillard beschrieben und bezeichnet die komplexen Reaktionsfolgen, die bei der Umsetzung von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren oder Proteinen ablaufen. Diese Reaktionen sind von großer Bedeutung für die Entwicklung von Farb-, Geschmacks- und Aromastoffen während der Zubereitung von Lebensmitteln (Ledl und Schleicher, 1990). Neben diesen positiven Aspekten ist jedoch auch auf die negativen Konsequenzen der Maillard-Reaktion, wie z. B. den Verlust von essentiellen Aminosäuren und die Bildung mutagener und karzinogener Substanzen hinzuweisen (Diem, 2001). Zur Aufklärung ablaufender Reaktionsmechanismen hat sich aufgrund der Fülle an Reaktionspartnern in natürlichen Systemen und der damit verbundenen Probleme bei der Trennung, Isolierung und Reinigung einzelner Maillard-Produkte allgemein die Untersuchung von Modellreaktionsgemischen durchgesetzt (Ledl und Schleicher, 1990). Allgemein gilt, dass Ausmaß und Produktverteilung des Maillardprozesses entscheidend von Parametern wie Temperatur, pH-Wert und Reaktionszeit sowie von der Reaktivität der beteiligten Reaktionspartner abhängen (Rizzi, 1994).

1.3.2 Bildung von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen aus Zuckern

4-Hydroxy-3(2H)-furanone entstehen beim thermischen Abbau von Zuckern und sind als Maillardprodukte Bestandteil vieler verarbeiteter Lebensmittel (Abschnitt B 1.1). Anhand von Modellreaktionen, unter anderem auch unter Verwendung von isotoopenmarkierten Ausgangsverbindungen, ist ihre Bildung während des Koch- bzw. Röstprozesses bereits sehr ausführlich untersucht worden. HDMF, HEMF und HMF entstehen allgemein aus 1-Desoxydiketosen (1-Desoxyosonen) durch Zyklisierung und anschließende Dehydratisierung. Initiiert wird die Bildung der 1-Desoxydiketosen durch Kondensation einer Aldose und einer Aminokomponente, was zur Bildung einer 1-Amino-1-desoxy-2-ketose, einem sog. Amadori-Produkt, führt (Abb. B-7). Amadori-Produkte wie z. B. 1-Desoxy-1-dibenzylamino-D-fructuronsäure, 1-Desoxy-1-L-prolino-D-fructose, 1-Desoxy-1-piperidino-D-fructose sind bereits mehrfach als Prekursoren von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen nachgewiesen worden (Mills und Mitarbeiter, 1969; Hicks und Mitarbeiter, 1974; Hicks und Feather, 1975; Mills und Hodge, 1976). Infolge einer 2,3-Enolisierung der Amadori-Verbindung und Eliminierung des Amins am C-1 des Zuckers kommt es zur Freisetzung der sehr reaktiven 1-Desoxydiketose (Abb. B-7) (Hodge und Mitarbeiter, 1972; Mills und Hodge, 1976). 1-Desoxydiketosen, abgeleitet von Pentosen und der 6-Desoxyhexose L-Rhamnose können infolge von Zyklisierung und Dehydratisierung direkt die

entsprechenden Furanonderivate HMF und HDMF freisetzen. Im Falle der HDMF-Bildung aus Glucose sind formal zusätzlich eine Wassereliminierung und ein reduktiver Reaktionsschritt erforderlich. Als wichtiges Intermediat wurde 3,4,5-Trihydroxy-3,5-hexadien-2-on (Acetylformoin) vielfach postuliert (Mills und Mitarbeiter, 1969; Hodge und Mitarbeiter, 1972; Hofmann und Schieberle, 1997). Der effektive Umsatz von Acetylformoin in HDMF unter Hitzeeinwirkung konnte von Schieberle (1992) eindeutig nachgewiesen werden (Abb. B-8).

Im Falle von HEMF ist der ablaufende Reaktionsmechanismus noch weitgehend unbekannt. Huber (1992) postulierte in Analogie zur Bildung von HMF und HDMF eine 6,7-Didesoxyheptose als Vorläuferverbindung, die aus dem Amadori-Produkt von Pentosen durch Addition einer unbekanntes C2-Komponente gebildet wird (Abb. B-7).

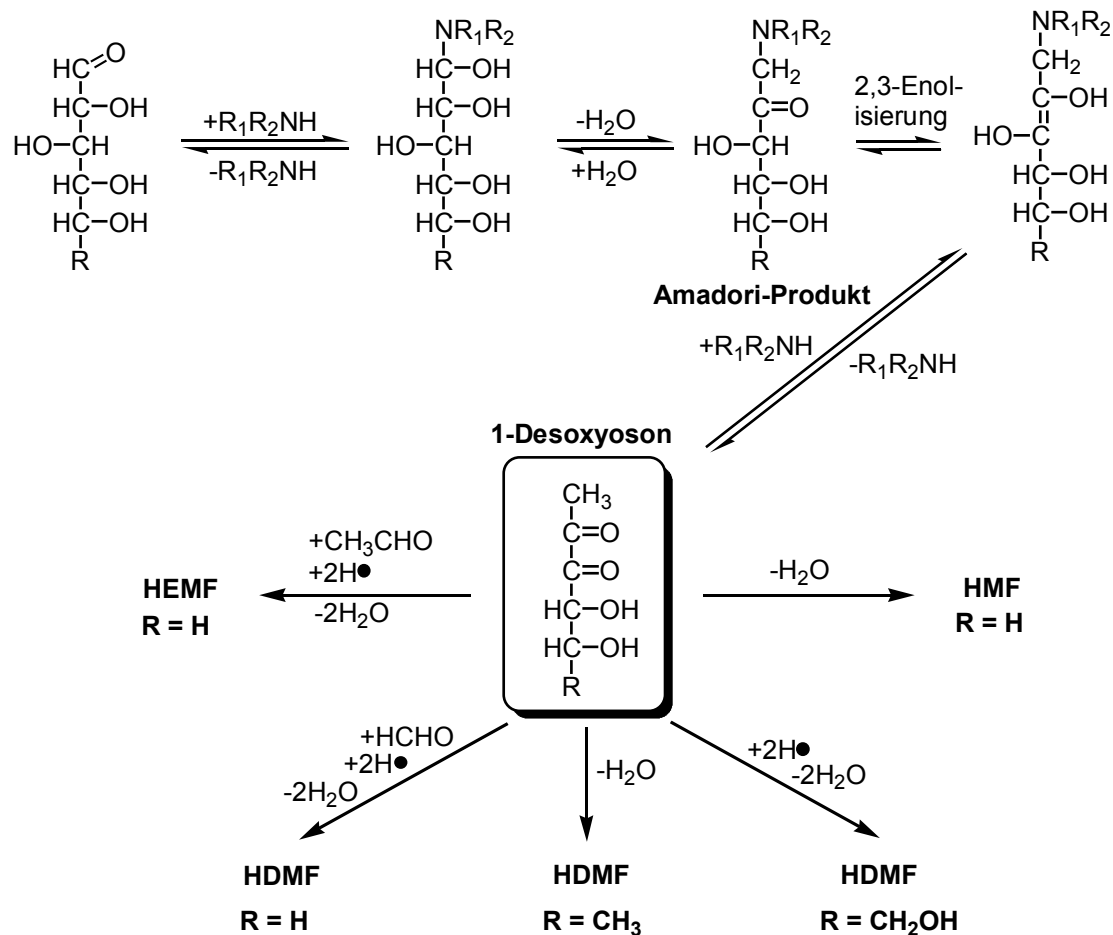


Abb. B-7: Vorgeschlagene Bildungsmechanismen von HDMF, HMF und HEMF aus Pentosen, Hexosen und 6-Desoxyhexosen im Rahmen der Maillard-Reaktion (Schwab und Roscher, 1997).

Des Weiteren wurden HDMF und HEMF auch in Modellumsetzungen von Pentosen mit den Aminosäuren Glycin bzw. Alanin nachgewiesen. Versuche mit den entsprechenden ¹³C-markierten Aminosäuren zeigten eindeutig die Addition der aus den Aminosäuren abgeleiteten Streckeraldehyde (Glycin → Formaldehyd; Alanin → Acetaldehyd) an ein Pentosederivat, was zur nötigen Verlängerung der Kohlenstoffkette führt (Blank und Fay, 1996) (Abb. B-7).

1.3.3 Bildung von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen aus Zuckerphosphaten

Zuckerphosphate, in erster Linie D-Fructose-1,6-diphosphat, stellten sich ebenfalls als potente Vorläufer von HDMF in Maillard-Modellumsetzungen heraus. Für die hohen Umsatzraten (ca. 15 mal höher als D-Fructose) werden die Phosphatgruppen verantwortlich gemacht, die eine bessere Abgangsgruppe darstellen als entsprechende Hydroxylfunktionen (Schieberle, 1992). Generell wird angenommen, dass infolge einer initiierten 2,3-Enolisierung die Phosphatgruppe am C-1 des Zuckers eliminiert wird, was zur Bildung von 1-Desoxyson-6-phosphat führt (Abb. B-8) (Schieberle, 1992; Belitz und Mitarbeiter, 2001). Weitere Enolisierungsschritte ermöglichen die Eliminierung der Phosphatgruppe an C-6, was letztendlich zur Bildung von Acetylformoin führt. Die Transformation von Acetylformoin in HDMF benötigt einen reduktiven Reaktionsschritt, für den eine Disproportionierung oder eine Reduktion durch weitere Enol-Oxo-Verbindungen wie z. B. Ascorbinsäure in Betracht kommen. HDMF wird infolge einer weiteren Enolisierung und Eliminierung eines Wassermoleküls freigesetzt (Abb. B-8).

Mottram und Nobrega (2002) untersuchten vor kurzem die Bildung schwefelhaltiger Aromastoffe in Maillard-Modellumsetzungen von Cystein mit verschiedenen Ribosederivaten. Dabei detektierten sie deutlich erhöhte HMF-Konzentrationen in Modellumsetzungen mit D-Ribose-5-phosphat (ca. 280 µg HMF pro 1 mmol Zucker). In analogen Ansätzen mit D-Ribose waren nur Spuren an HMF nachweisbar. Die deutlich variierenden HMF-Ausbeuten führten die Autoren auf unterschiedliche Abbaumechanismen von D-Ribose bzw. D-Ribose-5-phosphat zurück. Demnach stellt die Bildung von HMF aus D-Ribose-5-phosphat infolge einer einfachen Dephosphorylierung und Dehydratisierung (Abb. B-9) einen einfacheren Bildungsweg für 1-Desoxypentosen und HMF dar als die entsprechende Bildung über die im Rahmen der Maillard-Reaktion intermediär gebildete Amadori-Verbindung (Abb. B-7) (Mottram und Nobrega, 2002).

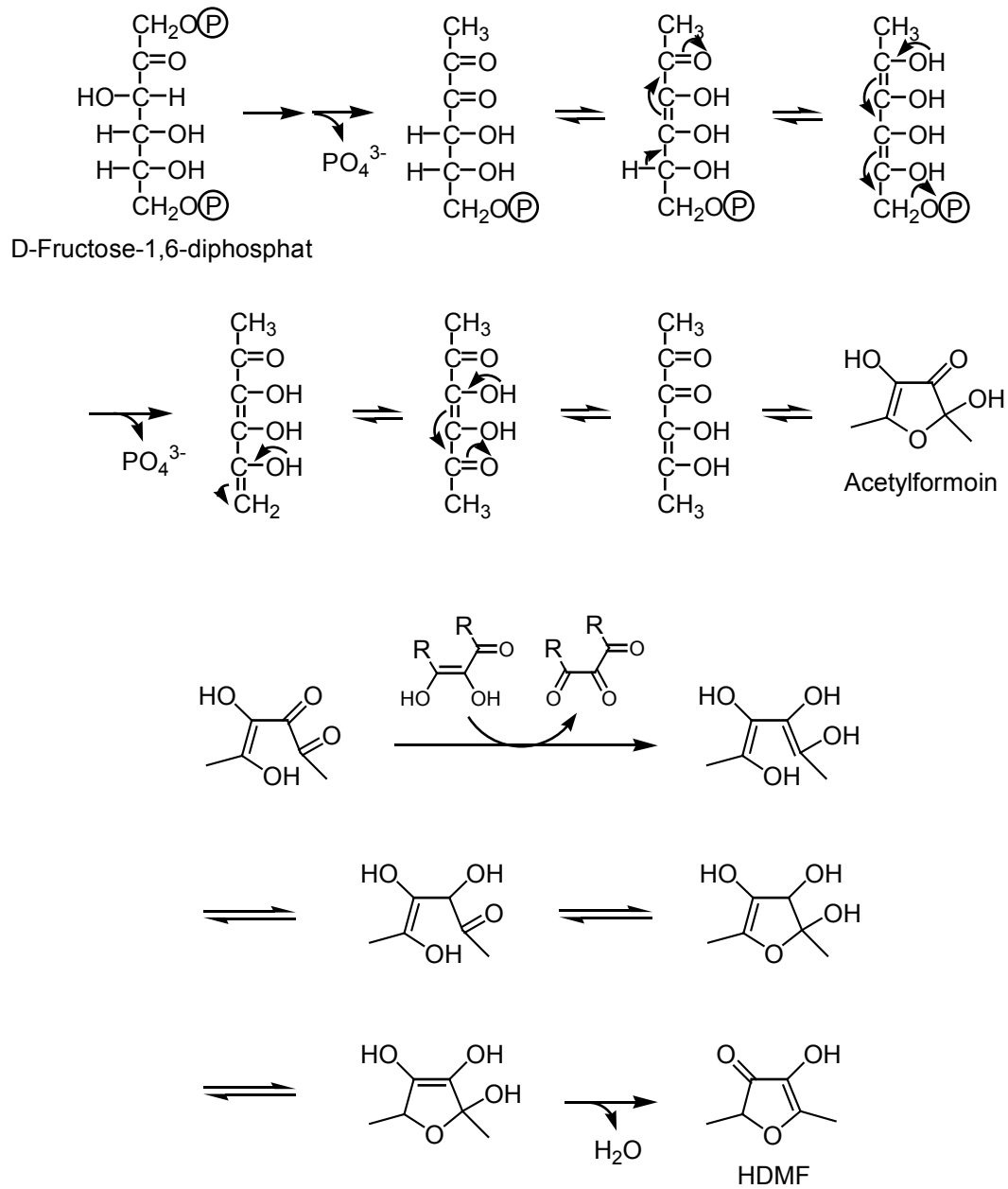


Abb. B-8: Hypothetischer Bildungsmechanismus von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat im Rahmen der Maillard-Reaktion (Schieberle, 1992).

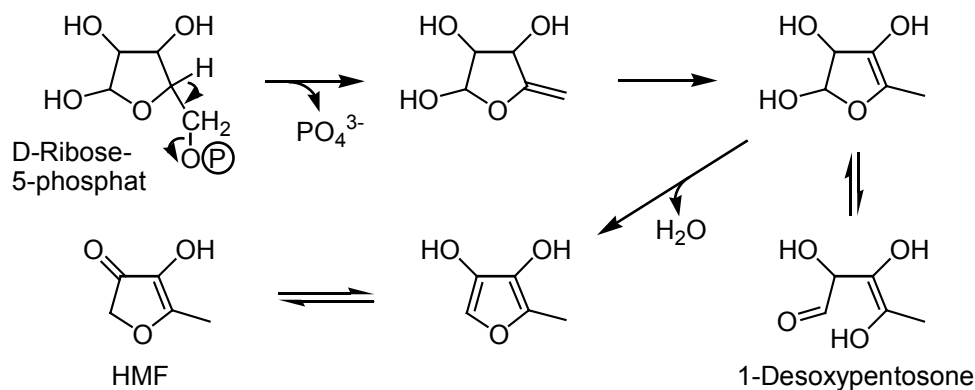


Abb. B-9: Hypothetischer Bildungsmechanismus von HMF aus D-Ribose-5-phosphat bei Erhitzung (Mottram und Nobrega, 2002).

1.4 Biosynthese

Aufgrund seines Vorkommens, seiner Bedeutung und seines breiten Einsatzes in der Lebensmittelindustrie ist die Biosynthese von HDMF in Pflanzen und Mikroorganismen von sehr großem Interesse. Weitreichende Kenntnisse über chemische Vorläufermoleküle aus dem Primär- und Sekundärstoffwechsel sowie über beteiligte Enzymsysteme sind Grundvoraussetzung für eine biotechnologische Gewinnung dieses bedeutenden Aromastoffes.

1.4.1 Bildung und Metabolismus von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen in Pflanzen

Obwohl HDMF bereits seit über 30 Jahren als wichtige Aromakomponente in Erdbeeren und Ananas bekannt ist, ist seine Biosynthese in diesen natürlichen Systemen noch weitgehend ungeklärt. Erste Erkenntnisse zur Biosynthese lieferten die Arbeiten von Pisarnitskii und Mitarbeitern (1992), die eine Korrelation zwischen dem Gehalt an HDMF und dem Gehalt an Methylpentosen in Erdbeeren feststellten. Die Autoren leiteten daraus eine natürliche HDMF-Bildung aus Methylpentosen – wie z.B. Rhamnose und Fucose – analog der Bildung in der Maillard-Reaktion ab (Abschnitt B 1.3.2).

Auch die Arbeiten der Gruppe um Zabetakis wiesen auf die Bedeutung von Methylpentosen als Prekursoren von HDMF und seiner Derivate in Erdbeeren hin (Zabetakis und Holden, 1995; Zabetakis und Holden, 1996; Zabetakis und Mitarbeiter, 1996). Die Verfütterung von 6-Desoxy-D-fructose an Erdbeerkallus-Kulturen führte zu einer deutlichen Produktion des HDMF-Glucosides (1.03 µg/g), was die Autoren auf die Verwendung von 6-Desoxy-D-fructose anstelle von D-Fructose im Saccharose-Bildungsweg zurückführten. Das entstehende Desoxyanalogon der Saccharose würde

demnach in einem weiteren, nicht näher charakterisierten Reaktionsschritt zum HDMF-Glucosid metabolisiert. HDMF würde somit erst durch Abspaltung des Glucoserestes freigesetzt werden. Im Widerspruch zu einer HDMF-Biosynthese über das entsprechende Glucosid stehen die Arbeiten von Sanz und Mitarbeitern (1995) und Pérez und Mitarbeitern (1996). Sie konnten zeigen, dass die Konzentrationen von HDMF, DMMF und HDMF-Glucosid sehr stark mit fortschreitendem Reifegrad zunehmen. Eine nachfolgende Lagerung bei 17 °C führte zu einer deutlichen Abnahme der HDMF-Konzentration und einer Zunahme der beiden HDMF-Derivate. Eine zuerst auftretende erhöhte Konzentration des HDMF-Glucosids in den Früchten, wie man sie im Falle einer Bildung von freiem HDMF über das entsprechende Glucosid erwarten würde, wurde nicht beobachtet.

Des Weiteren postulierte die Arbeitsgruppe um Zabetakis einen direkten Bildungsweg von HDMF aus 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat, das durch Kondensation von Dihydroxyacetonphosphat und D-Lactaldehyd entsteht (Abb. B-10) (Zabetakis und Holden, 1995; Zabetakis und Mitarbeiter, 1999b). 1,2-Propandiol gilt als direkter Vorläufer von D-Lactaldehyd und wurde als genuiner Bestandteil in Erdbeeren nachgewiesen (0.49 µg/g). Die exogene Applikation von 1,2-Propandiol an Erdbeerkalluskulturen führte zur signifikanten Bildung des HDMF-Glucosids (0.94 µg/g) (Zabetakis und Gramshaw, 1998). Überraschenderweise führte der Zusatz von D-Lactaldehyd an Erdbeerkallus-Kulturen jedoch primär zur Bildung von freiem HDMF (26.6 µg/g) (Zabetakis und Mitarbeiter, 1999b), woraus die Autoren zwei unterschiedliche, parallel ablaufende Biosyntheserouten für HDMF und HDMF-Glucosid ableiteten (Zabetakis und Mitarbeiter, 1999a). In Erdbeerkalluskulturen, die mit *Methylobacterium extorgens* infiziert waren, konnte ohne Zusatz einer weiteren Kohlenstoffquelle die Bildung von HDMF (6 µg/g Frischgewicht) und DMMF (11 - 12 µg/g Frischgewicht) beobachtet werden (Zabetakis, 1997). Daraus wurde gefolgert, dass aus der Pflanze stammendes 1,2-Propandiol von dem Mikroorganismus zu D-Lactaldehyd oxidiert werden kann. Dieser kann wiederum in einer Aldolreaktion mit aus der Pflanze stammendem Dihydroxyacetonphosphat zu 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat reagieren und somit als Vorläufer von HDMF fungieren (Abb. B-10) (Zabetakis und Holden, 1996; Zabetakis und Mitarbeiter, 1999b).

Aldolase-katalysierte Spaltung von aus $^{13}\text{C}_6$ -D-Fructose gebildetem D-Fructose-1,6-diphosphat und anschließenden Einbau einer C3-Einheit in die Furanonstruktur gebildet werden. In weiteren Versuchen wurden erst kürzlich von Wein und Mitarbeitern (2001) 6,6,6,5- $^2\text{H}_4$ -6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat, 6- ^2H -6-Desoxy-D-glucose und 1- ^{13}C -1-Desoxy-D-fructose synthetisiert und an Erdbeeren appliziert. Keines dieser häufig postulierten HDMF-Vorläufermoleküle hatte jedoch eine Steigerung des natürlichen Markierungsgrades von HDMF oder DMMF zur Folge (Wein und Mitarbeiter, 2001). Desoxyzucker können daher als potentielle HDMF-Vorläufer in Erdbeeren ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurden an verschiedenen Positionen Deuterium- und ^{13}C -markierte D-Glucosen und D-Fructosen in Erdbeeren injiziert und der Verbleib der stabilen Isotope im Zielmolekül massenspektrometrisch bestimmt. Die Isotopenmarkierung von 4- ^2H -D-Glucose wurde nicht in die Furanonstruktur eingebaut, was man jedoch im Falle einer Biosynthese über intermediär gebildete Desoxyzucker erwarten würde. Im Gegensatz wurde 2- ^2H -D-Glucose zu 1-(oder 6)- ^2H -HDMF metabolisiert, was auf einen Phosphohexose-Isomerase-katalysierten Wasserstofftransfer von C-2 nach C-1 bei der Umwandlung von D-Glucose-6-phosphat in D-Fructose-6-phosphat zurückzuführen ist (Wein und Mitarbeiter, 2001). Demnach ist das Enzym Phosphohexose-Isomerase an der Transformation von D-Glucose in HDMF beteiligt, was auch die Daten von Pérez und Mitarbeitern (1999) bestätigte, die nach Applikation von D-Fructose-6-phosphat an Erdbeeren eine deutlich gesteigerte Furanonkonzentration (125 %) detektieren konnten.

Durch Applikation von ^{14}C -markiertem HDMF an reife Erdbeeren gelang Roscher und Mitarbeitern (1997) der eindeutige Nachweis zur Bildung von HDMF-Glucosid und DMMF aus HDMF (Abb. B-11). Nach Applikation von ^{14}C -markiertem *S*-Adenosylmethionin wurde ebenfalls ^{14}C -markiertes DMMF erhalten, weshalb die Autoren die Präsenz einer *O*-Methyltransferase in der reifen Erbeerfrucht postulierten. In weiterführenden Arbeiten gelang Wein (2001) die heterologe Expression einer Erdbeer-*O*-Methyltransferase in *Escherichia Coli*. Untersuchungen bezüglich der Substratspezifität zeigten, dass neben Brenzcatechin, Kaffeesäure, Kaffeeoyl-CoA und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd auch das Furanonderivat HDMF von der rekombinanten *O*-Methyltransferase (OMT) als Substrat akzeptiert wurde. Nach den Autoren ist dies auf die strukturelle Ähnlichkeit des Dienol-Tautomers von HDMF zu phenolischen Verbindungen zurückzuführen (Wein und Mitarbeiter, 2002). Noch im gleichen Jahr veröffentlichten Lavid und Mitarbeiter (2002) die Charakterisierung einer aus Erdbeeren teilweise aufgereinigten *O*-Methyltransferase. Die Eigenschaften bezüglich der Substratspezifität, des Aktivitätsoptimums und des Molekulargewichts entsprachen den beschriebenen Eigenschaften des rekombinanten Enzyms von Wein und Mitarbeitern (2002).

Zur Biosynthese von HMF und HEMF in Pflanzen wurden bislang keine Studien durchgeführt.

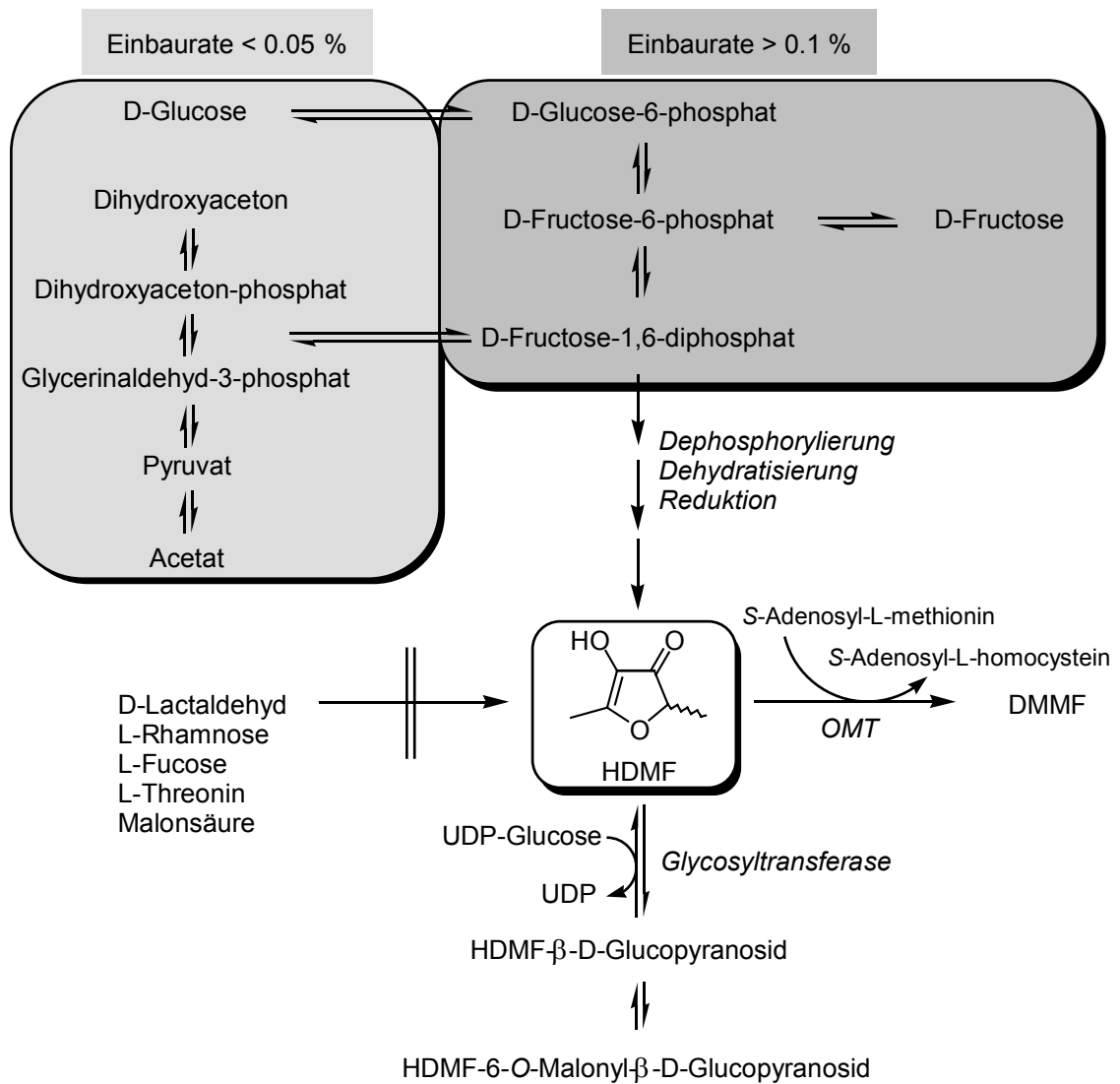


Abb. B-11: Postulierter Biosynthese- und Metabolismusweg für HDMF und seine natürlichen Derivate (Roscher, 1998).

1.4.2 Bildung von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen durch Mikroorganismen

1.4.2.1 Hefen

Den Anstoß zur Erforschung der Bildung von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen durch Hefen gaben die Arbeiten von Nunomura und Mitarbeitern in den 70er Jahren. Diese Gruppe beschäftigte sich mit dem Aroma von Sojasoße („Shoyu“) und konnte erstmals HEMF als „character-impact“-Verbindung dieses Lebensmittels identifizieren (Nunomura und Mitarbeiter, 1976). In weiteren Arbeiten dieser Gruppe wurden zusätzlich HMF (Nunomura und Mitarbeiter, 1979) und HDMF (Nunomura und Mitarbeiter, 1980) im Aroma von Sojasoße nachgewiesen, wobei die Herkunft der Hydroxyfuranone jedoch unklar blieb.

Die Herstellung von Sojasoße läuft traditionell nach dem folgenden Schema ab: Die Sojabohnen werden gekocht, mit geröstetem Weizen vermischt und anschließend einer mehrtägigen Fermentation mit Aspergillus-Arten (*A. oryzae*, *A. sojae*) unterzogen. Hierbei erhält man ein Proteinhydrolysat, das sogenannte „Soja-Koji“, oder einfach „Koji“, welches mit Kochsalzlösung eingemaischt und im Anschluß über mehrere Monate mit Milchsäurebakterien und der Hefe *Z. rouxii* vergoren wird (Belitz und Mitarbeiter, 2001). Durch die Arbeiten von Sugawara (1991) und Hayashida und Mitarbeitern (1998a), die sich mit dem Aroma von Miso (einem ähnlich der Sojasoße aus Reis hergestellten Produkt) beschäftigten, konnte gezeigt werden, dass HEMF und teilweise auch HDMF während des Fermentationsprozesses mit *Z. rouxii* gebildet werden. Die HMF-Konzentrationen wiederum wurden durch die Fermentation nicht oder negativ beeinflusst. Die Autoren folgerten, dass es sich bei 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen mit Ausnahme von HMF um Metabolite des Sekundärstoffwechsels der Hefe handelt und somit nicht um Produkte einer Maillard-Reaktion.

In den letzten Jahren wurden bereits mehrere Versuche unternommen, die Vorläufer von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen in Sojasoße zu identifizieren. In Metabolismusversuchen wurden verschiedene Zucker und Zuckerderivate, insbesondere Desoxyzucker und Zuckerphosphate, einem auf „Soja-Koji“ basierenden Fermentationsmedium zugesetzt. D-Ribulose-5-phosphat, D-Sedoheptulose-7-phosphat und eine Mischung aus D-Xylulose-5-phosphat und D-Ribose-5-phosphat konnten dadurch als potentielle Vorläufer von HEMF und HMF identifiziert werden (Sasaki und Mitarbeiter, 1991). Nach einer Zugabe von 20 g/L des jeweiligen Zuckerphosphates und 12-tägiger Fermentationszeit bei 30 °C wurden 4 - 10-mal höhere HEMF-Konzentrationen (15.26 ppm für D-Sedoheptulose-7-phosphat; 44.34 ppm für die Mischung aus D-Xylulose-5-phosphat und D-Ribose-5-phosphat) als in den Kontrollansätzen (4.23 ppm) detektiert. Im Falle von HMF ist die Bildung auf einen nicht-enzymatischen Reaktionsmechanismus zurückzuführen, da in den Kontrollexperimenten ohne Hefezusatz vergleichbare HMF-Konzentrationen detektiert wurden. Weitere Experimente zeigten eine direkte Korrelation zwischen den HEMF-Ausbeuten und den applizierten Mengen des jeweiligen Zuckerphosphates.

In einer vergleichenden Studie produzierten alle 6 Stämme der Hefe *Z. rouxii*, 10 Stämme von Candida-Hefen, 9 Stämme der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und *Yarrowia lipolytica* in analogen Ansätzen HEMF aus Zuckerphosphaten, wobei sich die *Z. rouxii*-Stämme als wirksamste HEMF-Bildner herausstellten. Somit scheint es sich bei der HEMF-Produktion um eine unter Hefen sehr weit verbreitete Fähigkeit zu handeln.

D-Xylulose-5-phosphat wurde von Sasaki (1996a) als natürlicher Bestandteil in der Sojasoßen-Maische nachgewiesen und als HEMF-Vorläufer postuliert. Eine Bildung von D-Xylulose-5-phosphat infolge von RNA-Hydrolyse und anschließender Isomerisierung und Epimerisierung des freigesetzten D-Ribose-5-phosphats im Pflanzenmaterial wird angenommen (Sasaki, 1996a). Diese Theorie wird gestützt durch die Beobachtung von Hayashida und Mitarbeitern (1997; 1998a), die einen positiven Einfluss einer Vorinkubation der Sojabohnen-Maische (vor Zusatz des Hefestammes) auf die HEMF-Konzentration im Endprodukt feststellten.

Der Gehalt an 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen in Sojasoße wird weiterhin entscheidend von der Kochsalzkonzentration beeinflusst, die im zu vergärenden „Koji“ vorliegt. Als optimal für die HEMF-Bildung stellte sich eine zur Sojasoßenproduktion gängige Kochsalzkonzentration von 16 - 18 % heraus. Die HDMF- und HMF-Konzentrationen variierten zwar ebenfalls in Abhängigkeit von der Kochsalzkonzentration, zeigten aber keine so eindeutigen Tendenzen wie die HEMF-Ausbeute (Sasaki, 1996b).

In Analogie zur Produktion von HEMF aus D-Sedoheptulose-7-phosphat folgerten Hecquet und Mitarbeiter (1996), dass der Hefestamm *Z. rouxii* in der Lage sein müsste, HDMF aus Hexosederivaten zu bilden. Motiviert von der Idee einer fermentativen HDMF-Gewinnung, verfütterten sie verschiedene Hexosen, Desoxyhexosen und Hexosephosphate an *Z. rouxii* in einem Yeast-Pepton-Dextrose (YPD)-Medium. Durch Quantifizierung der HDMF-Ausbeuten mittels HPLC-UV-Analyse stellte sich D-Fructose-1,6-diphosphat als effektivster Vorläufer von HDMF heraus. Durch Zusatz von 10 % D-Fructose-1,6-diphosphat und 5 % D-Glucose wurde nach 11 Tagen eine maximale HDMF-Konzentration von 80 ppm erreicht. Die Identifizierung von D-Fructose-1,6-diphosphat als potentieller Vorläufer von HDMF steht somit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Roscher und Mitarbeitern (1998) und Schieberle (1992), die D-Fructose-1,6-diphosphat als wirksamsten Vorläufer von HDMF in Erdbeeren und in der Maillard-Reaktion nachwiesen. Dahlen und Mitarbeiter (2001) untersuchten in weiterführenden Studien den Einfluss des Nährmediums auf die HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch *Z. rouxii*. In einem Medium, das D-Fructose-1,6-diphosphat als alleinige Kohlenstoffquelle enthielt, wurden weder Zellwachstum von *Z. rouxii* noch HDMF-Bildung beobachtet. In Nährmedien, denen D-Glucose als Kohlenstoffquelle zugesetzt worden war, fand zwar ein deutliches Zellwachstum statt, HDMF wurde jedoch ausschließlich in Gegenwart von exogen zugesetztem D-Fructose-1,6-diphosphat gebildet. Die HDMF-Ausbeuten korrelierten sehr stark mit den Zellzahlen und den eingesetzten D-Fructose-1,6-diphosphat-Konzentrationen.

Bei Studien mit Hefen, die HDMF aus L-Rhamnose bilden können, wurden zwei *Pichia*-Stämme identifiziert (*P. capsulata* und *P. angusta*), die innerhalb von 48 Stunden bis zu 60 ppm HDMF produzierten (Ribeiro und Mitarbeiter, 1995). Weitere Studien von Roscher und Mitarbeitern (1997) zeigten jedoch, dass *P. capsulata* nur dann in der Lage war, HDMF aus L-Rhamnose zu bilden, wenn der Zucker zuvor einer thermischen Behandlung (Hitzesterilisation) unterzogen wurde. In einem sterilfiltrierten Nährmedium, dem L-Rhamnose zugesetzt worden war, wurde keine HDMF-Bildung durch *P. capsulata* beobachtet. Hayashida und Slaughter (1997) untersuchten die Bildung von Hydroxyfuranonen durch *S. cerevisiae* während des Fermentationsprozesses unterschiedlicher Malzextrakte. Während HDMF bei der Fermentation von hellem und dunklem Malzextrakt gebildet wurde, konnte HEMF nur nach Fermentation des dunklen Malzextraktes nachgewiesen werden. Diese Versuche zeigten somit zum einen die Bedeutung des Fermentationsprozesses für die Furanonbildung und zum anderen, dass der Grad der Erhitzung vor der Fermentation von entscheidendem Einfluss auf das nach der Fermentation erhaltene Furanonspektrum ist (Slaughter, 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorgestellten Arbeiten sehr deutlich die Bedeutung der zur Fermentation eingesetzten Hefestämme für die Produktion von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen zeigen. Die Bildung eines Maillard-Intermediates, das durch Enzymsysteme der Hefe zu den entsprechenden Furanonderivaten weiter metabolisiert werden kann, wird von der Arbeitsgruppe um Hayashida als Grundvoraussetzung angesehen (Hayashida und Mitarbeiter, 1998b; Hayashida und Mitarbeiter, 1999) (Abb. B-12). Es bleibt zu klären, inwieweit sich die Bildungsmechanismen von Hydroxyfuranonen durch Hefen aus Maillard-Intermediaten von den beschriebenen Bildungsmechanismen aus Zuckerphosphaten unterscheiden.

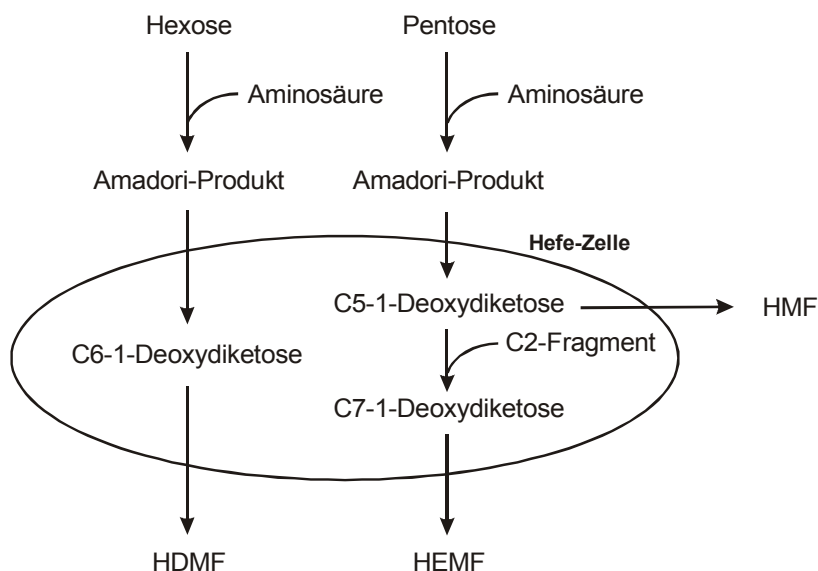


Abb. B-12: Hypothetische Bildungsmechanismen von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen durch Hefen (Hayashida und Mitarbeiter, 1998b).

1.4.2.2 Bakterien

Anstoß zu Arbeiten über die 4-Hydroxy-3(2H)-furanon-Produktion durch Bakterien war die Identifizierung von HDMF und HEMF im Aroma von Schweizer Emmentaler Käse (Preininger und Grosch, 1994). Preininger und Grosch (1995) wiesen in einer weiteren Studie die Bildung von beachtlichen Mengen an HDMF nach siebentägigem Wachstum von *Lactobacillus helveticus* (0.6 mg/L HDMF) und *L. delbrueckii* (0.4 mg/L HDMF) in einer auf Molkepulver basierenden wässrigen Suspension nach. *Propionibacterium freudenreichii* produzierte unter analogen Bedingungen nur 0.08 mg/L HDMF, weshalb die Autoren eine HDMF-Produktion durch die Milchsäurebakterien ableiteten. Sie konnten jedoch nicht eindeutig beweisen, ob die Furanone direkt von den Bakterien gebildet werden oder ob sie Produkte einer Spontanreaktion im Nährmedium darstellen, die auf bakterielle Stoffwechselprodukte wie z. B. Dihydroxyacetonphosphat oder Aminosäuren zurückzuführen sind (Slaughter, 1999). Hayashida und Mitarbeiter (2001) untersuchten kürzlich die HDMF-Produktion durch *Lactococcus lactis* Subsp. *Cremoris* IFO 3427 in einfachem Nährmedium unter Zusatz von erhitzten Mischungen aus Zuckern und Aminosäuren. Hierbei konnte während des Wachstums eine geringe Steigerung der HDMF-Konzentration im Nährmedium beobachtet werden, was die Autoren auf einen ähnlichen Bildungsmechanismus wie in Hefen (Abb. B-12) zurückführten.

1.4.3 Enzymatische Bildung von 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon

1.4.3.1 Bildung von HMF aus D-Ribose-5-phosphat

Bei ihren Untersuchungen zur Aktivität der Phosphoribose-Isomerase aus Spinat beobachteten Knowles und Mitarbeiter (1980) das sequenzielle Auftreten von drei UV-absorbierenden Chromophoren mit Absorptionsmaxima bei 280, 308.5 und 285 nm. D-Ribulose-5-phosphat wurde als die bei 280 nm absorbierende Verbindung identifiziert. Die bei 308.5 nm absorbierende Verbindung trat nur vorübergehend nach der Bildung von D-Ribulose-5-phosphat auf und ging einer Akkumulation der bei 285 nm absorbierenden Komponente voraus. Während die bei 285 nm absorbierende Verbindung anhand ihrer spektralen Daten (UV, IR und NMR) eindeutig als HMF nachgewiesen wurde, konnte die Zwischenverbindung (bei 308.5 nm absorbierende Verbindung) nicht identifiziert werden. Interessanterweise zeigten analoge Umsetzungen unter Verwendung von Phosphoribose-Isomerase, isoliert aus Kaninchenmuskel, eine Umsetzung des D-Ribose-5-phosphates ausschließlich zu D-Ribulose-5-phosphat. Die Autoren führten daher die HMF-Bildung auf eine unbekannte Nebenaktivität der Phosphoribose-Isomerase aus photosynthetischem Gewebe zurück. Des Weiteren postulierten sie den in Abb. B-13 dargestellten Bildungsmechanismus von HMF aus D-Ribulose-5-phosphat über 3,4-Epoxy-ribulose-5-phosphat und eine α,β -ungesättigte α -Dicarbonylverbindung. Prinzipiell stellt dies bislang den einzigen Hinweis auf ein Enzym dar, das an der Bildung von Hydroxyfuranonen aus Zuckerphosphaten beteiligt ist.

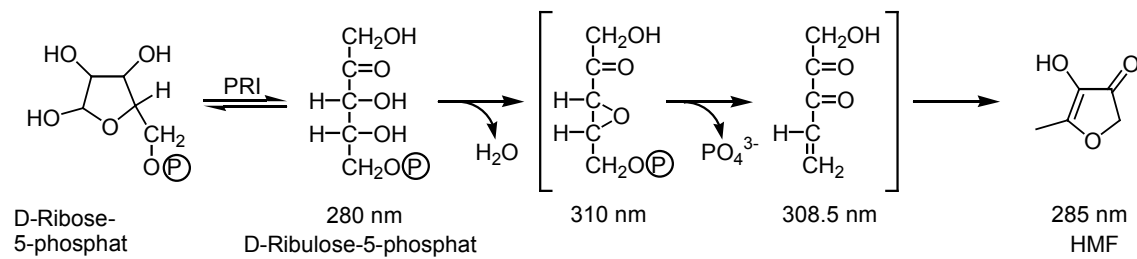


Abb. B-13: Hypothetischer Bildungsweg von HMF aus D-Ribose-5-phosphat infolge einer Isomerisierung durch Phosphoribose-Isomerase (aus Spinat) (PRI) (Knowles und Mitarbeiter, 1980).

1.4.3.2 Bildung von HMF aus *S*-Ribosylhomocystein

Seit kurzem sind HMF und sein diskutierter Vorläufer 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion bei Untersuchungen zur bakteriellen Signalübertragung von besonderem Interesse. Allgemein wird eine Kommunikation von Bakterienzellen untereinander durch den Austausch extrazellulärer Signalmoleküle, die auch „Autoinducer“ genannt werden, erreicht. Dieser Prozess, der als „quorum sensing“ bezeichnet wird, gewährleistet bakteriellen Populationen die Koordination der Genexpression. Das durch „quorum-sensing“ kontrollierte multizelluläre Verhalten beinhaltet verschiedene physiologische und morphologische Prozesse wie z. B. Biolumineszenz, Biosynthese von Antibiotika, Expression von Virulenzfaktoren und die Entwicklung von Biofilmen. Im Gegensatz zu Autoinducern, die spezifisch für eine bestimmte Bakterienart sind (z. B. *N*-Acyl-L-homoserinlactone für gramnegative Bakterien), wird der erst vor kurzem entdeckte Autoinducer AI-2 von einer Vielzahl von Bakterienarten produziert. Die genaue Struktur dieses sog. „universal“-Autoinducers ist noch nicht eindeutig aufgeklärt, eine Bildung aus der α -Dicarbonylverbindung 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion wird jedoch allgemein angenommen (Schauder und Mitarbeiter, 2001; Chen und Mitarbeiter, 2002; Winzer und Mitarbeiter, 2002).

4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion entsteht neben Homocystein beim Abbau von *S*-Ribosylhomocystein durch die sog. LuxS Proteine (Abb. B-14). Seine Bildung im Rahmen dieser Reaktion konnte von Duerre und Mitarbeitern bereits 1971 nachgewiesen werden. Winzer und Mitarbeiter (2002) detektierten vor kurzem HMF als ein Hauptprodukt in der LuxS-*in vitro*-Reaktion unter Verwendung von *S*-Ribosylhomocystein als Substrat (Abb. B-14). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Bildung von HMF aus 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion, das in der Maillard-Reaktion aus dem Amadori-Produkt von Pentosen gebildet wird (Abschnitt B 1.3.2). HMF stellt jedoch nicht den Autoinducer AI-2 dar, da synthetisches HMF im spezifischen *Vibrio harveyi*-Bioassay eine viel geringere Aktivität (Faktor 1000) im Vergleich zu *in vitro* synthetisiertem AI-2 zeigte (Schauder und Mitarbeiter, 2001; Winzer und Mitarbeiter, 2002). Winzer und Mitarbeiter (2002) postulierten daher, dass es sich bei AI-2 um eine hochaktive Minorkomponente, gebildet

aus 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion, oder um eine Zwischenverbindung der HMF-Bildung handelt. Noch im gleichen Jahr publizierten Chen und Mitarbeiter (2002) hingegen die Bildung von AI-2 aus 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion und Borsäure, wonach es sich bei AI-2 um einen Furanosylborat-diester handelt (Abb. B-14). Die Autoren wiesen außerdem auf die mögliche Existenz weiterer 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion-Derivate hin, die in der Natur gebildet werden und als Signalmoleküle dienen können.

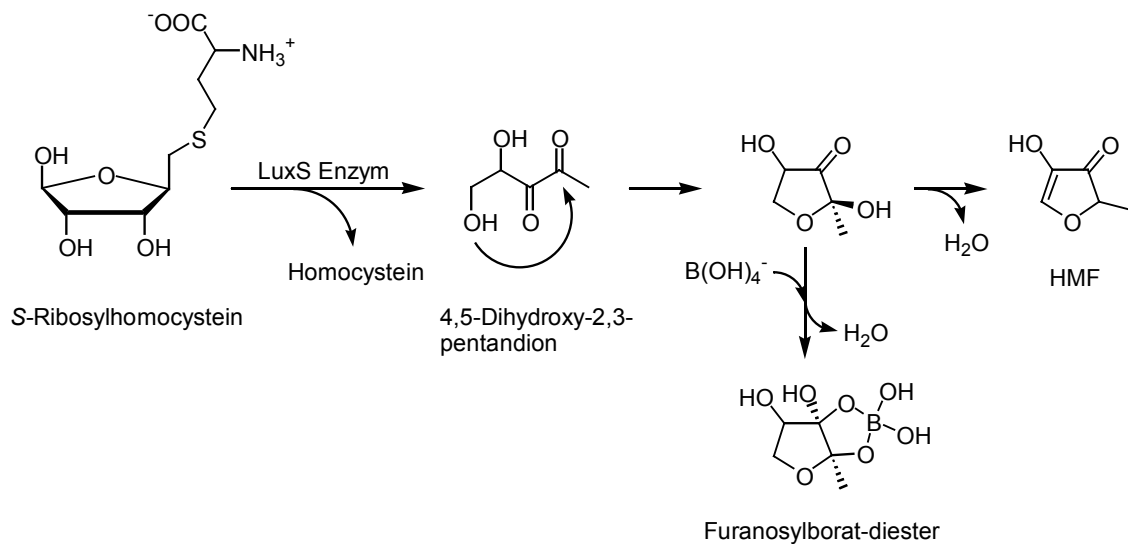


Abb. B-14: Bildung von HMF (Winzer und Mitarbeiter, 2002) und einem Furanosylborat-diester (Chen und Mitarbeiter, 2002) infolge des Abbaus von S-Ribosylhomocystein durch LuxS Proteine.

2 Die Hefe *Zygosaccharomyces rouxii*

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Charakterisierung bzw. die Aufklärung der Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch den Hefestamm *Z. rouxii* (Hecquet und Mitarbeiter, 1996). Auf die Bildung von Hydroxyfuranonen durch diese Hefe wurde bereits in Abschnitt B 1.4.2.1 ausführlich eingegangen. Zwecks besseren Verständnisses werden in diesem Kapitel wichtige allgemeine Charakteristika dieses weit verbreiteten Hefestammes vorgestellt.

2.1 Allgemeines

Taxonomisch lässt sich der Hefestamm *Z. rouxii* wie folgt einordnen:

Tab. B-1: Taxonomische Einordnung der Hefe *Z. rouxii*³.

Taxonomischer Rang	Taxonomischer Name
<i>Überreich</i>	Eukaryota
<i>Reich</i>	Pilz
<i>Stamm</i>	Ascomycota
<i>Unterstamm</i>	Saccharomycotina
<i>Klasse</i>	Saccharomycetes
<i>Ordnung</i>	Saccharomycetales
<i>Familie</i>	Saccharomycetaceae
<i>Gattung</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>Art</i>	<i>rouxii</i>

Z. rouxii wurde erstmals im Jahre 1884 von L. Boutroux beschrieben, der dem Stamm den Namen *Saccharomyces rouxii* zuteilte. Die jochförmigen Gebilde, die bei der Kopulation der Sporen von *Zygosaccharomyces* entstehen (Abb. B-15), gaben B. T. Barker im Jahre 1901 Veranlassung, für diese Hefeart eine eigene Untergruppe zu schaffen (daher der Name „zygos“ = Ochsenjoch) (Barker, 1901; Böhringer, 1962).

Nach Laskowski (1960) handelt es bei *Zygosaccharomyces* um homothallische Organismen, das heisst haploide Organismen, bei denen keine genetisch bedingte Trennung der Geschlechter oder Paarungstypen vorliegt, so dass Individuen eines Klons miteinander kopulieren können. Darin liegt der wesentliche Unterschied zu den echten Saccharomyceten (z. B. *S. cerevisiae*), bei denen es sich um heterothallische Organismen

³ <http://taxon.molgen.mpg.de/gettaxon>

handelt. Eine Kopulation erfolgt nur zwischen Individuen, die sich genetisch bezüglich des Geschlechts oder des Paarungstyps unterscheiden (Laskowski, 1960). Die vegetativen Zellen von *Saccharomyces* liegen vorwiegend in diploider Form vor, während sich die diploide Phase bei *Zygosaccharomyces* auf die Zygote beschränkt (Schlegel, 1992). Im Anschluss an die Reduktionsteilung bildet sich bei *Zygosaccharomyces* ein Ascus mit ein bis vier rauen oder glatten, runden Ascosporen aus (Kurtzman und Fell, 1998). In Abb. B-15 ist ein Vergleich der Entwicklungszyklen der Hefen der Gattungen *Saccharomyces* und *Zygosaccharomyces* schematisch dargestellt.

Trotz der phänotypischen Unterschiede kann *Z. rouxii* aufgrund des Vergleichs der ribosomalen DNA-Sequenz genetisch sehr nahe bei *S. cerevisiae* eingeordnet werden (Wilmotte und Mitarbeiter, 1993; Montigny und Mitarbeiter, 2000).

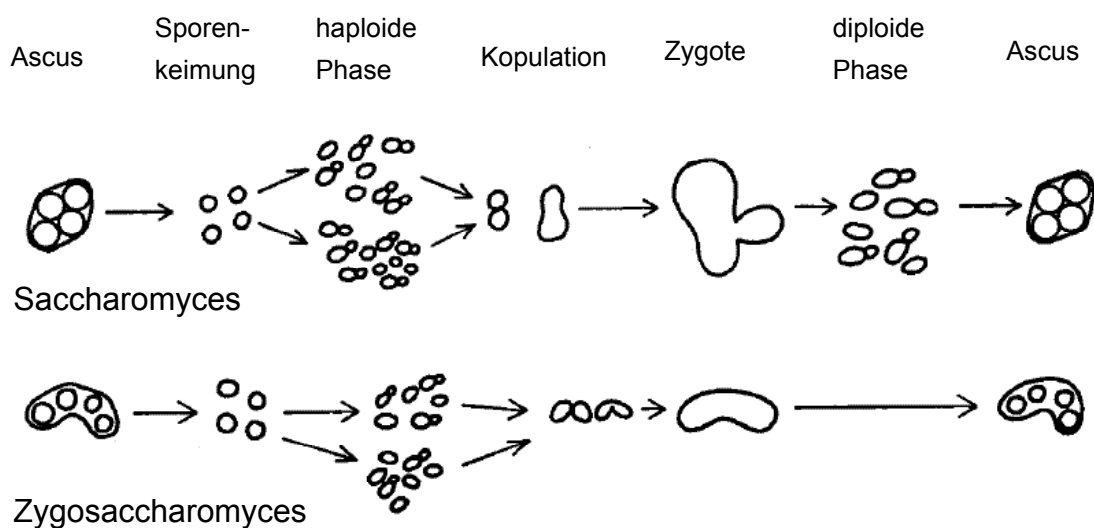


Abb. B-15: Vergleichende Schematische Darstellung der Entwicklungszyklen von Hefen der Gattungen *Saccharomyces* und *Zygosaccharomyces* (Laskowski, 1960; Schlegel, 1992).

2.2 Eigenschaften und Vorkommen

Z. rouxii bildet weiße bis cremefarbene Kolonien. Die Zellen sind kugelig bis zylindrisch geformt $(3.0-7.8) \times (3.5-8.1) \mu\text{m}$, und liegen einzeln, paarweise oder gelegentlich auch in kleinen Clustern vor (Kurtzman und Fell, 1998). Die für *Zygosaccharomyces* charakteristische Art der asexuellen vegetativen Fortpflanzung ist die multilaterale Knospung. Dies bedeutet, dass die Knospung an jeder Stelle auf der Oberfläche der Mutterzelle stattfinden kann (Walker, 1998). Pseudohyphen sind nicht oder nur sehr schwach differenziert. *Z. rouxii* zeichnet vor allem seine Toleranz gegenüber hohen Zucker- und Salzkonzentrationen im Nährmedium aus, was diesen Stamm auch deutlich von den anderen Arten seiner Gattung abgrenzt. So ist er beispielsweise der einzige Stamm seiner Gattung,

der bei einer Natriumchlorid-Konzentration von 16 % in Gegenwart von 5 % D-Glucose noch ein deutliches Wachstum zeigt (Kurtzman und Fell, 1998).

Viele Studien belegen, dass Hefen auf zuckerreichen Lebensmitteln, wie z. B. Zuckersirup, Honig, getrockneten Früchten, Fruchtsaftkonzentraten und Marmeladen, weit verbreitet sind (Tokuoka, 1993). Aufgrund seiner bereits erwähnten Toleranz gegenüber hohen Zucker- und Salzkonzentrationen bzw. gegenüber niedrigen Wasseraktivitäten ist es wenig verwunderlich, dass *Z. rouxii* für den Verderb derartiger Lebensmittel hauptverantwortlich ist (Hernandez und Beuchat, 1995; Marquina und Mitarbeiter, 2001). In Tab. B-2 sind zuckerreiche Lebensmittel, auf denen unter anderem *Z. rouxii* nachgewiesen wurde, zusammengefasst. Für die Identifizierung bedient man sich nach Ok und Hashinaga (1997) und Baleiras Couto und Mitarbeitern (1995) verschiedener Tests wie zum Beispiel:

- morphologische Tests (z. B. Größe der Zelle; Ascosporenbildung, Bildung von Pseudohyphen)
- biochemische Tests (Assimilations- und Fermentationstests)
- physiologische Tests (z. B. Zuckertoleranz, Salztoleranz)
- molekularbiologische Tests (z. B. DNA-Basen-Zusammensetzung, Restriktionsanalyse ribosomaler DNA)

Tab. B-2: Auf zuckerreichen Lebensmitteln nachgewiesene Hefestämme.

Lebensmittel	Identifizierte Stämme	Anzahl der Stämme	Literatur
Honig	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	6	1*
		4	2
Zucker, Sirup	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1	1
		2	2
		<i>Candida glucosophila</i>	1
Molasse	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	6	1
	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	1	1
	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	2	1
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	1
	<i>Torulaspora delbruekii</i>	1	1
	<i>Candida mannitofaciens</i>	1	1
Kandierte Früchte	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3	1
		1	2
		<i>Candida dattila</i>	1
Fruchtsaftkonzentrat	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	10	2
	<i>Torulaspora delbruekii</i>	1	2

* Literatur: 1 Tokuoka und Mitarbeiter (1985); 2 Jermini und Mitarbeiter (1987)

2.3 Verwendung von *Z. rouxii*

2.3.1 Einsatz in der Nahrungsmittelherstellung

Neben dem unerwünschten Vorkommen von *Z. rouxii* kommt diesem Stamm jedoch auch sehr große kommerzielle Bedeutung in der Produktion von Lebensmitteln zu. Eingesetzt wird er in erster Linie zur Fermentation bei der Sojasoßen- und Miso-Herstellung, wo er einen wesentlichen Beitrag zu der Entwicklung von Aroma- und Geschmacksstoffen leistet (Horitsu und Mitarbeiter, 1990 und 1991; Sasaki, 1996b; Hayashida und Mitarbeiter, 1998a; van der Sluis und Mitarbeiter, 2001). Neben der bereits ausführlich dargestellten Bildung von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen während der Fermentation ist *Z. rouxii* auch für die Produktion von Methionol (3-Methylthiopropyl), einem Abbauprodukt des Methionin, verantwortlich, das ebenfalls zum charakteristischen Aroma von Sojasoße beiträgt (van der Sluis und Mitarbeiter, 2001). Des Weiteren wird dem Stamm eine antibakterielle Wirkung nachgesagt, weshalb er bei der Fermentation von zuckerreichen Gemüseextrakten zum Einsatz kommt, die in Japan als „health drinks“, „functional food“ oder „enzyme drinks“ gehandelt werden (Ok und Hashinaga, 1997).

