

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie

Passionsfrucht-typische 2-Alkylester:  
Analytik, enzymkatalysierte Gewinnung  
und sensorische Bewertung

Hedwig Strohm

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Schwab  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel  
2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 14.01.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01.03.2010 angenommen.

MEINEM MANN MARKUS

GEWIDMET

„WEGE ENTSTEHEN DADURCH, DASS MAN SIE GEHT“  
(FRANZ KAFKA)

## **DANKSAGUNG**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. K.-H. Engel danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die vielen wertvollen Ratschläge und Diskussionen. Insbesondere bedanke ich mich für die mir jederzeit gewährte Unterstützung und das meiner Arbeit stets entgegengebrachte Interesse.

Weiterhin bedanke ich mich bei all meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls für Allgemeine Lebensmitteltechnologie für ihre Hilfsbereitschaft, ihre tatkräftige Unterstützung und vor allem das stets tolle Arbeitsklima. Ein besonderer Dank geht dabei an Dr. Márta Dregus, Iulia Poplacean, Oxana Fastovskaya und Tobias Müller aus der „Aroma-Gruppe“. Für die außerordentlich gute Arbeitsatmosphäre in unserem gemeinsamen Büro und die fachlichen und sonstigen Diskussionen danke ich Herrn Andreas Barnsteiner. Mein Dank richtet sich auch an die „Mittagsrunde“ für die inspirativen und konstruktiven Gespräche und Ratschläge.

Für ihre tatkräftige und erfolgreiche Mitarbeit im Rahmen ihrer Bachelor- und Masterarbeiten bedanke ich mich sehr herzlich bei Susanne Dold, Franziska Finkbeiner, Johanna Neuner, Kathrin Pendzialek, Astrid Wahl und Monika Weiher.

Weiterhin vielen Dank an alle Teilnehmer des Sensorik-Panels, die durch Ihren Einsatz und ihr Engagement wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. G. Krammer (Symrise) und seinem Sensorik-Team für die Durchführung der retronasalen Bewertungen.

Bei meiner Kollegin und Freundin Beate Arold bedanke ich mich für den wertvollen „inter- und außerdisziplinären Austausch“ und die motivierenden Gespräche.

Vielen Dank an meine Familie für ihre stete und vielseitige Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Mein unübertroffener Dank allerdings gilt meinem Mann Markus, der mich während des Studiums und der Promotion mit seinem sonnigen Gemüt und seiner unermüdlichen Geduld und Liebe in jeder Hinsicht unterstützt und bereichert hat.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG &amp; ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>KENNTNISSTAND .....</b>	<b>3</b>
2.1	Passionsfrüchte .....	3
2.1.1	Botanik und Verwendung .....	3
2.1.2	Aromastoffe.....	5
2.2	Sekundäre Alkohole und ihre Ester.....	9
2.2.1	Passionsfrüchte .....	9
2.2.2	Biosynthese .....	11
2.2.3	Weiteres Vorkommen .....	13
2.2.4	Sensorische Eigenschaften .....	14
2.3	Chiralität.....	16
2.3.1	Definition und Bedeutung.....	16
2.3.2	Chirale Aromastoffe .....	18
2.3.3	Kapillargaschromatographische Enantiomerendifferenzierung .....	19
2.4	Enantioselektive Biokatalyse.....	22
2.5	Enzyme .....	25
2.5.1	Lipasen .....	25
2.5.1.1	Struktur und Mechanismus .....	26
2.5.1.2	Enantioselektivität .....	28
2.5.1.3	<i>Candida antarctica</i> Lipase B (CALB) .....	30
2.5.1.4	<i>Candida cylindracea</i> Lipase (CCL) .....	31
2.6	Sensorik .....	33
2.6.1	Allgemeine Aspekte .....	33
2.6.2	Aromawert .....	34
2.6.3	Methoden der sensorischen Bewertung.....	35

<b>3</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>37</b>
3.1	Material .....	37
3.1.1	Untersuchungsmaterial .....	37
3.1.2	Chemikalien .....	37
3.1.3	Synthese von Referenzsubstanzen .....	39
3.1.4	Enzympräparate.....	40
3.2	Methoden .....	41
3.2.1	Isolierung und Anreicherung der Aromastoffe.....	41
3.2.1.1	Simultane Destillation-Extraktion (SDE).....	41
3.2.1.2	Vergleich der Isolierungsmethoden.....	41
3.2.2	Identifizierung und Quantifizierung der Aromastoffe .....	42
3.2.2.1	Bestimmung der Retentionsindices.....	43
3.2.2.2	Bestimmung der FID-Response-Faktoren.....	43
3.2.2.3	Wiederfindungsversuche.....	43
3.2.2.4	Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen .....	44
3.2.2.5	Quantitative Bestimmung .....	46
3.2.2.6	Kapillargaschromatographie (HRGC-FID).....	47
3.2.2.7	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) .....	47
3.2.3	Untersuchung natürlicher Enantiomerenzusammensetzungen.....	48
3.2.3.1	Bestimmung kapillargaschromatographischer Kenngrößen.....	48
3.2.3.2	Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC).....	49
3.2.3.3	Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen .....	51
3.2.4	Enzymkatalysierte kinetische Racematspaltungen .....	52
3.2.4.1	Parameter .....	52
3.2.4.2	Enzymkatalysierte Veresterungen und Enzymscreening .....	55
3.2.4.3	Enzymkatalysierte Hydrolysen .....	55
3.2.5	Präparative Gewinnung optisch reiner Ester.....	56
3.2.5.1	Kinetische Racematspaltung.....	56
3.2.5.2	Säulenchromatographische Trennung .....	57
3.2.5.3	Wiederveresterung.....	57
3.2.5.4	Gewinnung der ( <i>R</i> )- und ( <i>S</i> )-Ester .....	58
3.2.5.5	Bestimmung der optischen Drehwinkel.....	58

3.2.6	Sensorische Bewertung .....	59
3.2.6.1	Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie (HRGC/O).....	59
3.2.6.2	Sensorische Bewertung in Wasser (orthonasal) .....	61
3.2.6.3	Sensorische Bewertung in Wasser (retronasal) .....	62
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE &amp; DISKUSSION.....</b>	<b>63</b>
4.1	Analytik von 2-Alkylestern in Passionsfrüchten .....	63
4.1.1	Einleitung .....	63
4.1.2	Qualitative und quantitative Verteilung.....	64
4.1.3	Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen ..	69
4.1.4	Einfluss der Isolierungsmethode auf die natürliche Enantiomerenzusammensetzung.....	74
4.1.5	Zusammenfassung und biogenetische Aspekte.....	75
4.2	Enzymkatalysierte Gewinnung der 2-Alkylester .....	78
4.2.1	Einleitung .....	78
4.2.2	Enzymscreening .....	79
4.2.3	Enzymkatalysierte Veresterungen .....	81
4.2.4	Enzymkatalysierte Hydrolysen .....	84
4.2.5	Gewinnung optisch reiner 2-Alkylester.....	88
4.2.5.1	Gewinnung der ( <i>R</i> )-2-Alkylester .....	88
4.2.5.2	Gewinnung der ( <i>S</i> )-2-Alkylester .....	91
4.2.5.3	Polarimetrische Untersuchung der gewonnenen Ester .....	93
4.2.6	Zusammenfassung .....	95
4.3	Sensorische Bewertung der 2-Alkylester .....	97
4.3.1	Einleitung .....	97
4.3.2	Bewertung mittels Gaschromatographie/Olfaktometrie (GC/O) .....	98
4.3.3	Orthonasale Bewertung in Wasser .....	103
4.3.4	Retronasale Bewertung in Wasser.....	106
4.3.5	Berechnung des Aromawertes.....	108
4.3.6	Zusammenfassung und Ausblick .....	109
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>113</b>

## ABKÜRZUNGEN

AAT	Alkohol-Acyltransferasen
AEVA	Aromaextraktverdünnungsanalyse
BG	Bestimmungsgrenze
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CALB imm	<i>Candida antarctica</i> Lipase B immobilisiert
CCL	<i>Candida cylindracea</i> Lipase
CD	Cyclodextrin
CHARM	Combined Hedonic Response Measurement
E	Enantioselektivität
EC	Enzym-Kommission (enzyme commission)
ee	Enantiomerenüberschuss ( <i>enantiomeric excess</i> )
EI	Elektronenstoßionisation
F	Filmdicke
FD	Flavour Dilution Factor
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC/O	Gaschromatographie/Olfaktometrie
HRGC	Kapillargaschromatographie (High Resolution Gas Chromatography)
HRGC/MS	Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie
I.D.	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
kDa	Kilodalton
KI	Kovats-Index
LLE	Flüssig-Flüssig Extraktion (Liquid-Liquid Extraction)
MCSS	Moving Column Stream Switching
MDGC	Multidimensionale Gaschromatographie
MS	Massenspektrometrie
MTPA	$\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluormethylphenylelessigsäure
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NG	Nachweisgrenze
SDE	Simultane Destillation-Extraktion
VHS	Vakuum Headspace Technik
Wf	Wiederfindung

# 1 EINLEITUNG & ZIELSETZUNG

Passionsfrüchte gehören zur Familie der *Passifloraceae* und stellen die Früchte der Passionsblumengewächse dar. Von den über 400 bekannten *Passiflora*-Spezies haben die roten (*Passiflora edulis* Sims) und gelben Passionsfrüchte (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) größtes kommerzielles Interesse erlangt. Die Varietäten unterscheiden sich nicht nur in ihrem Aussehen, sondern auch in ihrem Aroma. Während die gelben Passionsfrüchte eine typisch schweflig-exotische Note aufweisen, besitzen die roten Früchte ein angenehmes blumig-tropisches Aroma. Bislang wurde eine Vielzahl an flüchtigen Verbindungen identifiziert, die das Aroma der beiden Varietäten prägen (*Whitfield und Last, 1986; Shibamoto und Tang, 1990*).

In einem umfangreichen Vergleich der beiden Varietäten konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der 2-Alkylester zur Differenzierung zwischen roten und gelben Passionsfrüchten geeignet ist (*Engel und Tressl, 1983*). Während die Acetate, Butanoate, Hexanoate und Octanoate der ungeradzahigen sekundären Alkohole 2-Pentanol, 2-Heptanol und 2-Nonanol Hauptkomponenten in roten Früchten darstellten, konnten sie in der gelben Varietät nicht oder lediglich als Minorkomponenten (*Chen et al., 1982a; Werkhoff et al., 1998*) nachgewiesen werden. Die freien sekundären Alkohole wurden dagegen in beiden Früchten identifiziert.

Weiterführende Untersuchungen der chiralen Aromastoffe zeigten, dass sich die Passionsfrucht-Varietäten auch in ihren natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen unterscheiden (*Tressl und Engel, 1985*). Allerdings erlaubte das für die damalige Zeit übliche Analysenverfahren (kapillargaschromatographische Trennung von MTPA-Diastereomeren) keine Betrachtung der Enantiomerenverhältnisse der einzelnen 2-Alkylester. Fortschritte auf dem Gebiet der instrumentellen Analytik und insbesondere die Entwicklung chiraler stationärer Phasen ermöglichen mittlerweile eine direkte Trennung von Enantiomeren (*Schurig, 2002*).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen der einzelnen Passionsfrucht-typischen

2-Alkylester und freien sekundären Alkohole mittels Multidimensionaler Gaschromatographie und unter Verwendung einer modifizierten Cyclodextrin-Phase.

Neben der Möglichkeit zur Echtheitsbewertung von Lebensmitteln kommt chiralen Aromastoffen ein weiteres Augenmerk zu. Für viele Enantiomere konnte gezeigt werden, dass sie sich in ihren sensorischen Eigenschaften unterscheiden (*Boelens et al., 1993; Koppenhoefer et al., 1994; Brenna et al., 2003*). Dabei können sowohl Unterschiede hinsichtlich der Geruchsqualitäten als auch der Intensitäten auftreten. Aufgrund des gestiegenen Interesses am gezielten Einsatz reiner Enantiomere gewinnt die Herstellung optisch reiner Verbindungen für die Lebensmittelindustrie und die Aromaforschung zunehmend an Bedeutung.

Im Bereich der asymmetrischen Synthesen hat sich vor allem die Verwendung von Enzymen als Biokatalysatoren etabliert. Verglichen mit konventionellen chemischen Katalysatoren zeigen sich die Vorteile ihres Einsatzes nicht nur in ihrer Chemo-, Regio- und Stereoselektivität, sondern auch in mildereren Prozessbedingungen und einer besseren Umweltverträglichkeit. Aufgrund ihres breiten Substratspektrums und ihrer hohen Enantioselektivität zählen Hydrolasen, darunter insbesondere Lipasen, zu den am häufigsten eingesetzten Enzymen (*Faber, 1997; Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit kommerzieller Hydrolase-Präparate zur enantioselektiven Veresterung sekundärer Alkohole untersucht. Basierend auf Veresterungs- und Hydrolysereaktionen sollte eine Methode zur Gewinnung der optisch reinen Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester im präparativen Maßstab entwickelt werden.