2.3.2 Einsatz als Biokatalysator in der chemischen Synthese

Aufgrund seines Nutzens als Biokatalysator in der Darstellung enantiomerenreiner Produkte hat *Z. rouxii* in den letzten Jahren auch die Aufmerksamkeit der chemischen Industrie auf sich gezogen (Anderson und Mitarbeiter, 1995; Hallinan und Mitarbeiter, 1995). Von großer Bedeutung ist die enantioselektive Reduktion von 3,4-Methylenedioxyphenylaceton zu 3,4-Methylenedioxyphenyl-(*S*)-isopropanol, einer Vorstufe bei der Synthese von 5*H*-2,3-Benzodiazepine LY 300164, die mittels chemischer Methoden mit nur unbefriedigender Selektivität oder hohem Kostenaufwand zu bewerkstelligen ist (Anderson und Mitarbeiter, 1995). Dies führte zur Entwicklung eines industriellen Prozesses, bei dem *Z. rouxii*-Zellen als Biokatalysator zur Reduktion vom 3,4-Methylenedioxyphenylaceton eingesetzt werden (Vincenzi und Mitarbeiter, 1997). Das für die Durchführung dieser Reduktion verantwortliche Enzym, eine Ketoreduktase, wurde drei Jahre später von Costello und Mitarbeitern aufgereinigt und charakterisiert. Das codierende Gen wurde in *E. coli* und *P. pastoris* kloniert, wodurch die Expression der Ketoreduktase in den beiden Mikroorganismen ermöglicht wurde (Costello und Mitarbeiter, 2000).

2.4 Osmoregulation von *Z. rouxii*

2.4.1 Hyperosmotischer Stress

Die am intensivsten untersuchte Eigenschaft des Hefestammes *Z. rouxii* ist aber seine bereits erwähnte Toleranz gegenüber extrem hohen Zucker- und Salzkonzentrationen im Nährmedium (Hosono und Ryu, 1993; Attfield, 1998). Hohe Konzentrationen an gelösten Stoffen führen zu einer drastischen Senkung der Wasseraktivität (a_w), die dem Gehalt an frei verfügbaren Wassermolekülen entspricht. Die Wasseraktivität (a_w) ist allgemein definiert als der Quotient aus der Konzentration an Wasser in der Dampfphase im Luftraum über einer Lösung (dem Medium) und der Wasserkonzentration in der Dampfphase über reinem Wasser (Attfield, 1998). Während beispielsweise *S. cerevisiae* nur in Medien mit a_w -Werten über 0.9 Wachstum zeigt, ist *Z. rouxii* bis zu a_w -Werten von 0.6 wachstumsfähig. Nur einige Pilzarten der Gattung *Aspergillus* und *Xeromyces bisporus* zeigen eine ähnlich hohe Toleranz (Hosono und Ryu, 1993). Während der Osmoregulierung unterziehen sich die Zellen von *Z. rouxii* einer Reihe von physiologischen Veränderungen, um dem osmotischen Stress und den damit verbundenen Konsequenzen, wie z. B. dem Verlust von intrazellulärem Wasser, entgegenzuwirken. In erster Linie produzieren und akkumulieren Hefen zum Ausgleich von hyperosmotischem Stress hohe Gehalte an Glycerin. Glycerin fungiert als Osmoregulator und gleicht somit den osmotischen Gradienten zwischen dem Nährmedium und dem Cytosol der Hefezelle aus (Reed und Mitarbeiter 1987; Attfield, 1998). Van Zyl und Mitarbeiter zeigten, dass die Hefe *Z. rouxii* die Fähigkeiten besitzt, Glycerin durch aktiven Transport aus dem Nährmedium aufzunehmen und in hohem Maße selbst zu produzieren (van Zyl und Mitarbeiter, 1990, 1991, 1993). Die Bildung und Akkumulation setzt unmittelbar nach Beginn des osmotischen Stresses ein und gleicht binnen einer Stunde den inneren dem äußeren osmotischen Druck an (Yagi, 1992; Yagi und Nishi, 1993). Demnach scheinen hohe Salzkonzentrationen intrazelluläre Mechanismen auszulösen, die den gewöhnlichen Kohlenhydratstoffwechsel von Glucose via Zitronensäurezyklus oder alkoholische Gärung umlenken, um letzten Endes Glycerin bilden zu können (Abb. B-16) (Ohshiro und Yagi, 1996).

Die Glycerinbiosynthese bzw. der Glycerinmetabolismus kann in Hefen im wesentlichen über zwei unterschiedliche Wege ablaufen: (1) über Glycerin-3-phosphat oder (2) über Dihydroxyaceton (Abb. B-16). Für *S. cerevisiae* wurde eine Bildung über Weg (1) nachgewiesen, während man im Falle von *Z. rouxii* von einer Bildung über Weg (2) ausgeht (Prior und Hohmann, 1997). Dies basiert auf dem Nachweis deutlich erhöhter Enzymaktivitäten von Glycerindehydrogenase und Dihydroxyaceton-Kinase in zellfreien Proteinextrakten, gewonnen aus „hyperosmotisch gestressten“ *Z. rouxii*-Zellen, verglichen mit analogen Extrakten aus „ungestressten“ *Z. rouxii*-Zellen (van Zyl, 1991). Erhöhte Aktivitäten einer Phosphatase bzw. einer Dehydrogenase, welche die Reduktion von Dihydroxyaceton zu Glycerin katalysiert, wurden jedoch nicht beschrieben.

Des Weiteren beschäftigte sich Hosono (1992) intensiv mit der Zusammensetzung der Cytoplasmamembran von *Z. rouxii*-Zellen, die in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen gewachsen waren, und verglich diese mit der Membranzusammensetzung von Kontrollzellen. Die Ergebnisse deuteten auf eine herabgesetzte Durchlässigkeit der Cytoplasmamembran „hyperosmotisch gestresster“ *Z. rouxii*-Zellen hin. Nach Attfield (1998) hat dies möglicherweise entscheidende Bedeutung für die Zurückhaltung und Akkumulation von Glycerin in den Zellen.

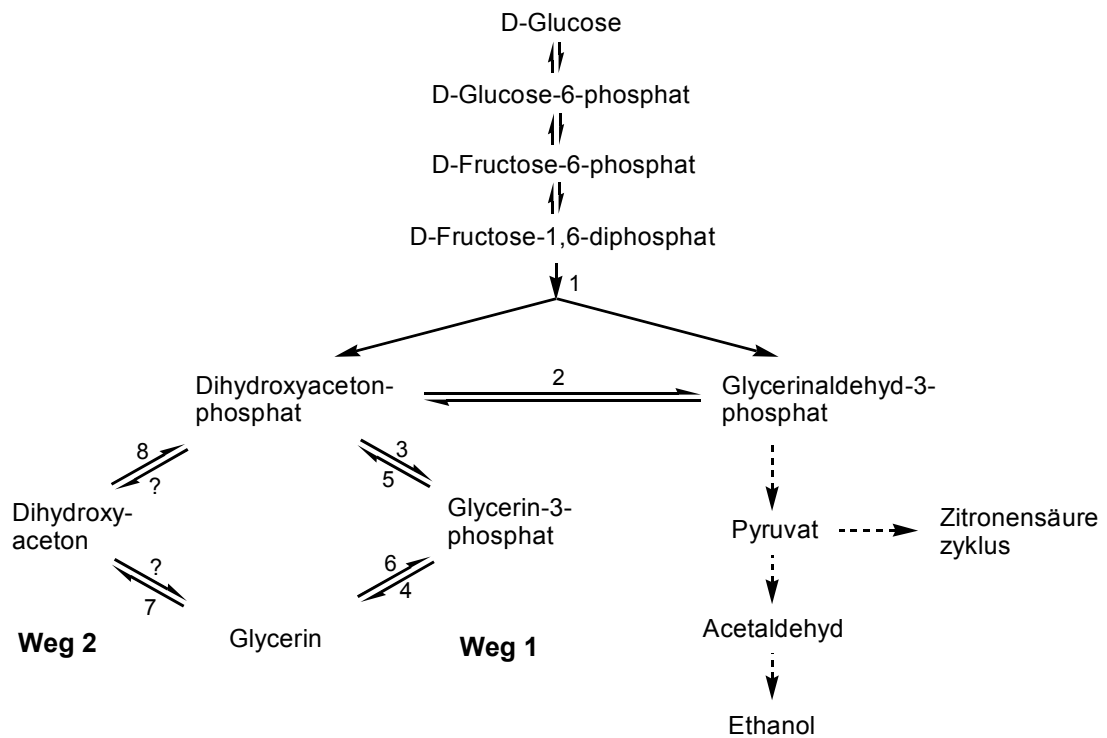


Abb. B-16: Glycerinbiosynthese und Glycerinmetabolismus in Hefen (Hosono und Ryu, 1993). (1) Aldolase; (2) Triosephosphatisomerase; (3) NAD-abhängige Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase; (4) Phosphatase; (5) mitochondriale Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase; (6) Glycerinkinase; (7) Glycerin-Dehydrogenase; (8) Dihydroxyaceton-Kinase.

2.4.2 Hypoosmotischer Stress

Über den Effekt von hypoosmotischem Schock auf *Z. rouxii*-Zellen ist derzeit noch sehr wenig bekannt. Hosono beschrieb 1991 eine beachtliche Freisetzung von Proteinen und weiteren UV-absorbierenden Verbindungen, die nicht näher charakterisiert wurden, infolge von hypoosmotischem Schock auf *Z. rouxii*-Zellen, gewachsen auf 15 % NaCl. Zehn Jahre später beobachteten Kayingo und Mitarbeiter eine kontrollierte rasche Freisetzung von Glycerin und Arabitol, hervorgerufen durch hypoosmotischen Schock. Die freigesetzte Menge war proportional zur Schockintensität. Die Autoren führten dies auf die Beteiligung eines in *Z. rouxii* unbekanntes Kanalproteins zurück, in Analogie zu dem bislang nur in *S. cerevisiae* identifizierten Glycerintransporter Fps1 (Kayingo und Mitarbeiter, 2001).

3 Problemstellung

Für die enzymatische bzw. mikrobiologische Gewinnung von natürlichen Aromastoffen stellen weitreichende Kenntnisse bezüglich ihrer Biosynthese eine Grundvoraussetzung dar. Im Falle der 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone ist dieses Wissen jedoch noch sehr lückenhaft. So sind ausschließlich Vorläufermoleküle aus dem Primärstoffwechsel in verschiedenen natürlichen Systemen eindeutig nachgewiesen worden. Des Weiteren wurden bislang mit Ausnahme der unter Abschnitt B 1.4.3 erläuterten enzymatischen Bildungswege von HMF keine Enzym-Systeme beschrieben, die an der Biosynthese von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen beteiligt sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Biosynthese dieser Verbindungen, insbesondere durch den Hefestamm *Z. rouxii*, genauer zu untersuchen. Dabei standen folgende Aufgaben im Mittelpunkt:

- Aufbauend auf den Ergebnissen von Hecquet und Mitarbeitern (1996) und Dahlen und Mitarbeitern (2001), sollte der Einfluss des Nährmediums auf das Zellwachstum von *Z. rouxii* und die damit im Zusammenhang stehende HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat näher untersucht werden. Insbesondere war der Einfluss des pH-Wertes und der Natriumchlorid-Konzentration sowie der Einfluss exogen zugesetzten Glycerins zu testen.
- D-Fructose-1,6-diphosphat wurde von Hecquet und Mitarbeitern (1996) als effektivster Vorläufer bei der biokatalytischen HDMF-Bildung durch *Z. rouxii* identifiziert. Ob D-Fructose-1,6-diphosphat die alleinige Kohlenstoffquelle des Hydroxyfuranons darstellt, wurde jedoch nicht untersucht. Diese Problematik sollte durch Applikation von isotope markierten Vorläufern aufgeklärt werden.
- Mit Hilfe der Enantiomerenanalytik sollte das Enantiomerenverhältnis von durch *Z. rouxii* gebildetem HDMF bestimmt werden. Voraussetzung hierfür war die Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit des HDMF-Moleküls in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums. Des Weiteren galt es in diesem Zusammenhang, eine neue, geeignete Analysenmethode zur enantioselektiven Analyse von HDMF zu entwickeln.
- Die Bildung von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen aus Zuckerphosphaten durch intakte, sich im Wachstum befindende *Z. rouxii*-Zellen sollte vom sog. „whole-cell-System“ auf Rohproteinextrakte übertragen werden. Zur Lokalisierung der Hydroxyfuranonbildung in einem bestimmten Kompartiment der Hefezelle galt es, verschiedene Rohproteinextrakte aus der Hefezelle herzustellen und hinsichtlich ihrer Aktivität zu analysieren.

- Die von Knowles und Mitarbeitern (1980) beschriebene enzymatische Bildung von HMF aus D-Ribose-5-phosphat infolge einer Isomerisierung durch Phosphoribose-Isomerase aus Spinat stellt bislang den einzigen Hinweis auf ein Enzym dar, das an der Bildung von Hydroxyfuranonen aus Zuckerphosphaten beteiligt ist. Daher sollte dieser Bildungsweg im Detail untersucht werden. Anhand verschiedener Inkubationsexperimente galt es herauszufinden, ob HMF über einen enzymatischen oder chemischen Bildungsweg generiert wird. Des Weiteren sollten mögliche Zwischenverbindungen identifiziert werden, und nach Applikation von stabil markierten Vorläufern war schließlich der Reaktionsmechanismus aufzuklären.
- Das Nährmedium von *Z. rouxii* sollte auf potentielle Zwischenverbindungen der Transformation von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF untersucht werden. Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Analyse von Verbindungen, die eine α -Dicarbonylstruktur aufweisen.

C Ergebnisse und Diskussion

1 Versuche mit intakten Zellen der Hefe *Zygosaccharomyces rouxii*

Die Bildung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF, Furaneol[®]) aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch intakte, sich im Wachstum befindende Zellen des Hefestammes *Zygosaccharomyces rouxii* wurde durch die Arbeiten von Hecquet und Mitarbeitern (1996) und Dahlen und Mitarbeitern (2001) eindeutig belegt. In Anlehnung an die erwähnten Arbeiten sind verschiedene Versuchsreihen zur Erlangung detaillierterer Informationen bezüglich des Bildungsmechanismus durchgeführt worden. Dabei wurde in Analogie zu den Arbeiten von Dahlen und Mitarbeitern (2001) nach dem in Abb. C-1 dargestellten Schema vorgegangen. Sterilem YPD (Yest-Peptide-Dextrose)-Medium definierter Zusammensetzung wurde eine sterilfiltrierte wässrige D-Fructose-1,6-diphosphat-Lösung zugesetzt. Nach Beimpfung mit *Z. rouxii*-Zellen aus einer Stammkultur erfolgte eine Inkubation der Lösung bei 30 °C im Schüttelinkubator. Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte photometrisch bei 600 nm unter Verwendung der von Dahlen und Mitarbeitern (2001) mittels einer Thoma-Neubauer-Zählkammer ermittelten Kalibriergerade. Zur Bestimmung der HDMF-Konzentrationen wurden die Proben nach Zentrifugation direkt mittels reversed-phase (RP)-HPLC unter Verwendung einer C18-Säule und UV-Detektion bei 285 nm analysiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand von Kalibriergeraden, die mit kommerziell erhältlichem HDMF aufgenommen wurden.

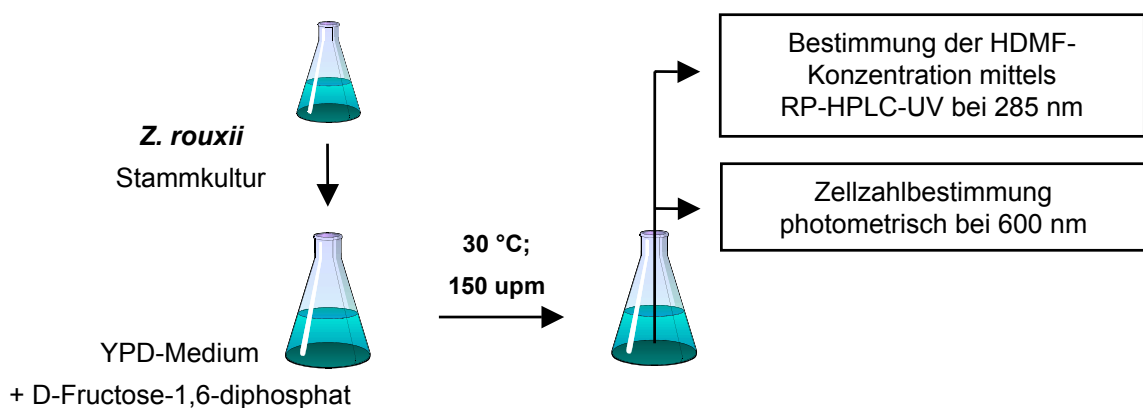


Abb. C-1: Schematische Vorgehensweise bei der Untersuchung der HDMF-Bildung durch intakte *Z. rouxii*-Zellen.

1.1 Einfluss des Nährmediums auf die HDMF-Bildung durch *Z. rouxii*

1.1.1 Einfluss der Natriumchloridkonzentration

Der Einfluss steigender Natriumchloridkonzentrationen auf das Zellwachstum von *Z. rouxii* und die HDMF-Bildung wurde in YPD-Medium untersucht, dem 1 % D-Glucose und 4.5 % D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt worden waren. Die Natriumchloridkonzentrationen lagen im Bereich von 0 – 26 %. Nach Krämer (1997) hat dies unter Vernachlässigung des Einflusses der sonstigen gelösten Stoffe des Mediums Wasseraktivitäten im Bereich von $a_w = 0.99$ bis 0.75 zur Folge. In den mit *Z. rouxii* inkubierten Medien wurden täglich die Zellzahlen und HDMF-Konzentrationen bestimmt, bis maximale HDMF-Ausbeuten erreicht waren. Im Falle der Inkubationsansätze mit 23 % bzw. 26 % Natriumchlorid wurde weder Zellwachstum noch HDMF-Bildung beobachtet. Die HDMF-Ausbeuten in den übrigen Ansätzen korrelierten sehr eng mit dem Zellwachstum, was in Analogie zu den Ergebnissen von Dahlen und Mitarbeitern (2001) steht. Mit steigendem Salzgehalt nahmen die Wachstumsraten und die maximal erreichten Zellzahlen deutlich ab (Abb. C-2 A). Die HDMF-Ausbeuten nahmen jedoch trotz abnehmender Zellzahlen mit steigendem Salzgehalt deutlich zu (Abb. C-2 B). Demnach stimuliert osmotischer Stress die HDMF-Bildung durch die Hefe *Z. rouxii*, was zu einem signifikanten Anstieg der Produktivität der einzelnen Zellen führt. In entsprechenden Kontrollexperimenten (ohne *Z. rouxii*-Zellen) wurde keine HDMF-Bildung beobachtet.

Der Einfluss der Natriumchloridkonzentration auf die Bildung von aromawirksamen Verbindungen durch *Z. rouxii* wurde bereits in komplex zusammengesetztem „Shoyu-Koji“ (375 g entfettete Soyabohnen pro Liter Wasser) ohne den Zusatz von weiteren Kohlenhydraten untersucht (Sasaki, 1996b). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute an 4-Hydroxy-2(oder 5)-ethyl-5(oder 2)-methyl-3(2H)-furanon (HEMF; Homofuraneol) eng mit der Natriumchloridkonzentration korrelierte und bei einer Konzentration von 16 % maximal war. Die HDMF-Konzentrationen korrelierten im Gegensatz dazu jedoch nicht mit den Salzkonzentrationen. Die Autoren führten die Detektion von HDMF daher auf eine nichtenzymatische Bildung während der Herstellung des Fermentationsansatzes zurück. Wie bereits unter Abschnitt B 1.4.2.1 erwähnt, werden die Soyabohnen vor der Fermentation gekocht, wobei HDMF im Rahmen der Maillard-Reaktion entstehen könnte (Abschnitt B 1.3 und B 1.4.2.1).

Eine nichtenzymatische Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch *Z. rouxii* kann jedoch aufgrund der bereits bekannten Daten weitgehend ausgeschlossen werden (Hecquet und Mitarbeiter, 1996; Dahlen und Mitarbeiter, 2001). Somit ist bei der HDMF-Bildung in „Shoyu-Koji“ und der hier untersuchten Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat prinzipiell von zwei unterschiedlichen Bildungsmechanismen auszugehen.

Z. rouxii ist eine salztolerante Hefe, die infolge von osmotischem Stress zur Osmoregulation hohe Gehalte an Glycerin akkumuliert. Damit sind unter anderem Veränderungen in der Cytoplasmamembran-Zusammensetzung, die ein Ausströmen von Glycerin aus der Zelle verhindern, sowie Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel verbunden (Abschnitt B 2.4.1). Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass diese Veränderungen von entscheidender Bedeutung für die HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat sind.

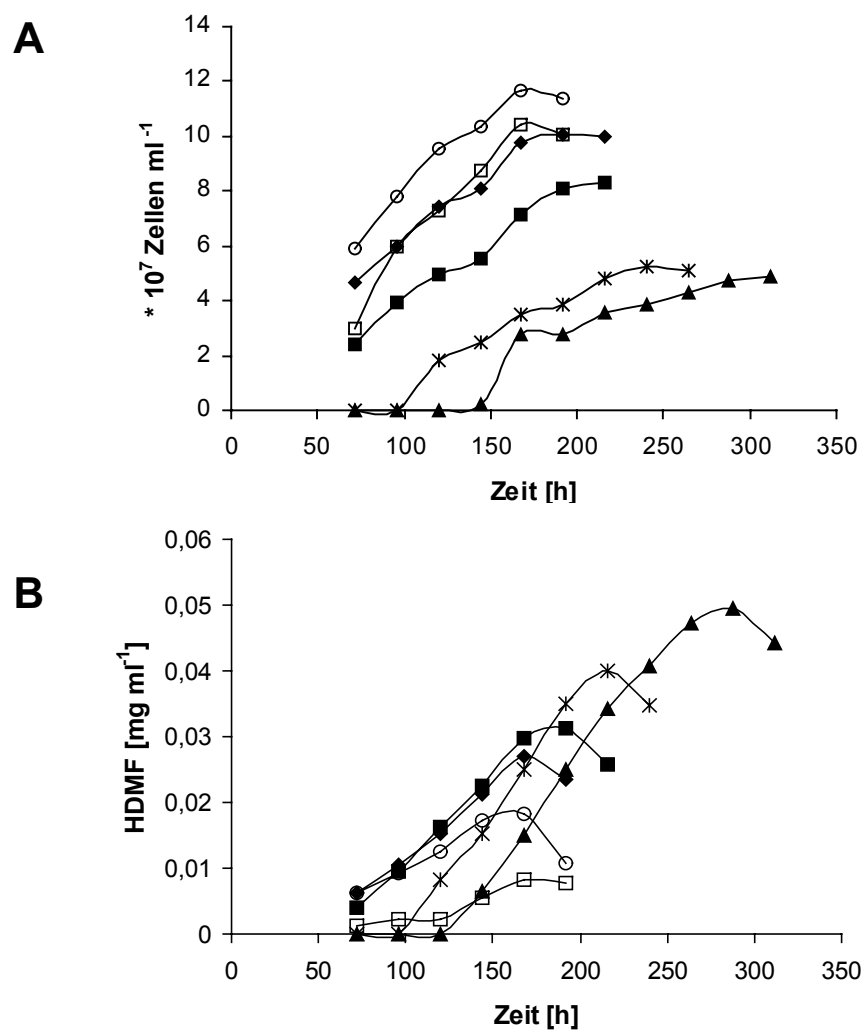


Abb. C-2: Einfluss der Natriumchloridkonzentration (0 % □, 5 % ○, 9 % ◆, 13 % ■, 17 % * 20 % ▲) im Nährmedium (YPD-Medium mit 4.5 % D-Fructose-1,6-diphosphat) auf:

A: Zellwachstum von *Z. rouxii*;

B: HDMF-Bildung durch *Z. rouxii*.

1.1.2 Einfluss des pH-Wertes

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse war die Lokalisierung des ersten Metabolisierungsschrittes von exogenem D-Fructose-1,6-diphosphat in der Zellwand oder Lipidmembran der Hefezelle bzw. im Medium als sehr wahrscheinlich anzusehen (Dahlen und Mitarbeiter, 2001). Der pH-Wert des Nährmediums könnte daher unmittelbaren Einfluss auf die HDMF-Bildung haben.

Zahlreiche Studien zeigten bereits, dass die Hefe *Z. rouxii* bei erhöhten Zuckerkonzentrationen (12 %) über einen sehr breiten pH-Bereich von pH 1.5 - pH 10.5 wächst (Restaino und Mitarbeiter, 1983). Im schwach sauren Milieu (pH 3.5 - pH 5) beobachteten Membre und Mitarbeiter (1999) ein optimales Wachstum. Die pH-Toleranz ist jedoch zum einen unmittelbar vom osmotischen Druck des Nährmediums abhängig und zum anderen von der gelösten Substanz, durch die dieser verursacht wird. So zeigte *Z. rouxii* allgemein eine breitere pH-Toleranz in zuckerreichen Medien (pH 1.9 - pH 8), als in Medien, die hohe Salzkonzentrationen aufwiesen (pH 3.0 - pH 6.6; Attfield, 1998).

Für die durchgeführten Studien wurden YPD-Nährmedien verwendet, die jeweils 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat enthielten und pH-Werte im Bereich von pH 4 bis pH 5.5 aufwiesen. Die mit *Z. rouxii* inkubierten Medien wurden täglich auf Zellzahl und HDMF-Konzentration geprüft. Abb. C-3 zeigt die bei unterschiedlichen pH-Werten erhaltenen Wachstumskurven sowie die jeweils ermittelten HDMF-Konzentrationen. Erhöhte pH-Werte des Nährmediums hatten einen positiven Einfluss auf die HDMF-Bildung. Dies wird besonders anhand der maximal erreichten HDMF-Konzentrationen deutlich (Abb. C-3 B). So wurden bei pH 5.1 maximale HDMF-Konzentrationen von 0.096 mg/ml detektiert, während beispielsweise bei pH 4.5 und pH 4.1 maximale Konzentrationen von 0.083 mg/ml bzw. 0.025 mg/ml bestimmt wurden. Das Zellwachstum verzögerte sich mit zunehmendem pH-Wert, wobei letztlich fast identische Zellzahlen erreicht wurden, mit Ausnahme der Probe bei pH 5.5 (Abb. C-3 A). Folglich war bei erhöhten pH-Werten die HDMF-Bildung pro Zelle um bis zu Faktor 4 erhöht, woraus sich eine entscheidende Bedeutung des pH-Wertes des Mediums für die HDMF-Bildung durch *Z. rouxii* ableiten ließ. Im Nährmedium, welches einen pH-Wert von 5.5 aufwies, wurden bereits nennenswerte Mengen an HDMF gebildet, bevor ein messbares Zellwachstum festgestellt werden konnte. Dieser Befund bestätigt erneut die Hypothese, dass Stressbedingungen einen positiven Einfluss auf die HDMF-Bildung pro *Z. rouxii*-Zelle haben.

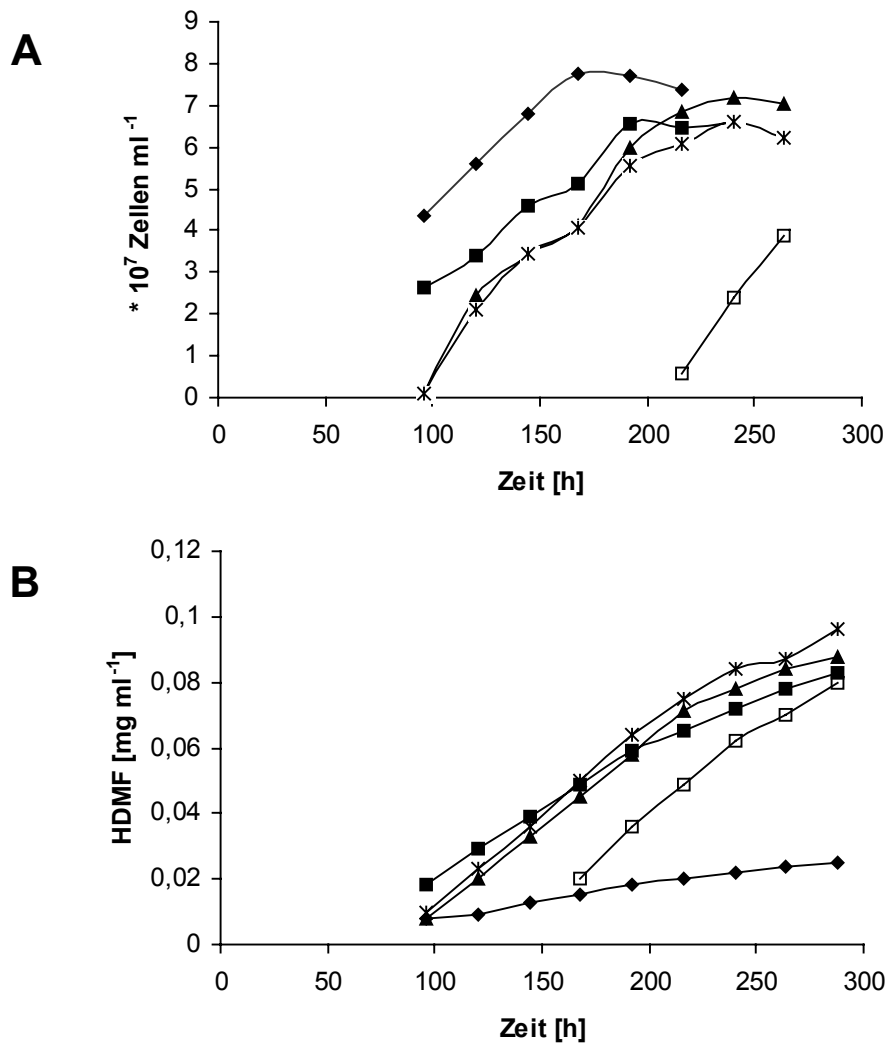


Abb. C-3: Einfluss des pH-Wertes (pH 4.1 ◆, pH 4.5 ■, pH 4.8 ▲, pH 5.1 *, pH 5.5 □) des Nährmediums (YPD-Medium mit 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat) auf:

A: Zellwachstum von *Z. rouxii*;

B: HDMF-Bildung durch *Z. rouxii*.

1.1.3 Einfluss von Glycerin

Z. rouxii verfügt über verschiedene Möglichkeiten, sich an osmotischen Stress anzupassen. Die Fähigkeiten, hohe Gehalte an Glycerin zu produzieren bzw. durch aktiven Transport aufzunehmen und zu akkumulieren, sind besonders hervorzuheben. Der Einfluss der Natriumchloridkonzentration (Abschnitt C 1.1.1) zeigte bereits eine sehr enge Korrelation zwischen dem osmotischen Stress und der HDMF-Bildung. Es stellte sich daher die Frage, ob dem Medium zugesetztes Glycerin einen Einfluss auf die HDMF-Bildung durch *Z. rouxii* in hyperosmotischem Nährmedium zeigt. Dadurch wäre ein direkter Zusammenhang zwischen der Glycerin- und der HDMF-Bildung hergestellt.

YPD-Nährmedien (17 % NaCl), denen 5 % D-Fruktose-1,6-diphosphat und 0 - 5 % Glycerin zugesetzt worden waren, wurden mit *Z. rouxii*-Zellen angeimpft und für mehrere Tage inkubiert. Analog wurde mit einem Ansatz verfahren, dem Glycerin anstelle von D-Glucose als verwertbare Kohlenstoff-Quelle zugesetzt worden war. Die Aufnahme der Wachstumskurven und die Bestimmung der entsprechenden HDMF-Konzentrationen in den Nährmedien zeigten jedoch keinen signifikanten Einfluss des exogen zugesetzten Glycerins. *Z. rouxii* ist somit fähig, auf Glycerin als Kohlenstoffquelle zu wachsen, wodurch die HDMF-Bildung jedoch nicht beeinflusst wird. Eine direkte Korrelation zwischen der Glycerin- und der HDMF-Bildung konnte demnach nicht hergestellt werden.

1.1.4 Einfluss von Xylose

Anstelle von Natriumchlorid wurde in dieser Studie der nichtverwertbare Zucker Xylose einem YPD-Nährmedium mit 1 % D-Glucose und 4.5 % D-Fruktose-1,6-diphosphat zugesetzt. Dadurch sollte der Einfluss der chemischen Beschaffenheit des Stoffes, durch welchen der osmotische Stress hervorgerufen wird, auf das Zellwachstum und die HDMF-Bildung untersucht werden. Der Zusatz von 17 % Xylose (1.1 M) zeigte einen ähnlichen Effekt auf des Zellwachstum wie der Zusatz von 9 % Natriumchlorid (1.5 M). Die HDMF-Bildung korrelierte zwar mit dem Zellwachstum, die maximalen HDMF-Ausbeuten (0.016 mg/ml) waren jedoch deutlich niedriger als die Ausbeuten, die infolge eines Zusatzes von 9 % Natriumchlorid erreicht wurden (0.025 mg/ml). Somit zeigten Xylose und Natriumchlorid ähnliche Einflüsse auf die HDMF-Bildung durch *Z. rouxii*. Trotz vergleichbarer osmotischer Bedingungen war die Produktivität pro Zelle jedoch in natriumchloridhaltigen Medien höher als in xylosehaltigen Medien.

1.2 Metabolismus von isotopenmarkierten HDMF-Vorläufern durch *Z. rouxii*

1.2.1 Metabolismus von 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat

Zur Klärung der Frage, ob extern zugesetztes D-Fructose-1,6-diphosphat lediglich die Bildung von HDMF induziert oder selbst das Kohlenstoffgrundgerüst des Furanons liefert, wurden zwei Nährmedien hergestellt, denen zum einen unmarkiertes D-Fructose-1,6-diphosphat und zum anderen 1-¹³C-markiertes D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt wurde. Die Medien sind mit *Z. rouxii*-Zellen beimpft und bei 30 °C inkubiert worden. Nach 96 Stunden wurden die Nährmedien mit Diethylether extrahiert und die organischen Extrakte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) analysiert. Neben verschiedenen Alkoholen und Säuren konnte HDMF bei 33.7 min detektiert (Abb. C-4) werden.

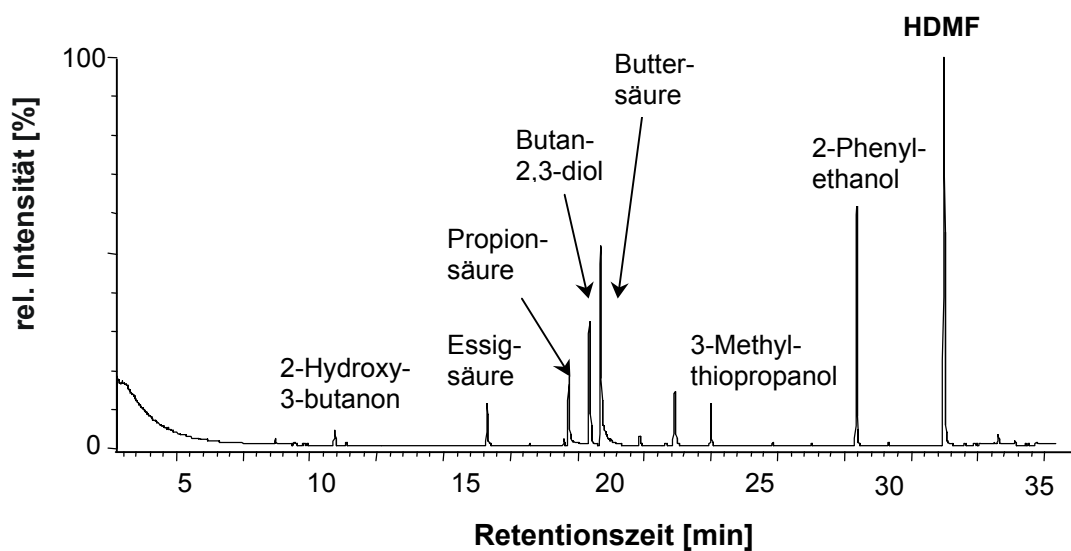


Abb. C-4: HRGC-MS-Analyse der Diethyletherextraktes eines *Z. rouxii*-Fermentationsmediums, dem 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt worden war (Inkubationszeit: 96 Stunden).

Trennsäule: J&W DB-Wax 20M; Detektion: MS; Trägergas: Helium 5.0; Fluss: 1.5 ml/min; GC-MS System 1.

Der Vergleich der Massenspektren von HDMF, gebildet aus unmarkiertem und $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat, ist in Abb. C-5 dargestellt. Massenspektrum B zeigt eindeutig, dass ausschließlich isotopenreines, markiertes HDMF (Molekülion m/z 129) von *Z. rouxii* in Gegenwart von $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Fructose-1,6-diphosphat gebildet wurde. Die Fragmentationenpaare m/z 85, 86, m/z 57, 58 und m/z 43, 44 entstehen aufgrund der unsymmetrischen, einfachen Markierung am C-1-Atom und der in Abschnitt B 1.2.1 vorgestellten Keto-Enol-Tautomerie. Eine Spaltung des Furanons an der O – C-2-(oder O – C-5) und der C-4 – C-5-(oder C-2 – C-3) – Bindung hat die Bildung der einfach markierten Fragmentationen m/z 86, 58 und 44 und der entsprechenden unmarkierten Fragmentationen mit nahezu gleichen Intensitäten zur Folge. Das isotopenreine Fragmentation m/z 73 hingegen wird gebildet durch Spaltung der C-2 – C-3- und der C-4 – C-5 – Bindung des HDMF-Moleküls, weshalb die Markierung an C-1 (oder C-6) immer im Fragmentation lokalisiert ist (Abb. C-5; Fay und Mitarbeiter, 1997).

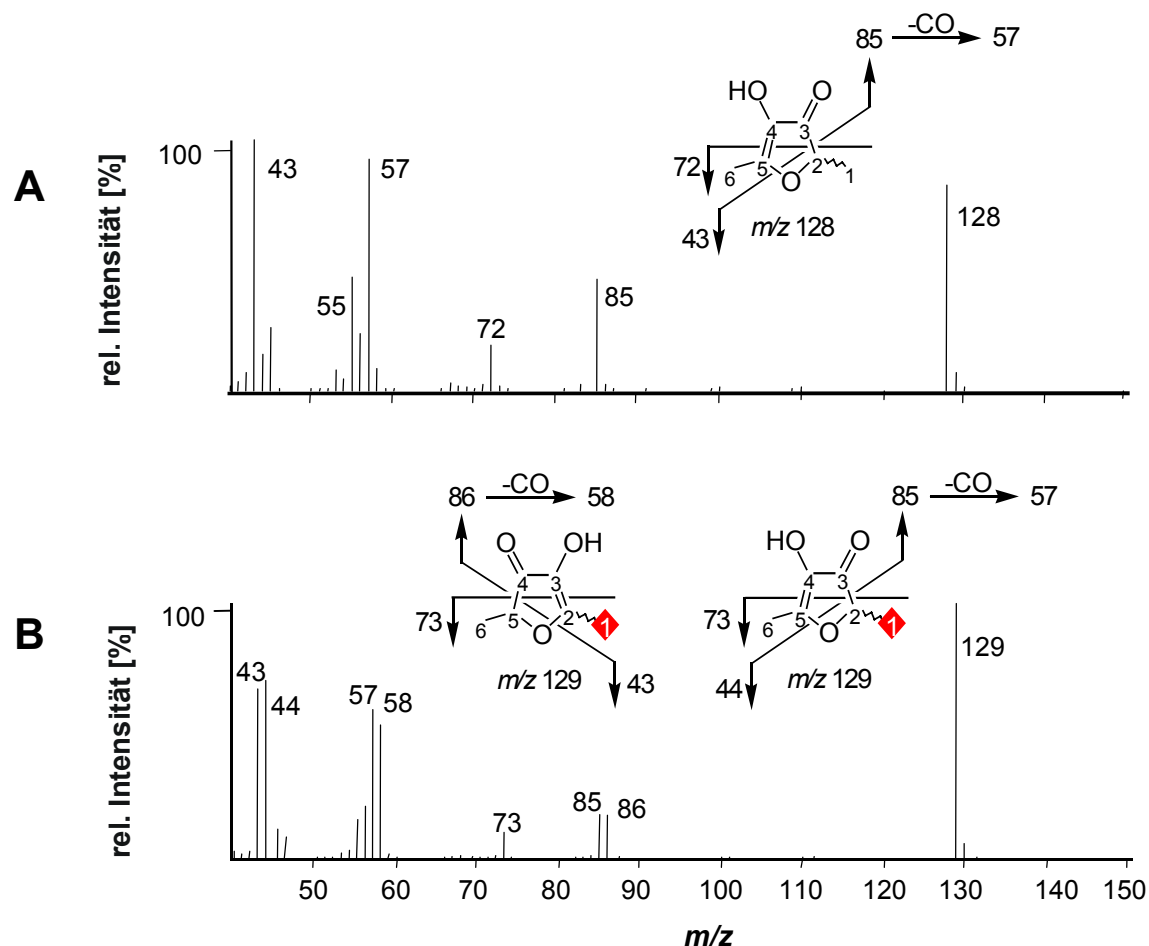


Abb. C-5: EI-Massenspektren von HDMF, gebildet durch *Z. rouxii*;

A: aus unmarkiertem D-Fructose-1,6-diphosphat;

B: aus $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Fructose-1,6-diphosphat.

Ionisation: 70 eV; Scanbereich: m/z 41 – m/z 250; Scandauer: 0.4 s; GC-MS System 1.

1.2.2 Metabolismus von [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat

Zur Identifizierung möglicherweise vorhandener weiterer apolarer Verbindungen, die aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch *Z. rouxii* gebildet werden, wurden einem Nährmedium 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat und 10⁶ dpm [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt. Nach Beimpfung mit *Z. rouxii*-Zellen ist das Medium bei 30 °C inkubiert worden. Nach fünf Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und ein Aliquot des Überstandes mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm analysiert. HDMF eluierte nach ca. 8.5 Minuten (Abb. C-6 A). Der verbleibende Überstand wurde mittels Festphasenextraktion an einer RP18-Kartusche gereinigt und der Extrakt mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm (Abb. C-6 B) und *off-line*-Radiodetektion (Abb. C-6 C) analysiert. Bei dieser Technik wird das HPLC-Eluat in Intervallen von jeweils einer Minute (entspricht 1 mL-Fractionen) aufgesammelt und die Radioaktivität in den einzelnen Fractionen mittels Flüssigszintillationszählung (LSC; liquid scintillation counting) bestimmt. Vor der HPLC-Analyse erfolgte eine Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Extrakt mittels LSC (ca. 800 dpm), die nach der HPLC-Fraktionierung nahezu vollständig in der HDMF-enhaltenden Fraction wieder gefunden wurde. Dieses Resultat bestätigt somit das Ergebnis der Metabolisierung von 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat und veranschaulicht zusätzlich die hohe Selektivität der Transformation des Zuckerphosphates zu HDMF durch *Z. rouxii*.

1.2.3 Metabolismus von ¹³C₆-D-Glucose

Um festzustellen, ob die Kohlenstoffatome der zum Zellwachstum benötigten D-Glucose in die HDMF-Struktur eingebaut werden, wurde ein Nährmedium mit ¹³C₆-markierter D-Glucose und unmarkiertem D-Fructose-1,6-diphosphat mit *Z. rouxii* beimpft. Anschließend wurde analog zu Abschnitt C 1.2.1 die Inkubation und Analyse durchgeführt. Die HRGC-MS-Analyse zeigte, dass ausschließlich unmarkiertes HDMF gebildet wurde. Das Massenspektrum war identisch mit Massenspektrum A in Abb. C-5. Folglich konnte ein Einbau von Kohlenstoff-Atomen der D-Glucose in die HDMF-Struktur ausgeschlossen werden.

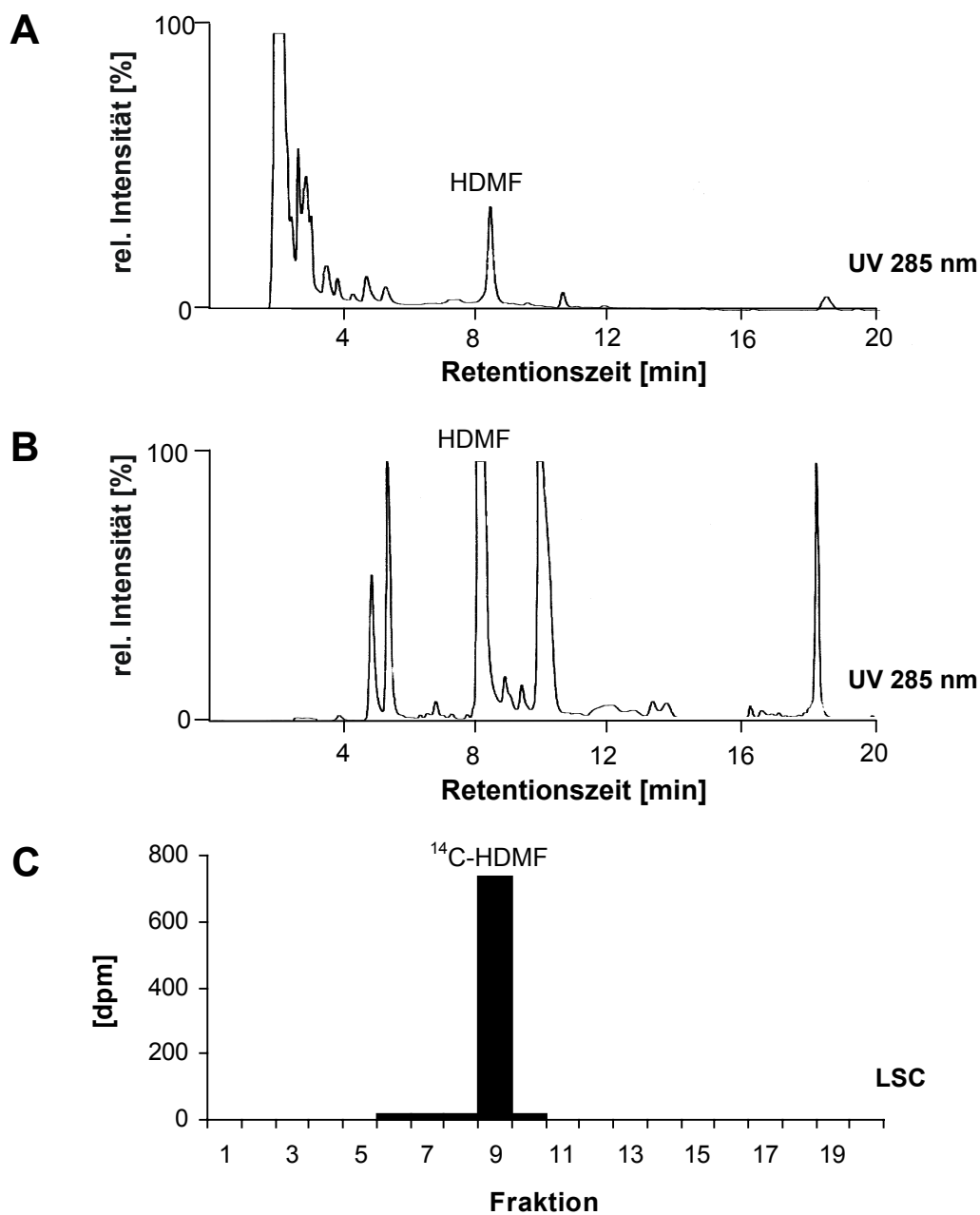


Abb. C-6: RP-18 HPLC-Analyse eines YPD-Mediums, dem 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat und 10^6 dpm [^{14}C]-D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt waren, nach fünftägiger Inkubation mit *Z. rouxii*-Zellen;

A: UV-Chromatogramm des Mediums nach Entfernung der Zellen durch Zentrifugation;

B: UV-Chromatogramm des Mediums nach Entfernung der Zellen durch Zentrifugation und Festphasenextraktion an einer RP18-Kartusche;

C: *off-line* Radiodetektion (LSC) von **B**.

Trennsäule: Eurospher 100 C-18; Detektion: UV 285 nm, *off-line*-Radiodetektion (LSC); Fluss: 1ml/min; Fließmittel: Wasser (0.05 % Ameisensäure)/Acetonitril; HPLC 6.

1.2.4 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Inkubationen mit stabil markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat und stabil markierter D-Glucose zeigen eindeutig, dass ausschließlich exogen zugesetztes D-Fructose-1,6-diphosphat von *Z. rouxii* zu HDMF metabolisiert wird. Da in Gegenwart von $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Fructose-1,6-diphosphat nur isotopenreines einfach markiertes HDMF gebildet wurde, kann ein Austausch zwischen exogen zugesetztem markiertem und intrazellulär vorhandenem unmarkiertem D-Fructose-1,6-diphosphat ausgeschlossen werden. Folglich kann D-Fructose-1,6-diphosphat nicht unverändert in die Hefezelle aufgenommen werden, da dies zu einer Verdünnung des markierten mit intrazellulärem unmarkiertem D-Fructose-1,6-diphosphat und somit zur Bildung eines gewissen Anteils an unmarkiertem HDMF führen würde. Auch eine initiierende Spaltung von D-Fructose-1,6-diphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (Aldolase-Reaktion) kann somit ausgeschlossen werden. Eine HDMF-Bildung infolge eines Zusammenschlusses von zwei C3-Einheiten würde ebenfalls zu einem Austausch mit unmarkierten intrazellulären C3-Metaboliten der Hefe führen.

Des Weiteren wurden bislang keine Transportsysteme für die Aufnahme von Zuckerphosphaten in Hefen beschrieben, ein weiteres Indiz dafür, dass D-Fructose-1,6-diphosphat nicht unverändert in die Hefezellen aufgenommen werden kann. Demzufolge müsste mindestens der erste Metabolisierungsschritt von extrazellulärem D-Fructose-1,6-diphosphat außerhalb des Cytosols der Hefezelle, d. h. in der Zellwand, der Lipidmembran oder im Nährmedium stattfinden.

Die Inkubation mit radioaktiv markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat zeigte zusätzlich die hohe Selektivität der Transformation des exogen zugesetzten Vorläufers zu HDMF durch die Hefe.

1.3 Analyse der HDMF-Enantiomere

1.3.1 Einführung

Natürliche chirale Aromastoffe zeigen charakteristische Enantiomerenverhältnisse, wobei in der Regel aufgrund einer stereoselektiven, enzymkatalysierten Biosynthese ein Enantiomer im Überschuss vorliegt. HDMF verfügt über ein asymmetrisches Kohlenstoffatom an C-2 bzw. C-5 und ist somit als chirale Verbindung zu betrachten (Abb. B-4). Frühere Studien beschäftigten sich bereits sehr intensiv mit der Enantiomerenanalytik von natürlichem, aus verschiedenen Früchten extrahiertem HDMF, wobei jedoch ausschließlich racemisches HDMF gefunden wurde (Bruche und Mitarbeiter, 1991). Dennoch kann eine stereoselektive Biosynthese von HDMF nicht ausgeschlossen werden, da HDMF aufgrund seiner Enol-Oxo-Struktur einer Keto-Enol-Tautomerie unterliegt, wodurch diese Stereoinformation verloren geht (Bruche und Mitarbeiter, 1991). Mosandl und Mitarbeitern gelang 1990 erstmals die Trennung der beiden HDMF-Enantiomere mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC). Hierbei kamen eine derivatisierte Cyclodextrinphase als Hauptsäule und eine achirale Vorsäule zum Einsatz, die durch ein sog. „Live-T-Stück“ miteinander gekoppelt waren. Während der gaschromatographischen Analyse trat jedoch eine Racemisierung von enantiomerenangereichertem HDMF ein, was die Autoren auf eine Racemisierung im „Live-T-Stück“ infolge der hohen Temperaturen und der Verwendung von Wasserstoff als Trägergas zurückführten (Bruche und Mitarbeiter, 1991). Die gleiche Beobachtung wurde beim Einsatz der MDGC gemacht, wobei Vor- und Hauptsäule über das sog. „moving column switching system“ (MCSS) miteinander gekoppelt waren. Daraus wurde eine bereits im Injektor des Gaschromatographen stattfindende Racemisierung des Moleküls abgeleitet (Raab und Mitarbeiter, 2003a). Gaschromatographische Methoden sind daher für die enantioselektive Analyse von HDMF nicht uneingeschränkt geeignet.

Eine schonendere Methode stellt die von Mosandl und Mitarbeitern (1990) vorgestellte Trennung mittels Chiralphasen-HPLC an einer Chiraspher NT[®]-Säule dar. Bei diesem Säulenmaterial handelt es sich um einen Poly-(*N*-Acryloyl-L-phenylalaninethylester) gebunden an Silicagel-Partikel (Abb. C-7). Die Enantiomerentrennung beruht in erster Linie auf der Ausbildung unterschiedlich stabiler Einschlussverbindungen der Enantiomere in den asymmetrischen Hohlräumen des vernetzten Polymers. Eine Racemisierung während der Analyse wurde nicht beobachtet (Raab und Mitarbeiter, 2003a). Jedoch konnte mittels dieser Methode keine Basislinientrennung der beiden HDMF-Enantiomere erreicht werden, weshalb ihre Anwendung keine genauen Aussagen über das Enantiomerenverhältnis zulässt (Abb. C-13 A).

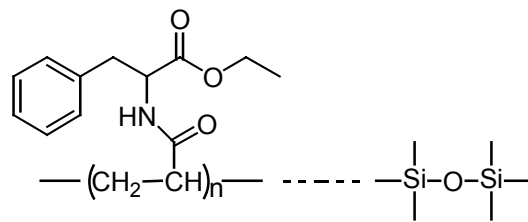
Poly-(*N*-Acryloyl-L-phenylalaninethylester)

Abb. C-7: Struktur des Säulenmaterials einer Chiraspher NT[®] HPLC-Säule: Poly-(*N*-Acryloyl-L-phenylalaninethylester), gebunden an Silicagel Partikel.

1.3.2 Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

Weitreichende Kenntnisse bezüglich der Racemisierungsgeschwindigkeit des HDMF-Moleküls stellen eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Methoden zur Analyse der natürlichen Verteilung der HDMF-Enantiomere dar. Mit Hilfe von NMR-Untersuchungen sollte die Racemisierungsgeschwindigkeit des HDMF-Moleküls in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums bestimmt werden. Dies wurde durch Messung des Austausches des am C-2 des Furanonrings gebundenen Protons gegen Deuteronen aus dem Medium (²H₂O) mittels ¹H-NMR-Spektroskopie realisiert (Abb. C-8). Der Austausch führt zu einer Verminderung der Signalintensität des Quartetts bei 4.7 ppm.

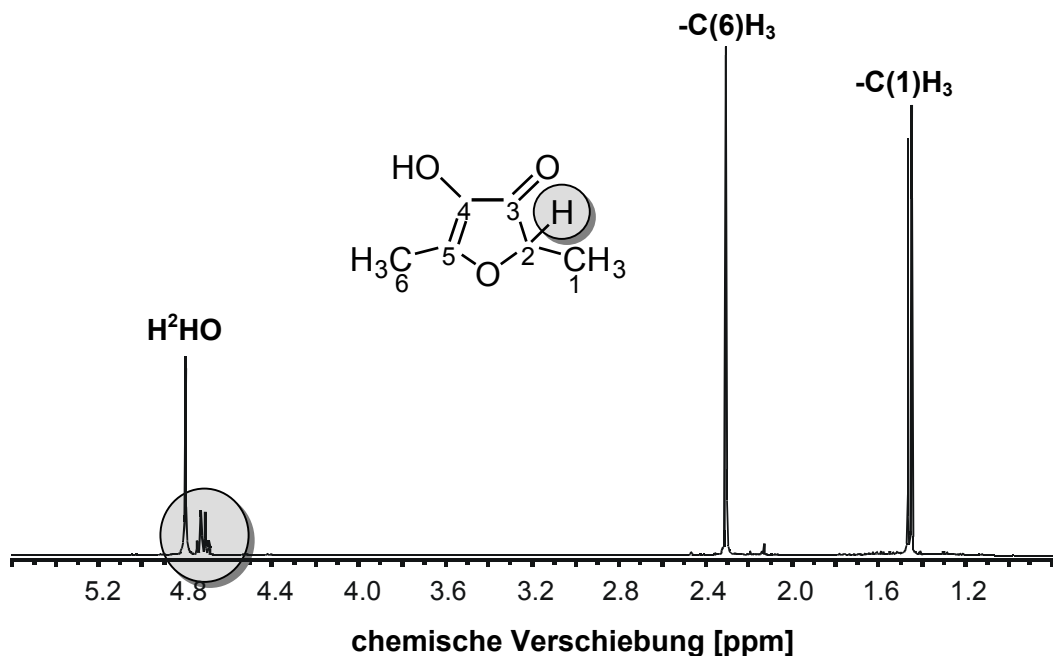


Abb. C-8: ¹H-NMR-Spektrum einer kommerziellen HDMF-Referenz, gelöst in ²H₂O (pH 2.1); aufgenommen nach 20 min.

Kommerziell erhältliches HDMF wurde in $^2\text{H}_2\text{O}$ bzw. in $^2\text{H}_2\text{O}$ -haltigen Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte gelöst und bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren erfolgte unmittelbar nach dem Lösen des Furanons sowie nach 24, 50 und 72 Stunden. Die Fläche des an C-2 gebundenen Protons wurde durch Integration bestimmt, wobei das Signal der Methylprotonen an C-6 (Singulet bei 2.31 ppm) als interner Standard diente (Abb. C-8). Der zeitabhängige Austausch des C-2-Protons bei unterschiedlichen pH-Werten ist in Abb. C-9 dargestellt. Im neutralen Milieu fand ein vollständiger Austausch des C-2 Protons binnen 24 Stunden statt, wohingegen bei pH 5.0 und pH 2.1 Abnahmen der Signalintensitäten von nur 10 % bzw. 35 % beobachtet wurden. Nach 72 Stunden waren bei pH 5.0 nur 25 % der C-2-Protonen durch Deuterone ersetzt. Dies beweist eine deutlich langsamer ablaufende Keto-Enol-Tautomerie des HDMF-Moleküls im sauren Milieu verglichen mit neutralem Milieu. Im schwach sauren pH-Bereich erreichte die Geschwindigkeit der Keto-Enol-Tautomerie ein Minimum. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten von Capon und Kwok (1984). Bei ihren Untersuchungen zur pH-Wert-Abhängigkeit der Ketonisierung von 3-Hydroxyfuran beobachteten sie im Bereich von pH 3.5 – pH 5.5 eine maximale Stabilität der Ketoform. Für eine präzisere Abschätzung der Geschwindigkeit der Keto-Enol-Tautomerie im neutralen Milieu wurde der Versuch bei pH 7.0 wiederholt, wobei die Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren in 20- bis 25-Minuten-Intervallen erfolgte. Aus Abb. C-10 ist ersichtlich, dass innerhalb von 100 Minuten über 70 % der C-2-Protonen ausgetauscht wurden. Der Austausch von ca. 30 – 40 % der C-2-Protonen innerhalb von 30 Minuten erklärt den zum Zeitpunkt null in der vorherigen Studie gemessenen Wert bei pH 7.0 (Fläche: 0.69), der ca. 30 Minuten nach dem Lösen von HDMF aufgenommen wurde. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schlussfolgern, dass die Keto-Enol-Tautomerie im leicht sauren Milieu ausreichend langsam abläuft, um eine Enantiomerenanreicherung im HDMF-Molekül mittels geeigneter Enantiomerenanalytik nachweisen zu können. Im neutralen Milieu hingegen unterliegt das Molekül einer schnellen Keto-Enol-Tautomerie, wodurch die Stereoinformation verloren geht.

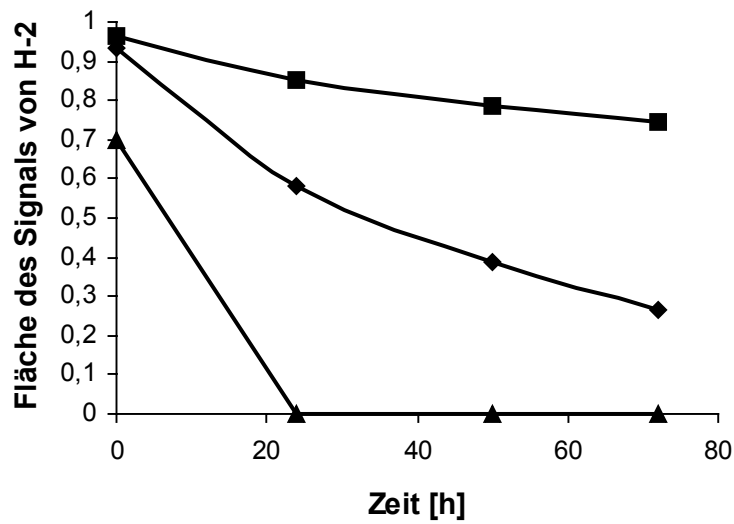


Abb. C-9: Zeitabhängiger Austausch des H-2 Protons von HDMF, gelöst in $^2\text{H}_2\text{O}$ bei pH 2.1 ◆, pH 5.0 ■ und pH 7.0 ▲.

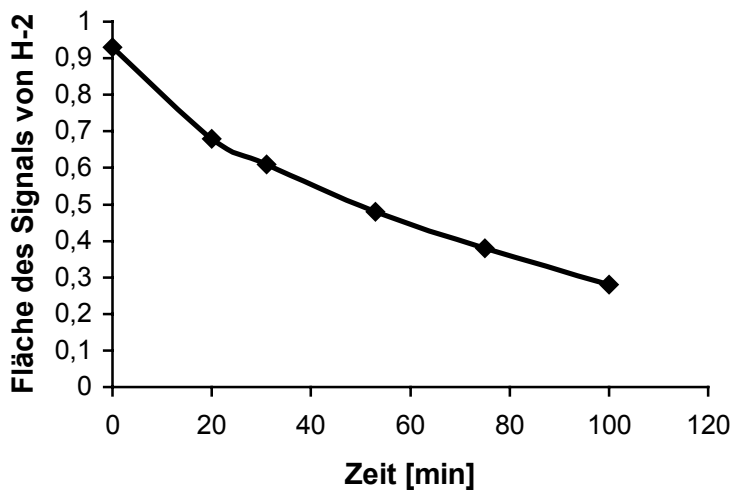


Abb. C-10: Zeitabhängiger Austausch des H-2 Protons von HDMF, gelöst in $^2\text{H}_2\text{O}$ bei pH 7.2.

1.3.3 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von HDMF mittels Chiralphasen-Kapillaronenelektrophorese (cKZE)

Neben den bereits erwähnten Methoden MDGC und Chiralphasen-HPLC stellt die Chiralphasen-Kapillaronenelektrophorese (cKZE) eine weitere ausgezeichnete und vielseitige Methode zur Enantiomerentrennung zahlreicher chiraler Analyte dar. Die cKZE zeichnet sich in erster Linie durch hohes Auflösungsvermögen und eine hohe Effizienz aus. Des Weiteren seien Vorteile wie Flexibilität, Robustheit, Umweltfreundlichkeit, kleine Probenvolumina und kurze Analysenzeiten erwähnt (Christians, 2001). Einen derzeitigen Überblick bezüglich der Applikation dieser sehr weit verbreiteten Methode gibt Amini (2001). Einsatz findet die cKZE vor allem bei der Enantiomerenanalytik von Pharmazeutika. Eine Trennung von chiralen Furanonen wurde bislang nicht beschrieben.

1.3.3.1 Grundlagen der cKZE

Aufbau und Trennprinzip

Das Trennprinzip der Kapillaronenelektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld, wobei die Ladung der Teilchen die Migrationsrichtung vorgibt. Anwendung finden heute üblicherweise Fused-Silica-Kapillaren, die Innendurchmesser von 10 – 100 μm aufweisen. Die Kapillare wird mit einer Pufferlösung gefüllt, und ihre Enden werden in je ein Reservoir mit der gleichen Pufferlösung eingetaucht. Innerhalb der Reservoirs befinden sich Platinelektroden, die über eine Hochspannungsquelle miteinander verbunden sind (Abb. C-11). Durch Anlegen einer Spannung von bis zu 30 kV ergibt sich je nach Länge der Kapillare (25 bis 75 cm) ein unterschiedlich starkes elektrisches Feld. Die entstehende Joulesche Wärme kann aufgrund des günstigen Volumen-Oberflächen-Verhältnisses der Kapillaren effektiv abgeleitet werden (Christians, 2001).

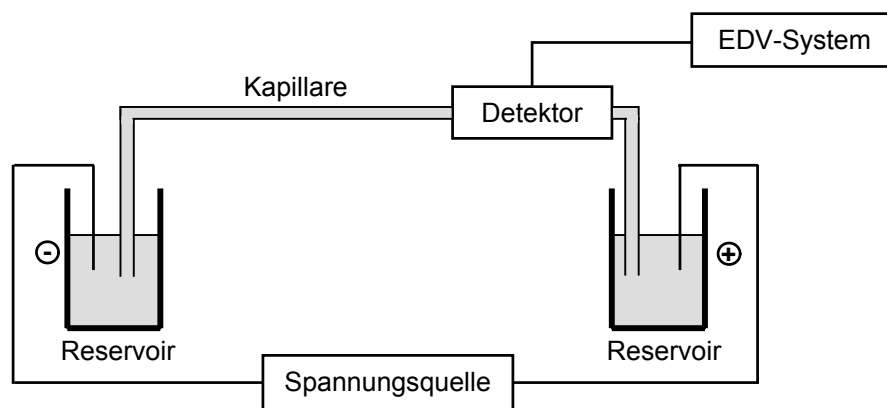


Abb. C-11: Schematischer Aufbau eines Kapillarzonenelektrophorese-Gerätes (Christians, 2001).

Zur Trennung von Enantiomeren wird eine geringe Menge an chiralem Selektor in der Pufferlösung gelöst. Während der Analyse tritt dieser selektiv mit den optischen Isomeren des Analyts in Wechselwirkung. Es kommt zur Ausbildung von reversiblen, labilen, diastereomeren Komplexen, die wiederum aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilitäten voneinander getrennt werden können (Copper und Mitarbeiter, 1995). Des Weiteren spielen unterschiedliche Komplexbildungskonstanten der Enantiomere mit den Cyclodextrinen eine entscheidende Rolle bei der Enantiomerentrennung (Chankvetadze und Mitarbeiter, 1999). Als chirale Selektoren finden in der cKZE neben Metallkomplexen, Kronenethern und Proteinen vor allem verschiedene Typen nativer und derivatisierter Cyclodextrine Anwendung (Terabe und Mitarbeiter, 1994).

Einsatz von Cyclodextrinen als chirale Selektoren

Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, die aus α -(1,4)-glycosidisch verknüpften D-Glucosemolekülen aufgebaut sind. Sie werden erhalten durch Einwirkung von Cyclodextringlycosyltransferasen von *Bacillus macerans* auf Stärke. Dabei entstehen in erster Linie aus sechs, sieben oder acht Glucopyranosemolekülen aufgebaute Cyclodextrine die als α , β und γ -Cyclodextrine bezeichnet werden.

Cyclodextrine wurden in der Kapillarzonenelektrophorese erfolgreich zur Trennung einer Vielzahl von optisch aktiven Analyten eingesetzt. Sie besitzen die Eigenschaft, mit dem Analyten Komplexe in Form von Einschlussverbindungen zu bilden, die durch sekundäre Wechselwirkungen, wie z. B. Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte, stabilisiert werden (Szejtli, 1988). Für die Trennung von neutralen chiralen Analyten, die im elektrischen Feld keine eigene elektrophoretische Mobilität besitzen, hat sich der Einsatz von negativ geladenen Cyclodextrinen (sulfatierte und carboxylierte Cyclodextrine) bewährt. Das anionische Cyclodextrin wandert im elektrischen Feld zur Anode und transportiert infolge von Einschlussverbindungen den Analyten in die gleiche

Richtung. Aufgrund von unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten werden die Enantiomere getrennt (Christians, 2001).

1.3.3.2 Analyse einer HDMF-Referenz mittels cKZE

Die Analyse wurde unter Verwendung einer Fused-Silica-Kapillare (30/40.2 cm, i.D. 50 μm) durchgeführt. Als Puffer diente eine 50 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 4), der 20 mM Heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD) zugesetzt waren. Die Probenlösung wurde mit Druck injiziert (hydrodynamische Injektion) und die Trennung erfolgte bei 25 $^{\circ}\text{C}$ unter Anlegung einer Spannung von 10 kV. HDMF wurde photometrisch (UV-VIS) bei 280 nm detektiert. Mittels der beschriebenen Methode eluierten die HDMF-Enantiomere innerhalb von 20 Minuten basisliniengetrennt mit einer Enantiomerenauflösung von $R_s = 7.8$ (Abb. C-14 A).

R_s -Werte werden allgemein nach folgender Formel berechnet:

$$R_s = 2 * \frac{t_{m2} - t_{m1}}{w_1 + w_2} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} t_m = \text{Retentionszeit [min]} \\ w = \text{Breite des Signals an der Basis [min]} \end{array}$$

Nach Raab und Mitarbeitern (2003a) wurde das zuerst eluierende Enantiomer dem (-)-HDMF-Enantiomer zugeordnet. Durch Untersuchung der mittels chiraler HPLC isolierten HDMF-Enantiomere konnte eine Racemisierung des Moleküls während der cKZE-Analyse ausgeschlossen werden. Studien zur Racemisierung infolge einer Keto-Enol-Tautomerie in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums bestätigten die Ergebnisse der NMR-Studien in Abschnitt C 1.3.2 (Raab und Mitarbeiter, 2003b).

1.3.4 Enantiomerenanalytik von durch *Z. rouxii* gebildetem HDMF

Die bisher dargestellten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass mindestens ein Reaktionsschritt der biokatalytischen Bildung von HDMF durch Enzymsysteme der Hefe *Z. rouxii* katalysiert wird. Es lag daher die Annahme nahe, dass die Reduktion, die formal stattfinden muss, diesen Reaktionsschritt darstellt. Stereoselektive durch Hefen vermittelte Reduktionen sind sehr gut untersucht und in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengefasst (Csuk und Glänzer, 1991; D'Arrigo und Mitarbeiter, 1997; Stewart, 2000). Oxidoreduktasen aus Hefen zeigen zum Teil sehr breite Substratspezifität und sehr hohe Enantioselektivität (Tadashi und Mitarbeiter, 1998 und 2001). Costello und Mitarbeiter (2000) isolierten und charakterisierten eine Ketoreduktase aus cytosolischen Proteinextrakten von *Z. rouxii*, die Methylketone, α -Ketolactone und Dicarbonylverbindungen effektiv und mit hoher Enantioselektivität zu den entsprechenden Alkoholen reduzierte. Als Substrate wurden unter anderem Dihydro-4,4-dimethylfuranon, 1-(S)-(+)-Camphorquinon und 3,4-Methylenedioxyphenylacetone akzeptiert. Dabei handelt es sich um Verbindungen, die gewisse strukturelle Homologien zu HDMF bzw. seinem postulierten Vorläufer Acetylformoin zeigen, wie z. B. Furanstruktur, α -Dicarbonyl-Struktur oder Methylketon-Struktur (Abb. C-12). Wir vermuteten deshalb die Bildung von enantiomerenangereichertem HDMF durch die Hefe *Z. rouxii*.

Des Weiteren weist das Nährmedium einen pH-Wert von ca. pH 4 auf, was aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt C 1.3.2 eine Grundvoraussetzung für den Nachweis einer Enantiomerenanreicherung im HDMF-Molekül darstellt.

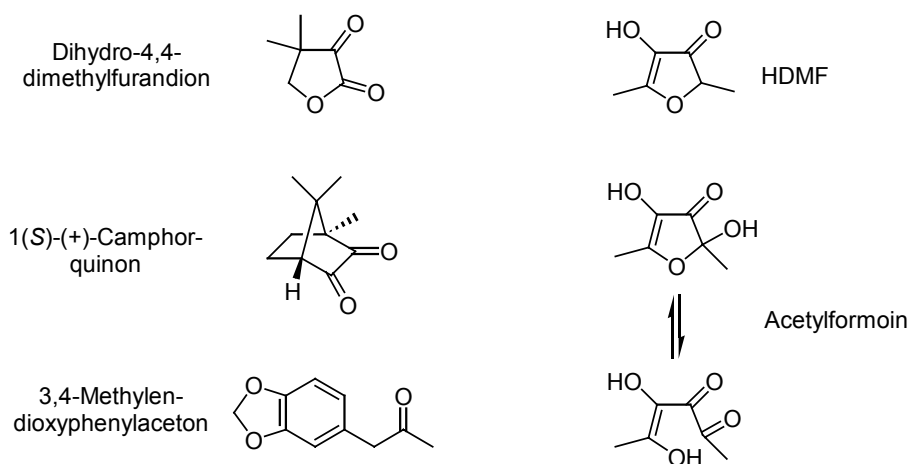


Abb. C-12: Strukturformeln von Substraten einer aus *Z. rouxii* isolierten Ketoreduktase (Costello und Mitarbeiter, 2000) im Vergleich mit den Strukturformeln von HDMF und zwei isomeren Formen von Acetylformoin.

1.3.4.1 Analyse mittels Chiralphasen-HPLC

Für die Enantiomerenanalytik des durch *Z. rouxii* gebildeten HDMF mittels Chiralphasen-HPLC wurde YPD-Medium, dem D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt worden war, mit *Z. rouxii*-Zellen beimpft. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen konnte mittels RP-HPLC-UV die HDMF-Konzentration im Nährmedium ermittelt werden (ca. 0.015 mg/ml). Ein Aliquot wurde entnommen und mit Diethylether extrahiert. Nach Einkonzentrierung des Diethyletherextraktes sind die Proben mit n-Pentan rückverdünnt worden, da sich hohe Diethyletherkonzentrationen in den Proben negativ auf die angewendete chromatographische Trennung der HDMF-Enantiomere auswirkten. Die Proben wurden mittels der von Mosandl und Mitabeyern (1990) beschriebenen Methode an einer Chiraspher NT[®]-Phase mit UV-Detektion bei 285 nm analysiert (Abb. C-13). Offensichtlich bilden die Hefen enantiomerenangereichertes HDMF. Das genaue Enantiomerenverhältnis konnte jedoch aufgrund der mangelhaften Trennung der beiden Enantiomere nicht bestimmt werden.

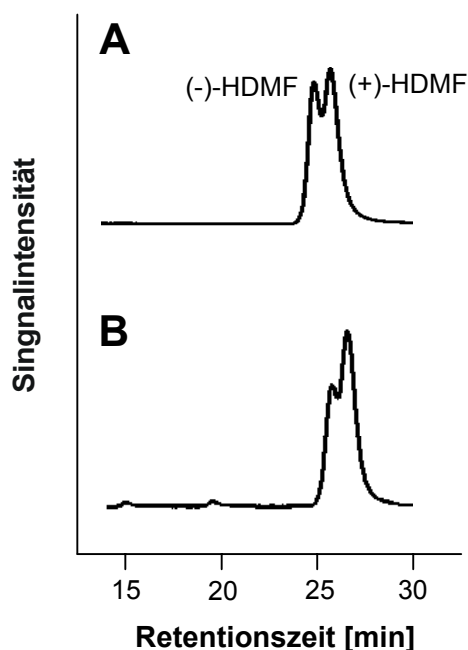


Abb. C-13: Chiralphasen-HPLC-Analyse von HDMF an Chiraspher NT[®] mit UV-Detektion bei 285 nm;

A: kommerzielle racemische HDMF-Referenz;

B: HDMF gebildet aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch *Z. rouxii*.

Trennsäule: Chiraspher NT[®]; Detektion: UV 285 nm; Fluss: 0.8 ml/min; Fließmittel: n-Pentan/Diethylether; HPLC 5.

1.3.4.2 Analyse mittels cKZE

Das exakte Enantiomerenverhältnis konnte durch Anwendung der unter Abschnitt C 1.3.3.2 beschriebenen neu entwickelten Methode mittels cKZE bestimmt werden.

Enantiomerenüberschüsse (*ee*-Werte; *enantiomeric excess*) werden allgemein berechnet nach folgender Formel (Schurig und Weber, 1983):

$$ee = \frac{n(R) - n(S)}{n(R) + n(S)} * 100 \quad \text{für } n(R) > n(S) \quad n = \text{Stoffmenge [Mol]}$$

Werden zur Trennung der Enantiomere wie im gegebenen Fall chromatographische Methoden angewandt, können zur Berechnung anstelle der Stoffmenge *n* die Flächen unter den getrennten Enantiomerenpeaks herangezogen werden.

Analog zu Abschnitt C 1.3.4.1 wurden *Z. rouxii*-Zellen in mehreren Inkubationansätzen angezüchtet. Nach vier, fünf, sechs und sieben Tagen sind die Zellen je eines Inkubationsansatzes abzentrifugiert, die HDMF-Konzentrationen mittels RP-HPLC-UV bestimmt und die verbleibenden Überstände mit Diethylether extrahiert worden. Zur Vermeidung einer schnellen Racemisierung des Moleküls in der Probenlösung wurde extrahiertes HDMF in einen 0.1 molaren Ammoniumacetat-Puffer (pH 4) transferiert und anschließend sofort mittels cKZE analysiert (Abb. C-14 B). Die Basislinientrennung der HDMF-Enantiomere ermöglichte eine exakte Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse, die in Abhängigkeit von der Zeit in Abb. C-15 graphisch dargestellt sind. Sie lagen maximal im Bereich von 27 % *ee*, wobei das (+)-Enantiomer angereichert vorlag (Raab und Mitarbeiter, 2003a). Trotz steigender HDMF-Konzentrationen nahm der Enantiomerenüberschuss innerhalb des Zeitraumes von 4 bis 7 Tagen konstant ab. Da das Medium einen pH-Wert von ca. 4 aufwies, war eine schnelle Racemisierung im Nährmedium weitgehend auszuschließen. Es scheint, dass die steigende Zelldichte im Nährmedium die Racemisierung zur Folge hat. Es wird deshalb angenommen, dass HDMF durch passive Diffusion, ähnlich wie es auch für Glycerin beschrieben ist (Prior und Hohmann, 1997), in die Hefezellen eindringen kann, wo die Moleküle aufgrund der dort vorherrschenden pH-Bedingungen (ca. pH 7.2 nach Vindelov und Arneborg, 2002) einer raschen Keto-Enol-Tautomerie unterliegen.

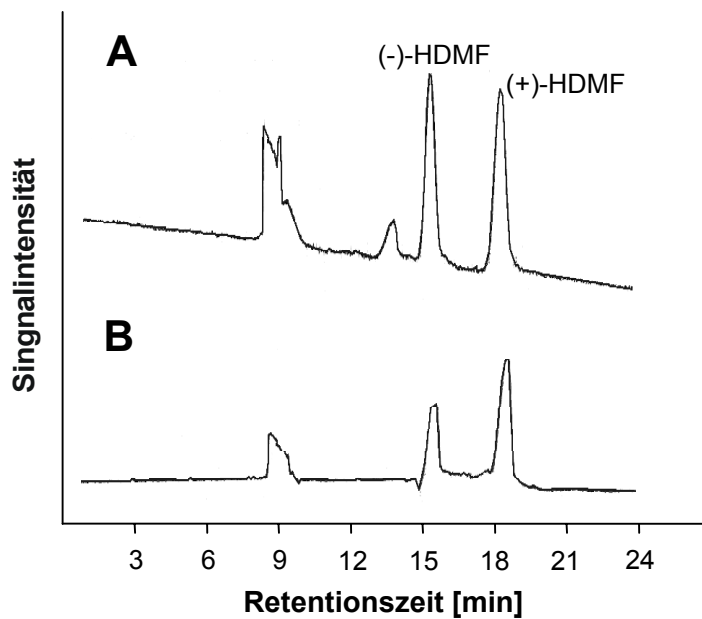


Abb. C-14: Chiralphasen-KZE-Analyse von HDMF mit UV-Detektion bei 280 nm;
A: kommerzielle racemische HDMF-Referenz;
B: HDMF gebildet aus D-Fruktose-1,6-diphosphat durch *Z. rouxii*.
 Kapillare: Fused-Silica-Kapillare; Spannung: 10 kV; Puffer: 50 mM Ammoniumacetat (pH 4), 20 mM Heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin.

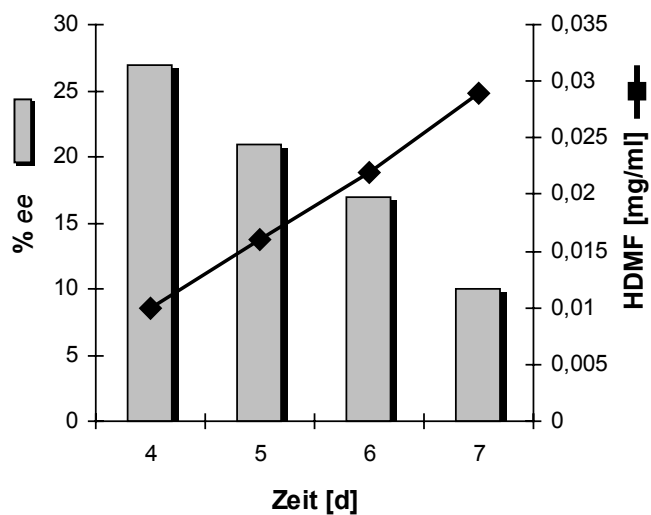


Abb. C-15: Zeitabhängigkeit des *ee*-Wertes von (+)-HDMF, gebildet durch *Z. rouxii*, und die entsprechenden mittels HPLC-UV ermittelten HDMF-Konzentrationen (D 3.4.11).

1.3.5 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine Methode mittels Chiralphasen-Kapillarelektrophorese entwickelt werden, mit der sich die HDMF-Enantiomere mit sehr hoher Auflösung trennen ließen. Weitere Vorteile der neu entwickelten Methode sind die geringen benötigten Probenvolumen, die einfache Probenvorbereitung und die kurzen Analysenzeiten. Eine Racemisierung während der Analyse, wie sie im Falle der gaschromatographischen Analyse an chiralen Phasen auftritt, wurde nicht beobachtet.

Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass das Hydroxyfuranon im neutralen Milieu einer sehr schnellen Keto-Enol-Tautomerie unterliegt, wodurch jegliche Stereoinformation verloren geht. Im schwach sauren bis sauren Milieu wurde hingegen eine nur sehr langsam ablaufende Keto-Enol-Tautomerie beobachtet. Die Einstellung des Keto-Enol-Gleichgewichts wird allgemein sowohl durch Säuren als auch durch Basen katalysiert. Da im HDMF-Molekül jedoch elektronenanziehende Substituenten in α -Stellung zur Carbonylfunktion stehen (Hydroxylfunktion an C-4 und der Sauerstoff im Furanonring), ist die Basizität der Carbonylfunktion und damit auch die katalytische Beschleunigung der Keto-Enol-Tautomerie durch Säuren deutlich herabgesetzt. Die Abgabe des α -Protons (H-2) ist andererseits dadurch im Basischen deutlich erleichtert, was eine beschleunigte basenkatalysierte Keto-Enol-Tautomerie zur Folge hat (Christen, 1977). Grundvoraussetzung für den Nachweis einer Enantiomerenanreicherung ist demzufolge ein schwach-saurer bis saurer pH-Wert des Mediums, was angesichts des normalen pH-Wertes des verwendeten Hefenährmediums von ca. pH 4 im gegebenen Fall kein Problem darstellte. Da bei der angewendeten cKZE-Methode ein Puffer verwendet wurde, der einen pH-Wert von 4 aufwies, konnte eine Racemisierung während der Analyse ebenfalls ausgeschlossen werden.

Für durch *Z. rouxii* gebildetes (+)-HDMF konnte ein Enantiomerenüberschuss von bis zu 27 % *ee* nachgewiesen werden. Dennoch wies der in Abb. C-15 dargestellte relativ schnelle Verlust der Stereoinformation des HDMF-Moleküls auf eine sehr hohe Sensitivität der Enantiomerenanreicherung hin. Demnach scheint schon eine kurze Verweildauer des Moleküls in den Hefezellen, z. B. nach intrazellulärer Bildung oder Aufnahme durch passive Diffusion aufgrund der dort vorherrschenden pH-Bedingungen (ca. pH 7.2 nach Vindelov und Arneborg, 2002), sich drastisch auf das Enantiomerenverhältnis auszuwirken. Raab und Mitarbeiter (2003a) detektierten in Erdbeeren ausschließlich racemisches HDMF unter Verwendung der neu entwickelten cKZE-Methode. Dies könnte auf eine Bildung bzw. Speicherung des Moleküls im Cytosol der Erdbeer-Zellen hinweisen.

Diese Arbeiten belegen zum ersten Mal das natürliche Vorkommen von enantiomerenangereichertem (+)-HDMF. Die enantioselektive Biosynthese und somit die Beteiligung einer enzym-katalysierten Reaktion an der Transformation von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF durch *Z. rouxii* wurde durch diese Ergebnisse eindeutig bewiesen. Durch die neu entwickelte, verbesserte Analysenmethode mittels cKZE und die gesammelten

Informationen bezüglich der Racemisierung des Moleküls wurden im Hinblick auf weitere Studien wichtige Grundlagen geschaffen.

2 Untersuchungen zur Bildung von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen in Rohproteinextrakten aus *Z. rouxii*

Der folgende Abschnitt der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Gewinnung von Rohproteinextrakten aus *Z. rouxii* sowie der Inkubation dieser Extrakte mit D-Fructose-1,6-diphosphat und der Analytik daraus gebildeter Produkte. Ziel war es, die anhand von verschiedenen Studien charakterisierte HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch intakte *Z. rouxii*-Zellen auf Rohproteinextrakte zu übertragen. Um eine maßgebliche Beteiligung von Enzymen eines bestimmten Kompartiments der Hefezelle zu ermitteln, sollten die Proteine verschiedener Kompartimente mittels gängiger Methoden voneinander getrennt und einzeln untersucht werden.

2.1 Gewinnung von Rohproteinextrakten aus Hefen

2.1.1 Aufbau einer Hefezelle

Eine Hefezelle lässt sich schematisch in drei Substrukturen untergliedern (Abb. C-16): das Cytosol, die Cytoplasmamembran und die Zellwand. Jedes dieser Teile verfügt über Proteine, die bestimmte enzymatische Funktionalitäten aufweisen.

Das **Cytosol** von Hefezellen ist eine wässrige Flüssigkeit, in der die intrazellulären Organellen der Zelle (z.B. Zellkern, Ribosomen, Vakuole, etc.) eingelagert sind. In ihr gelöst sind Verbindungen niedrigen und mittleren Molekulargewichts, Proteine, Glycogen und andere lösliche Makromoleküle. Die cytosolischen Enzyme umfassen glycolytische Enzyme, den Fettsäuresynthetase-Komplex und die Enzyme der Proteinbiosynthese (Walker, 1998).

Die **Cytoplasmamembran** besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in die Proteine ein- bzw. an ihr angelagert sind (integrale Membranproteine bzw. periphere Membranproteine) (Abb. C-16). Die wichtigste Funktion der Cytoplasmamembran ist der regulierte Transport von Substraten in die Zelle bzw. aus der Zelle heraus. Die Klasse der Membranproteine beinhaltet in erster Linie Transportproteine, Proteine der Zellwandbiosynthese, Proteine der transmembranen Signaltransduktion und Proteine, über die das Cytoskelett (Mikrotubuli und Mikrofilamente) verankert ist (Walker, 1998). Hierbei ist anzumerken, dass bislang in Hefen die Existenz von Hexosephosphat-Transport-Systemen nicht beschrieben wurde. Derartige Transporter wären für eine Aufnahme des intakten D-Fructose-1,6-diphosphat-Moleküls in die Zelle unbedingt erforderlich.

Die **Zellwand** von Hefezellen beträgt ca. 15 – 25 % der Trockenmasse der Zelle und stellt das bekannteste Unterscheidungsmerkmal aller Hefen dar (Walker, 1998). Sie ist aus den in Abb. C-16 aufgelisteten Bestandteilen aufgebaut und dient im Wesentlichen dem Schutz der Zelle vor externem Stress (Lipke und Ovalle, 1998; Edwards und Mitarbeiter, 1999). Bemerkenswerterweise wurden auch in Zellwänden von Hefen glycolytische Enzyme nachgewiesen, wie z. B. Enolase (Edwards und Mitarbeiter, 1999), 3-Phosphoglyceratkinase (Alluosh und Mitarbeiter, 1997) und Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Chaffin und Mitarbeiter, 1998).

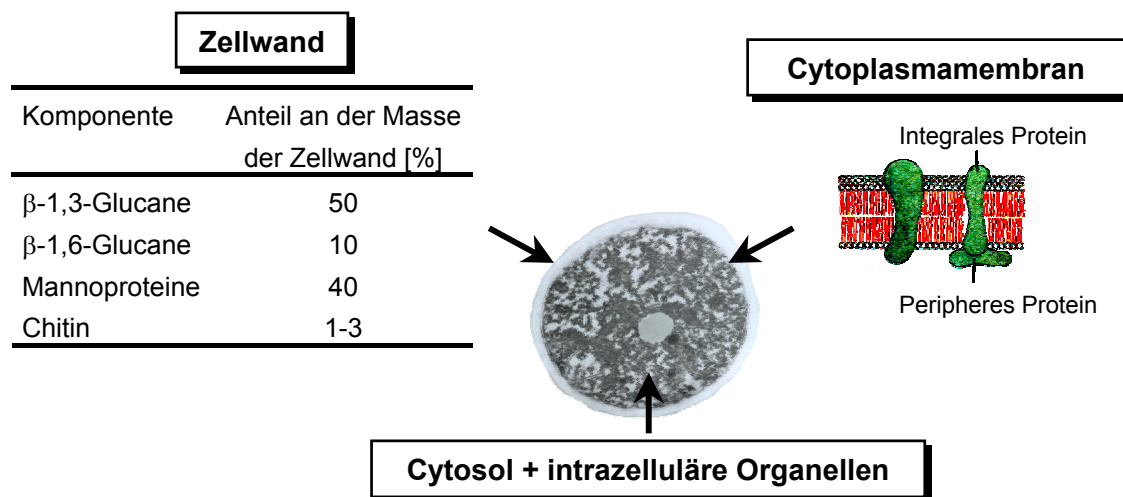


Abb. C-16: Schematischer Aufbau einer Hefezelle.

2.1.2 Extraktion von cytosolischen Proteinen und Membranproteinen

Um eine maßgebliche Beteiligung von Enzymen einer dieser Substrukturen an der HDMF-Bildung zu ermitteln, sollten die Proteine der verschiedenen Kompartimente der Hefezelle mittels gängiger Methoden voneinander getrennt und einzeln untersucht werden. Die Gewinnung von Rohproteinextrakten aus dem Cytosol und der Cytoplasmamembran der Hefe verlief parallel nach einer etablierten Methode in Anlehnung an die Arbeiten von Wojciechowicz und Mitarbeitern (1993) und Lu und Mitarbeitern (1994). Die Vorgehensweise ist in Abb. C-17 schematisch dargestellt. Die in YPD-Medium gewachsenen *Z. rouxii*-Zellen wurden in einem Lyse-Puffer durch mechanische Behandlung (Vortexen) mit Glaskügelchen homogenisiert. Die Abtrennung intakter Zellen und grober Zellbestandteile wie z. B. Zellkerne und Zellwandfragmente erfolgte durch Zentrifugation bei niedrigen g -Zahlen ($1000 \times g$). Im zweiten Zentrifugationsschritt bei hohen g -Zahlen ($27000 \times g$) wurden die Membranfragmente von den löslichen cytosolischen Proteinen abgetrennt. Nach anschließender Dialyse zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen wurde der Extrakt direkt für Inkubationsexperimente verwendet.

2.1.3 Extraktion von Zellwandproteinen

Die Gewinnung der Zellwandproteine erfolgte nach der Methode von Yoda und Mitarbeitern (2000). Die Methode beruht im Wesentlichen auf dem enzymatischen Verdau der β -1,3-Glucane, dem Hauptbestandteil der Hefezellwand, durch die Enzymmischung Zymolyase (Lyticase) in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT; Abschnitt C 2.1.1). In der Zellwand eingeschlossene Proteine werden dadurch freigesetzt. Die entstehenden Sphäroplasten (= Protoplasten) werden durch Zentrifugation von der sog. Periplasmafraktion (Zellwandproteine) abgetrennt. Nach anschließender Dialyse zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen wurde der Extrakt direkt für Inkubationsexperimente eingesetzt.

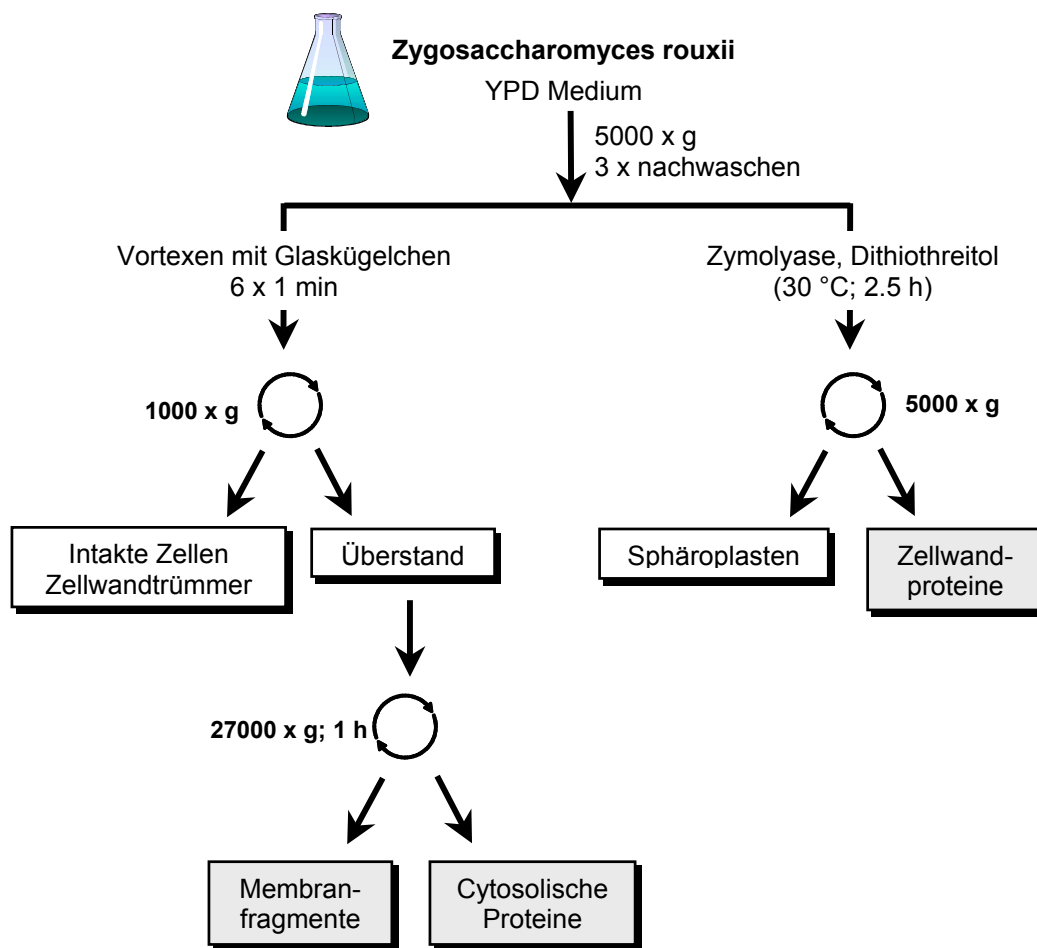


Abb. C-17: Gewinnung von Rohproteinextrakten aus Hefen (Wojciechowicz und Mitarbeiter, 1993; Lu und Mitarbeiter, 1994; Yoda und Mitarbeiter, 2000).

2.2 Inkubation von Rohproteinextrakten mit [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat

Ein nach Abschnitt C 2.1.2 frisch hergestellter cytosolischer Proteinextrakt wurde mit [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat und den Nicotinamidadenin-dinucleotiden NAD, NADH, NADP und NADPH inkubiert. Da während der Biotransformation von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF eine Reduktion stattfinden muss und Nicotinamidadenin-dinucleotide als Cofaktoren der meisten bekannten Dehydrogenasen fungieren, musste eine mögliche Beteiligung an der HDMF-Bildung in Betracht gezogen werden. Bereits Hecquet und Mitarbeiter (1996) und Dahlen und Mitarbeiter (2001) wiesen auf die eventuelle Beteiligung von Nicotinamidadenin-dinucleotiden bei der Biogenese von HDMF durch *Z. rouxii* hin. Nach 40 Stunden wurden die apolaren Verbindungen durch Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen extrahiert und mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 285 nm und *off-line*-Radiodetektion analysiert (Abb. C-18 A und B). Als Kontrollversuch diente ein durch Hitzebehandlung inaktivierter cytosolischer Extrakt, mit dem analog verfahren wurde (Abb. C-18 C und D). Abb. C-18 zeigt den Nachweis von radioaktiv markiertem HDMF sowohl im Extrakt des aktiven als auch im Extrakt des inaktiven Proteinextraktes. Dies deutete auf eine chemische HDMF-Bildung in den Reaktionsansätzen unter den gegebenen milden Reaktionsbedingungen hin. Im aktiven Extrakt wurde des Weiteren Radioaktivität im Durchlauf der HPLC-Analyse (Faktion vier) und in Fraktion sechs detektiert. Fraktion sechs war hierbei von besonderem Interesse, da sie auch im UV-Chromatogramm bei 285 nm ein Signal aufwies (Abb. C-18 A und B). Bei den detektierten radioaktiv-markierten Verbindungen in Fraktion vier handelte es sich vermutlich um polare Metabolite wie Ethanol, Acetaldehyd, Dihydroxyaceton, etc., die durch Transformation von D-Fructose-1,6-diphosphat durch glycolytische Enzyme entstehen.

Da analoge Inkubationsversuche mit den Membranextrakten und den Zellwandextrakten ähnliche bzw. keine verwertbaren Ergebnisse lieferten, beschränkten sich die nachfolgenden Untersuchungen zunächst auf den cytosolischen Proteinextrakt.

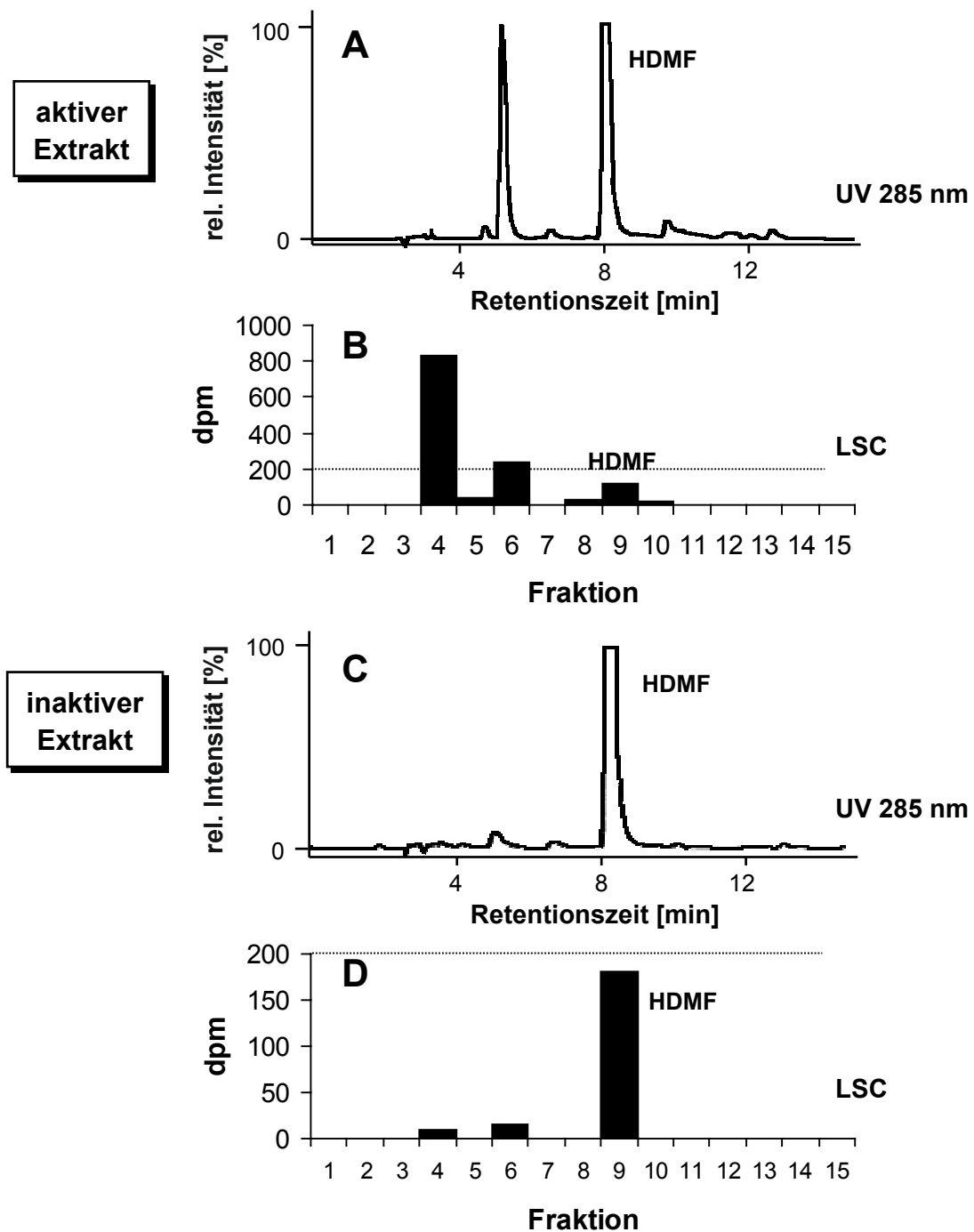


Abb. C-18: RP-HPLC-Analyse eines aktiven und eines hitzeinaktivierten cytosolischen Proteinextraktes aus *Z. rouxii* nach Applikation von $[U-^{14}C]$ -D-Fructose-1,6-diphosphat, NAD, NADH, NADP und NADPH (Inkubation: 40 Stunden; 30 °C; pH 7.5);

A: UV-Chromatogram des Extraktes der Inkubation des aktiven cytosolischen Extraktes;

B: *off-line* Radiodetektion (LSC) von A;

Fortsetzung zu Abb. C-18:

C: UV-Chromatogramm des Extraktes der Inkubation des hitzeinaktivierten cytosolischen Extraktes;

D: *off-line* Riodetektion (LSC) von **C**.

Trennsäule: Eurospher 100 C-18; Fluss: 1 ml/min;

Fließmittel: Wasser (0.05 % Ameisensäure)/Acetonitril; HPLC 6.

2.3 Nachweis der Bildung von HDMF und Identifizierung der unbekanntes Verbindung

2.3.1 HPLC-DAD-Analysen

Bei der HPLC-DAD-Analyse einer zu Abschnitt C 2.2 analogen Inkubation des cytosolischen Proteinextraktes mit unmarkiertem D-Fructose-1,6-diphosphat wurden ebenfalls zwei bei 285 nm UV-aktive Verbindungen detektiert (Abb. C-18 A). Die beiden Substanzen zeichneten sich durch identische UV-Spektren mit Absorptionsmaxima bei 285 nm aus, was deutlich auf eine strukturelle Homologie hindeutete. Retentionszeit und UV-Spektrum der als zweites eluierenden Verbindung stimmten exakt mit den Daten einer authentischen kommerziellen HDMF-Referenz überein.

Überraschenderweise lieferte eine authentische 4-Hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon-Referenz (HMF; Norfuranol) mit der unbekanntes Verbindung übereinstimmende Daten. Die UV-spektroskopischen Daten ließen somit auf die Bildung von HDMF und HMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in den cytosolischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii* schließen.

2.3.2 Massenspektrometrische Charakterisierung

Anhand von HPLC-MS-Analysen wurden für die beiden Verbindungen Pseudomolekülonen m/z 170 und m/z 156 bestimmt (Abb. C-19 A-D). Dies entsprach den Acetonitriladdukten der jeweiligen einfach protonierten Molekülonen von HDMF und HMF. Die Produktionenspektren beider Verbindungen waren gekennzeichnet durch die einfach protonierten Molekülonen m/z 129 bzw. m/z 115 und den jeweiligen Verlust von Kohlenmonoxid, der zur Bildung der Fragmentionen m/z 101 bzw. m/z 87 führte (Abb. C-19 E und F). Die erhaltenen Daten waren identisch mit den Daten authentischer Referenzverbindungen. Durch eine zusätzliche Analyse mittels HRGC-MS konnte die Präsenz von HDMF und HMF in den Extrakten bestätigt werden. Die massenspektrometrischen Analysen erbrachten somit den endgültigen Nachweis der Bildung von HDMF und HMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in zellfreien cytosolischen Proteinextrakten, die aus der Hefe *Z. rouxii* gewonnen wurden.

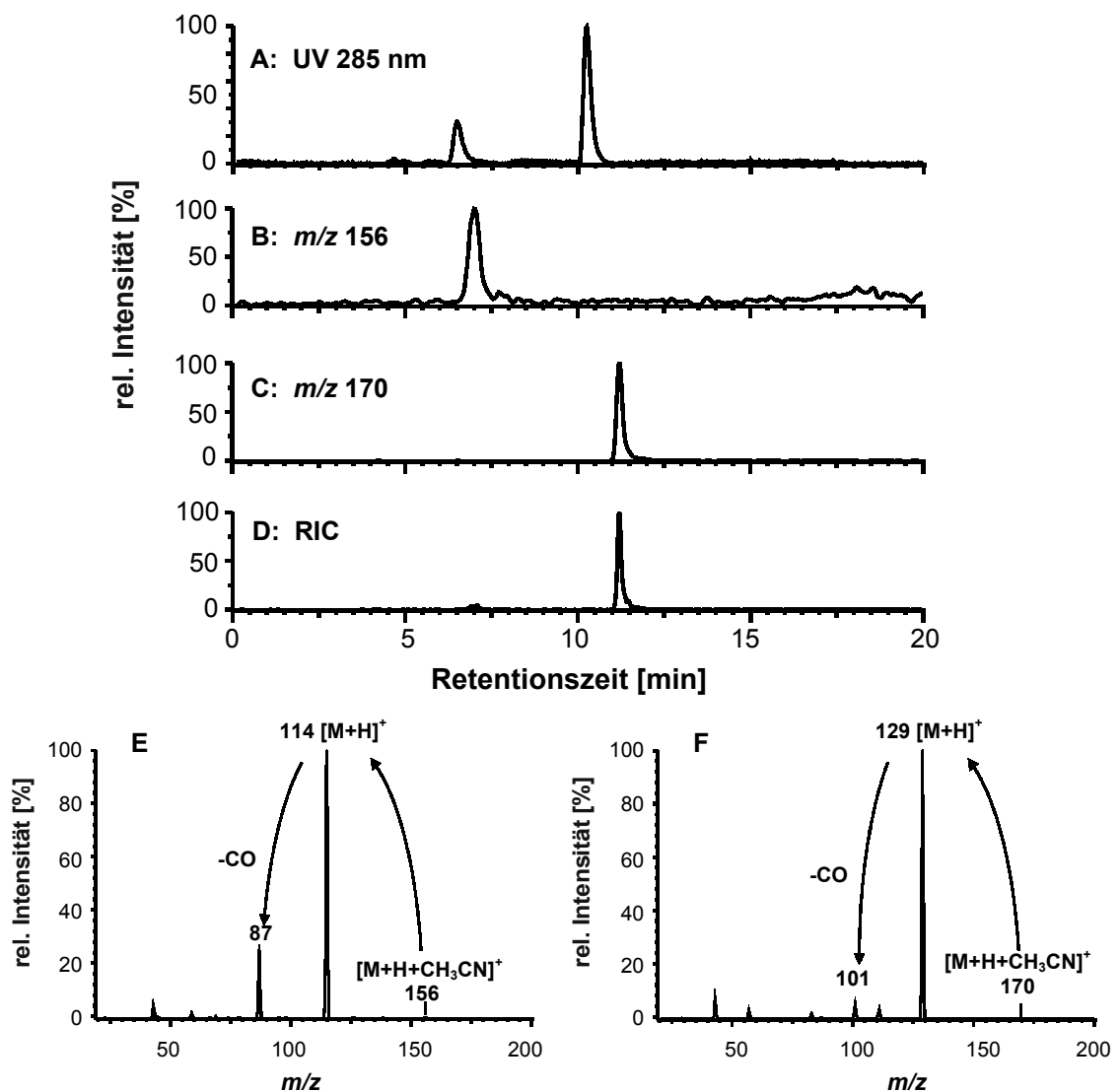


Abb. C-19: HPLC-UV-ESI-MS-Analyse eines aktiven cytosolischen Proteinextraktes aus *Z. rouxii* nach Applikation von D-Fruktose-1,6-diphosphat, NAD, NADH, NADP und NADPH (Inkubation: 40 Stunden; 30 °C);

A: UV-Chromatogramm (285 nm);

B: Massenchromatogramm zur Detektion von HMF mit m/z 156 $[M+H+MeCN]^+$;

C: Massenchromatogramm zur Detektion von HDMF mit m/z 170 $[M+H+MeCN]^+$;

D: Totalionenchromatogramm (RIC);

Trennsäule: XTerra MS C18; Fluss: 0.2 ml/min; Fließmittel: Wasser (0.05 % TFA)/Acetonitril; Scanbereich: m/z 153 - m/z 300; Scanzeit: 1.0 s.

E: Produktions-Massenspektrum von HMF

F: Produktions-Massenspektrum von HDMF

Prekursorionen: m/z 156 (**E**), m/z 170 (**F**); Scanbereich: m/z 20 - m/z 200; Scanzeit: 1.0 s; Stoßgasdruck: 0.27 Pa Argon; Stoßenergie: 15 eV.

2.4 Untersuchungen zur Bildung von HMF und HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat

Anhand von verschiedenen Inkubationsexperimenten sollte geklärt werden, ob es sich bei der beobachteten HMF- bzw. HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat in den cytosolischen Proteinextrakten um enzymkatalysierte Reaktionen oder rein chemische Bildungsmechanismen handelt. Aufgrund der ausreichenden Ausbeuten der zu analysierenden Verbindungen und der hohen Selektivität der Extraktions- und Analysenmethode (Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen und RP-HPLC-Analyse mit UV-Detektion bei 285 nm) konnten alle weiteren Versuche unter Verwendung von unmarkiertem D-Fructose-1,6-diphosphat durchgeführt werden.

Ein nach dem in Abschnitt C 2.1.2 beschriebenen Verfahren hergestellter cytosolischer Proteinextrakt wurde aliquotiert und mit D-Fructose-1,6-diphosphat in An- und Abwesenheit der Nicotinamidadenin-dinucleotide inkubiert. Parallel dazu sind Reagenzienblindwerte im entsprechenden Puffer angesetzt worden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Stunden wurden die Proben wie oben erwähnt extrahiert und analysiert. Das Chromatogramm des Extraktes, der durch Inkubation des cytosolischen Proteinextraktes mit D-Fructose-1,6-diphosphat und den Cofaktoren erhalten wurde, zeigte deutlich die Bildung von HMF und HDMF und bestätigte somit die Reproduzierbarkeit der bisherigen Ergebnisse (Abb. C-20 A). Aus dem Chromatogramm des Extraktes, der durch Inkubation des cytosolischen Proteinextraktes mit D-Fructose-1,6-diphosphat (ohne Cofaktoren) erhalten wurde, lässt sich die Relevanz der zugesetzten Cofaktoren für die Bildung der Hydroxyfuranone in den Proteinextrakten ableiten (Abb. C-20 B). HMF und HDMF waren nur in Spuren detektierbar, was auf eine Beteiligung von proteingebundenen Cofaktoren zurückzuführen sein könnte, die nicht durch die Dialyse abgetrennt wurden. Überraschenderweise wurden im Reagenzienblindwert, der D-Fructose-1,6-diphosphat und die Cofaktoren beinhaltet, aber keinen Proteinextrakt, ähnliche HDMF-Konzentrationen detektiert wie nach entsprechender Inkubation des cytosolischen Extraktes (Abb. C-20 C). Dies beweist eine chemische Bildung von HDMF unter den gewählten physiologischen Reaktionsbedingungen (neutraler pH-Wert; 30 °C). HMF wurde nicht detektiert. In einem Reagenzienblindwert, der aus D-Fructose-1,6-diphosphat und Puffer bestand, wurde weder HDMF noch HMF gebildet.

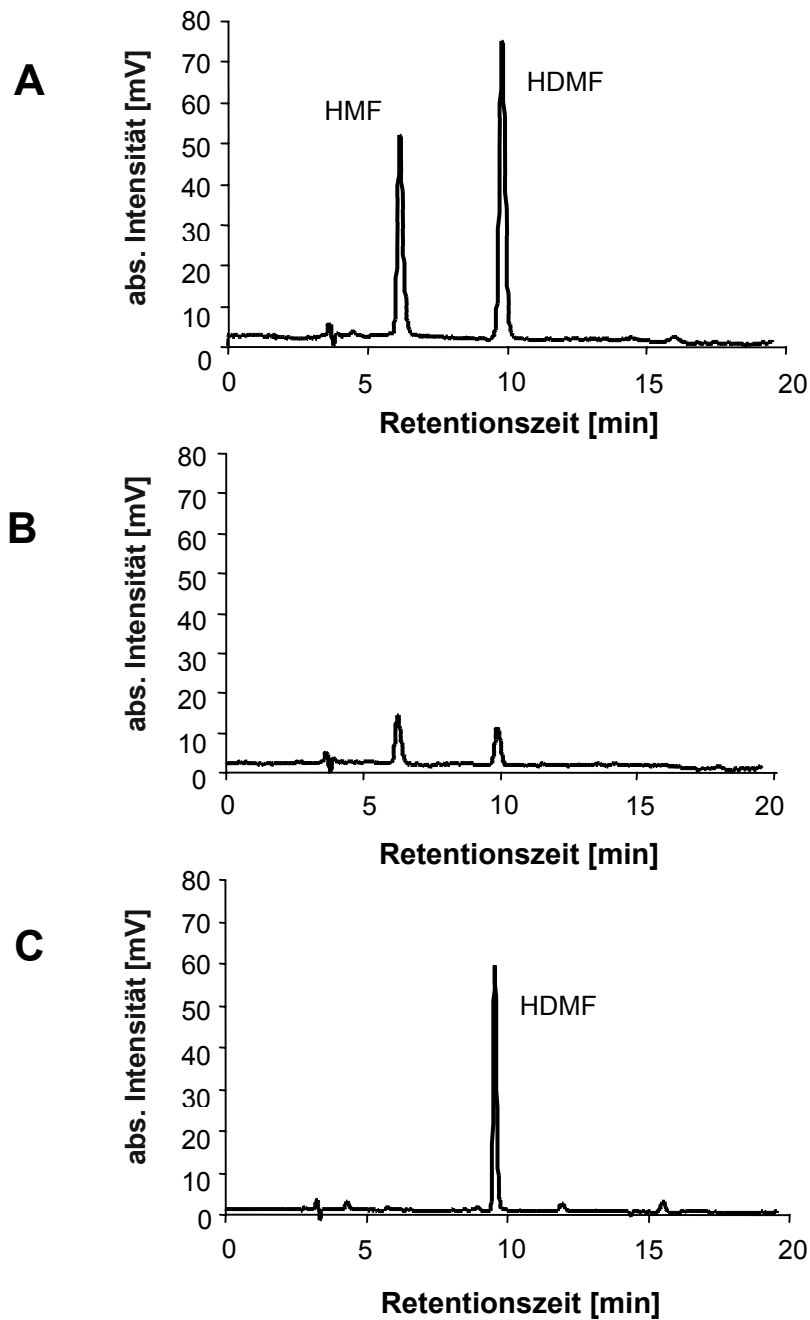


Abb. C-20: RP-HPLC-UV-Analysen von Extrakten verschiedener Inkubationsexperimente (Inkubation: 30 Stunden; 30 °C; 20 mM Tris-Cl, pH 7.5);
A: Cytosolischer Rohproteinextrakt aus *Z. rouxii*, D-Fructose-1,6-diphosphat und NAD, NADH, NADP und NADPH;
B: Cytosolischer Rohproteinextrakt aus *Z. rouxii* und D-Fructose-1,6-diphosphat;
C: D-Fructose-1,6-diphosphat und NAD, NADH, NADP sowie NADPH.
Trennsäule: Eurospher 100 C-18; Detektion: UV 285 nm, Fluss: 1 ml/min; Fließmittel: Wasser (0.05 % Ameisensäure)/Acetonitril; HPLC 2.