Die mittels enzymkatalysierter kinetischer Racematspaltung gewonnenen Ester-Enantiomere sollten hinsichtlich ihrer sensorischen Eigenschaften untersucht und mit denen der Racemate verglichen werden. Auf Basis der erhaltenen Daten und unter Berücksichtigung ihres originären Vorkommens sollte abschließend der Beitrag der 2-Alkylester zum Gesamtaroma roter Passionsfrüchte diskutiert werden.

## 2 KENNTNISSTAND

### 2.1 PASSIONSFRÜCHTE

#### 2.1.1 Botanik und Verwendung

Passionsfrüchte sind die gestielten Beerenfrüchte der Passionsblumengewächse und gehören zur Familie der *Passifloraceae*. Hierbei handelt es sich um mehrjährige, lianenartige Kletterpflanzen, die auch wegen ihrer auffallend gefärbten großen Blüten bekannt sind. Von den über 400 Spezies der wichtigsten Gattung *Passiflora* sind über 20 mit essbaren Früchten bekannt. Nur fünf davon haben wirtschaftliches Interesse erlangt. Hierzu zählen die Riesengranadilla (*Passiflora quadrangularis*), die mit ca. 20 cm Länge die größte Passionsfrucht darstellt, die Curuba (*P. mollissima*), die aufgrund ihres Aussehens auch „Bananenpassionsfrucht“ genannt wird, die Süßgranadilla (*P. ligularis*) und die Gelbe Granadilla (*P. laurifolia*). Im kommerziellen Anbau jedoch überwiegen die Früchte der Art *Passiflora edulis*, wobei hier zwei Varietäten zu unterscheiden sind: die rote (*P. edulis* Sims) und gelbe Passionsfrucht (*P. edulis* f. *flavicarpa*) (Vanderplank, 1996).

Die roten Passionsfrüchte (engl.: purple passion fruits), die ursprünglich aus dem Gebiet zwischen Südbrasilien und Nordargentinien stammen, weisen eine runde Form auf und besitzen eine braunrote bis schwarzviolette Schale (Abbildung 1).

Die gelben Passionsfrüchte (engl.: yellow passion fruits), deren Ursprung im Amazonasgebiet vermutet wird, sind im Vergleich dazu meist größer und besitzen eine gelbe bis orangefarbene Schale (Morton, 1987; Herrmann, 1995).

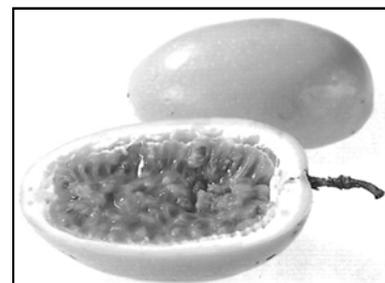


Abb. 1: Rote (oben) und gelbe (unten) Passionsfrüchte (Teubner, 1990)

Beide besitzen im Reifezustand eine lederartig geschrumpfte Schale, die nicht verzehrt wird. Zum Verzehr eignen sich die zahlreichen braunen bis schwarzen Samen, die von einer geleeartigen, saftigen Pulpe (Arillus) mit einem hocharomatischen, tropischen Aroma umgeben sind. Aufgrund ihrer Beliebtheit werden rote und gelbe Passionsfrüchte heute weltweit in den Tropen und Subtropen kultiviert (*Morton, 1987; Herrmann, 1995*) und im europäischen Handel auch unter anderen landestypischen Namen, wie z.B. Maracuja und Granadilla, vertrieben (*Teubner, 1990*).

Verwendet werden Passionsfrüchte neben dem Rohverzehr vor allem zur Safftherstellung. Hierzu werden meist Hybride der beiden Varietäten benutzt, die eine bessere Resistenz gegen Krankheiten aufweisen und höhere Erträge liefern (*Herrmann, 1995*). Darüber hinaus werden die Früchte als Zutat für Fruchtsoßen, Eis, Cremes, Puddings und anderen Desserts oder zur Herstellung von Likör oder Wein verwendet (*Morton, 1987; Teubner, 1990*). Aus den Samen, die ungefähr 11 % der Gesamtf Frucht ausmachen, wird ein Öl gewonnen, das sowohl in Lebensmitteln als auch industriell genutzt werden kann (*Morton, 1987*). Die Untersuchung der Fettsäurespektren verschiedener Passionsfrucht-Sorten und Hybride zeigte, dass das Öl vorwiegend aus Linol- (~70 %), Öl- (~15 %) und Palmitinsäure (~10 %) besteht und somit dem Sonnenblumenöl ähnelt (*Nyanzi et al., 2005*). Aufgrund des hohen Anteils an essentiellen Aminosäuren (v.a. Phenylalanin, Tyrosin und Leucin) und Mineralstoffen wird zudem das Potenzial als Proteinquelle für tropische und subtropische Regionen diskutiert (*Liu et al., 2008*). Die Extrakte der Blätter der Passionsblumengewächse werden seit langem in der traditionellen südamerikanischen Volksmedizin verwendet, um z.B. Migräne oder Schlaflosigkeit zu behandeln (*Zibadi und Watson, 2004*). Gegenwärtig wird auch das Potenzial der Extrakte von Passionsfrucht-Schalen zur Therapie von Asthma untersucht (*Watson et al., 2008*).

### 2.1.2 Aromastoffe

Neben ihrem Aussehen unterscheiden sich rote und gelbe Passionsfrüchte auch in ihrem Aroma. Während die gelbe Varietät eine typisch schweflig-exotische Note aufweist, besitzen rote Passionsfrüchte ein angenehmeres, blumig-fruchtiges Aroma (*Engel und Tressl, 1983*). Bis heute wurde eine Vielzahl an flüchtigen Verbindungen bestimmt, die das typische Aroma der beiden Varietäten prägen.

Erste Untersuchungen fanden bereits Anfang der 60er Jahre statt. 1961 wurden von *Hiu und Scheuer* das Öl des Saftes gelber Passionsfrüchte aus Hawaii analysiert und die Aromastoffe Ethylbutanoat, Ethylhexanoat und Hexylbutanoat sowie Hexylhexanoat als Hauptkomponenten identifiziert. Die technischen Fortschritte in der Gaschromatographie und der Einsatz von Gaschromatographie-Massenspektrometrie erlaubten es *Winter und Klöti (1972)* neben den vier bereits beschriebenen Estern 161 weitere Verbindungen in gelben Passionsfrüchten zu identifizieren. Hierbei handelte es sich um Verbindungen aus verschiedensten Stoffklassen, wie z.B. Aldehyde, Alkohole, Ester, Ketone, Lactone, Terpene und Terpenalkohole. Als quantitativ bedeutendste Komponenten wurden Hexanol (22,5 %), Benzaldehyd (18,6 %), Ethylhexanoat (15,8 %), Ethylbutanoat (5,9 %) und Linalool (2,1 %) bestimmt, wobei der hohe Gehalt an Benzaldehyd auf die Verwendung von Benzoat als Konservierungsmittel zurückgeführt werden kann (*Whitfield und Last, 1986*).