2.5 Diskussion der Ergebnisse

Bei den Untersuchungen zur Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in zellfreien Proteinextrakten aus *Z. rouxii* wurde die Bildung von HDMF in cytosolischen Extrakten in Gegenwart von Nicotinamidadenin-dinucleotiden (Cofaktoren) eindeutig nachgewiesen. Nachfolgende Inkubationsexperimente bewiesen jedoch, dass die beobachtete Bildung auf eine rein chemische Reaktion des Zuckerphosphates in Gegenwart der Cofaktoren zurückzuführen ist, was auch die offensichtliche HDMF-Bildung in den durch Hitzebehandlung inaktivierten Extrakten erklärt (Abb. C-18 C und D).

Eine chemische Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat im Sinne einer Maillard-Reaktion unter den gewählten physiologischen Bedingungen (neutraler pH-Wert; 30 °C) war bislang nicht beschrieben. In bisherigen Untersuchungen, die sich mit der Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in Modellumsetzungen befassten, wurden die Reaktionsmischungen deutlich höheren Temperaturen ausgesetzt (100–150 °C; Schieberle, 1992). Die nachgewiesene Beteiligung der Cofaktoren warf zusätzliche Fragen auf. Fungieren die Cofaktoren in diesem Zusammenhang als Lieferant einer Aminofunktion, welche die Maillard-Reaktion auch unter physiologischen Bedingungen katalysieren kann (Njoroge und Monnier, 1989), oder ist eine nicht-enzymatische Reduktion, katalysiert durch NAD(P)H, an der HDMF-Bildung beteiligt? Eine Reduktion während der Transformation von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF ist unbedingt erforderlich. Darüber hinaus sind derartige nicht-enzymatische durch NAD(P)H und NADH-Mediate Reduktionen bereits mehrfach dokumentiert worden (Miwa und Okuda, 1982; Nam und Renganathan, 1999; Wang und Mitarbeiter, 1999), jedoch niemals im Zusammenhang mit Zuckern oder zuckerähnlichen Strukturen.

Die Bildung von HMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in zellfreien cytosolischen Proteinextrakten war ebenfalls von großem Interesse. Generell konnte somit erstmals gezeigt werden, dass D-Fructose-1,6-diphosphat einen Prekursor von HMF darstellt. HMF wurde ausschließlich in den aktiven Proteinextrakten detektiert, was eindeutig für eine Beteiligung von Enzymsystemen der Hefe an der Bildung dieser Verbindung spricht. Des Weiteren waren auch hier die Cofaktoren von entscheidendem Einfluss, da in Abwesenheit der Cofaktoren deutlich weniger HMF gebildet wurde. Formal muss für die Bildung von HMF das eingesetzte D-Fructose-1,6-diphosphat zunächst in einen C5-Zucker umgewandelt werden, bevor sich HMF bilden kann. Eine Transformation des D-Fructose-1,6-diphosphats zu D-Glucose-6-phosphat und ein anschließender oxidativer Abbau über den Pentosephosphatweg wurde daher vermutet.

Somit gaben diese Untersuchungen eindeutige Hinweise auf zwei bislang unbekannte Bildungsmechanismen von Hydroxyfuranonen unter physiologischen Bedingungen. Die nachfolgenden Studien fokussierten sich daher auf die Aufklärung der Bildungsmechanismen beider Furanonderivate.

3 Untersuchungen zur Bildung von 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (HMF) unter physiologischen Bedingungen

3.1 Bildung von HMF in cytosolischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii*

In Kapitel C 2 konnte erstmals die Bildung von HMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in zellfreien cytosolischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii* gezeigt werden. Durch weitere Experimente sollte diese Biotransformation im Folgenden detailliert untersucht werden. Bei der näheren Charakterisierung der beobachteten HMF-Bildung stand die Identifizierung der Zwischenverbindungen und beteiligten Enzyme im Vordergrund. Prinzipiell muss das eingesetzte D-Fructose-1,6-diphosphat zunächst zu einem C5-Zucker abgebaut werden, bevor sich HMF bilden kann. Ein oxidativer Abbau über den Pentosephosphat-Weg wurde daher angenommen.

3.1.1 Studien zum Bildungsmechanismus

3.1.1.1 Substratstudien

Verschiedene Zuckerphosphate wurden unter den in Abschnitt C 2.4 beschriebenen Reaktionsbedingungen (pH 7.5; 30 °C) an Aliquote eines dialysierten cytosolischen Proteinextraktes appliziert. Nach 30-stündiger Inkubation und Extraktion an RP18-Kartuschen sind die Proben mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm und HPLC-MS/MS analysiert worden. HMF wurde in Extrakten detektiert, die mit D-Fructose-1,6-diphosphat, D-Fructose-6-phosphat, D-Glucose-6-phosphat, 6-Phosphogluconsäure, D-Ribose-5-phosphat und D-Ribulose-1,5-diphosphat inkubiert worden waren (Abb. C-21). In Kontrollexperimenten ohne Proteinextrakt oder mit hitzebehandeltem Proteinextrakt wurde kein HMF nachgewiesen. Die bei weitem höchsten Umsetzungsraten wurden bei der Applikation von D-Ribulose-1,5-diphosphat beobachtet (ca. 1.79 ‰ der eingesetzten Stoffmenge). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der in Abb. C-22 dargestellte Bildungsmechanismus von HMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat postuliert. Hierbei wird von einer Transformation des D-Fructose-1,6-diphosphats in D-Glucose-6-phosphat ausgegangen. D-Glucose-6-phosphat kann im Folgendem über den Pentosephosphat-Weg oxidativ zu D-Ribulose-5-phosphat, einem bereits beschriebenen HMF-Vorläufer (Sasaki und Mitarbeiter, 1991), abgebaut werden.

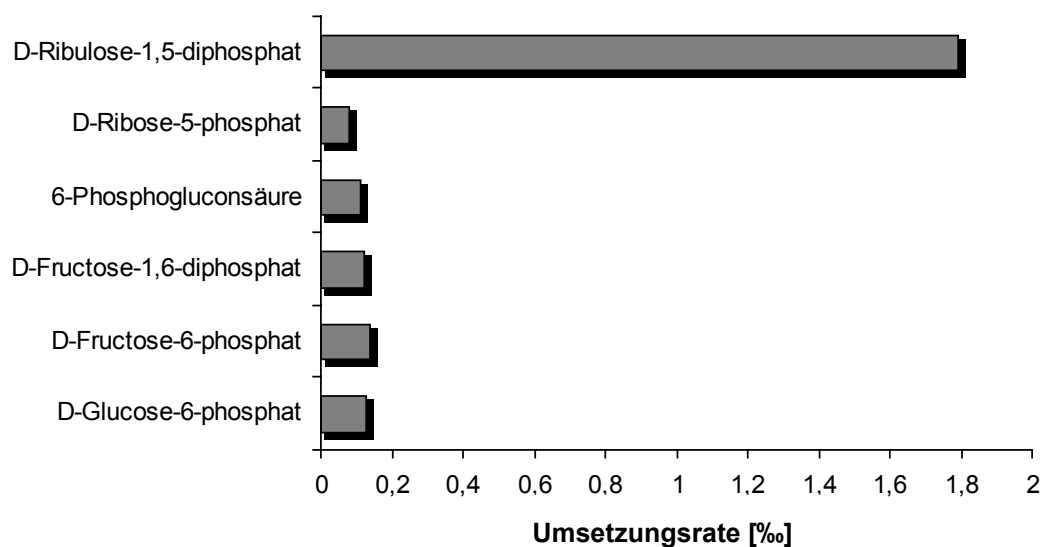


Abb. C-21: HMF-Bildung (dargestellt in Form von Umsetzungsraten [%]) in cytosolischen Proteinrohextrakten, die mit verschiedenen Zuckerphosphaten, NAD, NADH, NADP und NADPH inkubiert wurden. Inkubation: 30 Stunden; 30 °C (Reaktionsbedingungen unter D 3.7.1).

3.1.1.2 Nachweis von Enzymaktivitäten

Zur Bestätigung des in Abb. C-22 postulierten Bildungsweges wurde der Extrakt aus *Z. rouxii* auf seine Aktivität an Fructose-1,6-diphosphatase, Phosphohexose-Isomerase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase untersucht. Die Aktivitäten aller dieser Enzyme konnten mittels etablierter spezifischer Enzymassays eindeutig in den Extrakten nachgewiesen werden. Die ermittelten Aktivitäten der untersuchten Enzyme sind in Tab. C-1 zusammengefasst. Da für die Bestimmung der Aktivitäten zwei unterschiedliche Extrakte mit unterschiedlichen Proteingehalten verwendet wurden, variiert das Verhältnis zwischen Volumenaktivitäten und spezifischen Aktivitäten.

Tab. C-1: Enzymaktivitäten von Fructose-1,6-diphosphatase (1), Phosphohexose-Isomerase (2), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (3) and 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase (4) in cytosolischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii*.

	1	2	3	4
Volumenaktivität [U/ml Extrakt]	0.012 ^a	17.9 ^b	0.039 ^b	0.25 ^b
spezifische Aktivität [U/mgProtein]	0.0023 ^a	5.71 ^b	0.013 ^b	0.081 ^b

^{a/b} Extrakt a (Proteingehalt: 5.4 mg/ml) bzw. Extrakt b (Proteingehalt: 3.13 mg/ml) wurde verwendet.

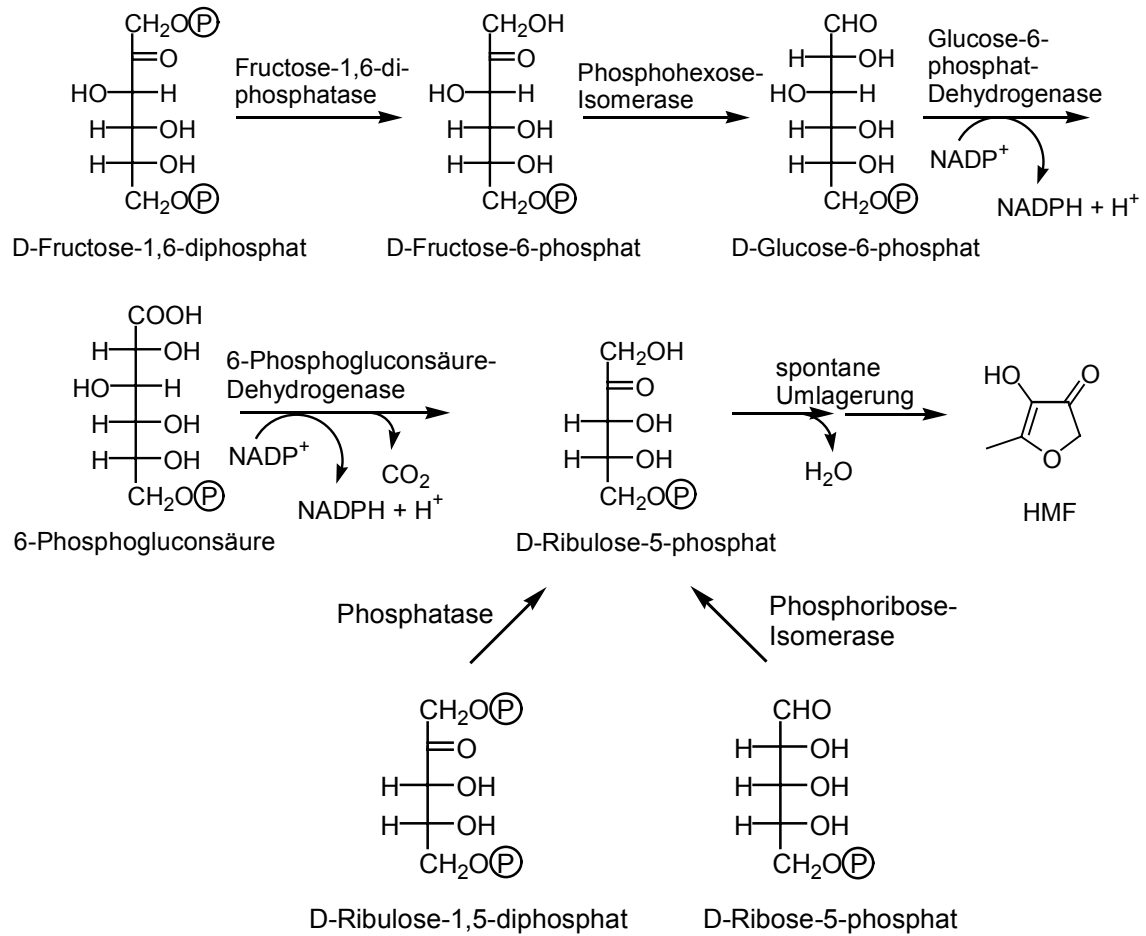


Abb. C-22: Postulierter Bildungsweg von HMF in cytosolischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii*.

3.1.1.3 Modellversuch mit 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat

Zum weiteren Nachweis des postulierten HMF-Bildungsweges wurde in einem Modellversuch 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat (synthetisiert und isoliert nach dem in Abschnitt C 3.2.3.2 beschriebenen Verfahren) mit einem Überschuss an kommerziell erhältlicher Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase in einem Tris-HCl Puffer (pH 7.5) umgesetzt. Der Modellansatz ist analog den Experimenten mit Proteinextrakten aus *Z. rouxii* für 30 Stunden bei 30 °C inkubiert worden. Nach Festphasenextraktion an einer RP18-Kartusche konnte HMF mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm detektiert werden. Anhand einer HPLC-MS-Analyse wurde für das gebildete HMF ein Pseudomolekülion m/z 157 bestimmt, was dem Acetonitriladdukt des einfach markierten, einfach protonierten Molekülions von HMF entspricht. Dieses Ergebnis impliziert, dass sich *in situ* synthetisiertes D-Ribulose-5-phosphat unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen spontan zu HMF umlagert, und bestätigt die in Abb. C-22 vorgestellte Reaktionsfolge. Die spontane Umlagerung zeigte auch ein

Versuch, bei dem D-Ribulose-5-phosphat unter analogen Bedingungen in einer Puffer-Lösung gelagert wurde. Dabei wurden innerhalb von 30 Stunden bei 30 °C bis zu 1 % des Zuckerphosphats zu HMF transformiert.

3.1.2 Charakterisierung der HMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat in cytosolischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii*

HMF wurde ausschließlich in den aktiven Proteinextrakten detektiert, was eindeutig für eine Beteiligung von Enzymsystemen der Hefe an der Bildung dieser Verbindung sprach. Die Cofaktoren waren von entscheidendem Einfluss, da in Abwesenheit von Cofaktoren deutlich weniger HMF gebildet wurde (Abschnitt C 2.4). Dies steht mit dem in Abb. C-22 postulierten Bildungsweg im Einklang, da die beteiligten Dehydrogenasen NADP als Cofaktor benötigen. Für weitere Studien wurde im Allgemeinen analog der in Abschnitt C 2.4 beschriebenen Inkubationsexperimente verfahren. Dialysierte cytosolische Rohproteinextrakte aus *Z. rouxii* sind aliquotiert und mit D-Fructose-1,6-diphosphat und den Cofaktoren (NAD, NADH, NADP, NADPH) unter variierenden Reaktionsbedingungen inkubiert worden. Die HMF-Ausbeuten wurden nach Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm ermittelt. Eine stufenweise Verdünnung des Proteinextraktes mit dem entsprechenden Puffer und anschließende Inkubation der einzelnen Verdünnungsstufen führte zu einer deutlichen Abnahme der gebildeten HMF-Konzentrationen mit steigendem Verdünnungsgrad. Ein pH-Optimum wurde bei pH 8 bestimmt. Die Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 20 – 50 °C zeigte maximale HMF-Ausbeuten (ca. 0.7 µg/ml) bei 40 °C.

3.1.3 Diskussion der Ergebnisse

HMF wurde als Produkt des Zuckerphosphatstoffwechsels in zellfreien *Z. rouxii*-Proteinextrakten nachgewiesen. Die HMF-Bildung ist im Detail untersucht worden, und aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde der in Abb. C-22 dargestellte Bildungsweg postuliert. Er umfasst die durch mehrere Enzyme katalysierte Transformation von D-Fructose-1,6-diphosphat in D-Ribulose-5-phosphat und dessen spontane Umlagerung in HMF. Die Aktivitäten der für die enzymatische Transformation benötigten Enzyme wurden in den Proteinextrakten nachgewiesen. Die spontane Umlagerung von *in situ* synthetisiertem D-Ribulose-5-phosphat in HMF konnte anhand eines Modellexperimentes, bei dem 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat mit kommerziell erhältlichen Enzymen umgesetzt wurde, gezeigt werden.

Somit ist der postulierte Bildungsweg von HMF in den cytosolischen Extrakten bestätigt worden. Eine rein chemische Umlagerung von D-Ribulose-5-phosphat in HMF wurde bereits von Sasaki und Mitarbeitern (1991) beschrieben. Bei einem eigens durchgeführten Lagerungsversuch von D-Ribulose-5-phosphat in einer Puffer-Lösung (pH 7.5) wurde

innerhalb von 30 Stunden bei 30 °C bis zu 1 % des Zuckerphosphates in HMF umgewandelt.

Die selektiven Transformationen von D-Ribose-5-phosphat und D-Ribulose-1,5-diphosphat zu HMF in den Extrakten unterstrichen die Bedeutung von D-Ribulose-5-phosphat als HMF-Vorläufer. Das Vorkommen einer Phosphoribose-Isomerase und einer Phosphatase in den Extrakten wird daher angenommen, wobei von einer deutlich höheren Phosphataseaktivität ausgegangen werden kann (Abb. C-21).

Diese Ergebnisse standen jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Knowles und Mitarbeitern (1980), die eine enzymatische Transformation von D-Ribulose-5-phosphat zu HMF durch eine Nebenaktivität der Phosphoribose-Isomerase aus Spinat beschrieben. Diese postulierte Nebenaktivität sollte daher im folgenden Abschnitt detailliert untersucht werden.

3.2 Bildung von HMF aus D-Ribulose-5-phosphat

Die von Knowles und Mitarbeitern (1980) beschriebene Bildung von HMF aus D-Ribulose-5-phosphat infolge einer durch Phosphoribose-Isomerase (isoliert aus Spinat) katalysierten Isomerisierung sollte in diesem Abschnitt im Detail untersucht werden. Anhand verschiedener Inkubationsexperimente galt es herauszufinden, ob HMF über einen enzymatischen oder wie in Abschnitt C 3.1.1.3 beobachtet über einen chemischen Bildungsweg aus D-Ribulose-5-phosphat generiert wird. Des Weiteren konzentrierten sich die Arbeiten auf die Identifizierung einer Zwischenverbindung dieser Transformation. Bislang konnten keine Zwischenverbindungen der Hydroxyfuranonbildung aus Zuckerphosphaten identifiziert werden. Durch Applikation von isotoopenmarkierten Ausgangsverbindungen galt es, den ablaufenden Reaktionsmechanismus aufzuklären.

3.2.1 Wiederholung der Versuche von Knowles und Mitarbeitern (1980)

D-Ribose-5-phosphat wurde analog zu den Arbeiten von Knowles und Mitarbeitern (1980) mit kommerziell erhältlicher Phosphoribose-Isomerase (aus Spinat) in einem Phosphatpuffer bei pH 7.4 umgesetzt. In regelmäßigen Zeitabständen wurden UV-Spektren aufgenommen, die in Abb. C-23 dargestellt sind. Zu Beginn der Reaktion stieg das Absorptionsmaximum bei 280 nm leicht an, was auf die Bildung von D-Ribulose-5-phosphat im Reaktionsansatz zurückzuführen war. Nach ca. 15 Minuten war eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 308 – 310 nm zu beobachten, gefolgt von einem deutlichen Anstieg des Absorptionsmaximums bei 308.5 nm (Abb. C-23 A). Ca. 60 Minuten nach Reaktionsbeginn erfolgte wiederum eine langsame, kontinuierliche hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums, was nach Knowles und Mitarbeitern (1980) auf die Bildung von HMF (Absorptionsmaximum bei

285 nm) im Reaktionsansatz zurückzuführen war (Abb. C-23 B; Abschnitt B 1.4.3.1). Der Versuch wurde nach 240 Minuten abgebrochen. Das Absorptionsmaximum lag zu diesem Zeitpunkt bei ca. 300 nm. Die Ergebnisse von Knowles und Mitarbeitern konnten somit bestätigt werden. Von besonderem Interesse war hierbei die offensichtliche Detektion einer Zwischenverbindung der HMF-Bildung (UV-aktive Verbindung bei ca. 308 nm), die im Folgenden identifiziert werden sollte.

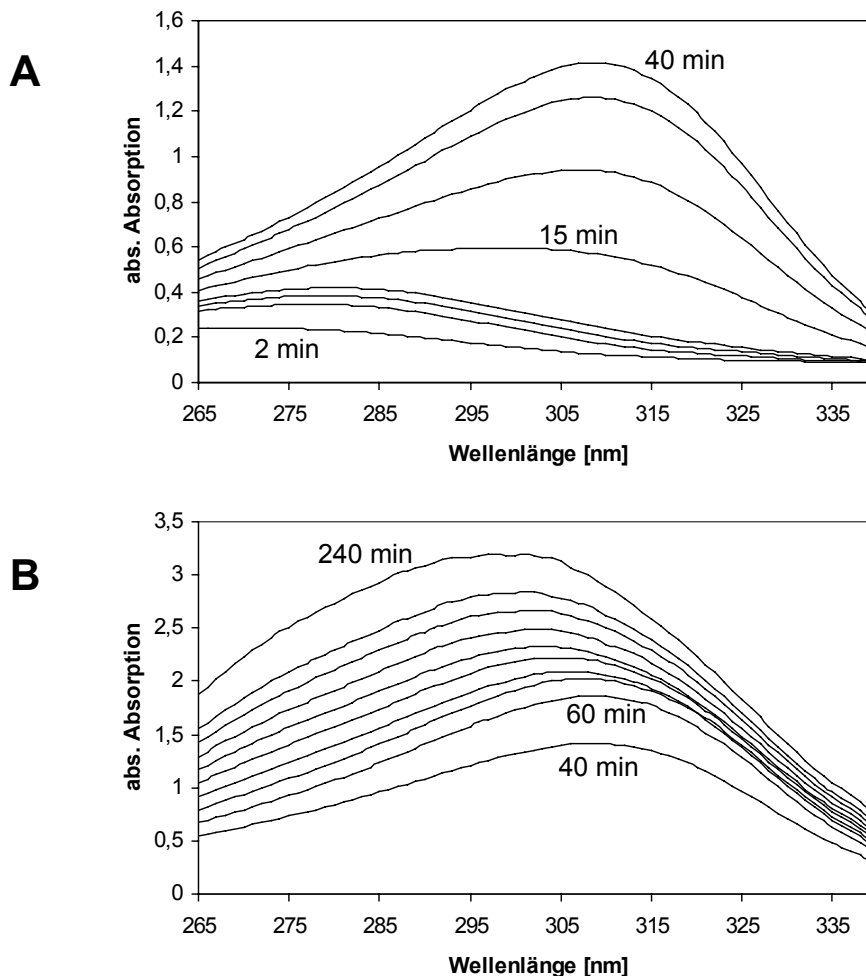


Abb. C-23: Umsetzung von D-Ribose-5-phosphat mit Phosphoribose-Isomerase (aus Spinat) in Phosphatpuffer (pH 7.4) bei 37 °C;

A: UV-Spektren, aufgenommen 2, 4, 6, 10, 15, 20, 30 und 40 Minuten nach Reaktionsbeginn;

B: UV-Spektren, aufgenommen 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 und 240 Minuten nach Reaktionsbeginn (D 3.8.1).

3.2.2 Identifizierung einer Zwischenverbindung

Als Prekursoren von HMF werden unterschiedliche Verbindungen diskutiert, denen jedoch allen eine α -Dicarbonylstruktur gemein ist. 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion wird generell als Schlüsselintermediat der HMF-Bildung angesehen, konnte aber bisher nicht eindeutig als solches nachgewiesen werden. Es entsteht aus dem Amadori-Produkt von Pentosen und wurde als Produkt des enzymatischen Abbaus von *S*-Ribosylhomocystein nachgewiesen (Abschnitt B 1.3.2 und Abschnitt B 1.4.3.2; Schauder und Mitarbeiter, 2001; Winzer und Mitarbeiter, 2002; Blank und Fay, 1996; Slaughter, 1999). Mottram und Nobrega (2002) postulierten die Bildung des Pentandions aus D-Ribose-5-phosphat infolge von Hitzeeinwirkung. Eine Bildung aus D-Ribulose-5-phosphat unter physiologischen Bedingungen wurde bislang nicht beschrieben. Knowles und Mitarbeiter (1980) postulierten im Falle einer HMF-Bildung via D-Ribulose-5-phosphat eine α,β -unge-sättigte α -Dicarbonylstruktur als direkten HMF-Vorläufer (Abb B-13).

3.2.2.1 Nachweis von Dicarbonylverbindungen

Für die Analyse der sehr reaktiven α -Dicarbonylverbindungen wurden verschiedene Methoden etabliert. Es sind Methoden beschrieben, die auf einer direkten Detektion der nativen α -Dicarbonylstruktur bzw. ihrer entsprechenden Alkohole nach Reduktion der Carbonylfunktionen beruhen (Kawakishi und Mitarbeiter, 1991; Zyzak und Mitarbeiter, 1995). Am häufigsten finden jedoch Derivatisierungen mit sog. Abfangreagenzien Anwendung. Beispielhaft seien *O*-Aryl- oder *O*-Alkyl-Hydroxylamine (z. B. *O*-Methylhydroxylamin), Hydrazine (z. B. Girard T-Reagenz), Cysteamin, *o*-Diaminobenzene-Derivate (z. B. *o*-Phenylendiamin) und Aminoguanidin genannt. Durch Reaktion mit α -Dicarbonylverbindungen entstehen stabile Derivate (Oxime, Osazone, Thiazolidine, Quinoxalin-Derivate bzw. Triazine), die mittels gängiger chromatographischer Verfahren und Detektionsmethoden analysiert werden können (Abb. C-24; Nevidek und Mitarbeiter, 1992; Glomb und Tschirnich, 2001).

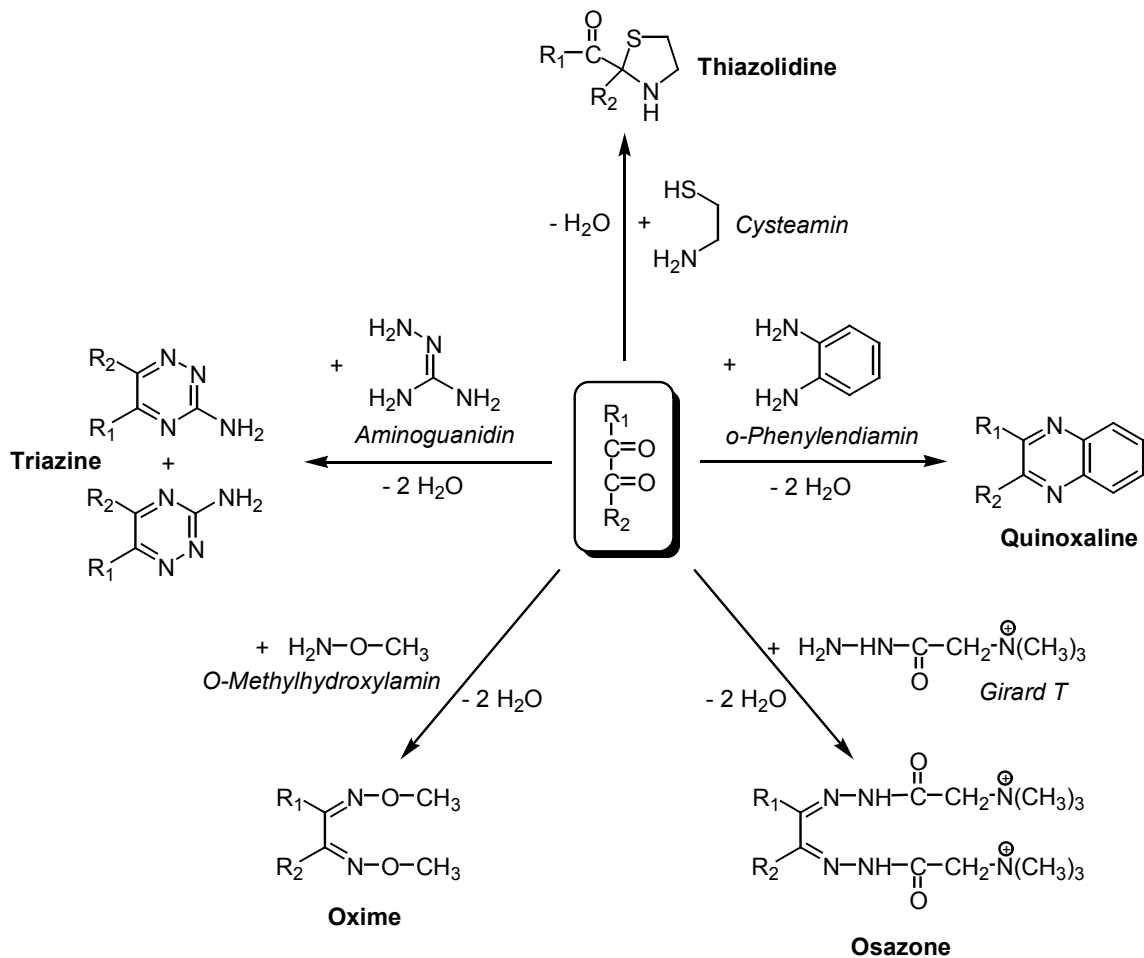


Abb. C-24: Abfangreaktionen für die Detektion von α -Dicarbonylverbindungen.

3.2.2.2 Analyse von Referenzverbindungen

Glomb und Tschirnich (2001) verglichen die Kondensationsraten der gängigen Abfangreagenzien *o*-Phenyldiamin und Aminoguanidin mit verschiedenen α -Dicarbonylverbindungen. Dabei konnte das sehr reaktive 1-Deoxyglucoson nur mit *o*-Phenyldiamin erfolgreich abgefangen werden. Da es sich bei der von uns gesuchten Zwischenverbindung eventuell um das entsprechende Pentoseanalogon (4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion) handelte, kam dieses Abfangreagenz auch in unseren Untersuchungen zum Einsatz. Zur Überprüfung der Derivatisierung mit *o*-Phenyldiamin unter den milden Bedingungen einer enzymatischen Umsetzung (Pufferlösung pH 7.5; 30 - 37 °C) wurden Glyoxal und Methylglyoxal unter diesen Versuchsbedingungen mit *o*-Phenyldiamin umgesetzt. Nach 12 Stunden Inkubation wurden die Proben mittels RP-HPLC-DAD analysiert. In beiden Fällen wurde jeweils nur ein Umsetzungsprodukt detektiert. Die Produkte zeigten nahezu identische UV-Spektren, die UV-Maxima bei ca. 236 nm

und 316 nm aufwiesen. Diese UV-Daten stimmten mit Literaturdaten von Quinoxalinderivaten der Dehydroascorbinsäure (Seok und Mitarbeiter, 1996) und den Daten einer authentischen Referenz des Quinoxalinderivates des 1-Deoxyglucosons [(1*S*,2*R*)-1-(3-Methyl-2-quinoxaliny)-1,2,3-propantriol]⁴ überein. Aufgrund dieser Übereinstimmungen wurden die Umsetzungsprodukte als Quinoxalin, gebildet aus Glyoxal, und Methylquinoxalin, gebildet aus Methylglyoxal, identifiziert. Dies wurde mittels HPLC-MS/MS bestätigt. Somit konnte von einer erfolgreichen Derivatisierung von α -Dicarbonylverbindungen mit *o*-Phenylendiamin unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ausgegangen werden.

3.2.2.3 Nachweis und Identifizierung des HMF-Vorläufers als Quinoxalinderivat

Zur Identifizierung einer eventuell auftretenden α -Dicarbonylstruktur während der Transformation von D-Ribulose-5-phosphat zu HMF wurde *o*-Phenylendiamin einem zu Abschnitt C 3.2.1 analogen Inkubationsansatz von D-Ribose-5-phosphat und Phosphoribose-Isomerase zugesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde der Reaktionsansatz mittels RP-HPLC-DAD analysiert. Wie aus Abb. C-25 A deutlich hervorgeht, wurde bei dieser Umsetzung ein Hauptprodukt gebildet, welches das für Quinoxalinderivate charakteristische UV-Spektrum mit zwei Absorptionsmaxima bei 238 nm und 318 nm aufwies (Abb. C-25 B). Die HMF-Ausbeute war gegenüber der eines analog ohne *o*-Phenylendiamin behandelten Inkubationsansatzes deutlich herabgesetzt. Mittels HPLC-MS/MS wurde für die unbekannte Verbindung ein Pseudomolekülion m/z 205 $[M+H]^+$ bestimmt. Das Produktions-Massenspektrum der Verbindung war gekennzeichnet durch die Fragmentionen m/z 187 $[M+H-H_2O]^+$ und m/z 158 (Abb. C-25 C). Das Fragmention m/z 158 $[M+H-H_2O-29]^+$ lässt auf die zusätzliche Abspaltung eines HCO-Radikals schließen (Justesen und Arrigoni, 2001). Eine Erhöhung der Kollisionsenergie lieferte keine weiteren Informationen.

Zur strukturellen Charakterisierung wurde die unbekannte Verbindung nach Inkubation von Phosphoribose-Isomerase mit D-Ribose-5-phosphat und *o*-Phenylendiamin mittels Säulenchromatographie an RP18-Material isoliert. Die NMR-spektroskopische Charakterisierung umfasste ¹H-, ¹³C-, DEPT-, ¹H¹H-COSY- sowie HMQC- und HMBC-Experimente. Die NMR-Daten bestätigten eindeutig die Bildung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin (Abb. C-26) in den Reaktionsansätzen. Die ¹H- und ¹³C-Daten stimmten mit bereits veröffentlichten Daten dieser Verbindung von Hofmann (1998) überein (Tab. C-2).

Dieses Ergebnis beweist die Bildung von 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD; 1-Desoxypentose; Abb. C-26) im entsprechenden Reaktionsansatz. Die Bildung von DPD aus dem Amadori-Produkt von Pentosen infolge einer 2,3-Enolisierung und der daraus resultierenden Eliminierung des Amins am C-1 des Zuckers wurde bereits mehrfach

⁴ (1*S*,2*R*)-1-(3-Methyl-2-quinoxaliny)-1,2,3-propantriol wurde uns dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Marcus A. Glomb (TU Berlin) zur Verfügung gestellt.

beschrieben (Blank und Fay, 1996; Slaughter, 1999). Mottram und Nobrega (2002) postulierten eine Bildung von DPD aus D-Ribose-5-phosphat infolge von Hitze- einwirkung. Die präsentierten Ergebnisse stellen jedoch den ersten eindeutigen Nachweis einer DPD-Bildung aus einem Pentosephosphat unter physiologischen Reaktions- bedingungen (pH 7.4; 37 °C) dar.

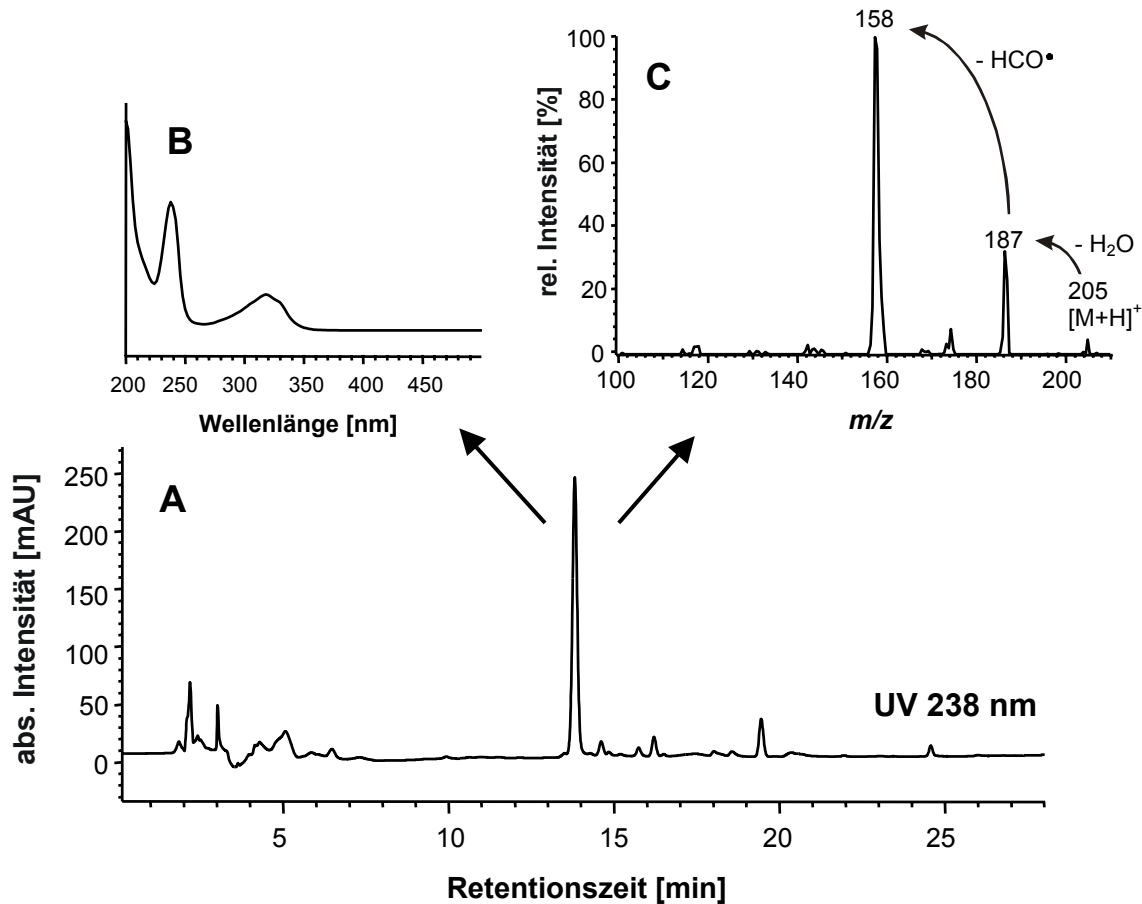
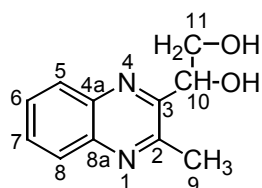
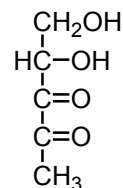


Abb. C-25: A: RP-HPLC-DAD-Analyse einer Inkubation von D-Ribose-5-phosphat, Phosphoribose-Isomerase und *o*-Phenylendiamin in Phosphatpuffer (pH 7.4); Inkubation: 37 °C; 15 Stunden;
 B: UV-Spektrum der bei ca. 13.7 Minuten eluierenden Verbindung;
 Trennsäule: Eurospher 100 C-18; Detektion: UV 238 nm; Fluss: 1.0 ml/min;
 Fließmittel: Wasser (0.05 % TFA)/Acetonitril; HPLC 3.
 C: ESI-Produktionen-Massenspektrum der detektierten Verbindung.
 Prekursorion: m/z 205 [M+H]⁺; Scanbereich: m/z 100 - m/z 210; Scanzeit: 1.0 s;
 Stoßgasdruck: 0.27 Pa Argon; Stoßenergie: 25 eV.



2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin



4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD)

Abb. C-26: Strukturformeln von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin und der daraus abgeleiteten α -Dicarbonylverbindung 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD).

Tab. C-2: ^1H - (400 MHz) und ^{13}C -NMR-Daten (100 MHz) von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin.

Signal	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	---	155.6
3	---	157.4
4a	---	143.1
6	8.03 (m, 2H)	129.7
7		130.7
5	7.76 (m, 2H)	131.4
8		132.1
8a	---	142.6
9	2.85 (s, 3H)	23.2
10	5.15 (m, 1H)	73.7
11	3.99 (m, 2H)	67.2

3.2.2.4 Nähere Charakterisierung der Bildung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin

Es blieb zu klären, welches der Pentosephosphate, D-Ribose-5-phosphat oder D-Ribulose-5-phosphat, den tatsächlichen Vorläufer von 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion in den Reaktionsansätzen darstellt. Daher wurden die Bildung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin aus D-Ribose-5-phosphat bzw. D-Ribulose-5-phosphat in An- und Abwesenheit von Phosphoribose-Isomerase bzw. in Gegenwart von inaktivierter Phosphoribose-Isomerase mittels RP-HPLC-UV bei 238 nm untersucht. Diese Versuche sollten des Weiteren Aufschluss darüber geben, ob die DPD-Bildung auf eine enzymkatalysierte Reaktion oder eine chemische Umlagerung zurückzuführen war. In den Inkubationsansätzen, bestehend aus D-Ribose-5-phosphat bzw. D-Ribulose-5-phosphat, aktiver Phosphoribose-Isomerase und *o*-Phenylendiamin, wurden nahezu identische Konzentrationen an 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin ermittelt (Abb. C-27 A).

Diese Ergebnisse führten wir auf die enzymkatalysierte Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen D-Ribose-5-phosphat und D-Ribulose-5-phosphat zurück. In Abwesenheit von Phosphoribose-Isomerase bzw. in Anwesenheit des durch Hitzebehandlung inaktivierten Enzyms wurden im Falle des Ketosephosphates um ca. Faktor zwei erhöhte Ausbeuten des Quinoxalinderivates detektiert (Abb. C-27 B und C). Der Einsatz von D-Ribose-5-phosphat führte hingegen zu deutlich verringerten Ausbeuten. Dieses Resultat weist darauf hin, dass DPD in erster Linie aus D-Ribulose-5-phosphat infolge einer nicht-enzymatischen Reaktion gebildet wird. Da DPD durch Zyklisierung und Dehydratisierung leicht zu HMF umgewandelt werden kann (Winzer und Mitarbeiter, 2002), unterstreichen diese Ergebnisse die bereits in Abschnitt C 3.1.1.3 beschriebene und nachgewiesene spontane Umlagerung von D-Ribulose-5-phosphat zu HMF. DPD konnte somit als Schlüsselintermediat der beobachteten HMF-Bildung aus D-Ribulose-5-phosphat nachgewiesen werden.

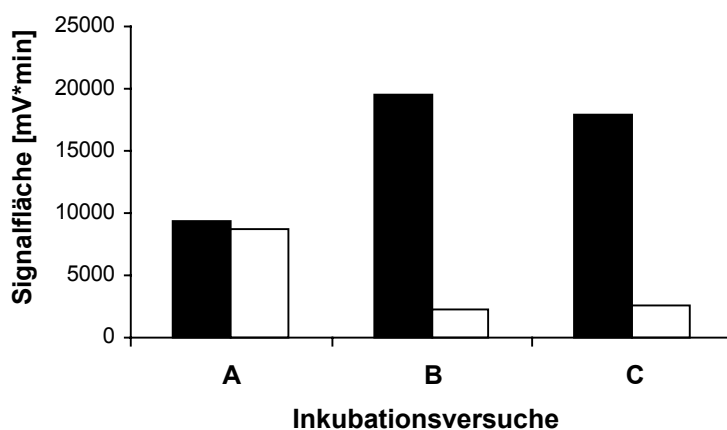


Abb. C-27: Bildung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin aus D-Ribulose-5-phosphat (schwarze Balken) bzw. D-Ribose-5-phosphat (weiße Balken), (Inkubation: 22 Stunden; 37 °C);

A: Inkubation mit Phosphoribose-Isomerase und *o*-Phenylendiamin;

B: Inkubation mit hitzeinaktivierter Phosphoribose-Isomerase und *o*-Phenylendiamin;

C: Inkubation mit *o*-Phenylendiamin.

3.2.3 Bildung von DPD aus D-Ribulose-5-phosphat

3.2.3.1 Nachweis der DPD-Bildung in Abwesenheit von *o*-Phenylendiamin

Abfangreagenzien wie *o*-Phenylendiamin können selbst entscheidenden Einfluss auf das erhaltene quantitative und qualitative α -Dicarbonyl-Spektrum nehmen (Glomb und Tschirnich, 2001). Daher galt es, die Bildung von DPD in den Reaktionsansätzen durch einen weiteren Nachweis zu bestätigen. Dieser Nachweis beruhte auf der vielfach zur

Identifizierung von Zuckern angewandten Alditolacetat-Synthese in Verbindung mit der HRGC-MS-Analyse (Fox, 1999). Mittels dieser Methode gelang beispielsweise die Detektion von 3-Deoxyfructose und 3-Deoxyglucoson in menschlichen Urin- und Plasmaproben (Knecht und Mitarbeiter, 1992).

Für den Nachweis von DPD wurde D-Ribose-5-phosphat mit Phosphoribose-Isomerase in einem Phosphatpuffer (pH 7.4) bei 37 °C inkubiert. Nach ein, drei, sechs und neun Stunden wurden jeweils zwei Aliquote entnommen, die einer Reduktion mit NaBH₄ bzw. NaB²H₄ unterzogen wurden. Die gebildeten Alditole wurden durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid zu den entsprechenden Alditolacetaten derivatisiert und anschließend mittels HRGC-MS analysiert (Abb. C-28).

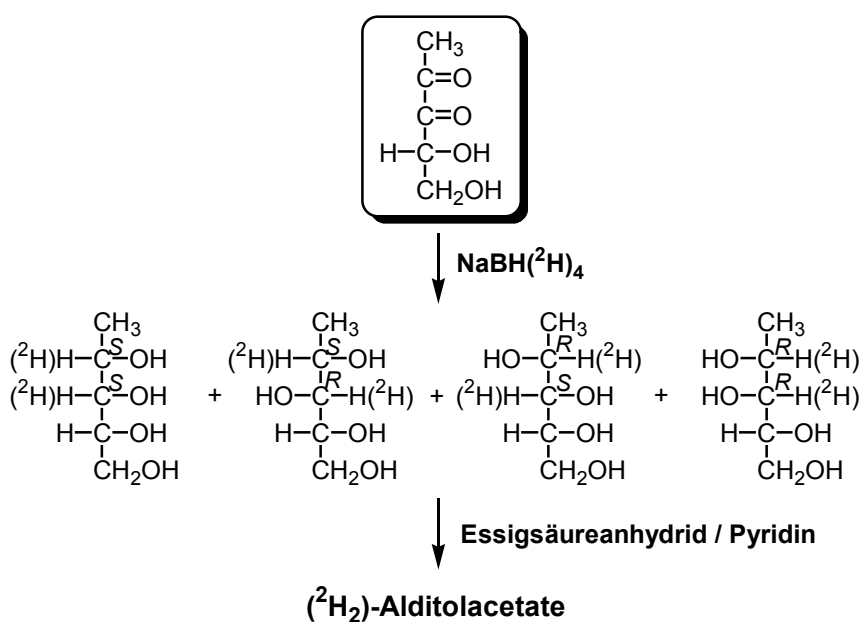


Abb. C-28: Syntheschema von Alditolacetaten bzw. ²H₂-Alditolacetaten aus DPD.

Abb. C-29 zeigt die HRGC-MS-Analyse der Probe, die nach einer Stunde Inkubation entnommen wurde, und die Analyse der anschließend gezogenen Proben. Während im dargestellten Bereich nach einstündiger Inkubation nur ein Signal detektiert wurde (Abb. C-29 A), traten nach sechs Stunden Inkubationszeit drei zusätzliche Signale mit nahezu identischen Massenspektren auf (Abb. C-29 B). Die Elution in Form eines Triplets ist vermutlich auf die Koelution von zwei der vier Diastereomere, die bei der Reduktion einer 2,3-Dicarbonylverbindung entstehen, zurückzuführen (Abb. C-28). Bei den Untersuchungen der Proben, die nach drei, sechs und neun Stunden gezogen wurden, konnten keine deutlichen Unterschiede bezüglich neu entstandener Signale oder Signalintensitäten festgestellt werden. Eine Akkumulation dieser Verbindungen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die diastereomeren Alditolacetate von DPD handelte, konnte daher ausgeschlossen werden. In Abb. C-30 sind die Massenspektren der in Abb. C-29 B

präsentierten Signale dargestellt, wobei das Massenspektrum in Abb. C-30 A durch Reduktion mit NaBH_4 , das Massenspektrum in Abb. C-30 B durch Reduktion mit NaB^2H_4 erhalten wurde. Obwohl die entsprechenden Molekülionen nicht detektiert wurden, zeigten die Massenspektren der deuterierten Alditolacetate deutlich den Einbau von zwei Deuteriumatomen. Die Fragmentationen m/z 231 bzw. m/z 233 können durch eine Spaltung der Kohlenstoffkette zwischen C-1 und C-2 erklärt werden. Eine Spaltung der Kohlenstoffkette zwischen C-2 und C-3 führt zur Bildung des Fragmentions m/z 145 unabhängig vom Reduktionsmittel und den entsprechenden Fragmentionen m/z 159 bzw. m/z 161. Die Fragmentionen m/z 129 bzw. m/z 131 können durch einen zusätzlichen Verlust von jeweils zwei Methylgruppen erklärt werden (Fox, 1999). Somit sind anhand der Alditolacetatmethode die Ergebnisse der „Abfangmethode“ mit *o*-Phenylendiamin bestätigt worden.

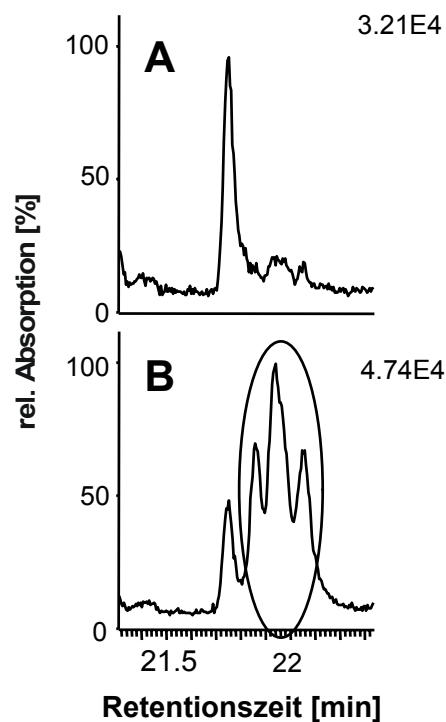


Abb. C-29: HRGC-MS-Analyse von Alditolacetaten, die aus einer Inkubation von D-Ribose-5-phosphat mit Phosphoribose-Isomerase in Phosphatpuffer (pH 7.4) bei 37 °C erhalten wurden;

A: Inkubationszeit: eine Stunde;

B: Inkubationszeit: sechs Stunden.

Trennsäule: J&W HP-5; Detektion: MS; Trägergas: Helium 5.0; Fluss: 1.0 ml/min; GC-MS System 2.

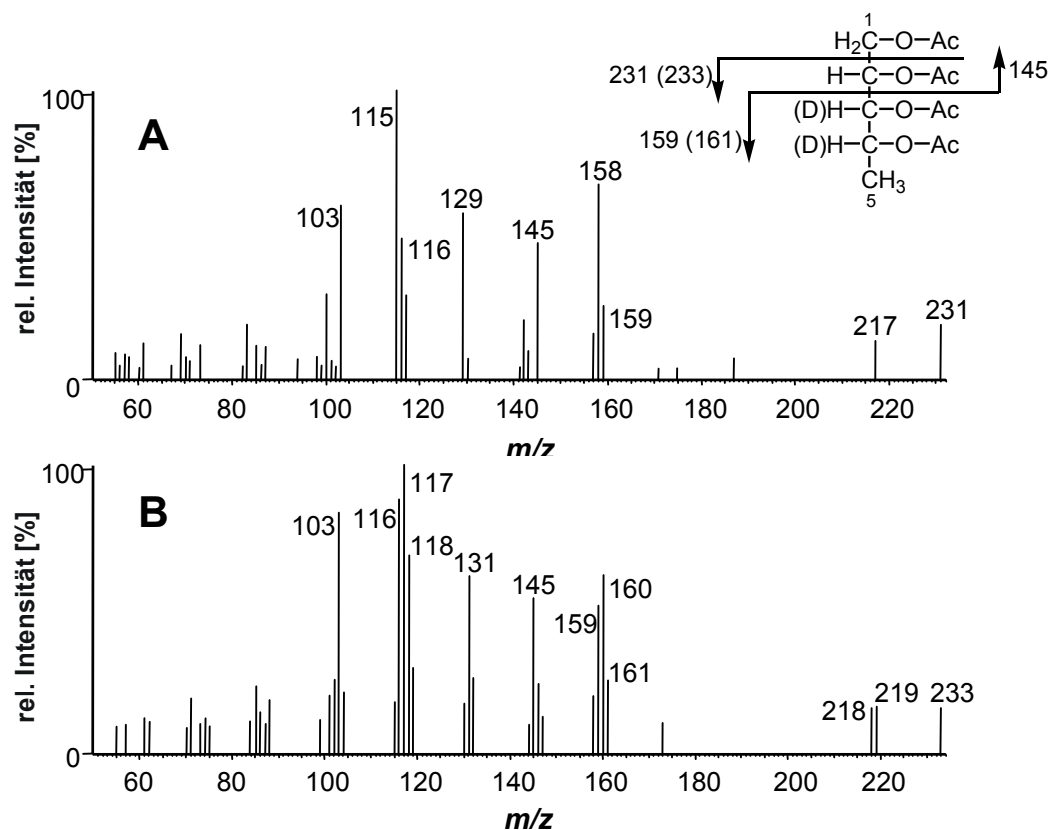


Abb. C-30: EI-Massenspektren von Alditolacetaten der unbekanntes Verbindung, die aus einer Inkubation von D-Ribose-5-phosphat mit Phosphoribose-Isomerase in Phosphatpuffer (pH 7.4) erhalten wurden (Inkubation: 6 Stunden; 37 °C);

A: nach Reduktion mit NaBH_4 und anschließender Acetylierung mit Essigsäureanhydrid;

B: nach Reduktion mit NaB^2H_4 und anschließender Acetylierung mit Essigsäureanhydrid.

Ionisation: 70 eV; Scanbereich m/z 39 – m/z 500; Scanzeit: 3.17 Scans/s; GC-MS System 2.

3.2.3.2 Untersuchungen zum Bildungsmechanismus

Der Bildungsmechanismus von DPD aus D-Ribulose-5-phosphat sollte durch Applikation von ^{13}C -markierten Vorläufern aufgeklärt werden. Der Verbleib der Isotopenmarkierung wurde sowohl im HMF- als auch im DPD-Molekül bestimmt.

Darstellung von stabil markiertem HMF und stabil markiertem 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin

Da ^{13}C -markierte Pentosephosphate nicht kommerziell erhältlich sind, wurden $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Ribulose-5-phosphat und $5\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Ribulose-5-phosphat *in situ* enzymatisch aus $2\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Glucose-6-phosphat bzw. $6\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Glucose-6-phosphat synthetisiert (Abb. C-31)

(Lee und Mitarbeiter, 1999). Die markierten D-Glucose-6-phosphate stellten wir aus den entsprechenden markierten D-Glucosen (2-¹³C-D-Glucose und 6-¹³C-D-Glucose) durch enzymatische Phosphorylierung mittels Hexokinase her. Die mittels Säulenchromatographie an einem Anionenaustauscher gereinigten markierten D-Glucose-6-phosphate sind jeweils durch einen Überschuss Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase in die entsprechenden markierten D-Ribulose-5-phosphate überführt worden. Zur Regenerierung von verbrauchtem NADP wurden Glutamat-Dehydrogenase (GDH) und α -Ketoglutarat zugesetzt. Die Transformationen der markierten D-Glucose-6-phosphate führten wir sowohl in An- als auch in Abwesenheit von *o*-Phenylendiamin durch.

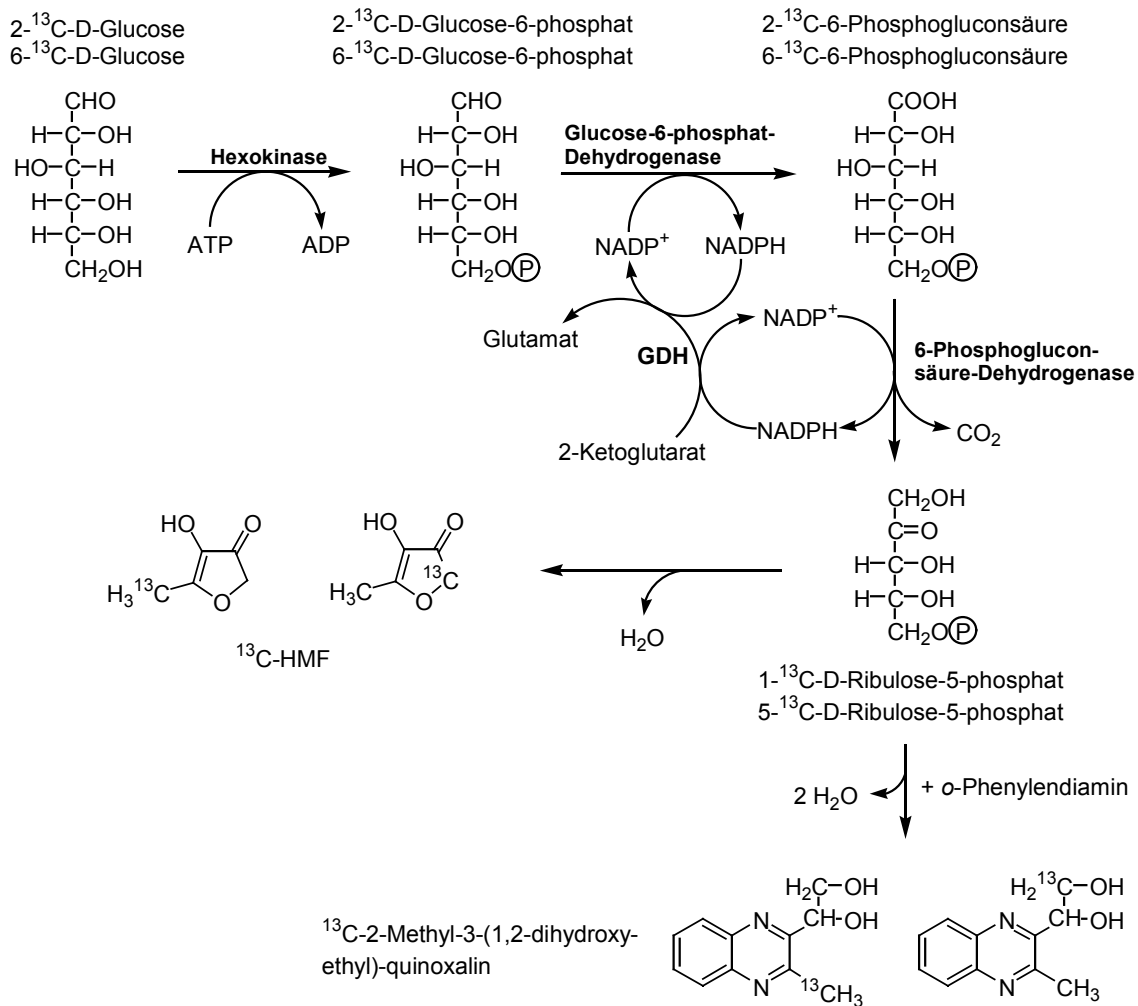


Abb. C-31: Schematische Darstellung der Synthese von ¹³C-markiertem HMF und ¹³C-markiertem 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin.

Massenspektrometrische Charakterisierung von stabil markiertem HMF

In den Proben ohne *o*-Phenylendiaminzusatz wurde HMF nach Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm detektiert. Die HPLC-MS-Analyse zeigte in beiden Fällen (Synthese aus 2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat bzw. 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat) ein Signal bei m/z 157, was den Acetonitriladdukten der protonierten einfach markierten Molekülonen von HMF entspricht. Die an unterschiedlichen Stellen im Molekül markierten Verbindungen lieferten jedoch identische Produktionenspektren. Diese waren gekennzeichnet durch die protonierten Molekülonen der einfach markierten Verbindungen m/z 116 $[M+H]^+$ und die Fragmentionen m/z 88 $[M+H-CO]^+$ und m/z 60 $[M+H-2CO]^+$. Eine exakte Lokalisierung der Markierung im Molekül konnte folglich nicht abgeleitet werden.

Massenspektrometrische Charakterisierung von stabil markiertem 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin

In den Proben mit *o*-Phenylendiaminzusatz wurde stabil markiertes 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin anhand der Retentionszeiten und der Massenspektren mittels RP-HPLC-UV bei 318 nm und HPLC-MS/MS identifiziert. Das Quinoxalinderivat, welches in den Ansätzen mit 1-¹³C-D-Ribulose-5-phosphat und 5-¹³C-D-Ribulose-5-phosphat (entspricht 2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat bzw. 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat) detektiert wurde, wies in beiden Fällen ein Pseudomolekülion m/z 206 $[M+H]^+$ auf, was den protonierten Molekülonen von einfach markiertem 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin entspricht. Ein Vergleich der Produktionen-Massenspektren erlaubte eine eindeutige Lokalisierung der Markierung in der Struktur des Quinoxalinderivates (Abb. C-32). Das Produktionen-Massenspektrum von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin, das durch Inkubation von 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat erhalten wurde, war gekennzeichnet durch die Produktionen m/z 188 $[M+H-H_2O]^+$ und m/z 159 $[M+H-H_2O-29]^+$ (Abb. C-32 A). Unter Annahme, dass die Abspaltung der Masse 29 amu auf die Abspaltung eines HCO-Radikals zurückzuführen war (Abb. C-25 C), konnte somit die ¹³C-Markierung der freien Methylgruppe am C-2 der Quinoxalinstruktur zugeordnet werden. Das Produktionen-Massenspektrum des entsprechenden Quinoxalinderivates, das im Inkubationsansatz mit 2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat gebildet wurde, wies neben dem Produktion m/z 188 $[M+H-H_2O]^+$ das Produktion m/z 158 $[M+H-H_2O-30]^+$ auf (Abb. C-32 B). Im Vergleich mit dem zuvor diskutierten Produktionen-Massenspektrum gab dies einen eindeutigen Hinweis auf die Abspaltung eines H¹³CO-Radikals. Die ¹³C-Markierung musste somit in der Dihydroxyethyl-Seitenkette des Quinoxalinderivates lokalisiert sein. Folglich entsteht die Methylgruppe im DPD-Molekül an der Position im Kohlenhydratgerüst, an welcher zuvor die Phosphatgruppe lokalisiert war.

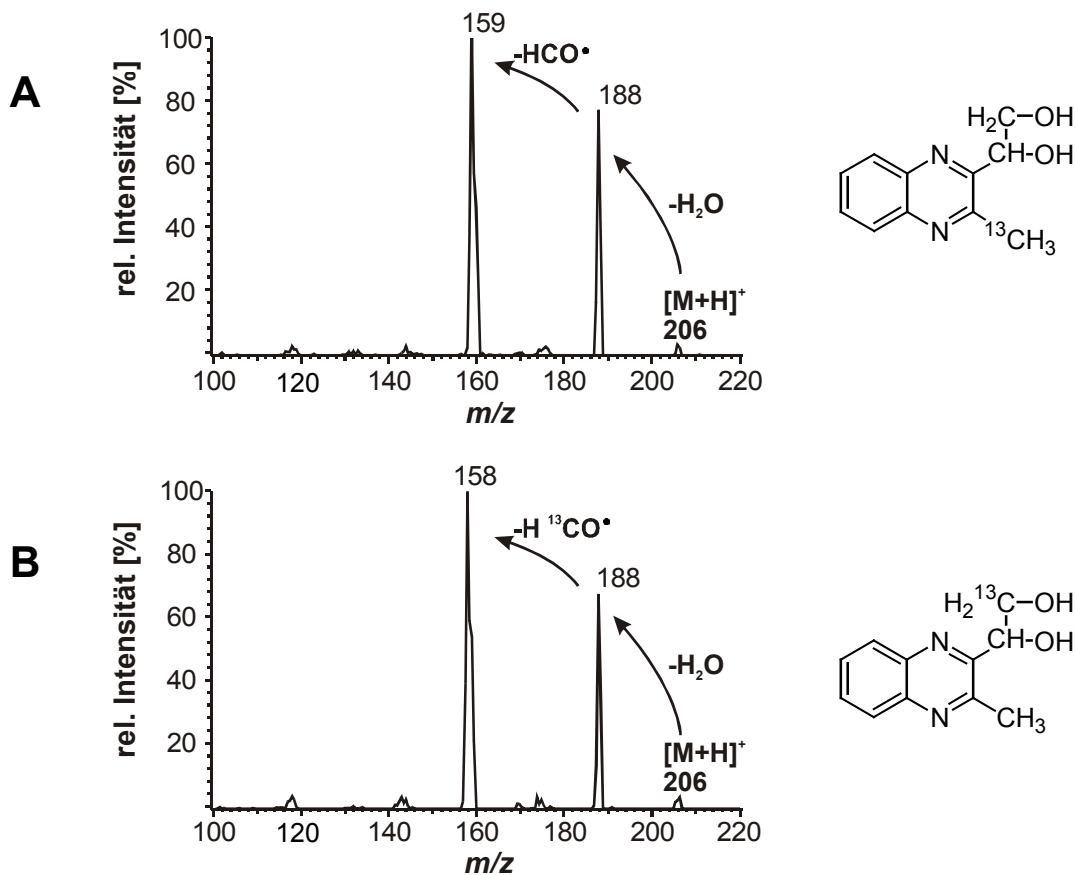


Abb. C-32: ESI-Produktionen-Massenspektren von ^{13}C -markiertem 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin, erhalten durch Inkubation von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase und *o*-Phenylendiamin mit

A: 6- ^{13}C -D-Glucose-6-phosphat;

B: 2- ^{13}C -D-Glucose-6-phosphat;

Inkubation: 22 Stunden; 30 °C; Tris-HCl-Puffer pH 7.5.

Prekursorion: m/z 206 $[M+H]^+$ (**A** und **B**); Scanbereich: m/z 30 - m/z 220; Scanzeit: 1.0 s; Stoßgasdruck: 0.27 Pa Argon; Stoßenergie: 22 eV.

Bildungsmechanismus von DPD und HMF aus D-Ribulose-5-phosphat

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass diese Ergebnisse eine Bildung von DPD aus D-Ribulose-5-phosphat infolge einer nichtenzymatischen Phosphateliminierung beweisen. Entsprechende Reaktionen wurden bereits für die Bildung von Methylglyoxal aus Dihydroxyacetonphosphat (Phillips und Thornalley, 1993) und die Überführung von D-Ribulose-1,5-diphosphat in das entsprechende 1-Desoxypentosenphosphat (Paech und Mitarbeiter, 1978) beschrieben. Da im D-Ribulose-5-phosphat-Molekül die Phosphatgruppe nicht in α - bzw. β -Stellung zur Carbonylfunktion vorliegt, wird eine anfängliche Wanderung der Carbonylfunktion von C-2 nach C-3 infolge einer 2,3-Enolisierung

angenommen. Eine anschließende 3,4-Enolisierung des Pentosephosphates kann zur β -Eliminierung der Phosphatgruppe und folglich zur Freisetzung von DPD führen (Abb. C-33). DPD ist in wässrigen Lösungen nicht stabil und wird durch Zyklisierung und Dehydratisierung zu HMF transformiert (Nevidek und Mitarbeiter, 1992; Blank und Fay, 1996; Slaughter, 1999; Winzer und Mitarbeiter, 2002). Die hohe Reaktivität von D-Ribulose-5-phosphat kann durch sein ausschließliches Vorkommen in der offenkettigen Carbonyl-Form in wässrigen Lösungen erklärt werden. Dies wurde von Franke und Mitarbeiter (1985) mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie eindeutig bewiesen.

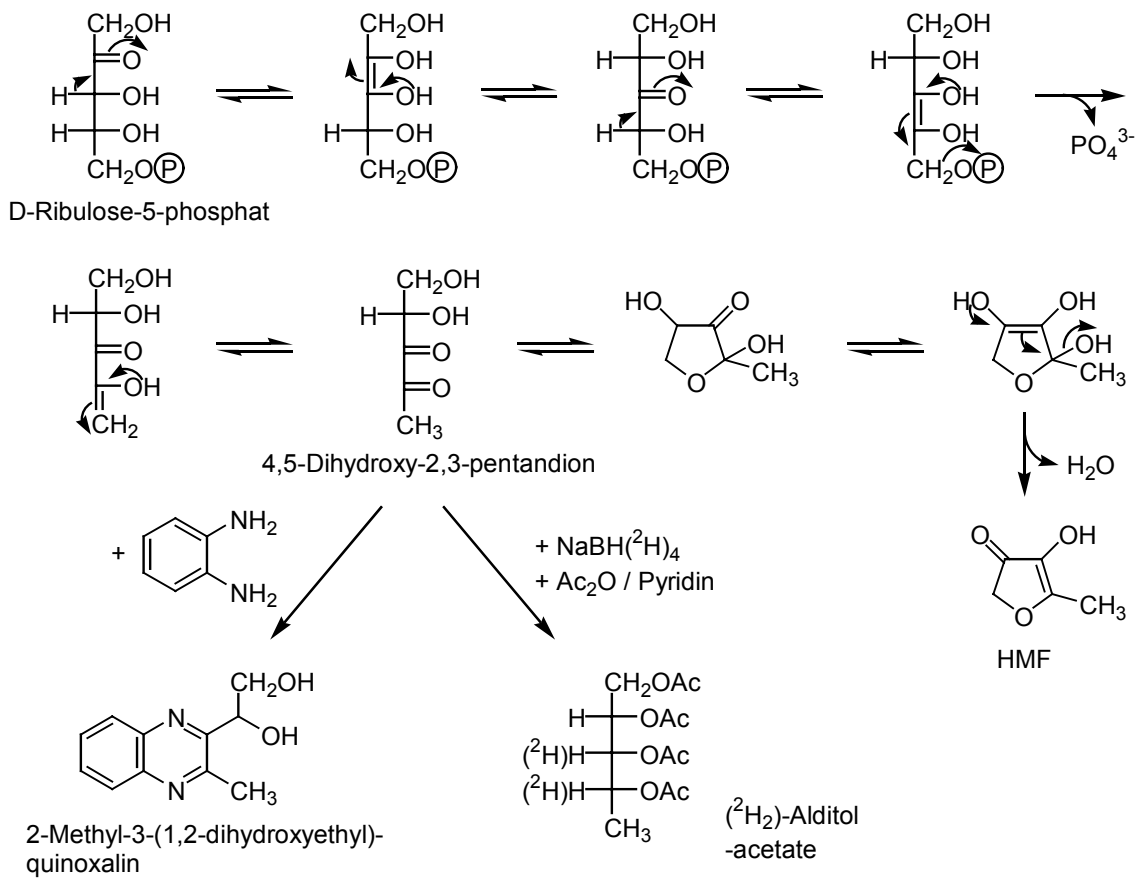


Abb. C-33: Bildungsmechanismen von DPD und seiner Alditolacetate, 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin und HMF aus D-Ribulose-5-phosphat.

3.2.4 Nachweis von DPD in Pflanzen

Außer in Himbeeren (Honkanen und Mitarbeiter, 1980) und Guaven (Idstein und Schreier, 1985) wurde HMF als genuiner Bestandteil im Aroma von Tomaten beschrieben (Buttery und Mitarbeiter, 1994). Bezüglich seiner Biosynthese in Pflanzen wurden bislang keine Untersuchungen durchgeführt. Angesichts der üblichen Temperaturen, denen Tomaten während der Reifung und Lagerung ausgesetzt sind, ist eine *in vivo*-Bildung aus dem Amadori-Produkt von Pentosen im Rahmen der Maillard-Reaktion äußerst unwahrscheinlich. Denkbar wäre hingegen eine spontane Bildung aus frei vorliegendem D-Ribulose-5-phosphat, wie sie im Rahmen dieser Arbeit bereits intensiv untersucht wurde. Daher stellte sich die Frage, ob in Analogie zu den vorherigen Untersuchungen der HMF-Vorläufer DPD in der intakten Tomate anhand seines Quinoxalinderivates nachgewiesen werden kann.

3.2.4.1 Nachweis von HMF im natürlichen Aroma von Tomaten

Zur Absicherung des natürlichen Vorkommens von HMF in den verwendeten Tomaten wurde ein Homogenat aus frischen, reifen Tomaten nach Entfernung der unlöslichen Bestandteile bei Raumtemperatur mit Diethylether im Flüssig-Flüssig-Extraktor extrahiert. Der organische Extrakt ist mittels HRGC-MS analysiert worden. HMF und HDMF konnten durch Vergleich mit den Daten authentischer Referenzsubstanzen anhand ihrer Retentionszeiten und charakteristischen EI-Massenspektren in den Extrakten detektiert werden.

3.2.4.2 Nachweis von DPD in Tomaten

Zum Nachweis des natürlichen Vorkommens von DPD in Tomaten wurde eine wässrige *o*-Phenylendiamin-Lösung in reife, intakte Tomaten injiziert. Nach der Applikation sind die Tomaten bei Raumtemperatur für 40 Stunden gelagert worden. Die Extraktion erfolgte durch Festphasen-Adsorptionschromatographie an XAD-2-Polystyrolharz nach der von Beuerle und Mitarbeitern (1997) beschriebenen Methode. Die Methode erlaubte eine unkomplizierte Abtrennung polarer Verbindungen aus dem wässrigen Tomatenhomogenat. Die adsorbierten Komponenten wurden durch Elution mit zwei Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität (Diethylether und Methanol) in einen Diethyletherextrakt und einen Methanolextrakt aufgetrennt. Im Anschluss untersuchten wir die Extrakte mittels HPLC-MS/MS auf das Vorkommen von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin. Im Diethyletherextrakt wurden zwei Verbindungen (P1 und P2) detektiert, die ein *m/z*-Verhältnis von 205 aufwiesen (Abb. C-34 A). Anhand des Produktions-Massenspektrums und der Retentionszeit konnte P2 eindeutig als 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin identifiziert werden (Abb. C-34 B). Die Koelution mit der Referenzverbindung wurde anhand eines Aufsatzversuches abgesichert. Die Identifizierung von P1 anhand des Produktions-Massenspektrums, das gekennzeichnet

war durch den Verlust von Wasser und einer zusätzlichen Abspaltung von 55 amu, war nicht möglich. Da die Massenspektren von Quinoxalinderivaten keine charakteristischen Produktionen aufweisen, konnte auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei der unbekanntem Verbindung P1 um ein Quinoxalinderivat handelt.

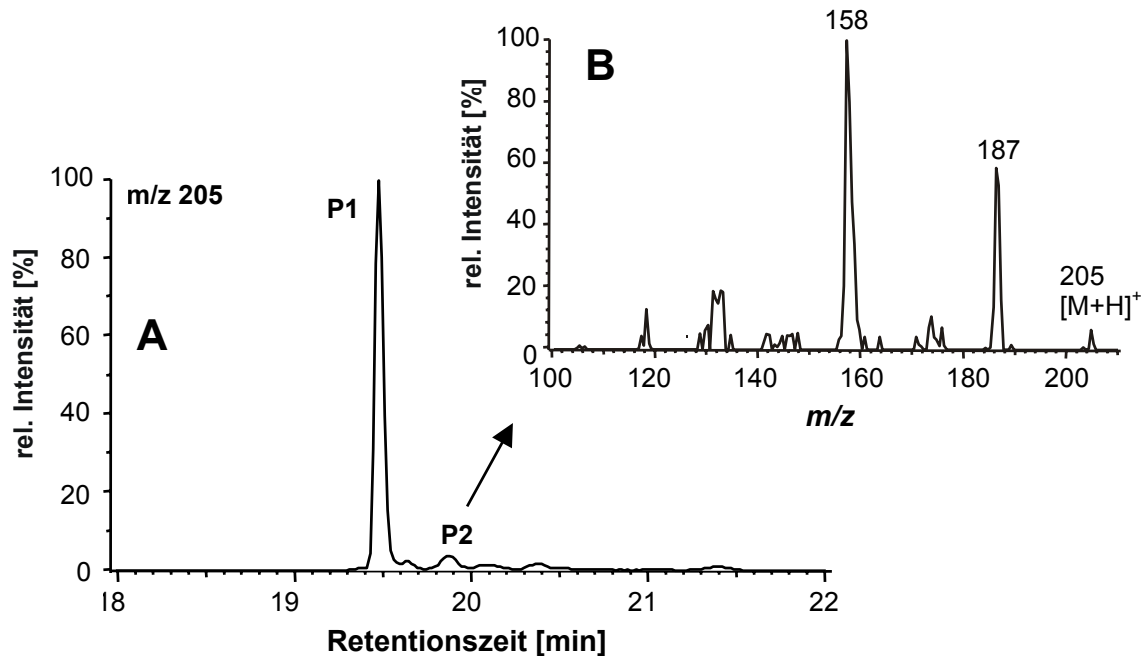


Abb. C-34: A: Ionenchromatogramm m/z 205 der HPLC-ESI-MS-Analyse des Diethylether-Extraktes aus Tomaten nach Applikation von *o*-Phenylen-diamin (Inkubation: 40 Stunden; 20 °C) und Festphasen-Adsorptionschromatographie an XAD-2-Polystyrolharz;

Trennsäule: Symmetry C-18; Fließmittel: Wasser (0.05 % TFA)/Acetonitril; Scanbereich: m/z 200 - m/z 210; Scanzeit: 1.0 s.

B: Produktionen-Massenspektrum von P2, aufgenommen unter MS/MS-Bedingungen.

Prekursorion: m/z 205 [M+H]⁺; Scanbereich: m/z 100 - m/z 220; Scanzeit: 1.0 s; Stoßgasdruck: 0.27 Pa Argon; Stoßenergie: 25 eV.

3.2.5 Diskussion der Ergebnisse

Die von Knowles und Mitarbeitern (1980) beschriebene Bildung von HMF im Rahmen der durch Phosphoribose-Isomerase (aus Spinat) katalysierten Isomerisierung von D-Ribose-5-phosphat konnte mittels UV-Spektroskopie und HPLC-Analysen eindeutig bestätigt werden. Anhand verschiedener Inkubationsexperimente ist erstmals gezeigt worden, dass es sich bei dieser Transformation um eine spontane Umlagerung von

D-Ribulose-5-phosphat in HMF unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4; 37 °C) handelt. Für diese Umlagerung wurden Umsatzraten von über 1 % nachgewiesen.

Die Inkubation in Gegenwart von *o*-Phenylendiamin führte zur nahezu selektiven Bildung eines Quinoxalinderivates, das anhand seiner spektroskopischen Daten (UV, MS, NMR) als 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin identifiziert wurde. Daraus ließ sich die Bildung von DPD in den Reaktionsansätzen ableiten. Es handelte sich hierbei um einen vielfach postulierten, aber nie als solchen eindeutig nachgewiesenen Vorläufer von HMF (Blank und Fay, 1996; Slaughter, 1999). Die Bildung einer Verbindung mit α -Dicarbonylstruktur konnte auch in Abwesenheit von *o*-Phenylendiamin anhand von synthetisierten Alditolacetaten eindeutig bestätigt werden. Eine Bildung infolge des Zusatzes des Abfangreagenzes konnte somit ausgeschlossen werden (Glomb und Tschirnich, 2001). Umsetzungen mit 1-¹³C-D-Ribulose-5-phosphat bzw. 5-¹³C-D-Ribulose-5-phosphat und die anschließende tandemmassenspektrometrische Analyse der gebildeten Quinoxalinderivate lieferten eindeutige Hinweise auf eine Bildung der Methylgruppe am C-5 des Zuckerphosphates infolge einer nicht-enzymatischen Phosphateliminierung (Phillips und Thornalley, 1993; Paech und Mitarbeiter, 1978).

Nach Applikation von *o*-Phenylendiamin an intakte, reife Tomaten wurde 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin in den Diethyletherextrakten mittels HPLC-ESI-MS/MS nachgewiesen. Dies impliziert das genuine Vorkommen von DPD in reifen Tomaten, in deren Aromaextrakten ebenfalls HMF als natürlicher Aromastoff identifiziert wurde. Demnach ist auch in natürlichen Systemen eine Bildung von HMF aus D-Ribulose-5-phosphat nach dem in Abb. C-33 dargestellten Reaktionsmechanismus über DPD denkbar. Dieses Ergebnis stellt somit nicht nur den ersten Nachweis dieser Verbindung in einem nicht-verarbeiteten Lebensmittel bzw. in Pflanzen dar, sondern auch den ersten Nachweis eines potentiellen direkten Vorläufers eines Hydroxyfuranons in einem pflanzlichen Gewebe. Es bleibt zu klären, ob DPD in der Tomate spontan entsteht oder infolge einer enzymkatalysierten Reaktion. Eine Bildung im Rahmen der Maillard-Reaktion ist angesichts der Temperaturen, denen Tomaten während der Reifung und Lagerung ausgesetzt sind, äußerst unwahrscheinlich. Eine Quantifizierung von frei vorliegendem D-Ribulose-5-phosphat in Tomaten könnte möglicherweise darüber Aufschluss geben. Darüber hinaus scheint die angewandte Methode generell für die Analyse von α -Dicarbonylstrukturen in verarbeiteten und unverarbeiteten Lebensmitteln geeignet zu sein.

In der Lebensmittelchemie und der Biochemie ist das Vorkommen von α -Dicarbonylverbindungen allgemein von großem Interesse. In erhitzten Lebensmitteln spielen sie als Vorläufer von Farb- und Aromastoffen eine wichtige Rolle, bezüglich ihres Vorkommens in unverarbeiteten Lebensmitteln ist jedoch derzeit sehr wenig bekannt. Darüber hinaus besitzen α -Dicarbonylverbindungen auch eine Reihe negativer Eigenschaften. Aufgrund ihrer Reaktivität modifizieren sie Proteine, was letztendlich zum Verlust der biologischen Verfügbarkeit von Nahrungsmittelproteinen führen kann (Glomb und Tschirnich, 2001). Die *in vivo*-Bildung von Dicarbonylverbindungen insbesondere von Glyoxal, Methyl-

glyoxal und 3-Desoxyglucoson ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden (Knecht und Mitarbeiter, 1992; Odani und Mitarbeiter, 1999; Glomb und Mitarbeiter, 1999). Auf die limitierte Verfügbarkeit authentischer Referenzverbindungen sei jedoch an dieser Stelle hingewiesen (Glomb und Tschirnich, 2001).

Die Bildung von DPD aus D-Ribulose-5-phosphat stellt darüber hinaus einen alternativen Bildungsweg dieses bedeutenden Vorläufers des bakteriellen extrazellulären Signalmoleküls AI-2 dar (Abschnitt B 1.4.3.2). DPD wird von einer Vielzahl von Bakterienarten beim Abbau von *S*-Ribosylhomocystein durch die sog. LuxS-Proteine gebildet. Im sog. „Quorum sensing“-Prozess wird ihm bzw. einem abgeleiteten Derivat eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Abschnitt B 1.4.3.2; Schauder und Mitarbeiter, 2001; Chen und Mitarbeiter, 2002; Winzer und Mitarbeiter, 2002). Die genaue Struktur dieses universalen Autoinducers ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Chen und Mitarbeiter (2002) beschrieben vor kurzem die Bildung des Autoinducers AI-2 aus DPD und Borsäure, wobei es sich bei AI-2 um einen Furanosylboratdiester handeln soll. Auf die mögliche Existenz weiterer DPD-Derivate, die in der Natur gebildet werden und als Signalmoleküle dienen können, wurde jedoch hingewiesen. Die beobachtete Bildung von DPD aus D-Ribulose-5-phosphat eröffnet somit eine Möglichkeit, größere Mengen an AI-2 *in vitro* zu produzieren. Dies könnte einen einfacheren Zugang zur exakten Strukturaufklärung dieser bedeutenden Verbindung darstellen.

4 Untersuchungen zur Bildung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF) unter physiologischen Bedingungen

4.1 Chemische Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat unter physiologischen Bedingungen

Die in Abschnitt C 2 beschriebene chemische Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in Gegenwart von Nictotinamidadenin-dinucleotiden (NAD, NADH, NADP und NADPH) unter physiologischen Bedingungen sollte anhand von verschiedenen Inkubationsexperimenten näher charakterisiert werden. Durch Applikation stabil markierter Ausgangsverbindungen wollten wir grundlegende Erkenntnisse zum Bildungsmechanismus erlangen. Wenn nicht anders vermerkt, wurde bei diesen Studien D-Fructose-1,6-diphosphat mit jeweils gleichen Mengen an NAD, NADH, NADP und NADPH (Cofaktoren) bei 30 °C in einem Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) inkubiert. Nach 30 Stunden sind die Proben einer Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen unterzogen und die Extrakte mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm analysiert worden.

4.1.1 Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat und NAD(P)H

HDMF wird unter den gewählten Reaktionsbedingungen mit sehr hoher Selektivität gebildet (Abb. C-20 C). Die Präsenz der Cofaktoren in den Reaktionsansätzen ist für die HDMF-Bildung unbedingt erforderlich, wie in Abschnitt C 2.4 eindeutig gezeigt werden konnte. HDMF wurde auch in Reaktionsansätzen gebildet, die ausschließlich die reduzierten Formen der Cofaktoren (NADH und NADPH) beinhalteten. Die zusätzliche Gegenwart der oxidierten Formen (NAD und NADP) wirkte sich jedoch positiv auf die HDMF-Ausbeuten aus. Ein Zusatz von Rinderserumalbumin (bovine serum albumine; BSA) (pI 4.9) zu den Inkubationsansätzen führte generell zu einer signifikanten Steigerung der HDMF-Bildung. Da ein Zusatz von Amyloglucosidase (pI 3.6) bzw. Trypsinogen (pI 9.3) ähnliche Effekte zeigte, konnte eine Abhängigkeit vom isoelektrischen Punkt des Proteins ausgeschlossen werden. Vielmehr erklärte diese Beobachtung die leicht erhöhten HDMF-Ausbeuten in den cytosolischen Extrakten gegenüber den Reagenzienblindwerten (Abb. C-20 A und C). Freie Aminosäuren zeigten keinen positiven Einfluss auf die Reaktion, weshalb ein stabilisierender Effekt des Proteins auf eine oder mehrere Zwischenverbindungen der Transformation angenommen wurde. Die Cofaktoren waren für die Bildung von HDMF auch in Gegenwart von Protein

oder Aminosäuren unbedingt erforderlich. Dies ließ im gegebenen Fall eine Bildung im Rahmen einer Maillard-Reaktion, wie sie von Schieberle (1992) postuliert wurde (Abschnitt B 1.3.3), als sehr unwahrscheinlich erscheinen. Vielmehr deuteten die Ergebnisse auf einen nicht-enzymatischen Transfer eines Hydrid-Ions vom reduzierten Cofaktor auf eine von D-Fructose-1,6-diphosphat abgeleitete Zuckerstruktur hin, was letzten Endes zur selektiven Bildung von HDMF führt. Da weder D-Fructose-1-phosphat noch D-Fructose-6-phosphat unter analogen Bedingungen in das Hydroxyfuranon transformiert wurde, waren die beiden Phosphatgruppen am C-1 und C-6 des Zuckers als strukturelle Grundvoraussetzung der beobachteten Reaktion zu betrachten. Schieberle (1992) erhielt hingegen beim Einsatz von D-Fructose-6-phosphat unter Maillard-Bedingungen ähnliche Ausbeuten wie beim Einsatz von D-Fructose-1,6-diphosphat. Die Inkubation von D-Fructose-1,6-diphosphat mit dem NADH-Modell 1-Benzyl-1,4-dihyronicotinamid (Lo und Mitarbeiter, 1999) führte zur Bildung vergleichbarer HDMF-Ausbeuten. Dadurch konnte die Relevanz des Nicotinsäureamid-Anteils der NADH-Struktur für die beobachtete Reaktion eindeutig gezeigt werden.

4.1.2 Charakterisierung der Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat und NAD(P)H

4.1.2.1 Einfluss der Temperatur

D-Fructose-1,6-diphosphat und die Cofaktoren wurden in einem Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) bei Temperaturen im Bereich von 20 °C bis 50 °C inkubiert. Die Inkubationsansätze sind, wie unter Abschnitt C 4.1 beschrieben, nach 30 Stunden extrahiert und analysiert worden. Zur näheren Charakterisierung des Einflusses von Protein in den Inkubationsansätzen wurde mit Proben, denen 4.6 mg/ml BSA zugesetzt waren, analog verfahren. In Abb. C-35 sind die gebildeten HDMF-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von BSA in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. In beiden Fällen wurden maximale HDMF-Ausbeuten bei 30 °C erhalten, wobei die HDMF-Ausbeuten ohne BSA-Zusatz deutlich unterhalb der Werte mit BSA-Zusatz lagen. Ursache für die geringeren HDMF-Konzentrationen bei höheren Temperaturen ist möglicherweise eine Reaktion von HDMF bzw. eines HDMF-Vorläufers mit Proteinseitenketten, z. B. ϵ -Aminogruppen oder den Aminofunktionen der Cofaktoren. Dadurch wird HDMF bzw. ein HDMF-Vorläufer bei höheren Temperaturen abgefangen, was letztendlich zu den verminderten Ausbeuten führt. Kontrollexperimente zeigten, dass HDMF in 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) auch bei 40 °C und 50 °C über einen Zeitraum von 48 Stunden stabil war. Somit konnte ein chemischer Zerfall oder eine Verflüchtigung als Ursache für die niedrigeren HDMF-Ausbeuten bei höheren Temperaturen ausgeschlossen werden.

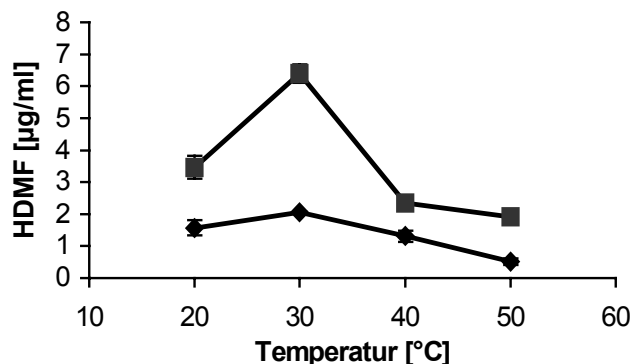


Abb. C-35: Temperaturabhängigkeit der HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat, NAD, NADH, NADP und NADPH in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) (◆) und in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), dem 4.6 mg/ml BSA zugesetzt waren (■); Inkubationszeit: 30 Stunden.

4.1.2.2 Einfluss des pH-Wertes und der chemischen Beschaffenheit des Puffers

D-Fructose-1,6-diphosphat und die Cofaktoren wurden in Pufferlösungen in einem pH-Bereich von pH 3 bis pH 10 inkubiert. Zur Überprüfung eines eventuellen Einflusses der chemischen Beschaffenheit des Puffers auf die HDMF-Bildung wurden im Bereich von pH 5 bis pH 8 jeweils zwei unterschiedliche Puffersysteme verwendet. Die Verwendung von Citrat-Phosphat-Puffer bzw. Phosphat-Puffer im Bereich von pH 3 bis pH 8 führte zu vergleichbaren durchschnittlichen HDMF-Ausbeuten von ca. 1.8 µg/ml. Der Einsatz eines Tris-HCl-Puffers im Bereich von pH 7 bis pH 10 lieferte leicht erhöhte HDMF-Konzentrationen (2.8 µg/ml).

4.1.2.3 Einfluss von Substratkonzentration und Reaktionszeit

Der Einfluss unterschiedlicher D-Fructose-1,6-diphosphat- bzw. Cofaktor-Konzentrationen auf die HDMF-Bildung ist in Abb. C-36 graphisch dargestellt. Bei einer gleichbleibenden D-Fructose-1,6-diphosphat-Konzentration führten ansteigende Cofaktor-Konzentrationen von 0 mg/ml bis 0.2 mg/ml zu einer deutlichen Zunahme der HDMF-Ausbeuten, die bei höheren Konzentrationen relativ konstant blieben (Abb. C-36 A). Hingegen zeigte sich bei gleichbleibender Cofaktor-Konzentration eine lineare Abhängigkeit der HDMF-Ausbeuten von der eingesetzten D-Fructose-1,6-diphosphat-Konzentration (Abb. C-36 B). Eine Substratsättigung wurde im gewählten Konzentrationsbereich nicht beobachtet. Diese Resultate weisen darauf hin, dass die Umlagerung der D-Fructose-1,6-diphosphat in eine unbekannte Zwischenverbindung, die von dem Cofaktor reduziert werden kann, den limitierenden Reaktionsschritt der HDMF-Bildung darstellt (Abb. C-36 C). Eine Studie zur Ermittlung der HDMF-Bildung in Abhängigkeit

von der Zeit, zeigte einen konstanten linearen Anstieg der HDMF-Ausbeuten innerhalb eines Zeitraumes von 45.5 Stunden (Abb. C-37).

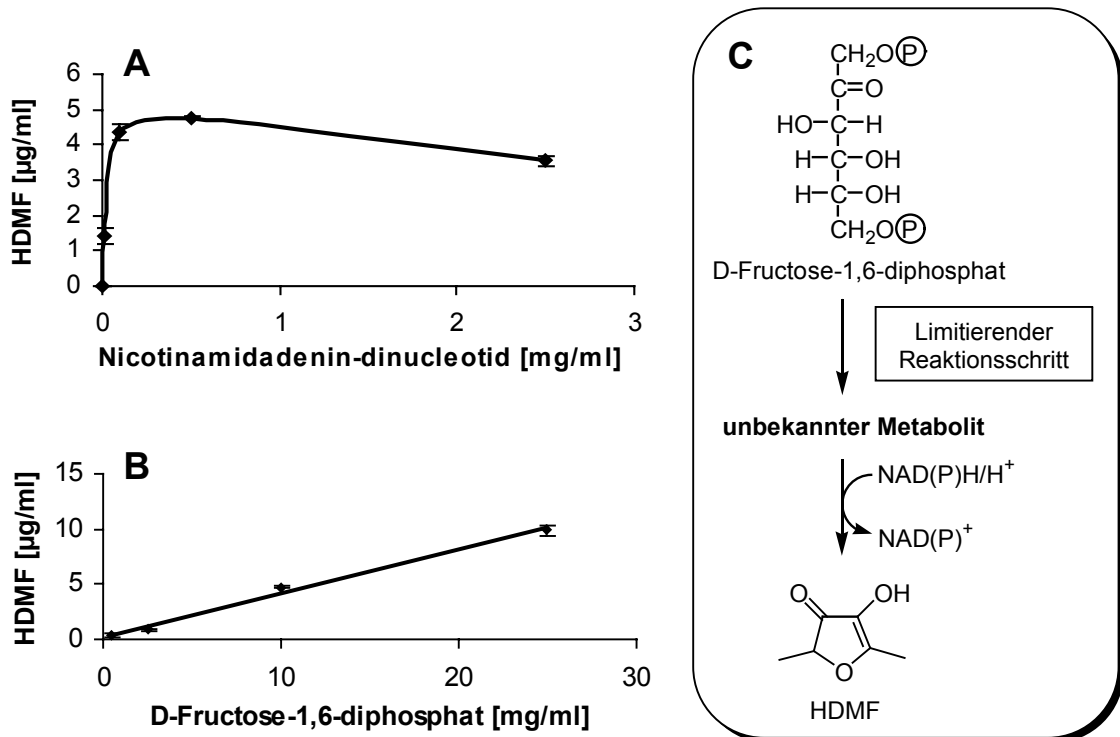


Abb. C-36: Abhängigkeit der HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat, NAD, NADH, NADP und NADPH von der Substratkonzentration; Inkubation: 30 Stunden; 30 °C; in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5;
A: Abhängigkeit von der Cofaktor-Konzentration bei konstanter D-Fructose-1,6-diphosphat-Konzentration (10 mg/ml);
B: Abhängigkeit von der D-Fructose-1,6-diphosphat-Konzentration bei konstanter Cofaktor-Konzentration (jeweils 0.5 mg/ml);
C: Aus **A** und **B** abgeleiteter Bildungsmechanismus.

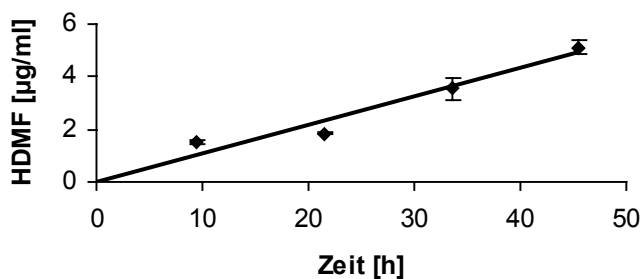


Abb. C-37: Abhängigkeit der HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat, NAD, NADH, NADP und NADPH von der Inkubationszeit; Inkubation: 30 °C; in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5.

4.1.3 Untersuchungen zum Bildungsmechanismus

Im Laufe der HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat muss formal eine Reduktion stattfinden. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse konnte eine Bildung im Sinne der Maillard-Reaktion, wie sie von Schieberle (1992) postuliert wurde (Abschnitt B 1.3.3), ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde eine Reduktion infolge eines nicht-enzymatischen Hydrid-Transfers von NAD(P)H auf eine aus D-Fructose-1,6-diphosphat abgeleitete Struktur angenommen. Die nicht-enzymatische Reduktion verschiedener funktioneller Gruppen wie z. B. Carbonylfunktionen, Azo-Gruppen oder Doppelbindungen durch NADH bzw. NADH-Modelle ist bereits mehrfach beschrieben worden (Buswell und Mitarbeiter, 1979; Miwa und Okuda, 1982; Nam und Renganathan, 1999; Wang und Mitarbeiter, 1999). Die Applikation von stereospezifisch deuteriertem und doppelt deuteriertem NADH sollte diese Annahme bestätigen.

4.1.3.1 Darstellung von stabil markierten Nicotinamidadenin-dinucleotiden

Einfach bzw. doppelt an der Position C-4 des Nicotinsäureamid-Anteils von NADH (Abb. C-38) Deuterium-markierte reduzierte Cofaktoren sind kommerziell nicht erhältlich. Für die Darstellung von an Position C-4 deuteriertem bzw. tritiiertem NAD(P)H sind jedoch zahlreiche enzymatische Synthesen beschrieben (Ottolina und Mitarbeiter, 1989; Kurz und Frieden, 1977). Die einfach stereospezifisch deuterierten Cofaktoren [4R-²H]-NADH und [4S-²H]-NADH wurden nach den in Abb. C-38 dargestellten Schemata hergestellt (Ottolina und Mitarbeiter, 1989). [4R-²H]-NADH ist mittels des durch Formiat-Dehydrogenase katalysierten Deuterid-Transfers von deuterierter Ameisensäure auf NAD⁺, der stereoselektiv in der pro-*R* Position von NAD⁺ stattfindet, dargestellt worden (You, 1982). Unter Verwendung von Glucose-Dehydrogenase, die selektiv das Deuterid von 1-²H-D-Glucose in die pro-*S* Position von NAD transferiert (You, 1982), wurde [4S-²H]-NADH synthetisiert. In beiden Fällen war die Umsetzung nahezu vollständig (> 90 %), was nach der Abtrennung von überschüssigem NAD mittels Anionenaustausch-Chromatographie an einer DEAE-Sepharose-Phase mit *off-line* UV-Detektion bei 260 nm deutlich wurde.

[4R,*S*-²H₂]-NADH wurde durch Kombination zweier publizierter Methoden nach dem in Abb. C-38 dargestellten Schema synthetisiert (Ottolina und Mitarbeiter, 1989; Kurz und Frieden, 1977). Hierbei ist im ersten Schritt nach der bereits vorgestellten Methode mittels Formiat-Dehydrogenase [4R-²H]-NADH hergestellt worden. Im zweiten Schritt erfolgte die stereoselektive Abstraktion des Hydrids in pro-*S* Position durch L-Glutamat-Dehydrogenase in Gegenwart von α -Ketoglutarat und Ammoniumionen. Das dadurch gebildete [4-²H]-NAD⁺ wurde im dritten Schritt wieder analog dem ersten Schritt mit Formiat-Dehydrogenase in Gegenwart von deuterierter Ameisensäure zum [4R,*S*-²H₂]-NADH reduziert. [4R,*S*-²H₂]-NADH ist in gleicher Weise wie die einfach deuterierten Cofaktoren an einer DEAE-Sepharose-Phase isoliert worden.

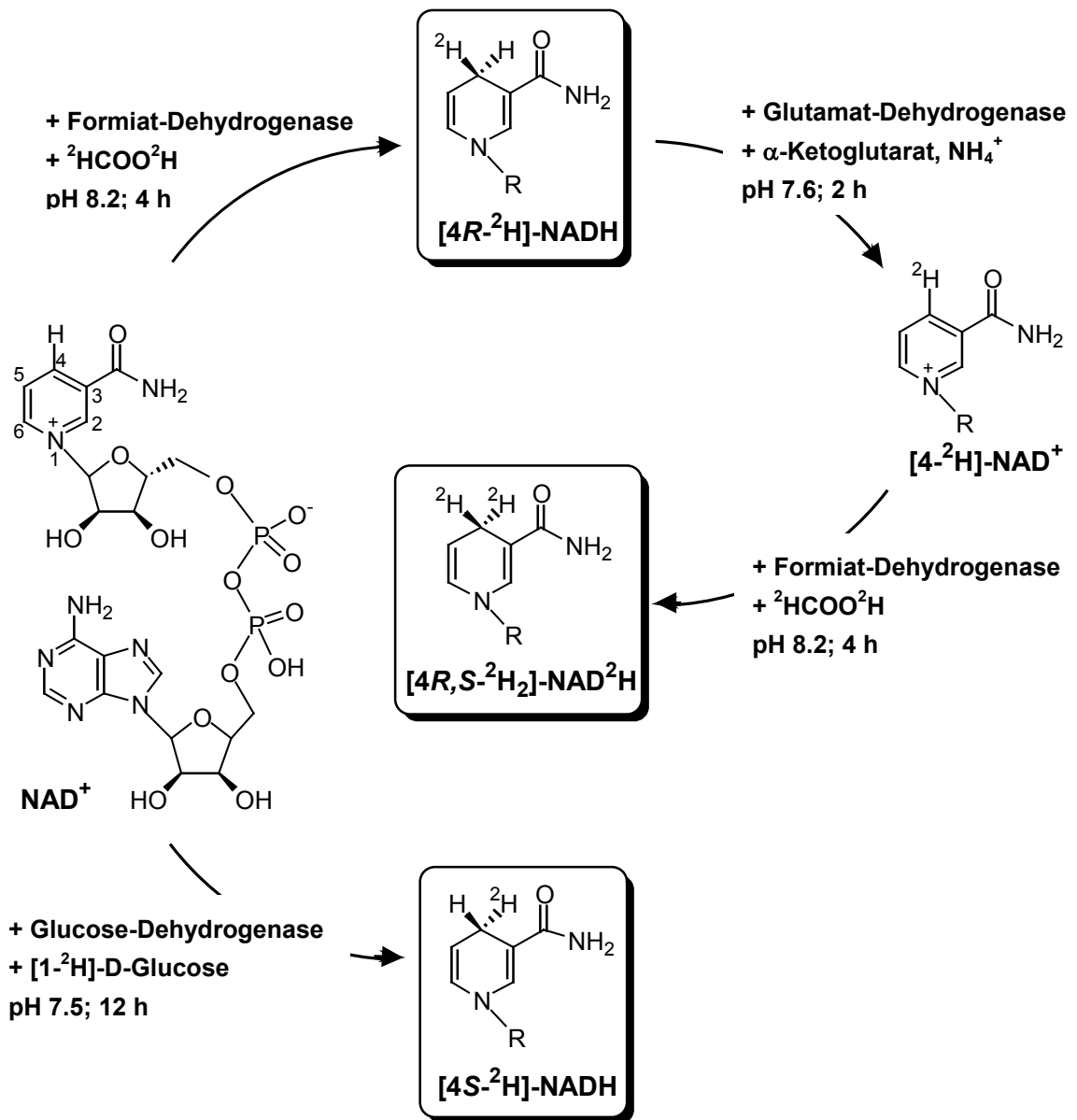


Abb. C-38: Schematische Darstellung der Synthese von stereospezifisch deuteriertem [4R- ${}^2\text{H}$]-NADH und [4S- ${}^2\text{H}$]-NADH sowie doppelt deuteriertem [4R,S- ${}^2\text{H}_2$]-NAD ${}^2\text{H}$ (Ottolina und Mitarbeiter, 1989; Kurz und Frieden, 1977).

In allen drei Fällen wurde mittels HPLC-MS der Isotopeneinbau kontrolliert und der Markierungsgrad bestimmt (Tab. C-3). Dieser wird als Verhältnis der Gesamtpeakfläche der isotopomeren Molekülonen und der Peakfläche des dazugehörigen Moleküls der markierten Verbindung in Prozent errechnet. Der Markierungsgrad beschreibt somit die Anzahl der markierten Moleküle in Verhältnis zu den vorliegenden Isotopomeren.

Tab. C-3: Markierungsgrade der synthetisierten stabil markierten Nicotinamidadenin-dinucleotide.

Synthetisierte Verbindung	Markierungsgrad
[4R- ² H]-NADH	100 % [M+1] ⁺
[4S- ² H]-NADH	100 % [M+1] ⁺
[4R,S- ² H ₂]-NADH	95.9 % [M+2] ⁺

4.1.3.2 Inkubation von D-Fructose-1,6-diphosphat mit stabil markierten Nicotinamidadenin-dinucleotiden

D-Fructose-1,6-diphosphat wurde mit [4R-²H]-NADH, [4S-²H]-NADH oder [4R,S-²H₂]-NADH in einem Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) bei 30 °C inkubiert. Nach 30 Stunden ist mittels HRGC-MS-Analyse der Einbau des Isotops des Cofaktors in die HDMF-Struktur ermittelt worden. Der Deuterideinbau bzw. der Markierungsgrad wurde durch einen Vergleich der Peakflächen der Molekülonen *m/z* 128 für unmarkiertes HDMF und *m/z* 129 für einfach deuteriertes HDMF bestimmt. Prinzipiell machen sich die relativen Häufigkeiten von ²H (0.015 %) und ¹³C (1.108 %) auch im unmarkierten HDMF bemerkbar (Schmidt und Schmelz, 1980). Natürlich vorkommendes HDMF weist infolgedessen einen Markierungsgrad von ca. 6 – 7 % auf (Abb. C-39 A). Die ermittelten Markierungsgrade sind daher keine Absolutwerte, sondern müssen immer in Relation zu Kontrollwerten betrachtet werden.

Die Verteilung der stabilen Isotope im HDMF-Molekül, das durch Inkubation von D-Fructose-1,6-diphosphat mit Deuterium-markiertem NADH gebildet wurde, zeigte eindeutig den Einbau eines Deuterium-Atoms in die HDMF-Struktur. Nach Applikation von stereospezifisch deuteriertem [4R-²H]-NADH bzw. [4S-²H]-NADH wurde in beiden Fällen für das gebildete HDMF ein Markierungsgrad von ca. 30 % ermittelt (Abb. C-39 B). Ein bevorzugter Deuterid-Transfer von der pro-*R* bzw. der pro-*S* Position konnte somit ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse sind durch die Applikation von [4R,S-²H₂]-NADH bestätigt worden. Das entsprechende HDMF-Massenspektrum zeigte nach einer Inkubationszeit von ca. 40 Stunden einen Markierungsgrad von ca. 66 %, was in etwa einer Verdoppelung des Wertes entsprach, der nach Applikation von einfach markiertem NADH erhalten wurde. Ein Deuteron-Austausch im Zielmolekül infolge der Keto-Enol-Tautomerie könnte die Ursache für die verbleibenden 34 % darstellen. Diese Annahme wurde bekräftigt durch die Beobachtung, dass der Markierungsgrad im

gebildeten HDMF in Abhängigkeit von der Inkubationszeit über einen Zeitraum von 64 Stunden konstant abnahm (von 72 % nach 24 Stunden auf 62 % nach 64 Stunden), trotz deutlich steigender HDMF-Konzentration. Die Interpretation des Fragmentierungsmusters von HDMF nach Fay und Mitarbeitern (1997) zeigte, dass die Deuteriummarkierung in einer der Methylgruppen bzw. an Kohlenstoff C-5 lokalisiert sein musste. Da das Moleküllion der markierten Verbindung (m/z 129) stark mit dem Fragmention m/z 73 korrelierte, welches durch Spaltung der C-2 – C-3 und der C-4 – C-5-Bindung des HDMF-Moleküls gebildet wird, konnte eine Deuteriummarkierung in der Hydroxylfunktion ausgeschlossen werden. Des Weiteren würde eine Deuteriummarkierung in der Hydroxylfunktion infolge eines Austausches mit Protonen des Mediums sehr schnell verloren gehen. Das Moleküllion der markierten Verbindung (m/z 129) korrelierte ebenfalls mit den markierten Fragmentionen m/z 86, m/z 58 und m/z 44, die durch Spaltung der O – C-2-(oder O – C-5) und der C-4 – C-5-(oder C-2 – C-3) –Bindung des Hydroxyfuranons gebildet werden (Abb. C-39). Dies stellt einen weiteren Beweis für die Lokalisierung der Deuteriummarkierung in einer der Methylgruppen bzw. an Kohlenstoff C-5 dar.

4.1.3.3 Inkubation von 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat mit NADH und [4R,S-²H₂]-NADH

Zur exakten Lokalisierung der Deuteriummarkierung im HDMF-Molekül wurde 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat unter Standardbedingungen mit unmarkiertem NADH bzw. doppelt deuteriertem NADH inkubiert. Nach 40 Stunden sind die Proben aufgearbeitet und mittels HRGC-MS analysiert worden. Durch Inkubation mit unmarkiertem NADH wurde ausschließlich einfach markiertes HDMF gebildet (Abb. C-39 C). Im Falle der Inkubation mit [4R,S-²H₂]-NADH gaben das HDMF-Isotopomer mit Moleküllion m/z 130 sowie das Fragmention m/z 74 eindeutige Hinweise auf die Präsenz von zwei Markierungen (¹³C und ²H) im Zielmolekül (Abb. C-39 D). Die dazugehörigen Fragmentionen m/z 86, m/z 58 und m/z 44 waren hingegen nur einfach markiert. Das Fragmentierungsmuster dieses HDMF-Isotopomers kann folglich nur dadurch erklärt werden, dass sich die Deuteriummarkierung an C-5 oder C-6 befindet, wenn die Nummerierung der Kohlenstoffkette mit dem ¹³C an Kohlenstoff C-1 beginnt. Eine Lokalisierung der Deuteriummarkierung an den Kohlenstoffen C-1 bzw. C-2 würde unweigerlich zur Bildung doppelt markierter Fragmentionen m/z 87, m/z 59 und m/z 45 führen. Dieses Ergebnis impliziert somit einen Hydridtransfer von NADH nach C-5 oder C-6 der Kohlenstoffkette von D-Fructose-1,6-diphosphat.

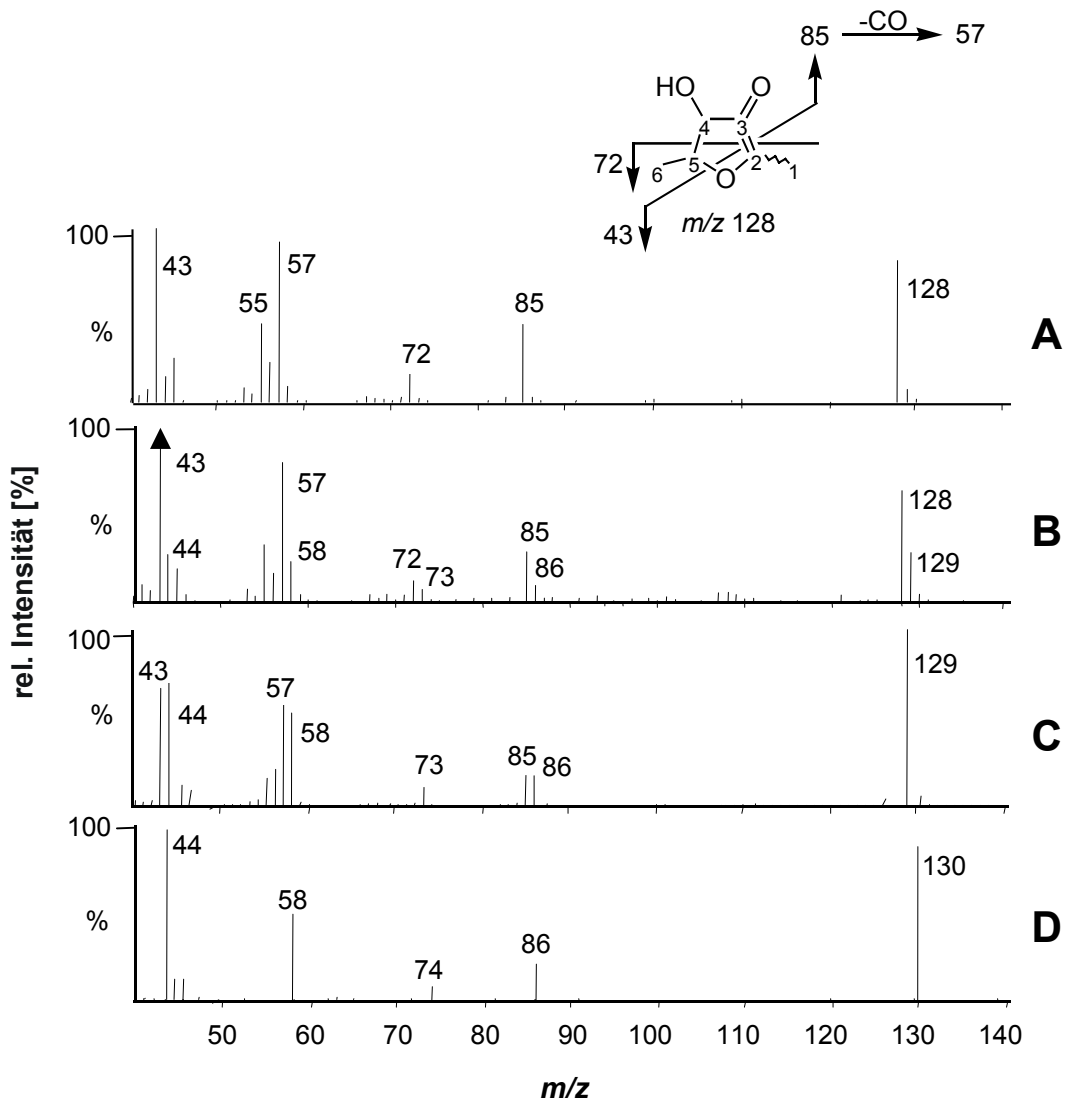


Abb. C-39: **A:** EI-Massenspektrum der HDMF-Isotopomere, erhalten durch Inkubation von D-Fructose-1,6-diphosphat mit NAD, NADP, NADH und NADPH;
B: EI-Massenspektrum der HDMF-Isotopomere, erhalten durch Inkubation von D-Fructose-1,6-diphosphat mit [4R-²H]-NADH;
C: EI-Massenspektrum der HDMF-Isotopomere, erhalten durch Inkubation von 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat mit NAD, NADP, NADH und NADPH;
D: EI-Massenspektrum des doppelt markierten HDMF-Isotopomers, erhalten durch Inkubation von 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat mit [4R,S-²H₂]-NADH.

Ionisation: 70 eV; Scanbereich: m/z 41 – m/z 250; Scandauer: 0.4 s; GC-MS System 1.

4.1.4 Diskussion der Ergebnisse

Aufgrund dieser Ergebnisse wird der in Abb. C-40 dargestellte Bildungsmechanismus vorgeschlagen. Ein für Kohlenhydrate beachtlicher Teil des D-Fructose-1,6-diphosphats liegt in der reaktiven offenkettigen Carbonylform vor (1.7 %; Benkovic, 1979). Eine anfängliche 2,3-Enolisierung dieser offenkettigen Form führt über die Endiolstruktur zur β -Eliminierung der Phosphatgruppe an C-1. Ähnliche chemische Reaktionen wurden bereits für die Bildung von Methylglyoxal aus Dihydroxyacetonphosphat (Phillips und Thornalley, 1993) und die Überführung von D-Ribulose-1,5-diphosphat in das entsprechende 1-Desoxypentosephosphat (Paech und Mitarbeiter, 1978) beschrieben. Des Weiteren steht diese Annahme mit den Ergebnissen aus Abschnitt C 3.2.3.2 im Einklang. Infolge weiterer Enolisierungsschritte wird auch die Phosphatgruppe an C-6 eliminiert, wodurch Acetylformoin gebildet wird, das in verschiedenen isomeren Strukturformen vorliegt. Durch eine Reduktion der C-5 – C-6-Doppelbindung oder der Carbonylfunktion an C-5, vermittelt durch einen Hydrid-Transfer von NADH auf C-5 oder C-6, und anschließende Zyklisierung und Dehydratisierung kann HDMF freigesetzt werden. In analogen Inkubationsexperimenten, bei denen Acetylformoin anstelle des Zuckerphosphates zum Einsatz kam, konnte jedoch kein HDMF detektiert werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Acetylformoin in wässrigen Lösungen ausschließlich in der zyklischen Form vorliegt (Engel und Mitarbeiter, 2001), die offensichtlich nicht in ähnlicher Art und Weise reduziert werden kann (Abb. C-40).

Meyers und Brown (1987) zeigten anhand von Experimenten mit NADH-Modellen und Carbonyl-Verbindungen, dass nach Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Modell und der Carbonylverbindung ein intramolekularer Hydrid-Transfer stattfand. Wir nehmen auch in unserem Fall die Ausbildung einer Enamin-Zwischenverbindung, die aus NADH und D-Fructose-1,6-diphosphat gebildet wird, an. Dadurch würde eine Zyklisierung des Zuckermoleküls zunächst inhibiert werden, was wiederum eine Steigerung der Reaktivität zur Folge hätte und somit die zweite Phosphatgruppen-Eliminierung begünstigen würde. Im Anschluss an einen intramolekularen Hydridtransfer könnte NAD^+ freigesetzt und HDMF gebildet werden.