Im Gegenzug wurden 1972 von zwei Arbeitsgruppen zum ersten Mal flüchtige Verbindungen aus roten Passionsfrüchten beschrieben. *Parliment (1972)* identifizierte 20 Substanzen in Passionsfruchtsaft aus Neu Guinea, wobei die Stoffklasse der Ester die dominierende Gruppe ausmachte. Neben den aliphatischen Estern Ethylbutanoat und Ethylhexanoat, die als Hauptkomponenten bestimmt wurden, konnten auch aromatische, ungesättigte und 2-Alkylester (2-Heptylbutanoat und 2-Heptylhexanoat) nachgewiesen werden. Ein größeres Spektrum an Aromastoffen in roten Passionsfrüchten wurde von *Murray et al. (1972)* beschrieben. Sie isolierten 94 Verbindungen aus dem Saft australischer Passionsfrüchte und identifizierten 73 Verbindungen aus verschiedenen Stoffklassen (Ester, Alkohole, Terpene, Ketone, Aldehyde und Lactone) mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Ethanol (100 ppm), Ethylbutanoat (35 ppm), Ethylhexanoat (13 ppm), Ethylacetat (8 ppm) und Hexylbutanoat

(8 ppm) wurden als Hauptkomponenten nachgewiesen. Darüber hinaus wurden die Verbindungen des Extraktes mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC/O) hinsichtlich ihrer Aromaintensität bewertet. Die Ester Ethylbutanoat und Ethylhexanoat wurden hierbei als geruchsintensivste Verbindungen erkannt. Zwei weitere, zunächst unbekannte Verbindungen fielen zudem durch ihren intensiven „rosen-ähnlichen“ Geruch auf. Aufgrund des Massenspektrums ( $M^+$  192/177) wurde für sie die Struktur der Edulane postuliert, was durch weiterführende Arbeiten (*Whitfield et al., 1973, Adams et al., 1974, Whitfield und Stanley, 1977*) bestätigt und um weitere Edulan-Derivate erweitert werden konnte (*Winter et al., 1979a, Prestwich et al., 1976*). Eine Nachmischung der Verbindungen mit mittlerer und höchster Geruchsintensität ohne die „Rosen-Komponenten“ lieferte ein „passionsfrucht-ähnliches“ Aroma, allerdings fehlte die typische einzigartige Note. Die Zugabe von Edulan I führte zu einer Verbesserung des Aromas, gab aber auch den Hinweis auf weitere noch nicht identifizierte, aromaprägende Verbindungen in roten Passionsfrüchten (*Murray et al., 1973*). In weiterführenden Arbeiten wurde die Reihe der ungewöhnlichen  $C_{13}$ -Norisoprenoide um die Iononderivate (*Näf et al., 1977*) und die „rosen- und himbeerartigen“ Megastigmatriene (*Whitfield et al., 1977; Whitfield und Sugowdz, 1979*) erweitert. Als weitere sensorisch aktive Spurenkomponenten in roten Passionsfrüchten wurden die ungesättigten Ester Ethyl-(Z)-4,7-Octandienoat mit „ananas-ähnlichem“ Geruch und (Z)-3,5-Hexadienylbutanoat, welches eine „schwere fruchtig-tropische“ Note aufweist, bestimmt (*Winter et al., 1979b*). Weiterführende Untersuchungen zur Aromarelevanz einzelner Verbindungen in roten Passionsfrüchten wurden von *Casimir und Whitfield (1978)* durchgeführt. Die Ermittlung des „Flavour Impact Values“ ausgesuchter Komponenten, d.h. die Steigerung der Aromaintensität durch Erhöhung der Konzentration der Verbindung, konnte vor allem die Bedeutung der  $C_{13}$ -Norisoprenoide für das Gesamtaroma roter Passionsfrüchte bestätigen.

Das Aroma gelber Passionsfrüchte, bei denen lediglich Megastigmadienone aus der Reihe der  $C_{13}$ -Norisoprenoide nachgewiesen wurden (*Demole et al., 1979*), wird hingegen durch die Anwesenheit von Schwefelaromastoffen geprägt. Bereits in anfänglichen Untersuchungen wurden 4-Methyl-5-vinylthiazol, Ethyl-3-methylthiopropanoat, 3-Methylthiohexanol und die Isomere des 2-Methyl-4-propyl-1,3-oxathians identifiziert (*Winter und Klöti, 1972; Winter et al., 1976*). In

weiterführenden Arbeiten wurden die natürlichen Enantiomerenverteilungen der 2-Methyl-4-propyl-1,3-oxathiane in gelben Passionsfrüchten (*Singer et al., 1986; Weber et al., 1995*) und die sensorischen Eigenschaften der Enantiomere (*Pickenhagen und Brönnner-Schindler, 1984; Singer et al., 1986*) ermittelt. Die Reihe der Schwefelverbindungen wurde 1991 von *Engel und Tressl* um 3-Mercaptohexanol sowie die Acetate, Butanoate und Hexanoate von 3-Mercaptohexanol und 3-Methylthiohexanol ergänzt. Die Untersuchung der natürlichen Enantiomerenverteilungen der Alkohole 3-Mercaptohexanol und 3-Methylthiohexanol zeigte einen deutlichen Überschuss der jeweiligen (S)-Enantiomere (*Weber et al., 1994*). Eine umfangreiche Beschreibung flüchtiger Verbindungen in gelben Passionsfrüchten wurde von *Werkhoff et al. (1998)* verfasst. Durch Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden konnten insgesamt 371 Verbindungen erfasst werden, von denen 180 zum ersten Mal in gelben Passionsfrüchten beschrieben wurden. Die durch Vakuum-Headspace-Technik (VHS) gewonnenen Extrakte spiegelten hierbei am besten das charakteristische Aroma frischer Früchte wider. Schwefelhaltige Minorkomponenten wurden durch präparative Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC) angereichert und flammenphotometrisch oder massenspektrometrisch detektiert. Von den 47 Schwefelaromastoffen wurden 35 zum ersten Mal in gelben Passionsfrüchten beschrieben. Trotz der Präsenz in niedrigen Konzentrationen werden sie aufgrund ihrer niedrigen Geruchsschwellen zu den geruchsaktiven Verbindungen in gelben Passionsfrüchten gezählt. Zudem wurden die natürlichen Enantiomerenverhältnisse ausgewählter chiraler Aromastoffe mittels Multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC) ermittelt. 2002 wurden zum ersten Mal die aromapragenden Substanzen mittels Gaschromatographie/Olfaktometrie (GC/O) bestimmt und hierbei das Wasserdampf-Destillat und der Saft gelber Passionsfrüchte verglichen (*Jordán et al. 2002*). Unter Durchführung der Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) wurden im Wasserdampf-Destillat die flüchtigen Komponenten 2-Methylbutylhexanoat, Hexylhexanoat und Linalool als aromaaktivste Verbindungen charakterisiert, während im Passionsfrucht-Saft für 2-Methylbutylhexanoat und 1,3-Dimethylbenzol (m-Xylol) die höchsten FD-Faktoren bestimmt wurden. Ein erster Vergleich gelber und roter Passionsfrüchte und eines Hybrides aus beiden Varietäten wurde von *Chen et al. (1982a)* durchgeführt. Hierbei zeigte sich,