Die beschriebenen Experimente beweisen erstmals die Bildung von HDMF unter physiologischen Bedingungen (neutraler pH-Wert; 30 °C) aus D-Fructose-1,6-diphosphat infolge einer nicht-enzymatischen Reduktion vermittelt durch NAD(P)H. Aufgrund der sehr niedrigen Umsetzungsraten (ca. 0.1 %) kann diese Bildung jedoch nicht die Ursache für das natürliche Vorkommen von HDMF darstellen. Beispielsweise wurden in Erdbeeren HDMF-Konzentrationen von ca. 26 - 60 mg/kg Frischgewicht nachgewiesen (Roscher, 1998). In Früchten sind aber nur D-Fructose-1,6-diphosphat-Konzentrationen von ca. 0.02 – 0.05 mg/g Frischgewicht ermittelt worden (Parekh und Mitarbeiter, 1970; Salminen und Young, 1975), die letztendlich um einen Faktor von 200 niedriger sind als die in den Inkubationsexperimenten eingesetzten Konzentrationen. Daher setzten wir in Pflanzen einem enzymatischen Bildungsweg voraus. Die enzymatische Bildung von

HDMF durch die Hefe *Z. rouxii* konnte anhand der Enantiomerenanalytik (C 1.3.4) bereits eindeutig nachgewiesen werden.

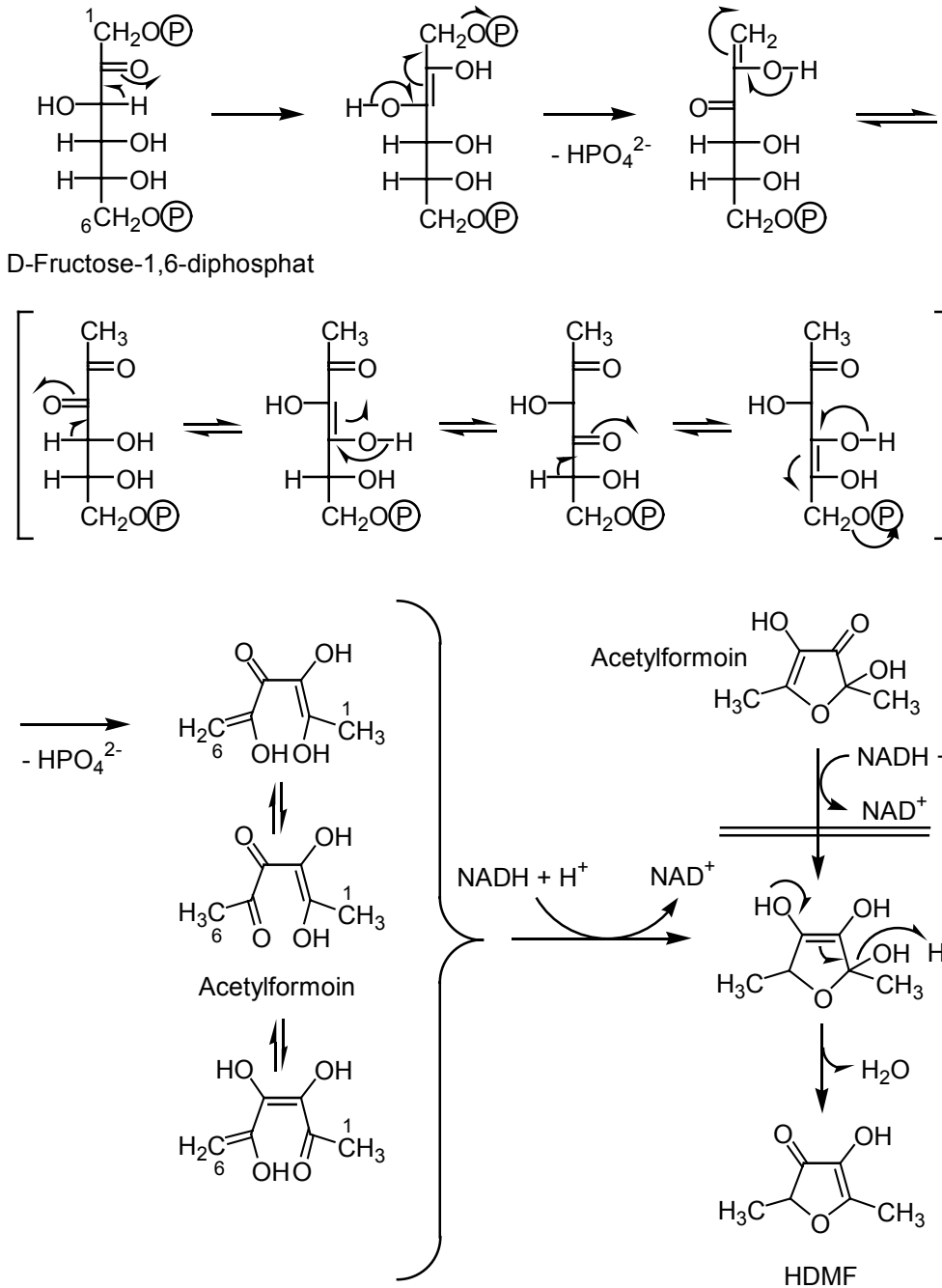


Abb. C-40: Vorgeschlagerener Bildungsweg von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in Gegenwart von Nicotinamidadenin-dinucleotiden.

4.2 Identifizierung einer Zwischenverbindung der HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat

Die Metabolisierungsstudien mit stabil markierten Vorläufern gaben eindeutige Hinweise auf eine Lokalisierung des initiierenden Reaktionsschrittes der HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch *Z. rouxii* außerhalb des Cytosols der Hefezelle (Abschnitt C 1.1). Aufgrund der Daten aus Abschnitt C 4.1 wurde davon ausgegangen, dass D-Fructose-1,6-diphosphat im Nährmedium spontan in eine Zwischenverbindung umgelagert wird, durch deren Reduktion HDMF freigesetzt werden kann. Daher sollte das Nährmedium hinsichtlich potentieller Zwischenverbindungen der HDMF-Bildung untersucht werden. Dabei wurde in Analogie zu Abschnitt C 3.2.3.2 von einer spontanen Bildung reaktiver α -Dicarbonylintermediate ausgegangen. Dies stünde auch mit dem in Abschnitt C 4.1.4 postulierten Reaktionsmechanismus im Einklang.

4.2.1 Nachweis von Dicarbonylverbindungen abgeleitet aus D-Fructose-1,6-diphosphat im Nährmedium von *Z. rouxii*

4.2.1.1 HPLC-DAD-Analysen

Die Bildung von α -Dicarbonylstrukturen aus D-Fructose-1,6-diphosphat, das dem Nährmedium zugesetzt worden war, sollte in An- und Abwesenheit von *Z. rouxii*-Zellen untersucht werden. In Analogie zu Abschnitt C 1 wurden hierfür drei Aliquote eines YPD-Nährmediums hergestellt. Zwei dieser Lösungen ist D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt worden, von denen wiederum eine Lösung mit *Z. rouxii*-Zellen angeimpft wurde. Nach sechs Tagen Inkubationszeit setzten wir den Lösungen *o*-Phenylendiamin zu und nach einer weiteren Inkubationsperiode über Nacht sind die Medien mittels HPLC-DAD analysiert worden (Abb. C-41). Im Ansatz, der D-Fructose-1,6-diphosphat und *Z. rouxii*-Zellen beinhaltetete, wurden neben HDMF drei Verbindungen detektiert, die ein für Quinoxalinderivate charakteristisches UV-Spektrum mit zwei Absorptionsmaxima bei 238 nm und 318 nm aufwiesen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden diese Verbindungen entsprechend ihrer Elutionsreihenfolge mit **Q1**, **Q2** bzw. **Q3** bezeichnet (Abb. C-41 A). **Q1** und **Q2** konnten auch im Ansatz, der D-Fructose-1,6-diphosphat, aber keine Hefezellen beinhaltetete, detektiert werden (Abb. C-41 B). Im Kontrollansatz ohne D-Fructose-1,6-diphosphat und ohne *Z. rouxii*-Zellen war keine dieser Verbindungen nachweisbar (Abb. C-41 C). Daher wurde eine Bildung von **Q1** und **Q2** infolge einer Kondensation von *o*-Phenylendiamin mit nicht-enzymatisch aus D-Fructose-1,6-diphosphat gebildeten Strukturen abgeleitet. Die Bildung von HDMF und **Q3** wurde hingegen nur im Inkubationsansatz mit D-Fructose-1,6-diphosphat und Hefezellen beobachtet, was einen entscheidenden Beitrag der Hefezellen an der Bildung dieser Verbindungen impliziert. Die weiteren detektierten Verbindungen (Abb. C-41) wurden

nicht näher untersucht, da sie weder für Furanone noch für Quinoxaline charakteristische UV-Spektren aufwiesen. Nach einer Festphasenextraktion an XAD-2 Material (Abschnitt C 3.2.4.2; Beuerle und Mitarbeiter, 1997) wurden Diethylether- und Methanolextrakt mittels RP-HPLC-UV bei 318 nm analysiert. Dabei zeigte sich, dass **Q1**, **Q2** und **Q3** ausschließlich mit Methanol eluiert wurden, während HDMF nur im Diethyletherextrakt zu detektieren war.

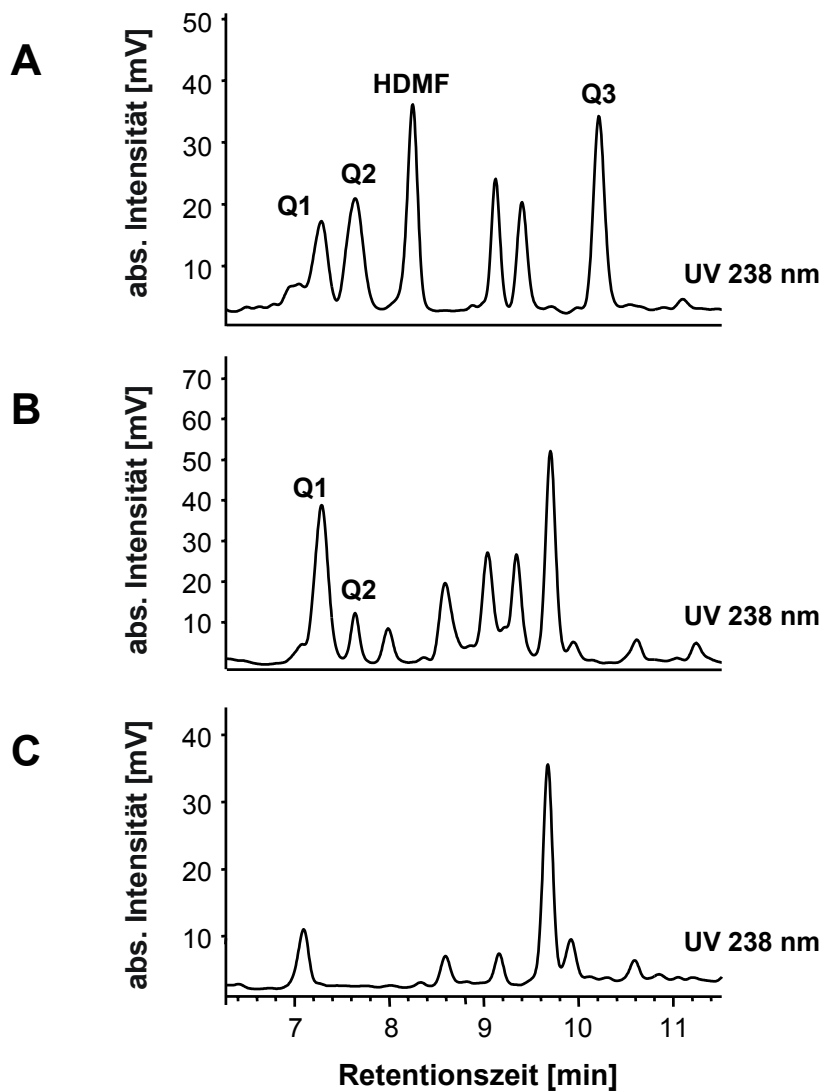


Abb. C-41: RP-HPLC-DAD-Analyse von mit *o*-Phenylendiamin inkubierten YPD-Nährmedien; Inkubation: 14 Stunden; 30 °C;

A: YPD-Nährmedium mit D-Fruktose-1,6-diphosphat und *Z. rouxii*-Zellen;

B: YPD-Nährmedium mit D-Fruktose-1,6-diphosphat;

C: YPD-Nährmedium ohne Zusätze (Inkubation: 6 Tage; 30 °C).

Trennsäule: Eurospher 100 C-18; Detektion: UV 238 nm; Fluss: 1 ml/min; Fließmittel: Wasser (0.05 % TFA)/Acetonitril; HPLC 3.

4.2.1.2 Massenspektrometrische Charakterisierung

Nach einer weiteren Aufreinigung der Methanolfraktion aus Abschnitt C 4.2.1.1 mittels Säulenchromatographie an RP18-Material wurden anhand von HPLC-MS-Analysen Pseudomolekülonen m/z 331 $[M+H]^+$ für **Q1**, m/z 315 $[M+H]^+$ für **Q2** sowie m/z 299 $[M+H]^+$ für **Q3** bestimmt. Die Produktionsmassenspektren der Verbindungen waren jeweils durch den Verlust von 98 Masseneinheiten gekennzeichnet, was auf eine jeweilige Abstraktion von Phosphorsäure zurückzuführen ist (Feuerle, 2000). In Abb. C-41 ist exemplarisch das Produktionsmassenspektrum der Verbindung **Q2** dargestellt. Die massenspektrometrischen und UV-spektroskopischen Daten implizierten somit, dass es sich bei **Q1**, **Q2** und **Q3** um phosphorylierte Quinoxalinderivate handelt. Diese könnten durch Kondensation von *o*-Phenylendiamin mit aus D-Fructose-1,6-diphosphat abgeleiteten phosphorylierten α -Dicarbonylstrukturen gebildet werden. Aufgrund der Massenunterschiede von **Q1** und **Q2** bzw. **Q2** und **Q3** (jeweils 16 amu) schienen sich die drei Verbindungen lediglich im Hydroxylierungsgrad zu unterscheiden.

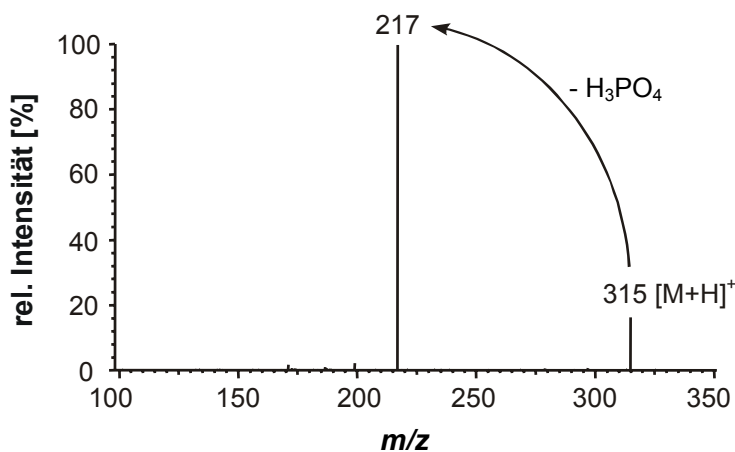


Abb. C-41: Produktionsmassenspektrum des Quinoxalinderivates **Q2**, aufgenommen unter HPLC-MS/MS-Bedingungen.

Prekursorion: m/z 315 $[M+H]^+$; Scanbereich: m/z 20 - m/z 350; Scanzeit: 1.0 s; Stoßgasdruck: 0.27 Pa Argon; Stoßenergie: 25 eV.

4.2.2 NMR-spektroskopische Identifizierung von Q1, Q2 und Q3

Zur Strukturaufklärung wurden die Verbindungen **Q1**, **Q2** und **Q3** aus einem Nährmedium mit D-Fruktose-1,6-diphosphat, *Z. rouxii*-Zellen und *o*-Phenylendiamin (Abschnitt C 4.2.1) mittels Säulenchromatographie an RP-18-Material isoliert. Die NMR-spektroskopische Charakterisierung umfasste ^1H -, ^{13}C -, ^{31}P -, DEPT-, ^1H - ^1H -COSY sowie HMBC- und HMQC-Experimente. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten sind in den Tabellen C-4 und C-5 zusammengefasst. Die aus diesen Daten abgeleiteten Strukturen sind in Abb. C-42 dargestellt.

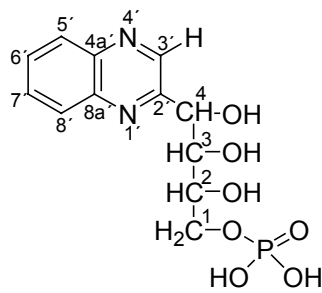
Die Signale des Phenylrings der Quinoxalin-Grundstruktur (H-5' - H8'; C-4a' - C-8a') waren in den ^1H - und ^{13}C -Spektren nahezu identisch (McNab, 1982; Vermeersch und Mitarbeiter, 1984; Hofmann, 1998; Glomb und Pfahler, 2000). Deutliche Unterschiede traten hingegen bei den vom Zuckerphosphat abgeleiteten Substituenten an C-2' und C-3' auf. Die NMR-Daten von **Q1** zeigten die Bindung eines Protons am C-3' der Quinoxalin-Grundstruktur anhand eines Singulets bei 9.14 ppm im ^1H -Spektrum (H-3') und einer HMQC-Korrelation zwischen H-3' und C-3'. Die NMR-Daten von **Q2** und **Q3** zeigten hingegen eine freie Methylgruppe am C-3' der Quinoxalin-Grundstruktur aufgrund der chemischen Verschiebung von C-3a' ($\delta_{\text{C}} = 22.5$ ppm für **Q2** und **Q3**) und der HMBC-Korrelation zwischen H-3a' and C-2'. Für **Q1** bewiesen die NMR-Daten des Weiteren die Bindung eines 1-Phospho-2,3,4-trihydroxybutyl-Restes am C-2'. Für **Q2** wurde ein 1-Phospho-2,3-dihydroxypropyl-Rest am C-2' des Quinoxalin-Grundgerüsts nachgewiesen. Die aufgespaltenen Signale in den ^{13}C -Spektren infolge einer Phosphor-Kohlenstoff-Kopplung ($^2J_{\text{C-1,P}} = 5.2$ Hz und $^3J_{\text{C-2,P}} = 7.5$ Hz für **Q1**; $^2J_{\text{C-1,P}} = 5.5$ Hz und $^3J_{\text{C-2,P}} = 7.5$ Hz für **Q2**) zeigten in beiden Fällen das Vorliegen der Phosphatgruppe an C-1. Die Phosphor-Kohlenstoff-Kopplungskonstanten waren in etwa vergleichbar mit den für D-Ribulose-5-phosphat veröffentlichten Kopplungskonstanten ($^2J_{\text{C-5,P}} = 5.9$ Hz und $^3J_{\text{C-4,P}} = 7.3$ Hz; Serianni und Mitarbeiter, 1979). Die Existenz der Phosphatgruppe konnte zusätzlich jeweils mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Demzufolge wurden **Q1** und **Q2** eindeutig als Phosphorsäure-mono-(2,3,4-trihydroxy-4-quinoxalin-2-yl-butyl)-ester und Phosphorsäure-mono-[2,3-dihydroxy-3-(3-methyl-quinoxalin-2-yl)-propyl]-ester identifiziert (Abb. C-42). Für **Q3** zeigten die NMR-Daten einen 1-Phospho-2-hydroxypropyl-Rest am C-2' der Quinoxalin-Grundstruktur. Die Position der Methylen-Gruppe an C-3 wurde durch die chemische Verschiebung ($\delta_{\text{C-3}} = 39.0$ ppm) und das entsprechende negative Signal im DEPT-Spektrum bewiesen. Analog zu **Q1** und **Q2** ist die Bindung einer Phosphatgruppe durch ein Signal im ^{31}P -NMR-Spektrum und die aufgespaltenen Signale im ^{13}C -Spektrum ($^2J_{\text{C-1,P}} = 5.7$ Hz und $^3J_{\text{C-2,P}} = 8.3$ Hz) bestätigt worden. **Q3** konnte folglich eindeutig als Phosphorsäure-mono-[2-hydroxy-3-(3-methyl-quinoxalin-2-yl)-propyl]-ester identifiziert werden (Abb. C-42).

Tab. C-4: ^1H -NMR-Daten (600 MHz; $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$) der Quinoxalinderivate **Q1**, **Q2** und **Q3**.

Signal	Chemische Verschiebung (ppm)		
	Q1	Q2	Q3
Quinoxalin			
H-5' } H-8' }	7.82 (m, 2H)	7.77 (m, 2H)	7.74 (m, 2H)
H-6' } H-7' }	8.08 (m, 2H)	8.01 (m, 1H), 7.98 (m, 1H)	8.02 (m, 1H), 7.97 (m, 1H)
Substituent an C-2'			
H-1	4.16 (m, 1H), 4.29 (m, 1H)	4.28-4.35 (m, 2H)	4.09 (m, 2H)
H-2	4.06 (m, 1H)	4.38 (m, 1H)	4.51 (m, 1H)
H-3	3.97 (d, 1H)	5.14 (d, 1H)	3.25 (m, 2H)
H-4	5.34 (s, 1H)	---	---
Substituent an C-3'			
H-3'	9.14 (s, 1H)	---	---
H-3a'	---	2.87 (s, 3H)	2.81 (s, 3H)

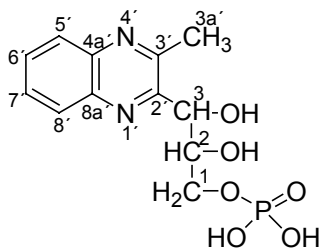
Tab. C-5: ^{13}C -NMR-Daten (150 MHz; $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$) der Quinoxalinderivate **Q1**, **Q2** und **Q3**.

Signal	Chemische Verschiebung (ppm)		
	Q1	Q2	Q3
Quinoxalin			
C-2'	159.8	157.6	156.1
C-3'	145.8	155.3	155.7
C-4a'	142.5	141.9	141.6
C-5'	131.5	131.2	130.7
C-6'	129.7	128.7	128.7
C-7'	129.8	129.8	129.3
C-8'	130.9	130.4	130.4
C-8a'	142.7	142.1	142.0
Substituent an C-2'			
C-1	69.6 ($^2J_{\text{C-1,P}} = 5.2$ Hz)	69.2 ($^2J_{\text{C-1,P}} = 5.5$ Hz)	70.7 ($^2J_{\text{C-1,P}} = 5.7$ Hz)
C-2	71.5 ($^3J_{\text{C-2,P}} = 7.5$ Hz)	74.8 ($^3J_{\text{C-2,P}} = 7.5$ Hz)	70.8 ($^3J_{\text{C-2,P}} = 8.3$ Hz)
C-3	74.8	71.2	39.0
C-4	73.5	---	---
Substituent an C-3'			
C-3a'	---	22.5	22.5



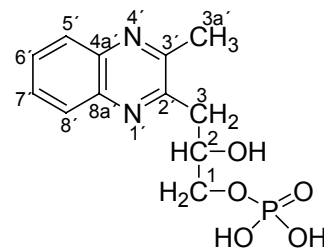
Phosphorsäure-mono-(2,3,4-trihydroxy-4-quinoxalin-2-yl-butyl)-ester

Q1



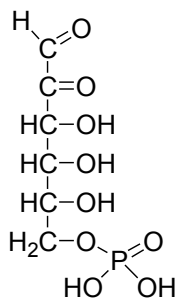
Phosphorsäure-mono-[2,3-dihydroxy-3-(3-methyl-quinoxalin-2-yl)-propyl]-ester

Q2



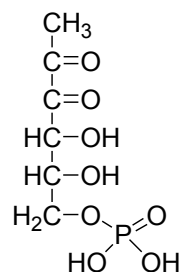
Phosphorsäure-mono-[2-hydroxy-3-(3-methyl-quinoxalin-2-yl)-propyl]-ester

Q3



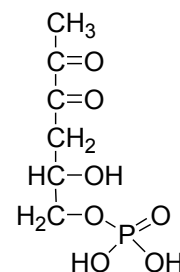
2-Hexosulose-6-phosphat

D1



1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat

D2



1,4-Didesoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat

D3

Abb. C-42: Strukturen der Quinoxalinderivate **Q1**, **Q2** und **Q3**, isoliert aus einem Fermentationsansatz bestehend aus *Z. rouxii* in YPD-Medium mit 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat (Inkubationszeit: 6 Tage), dem *o*-Phenylendiamin zugesetzt worden war (Inkubationszeit: ca. 14 Stunden), sowie die daraus abgeleiteten α -Dicarbonylstrukturen **D1**, **D2** und **D3**.

4.2.3 Inkubation von Proteinextrakten aus *Z. rouxii*

Die in Abschnitt C 4.2.2 nachgewiesene Bildung von **Q2** impliziert eine von den Hefezellen unabhängige Bildung des postulierten HDMF-Vorläufers 1-Deoxy-2,3-hexodiu-lose-6-phosphat (**D2**) aus D-Fructose-1,6-diphosphat im Nährmedium. Andererseits wird HDMF nur in Gegenwart der Hefezellen gebildet, und die in Abschnitt C 1.3.4.2 nachgewiesene Anreicherung eines HDMF-Enantiomers lässt unwiderruflich auf mindestens einen enzym-katalysierten Reaktionsschritt schließen. Da für die Transformation der Zwischenverbindung zu HDMF ein reduktiver Reaktionsschritt erforderlich ist, setzten wir die Beteiligung einer unspezifischen Ketoreduktase der Hefe voraus (Abschnitt C 1.3.4). Zur Lokalisierung dieser Ketoreduktaseaktivität wurden cytosolische und periplasmatische Proteinextrakte nach den in Abschnitt C 2.1 vorgestellten Methoden aus *Z. rouxii* hergestellt. Um die nicht-enzymatische *in situ*-Bildung der benötigten Zwischenverbindung zu gewährleisten, sind die Extrakte mit einem deutlichen Überschuss an D-Fructose-1,6-diphosphat inkubiert worden. Nach einer Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen wurden die Proben mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm analysiert.

4.2.3.1 Periplasma-Extrakt

Abb. C-43 zeigt die HDMF-Ausbeuten, die nach Inkubation eines dialysierten aktiven periplasmatischen Proteinextraktes (PE), eines entsprechenden hitze-inaktivierten periplasmatischen Proteinextraktes und einer Kontrollprobe (Zymolyase) mit D-Fructose-1,6-diphosphat erhalten wurden. HDMF wurde nahezu ausschließlich in der aktiven Probe gebildet. Ein Zusatz von Reduktionsäquivalenten (NADH oder NADPH) war nicht erforderlich, weshalb eine chemische Bildung nach dem in Abschnitt C 4.1 detailliert untersuchten Mechanismus ausgeschlossen werden konnte.

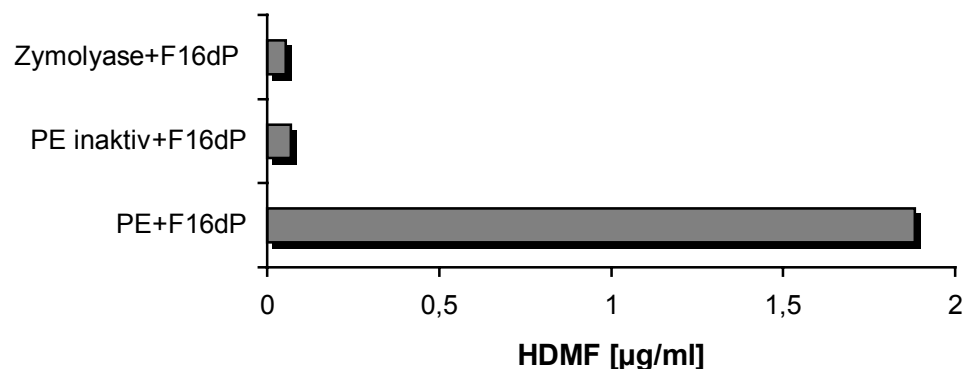


Abb. C-43: Bildung von HDMF in periplasmatischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii* nach Inkubation mit D-Fructose-1,6-diphosphat (Inkubation: 24 Stunden; 30 °C); (PE = periplasmatischer durch Zymolyasebehandlung erhaltener Proteinextrakt; F16dP = D-Fructose-1,6-diphosphat; Zymolyase = Zymolyase-haltige zum Zellwandverdau eingesetzte Pufferlösung).

Zur näheren Charakterisierung der beobachteten HDMF-Bildung im aktiven Periplasmaextrakt wurde eine Zeitstudie durchgeführt, durch welche die Freisetzung der HDMF-bildenden Aktivität während des Zellwandverdaus untersucht werden sollte. Hierfür wurden in regelmäßigen Abständen Proben aus dem Zymolyaseverdaus-Ansatz gezogen, in Analogie zu Abschnitt B 4.2.3 mit D-Fructose-1,6-diphosphat inkubiert und anschließend analysiert. Der Verdau der Zellwand ist parallel durch Messung der optischen Dichte bei 800 nm kontrolliert worden (Abb. C-44 A). Wie aus Abb. C-44 B eindeutig hervorgeht, wurde die HDMF-bildende Aktivität nach und nach von den Hefezellen freigesetzt. Infolge eines 150-minütigen Zellwandverdaus wurden nach Inkubation mit D-Fructose-1,6-diphosphat maximale HDMF-Ausbeuten detektiert, die im Folgenden konstant blieben.

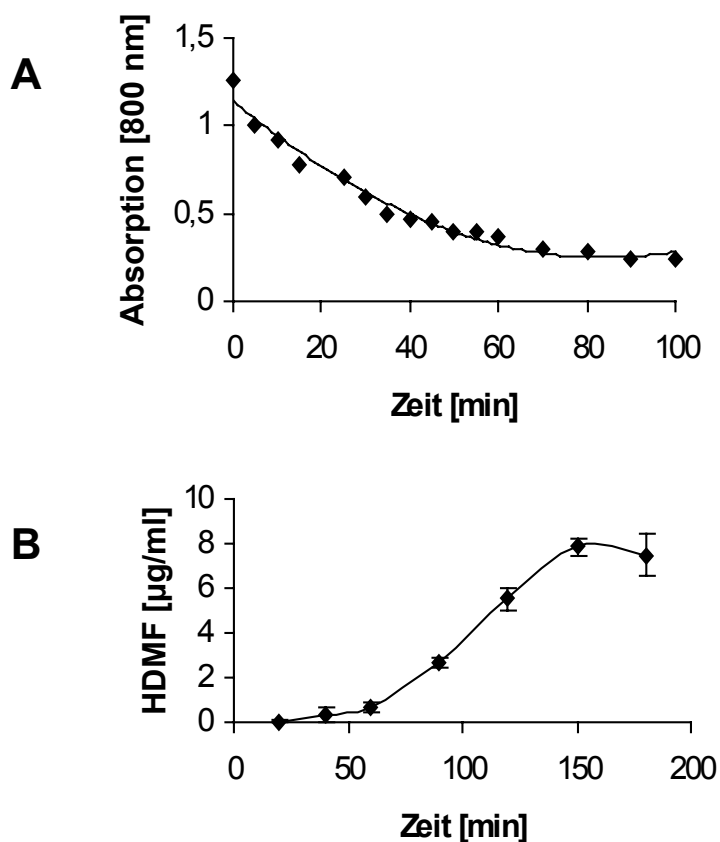


Abb. C-44: A: Photometrische Kontrolle des Zellwandverdaus von *Z. rouxii*-Zellen;
B: HDMF-Bildung in den entsprechenden dialysierten periplasmatischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii* nach Inkubation mit D-Fructose-1,6-diphosphat (Inkubation: 30 Stunden; 30 °C).

4.2.3.2 Cytosolischer Extrakt

Im Falle des cytosolischen Proteinextraktes wurde eine signifikante HDMF-Bildung nur nach Zusatz von D-Fructose-1,6-diphosphat und NADPH oder NADH detektiert (Abb. C-45). Eine Hitzebehandlung des Extraktes vor der Inkubation sowie das Weglassen der Cofaktoren führten zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung der HDMF-bildenden Aktivität. Aufgrund der in Abschnitt C 4.1 beschriebenen Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in Gegenwart geringer Mengen an Nicotinamidadenin-nucleotiden wurden analog Kontrollinkubationen im entsprechenden Puffer durchgeführt. Wie aus Abb. C-45 eindeutig ersichtlich ist, war die HDMF-Bildung in den Kontrollexperimenten deutlich geringer als die Bildung in den aktiven Extrakten. In einer weiteren Studie führte eine kontinuierliche Verdünnung des cytosolischen Extraktes mit dem entsprechenden Puffer zu einer konstanten Abnahme der HDMF-Ausbeuten, was ebenfalls für eine enzym-katalysierte Bildung spricht. Die Detektion einer enzym-katalysierten HDMF-Bildung in den cytosolischen Extrakten muss jedoch kritisch betrachtet werden, da sie im Widerspruch zu den unter Abschnitt C 2 präsentierten Ergebnissen steht. Diese Gegensätzlichkeit könnte beispielsweise auf eine extrem labile beteiligte enzymatische Aktivität zurückzuführen sein, wodurch bereits geringfügige Variationen in der Versuchsdurchführung zu einer Inaktivierung führen würden. Aus Zeitmangel konnten bezüglich dieser Problematik jedoch keine weiteren Studien durchgeführt werden.

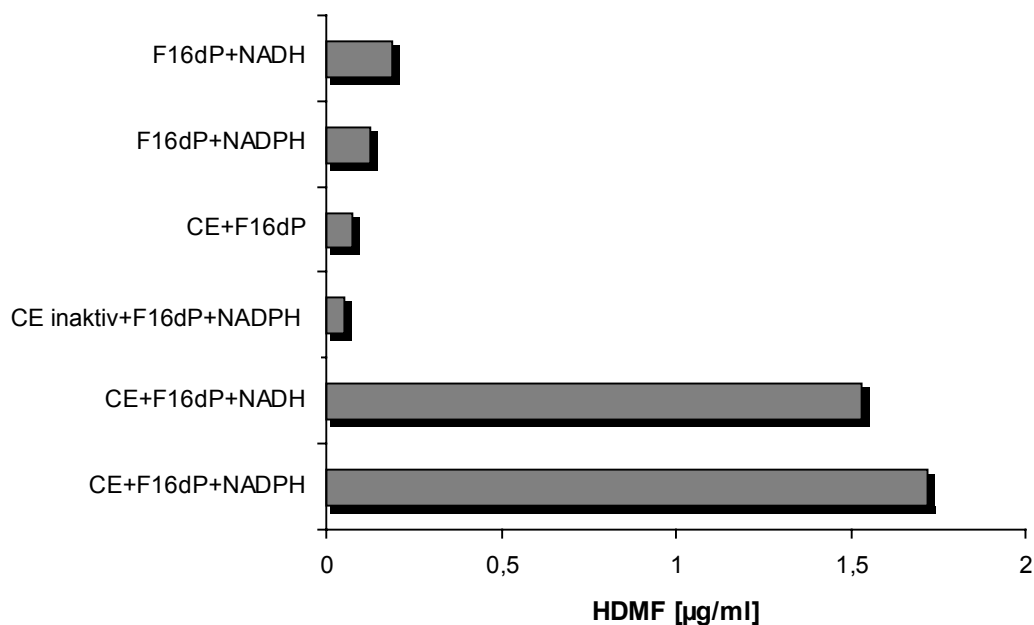


Abb. C-45: Bildung von HDMF in cytosolischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii* (Inkubation: 24 Stunden; 30 °C); (CE = cytosolischer Proteinextrakt; F16dP = D-Fructose-1,6-diphosphat).

4.2.4 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die spontane chemische Bildung von hochreaktiven α -Dicarbonylverbindungen aus D-Fructose-1,6-diphosphat erstmals nachgewiesen. Diese Transformationen fanden unter moderaten Bedingungen (30 °C; pH 4-5) im Nährmedium, das zur Kultivierung der Hefe *Z. rouxii* verwendet wurde, statt. Aus den identifizierten Quinoxalinderivaten **Q1**, **Q2** und **Q3** ließen sich die Strukturen von 2-Hexosulose-6-phosphat (**D1**), 1-Deoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (**D2**) and 1,4-Dideoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (**D3**) ableiten (Abb. C-42).

Die Bildung von α -Dicarbonylverbindungen aus Kohlenhydraten wurde unter Verwendung von Abfangreagenzien, insbesondere *o*-Phenylendiamin oder Aminoguanidin, bereits sehr intensiv untersucht. Zuckerphosphate kamen bei diesen Studien jedoch äußerst selten zum Einsatz (Naofumi und Mitarbeiter, 1984; Nevidek und Mitarbeiter, 1992; Hirsch und Mitarbeiter, 1995; Hofmann, 1998 und 1999; Glomb und Tschirnich, 2001). Da α -Dicarbonylverbindungen reaktive Schlüsselverbindungen in der Maillard-Reaktion darstellen, wurde ihre Bildung vor allem in hitzebehandelten Mischungen aus Pentosen oder Hexosen mit Aminosäuren untersucht. Des Weiteren ist ihre *in vivo*-Entstehung im Rahmen der sog. fortgeschrittenen Maillard-Reaktion nachgewiesen worden (Odani und Mitarbeiter, 1999). Über ihre Bildung aus Zuckerphosphaten infolge einer Phosphateliminierung ist derzeit noch sehr wenig bekannt. Die Bildung von Methylglyoxal aus Dihydroxyacetonphosphat (Phillips und Thornalley, 1993), die Überführung von D-Ribulose-1,5-diphosphat in das entsprechende 1-Desoxypentosenphosphat (Peach und Mitarbeiter, 1978) sowie die im Rahmen dieser Arbeit im Detail untersuchte Phosphateliminierung aus D-Ribulose-5-phosphat (Abschnitt C 3.2.3.2) stellen bislang die einzigen Nachweise einer derartigen Reaktion dar. Larimer und Mitarbeitern gelang 1994 erstmals der Nachweis eines phosphorylierten α -Dicarbonyls, entstanden aus D-Ribulose-1,5-diphosphat, anhand des entsprechenden Quinoxalinderivates. Die analoge Bildung von α -Dicarbonylverbindungen aus Hexosephosphaten ist jedoch bislang nicht untersucht worden.

Für **D1** wird eine Bildung infolge einer Oxidation von D-Fructose-6-phosphat angenommen. D-Fructose-6-phosphat kann wiederum durch Hydrolyse des Phosphorsäureesters am C-1 infolge des leicht sauren pH-Wertes des Nährmediums (ca. pH 4) aus D-Fructose-1,6-diphosphat gebildet werden. Diese Annahme wurde bestätigt durch die massenspektrometrische Detektion von **Q1** in analog behandelten Modellumsetzungen von D-Fructose-6-phosphat mit *o*-Phenylendiamin in einem Phosphatpuffer. Nach einer Publikation von Glomb und Tschirnich (2001) besitzt *o*-Phenylendiamin ein hohes oxidatives Potential, weshalb es die Bildung von α -Dicarbonylverbindungen erheblich beeinflussen kann. Die Inkubation des Amadoriproduktes aus N ^{α} -*t*-BOC-Lysin und D-Glucose mit *o*-Phenylendiamin führte zu einer signifikanten Bildung von Glucoson, dem unphosphorylierten Analogon des identifizierten 2-Hexosulose-6-phosphates.

Demzufolge könnte die Bildung von **D1** auf das oxidative Potenzial von *o*-Phenylendiamin zurückzuführen sein.

1-Deoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (**D2**) entsteht durch β -Eliminierung der Phosphatgruppe am C-1 von D-Fructose-1,6-diphosphat infolge einer initiierten 2,3-Enolisierung. Die Bildung von **D2** bestätigt weiterhin die Ergebnisse eines Inkubationsexperimentes, bei dem D-Ribulose-1,5-diphosphat mit *o*-Phenylendiamin umgesetzt wurde. Die quantitative Umsetzung des Abfangreagenzes zu dem von Larimer und Mitarbeitern (1994) vorgeschlagenen Quinoxalinderivat konnte mittels HPLC-MS-Analyse (m/z 285 $[M+H]^+$) nachgewiesen werden.

Wir erklären die Bildung von **D3** durch eine Dehydratisierung von **D2** und anschließende Umlagerung und Reduktion. Die ausschließliche Bildung in Gegenwart der Hefezellen weist auf eine durch die Hefen katalysierte Reduktion hin (Abb C-46). Wir vermuten, dass HDMF durch die Hefe *Z. rouxii* in analoger Art und Weise aus **D2** infolge einer spontanen initiierten Phosphatelimierung gebildet wird (Abb C-46).

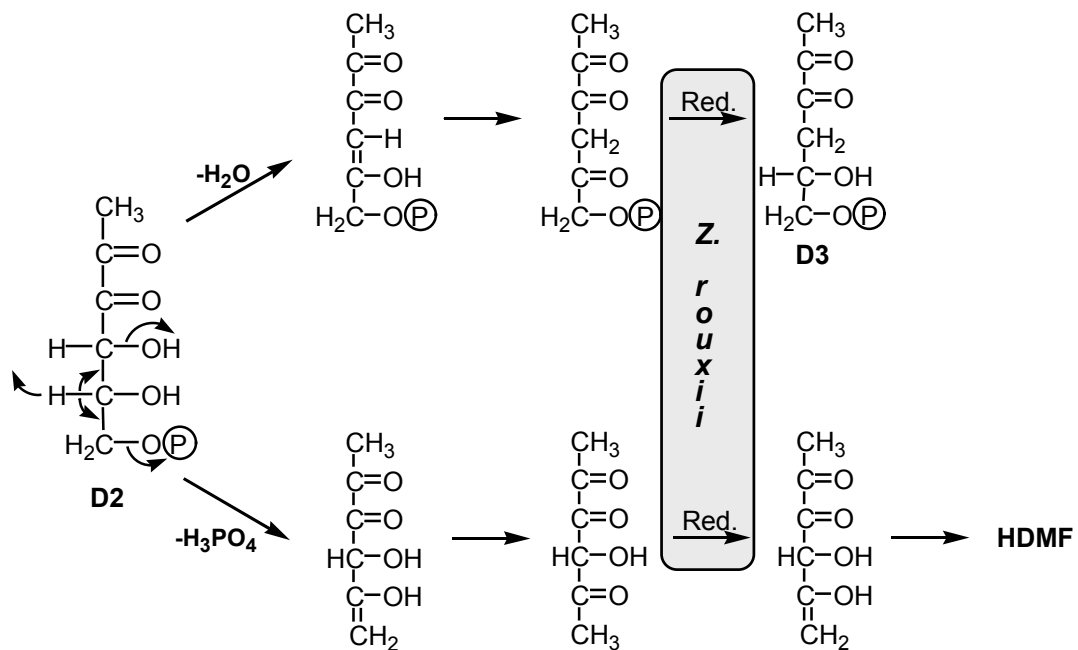


Abb. C-46: Postulierter Bildungsmechanismus von **D3** und HDMF aus **D2**.

Prinzipiell kommen auch rein chemisch gebildete α -Dicarbonylverbindungen als mögliche HDMF-Vorläufer in Betracht. Dies steht im Einklang mit der in Abschnitt C 4.1 im Detail untersuchten Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in Gegenwart von Nicotinamidadenin-dinucleotiden und dem in Abschnitt C 4.1.4 vorgeschlagenen Bildungsmechanismus. Aufgrund der nötigen sehr hohen D-Fructose-1,6-diphosphatkonzentrationen im Nährmedium von *Z. rouxii* (bis zu 8 % nach Hecquet und Mitarbeitern, 1996) erscheint eine initiierte chemische Transformation des Zuckerphosphates wahrscheinlicher als eine Biotransformation durch die Hefen.

Bereits Schieberle wies 1992 auf eine Phosphateliminierung infolge einer 2,3-Enolisierung des Zuckerphosphates als ersten Reaktionsschritt der HDMF-Bildung in der Maillard-Reaktion hin. Die Bildung von **D2** wurde jedoch bislang nicht eindeutig bestätigt. Die Identifizierung und Charakterisierung von **D2** in Form seines Quinoxalinderivates gelang erstmals im Rahmen dieser Arbeit.

Die erhaltenen Daten weisen darauf hin, dass die HDMF-Bildung durch *Z. rouxii* auf eine initiierende chemischen Bildung von **D2** zurückzuführen ist. Diese Annahme wird unterstützt durch die Ergebnisse der Metabolisierungsstudien mit stabil markierter D-Glucose bzw. D-Fructose-1,6-diphosphat (Abschnitt C 1.2), woraus geschlossen werden konnte, dass ausschließlich exogen zugesetztes D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF metabolisiert wird.

Unter Betracht der im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten ist demnach eine HDMF-Bildung durch *Z. rouxii* infolge einer Kombination aus chemischen und enzymatischen Reaktionsschritten nach dem in Abb. C-47 dargestellten Schema sehr wahrscheinlich. Die Detektion der HDMF-Bildung in den zellfreien Proteinextrakten, die mit einem Überschuss D-Fructose-1,6-diphosphat inkubiert wurden, bestätigen die bereits unter Abschnitt C 1.3.4 postulierte Beteiligung einer Oxidoreduktase.

Da die periplasmatischen Extrakte auch ohne Zusatz von Cofaktoren eine HDMF-bildende Aktivität zeigten, wird das Vorhandensein von proteingebundenem NAD(P)H in diesen Extrakten angenommen. Als Beispiel für ein solches Enzym sei an dieser Stelle die bereits sehr gut untersuchte periplasmatische NADP-enhaltende Glucose-Fructose-Oxidoreduktase des gramnegativen Bakteriums *Zymomonas mobilis* genannt (Wiegert und Mitarbeiter, 1997).

Zusammenfassend kann der in Abb. C-47 dargestellte Bildungsmechanismus als erwiesen angesehen werden, da er sowohl durch Studien mit isotope markierten Vorläufermolekülen als auch durch biochemische Untersuchungen und die zweifelsfreie Identifizierung der Zwischenverbindung bestätigt wurde.

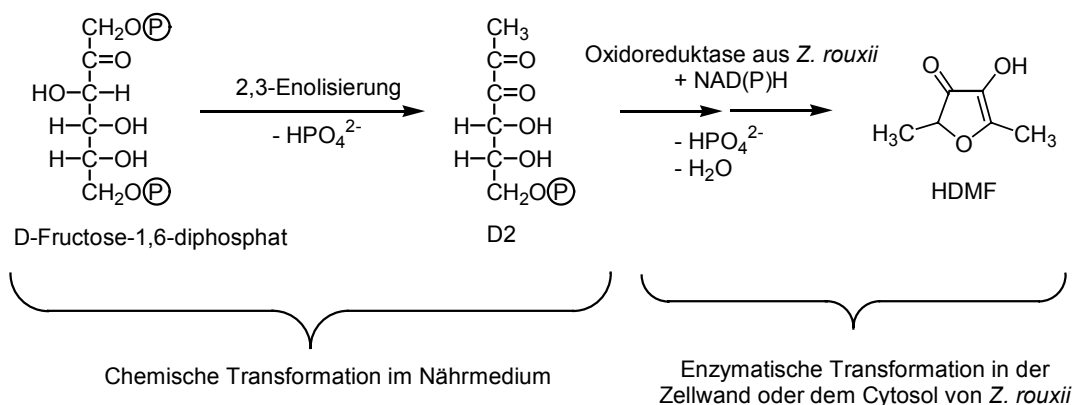


Abb. C-47: Postulierter Bildungsmechanismus von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch *Z. rouxii*.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Zuckerphosphate D-Ribulose-5-phosphat und D-Fructose-1,6-diphosphat generell potentielle Vorläuferverbindungen der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone HMF bzw. HDMF darstellen. Durch eine spontane nicht-enzymatische Phosphateliminierung, die in wässrigen Medien auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet, werden beide Zuckerphosphate zu hoch reaktiven α -Dicarbonylstrukturen transformiert, die als potentielle Zwischenprodukte der 4-Hydroxy-3(2H)-furanon-Bildung angesehen werden können. Im Falle des Pentosephosphates führt dies zur spontanen Bildung von DPD, das in wässrigen Lösungen nicht stabil ist und durch Zyklisierung und Dehydratisierung zu HMF transformiert wird (Nevidek und Mitarbeiter, 1992; Blank und Fay, 1996; Slaughter, 1999; Winzer und Mitarbeiter, 2002).

D-Fructose-1,6-diphosphat wird durch Eliminierung der Phosphat-Gruppe in 1-Deoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat umgelagert, für dessen Transformation zu HDMF zusätzlich neben einer weiteren Phosphateliminierung ein reduktiver Reaktionsschritt erforderlich ist. Diese Reduktion kann auf unterschiedlichen Wegen ablaufen. In der Maillard-Reaktion wird eine Reduktion infolge von Disproportionierung oder vermittelt durch weitere Enol-Oxo-Verbindungen, sog. Reduktone, angenommen (Schieberle, 1992; Belitz und Mitarbeiter, 2001). Unter physiologischen Reaktionsbedingungen kann diese Reduktion durch einen nicht-enzymatischen Hydrid-Transfer von reduzierten Formen der Nicotinamidadenin-dinucleotide auf ein aus D-Fructose-1,6-diphosphat abgeleitetes Zwischenprodukt erfolgen (Abschnitt C 4.1).

Neben diesen rein chemischen Bildungsmechanismen kann das spontan gebildete Zwischenprodukt der HDMF-Bildung auch enzymatisch durch Oxidoreduktasen des Hefestammes *Z. rouxii* reduziert werden (Abschnitt C 1.3.4 und C 4.2). Dies eröffnet Möglichkeiten für die biotechnologische Gewinnung dieses bedeutenden Aromastoffes.

D Experimentaltteil

1 Material

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.A.-Qualität von den Firmen Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fisher (Loughborough, England) und ICN (Eschwege, Deutschland) bezogen. Lösungsmittel wurden zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert. 4-Hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon (Norfuraneol), 4-Hydroxy-2(oder 5)-ethyl-5(oder 2)-methyl-3(2*H*)-furanon (Homofuraneol) und 2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (Acetylformoin) sind von der Firma Firmenich SA (Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt worden. 1-Benzyl-1,4-dihydronicotinamid wurde bei der ABCR GmbH KG (Karlsruhe, Deutschland) erworben. 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat (Natriumsalz; MG 506.7) und [1-²H]-D-Glucose (98 % ²H) wurden von Omichron Biochemicals (South Bend, IN, USA) bezogen. [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat (153.4 mCi/mmol ; 13261.2 MBq/g) und ¹³C₆-D-Glucose (99 % Atom % ¹³C; MG 186.2) stammte von Sigma, NaB²H₄ und ²H₂-Ameisensäure von Aldrich. 6-¹³C-D-Glucose (99 % ¹³C) und 2-¹³C-D-Glucose (99 % ¹³C) wurden bei der Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland) erworben. Eine (1*S*,2*R*)-1-(3-Methyl-2-quinoxaliny)-1,2,3-propantriol-Referenz ist freundlicherweise von PD Dr. Marcus A. Glomb (Institut für Lebensmittelchemie der technischen Universität Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt worden.

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand authentischer Referenzverbindungen. Neben selbst synthetisierten und isolierten Verbindungen wurden die in der Referenzsammlung des Arbeitskreises vorhandenen Vergleichsproben verwendet.

1.2 Enzyme

- Yeast lytic enzyme aus *Achromobacter* sp. (ICN), ca. 5.5 U/mg.
- Glucose-Dehydrogenase aus *Thermoplasma acidophilum*, rekombinant; exprimiert in *E. coli* (E.C. 1.1.1.47; Sigma), Suspension in Ammoniumsulfat-Lösung, 100 U/mg.
- Formiat-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (E.C. 1.2.1.2; Sigma), 10 U/mg Protein.

- L-Glutamat-Dehydrogenase Typ I aus Rinderleber (E.C. 1.4.1.3; Sigma), Suspension in Ammoniumsulfat-Lösung, 40 U/mg Protein.
- Hexokinase Typ III aus *Saccharomyces cerevisiae* (E.C. 2.7.1.1; Sigma), 20 U/mg Protein.
- Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase Typ V aus *Saccharomyces cerevisiae* (E.C. 1.1.1.49; Sigma), 198 U/mg Protein.
- 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase Typ IV aus Torulahefe (E.C. 1.1.1.44; Sigma), Suspension in Ammoniumsulfat-Lösung, minimal 20 U/mg Protein.
- Phosphoribo-Isomerase Typ I aus Spinat (E.C. 5.3.1.6; Sigma), 100 U/mg Protein.

1.3 Mikroorganismus

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefestamm war *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 13356 (American Type Culture Collection).

1.4 Pflanzenmaterial

Die für die Studien in Abschnitt C 3.2.4 verwendeten Tomaten wurden vom örtlichen Handel bezogen.

1.5 Füllmaterialien für die Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie an einer Umkehrphase wurde Lichroprep[®] RP-18-Material (Korngröße 40 - 63 µm) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

Für die Säulenchromatographie an einer Festphase kam Amberlite[®] XAD-2-Material (Korngröße 0.3 – 1 mm) der Firma Serva (Heidelberg, Deutschland) zum Einsatz.

1.6 Membranfiltration

Sterile Spartan 30/A Einmalfilter mit 0.2 µm Porengröße und 30 mm Durchmesser (Ziemer) wurden zur Filtration der D-Fructose-1,6-diphosphat-Stammlösungen eingesetzt.

Zur Filtration der Proben, die mittels cKZE analysiert wurden, kamen Filter mit einer Porengröße von 0.22 µm der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland) zum Einsatz.

1.7 Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion wurden C18-Kartuschen (500 mg, 3 ml) der Firma ICT (Bad Homburg, Deutschland) verwendet.

1.8 Dialyse

Für die Dialyse sind Dialyseschläuche der Firma Serva (Heidelberg, Deutschland) mit 16 mm Durchmesser und einer Ausschlussgrenze von 12 kDa verwendet worden.

2 Geräte

2.1 Schüttelinkubator

Gerät: GFL 3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)

Temperatur: 30 °C

Schüttelgeschwindigkeit: 150 upm

2.2 Autoklav

Gerät: Wolf Sanoclav, Typ S-MCS (Wolf, Geisslingen, Deutschland)

Temperatur: 121 °C

Autoklavierzeit: 16 min

2.3 UV-VIS-Spektralphotometer

Gerät UV 1: Spectronic Genesys 2PC (Spectronic Instruments Inc., Rochester NY, USA)

Gerät UV 2: UV 2101 PC UV-VIS Scanning Spektralphotometer (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)

2.4 Flüssigchromatographie (LC)

LC: Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

Pumpen: 2 x P-500 Präzisionskolbenpumpen (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)

Probenaufgabe: manuelle Aufgabe unter Verwendung einer P-1 Peristaltikpumpe (Pharmacia)

Säule: DEAE-Sepharose (2 × 14 cm) (Pharmacia)

Fließmittel: A: Wasser

B: 0.4 M (NH₄)HCO₃

Fluss: 9 ml/h

Gradient:	0 - 20 ml: 0 % B; 20 - 320 ml: 0 - 100 % B
Detektor:	Festwellenlängendetektor UV-M II Monitor mit 254 nm Filter (Pharmacia)
Fraktionensammler:	FRAC-100 (Pharmacia) mit 12 ml Polystyrolröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
Fraktionenvolumen:	4.5 ml
Steuerung:	Controller LCC 500-Plus (Pharmacia)
Ausgabe:	Rec 102 Analogschreiber (Pharmacia)

2.5 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC 1:	Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensystem:	HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf, und Dynamic Mixing Chamber (Knauer)
Degasser:	4-Wege-Degasser (Knauer)
Mischkammer:	dynamische Mischkammer (Knauer)
Autosampller:	Basic Marathon (Spark, Emmen, Holland)
Injektor:	Rheodyne Vier-Wege-Ventil Nr. 7125, Probenschleife 200 µl
Trennsäule 1:	Eurospher 100 C-18 (250 × 4.6 mm i.d.; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel 1:	A: 0.05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril Fluss: 1 ml/min
Gradient 1:	0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 30 min: 20 - 100 % B
Trennsäule 2:	Nucleosil 100-10 SB (250 × 4 mm i.d.; 10 µm) (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland)
Fließmittel 2:	A: Wasser B: 1 M NH ₄ CHOO, pH 4 Fluss: 1 ml/min
Gradient 2:	0 - 10 min: 8 - 10 % B; 10 - 30 min: 10 - 30 % B
Detektoren:	UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer) und/oder Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (ELSD, <u>E</u> vaporative <u>L</u> ight <u>S</u> cattering <u>D</u> etector), Modell Sedex 55 (Sedere, Alfortville, Frankreich); Temperatur: 40°C, Druck 2.4 atm, Luft als Evaporationsgas
Datenaufnahme und -auswertung:	Eurochrom 2000 (Knauer)
Ausgabe:	HP-Drucker (Hewlett Packard)

HPLC 2:	Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensystem:	HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf, und Dynamic Mixing Chamber (Knauer)
Degasser:	4-Wege-Degasser (Knauer)
Mischkammer:	dynamische Mischkammer (Knauer)
Autosampler:	Basic Marathon (Spark, Emmen, Holland)
Injektor:	Rheodyne Vier-Wege-Ventil Nr. 7125, Probenschleife 50 µl
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 × 4.6 mm i.d.; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel:	A: 0.05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril Fluss: 1 ml/min
Gradient:	0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 30 min: 20 - 100 % B
Detektor:	UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer)
Datenaufnahme und -auswertung:	Eurochrom 2000 (Knauer)
Ausgabe:	HP-Drucker (Hewlett Packard)
HPLC 3:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Serie
Pumpen:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Serie
Injektor:	Rheodyne 7125 Probenventil, Probenschleife 100 µl
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 × 4.6 mm i.d.; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel:	A: 0.05 % Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser B: Acetonitril Fluss: 1 ml/min
Gradient:	0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 30 min: 20 - 100 % B
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray 1100 Serie mit Hewlett Packard Aufnahme- und Auswertesoftware
Ausgabe:	HP-Drucker (Hewlett Packard)
HPLC 4:	Analytische HPLC von Gilson Abimed (Abimed, Langenfeld, Deutschland)
Pumpen:	2 x Gilson Abimed Pumpe Model 303 mit analytischem Pumpenkopf
Injektor:	Gilson Abimed Sample Injector Model 231, Probenschleife 200 µl
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 × 4.6 mm i.d.; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel:	A: 0.05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril Fluss: 0.7 ml/min

Gradient:	0 - 15 min: 5 - 20 % B; 15 - 35 min: 20 - 100 % B
Detektor:	Knauer-UV-Spektralphotometer mit analytischer Meßzelle (10 mm)
Steuerung und Datenverarbeitung:	Gilson 712 HPLC Controller, Version 1.02
Ausgabe:	HP-Drucker (Hewlett Packard)
HPLC 5:	Analytische Niederdruckgradientenanlage (Knauer, Berlin, Deutschland)
Degasser:	Knauer
Pumpe:	Knauer Maxi-Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf
Mischkammer:	Knauer Dynamische Mischkammer
Injektor:	Knauer A0258 Probenventil, Probenschleife 20 µl
Trennsäule:	Chiraspher NT [®] (240 × 4 mm i.d.; 5 µm) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Fließmittel:	A: n - Pentan B: Diethylether Fluss: 0.8 ml/min
Gradient:	0 min 30 % B – 60 min: 30 % B
Detektor:	Knauer-UV-Spektralphotometer mit analytischer Meßzelle (10 mm)
Steuerung und Datenverarbeitung:	Knauer Eurochrom 2000
Ausgabe:	HP-Drucker (Hewlett Packard)
HPLC 6:	Analytische HPLC von Waters (Waters, Milford, USA)
Pumpen:	2 x Waters-Pumpe Model 510 mit analytischem Pumpenkopf
Gradientenformer:	Automated Gradient Controller (Waters)
Injektor:	Rheodyne 7125 Probenventil, Probenschleife 100 µl
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 × 4,6 mm; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel:	A: 0.05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril Fluss: 1 ml/min
Gradient:	0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 40 min: 20 - 100 % B
Detektor:	Multiwavelength-UV-Spektralphotometer S-3702 (SOMA)
Ausgabe:	Integrator CR-6-A (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)

2.6 Hochleistungsflüssigchromatographie – Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

HPLC 7:	Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems)
Pumpe:	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten
Injektor:	Rheodyne 8125 Probenventil, Probenschleife 5 µl
Autosampler:	Spark Triathlon, µl-Pickup-Modus für automatische Injektion
Trennsäule 1:	Xterra MS C18 (150 × 2.1 mm i.d., 3.5 µm) (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
Trennsäule 2:	Symmetry C18 (150 × 2.1 mm i.d., 5 µm) (Waters)
Trennsäule 3:	Eurospher 100 C18 (100 × 2 mm i.d., 5 µm) (Knauer Berlin, Deutschland)
Fließmittel:	A: 0.05 % TFA in Wasser B: Acetonitril Fluss: 0.2 ml/min
Gradient:	0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 30 min: 20 - 100 % B
Detektor:	Knauer-UV-Spektralphotometer mit analytischer Meßzelle (10 mm)

Tandemmassenspektrometer:

Spektrometer:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) mit ESI-Interface
ESI-Koppelkapillare:	desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm i.d.; J & W)
Sheathgas:	Stickstoff 5.0, 60 bis 70 psi
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0, 10 Skalenteile
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 0.27 Pa (2.0 mTorr)
Kollisionsenergie:	15 bis 30 eV
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	210 °C
Kapillarspannung:	3.5 bis 4.0 kV
Datenaufnahme und -auswertung:	DEC 5000/33 Workstation (Digital Equipment, Unterföhring, Deutschland) ICIS 8.1 Softwarepaket (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)

2.7 Kapillargaschromatographie – Massenspektrometrie (HRGC-MS)

System 1:

GC:	Fisons Instruments GC 8060 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)
Autosampler:	Fisons AS 800
Injektor:	Split-Splitless-Injektor (1:20), Temperatur : 220°C
Trennsäule:	J&W DB-Wax 20M (30 m × 0.25 mm i.D. ; df = 0.25 µm) (J&W, Folsom, CA, USA)
Temperaturprogr.:	50°C (3 min isotherm) - 4°C/min - 240°C
Trärgas:	Helium 5.0, 1.5 ml/min konstanter Druck
MS:	Fisons Instruments MD 800 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)
Massenbereich:	41 - 250 u
Scandauer:	0.4 s
Temperaturen:	Ionenquelle: 220°C, Transferline: 250°C
Ionisation:	Elektronenstoßionisierung (EI+), 70 eV
Quellendruck:	10 nbar
Photomultiplier:	350 V
Datenaufnahme und -auswertung:	Masslab für Windows (Fisons, Egelsbach, Deutschland) Xcalibur für Windows (Fisons Instruments, Mainz, Deutschland)

System 2:

GC:	Agilent 6890 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca, USA)
Autosampler:	Agilent 7683 Serie Injector
Injektor:	Split-Splitless-Injektor (1:20), Temperatur : 250°C
Trennsäule:	J&W HP-5 (30 m × 0.25 mm i.D. ; df = 0.25 µm) (J&W, Folsom, CA, USA)
Temperaturprogr.:	60°C - 5°C/min - 300°C
Trärgas:	Helium 5.0, 1 ml/min konstanter Fluss
MS:	Agilent 5973 MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca, USA)
Massenbereich:	39 - 500 u
Scandauer:	3.17 Scans/s
Temperaturen:	Ionenquelle: 230°C, Transferline: 230°C, Quadrupol: 150 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisierung (EI+), 70 eV

Quellendruck:	10 nbar
Photomultiplier:	1500 V
Datenaufnahme:	MS Chemstation
Datentransfer:	Mass transit
Datenauswertung:	Xcalibur für Windows (Fisons Instruments, Mainz, Deutschland)

2.8 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Geräte:	Bruker Avanced 400 (400 MHz bzw. 100 MHz) (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Bruker DMX 600 (600 MHz bzw. 150 MHz) (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)
Lösungsmittel:	$C^2H_3O^2H$, 2H_2O

Die chemische Verschiebung δ [ppm] wird relativ zum Lösungsmittelsignal ($C^2H_3O^2H$: 3.31 ppm für 1H -NMR; 49.0 ppm für ^{13}C -NMR; 2H_2O : 4.8 ppm für 1H -NMR) angegeben. Die 2D-Experimente wurden mit den Bruker Standard-Impulssequenzen durchgeführt. Zur Wiedergabe der Multiplizitäten in den 1H -NMR-Spektren werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dq = Dublett vom Quartett, t = Triplett, m = Multiplett.

2.9 Chiralphasen – Kapillarzonenelektrophorese (cKZE)

Gerät:	P/ACE system MDQ (Beckman, Fullerton, CA, USA)
Injektion:	hydrodynamische Injektion am anodischen Ende der Kapillare (0.5 psi, 10 sec)
Trennsäule:	Fused silica (30/40.2 cm, i.D. 50 μ m)
Temperatur:	25 °C
Spannung:	10 kV
Laufpuffer:	50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 4) + 20 mM Heptakis-(2,3-O-diacetyl-6-O-sulfato)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD)
Waschlösungen:	0.1 M NaOH (2 min), Laufpuffer (2 min)
Detektor:	UV-Spektralphotometer mit variabler Wellenlänge (Knauer)
Ausgabe:	HP-Drucker (Hewlett Packard)

2.10 Flüssigszintillationszähler (LSC, Liquid-Scintillation-Counting)

Gerät:	Rackbeta 1214 LKB (Wallac, Freiburg, Deutschland)
Photomultiplier:	10 °C
Messkammer:	10 °C
Messzeit:	1 bzw. 10 min
LSC-Vials:	20 ml (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande)
Szintillationscocktail:	Emulsifier-Safe™ (Packard Bioscience)
Automatische	
Löschkorrektur:	Standard-Kanalverhältnismethode mit ²²⁶ Ra als externem Standard
Auswertung:	Software „ <i>Ultra-Term</i> ®“ (Wallac)

2.11 Sonstige Geräte

Sterile Werkbank:	Laminar Airflow Bench, Modell-Nr. NU440600E (NuAire Inc., Plymouth, MN, USA)
pH-Meter:	Labor-pH-Meter (Knick, Berlin, Deutschland)
Waagen:	Mettler PL 300 (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) Sartorius BP 210 S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Ultraschallbad:	Branson 1210 Bandelin Sonorex TK 52
Rotavapor:	Büchi Rotavapor und Büchi Vakuum System B-173 und Büchi Vakuum Controller B-720 (Büchi, Konstanz, Deutschland)
Kühlzentrifugen:	Typ Universal 16R, Rotor 1616 & 1614 (Hettich) Beckman Typ J2-21 (Rotoren: JA10 und JA20)
Zentrifugen:	Hettich EBA 12 (Rotor: Universal 30 F)
Lyophilisator:	Christ Alpha 1 - 4; 0.1 mbar (Christ, Osterode, Deutschland)

3 Methoden

3.1 Pufferherstellung

Die Tris-Puffer werden durch Titration der entsprechenden Menge an Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) mit Salzsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Herstellung der Phosphatpuffer erfolgt durch Mischen von 1 M Di-kaliumhydrogenphosphat- und 1 M Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösungen und anschließender Verdünnung mit dest. Wasser.

3.2 Herstellung des Nährmediums

Soweit nicht anders vermerkt ist, wird für die Kultivierung von *Z. rouxii* YPD (yeast peptone dextrose)-Nährmedium nach Hecquet und Mitarbeitern (1996) verwendet.

Zusammensetzung:	0.5 %	Hefeextrakt (yeast extract)
	0.5 %	Pepton
	0.5 %	KH ₂ PO ₄
	0.5 %	MgSO ₄
	1 % bzw. 5 %	D-Glucose
	17 %	NaCl

Für die in den Abschnitten C 1.1 und C 1.2 beschriebenen Versuche wird eine D-Glucosekonzentration von 1 % verwendet. Für alle anderen Versuche werden 5 % D-Glucose eingesetzt.

Die hergestellte Stammlösung wird bei 4 °C gelagert. Vor der Animpfung mit Hefezellen wird das Medium autoklaviert (121 °C, 16 min) und anschließend mit autoklaviertem Wasser bzw. einer sterilfiltrierten D-Fructose-1,6-diphosphat-Stammlösung (15 - 40 % D-Fructose-1,6-diphosphat in Wasser) im Verhältnis 3:1 verdünnt.

3.3 Wachstumsbedingungen

10 – 240 ml YPD Medium werden mit 10 – 240 µl einer *Z. rouxii*-Stammkultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 30 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 upm inkubiert.

3.4 Durchführung der Experimente mit intakten *Z. rouxii*-Zellen

3.4.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgt photometrisch (UV 1) durch Trübungsmessung bei 600 nm unter Verwendung der von Dahlen und Mitarbeitern (2001) mittels einer Thoma-Neubauer-Zählkammer ermittelten Kalibriergeraden.

Kalibrierfunktion: $y = 5 \times 10^{-8} x + 0.0512$ mit $y = \text{Absorption [600 nm]}$
 $x = \text{Zellzahl}$

3.4.2 Bestimmung der HDMF-Konzentration

Die aus den Nährmedien entnommenen Proben werden bei ca. $5000 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wird direkt mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm analysiert (HPLC 4). Die Quantifizierung von HDMF erfolgt anhand einer Kalibriergeraden, die unter Verwendung von kommerziell erhältlichem HDMF bei 285 nm ermittelt wird.

Kalibrierfunktion: $y = 10^8 x + 145824$ mit $y = \text{Signalfläche}$
 $x = \text{HDMF-Konzentration [mg/ml]}$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0.9997$

3.4.3 Metabolismus von 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat

Einem YPD-Medium werden 8 % D-Fructose-1,6-diphosphat, einem zweiten 4 % 1-¹³C-D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt und beide Medien mit ca. 1.7×10^6 *Z. rouxii*-Zellen beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden bei 30 °C werden die Zellen beider Ansätze abzentrifugiert ($5000 \times g$; 5 min) und die Überstände jeweils drei mal mit je 1 ml Diethylether extrahiert. Nach Vereinigung der organischen Phasen wird über Na₂SO₄ getrocknet, einkonzentriert und jeweils mittels HRGC-MS analysiert (System 1).

3.4.4 Metabolismus von ¹³C₆-D-Glucose

YPD-Medium (2 ml), dem 1 % ¹³C₆-D-Glucose (anstelle von D-Glucose) und 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt sind, wird mit 1.5×10^6 *Z. rouxii*-Zellen angeimpft und anschließend für 96 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach Zentrifugation ($5000 \times g$; 5 min) wird der Überstand drei mal mit je 1 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet, einkonzentriert und mittels HRGC-MS analysiert (System 1).

3.4.5 Metabolismus von [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat

YPD-Medium (2 ml) wird D-Fructose-1,6-diphosphat (5 %) und [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat (1.08×10^6 dpm) zugesetzt, mit 1.5×10^6 *Z. rouxii*-Zellen angeimpft und bei 30 °C für 124 Stunden inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen ($5000 \times g$; 5 min) wird der Überstand direkt mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm analysiert (HPLC 6) und der verbleibende Überstand auf eine konditionierte RP18-Kartusche (500 mg, 3 ml) gegeben (Konditionierung: Elution mit 6 ml MeOH und dann mit 6 ml H₂O). Nach Waschen der Kartusche mit 1 ml Wasser erfolgt die Elution apolarer Verbindungen mit 3 ml Diethylether. Nach Trocknung der Diethyletherphase über Na₂SO₄ werden 100 µl H₂O zugesetzt und das organische Lösungsmittel im leichten Stickstoffstrom abgeblasen. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität werden zweimal 10 µl der verbleibenden Wasserphase mittels Flüssigszintillationszählung vermessen. Der übrige wässrige Extrakt wird mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm und *off-line*-Radiodetektion analysiert (HPLC 6). Hierfür wird das HPLC-Eluat in 1 ml-Fraktionen (1 Minuten-Intervalle) aufgesammelt und die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt.

3.4.6 Einfluss der Natriumchloridkonzentration

YPD-Medien (10 ml), die 4.5 % D-Fructose-1,6-diphosphat und Natriumchloridkonzentrationen von 0 % bis 26 % (Sättigung) enthalten, werden mit *Z. rouxii*-Zellen beimpft (ca. 1.9×10^6 Zellen pro Ansatz) und bei 30 °C inkubiert. Täglich werden je Ansatz 100 µl zur Bestimmung der Zellzahl und 500 µl zur Bestimmung der HDMF-Konzentration entnommen.

3.4.7 Einfluss des pH-Wertes

Aliquote (10 ml) YPD-Medien, die 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat enthalten, werden durch Zusatz von 1 N NaOH auf pH 4.1 (ohne NaOH-Zusatz), 4.5, 4.8, 5.1 und 5.5 eingestellt. Nach Beimpfung mit *Z. rouxii*-Zellen (ca. 3×10^6 Zellen pro Ansatz) und Inkubation bei 30 °C werden täglich je Ansatz 100 µl zur Bestimmung der Zellzahl und 500 µl zur Bestimmung der HDMF-Konzentration entnommen.

3.4.8 Einfluss von Glycerin

YPD-Nährmedien (10 ml-Aliquote), die 0 - 5 % Glucose, 4.5 % D-Fructose-1,6-diphosphat und 0 - 5 % Glycerin enthalten, werden mit ca. 3×10^6 Hefezellen pro Ansatz beimpft und bei 30 °C inkubiert. Täglich werden je Ansatz 100 µl zur Bestimmung der Zellzahl und 500 µl zur Bestimmung der HDMF-Konzentration entnommen.

3.4.9 Einfluss von Xylose

Zehn ml YPD-Nährmedium (0 % Natriumchlorid), das 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat und 17 % Xylose enthält, werden mit ca. 1.9×10^6 Hefezellen beimpft und bei 30 °C inkubiert. Täglich werden 100 µl zur Bestimmung der Zellzahl und 500 µl zur Bestimmung der HDMF-Konzentration entnommen.

3.4.10 Probenvorbereitung für Chiralphasen-HPLC

YPD-Nährmedium (10 ml), das 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat enthält, wird mit *Z. rouxii*-Zellen (ca. 2.2×10^6 Hefezellen) beimpft und bei 30 °C inkubiert. Nach 5 Tagen erfolgt die Bestimmung der HDMF-Konzentration mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm (HPLC 4). Ein 1 ml Aliquot wird entnommen, die Hefezellen werden abzentrifugiert ($5000 \times g$; 5 min) und der Überstand viermal mit je 0.5 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und auf ein Volumen von ca. 10 µl einkonzentriert. Nach Zugabe von 200 µl n-Pentan wird der Extrakt mittels Chiralphasen-HPLC an einer Chiraspher NT[®] Phase mit UV-Detektion bei 285 nm analysiert (HPLC 5).

3.4.11 Probenvorbereitung für Chiralphasen-KZE

Vier YPD-Medien (10 ml), denen 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt sind, werden mit jeweils ca. 2.4×10^6 *Z. rouxii*-Zellen beimpft und bei 30 °C inkubiert. Nach 4, 5, 6 und 7 Tagen werden die Zellen je eines Ansatzes abzentrifugiert ($5000 \times g$; 5 min) und die HDMF-Konzentrationen in den Überständen mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm bestimmt (HPLC 4). Die Extraktion der Überstände erfolgt jeweils dreimal mit je 10 ml Diethylether, und die Trocknung der vereinigten organischen Phasen findet über Na_2SO_4 statt. Den Extrakten werden 500 µl eines 0.1 M Ammoniumacetat-Puffers zugesetzt und der Diethylether wird im leichten Stickstoffstrom abgeblasen. Die verbleibenden wässrigen Lösungen werden durch 0.22 µm Membranfilter filtriert und mittels Chiralphasen-KZE analysiert.

3.5 Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit von HDMF mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

HDMF wird in ²H₂O gelöst (12 mg/ml). Von Aliquoten dieser Lösung, die einen pH-Wert von 2.1 aufweist, werden die pH-Werte auf pH 5 bzw. pH 7 eingestellt. Dies erfolgt durch Zusatz einer 0.1 M K₂HPO₄ in ²H₂O-Lösung bzw. einer 10 %igen N²H₃ in ²H₂O-Lösung. Unmittelbar nach dem Einstellen der pH-Werte werden von den drei Proben ¹H-NMR-

Spektren aufgenommen und die Proben anschließend bei 30 °C gelagert. Zusätzliche ¹H-NMR-Messungen finden nach 24, 50 und 72 Stunden statt. Von einem weiteren Ansatz bei pH 7 werden die ¹H-NMR-Spektren in 20-25-Minuten-Intervallen aufgenommen. Die Fläche des an C-2 gebundenen Protons wird durch Integration bestimmt. Die Fläche des Signals der drei Methylprotonen an C-6 (Dublett bei 2.31 ppm) wird als interner Standard verwendet.

¹H-NMR-Daten von HDMF (400 MHz, ²H₂O): δ 4.72 (dq, 1H, H-2), δ 2.31 (d, 3H, H-6), δ 1.46 (d, 3H, H-1); $J_{H1,H2} = 7.1$ Hz, $J_{H2,H6} = 1$ Hz (Abb. C-8).

3.6 Durchführung der Experimente mit Proteinextrakten aus *Z. rouxii*

3.6.1 Darstellung des cytosolischen Proteinextraktes und des Membranproteinextraktes

(Wojciechowicz und Mitarbeiter, 1993; Lu und Mitarbeiter, 1994)

Die Kultivierung der *Z. rouxii*-Zellen erfolgt in 240 ml YPD-Medium. Während der exponentiellen Wachstumsphase (nach ca. 3-4 Tagen) werden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 × g für 15 min bei 4 °C geerntet. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit vorgekühltem (4 °C) Waschpuffer werden die Zellen in 4 ml vorgekühltem (4 °C) Lyse-Puffer suspendiert und die Suspension mit kalten Glaskügelchen (0.5 mm Durchmesser; Roth, Karlsruhe, Deutschland) im Verhältnis 1/1 (v/v) vermischt. Bei einer Temperatur von 4 °C werden die Zellen durch mechanische Behandlung („Vortexen“) aufgebrochen. Hierfür wird die Zellsuspension/Glaskügelchen-Mischung 6 × 1 min auf dem Vortex-Mixer gerührt. Nach jeder Minute „Vortexen“ erfolgt ein mindestens einminütiges Kühlintervall auf Eis. Im Anschluss werden weitere 2 ml des Lyse-Puffers zugesetzt. Die Abtrennung der intakten Zellen und Zellwandbestandteile erfolgt durch Zentrifugation (1000 × g; 5 min, 4 °C). Der Überstand wird zur Abtrennung von Membranbestandteilen bei 27000 × g für 1 Stunde bei 4 °C zentrifugiert und der dabei resultierende Überstand (lösliche cytosolische Proteine) vom Membranpellet (= Membranextrakt) abgenommen und in einen Dialyseschlauch (Durchmesser: 16 mm; Ausschlussgrenze: 12 kDa) überführt. Die Dialyse erfolgt über Nacht gegen 3 - 5 l einer 20 - 100 mM Tris-HCl-Pufferlösung, wobei der Dialysepuffer alle 4 - 8 Stunden gewechselt wird. Der resultierende Proteinrohextrakt wird direkt für Inkubationsversuche eingesetzt. Von Extrakten, die zur Bestimmung von Enzymaktivitäten eingesetzt werden, werden Volumen und Proteingehalt bestimmt.

Waschpuffer:

20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.5)
17 % = 2.91 M NaCl

Lyse-Puffer:

50 mM Phosphatpuffer (pH 7.5) oder Tris-HCl Puffer (pH 7.5)
150 mM NaCl
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
30 µg/ml Leupeptin
30 µg/ml Pepstatin
30 µg/ml Antipain

3.6.2 Darstellung des Periplasma-Extraktes

(Yoda und Mitarbeiter, 2000)

Z. rouxii-Zellen, die analog zu Abschnitt D 3.6.1 kultiviert, geerntet und nachgewaschen worden sind, werden mit 20 ml Verdaupuffer bei 30 °C für 2.5 Stunden bei vorsichtiger (!) Durchmischung inkubiert. Die periplasmatische Fraktion wird anschließend durch Zentrifugation (8000 × g, 10 min, 4 °C) von den Sphäroplasten abgetrennt und der Überstand analog dem cytosolischen Extrakt (Abschnitt D 3.6.1) dialysiert und direkt für Inkubationsversuche eingesetzt.

Verdaupuffer:

20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.5)
17 % = 2.91 M NaCl
1 mM Dithiothreitol (DTT)
10 U/ml Yeast lytic enzyme

3.6.3 Inkubation des cytosolischen Proteinextraktes

Nach Vorschrift D 3.6.1 werden zwei Aliquote des cytosolischen Proteinextraktes (4 ml) hergestellt. Einer der Ansätze wird für 6 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, und nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden den Ansätzen jeweils 50 mg D-Fructose-1,6-diphosphat, 1.8×10^6 dpm [$U\text{-}^{14}\text{C}$]-D-Fructose-1,6-diphosphat, NAD, NADH, NADP und NADPH (jeweils 1 mg) zugefügt. Für die Analyse mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS wird ein aktiver cytosolischer Extrakt analog nur mit unmarkierter D-Fructose-1,6-diphosphat inkubiert. Für weitere Inkubationsexperimente werden jeweils 2 ml Pufferlösung bzw. 2 ml cytosolischer Extrakt mit 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und jeweils 1 mg NAD, NADH, NADP und NADPH inkubiert.

3.6.4 Extraktion und Analyse

Nach einer Inkubationszeit von 40 Stunden werden die Proben zentrifugiert, die Überstände separat auf konditionierte RP18-Kartuschen aufgetragen (Konditionierung: Elution mit 6 ml MeOH und dann mit 6 ml H₂O) und die Kartuschen mit jeweils 1 ml H₂O nachgewaschen. Die Elution der apolaren Verbindungen erfolgt mit jeweils 3 ml Diethylether. Dem über Na₂SO₄ getrockneten organischen Extrakt werden 100 µl H₂O zugesetzt, das organische Lösungsmittel im leichten Stickstoffstrom vorsichtig abgeblasen und die verbleibende wässrige Phase mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm und *off-line*-Radiodetektion analysiert (siehe Abschnitt D 3.4.5; HPLC 6). Im Falle der Proben mit ausschließlich unmarkierter D-Fruktose-1,6-diphosphat erfolgt die Analyse mittels RP-HPLC-DAD (HPLC 3), HPLC-MS und HPLC-MS/MS. Die HPLC-Probe des aktiven cytosolischen Extraktes wird mittels einer konditionierten RP18-Kartusche extrahiert (siehe oben). Die Analyse des Diethylethereluates findet direkt nach Trocknung über Na₂SO₄ und Konzentrierung mittels HRGC-MS statt (System 1). Die Analyse der weiteren Inkubationsexperimente erfolgt mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm (HPLC 2). Die HPLC-MS-Analysen (Trennsäule 1) werden mit folgenden Elektrospray-Parametern durchgeführt: 3.5 kV Kapillarspannung, 210 °C Kapillartemperatur, 70 psi Sheath- und 10 Skalenteile Hilfsgas sowie eine Multiplierspannung von 1200 V. Die Detektion der positiven Ionen erfolgt in einem Scanbereich von *m/z* 153 bis *m/z* 300 und einer Scandauer von 1.0 s. Im Produktionenscan wird der Bereich von *m/z* 20 bis *m/z* 200 in 1.0 s untersucht. Die Fragmentierung erfolgt mit einer Stoßgasenergie von 15 eV und einem Kollisionsgasdruck von 0.27 Pa Argon.

3.6.5 Quantifizierung von HMF und HDMF

Die Quantifizierung von HMF und HDMF erfolgt mittels RP-HPLC-UV-Analyse bei 285 nm anhand von Kalibriergeraden, die unter Verwendung einer authentischen HMF-Referenz bzw. kommerziell erhältlichem HDMF bei 285 nm ermittelt werden (HPLC 2).

HMF: Kalibrierfunktion: $y = 1760.5 x$ mit $y = \text{Signalfläche}$
 $x = \text{HMF-Konzentration [mg/ml]}$
Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0.9988$

HDMF: Kalibrierfunktion: $y = 1267.2 x$ mit $y = \text{Signalfläche}$
 $x = \text{HDMF-Konzentration [mg/ml]}$
Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0.9994$

3.6.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

(Bradford, 1976)

Bradford-Reagens: 0.01 % Coomassie Brilliantblau G-250
4.8 % Ethanol
8.5 % Phosphorsäure

50 μ l Proteinlösung werden mit 2.5 ml Bradford-Reagens vermischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wird bei 595 nm gegen einen Reagenzienleerwert (50 μ l des entsprechenden Puffers + 2.5 ml Bradford-Reagens) vermessen (UV 2). Zur Aufnahme der Eichgeraden wird aus einer kommerziellen 1 mg/ml Rinderserumalbumin-Stammlösung (Sigma) eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die einzelnen Verdünnungen werden wie oben beschrieben vermessen.

Kalibrierfunktion: $y = 0.7641 x + 0.0584$ mit $y = \text{Absorption}$
 $x = \text{Proteinkonzentration [mg/ml]}$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0.9675$

3.7 Untersuchungen zur HMF-Bildung in cytosolischen Proteinextrakten aus *Z. rouxii*

3.7.1 Substratstudie

Zu aliquoten Mengen (2 ml) eines dialysierten, nach D 3.6.1 hergestellten cytosolischen Proteinextraktes und eines 20 mM Tris-HCl-Puffers (pH 7.5) (2 ml) werden Substrat und die Cofaktoren NAD, NADH, NADP, NADPH (jeweils 1 mg) zugesetzt. Als Substrate kommen 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat, 20 mg D-Fructose-6-phosphat, 20 mg D-Glucose-6-phosphat, 20 mg D-Gluconsäure-6-phosphat, 25 mg D-Ribose-5-phosphat und 10 mg D-Ribulose-1,5-diphosphat zum Einsatz. Die Reaktionsansätze werden bei 30 °C für 30 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert.

3.7.2 Extraktion und Analyse

Die Proben werden nach Zentrifugation (5000 \times g; 5 min) mittels Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen, die zuvor mit 6 ml MeOH und 6 ml H₂O konditioniert worden waren, extrahiert. Nach der Probenaufgabe werden die Kartuschen mit jeweils 1 ml H₂O nachgewaschen und anschließend mit 3 ml Diethylether eluiert. Das in der Diethyletherphase verbleibende Wasser wird bei -18 °C ausgefroren. Der organischen Phase werden 200 μ l H₂O zugesetzt, und der Diethylether wird im leichten Stickstoffstrom abgeblasen. Die wässrige Phase wird mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm analysiert (HPLC 2). Die

Quantifizierung erfolgt unter Verwendung der in Abschnitt D 3.6.5 aufgeführten Kalibriergeraden.

3.7.3 Enzymassays

Dialysierte cytosolische Proteinextrakte werden nach Bestimmung des Volumens und der Proteinkonzentration nach Abschnitt D 3.6.6 direkt für die Bestimmung der Enzymaktivitäten eingesetzt. Die Aktivität der Fructose-1,6-diphosphatase wird nach Esposito und Mitarbeitern (2001) in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂ bestimmt. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten der Phosphohexose-Isomerase erfolgt nach Benevolensky und Mitarbeitern (1994), die der Aktivitäten von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Gluconsäure-6-phosphat-Dehydrogenase nach Kato und Mitarbeitern (1979) in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM MgCl₂. Die Pipettierschemen der einzelnen Enzymassays und ihrer jeweiligen Kontrollwerte (Leerwerte) sind in Tab. D-1 zusammengefasst. Die Enzymaktivitäten werden durch photometrische Messung der NADPH-Bildung bei 340 nm bestimmt. Die Aufnahmen erfolgen über einen Zeitraum von 10 – 25 Minuten bei Raumtemperatur in Zeitintervallen von 15 Sekunden bis 2 Minuten (Tab. D-1). Die Reaktionen werden durch Zugabe des jeweiligen Substrates initiiert.

Tab. D-1: Pipettierschemen und Messintervalle der Enzymassays und der entsprechenden Leerwerte zum spezifischen Nachweis der Aktivitäten von Fructose-1,6-diphosphatase (1), Phosphohexose-Isomerase (2), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (3) und Gluconsäure-6-phosphat-Dehydrogenase (4)

	Probe 1	Leerwert 1	Probe 2	Leerwert 2	Probe 3	Probe 4	Leerwert 3 und 4
Gesamtvolumen [μl]	2000	2000	3000	3000	3000	3000	3000
Extraktvolumen [μl]	1000	1000	10	10	100	100	100
NADP [mM]	0.14	0.14	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
D-Fructose-1,6-diphosphat [mM]	3.35	—	—	—	—	—	—
D-Fructose-6-phosphat [mM]	—	—	1	—	—	—	—
D-Glucose-6-phosphat [mM]	—	—	—	—	4	—	—
D-Gluconsäure-6-phosphat [mM]	—	—	—	—	—	0.1	—
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase [U]	—	—	2	2	—	—	—
Messintervall	1 Minute		15 Sekunden		2 Minuten		

Die Enzymaktivitäten werden nach folgenden Formeln ermittelt:

$$\text{Volumenaktivität } [U \cdot \text{ml}^{-1}] = \frac{A \cdot V_t}{\varepsilon \cdot l \cdot V_e} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} A = \text{Absorption pro Minute (linearer} \\ \text{Bereich)} [\text{min}^{-1}] \\ V_t = \text{Gesamtvolumen [ml]} \\ \varepsilon = \text{Absorptionskoeffizient (NADPH,} \\ \text{340 nm)} = 6.3 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \\ l = \text{Schichtdicke} = 1 \text{ cm} \\ V_e = \text{Extraktvolumen [ml]} \end{array}$$

$$\text{Spezifische Aktivität } [U \cdot \text{mg}^{-1}] = \frac{\text{Volumenaktivität}}{\text{Proteinkonzentration}}$$

3.7.4 Einfluss des pH-Wertes

Aliquote Mengen (2 ml) eines cytosolischen Proteinextraktes werden gegen 20 mM Puffer-Lösungen unterschiedlicher pH-Werte im Bereich von pH 4 – pH 9 dialysiert. Bei pH 4 wird ein verdünnter Citrat-Phosphat-Puffer nach McIlvaine verwendet (Verdünnung 1:4 mit bidest. Wasser; ca. 20 mM), im Bereich von pH 5 – pH 7 ein 20 mM Phosphat-Puffer und bei pH 8 und pH 9 20 mM Tris-HCl-Puffer. Nach Zusatz von 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und den Cofaktoren NAD, NADH, NADP und NADPH (jeweils 1 mg) werden die Proben für 30 Stunden bei 30 °C inkubiert. Extraktion und Analyse erfolgt gemäß Abschnitt D 3.7.2.

3.7.5 Einfluss der Temperatur

Aliquoten Mengen (2 ml) eines dialysierten cytosolischen Proteinextraktes werden 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und jeweils 1 mg der Cofaktoren NAD, NADH, NADP und NADPH zugesetzt. Die Proben werden bei Temperaturen im Bereich von 20 °C bis 50 °C für 30 Stunden inkubiert und anschließend gemäß Abschnitt D 3.7.2 extrahiert und analysiert.

3.7.6 Einfluss der Extraktkonzentration

Aliquote Mengen eines dialysierten cytosolischen Proteinextraktes werden mit dem entsprechenden Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5) um die Faktoren 5, 10, 50 und 100 verdünnt. Zu aliquoten Mengen (2 ml) der einzelnen Verdünnungen werden jeweils 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und die Cofaktoren NAD, NADH, NADP und NADPH (jeweils 1 mg) zugesetzt. Extraktion und Analyse erfolgt nach einer Inkubationszeit von 30 Stunden bei 30 °C gemäß Abschnitt D 3.7.2.

3.8 Untersuchungen zur Bildung von HMF aus D-Ribulose-5-phosphat

3.8.1 Inkubation und Analyse

(Knowles und Mitarbeiter, 1980)

20 mM D-Ribose-5-phosphat werden mit 1 U/ml Phosphoribose-Isomerase (aus Spinat) in 40 mM Phosphat-Puffer (pH 7.4) bei 37 °C in einer Glasküvette inkubiert. In zeitlichen Abständen von 5 bzw. 10 Minuten werden UV-Spektren im Bereich von 265 nm bis 340 nm aufgenommen (UV2). Der Abbruch der Reaktion erfolgt nach 4 Stunden.

3.8.2 Darstellung und Charakterisierung von Quinoxalinderivaten

Zur Darstellung von Quinoxalin und 2-Methylquinoxalin werden 20 mM Glyoxal bzw. 20 mM Methylglyoxal mit jeweils 3.3 mM *o*-Phenylendiamin unter zu D 3.8.1 analogen Reaktionsbedingungen inkubiert. Nach Inkubation über Nacht werden die Proben mittels HPLC-DAD (HPLC 3) analysiert.

Die massenspektrometrischen Analysen erfolgen direkt mittels ESI-MS ohne vorherige HPLC-Trennung (loop-Injection; Fließmittel Wasser/TFA/Acetonitril 1/0.05/1, v/v/v). Die Elektrospray-Parameter sind 3.5 kV Kapillarspannung, 200 °C Kapillartemperatur, 60 psi Sheath- und 10 Skalenteile Hilfsgas sowie eine Multiplierspannung von 1200 V. Die positiven Ionen werden mit einem Scanbereich von m/z 155 bis m/z 1000 und einer Scandauer von 1.0 s detektiert. Im Produktionenscan wird in beiden Fällen der Bereich von m/z 20 bis m/z 190 in 1.0 s untersucht. Der Kollisionsgasdruck beträgt in beiden Fällen 0.27 Pa Argon. Die UV-Daten werden mittels RP-HPLC-DAD-Analyse bestimmt, wobei die entsprechende Lösungsmittelzusammensetzung rechnerisch ermittelt wird.

Quinoxalin:

UV λ_{\max} (H₂O/TFA/MeCN 48/0.05/52, v/v/v): 316 nm, 236 nm

ESI-MS: m/z 172 [M+H+MeCN]⁺

ESI-MS/MS (Prekursorion m/z 172, CID 35 eV): m/z 131 [M+H]⁺
 m/z 104 [M+H-HCN]⁺
 m/z 77 [M+H-2HCN]⁺

2-Methyl-quinoxalin:

UV λ_{\max} (H₂O/TFA/MeCN 53/0.05/47, v/v/v): 316 nm, 236 nm

ESI-MS: m/z 186 [M+H+MeCN]⁺

ESI-MS/MS (Prekursorion m/z 186, CID 35 eV): m/z 145 [M+H]⁺
 m/z 118 [M+H-HCN]⁺
 m/z 77 [M+H-HCN-MeCN]⁺

3.8.3 Modifizierte Inkubation

20 mM D-Ribose-5-phosphat bzw. D-Ribulose-5-phosphat, 3.3 mM *o*-Phenylendiamin und 10 U/ml Phosphoribose-Isomerase (aus Spinat) werden in 1 M Phosphatpuffer (pH 7.4) bei 37 °C für 22 Stunden inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der Phosphoribose-Isomerase erfolgt durch Erhitzung der Enzymstammlösung im siedenden Wasserbad für 10 Minuten. Die Lösung wird nach Abkühlung auf Raumtemperatur den Inkubationen zugesetzt. Zur Überprüfung der HMF-Bildung aus den Pentosephosphaten werden weder *o*-Phenylendiamin noch Phosphoribose-Isomerase zugesetzt.

3.8.4 Analyse von Quinoxalinderivaten

Quinoxalinderivate werden mittels RP-HPLC-UV bei 238 nm oder 318 nm (HPLC 2), RP-HPLC-DAD (HPLC 3), HPLC-MS und HPLC-MS/MS analysiert. Die Analyse von HMF erfolgt mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm (HPLC 2). Die HPLC-MS-Analysen (Trennsäule 3) werden mit folgenden Elektrospray-Parametern durchgeführt: 3.5 kV Kapillarspannung, 200 °C Kapillartemperatur, 60 psi Sheath- und 10 Skalenteile Hilfsgas sowie eine Multiplierspannung von 1200 V. Die Detektion der positiven Ionen erfolgt in einem Scanbereich von m/z 156 bis m/z 1000 und einer Scandauer von 1.0 s. Im Produktionsenscan wird der Bereich von m/z 20 bis m/z 210 in 1.0 s untersucht und die Fragmentierung mit einer Stossgasenergie von 25 eV bei einem Kollisionsgasdruck von 0.27 Pa Argon durchgeführt.

3.8.5 Isolierung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin

D-Ribose-5-phosphat (20 mM), *o*-Phenylendiamin (10 mM) und Phosphoribose-Isomerase (10 U/ml) werden in 54 ml 1 M Phosphat-Puffer (pH 7.5) bei 35 °C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Zur Isolierung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin wird der Reaktionsansatz direkt auf eine mit Lichroprep[®] C18-Material gefüllte Glassäule (12 × 2.5 cm) gegeben (konditioniert mit 500 ml Wasser/Ameisensäure, 100/0.05, v/v). Die Elution erfolgt mittels eines Stufengradienten mit den Eluenten A (Wasser/Ameisensäure, 100/0.05, v/v) und B (Acetonitril). Der prozentuale Gehalt an Eluent B wird in 10 %-Schritten von 0 auf 70 % gesteigert (100 ml Elutionsmittel pro Stufe). Das Eluat wird in 10 ml Fraktionen aufgesammelt, die anschließend mittels RP-HPLC-UV bei 238 nm analysiert werden (HPLC 4). 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin enthaltende Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40 °C und anschließende Gefriertrocknung entfernt. Durch den beschriebenen Aufreinigungsschritt wird die Verbindung 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin als Reinsubstanz in Form eines weißen, amorphen Pulvers erhalten.

Ausbeute: ca. 21 mg

3.8.6 Charakterisierung von 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin

Die UV- und MS-Daten des Quinoxalinderivates 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin sind nachfolgend zusammengestellt. Die UV-Daten werden mittels RP-HPLC-DAD-Analyse bestimmt, wobei die entsprechende Lösungsmittelzusammensetzung rechnerisch ermittelt wird. Die Ermittlung der MS-Daten findet unter zu Abschnitt D 3.8.4 analogen Bedingungen statt. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten sind in Tab. C-2 in Abschnitt C 3.2.2.3 zusammengefasst.

UV λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}/\text{MeCN}$ 36/0.05/64, v/v/v): 318 nm, 238 nm

ESI-MS: m/z 205 $[\text{M}+\text{H}]^+$

ESI-MS/MS (Prekursorion m/z 205, CID 25 eV): m/z 205 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 m/z 187 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$
 m/z 158 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{HCO}]^+$

3.8.7 Synthese von Alditolacetaten

D-Ribose-5-phosphat (20 mM) wird mit Phosphoribose-Isomerase (250 U) in 1 M Phosphatpuffer pH 7.4 (20 ml) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 1, 3, 6 und 9 Stunden werden jeweils zwei Aliquote (2 ml) entnommen und sofort einer Reduktion unterzogen, eine mit einem Überschuss an NaBH_4 (ca. 50 mg), die andere mit einem Überschuss an NaB^2H_4 (ca. 50 mg). Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wird überschüssiges NaBH_4 bzw. NaB^2H_4 durch den Zusatz von jeweils ca. 15 ml einer verdünnten methanolischen Essigsäure-Lösung (Methanol/ Wasser/Essigsäure, 70/27/3, v/v/v) entört. Dabei entstehendes Borat wird im Folgenden als Tetramethylborat durch wiederholtes Nachfüllen und Abdampfen von Methanol (4 - 5 mal) im Trockenschrank bei 110 °C entfernt. Die Acetylierung des trockenen Rückstandes erfolgt anschließend mit 1 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid bei Raumtemperatur über Nacht. Gebildete Alditolacetate werden mit 2 ml Chloroform extrahiert und vorhandenes Pyridin wird im Folgenden durch wiederholtes Ausschütteln mit einer wässrigen 8 %igen CuSO_4 -Lösung entfernt (viermal mit jeweils 5 ml). Nach Trocknung über Na_2SO_4 und Einkonzentrierung der Chloroformphasen im leichten Stickstoffstrom erfolgt die Analyse mittels HRGC-MS (System 2).

3.9 Untersuchungen zum HMF-Bildungsmechanismus

3.9.1 Darstellung und Isolierung von 2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat und 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat

Einem Reaktionsansatz (10 ml) mit 20 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7.5, 1 mM DTT und 15 mM ATP werden 0.02 M 2-¹³C-D-Glucose bzw. 6-¹³C-D-Glucose und 200 U Hexokinase zugesetzt. Dieser Ansatz wird über Nacht bei 30 °C mit mäßiger Durchmischung inkubiert und die Phosphorylierung mittels HPLC unter Verwendung einer Anionenaustauschersäule mit ELSD-Detektion kontrolliert (HPLC 1; Trennsäule 2, Fließmittel 2, Gradient 2). Anschließend wird die Lösung mit 40 ml Wasser verdünnt und mittels einer Peristaltikpumpe (Pharmacia) auf eine mit Wasser equilibrierte DEAE-Sepharose-Säule (2 × 14 cm) (Pharmacia) aufgetragen. Die Elution der Verbindungen erfolgt nach Waschen mit 20 ml Wasser mit einem linearen Ammoniumbicarbonat-Gradienten bei 4 °C (D 2.4). Die 2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat oder 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat enthaltenden Fraktionen (4.5 ml) werden mittels HPLC unter Verwendung einer Anionenaustauschersäule mit ELSD-Detektion bestimmt (HPLC 1; Trennsäule 2, Fließmittel 2, Gradient 2), vereinigt und lyophilisiert.

Die massenspektrometrischen Analysen der markierten Verbindungen erfolgen direkt mittels ESI-MS ohne vorherige HPLC-Trennung (loop-Injection; Fließmittel: Wasser/TFA/Acetonitril 1/0.05/1, v/v/v). Die Elektrospray-Parameter sind 4 kV Kapillarspannung, 200 °C Kapillartemperatur, 70 psi Sheath- und 10 Skalenteile Hilfsgas sowie eine Multiplierspannung von 1200 V. Die Detektion der negativ geladenen Ionen erfolgt in einem Scanbereich von *m/z* 345 bis *m/z* 460 und einer Scandauer von 1.0 s.

Ausbeute: jeweils ca. 59 mg

ESI-MS: *m/z* 374 [M+TFA-H]⁻ für 2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat und 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat

3.9.2 Modelexperiment zur Darstellung von ¹³C-markiertem HMF

2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat oder 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat (13 mg) werden einem Reaktionsansatz (3 ml) mit 20 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.5), 10 mM NH₄Cl, 1.7 mM NADP, 10 mM α-Ketoglutarat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (60 U), 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase (30 U) und L-Glutamat-Dehydrogenase (40 U) zugesetzt. Die Analyse erfolgt nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 30 °C mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm (HPLC 2). Anschließend werden die Proben mittels Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen extrahiert (D 3.7.2). Für die massenspektrometrischen Analysen wird der Extrakt direkt mittels ESI-MS ohne vorherige HPLC-Trennung (loop Injektion) analysiert (Fließmittel Wasser/TFA/Acetonitril 1/0.05/1, v/v/v). Die Elektrospray-Parameter sind 3.5 kV Kapillarspannung, 220 °C Kapillar-

temperatur, 60 psi Sheath- und 10 Skalenteile Hilfsgas sowie eine Multiplierspannung von 1200 V. Die positiven Ionen werden mit einem Scanbereich m/z 150 bis m/z 300 und einer Scandauer von 1.0 s detektiert. Im Produktionenscan wird der Bereich von m/z 40 bis m/z 165 in 1.0 s untersucht. Die Fragmentierung erfolgt im positiven Modus mit einer Stossgasenergie von 20 eV und einem Kollisionsgasdruck von 0.27 Pa Argon.

HMF aus 2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat oder 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat:

ESI-MS: m/z 157 [M+H+MeCN]⁺

ESI-MS/MS (Prekursorion m/z 157): m/z 116 [M+H]⁺
 m/z 88 [M+H-CO]⁺
 m/z 60 [M+H-2 CO]⁺

3.9.3 Modelexperiment zur Darstellung von ¹³C-markiertem 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin

2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat oder 6-¹³C-D-Glucose-6-phosphat (13 mg) werden einem Reaktionsansatz (3 ml) mit 20 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5), 10 mM NH₄Cl, 1.7 mM NADP, 10 mM α-Ketogluarat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (60 U), 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase (30 U) und L-Glutamat-Dehydrogenase (40 U) zugesetzt. Nach 2 Stunden erfolgt der Zusatz von 500 µl einer 100 mM *o*-Phenylendiamin-Lösung, und nach einer weiteren Inkubationszeit von 22 Stunden bei 30 °C werden die Proben auf konditionierte RP18 Kartuschen (Konditionierung: Elution mit 6 ml MeOH und dann mit 6 ml H₂O) aufgetragen. Nach Waschen mit jeweils 1 ml Wasser werden die Kartuschen mit jeweils 3 ml Methanol eluiert. Nach Einkonzentrierung der Methanolextrakte bei 40 °C im leichten Stickstoffstrom (ca. 200 µl Endvolumen) finden RP-HPLC-UV-Analysen bei 318 nm statt (HPLC 2). Die HPLC-MS-Analysen (Trennsäule 3) werden mit folgenden Elektrospray-Parametern durchgeführt: 3.5 kV Kapillarspannung, 200 °C Kapillartemperatur, 60 psi Sheath- und 10 Skalenteile Hilfsgas sowie eine Multiplierspannung von 1200 V. Die positiven Ionen werden mit einem Scanbereich m/z 155 bis m/z 800 und einer Scandauer von 1.0 s detektiert. Im Produktionenscan wird der Bereich von m/z 30 bis m/z 220 in 1.0 s untersucht. Die Fragmentierung erfolgt im positiven Modus mit einer Stoßgasenergie von 22 eV und einem Kollisionsgasdruck von 0.27 Pa Argon.

¹³C-2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin aus 2-¹³C-D-Glucose-6-phosphat:

ESI-MS: m/z 206 [M+H]⁺

ESI-MS/MS (Prekursorion m/z 206, CID 25 eV): m/z 206 [M+H]⁺
 m/z 188 [M+H-H₂O]⁺
 m/z 158 [M+H-H₂O-H¹³CO]⁺

^{13}C -2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin aus 6- ^{13}C -D-Glucose-6-phosphat:ESI-MS: m/z 206 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ESI-MS/MS (Prekursorion m/z 206, CID 25 eV):
 m/z 206 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 m/z 188 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$
 m/z 159 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{HCO}]^+$

3.10 Untersuchungen an Tomaten

3.10.1 Aufarbeitung und Analyse von unbehandelten Tomaten

Zwei frische, reife Tomaten werden zerkleinert und nach Zusatz von 100 ml Wasser mit einem Küchenmixer homogenisiert. Nach Zugabe von 150 g Natriumchlorid wird das Homogenat erneut gemixt und anschließend 20 min bei $5000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Rückstand wird mit 70 ml Wasser aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden über Glaswolle filtriert und in zwei Flüssig-Flüssig-Extraktoren überführt, in denen je 200 ml Diethylether vorgelegt sind. Die Extraktion erfolgt bei Raumtemperatur für 8 Stunden. Die vereinigte über Na_2SO_4 getrocknete Diethyletherphase wird anschließend am Rotationsverdampfer bei 40°C auf ca. 1 ml eingengt, in ein 1.5 ml GC-Gläschen überführt und mittels HRGC-MS analysiert (System 1).

3.10.2 Applikation von *o*-Phenylendiamin an Tomaten

In zwei frische, reife Tomaten werden jeweils 0.5 ml einer frisch angesetzten wässrigen 0.3 M *o*-Phenylendiamin-Lösung mit einer 50 μl HPLC-Spritze in das Fruchttinnere injiziert. Die Tomaten werden bei Raumtemperatur und Tageslicht (Fensterbrett) für 40 Stunden gelagert und anschließend bei -22°C eingefroren.

3.10.3 Aufarbeitung und Analyse der mit *o*-Phenylendiamin behandelten Tomaten

Die mit *o*-Phenylendiamin behandelten Tomaten lässt man bei Raumtemperatur auftauen, zerkleinert und homogenisiert sie anschließend nach Zusatz von 250 ml Wasser mit einem Küchenmixer. Das Homogenat wird 15 min bei $5000 \times g$ und 4°C zentrifugiert und der Überstand nach Filtration über Glaswolle auf eine mit Wasser konditionierte XAD-Festphasen-Säule (40×3.5 cm) gegeben. Der Rückstand wird mit 100 ml Wasser aufgeschlämmt, wie oben beschrieben zentrifugiert und der durch Glaswolle filtrierte Überstand ebenfalls auf die XAD-Säule gespült. Nach dem Durchlauf der Lösung wird die Säule mit 400 ml Wasser nachgewaschen und anschließend im leichten Luftstrom

trocken geblasen. Dann werden zunächst die unpolaren Verbindungen mit 500 ml Diethylether und anschließend die phosphorylierten bzw. glykosylierten Verbindungen mit 500 ml Methanol eluiert. Die Konzentrierung beider Extrakte findet am Rotationsverdampfer bei 40 °C statt. Die Rückstände werden in Wasser/Acetonitril (95/5; v/v) aufgenommen und nach Zentrifugation (ca. 6000 × g; 10 min) die Proben mittels HPLC-MS und HPLC-MS/MS (Trennsäule 2) analysiert.

Die massenspektrometrischen Analysen werden mit folgenden Elektrospray-Parametern durchgeführt: 4 kV Kapillarspannung, 200 °C Kapillartemperatur, 70 psi Sheath- und 10 Skalenteile Hilfsgas sowie eine Multiplierspannung von 1200 V. Die positiven Ionen werden mit einem Scanbereich m/z 200 bis m/z 210 und einer Scandauer von 1.0 s detektiert. Im Produktionenscan wird der Bereich von m/z 100 bis m/z 210 in 1.0 s untersucht. Die Fragmentierung erfolgt im positiven Modus mit einer Stoßgasenergie von 25 eV und einem Kollisionsgasdruck von 0.27 Pa Argon. Für einen Aufsatzversuch wurde die Lösung im Verhältnis 2:1 mit einer 0.1 mg/ml 2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-quinoxalin-Referenzlösung versetzt und analog im Produktionenscan vermessen.

3.11 Untersuchungen zur HDMF-Bildung aus D-Fructose-1,6-diphosphat und NAD(P)H

3.11.1 Inkubation

Aliquoten Mengen (2 ml) einer 20 mM Puffer-Lösung (Phosphat-Puffer oder Tris-HCl-Puffer) wird das entsprechende Substrat (1 – 50 mg D-Fructose-1,6-diphosphat, 20 mg D-Fructose-1-phosphat, 20 mg D-Fructose-6-phosphat, 50 mg $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D Fructose-1,6-diphosphat oder 7 mg Acetylformoin) zugesetzt. Nach Zugabe von gleichen Mengen an NAD, NADH, NADP und NADPH (jeweils 0 – 5 mg) oder von 2 mg 1-Benzyl-1,4-dihydronicotinamid werden die Proben bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert.

3.11.2 Extraktion und Analyse

Die Proben werden gemäß Abschnitt D 3.7.2 extrahiert und analysiert. Die Quantifizierung von HDMF erfolgt gemäß Abschnitt D 3.6.5.

3.11.3 Einfluss des pH-Wertes

Aliquoten Mengen (2 ml) von 20 mM Puffer-Lösungen im pH-Bereich von pH 3 bis pH 10 werden 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und jeweils 1 mg der Cofaktoren NAD, NADH, NADP und NADPH zugesetzt. Im Bereich von pH 3 – pH 6 wird ein verdünnter Citrat-Phosphat-Puffer nach McIlvaine verwendet (Verdünnung 1:4 mit bidest. Wasser).

Phosphat-Puffer wird im Bereich von pH 5 – pH 8, Tris-HCl-Puffer im Bereich von pH 7 – pH 10 eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Stunden bei 30 °C werden die Proben gemäß Abschnitt D 3.7.2 extrahiert und analysiert.

3.11.4 Einfluss der Temperatur

Aliquoten Mengen (2 ml) eines 20 mM Tris-HCl-Puffers (pH 7.5) werden 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und jeweils 1 mg der Cofaktoren NAD, NADH, NADP und NADPH zugesetzt. Die Proben werden bei Temperaturen im Bereich von 20 °C bis 50 °C für 30 Stunden inkubiert, anschließend gemäß Abschnitt D 3.7.2 extrahiert und analysiert. Die Behandlung der Proben, die zusätzlich 4.6 mg/ml Rinderserumalbumin enthalten, erfolgt analog.

Um den HDMF-Verlust infolge von chemischem Zerfall bzw. Verflüchtigung zu ermitteln, werden 0.01 mg/ml HDMF in 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) bei 40 °C und 50 °C für 48 Stunden gelagert. In regelmäßigen Zeitabständen wird mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm die HDMF Konzentration bestimmt (HPLC 2).

3.11.5 Einfluss der Inkubationszeit

200 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und jeweils 10 mg der Cofaktoren NAD, NADH, NADP und NADPH werden in 20 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 9.5, 21.5, 33.5 und 45.5 Stunden werden zwei Aliquote (jeweils 2 ml) entnommen und gemäß Abschnitt D 3.7.2 extrahiert und analysiert.

3.11.6 Einfluss von Protein und Aminosäuren

Proben (jeweils 2 ml) mit 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5), 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und 9.2 mg Rinderserumalbumin oder 2 mg Amyloglucosidase oder 2 mg Trypsinogen oder 2 mg einer Mischung aller 20 Aminosäuren (jeweils 0.1 mg) werden hergestellt. Anschließend werden jeweils zwei Proben in Anwesenheit der Cofaktoren NAD, NADH, NADP und NADPH (jeweils 1 mg) und in Abwesenheit der Cofaktoren bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Extraktion und Analyse erfolgt nach 30 Stunden gemäß Abschnitt D 3.7.2.

3.12 Darstellung von stabil markiertem NADH

3.12.1 Darstellung und Charakterisierung von [4R-²H]-NADH

Sechs ml einer 0.05 M Na₂CO₃-Lösung werden 0.1 M ²H₂-Ameisensäure und 0.015 M NAD zugesetzt. Der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf pH 8.5 eingestellt, 20 U Formiat-Dehydrogenase hinzugefügt und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur mit gelegentlichem vorsichtigem Vermischen inkubiert. Die Kontrolle der NAD-Reduktion erfolgt photometrisch durch Messung der Absorption bei 340 nm. Hierfür werden jeweils 10 µl des Reaktionsansatzes entnommen, in der Küvette mit 2490 µl 0.05 M Na₂CO₃-Lösung verdünnt und gegen 0.05 M Na₂CO₃-Lösung vermessen. Nach ca. 3 Stunden ist die Umsetzung abgeschlossen. Die Lösung wird mit 9 ml Wasser verdünnt und mittels einer Peristaltikpumpe (Pharmacia) auf eine mit Wasser äquilibrierte DEAE-Sepharose-Säule (2 × 14 cm; Pharmacia) aufgetragen. Nach Waschen mit 20 ml Wasser wird die Säule mit einem linearen Ammoniumbicarbonat-Gradienten mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.15 ml/min bei 4 °C eluiert (D 2.4). Die Absorptionsmessung der einzelnen Fraktionen (4.5 ml) erfolgt bei 260 nm. NAD und NADH werden zusätzlich anhand ihrer charakteristischen UV-Spektren identifiziert. Nicht reduziertes NAD eluiert in den Fraktionen 15-21, NADH eluiert in den Fraktionen 29-39. Die NADH-enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

Die Kontrolle des Isotopeneinbaus erfolgt mittels ESI-MS. Hierfür wird eine wässrige ca. 0.1 mg/ml NADH- bzw. [4R-²H]-NADH-Lösung direkt mittels ESI-MS ohne vorherige HPLC-Trennung (loop Injektion) analysiert (Fließmittel: Wasser/TFA/ Acetonitril 1/0.05/1, v/v/v). Die Elektrospray-Parameter sind 4 kV Kapillarspannung, 200 °C Kapillartemperatur, 70 psi Sheath- und 10 Skalenteile Hilfsgas sowie eine Multiplierspannung von 1200 V. Die positiven Ionen werden mit einem Scanbereich *m/z* 500 bis *m/z* 1000 und einer Scandauer von 1.0 s detektiert.

Ausbeute: > 90 % (bestimmt anhand des Peakflächenverhältnisses von NAD zu NADH im UV-Chromatogramm (260 nm) der Trennung an DEAE-Sepharose)

Unmarkiertes NADH: *m/z* 666 [M+H]⁺

Deuteriertes NADH: *m/z* 667 [M+H]⁺ Markierungsgrad: 100 %

3.12.2 Darstellung und Charakterisierung von [4S-²H]-NADH

Eine Lösung (6 ml), bestehend aus 0.05 M NaHCO₃, 0.03 M 1-²H-D-Glucose und 0.015 M NAD, wird auf pH 7.5 eingestellt, mit 35 U Glucose-Dehydrogenase versetzt und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Kontrolle der NAD-Reduktion erfolgt analog zu Abschnitt D 3.12.1 photometrisch durch Messung der Absorption bei 340 nm. Die

anschließende Aufreinigung von [4S-²H]-NADH findet analog der Aufreinigung von [4R-²H]-NADH statt (D 3.12.1). Der Einbau des Isotops wird mittels HPLC-MS unter den Bedingungen des Abschnitts D 3.12.1 kontrolliert.