dass die Hybrid-Passionsfrucht die höchste Gesamtkonzentration an Aromastoffen aufwies und den sensorischen Charakter beider Varietäten widerspiegelte. Ausführliche Übersichten über die Aromaspektren der verschiedenen Passionsfrucht-Varietäten wurden von *Whitfield und Last (1986)*, *Maarse und Visscher (1989)* sowie *Shibamoto und Tang (1990)* zusammengestellt.

In einem umfangreichen, direkten Vergleich gelber und roter Passionsfrüchte konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Aromastoffe nicht nur von der Art der Varietät, sondern auch von der Herkunft und dem Erntezeitpunkt der Früchte abhängt (*Tressl und Engel, 1983*). Darüber hinaus wurden über einen direkten Vergleich der qualitativen und quantitativen Vorkommen charakteristische Ester aufgezeigt, die zur Differenzierung beider Varietäten geeignet sind (*Engel und Tressl, 1983*). Als typische flüchtige Verbindungen ausschließlich roter Passionsfrüchte wurden die Ester der ungesättigten Alkohole (*E*)- und (*Z*)-3-Octen-1-ol sowie (*Z*)-3-Decen-1-ol nachgewiesen. Auch Ester terpenoider Alkohole wurden als Differenzierungsmöglichkeit aufgezeigt. Geranyl-Ester wurden ausschließlich in der roten Varietät bestimmt und für Citronellyl-Ester wurden zehnmal höhere Konzentrationen als in gelben Früchten ermittelt. Darüber hinaus wurde eine weitere charakteristische Gruppe bestimmt, die sich in besonderem Maße zur Differenzierung zwischen den Varietäten eignet: die Ester ungeradzahliger sekundärer Alkohole.

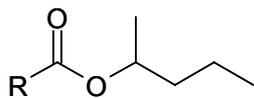
Aufgrund ihrer Relevanz für diese Arbeit werden ihr Vorkommen in Passionsfrüchten und anderen Früchten sowie biogenetische Aspekte in den folgenden Kapiteln gesondert diskutiert.

## 2.2 SEKUNDÄRE ALKOHOLE UND IHRE ESTER

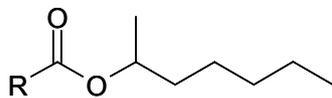
### 2.2.1 Passionsfrüchte

Bereits 1972 wurden von *Parliment* 2-Heptylbutanoat und -hexanoat als flüchtige Verbindungen in roten Passionsfrüchten beschrieben und von *Murray et al. (1972)* um 2-Pentylbutanoat und 2-Heptylacetat erweitert.

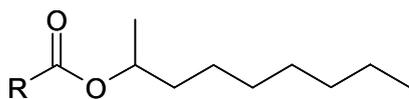
In einem umfangreichen, direkten Vergleich der Aromastoffe gelber und roter Passionsfrüchte konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der Ester ungeradzahlig, sekundärer Alkohole zur Differenzierung zwischen den beiden Varietäten geeignet ist (*Engel und Tressl, 1983*). Hierbei handelt es sich um die Acetate, Butanoate, Hexanoate und Octanoate von 2-Pentanol, 2-Heptanol und 2-Nonanol (Abbildung 2).



2-Pentylester



2-Heptylester



2-Nonylester

R	Ester
- CH <sub>3</sub>	Acetat
- C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Butanoat
- C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	Hexanoat
- C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	Octanoat

Abbildung 2: Passionsfrucht-typische 2-Alkylester

Wie in Tabelle 1 veranschaulicht, wurden die freien sekundären Alkohole 2-Pentanol und 2-Heptanol in beiden Varietäten detektiert, während die 2-Alkylester lediglich in roten Passionsfrüchten als typische flüchtige Komponenten nachgewiesen werden konnten (*Engel und Tressl, 1983; Tressl und Engel, 1983*).

Als quantitativ bedeutendste Vertreter wurde die Gruppe der 2-Heptylester mit den Hauptkomponenten 2-Heptylbutanoat und -hexanoat (1000-2500 µg/kg) ermittelt. Für die Vertreter der 2-Pentyl- und 2-Nonylester wurden geringere Konzentrationen bestimmt.

Tabelle 1: Konzentrationen (µg/kg) sekundärer Alkohole und ihrer Ester in roten und gelben Passionsfrüchten (*Engel und Tressl, 1983; Tressl und Engel, 1983*)

	Rote Passionsfrüchte (µg/kg) <sup>a</sup>		Gelbe Passionsfrüchte (µg/kg) <sup>b</sup>
	Brasilien (1981)	Kenia (1981)	Brasilien (1980/1981)
2-Pentanol	120	150	25
2-Heptanol	500	400	50
2-Pentylacetat	50	10	n.n. <sup>c</sup>
2-Pentylbutanoat	50	80	n.n.
2-Pentylhexanoat	70	70	n.n.
2-Pentyl octanoat	90	50	n.n.
2-Heptylacetat	20	20	n.n.
2-Heptylbutanoat	1000	600	n.n.
2-Heptylhexanoat	600	2500	n.n.
2-Heptyl octanoat	300	100	n.n.
2-Nonylacetat	Spuren	Spuren	n.n.
2-Nonylbutanoat	50	50	n.n.
2-Nonylhexanoat	Spuren	Spuren	n.n.
2-Nonyl octanoat	Spuren	Spuren	n.n.

<sup>a</sup> Mittelwerte aus 6 Aufarbeitungen. <sup>b</sup> Mittelwerte aus 4 Erntezeitpunkten. <sup>c</sup> nicht nachgewiesen

Ein ähnliches Ergebnis wurde von *Chen et al. (1982a)* erarbeitet, die in einem Vergleich der Varietäten zwar 2-Heptylacetat, -butanoat und -hexanoat in gelben Passionsfrüchten nachweisen konnten, allerdings als Spurenkomponenten und mit bis zu 60 Mal niedrigeren Gehalten als in roten Früchten. Auch von *Werkhoff et al. (1998)* wurden 2-Pentylbutanoat, -hexanoat und -octanoat sowie 2-Heptylbutanoat und -octanoat nach Anreicherung mittels präparativer Gaschromatographie lediglich als Minorkomponenten in gelben Passionsfrüchten identifiziert.

Für die chiralen Passionsfrucht-typischen sekundären Alkohole und ihre Ester wurden neben den qualitativ-quantitativen Untersuchungen auch Bestimmungen der natürlichen Enantiomerenverhältnisse durchgeführt. Es wurden die freien

sekundären Alkohole 2-Pentanol und 2-Heptanol, die in beiden Varietäten vorkommen, sowie die 2-Heptylester aus roten Passionsfrüchten untersucht (Tressl und Engel, 1985). Nach Derivatisierung des entsprechenden Alkoholes mit (*R*)-(+)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluormethylphenyllessigsäure ((*R*)-(+)-MTPA) und anschließender gaschromatographischer Trennung der erhaltenen Diastereomere konnte gezeigt werden, dass freies 2-Pentanol sowie 2-Heptanol in gelben Passionsfrüchten mit einem Enantiomerenüberschuss zugunsten der (*S*)-Enantiomere vorliegen. Im Gegensatz dazu wurde für 2-Heptanol aus roten Passionsfrüchten vorwiegend das (*R*)-Enantiomer nachgewiesen. Eine Bestimmung der 2-Heptylester erfolgte nach Hydrolyse der Ester und anschließender Derivatisierung des erhaltenen Alkohols 2-Heptanol. Für die Gruppe der 2-Heptylester wurde so ein Enantiomerenüberschuss der (*R*)-Enantiomere von 100 % nachgewiesen.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich die beiden Passionsfrucht-Varietäten aufgrund der gegensätzlichen Enantiomerenverhältnisse des enthaltenen freien 2-Heptanols unterscheiden lassen und die Gruppe der 2-Heptylester in roten Früchten die Konfiguration des freien Alkohols aufweist. Allerdings konnte mit der angewandten Methode keine Aussage über die Enantiomerenverhältnisse der einzelnen Ester getroffen werden.

### 2.2.2 Biosynthese

Die 2-Alkylester werden während der Fruchtreifung durch enzymkatalysierte Veresterung der entsprechenden sekundären Alkohole gebildet (Schwab *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass diese Coenzym-A-abhängige Reaktion durch Alkohol-Acyltransferasen (AAT) katalysiert wird (Sanz *et al.*, 1997). Zahlreiche AAT kodierende Gene konnten bereits aus anderen Früchten, wie z.B. Bananen, Äpfeln, Melonen und Erdbeeren, isoliert und charakterisiert werden (Aharoni *et al.*, 2000; Beekwilder *et al.*, 2004; El-Sharkawy *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Als Vorstufe der sekundären Alkohole werden die jeweiligen ungeradzahigen Methylketone vermutet, die auch als flüchtige Verbindungen in Passionsfrüchten beschrieben wurden (Whitfield und Last, 1986; Shibamoto und Tang, 1990).

Abbildung 3 zeigt einen möglichen Biosyntheseweg chiraler 2-Heptylester ausgehend von Octansäure. Die aliphatische, geradzahlige Säure wird im Zuge der  $\beta$ -Oxidation über  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Intermediate und anschließende Decarboxylierung zunächst in 2-Heptanon überführt, aus dem durch enzymatische Reduktion 2-Heptanol entsteht (Tressl und Engel, 1985). Die Entstehung der sekundären Alkohole aus dem Fettsäure-Abbau wurde von Tressl und Drawert (1971) durch Markierungsversuche von Bananen- und Erdbeerscheiben mit 8- $^{14}$ C-Octansäure gezeigt. Die Biosynthese der Methylketone wurde zudem durch Grosch (1987) bestätigt.

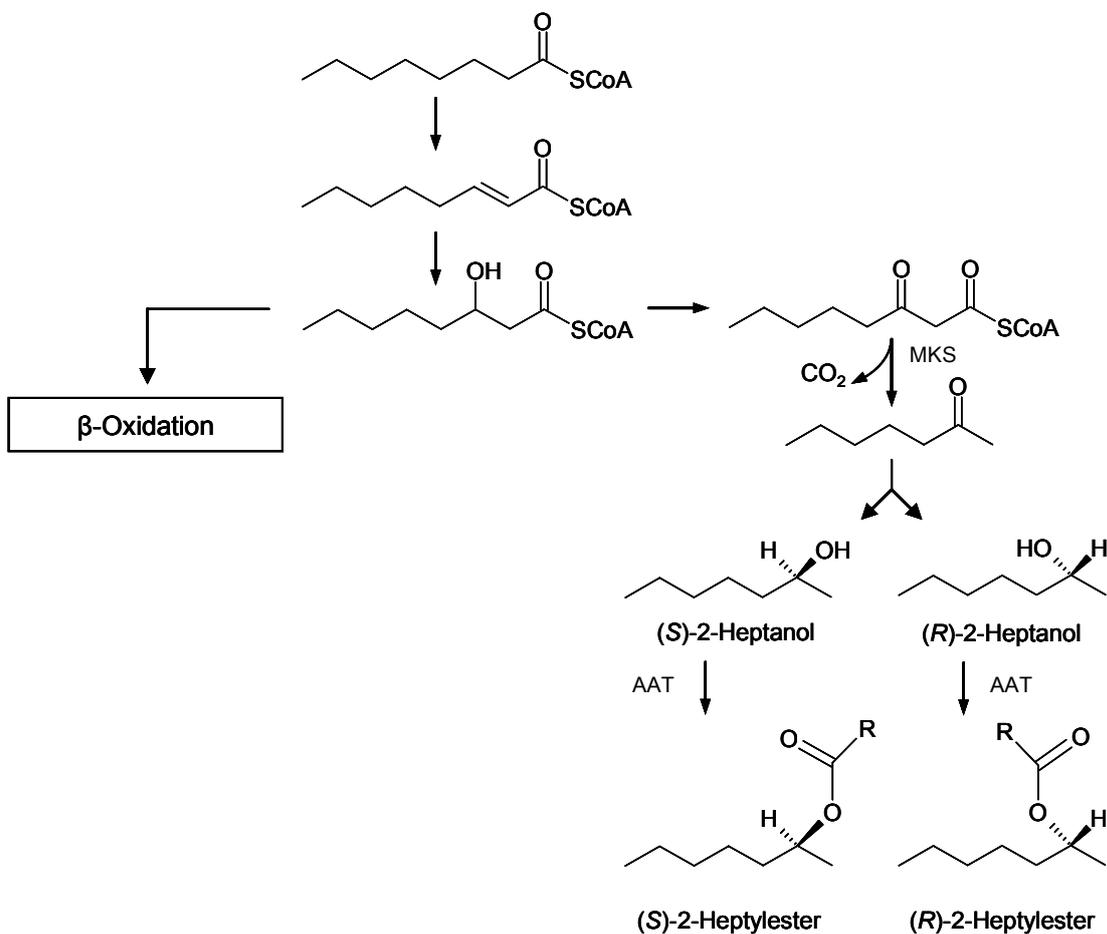


Abbildung 3: Mögliche Biosynthese von sekundären Alkoholen und ihren Estern in Passionsfrüchten (nach Tressl und Engel, 1985 und Schwab et al., 2008)  
AAT: Alkohol-Acyltransferase, MKS: Methylketon-Synthase