Ausbeute: > 90 % (bestimmt anhand des Peakflächenverhältnisses von NAD zu NADH im UV-Chromatogramm (260 nm) der Trennung an DEAE-Sepharose)

Unmarkiertes NADH: m/z 666 [M+H]⁺

Deuteriertes NADH: m/z 667 [M+H]⁺ Markierungsgrad: 100 %

3.12.3 Darstellung und Charakterisierung von [4R,S-²H₂]-NADH

[4R-²H]-NADH wird gemäß dem in Abschnitt D 3.12.1 beschriebenen Verfahren hergestellt. Nach Abschluss der Reduktion wird die Formiat-Dehydrogenase durch Zusatz von 15 ml Acetonitril inaktiviert, das zugesetzte Acetonitril am Rotationsverdampfer bei 40 °C abgezogen und Wasser durch Lyophilisieren entfernt. Der weiße Rückstand lässt sich vollständig in 6 ml Wasser lösen und auf einen pH-Wert von pH 7.6 mit 0.1 N HCl einstellen. [4R-²H]-NADH wird durch den Zusatz von 55 U L-Glutamat-Dehydrogenase, 0.02 M α-Ketoglutarat und 50 µl einer 1 M NH₄Cl-Lösung zum [4-²H]-NAD⁺ oxidiert. Die Kontrolle des Reaktionsverlaufs erfolgt photometrisch durch Messung der Absorptionsabnahme bei 340 nm. Nach 105 min ist die Oxidation abgeschlossen, das Enzym wird durch den Zusatz von 15 ml Acetonitril inaktiviert und der Ansatz wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die Synthese von [4R,S-²H₂]-NADH erfolgt durch Reduktion von [4-²H]-NAD⁺ mittels Formiat-Dehydrogenase in Gegenwart von ²H₂-Ameisensäure analog dem in Abschnitt D 3.12.1 beschriebenen Verfahren. Der Markierungsgrad wird mittels HPLC-MS unter den Bedingungen des Abschnitts D 3.12.1 bestimmt.

Ausbeute: > 90 % (bestimmt anhand des Peakflächenverhältnisses von NAD zu NADH im UV-Chromatogramm (260 nm) der Trennung an DEAE-Sepharose)

Einfach deuteriertes NADH: m/z 667 [M+H]⁺ Markierungsgrad: 4.1 %

Doppelt deuteriertes NADH: m/z 668 [M+H]⁺ Markierungsgrad: 95.9 %

3.13 Inkubationen mit stabil markiertem NADH

Zu aliquoten Mengen (2 ml) eines 20 mM Tris-HCl-Puffers (pH 7.5) werden jeweils 50 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und je ca. 2 mg [4R-²H]-NADH oder [4S-²H]-NADH zugesetzt. Diese Lösungen werden bei mäßiger Durchmischung bei 30 °C für 40 h inkubiert, und HDMF wird durch Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen analog zu

Abschnitt D 3.7.2 extrahiert. Das Diethylethereluat wird nach Trocknung über Na_2SO_4 mittels HRGC-MS analysiert (System 1).

Analog werden drei Aliquote (2 ml) mit je 50 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und ca. 2 mg $[4R,S\text{-}^2\text{H}]$ -NADH sowie ein Ansatz mit 50 mg $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Fructose-1,6-diphosphat und ca. 2 mg $[4R,S\text{-}^2\text{H}_2]$ -NADH inkubiert. Nach 24, 40 und 60 Stunden wird jeweils eine Inkubation durch die sofortige Durchführung der Festphasenextraktion an einer RP18-Kartusche abgebrochen. Der Abbruch der Inkubation mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Fructose-1,6-diphosphat erfolgt nach 40 Stunden. Die Diethylethereluate der Festphasenextraktionen werden nach Trocknung über Na_2SO_4 mittels HRGC-MS analysiert (System 1). Der Markierungsgrad von HDMF wird allgemein als Verhältnis der Peakfläche des Moleküls der unmarkierten Verbindung (m/z 128) und der Peakflächen der dazugehörigen Moleküle der markierten Verbindung (m/z 129 oder m/z 130) in Prozent bestimmt.

3.14 Untersuchungen zur Bildung von Dicarbonylverbindungen aus D-Fructose-1,6-diphosphat

3.14.1 Inkubation

Drei YPD-Medien (100 ml) werden hergestellt. Zwei dieser Medien wird 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt und wiederum eine dieser Lösungen wird mit *Z. rouxii*-Zellen (ca. 2×10^7 Zellen) angeimpft. Die drei Medien werden bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert und nach sechs Tagen die HDMF-Konzentration in den Nährmedien mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm bestimmt. Anschließend wird jeweils eine frisch angesetzte wässrige *o*-Phenylendiamin-Lösung (100 mM) zugegeben (Endkonzentration *o*-Phenylendiamin im Nährmedium: jeweils ca. 14 mM), und die Reaktionsansätze werden über Nacht bei 30 °C inkubiert.

3.14.2 Extraktion

Die Hefezellen werden abzentrifugiert ($5000 \times g$; 10 min), dem Überstand wird ein Aliquot (1 ml) entnommen und der verbleibende Überstand auf eine mit Wasser konditionierte XAD-Festphasensäule (30 cm \times 3.3 cm) gegeben. Mit den Ansätzen ohne Hefezellen wird analog verfahren. Nach der Elution werden die Säulen mit jeweils 100 ml Wasser gewaschen und anschließend im leichten Luftstrom trocken geblasen. Die Elution der unpolaren Verbindungen erfolgt mit jeweils 200 ml Diethylether und die der phosphorylierten Verbindungen mit jeweils 200 ml Methanol. Die methanolischen Phasen werden am Rotationsverdampfer bei 40 °C auf ca. 6 ml und anschließend im Stickstoffstrom bei 40 °C auf ca. 0.4 ml eingengt. Der Zusatz von jeweils 1.2 ml Wasser führt zur Bildung dunkelbrauner Niederschläge, die im Folgenden abzentrifugiert und

verworfen werden. Die Diethyletherextrakte werden am Rotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockene eingedampft und die Rückstände in jeweils 1 ml Methanol aufgenommen. Die Extrakte sowie die anfangs entnommenen Aliquote werden mittels RP-HPLC-DAD analysiert (HPLC 3).

3.14.3 Isolierung von Q1, Q2 und Q3

Für die Isolierung der Verbindungen **Q1**, **Q2** und **Q3** werden einem Liter YPD Medium 5 % D-Fructose-1,6-diphosphat und ca. 2×10^7 *Z. rouxii*-Zellen zugesetzt. Nach sechs Tagen erfolgt die Bestimmung der HDMF-Konzentration im Nährmedium mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm. Eine frisch angesetzte *o*-Phenylendiaminlösung (100 mM) wird zugegeben (Endkonzentration *o*-Phenylendiamin im Nährmedium: ca. 14 mM) und der Reaktionsansatz über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Hefezellen werden abzentrifugiert ($5000 \times g$; 10 min), dem Überstand wird ein 1 ml Aliquot entnommen und der verbleibende Überstand auf eine mit Wasser konditionierte XAD-Festphasensäule (100 cm \times 4.5 cm) gegeben. Nach der Elution wird die Säule mit 1 l Wasser gewaschen und anschließend im leichten Luftstrom trocken geblasen. Die Elution der unpolaren Verbindungen erfolgt anschließend mit 2 l Diethylether und die der phosphorylierten Verbindungen mit 2.5 l Methanol. Die methanolische Phase wird am Rotationsverdampfer bei 40 °C auf ca. 20 ml und dann im Stickstoffstrom bei 40 °C auf ca. 6 ml eingeeengt. Der Zusatz von 15 ml Wasser führt zur Bildung eines dunkelbraunen Niederschlages, der im Folgenden abzentrifugiert und verworfen wird. Der Überstand wird auf eine mit Lichroprep[®] C18-Material gefüllte Glassäule (33 \times 3.3 cm) gegeben (C18-Material wird zuvor mit 500 ml Wasser/Ameisensäure (100/0.05, v/v) konditioniert) und die Säule mit 2.5 l Wasser/ Acetonitril/Ameisensäure (95/5/0.05, v/v/v) und anschließend mit 1 l Wasser/Acetonitril/ Ameisensäure (90/10/0.05, v/v/v) eluiert. Die aufgesammelten 10 ml Fraktionen, die eine deutliche UV-Absorption bei 318 nm zeigen (UV 2), werden mittels RP-HPLC-UV bei 318 nm analysiert (HPLC 4). **Q1**, **Q2** und **Q3** enthaltende Fraktionen werden jeweils vereinigt. Das Lösungsmittel wird durch Rotationsverdampfung bei 40 °C und das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Die drei Proben werden separat auf eine weitere mit Lichroprep[®] C18-Material gefüllte Glassäule (12 \times 2.5 cm) gegeben (konditioniert mit 500 ml Wasser/TFA, 100/0.05, v/v), und die Elution erfolgt mittels eines Stufengradienten mit den Eluenten A (Wasser/TFA, 100/0.05, v/v) und B (Acetonitril). Der prozentuale Gehalt an Eluent B wird in 4 %-Schritten von 4 auf 24 % gesteigert (50 ml Elutionsmittel pro Stufe). Die erhaltenen 10 ml Fraktionen werden mittels RP-HPLC-UV bei 318 nm analysiert (HPLC 4) und Fraktionen, die **Q1**, **Q2** oder **Q3** enthalten, vereinigt und nach Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (40 °C) lyophilisiert. Durch die beschriebenen Aufreinigungsschritte erhält man die Verbindungen **Q1**, **Q2** und **Q3** als Reinsubstanzen in Form von gelblichen amorphen Pulvern.

3.14.4 Charakterisierung von Q1, Q2 und Q3

Die UV- und MS-Daten der Quinoxalinderivate **Q1**, **Q2** und **Q3** sind nachfolgend zusammengestellt. Die UV-Daten werden mittels RP-HPLC-DAD-Analyse bestimmt, wobei die entsprechenden Lösungsmittelzusammensetzungen rechnerisch ermittelt werden. Die HPLC-MS-Analysen (Trennsäule 3) finden unter folgenden Elektrospray-Parametern statt: 4 kV Kapillarspannung, 200 °C Kapillartemperatur, 70 psi Sheath- und 10 Skalenteile Hilfsgas sowie eine Multiplierspannung von 1200 V. Die positiven Ionen werden mit einem Scanbereich m/z 160 bis m/z 1000 und einer Scandauer von 1.0 s detektiert. Im Produktionenscan wird der Bereich von m/z 20 bis m/z 350 in 1.0 s untersucht. Die Fragmentierung erfolgt mit einer Stossgasenergie von 25 eV und einem Kollisionsgasdruck von 0.27 Pa Argon. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten sind in Tab. C-4 und Tab. C-5 in Abschnitt C 4.2.2 zusammengefasst.

Q1:

UV λ_{max} (H₂O/TFA/MeCN 84/0.05/16, v/v/v): 318 nm, 238 nm

ESI-MS: m/z 331 [M+H]⁺

ESI-MS/MS (Prekursorion m/z 331, CID 25 eV): m/z 331 [M+H]⁺
 m/z 233 [M+H-H₃PO₄]⁺
 m/z 215 [M+H-H₃PO₄-H₂O]⁺

Q2:

UV λ_{max} (H₂O/TFA/MeCN 84/0.05/16, v/v/v): 320 nm, 238 nm

ESI-MS: m/z 315 [M+H]⁺

ESI-MS/MS (Prekursorion m/z 315, CID 25 eV): m/z 315 [M+H]⁺
 m/z 217 [M+H-H₃PO₄]⁺

Q3:

UV λ_{max} (H₂O/TFA/MeCN 80/0.05/20, v/v/v): 320 nm, 240 nm

ESI-MS: m/z 299 [M+H]⁺

ESI-MS/MS (Prekursorion m/z 299, CID 25 eV): m/z 299 [M+H]⁺
 m/z 201 [M+H-H₃PO₄]⁺
 m/z 183 [M+H-H₃PO₄-H₂O]⁺

E Literaturverzeichnis

- Alluosh, H. M.; Lopez-Ribot, J. L.; Masten, B. J.; Chaffin, W. L. (1997). 3-Phosphoglycerat kinase: a glycolytic protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 321-330.
- Amini, A. (2001). Recent developments in chiral capillary electrophoresis and applications of this technique to pharmaceutical and biomedical analysis. *Electrophoresis* **22**, 3107-3130.
- Anderson, B. A.; Hansen, M. M.; Harkness, A. R.; Henry, C. L.; Vicenzi, J. T.; Zmijewski, M. J. (1995). Application of a practical biocatalytic reduction to an enantioselective synthesis of the 5H-2,3-Benzodiazepine LY300164. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12358-12359.
- Attfield, P.V. (1998). Physiological and molecular aspects of hyperosmotic stress tolerance in yeasts. *Recent Res. Devel. Microbiol.* **2**, 427-441.
- Baleiras Couto, M. M.; Vogels, J. T. W. E.; Hofstra, H.; Huis in't Veld, J. H. J.; van der Vossen, J. M. B. M. (1995). Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 525-535.
- Barker, B. T. (1901). A conjugating yeast. *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, **194**, 467.
- Belitz, H. D.; Grosch, W., Schieberle, P. (2001). Lehrbuch der Lebensmittelchemie; 5. Auflage, Springer, Berlin-Heidelberg.
- Benevolensky, S. V.; Clifton, D.; Fraenkel, D. G. (1994). The effect of increased phosphoglucose isomerase on glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 4878-4882.
- Benkovic, S. J. (1979). Anomeric specificity of carbohydrate-utilizing enzymes. *Methods Enzymol.* **63**, 370-379.
- Beuerle, T.; Schreier, P.; Schwab, W. (1997). (R)-3-hydroxy-5(Z)-octenyl β -D-glucopyranoside from *Malus sylvestris* fruits. *Nat. Prod. Lett.* **10**, 119-124.
- Blank, I.; Fay, L. B. (1996). Formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone through Maillard reaction based on pentose sugar. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 531-536.
- Blank, I.; Schieberle, P. (1993). Analysis of the seasoning-like flavour substance of a commercial lovage extract (*Levisticum officinale* Koch.). *Flavour Fragr. J.* **8**, 191-195.

- Böhringer, P. (1962). Weinhefe und Weinbereitung. In: Die Hefen Band II Technologie der Hefen. Reiff, F.; Kautzmann, R.; Lüers, H.; Lindemann, M. (Hrsg.) Hans Carl, Nürnberg.
- Boo, Y. C.; Jeon, C. O.; Oh, J. Y. (1994). Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone from pine needles as an antioxidative principle. *Han'guk Nonghwa Hakhoechi* **37**, 310-314.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bruche, G.; Dietrich, A.; Mosandl, A. (1995). Stereoisomeric flavour compounds LXXI: Determination of the origin of aroma-active dihydrofuranones. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**, 249-252.
- Bruche, G.; Schmarr, H.-G.; Bauer, A.; Mosandl, A.; Rapp, A.; Engel, L. (1991). Stereoisomere Aromastoffe. LI: Stereodifferenzierung chiraler Furanone. Möglichkeiten und Grenzen der herkunftsspezifischen Aromastoff-Analyse. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **193**, 115-118.
- Brühlmann, F. (2002). Persönliche Mitteilung. Firmenich SA, Schweiz.
- Buswell, J. A.; Hamp, S.; Eriksson, K.-E. (1979). Intracellular quinone reduction in *Sporotrichum pulverulentum* by NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *FEBS Letters* **108**, 229-232.
- Buttery, R. G.; Ling, L. C. (1996). Direct formation of 4-alkoxy derivatives from 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and aliphatic alcohols. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1512-1514.
- Buttery, R. G.; Ling, L. C.; Stern, D. J. (1997). Studies on popcorn aroma and flavor volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 837-843.
- Buttery, R. G.; Takeoka, G. R.; Krammer, G. E.; Ling, L. C. (1994). Identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and 5-methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in fresh and processed tomato. *Lebensm. Wiss. Technol.* **27**, 592-594.
- Buttery, R. G.; Takeoka, G. R.; Ling, L. C. (1995). Furaneol: Odor threshold and importance to tomato aroma. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1638-1640.
- Capon, B.; Kwok, F. C. (1989). Tautomerism of the monohydroxy derivatives of five-membered oxygen, nitrogen and sulfur heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 5346-5356.
- Cerny, C.; Grosch, W. (1992). Evaluation of potent odorants in roasted beef by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **194**, 322-325.

- Chaffin, W. L.; Lopez-Ribot, J. L.; Casanova, M.; Gozalbo, D.; Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **62**, 130-180.
- Chankvetadze, B.; Frost, M.; Blaschke, G. (1999). Capillary electrophoresis. An attractive method in enantiomer analysis. *Pharm. in unserer Zeit* **28**, 186-196.
- Cheetham, P. S. J. (1997). Combining a technical push and the business pull for natural flavours. In: *Biotechnology of aroma compounds*; Berger, R.G., (Hrsg.); aus Band 55: *Advances in biochemical engineering biotechnology*, Scheper, T., (Hrsg.); Springer, Berlin, 1-50.
- Chen, C.-W.; Shu, C.-K.; Ho, C.-T. (1996). Photosensitized oxidative reaction of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2361-2365.
- Chen, X.; Schauder, S.; Potier, N.; Van Dorsselaer, A.; Pelczer, I.; Bassler, B. L.; Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* **415**, 545-549.
- Christen, H. R. (1977). *Grundlagen der organischen Chemie*. 4. Auflage, Sauerländer; Diesterweg-Salle.
- Christians, T. (2001). *Kapillarelektrophoretische Trennung chiraler 1,4-Dihydropyridine mit nativen und anionischen Cyclodextrinen sowie mit einem neu synthetisierten, carbamoylierten β -Cyclodextrin-Derivat*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Comte, G.; Allais, D. P.; Chulia, A. J.; Vercauteren, J.; Dalge, C. (1996). Two furanone glucoside derivatives from *Juniperus Phoenicæ*. *Phytochemistry* **41**, 1329-1332.
- Copper, C. L.; Davis, J. C.; Sepaniak, M. J. (1995). Mechanisms of enantiomeric resolution in cyclodextrin-modified capillary electrophoretic separations of binaphthyl compounds. *Chirality* **7**, 401-408.
- Costello, C. A.; Payson, R. A.; Menke, M. A.; Larson, J. L.; Brown, K. A.; Tanner, J. E.; Kaiser, R. E.; Hershberger, C. L.; Zmijewski, M. J. (2000). Purification, characterization, cDNA cloning and expression of a novel ketoreductase from *Zygosaccharomyces rouxii*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5493-5501.
- Csuk, R.; Glaenger, B. I. (1991). Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry. *Chem. Rev.*, 49-97.
- Dahlen, T.; Hauck, T.; Wein, M.; Schwab, W. (2001). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone as a secondary metabolite from D-fructose 1,6-diphosphate metabolism by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 352-358.
- D'Arrigo, P.; Pedrocchi-Fantoni, G.; Servi, S. (1997). Stereoselective synthesis of chiral compounds using whole-cell biocatalysts. *Stereoselec. Biocatal.* **44**, 365-396.

- De Rijke, D; Boelens, H. (1973). Synthesis and reactions of 3-oxo-2H-furan derivatives. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **92**, 731-738.
- Diem, S. (2001). Enzymatische und chemische Glykosylierung von Tryptophan. Identifizierung und Charakterisierung neuer Tryptophan-Glycoderivate. Dissertation, Universität Würzburg.
- Duerre, J. A.; Baker, D. J.; Salisbury, L. (1971). Structure elucidation of a carbohydrate derived from *S*-ribosylhomocystein by enzymatic cleavage. *Fed. Proc.* **30**, 88.
- Edwards, S. R.; Braley, R.; Chaffin, W. L. (1999). Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 211-216.
- Engel, W.; Hofmann, T.; Schieberle, P. (2001). Characterization of 3,4-dihydroxy-3-hexen-2,5-dion as the first open-chain caramel-like smelling flavor compound. *Eur. Food Res. Technol.* **213**, 104-106.
- Esposito, S.; Carfagna, S.; Massaro, G.; Vona, V.; Di Martino Rigano, V. (2001). Glucose-6-phosphate dehydrogenase in barley roots: kinetic properties and localization of the isoforms. *Planta* **212**, 627-634.
- Farine, J. P.; Le Quere, J. L.; Duffy, J.; Semon, E.; Brossut, R. (1993). 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, two components of the male sex pheromone of *Eurycotis floridana* (Walker) (Insecta Blattidae, Polyzosteriinae). *J. Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 2026-2030.
- Fay, L. B.; Huynh-Ba, T.; Blank, I. (1997). Study of the fragmentation of 3[2H]-furanones by mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4057-4064.
- Feron, G.; Bonnarme, P.; Durand, A. (1996). Prospects for the microbial production of food flavours. *Trends. Food Sci. Technol.* **7**, 285-293.
- Feuerle, J. (2000). Bakterielle Antigene für humane V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten: Untersuchungen zur strukturellen Charakterisierung und zum strukturellen Zusammenhang mit der mevalonatunabhängigen Isoprenoidbiosynthese. Dissertation, Universität Würzburg.
- Fischer, N.; Hammerschmidt, F.-J. (1992). A contribution to the analysis of fresh strawberry flavour. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **14**, 141-148.
- Flath, R. A.; Forrey, R. R. (1970). Volatile components of smooth cayenne pineapple. *J. Agric. Food Chem.* **18**, 306-309.
- Fox, A. (1999). Carbohydrate profiling of bacteria by gas chromatography-mass spectrometry and their trace detection in complex matrices by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **843**, 287-300.
- Franke, F. P.; Kapuscinski, M.; Lyndon, P. (1985). Synthesis and NMR characterization of intermediates in the L-type pentose phosphate cycle. *Carbohydr. Res.* **143**, 69-76.

- Glomb, M. A.; Pfahler, C. (2000). Synthesis of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose, a major hexose Maillard intermediate. *Carbohydr. Res.* **329**, 515-523.
- Glomb, M. A.; Tschirnich, R. (2001). Detection of α -dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5543-5550.
- Glomb, M. A.; Tschirnich, R.; Araki, M.; Takahaschi, M.; Monnier, V. M. (1999). Nachweis von α -Dicarbonylstrukturen *in-vivo*. *Lebensmittelchemie* **53**, 143.
- Grimm, U. (1997). Die Suppe lügt. Die schöne neue Welt des Essens. Klett-Cotta, Stuttgart.
- Grosch, W. (1990). Analyse von Aromastoffen. *ChiuZ* **24**, 82-89.
- Guth, H.; Grosch, W. (1993). Identification of potent odorants in static headspace samples of green and black tea powders on the basis of aroma extract dilution analysis (AEDA). *Flavour Fragr. J.* **8**, 173-178.
- Guth, H.; Grosch, W. (1994). Identification of the character impact odorants of stewed beef juice by instrumental analyses and sensory studies. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2862-2866.
- Hallinan, K. O.; Crout, D. H. G.; Hunt, J. R.; Carter, A. S.; Dalton, H.; Murrel, J. C.; Holt, R. A.; Crosby, J. (1995). Yeast catalysed reduction of β -keto esters (2): optimisation of the stereospecific reduction by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biocatal. Biotransform.* **12**, 179-191.
- Hayashida, Y.; Slaughter, J. C. (1997). Biosynthesis of flavour-active furanones by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation depends on the malt type used in medium preparation. *Biotechnol. Lett.* **19**, 429-431.
- Hayashida, Y.; Hatano, M.; Tamura, Y.; Kakimoto, M.; Nishimura, K.; Igoshi, K.; Kobayashi, H.; Kuriyama H. (2001). 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF) production in simple media by lactic acid bacterium, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IFO 3427. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 97-99.
- Hayashida, Y.; Kuriyama, H.; Nishimura, K.; Slaughter, J. C. (1999). Production of 4-hydroxyfuranones in simple media by fermentation. *Biotechnol. Lett.* **21**, 505-509.
- Hayashida, Y.; Nishimura, K.; Slaughter, J. C. (1997). The influence of mash pre-aging on the development of the flavour-active compound , 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF), during soy sauce fermentation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **32**, 11-14.
- Hayashida, Y.; Nishimura, K.; Slaughter, J. C. (1998a). The importance of the furanones HDMF and HEMF in the flavour profile of japanese barley miso and their production during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **78**, 88-94.

- Hayashida, Y.; Nishimura, K.; Slaughter, J. C. (1998b). Formation mechanisms of flavour-active furanones, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF) and 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF), in *Mugi-Miso*, fermented soy-beans paste with berley-*Koji*. *J. Brew. Soc. Japan* **93**, 730-738.
- Hecquet, L.; Sancelme, M.; Bolte, J.; Demuynck, C. (1996). Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1357-1360.
- Henry, D. W.; Silverstein, R. M. (1966). A rational synthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, a flavour component of pineapple. *J. Org. Chem.* **31**, 2391-2394.
- Hernandez, P.; Beuchat, L. R. (1995). Evaluation of diluents and media for enumerating *Zygosaccharomyces rouxii* in blueberry syrup. *Int. J. Food Microbiol.* **25**, 11-18.
- Hicks, K. B.; Feather, M. S. (1975). Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxy-3(2H)-furanone, a component of beef flavor, from amadori products. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 957-960.
- Hicks, K. B.; Harris, D. W.; Feather, M. S.; Loepky, R. N. (1974). Production of 4-hydroxy-3(2H)-furanone, a component of beef flavor, from a 1-amino-1-deoxy-D-fructofuronic acid. *J. Agric. Food Chem.* **22**, 724-725.
- Hirsch, J.; Mossine, V. V.; Feather, M. S. (1995). The detection of some dicarbonyl intermediates arising from the degradation of Amadori compounds (the Maillard reaction). *Carbohydr. Res.* **273**, 171-177.
- Hirvi, T.; Honkanen, E. (1982). The Volatiles of Two New Strawberry Cultivars, „Annelie“ and „Alaska Pioneer“, obtained by backcrossing of cultivated strawberries with wild strawberries, *Fragaria vesca*, Rügen and *Fragaria virginiana*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **175**, 113-116.
- Hirvi, T.; Honkanen, E.; Pyysalo, T. (1980). Stability of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in aqueous buffer solutions. *Lebensm. Wiss. Technol.* **13**, 324-325.
- Hodge, J. E. (1960). Novel reductones and methods of making them. US-Patent 2.936.308.
- Hodge, J. E.; Fisher, B. E.; Nelson, E. C. (1963). Dicarbonyls, reductones, and heterocyclics produced by reaction of reducing sugars with secondary amine salts. *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* **83**, 84-92.
- Hodge, J. E.; Mills, F. D.; Fisher, B. E. (1972). Compounds of browned flavor derived from sugar-amine reactions. *Cereal Sci. Today* **17**, 34-40.
- Hofmann, A.; Eugster, C. H. (1966). Synthese von 2,5-Dimethyl-3-hydroxy- Δ^2 -furenidon-(4), einer Aromakomponente der Ananasfrucht. *Helv. Chim. Acta* **49**, 53-56.

- Hofmann, T. (1998). Characterization of precursors and elucidation of the reaction pathway leading to a novel colored 2H,7H,8aH-pyrano[2,3-b]pyran-3-one from pentoses by quantitative studies and application of ¹³C-labeling experiments *Carbohydr. Res.* **313**, 215-224.
- Hofmann, T. (1999). Quantitative studies on the role of browning precursors in the Maillard reaction of pentoses and hexoses with L-alanine. *Eur. Food Res. Technol.* **209**, 113-121.
- Hofmann, T.; Schieberle, P. (1997). Identification of potent aroma compounds in thermally treated mixtures of glucose/cysteine and rhamnose/cysteine using aroma extract dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 898-906.
- Honkanen, E.; Pyysalo, T.; Hirvi, T. (1980). The aroma of finnish wild raspberries, *Rubus idaeus*, L. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **171**, 180-182.
- Honkanen, E.; Takeoka, G. R.; Buttery, R. G. (1994). Isolation and identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone glucoside from tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1595-1597.
- Horitsu, H.; Maseda, Y.; Kawai, K. (1990). A new process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 295-300.
- Horitsu, H.; Wang, M. Y.; Kawai, K. (1991). A modified process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 269-271.
- Hosono, K. (1991). The release of proteins and UV-absorbing materials from salt-tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii* by osmotic shock. *J. Ferment. Bioeng.* **72**, 445-449.
- Hosono, K. (1992). Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 91-96.
- Hosono, K.; Ryu, B.-H. (1993). Changes in the membrane properties of *Zygosaccharomyces rouxii* in response to osmotic stress. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **22**, 101-107.
- Huber, U. A. (1992). Homofuraneol: A powerful tool to prepare and improve sophisticated high quality flavors. *Perfum. Flavour* **17**, 15-19.
- Hunter, G. L. K.; Bucek, W. A.; Radford, T. (1974). Volatile components of canned Alphonso mango. *J. Food Sci.* **39**, 900-903.
- Idstein, H.; Schreier, P. (1985). Volatile constituents from guava (*Psidium guajava*, L.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 138-143.
- Jermi, M. F. G.; Geiges, O.; Schmidt-Lorenz, W. (1987). Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products. *J. Food Protect.* **50**, 468-472.

- Justesen, U.; Arrigoni, E. (2001). Electrospray ionisation mass spectrometric study of degradation products of quercetin, quercetin-3-glucoside and quercetin-3-rhamnoglucoside, produced by *in vitro* fermentation with human faecal flora. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 477-483.
- Kallio, H. (1976). Identification of vacuum steam-distilled aroma compounds in the press juice of arctic bramble, *Rubus arcticus* L. *J. Food Sci.* **41**, 555-562.
- Kato, N.; Sahm, H.; Schutte, H.; Wagner, F. (1979). Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii*. *Biochim. Biophys. Acta* **566**, 1-11.
- Kawakishi, S.; Tsunehiro, J.; Uchida, K. (1991). Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion. *Carbohydr. Res.* **211**, 167-171.
- Kayingo, G.; Kilian, S. G.; Prior, B. A. (2001). Conservation and release of osmolytes by yeasts during hypo-osmotic stress. *Arch. Microbiol.* **177**, 29-35.
- Knecht, K. J.; Feather, M. S.; Baynes, J. W. (1992). Detection of 3-deoxyfructosone and 3-Deoxyglucosone in human urine and plasma: Evidence for intermediate stages of the Maillard reaction *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 130-137.
- Knowles, F. C.; Chanley, J. D.; Pon, N. G. (1980). Spectral changes arising from the action of spinach chloroplast ribose phosphate isomerase on ribose 5-phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **202**, 106-115.
- Krämer, J. (1997). *Lebensmittelmikrobiologie*. 3. Auflage, Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Krings, U.; Berger, R. G. (1998). Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 1-8.
- Kunert-Kirchhoff, J.; Baltes, W. (1990). Model reactions on roast aroma formation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **190**, 14-16.
- Kurtzman, C. P.; Fell, J. W. (1998). *The Yeast: A taxonomic study*, 4th Edition, Elsevier, Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Singapore-Tokyo, 424-432.
- Kurz, L. C.; Frieden, C. (1977). Comparison of the structures of enzymatic and nonenzymatic transition states. Reductive desulfonation of 4-X-2,6-dinitrobenzenesulfonates by reduced nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry* **16**, 5207-5216.
- Larimer, F. W.; Harpel, M. R.; Hartman, F. C. (1994). β -Elimination of phosphate from reaction intermediates by site-directed mutants of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **269**, 11114-11120.
- Larsen, M.; Poll, L. (1992). Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **195**, 120-123.

- Larsen, M.; Poll, L.; Olsen, C. E. (1992). Evaluation of the aroma composition of some strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) cultivars by use of odour threshold values. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **195**, 536-539.
- Laskowski, W. (1960). Entwicklungscyclen und Erbverhalten der Hefen. In: Die Hefen, Band I, Hefen in der Wissenschaft. Reiff, F.; Kautzmann, R.; Lüers, H.; Lindemann, M. (Hrsg.) Hans Carl, Nürnberg.
- Lavid, N.; Schwab, W.; Kafkas, E.; Koch-Dean, M.; Bar, E.; Larkov, O.; Ravid, U.; Lewinsohn, E. (2002). Aroma biosynthesis in strawberry: *S*-adenosylmethionine: Furanol *O*-methyltransferase activity in ripening fruits. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4025-4030.
- Ledl, F.; Schleicher, E. (1990). Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chem.* **102**, 597-626.
- Ledl, F.; Severin, T. (1978). Bräunungsreaktionen von Pentosen und Aminen – Untersuchung zur Maillard-Reaktion, XIII [1]. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **167**, 410-413.
- Lee, S.; Kirschning, A.; Müller, M.; Way, C.; Floss, H. G. (1999). Enzymic synthesis of [7-¹⁴C, 7-³H]- and [1-¹³C]sedoheptulose 7-phosphate and [1-¹³C]ido-heptulose 7-phosphate. *J. Molec. Catal. B: Enzymatic* **6**, 369-377.
- Lipke, P. N.; Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**, 3735-3740.
- Lo, H. C.; Buriez, O.; Kerr, J. B.; Fish, R.H. (1999). Regioselective reduction of NAD⁺ models with [Cp*Rh(bpy)H]: Structure – activity relationships and mechanistic aspects in the formation of the 1,4-NADH derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1429-1432.
- Lu, C.; Kurjan, J.; Lipke, P. (1994). A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4825-4833.
- Maarse, C. H.; Visscher, C. A. (1992). Volatile compounds in food. TNO-Division for Nutrition and Food Research; TNO-CIVO Food Analysis Institute Zeist, 3. Ergänzungsband.
- Maillard, L. C. (1912). Action des acides amines sur le sucre, formation des melanoidines par voie methodique. *Compt Rend. Acad. Sci.* **154**, 66.
- Marquina, D.; Llorente, P.; Santos, A.; Peinado, J. M. (2001). Characterization of the yeast population in low water activity foods. *Adv. Food Sci.* **23**, 63-67.
- Mayerl, F.; Näf, R.; Thomas, A. F. (1989). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone glucoside: Isolation from strawberries and synthesis. *Phytochemistry* **28**, 631-633.

- McNab, H. (1982). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of quinoxaline derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2**, 357-363.
- Membre, J.-M.; Kubaczka, M.; Chene, C. (1999). Combined effects of pH and sugar on growth rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a bakery product spoilage yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4921-4925.
- Meyers, A. I.; Brown, J. D. (1987). The first nonenzymatic stereospecific intramolecular reduction by a NADH mimic containing a covalently bound carbonyl moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3155-3156.
- Mills, F. D.; Hodge, J. E. (1976). Amadori compounds: Vacuum thermolysis of 1-deoxy-1-L-proline-D-fructose. *Carbohydr. Res.* **51**, 9-21.
- Mills, F. D.; Baker, B. G.; Hodge, J. E. (1969). Amadori compounds as nonvolatile flavor precursors in processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **17**, 723-727.
- Milo, C.; Reineccius, G. A. (1997). Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild cheddar-cheese. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3590-3594.
- Miwa, I.; Okuda, J. (1982). Non-enzymatic reduction of alloxan by reduced nicotinamide nucleotide. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 921-925.
- Montigny, J. de; Straub, M.-L.; Potier, S.; Tekaia, F.; Dujon, B.; Wincker, P.; Artiguenave, F.; Souciet, J.-L. (2000). Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 8. *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEBS Letters* **487**, 52-55.
- Mosandl, A.; Bruche, G.; Askari, C.; Schmarr, H.-G. (1990). Stereoisomeric flavor compounds XLIV: Enantioselective analysis of some important flavor molecules. *J. High Resol. Chromatogr.* **13**, 660-662.
- Mottram, D. S.; Nobrega, I. C. C. (2002). Formation of sulfur aroma compounds in reaction mixtures containing cysteine and three different forms of ribose. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4080-4086.
- Nahrstedt, A.; Rockenbach, J.; Wray, V. (1995). Phenylpropanoid glycosides, a furanone glucoside and geniposidic acid from members of the Rubiaceae. *Phytochemistry* **39**, 375-378.
- Nam, S.; Renganathan, V. (1999). Non-enzymatic reduction of azo dyes by NADH. *Chemosphere* **40**, 351-357.
- Naofumi, M.; Yoshiyuki, D.; Masanosuke, T. (1984). Quinoxalines derived from pentoses with o-phenylenediamine under acidic refluxed conditions. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 3161-3163.
- Nevidek, W.; Ledl, F.; Fischer, W. (1992). Detection of 5-hydroxymethyl-2-methyl-3(2H)-furanone and α -dicarbonyl compounds in reaction mixtures of hexoses and pentoses with different amines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **194**, 222-228.

- Njoroge, F. M.; Monnier, V. M. (1989). The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Prog. Clin. Biol. Res.* **304**, 85-107.
- Nunomura, N.; Sasaki, M.; Asao, Y.; Yokotsuka, T. (1976). Studies on flavor components in Shoyu. II. Isolation and identification of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone, as a flavor component in shoyu (Soy Sauce). *Agric. Biol. Chem.* **40**, 491-495.
- Nunomura, N.; Sasaki, M.; Yokotsuka, T. (1979). Studies on flavor components in shoyu. Part V. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, a flavor component in shoyu (soy sauce). *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1361-1363.
- Nunomura, N.; Sasaki, M.; Yokotsuka, T. (1980). Studies on flavor components in shoyu. Part VI. Shoyu (Soy Sauce) flavor components: Acidic fractions and the characteristic flavor component. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 339-351.
- Odani, H.; Shinzato, T.; Matsumoto, Y.; Usami, J.; Maeda, K. (1999). Increase in three α,β -dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific *in vivo* determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 89-93.
- Ohloff, G. (1969). Chemie der Geruchs- und Geschmacksstoffe. *Fortschr. Chem. Forsch.* **12**, 185-253.
- Ohloff, G. (1990). Riechstoffe und Geruchssinn – Die molekulare Welt der Düfte. Springer, Berlin.
- Ohshiro, K.; Yagi, T. (1996). Regulation of intracellular osmotic pressure and some factors that influence the promotion of glycerol synthesis in a respiration-deficient mutation of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* during salt stress. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **42**, 201-212.
- Ok, T.; Hashinaga, F. (1997). Identification of sugar-tolerant yeasts isolated from high-sugar fermented vegetable extracts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**, 39-47.
- Ottolina, G.; Riva, S.; Carrea, G.; Danieli, B.; Buckman, A. F. (1989). Enzymatic synthesis of [4R-²H]-NAD(P)H and [4S-²H]-NAD(P)H and determination of the stereospecificity of 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **998**, 173-178.
- Paech, C.; Pierce, J.; McCurry, S. D.; Tolbert, N. E. (1978). Inhibition of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by ribulose-1,5-bisphosphate epimerization and degradation products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 1084-1092.
- Parekh, L. J.; Sakariah, K. K.; Shah, V. J. (1970). Studies on carbohydrate metabolism in fruit tissues of *Citrus acida*. Part II. Studies on glycolytic enzymes and glycolytic intermediates in the fruit tissues of *Citrus acida* during the development of the fruit. *Enzymol. Acta Biocatal.* **38**, 23-28.

- Peer, H. G.; Van den Ouweland, G. A. M. (1968). Synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-2,3-dihydro-3-furanone from D-ribose 5-phosphate. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas I* **87**, 1017-1020.
- Peer, H. G.; Van den Ouweland, G. A. M.; De Groot, C. N. (1968). Reaction of aldopentoses and secondary amine salts, a convenient method of preparing 4-hydroxy-5-methyl-2,3-dihydro-3-furanone. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **87**, 1011-1016.
- Pérez, A. G.; Olías, R.; Olías, J. M.; Sanz, C. (1999). Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone and derivatives in *in vitro* grown strawberries. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 655-658.
- Pérez, A. G.; Olías, R.; Sanz, C.; Olías, J. M. (1996). Furanones in strawberries: Evolution during ripening and postharvest shelf life. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3620-3624.
- Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. (1993). The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* **212**, 101-105.
- Pickenhagen, W.; Velluz, A.; Passerat, J.-P.; Ohloff, G. (1981). Estimation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone (FURANEOL[®]) in cultivated and wild strawberries, pineapples and mangoes. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 1132-1134.
- Pisarnitskii, A. F.; Demechenko, A. G.; Egorov, I. A.; Cvelesiani, R. K. (1992) Methylpentoses are probable precursors of furanones in fruits. *Appl. Biochem. Microbiol.* **28**, 97-100.
- Preininger, M.; Grosch, W. (1994). Evaluation of key odorants of the neutral volatiles of Emmentaler cheese by the calculation of odour activity values. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **27**, 237-244.
- Preininger, M.; Grosch, W. (1995). Determination of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF) in cultures of bacteria. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**, 97-98.
- Preininger, M.; Rychlik, M.; Grosch, W. (1994b). Potent odorants of the neutral volatile fraction of swiss cheese (Emmentaler). In: Trends in Flavour Research. Maarse, H., van der Heij (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, 267-270.
- Preininger, M.; Warmke, R.; Belitz, H. D.; Grosch, W. (1994a). Studies on the flavour of Swiss cheese (Emmentaler) *Bericht der deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie*, 88.
- Preininger, M.; Warmke, R.; Grosch, W. (1996). Identification of the character impact flavour compounds of Swiss cheese by sensory studies of models. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **202**, 30-34.

- Prior, B. A.; Hohmann, S. (1997). Glycerol Production and osmoregulation. In: Yeast sugar metabolism - biochemistry, genetics, biotechnology, and applications. Zimmermann, F. K.; Entian, K.-D. (Hrsg.) Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, 313-338.
- Pyysalo, T.; Honkanen, E.; Hirvi, T. (1979). Volatiles of wild strawberries, *Fragaria vesca* L., compared to those of cultivated berries, *Fragaria × ananassa* cv. Senga Sengana. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 19-22.
- Raab, T.; Schmitt, U.; Hauck, T.; Knecht, A.; Holzgrabe, U.; Schwab, W. (2003a). Capillary electrophoretic resolution of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone enantiomers, the key flavour compounds in strawberry fruit. *J. Chromatogr.*, zur Veröffentlichung angenommen.
- Raab, T.; Hauck, T.; Knecht, A.; Schmitt, U.; Holzgrabe, U.; Schwab, W. (2003b). Tautomerism of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone – Evidence for its enantioselective biosynthesis. *Chirality*, zur Veröffentlichung eingereicht.
- Rapp, A.; Knipser, W.; Engel, L.; Ullemeyer, H.; Heimann, W. (1980). Fremdkomponenten im Aroma von Trauben und Weinen interspezifischer Rebsorten. I. Die Erdbeernote. *Vitis* **19**, 13-23.
- Re, L.; Ohloff, G. (1967) Organoleptic 2,5-dimethyl-3-furanol-4(5*H*)-one. CH-Patent 474,500; CA 73 87778.
- Re, L.; Maurer, B.; Ohloff, G. (1973). A simple synthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (furanol) an important aroma component of pineapple and strawberry. *Helv. Chim. Acta* **56**, 1882-1894.
- Reed, R. H.; Chudek, J. A.; Foster, R.; Dadd, G. M. (1987). Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2119-2123.
- Restaino, L.; Bills, S.; Tscherneff, K.; Lenovich, L. M. (1983). Growth characteristics of *Saccharomyces rouxii* from chocolate syrup. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1614-1621.
- Ribeiro, B.; Bossier, A.; Duarte, J. C. (1995). Production of furanone derivatives by yeasts. In: 7th European Congress on Biotechnology, Societe de Chimie Industrielle (Hrsg.), Abstract book IV, JEP 118, Nizza, 75.
- Rizzi, G. P. (1994). The Maillard reaction in food, In: Maillard reactions in chemistry, food, and health, Labuza, T. P.; Reineccius, G. A.; Monnier, V. M.; O'Brian, J.; Baynes, J. W. (Hrsg.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 11-19.
- Rodin, J. O.; Himel, C. M.; Silverstein, R. M.; Leeper, R. W.; Gortner, W. A. (1965). Volatile flavor and aroma components of pineapple. I. Isolation and tentative identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone. *J. Food Sci.* **30**, 280-285.

- Roscher, R. (1998). Biosynthese und Metabolismus von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanon (Furaneol[®]). Dissertation, Universität Würzburg.
- Roscher, R.; Bringmann, G.; Schreier, P.; Schwab, W. (1998). Radiotracer studies on the formation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in detached ripening strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1488-1493.
- Roscher, R.; Herderich, M.; Steffen, J.-P.; Schreier, P.; Schwab, W. (1996). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone 6'-O-malonyl- β -D-glucopyranoside in strawberry fruits. *Phytochemistry* **43**, 155-159.
- Roscher, R.; Hilkert, A.; Gessner, M.; Schindler, E.; Schreier, P.; Schwab, W. (1997). L-Rhamnose: progenitor of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone formation by *Pichia capsulata*? *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **204**, 198-201.
- Roscher, R.; Schreier, P.; Schwab, W. (1997). Metabolism of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in detached ripening strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3202-3205.
- Rothe, M.; Thomas, B. (1963). Aromastoffe des Brotes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **119**, 302-310.
- Salminen, S. O.; Young, R. E. (1975). The control properties of phosphofructokinase in relation to the respiratory climacteric in banana fruits. *Plant Physiol.* **55**, 45-50.
- Sanz, C.; Richardson, D. G.; Pérez, A. G. (1995). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and derivatives in strawberries during ripening. In: Fruit Flavors, Biogenesis, Characterization, and Authentication. R. L. Rouseff und M. M. Leahy (Hrsg.); ACS Symposium Series No. 596, American Chemical Society, Washington DC, 268-275.
- Sasaki, M. (1996a). Isolation and identification of precursor of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone from isolated soybean protein and shoyu. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 230-235.
- Sasaki, M. (1996b). Influence of sodium chloride on the levels of flavor compounds produced by shoyu yeast. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3273-3275.
- Sasaki, M.; Nunomura, N.; Matsudo, T. (1991). Biosynthesis of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone by yeasts. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 934-938.
- Schauder, S.; Shokat, K.; Surette, M. G.; Bassler, B. L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* **41**, 463-476.
- Schieberle, P. (1991a). Primary odorants in popcorn. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1141-1144.

- Schieberle, P. (1991b). Primary odorants in pale lager beer. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **193**, 558-565.
- Schieberle, P. (1992). Formation of furaneol in heat-processed foods. *ACS Symp. Ser.* **490** (Flavor Precursors), 164-174.
- Schieberle, P.; Grosch, W. (1994). Potent odorants of rye bread crust-differences from the crumb and from wheat bread crust. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **198**, 292-296.
- Schieberle, P.; Hofmann, T. (1997). Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 227-232.
- Schlegel, H.G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage. Georg Thieme, Stuttgart-New York.
- Schmidt, H.-L.; Schmelz, E. (1980). Stabile Isotope in Chemie und Biowissenschaften. *ChiuZ* **14**, 25-34.
- Schomburg, G.; Husmann, H.; Podmaniczky, L.; Weeke, F.; Rapp, A. (1984). Coupled gas chromatographic methods for separation, identification, and quantitative analysis of complex mixtures: MDGC, GC-MS, GC-IR, LC-GC. In: Analysis of volatiles – Methods and applications; Schreier, P. (Hrsg.); Walter de Gruyter, Berlin-New York, 121-150.
- Schreier, P. (1997). Enzymes and flavour biotechnology. In: Biotechnology of aroma compounds; Berger, R. G., (Hrsg.); aus Band 55: Advances in biochemical engineering biotechnology, Scheper, T., (Hrsg.); Springer, Berlin, 51-72.
- Schreier, P.; Mosandl, A. (1985). Aromaforschung heute. *ChiuZ* **19**, 22-31.
- Schurig, V.; Weber, R. (1983). Derivatization-free enantiomer separation of chiral alcohols and ketones by high resolution complexation gas chromatography. *Angew. Chem.* **95**, 797-798.
- Schwab, W. (1998). Application of stable isotope ratio analysis explaining the bioformation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in plants by a biological Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2266-2269.
- Schwab, W.; Roscher, R. (1997). 4-Hydroxy-3(2H)-furanones: Natural and Maillard products. *Recent Res. Devel. in Phytochem.* **1**, 643-673.
- Scragg, A. H. (1997). The production of aromas by plant cell cultures. In: Biotechnology of aroma compounds; Berger, R. G., (Hrsg.); aus Band 55: Advances in biochemical engineering biotechnology, Scheper, T., (Hrsg.); Springer, Berlin, 239-264.
- Seok, Y.-J.; Yang, K.-S.; Kim, S.-T.; Huh, W.-K.; Kang, S.-O. (1996). Characterization of quinoxaline derivatives of dehydro-D-erythroascorbic acid. *J. Carbohydr. Chem.* **15**, 1085-1095.

- Serianni, A. S.; Pierce, J.; Barker, R. (1979). Carbon-13-enriched carbohydrates: preparation of triose, tetrose, and pentose phosphates. *Biochemistry* **18**, 1192-1199.
- Severin, T.; Seilmeier, W. (1967). Maillard reaction. II. Reaction of pentoses in the presence of amine acetates. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **134**, 230-232.
- Shallenberger, R. S.; Acree, T. E. (1967). Molecular theory of sweet taste. *Nature* **216**, 480-482.
- Shu, C.-K.; Mookherjee, B. D.; Ho, C.-T. (1985). Volatile components of the thermal degradation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 446-448.
- Slaughter, J. C. (1999). The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food. *Biol. Rev.* **74**, 259-276.
- Stewart, J. D. (2000). Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 363-368.
- Sugawara, E. (1991). Changes in aroma components of miso with aging. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **38**, 1093-1097.
- Sundt, E. (1970). The development and future of flavour research. *Næringsmiddelindustrien* **23**, 5-13.
- Szejtli, J. (1988). Cyclodextrin Technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Tadashi, E.; Hiroyuki, M.; Toru, K.; Tomomasa, I.; Kentaro, M.; Masanori, U.; Takashi, S. (2001). High enantioselectivity and broad substrate specificity of a carbonyl reductase: toward a versatile biocatalyst. *J. Org. Chem.* **66**, 8682-8684.
- Tadashi, E.; Yasushi, S.; Minoru, F.; Hiroyuki, M.; Jing-Nan, C.; Takashi S.; Masanori, U. (1998). Highly enantioselective reduction of carbonyl compounds using a reductase purified from bakers' yeast. *J. Org. Chem.* **63**, 4996-5000.
- Terabe, S.; Otsuka, K.; Nishi, H. (1994). Separation of enantiomers by capillary electrophoretic techniques. *J. Chromatogr. A* **666**, 295-319.
- Tokuoka, K. (1993). Sugar- and salt-tolerant yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 101-110.
- Tokuoka, K.; Ishitani, T.; Goto, S.; Komagata, K. (1985). Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **31**, 411-427.
- Tonsbeek, C. H. T.; Eykelboom, A. J. (1969). Bakery product additive. D-Patent 1,915,788; CA 72 20702.
- Tonsbeek, C. H. T.; Koenders, E. B.; Van der Zijden, A. S. M.; Losekoot, J. A. (1969). Components contributing to beef flavor; natural precursors of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone in beef broth. *J. Agric. Food Chem.* **17**, 397-400.

- Tonsbeek, C. H. T.; Plancken, A. J.; van der Weerdhof, T. (1968). Components contributing to beef flavor. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and its 2,5-dimethyl homolog from beef broth. *J. Agric. Food Chem.* **16**, 1016-1021.
- Tressl, R.; Bahri, D.; Köppler, H.; Jensen, A. (1978). Diphenole und Caramelkomponenten in Röstkaffees verschiedener Sorten. II. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **167**, 111-114.
- Tyrell, M. H. (1990). Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. *Food Technol.* **1**, 68-72.
- Van der Sluis, C.; Stoffelen, C. J. P.; Castelein, S. J.; Engbers, G. H. M.; ter Schure, E. G.; Tramper, J.; Wijffels, R. H. (2001). Immobilized salt-tolerant yeasts: application of a new polyethylene-oxide support in a continuous stirred-tank reactor for flavour production. *J. Biotechnol.* **88**, 129-139.
- van Zyl, P. J.; Kilian, S. G.; Prior, B. A. (1990). The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 231-235.
- van Zyl, P. J.; Kilian, S. G.; Prior, B. A. (1993). Physiological responses of *Zygosaccharomyces rouxii* to osmotic stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 235-241.
- van Zyl, P. J.; Prior, B. A.; Kilian, S. G. (1991). Regulation of glycerol metabolism in *Zygosaccharomyces rouxii* to response to osmotic stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 369-374.
- Vermeersch, G.; Marko, J.; Febvay-Garot, N.; Caplain, S.; Lablache-Combier, A. (1984). Low-field photochemically induced dynamic nuclear polarization (photo-CIDNP) of diazanaphthalenes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **12**, 2027-2030.
- Vicenzi, J. T.; Zmijewski, M. J.; Reinhard, M. R.; Landen, B. R.; Muth, W. L.; Marler, P. G. (1997). Large-scale stereoselective enzymatic ketone reduction with *in situ* product removal via polymeric adsorbant resins. *Enzyme and Microbiol. Technol.* **20**, 494-499.
- Vindelov, J.; Arneborg, N. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces mellis* exhibit different hyperosmotic shock responses. *Yeast* **19**, 429-439.
- Walker, G. M. (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Wang, H.; Liu, Y.; Guo, Q. (1999). Mechanism of reduction of ethylenic compounds by NADH models. *Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, 64-70.

- Wein, M. (2001). Biosynthese und Metabolismus von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon in Erdbeeren. Chemisch-analytische, biochemische und molekularbiologische Studien. Dissertation, Universität Würzburg.
- Wein, M.; Lewinson, E.; Schwab, W. (2001). Metabolic fate of isotopes during the biological transformation of carbohydrates to 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2427-2432.
- Wein, M.; Lavid, N.; Lunkenbein, S.; Lewinsohn, E.; Schwab, W.; Kaldenhoff, R. (2002). Isolation, cloning and expression of a multifunctional *O*-methyltransferase capable of forming 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits. *Plant J.* **31**, 755-765.
- Wiegert, T.; Sahm, H.; Sprenger, G. A. (1997). The substitution of a single amino acid residue (Ser-116 → Asp) alters NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* into a glucose dehydrogenase with dual coenzyme specificity. *J. Biol. Chem.* **272**, 13126-13133.
- Willhalm, B.; Stoll, M.; Thomas, A. F. (1965). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-one. *Chem. Ind.* **18**, 1629-1630.
- Williams, A. A.; Mottram, D. S. (1981). Gas chromatographic analysis of furaneol. *J. High Resol. Chromatogr.* **4**, 421-422.
- Wilmotte, A.; Van de Peer, Y.; Goris, A.; Chapelle, S.; De Baere, R.; Nelissen, B.; Neefs, J. M.; Hennebert, G. L.; De Wachter, R. (1993). Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal subunit RNA sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 436-444.
- Wintoch, H.; Krammer, G.; Schreier, P. (1991). Glycosidically bound aroma compounds from two strawberry fruit species, *Fragaria vesca* f. *semperflorens* and *Fragaria* × *ananassa*, cv. Korona. *Flavour Fragrance J.* **6**, 209-215.
- Winzer, K.; Hardie, K. R.; Burgess, N.; Doherty, N.; Kirke, D.; Holden, M. T. G.; Linfoth, R.; Cornell, K. A.; Taylor, A. J.; Hill, P. J.; Williams, P. (2002). LuxS: Its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology* **148**, 909-922.
- Withopf, B.; Richling, E.; Roscher, R.; Schwab, W.; Schreier, P. (1997). Sensitive and selective screening for 6'-O-malonylated glucoconjugates in plants. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 907-911.
- Wojciechowicz, D.; Lu, C.; Kurjan, J.; Lipke, P. (1993). Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein α -agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2554-2563.

- Yagi, T. (1992). Regulation of intracellular osmotic pressure during the initial stages of salt stress in a salt-tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*. *Microbios*. **70**, 93-102.
- Yagi, T.; Nishi, T. (1993). Regulation of intracellular osmotic pressure and changes in intracellular proteins during the initial stages of salt stress in *Zygosaccharomyces rouxii*. *Microbios*. **74**, 155-166.
- Yoda, K.; Ko, J.-H.; Nagamatsu, T.; Lin, Y.; Kaibara, C.; Kawada, T.; Tomishige, N.; Hashimoto, H.; Noda, Y.; Yamasaki, M. (2000). Molecular characterization of a novel yeast cell-wall acid phosphatase cloned from *Kluyveromyces marxianus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 142-148.
- You, K.-S. (1982). Stereospecificities of the pyridine nucleotide-linked enzymes. *Methods Enzymol.* **87**, 101-126.
- Zabetakis, I. (1997). Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria × ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **50**, 179-183.
- Zabetakis, I.; Gramshaw, J. W. (1998). 1,2-Propanediol in strawberries and its role as a flavour precursor. *Food Chem.* **61**, 351-354.
- Zabetakis, I.; Holden, M. A. (1995). A study of strawberry flavour biosynthesis. In: Bioflavour 95: Analysis - Precursor studies - Biotechnology. P. Etievant und P. Schreier (Hrsg.); INRA Editions, Paris, 211-216.
- Zabetakis, I.; Holden, M. A. (1996). The effect of 6-deoxy-D-fructose on flavour bioformation from strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus culture. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* **45**, 25-29.
- Zabetakis, I.; Gramshaw, J. W.; Robinson, D. S. (1996). The biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives in strawberry. In: Flavour Science - Recent Developments. A. J. Taylor und D. S. Mottram (Hrsg.); The Royal Soc. Chem., Cambridge, 90-93.
- Zabetakis, I.; Gramshaw, J. W.; Robinson, D. S. (1999a). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis – a review. *Food Chem.* **65**, 139-151.
- Zabetakis, I.; Moutevelis-Minakakis, P.; Gramshaw, J. W. (1999b). The role of 2-hydroxypropanal in the biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one in strawberry (*Fragaria × ananassa*, cv. Elsanta) callus cultures. *Food Chem.* **64**, 311-314.
- Zyzak, D. V.; Richardson, J. M.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. (1995). Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 547-554.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die Dissertation „Zuckerphosphate als Vorläufer von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen – Biochemische Transformation durch die Hefe *Zygosaccharomyces rouxii* und chemische Bildung unter physiologischen Bedingungen“ 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

Tobias Hauck

Lebenslauf

Name: Tobias Hauck
Anschrift: Theresienstraße 15, 97070 Würzburg
Geboren: 15.06.1974 in Würzburg
Religion: römisch-katholisch
Familienstand: ledig
Eltern: Peter Hauck, Richter
Birgit Hauck, geb. Heigl, Hausfrau

Schulbildung: September 1981 bis Juli 1985
Grundschule in Würzburg - Oberdürrbach
September 1985 bis Juli 1989
Siebold-Gymnasium in Würzburg
September 1989 bis Juli 1995
Mozart-Gymnasium in Würzburg
Allgemeine Hochschulreife

Studium: November 1995 bis Dezember 1999
Lebensmittelchemie an der Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
am 6. Dezember 1999

Promotion: Januar 2000 bis Dezember 2002
Anfertigung der Promotionsarbeit am Lehrstuhl für
Lebensmittelchemie, Universität Würzburg,
betreut von PD Dr. W. Schwab