Die Bildung der 2-Pentyl- und 2-Nonylester lässt sich analog durch den Abbau homologer Fettsäuren erklären.

Aufgrund der Tatsache, dass 2-Heptanol in roten und gelben Passionsfrüchten in gegensätzlicher Konfiguration nachgewiesen wurde, wurde die Beteiligung unterschiedlicher Enzymsysteme an der Reduktion der entsprechenden Methylketone in den beiden Varietäten postuliert (*Tressl und Engel, 1985*).

### 2.2.3 Weiteres Vorkommen

Neben Passionsfrüchten wurden die sekundären Alkohole 2-Pentanol und 2-Heptanol sowie deren Acetate, Butanoate, Hexanoate und Octanoate ebenfalls als charakteristische flüchtige Verbindungen in Bananen nachgewiesen (*Tressl et al., 1969a; Tressl et al., 1970*). Als Spurenkomponenten wurden darüber hinaus 2-Nonanol und 2-Nonylacetat detektiert (*Tressl et al., 1969a; Berger et al., 1986*).

Die Bestimmung der natürlichen Enantiomerenverhältnisse von 2-Pentanol und 2-Heptanol sowie deren Acetate und Butanoate zeigte deutliche Unterschiede zu roten Passionsfrüchten: Für die chiralen Aromastoffe wurden deutliche Überschüsse der jeweiligen (S)-Enantiomere ermittelt (*Gessner et al., 1988; Fröhlich et al., 1989; Bernreuther, 1992*). Dies konnte auch für Früchte verschiedener Herkunftsländer bestätigt werden (*Schubert et al., 1991*). Das Vorkommen der charakteristischen chiralen Aromastoffe in gegensätzlichen Konfigurationen gibt somit einen klaren Hinweis auf metabolische Unterschiede zwischen Bananen und roten Passionsfrüchten.

Die homologe Reihe der sekundären Alkohole 2-Pentanol, 2-Heptanol und 2-Nonanol und ihrer Acetate, Butanoate und Hexanoate (mit Ausnahme von 2-Nonylacetat) wurde zudem in Erdbeeren und Erdbeermarmelade nachgewiesen (*Tressl et al., 1969b; Barron und Etiévant, 1990*).

Die in Erdbeeren vorliegenden natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen der sekundären Alkohole und deren Ester wurden bislang nicht untersucht.

## 2.2.4 Sensorische Eigenschaften

Im Rahmen der Untersuchungen des natürlichen Vorkommens der chiralen 2-Alkylester in Bananen wurden von *Mosandl und Deger (1987)* die Aromaqualitäten der Enantiomere bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Sensorische Bewertung optisch reiner 2-Alkylester (*Mosandl und Deger, 1987*)

<b>Ester</b>	<b>Enantiomer</b>	<b>Aromaqualität <sup>a</sup></b>
2-Pentylacetat	(S)	unspezifisch chemisch
	(R)	wie (S), jedoch schwächer
2-Pentylbutanoat	(S)	fruchtig, leicht flüchtig, Nachgeruch schweißig
	(R)	würzig, rauchig
2-Pentylhexanoat	(S)	angenehm fruchtige Note
	(R)	blumige Duftnote
2-Pentyl octanoat	(S)	schwach fruchtig
	(R)	unspezifisch, sehr schwach
2-Heptylacetat	(S)	feine, reintonige Fruchtnote
	(R)	durchdringende, schweißige Note
2-Heptylbutanoat	(S)	ausgeprägte Fruchtromanote
	(R)	fruchtig-süße Keton-Note
2-Heptylhexanoat	(S)	reine, fruchtige Esternote
	(R)	fruchtig-süße Keton-Note
2-Heptyl octanoat	(S)	muffig, dumpf, unspezifisch
	(R)	sehr schwach krautig, unspezifisch
2-Nonylacetat	(S)	typische Fruchtnote
	(R)	blumig, intensiver als (S)
2-Nonylbutanoat	(S)	erst unspezifisch, dann gewürzartig
	(R)	unspezifisch, schwach blumig
2-Nonylhexanoat	(S)	blumig süß
	(R)	schwach fruchtig, leicht erdige Note
2-Nonyl octanoat	(S)	schwache unspezifische Noten,
	(R)	jedoch differenzierbar

<sup>a</sup> Aromaqualitäten 1%-iger Lösungen in Ethanol (ermittelt mittels Riechstreifen)

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, wurden deutliche Unterschiede zwischen den Enantiomeren festgestellt. Zudem zeichneten sich mittels der angewandten Methode vor allem die (S)-Enantiomere durch typische „Fruchtromanoten“ aus. Im Vergleich dazu wurde von *Jordán et al. (2001)* natürliches 2-Pentylacetat aus Bananen mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (siehe Kapitel 2.6.3) bewertet und als „krautig, süß, blumig“ beschrieben. Es wurde zwar keine Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzung des chiralen Esters durchgeführt, allerdings ist ein deutlicher Überschuss des (S)-Enantiomers in Bananen bekannt (siehe 2.2.3).

Unterschiede zwischen den Enantiomeren von 2-Pentyl- bzw. 2-Heptylacetat wurden auch von *Nozaki et al. (1996)* beschrieben, wobei bei beiden Isomeren jeweils ein fruchtiger Grundton dominierte.

Untersuchungen der Racemate hinsichtlich ihrer Aromaqualitäten und Geruchsschwellenwerte wurden nur für wenige einzelne Ester durchgeführt und lassen aufgrund der unterschiedlichen sensorischen Bestimmungsmethoden keinen eindeutigen Vergleich der Homologen zu (*Gibka et al., 1998; Schnabel et al., 1988; Shiota, 1993; Takeoka et al., 1996; Teranishi et al., 1966*).

## 2.3 CHIRALITÄT

### 2.3.1 Definition und Bedeutung

Der Begriff „Chiralität“ leitet sich von dem griechischen Wort „cheir“ ab, das „Händigkeit“ oder „Hand“ bedeutet (*Vollhardt und Schore, 2007*). Bei chiralen Molekülen handelt es sich um Verbindungen, bei denen sich Bild und Spiegelbild nicht zur Deckung bringen lassen. Ihre räumliche Struktur unterscheidet sich wie das bekannteste Beispiel aus der Natur, wie linke und rechte Hand, und können durch Drehung nicht zur Deckung gebracht werden (*Mortimer, 2003*). Ein Molekül ist dann chiral, wenn es keine Symmetrieebene und kein Symmetriezentrum aufweist. Dies ist zum Beispiel bei einem Kohlenstoffatom mit vier unterschiedlichen Substituenten der Fall. Die beiden spiegelbildisomeren Formen werden als optische Antipoden oder Enantiomere bezeichnet, während man bei einer äquimolaren Mischung beider Isomere von einem Racemat spricht.

Enantiomere besitzen gleiche chemische und physikalische Eigenschaften, wie z.B. Schmelz- und Siedepunkt, Dichte oder Löslichkeit. Sie unterscheiden sich lediglich in ihrer Wechselwirkung mit linear polarisiertem Licht. Dabei dreht ein Enantiomer die Schwingungsebene nach rechts, das andere Isomer um denselben Betrag nach links. Dieses Phänomen wird als „optische Aktivität“ bezeichnet. Eine racemische Mischung dreht die Schwingungsebene nicht, da sich die links- und rechtsdrehende Wirkung aufheben.

Ein weiterer Unterschied von Enantiomeren zeigt sich in ihrem unterschiedlichen chemischen Verhalten in einer chiralen Umgebung. Da viele Biomoleküle in lebenden Zellen nur in einer Enantiomeren-Form auftreten (z.B. L-Aminosäuren, D-Zucker), sind die daraus gebildeten Makromoleküle, wie Polysaccharide, Proteine, DNA und RNA, ebenfalls chiral (*Barron, 2008*). Enantiomere unterscheiden sich folglich in ihrer Interaktion mit Rezeptorproteinen, Biokatalysatoren (Enzymen) sowie Transportsystemen. Chiralen Verbindungen kommt deshalb in der Biochemie, Pharmakologie, Agrochemie sowie der Lebensmittelindustrie eine sehr große Bedeutung zu (*Sheldon, 1993*).

Aus einer Vielzahl von Studien ist bekannt, dass sich Enantiomere hinsichtlich ihrer pharmakologischen Wirkung unterscheiden können. Das bekannte Beispiel

des Thalidomids (Contergan<sup>®</sup>) verdeutlicht die Tragweite dieses Phänomens. Der Wirkstoff wurde in den sechziger Jahren in Form eines racemischen Gemisches als Schlaf- und Beruhigungsmittel bei Schwangeren eingesetzt. Erst zu spät entdeckte man, dass lediglich das (*R*)-Enantiomer die gewünschte beruhigende Wirkung hervorruft, während das (*S*)-Enantiomer hoch teratogen ist (*Patel und Hutt, 2004*). Nahezu die Hälfte der zurzeit verwendeten Pharmazeutika ist chiral. Da sich bei sehr vielen chiralen Wirkstoffen ein Enantiomer inaktiv verhalten oder unerwünschte Nebenwirkungen bis hin zu Toxizität aufweisen kann, nehmen die Entwicklung und der Einsatz enantioreiner Arzneimittel stetig zu (*Gübitz und Schmid, 2006*). Dabei liegt das Augenmerk nicht nur auf der Entwicklung neuer Präparate, bei denen bereits im frühen Entwicklungsstadium sowohl das Racemat als auch die Enantiomere getrennt erforscht werden müssen, sondern vor allem bei bereits in racemischer Form eingesetzten Wirkstoffen steigt die Anzahl der nachträglichen Patente auf „Single-Enantiomer“-Präparate (*Maier et al., 2001; Sancho und Minguillón, 2009*). So wurde z.B. im Falle des Asthmapräparates Albuterol nachträglich die bessere Verträglichkeit des (*S*)-Enantiomers (Levalbuterol) erkannt oder für (*S*)-Fluoxetin eine Anti-Migräne-Wirkung festgestellt, während der racemische Wirkstoff ursprünglich als Antidepressivum verabreicht wurde. Bei Atorvastatin, dem Wirkstoff des weltweit umsatzstärksten verschreibungspflichtigen Arzneimittels Lipitor<sup>®</sup> (Cholesterinsenker) handelt es sich ebenfalls um ein „Single-Enantiomer“-Produkt (*Piras und Roussel, 2008; <http://www.imshealth.com>*).

Auch im Bereich der Agrochemie hat man das unterschiedliche Enantiomeren-Verhalten chiraler Wirkstoffe erkannt (*Kurihara und Miyamoto, 1998*). In der Gruppe der Aryloxypropanoat-Herbizide konnte für viele Pflanzenschutzmittel eine größere biologische Aktivität eines Enantiomers festgestellt werden. Allerdings gibt es auch chirale Substanzen, bei denen die Isomeren unterschiedliche chemische Aktivitäten aufweisen. So weiß man von vielen Triazolen, dass ein Enantiomer fungizide Wirkung besitzt, während das andere als Wachstumsregulator wirkt. Mittlerweile werden eine Vielzahl an Agrochemikalien in optisch reiner Form hergestellt und vermarktet (Aryloxypropanoat-Herbizide, Acylanilid-Herbizide und -Fungizide, Triazol-Fungizide). Dass der Einsatz optisch reiner Wirkstoffe nicht nur eine gezieltere Anwendung garantiert, sondern auch positive Effekte für die Umwelt mit sich bringt, wird am Beispiel des Herbizid-Wirkstoffes Metolachlor

ersichtlich. Während die Substanz seit den Siebziger Jahren als Racemat große Anwendung fand, wurde der Wirkstoff ab 1996 durch das optisch reine (S)-Enantiomer ersetzt, was zu einer Verringerung der Umweltbelastung um ca. 40 % führte (*Spindler und Früh, 1998*).

### 2.3.2 Chirale Aromastoffe

Neben der Pharmazie und Agrochemie kommt chiralen Verbindungen auch in der Lebensmittelindustrie eine große Bedeutung zu. Für viele chirale Aromastoffe wurde demonstriert, dass sich die Enantiomere sowohl in ihrer Geruchsqualität als auch in ihrer Geruchsintensität unterscheiden können. Die Geruchsrezeptoren sind aus Proteinen aufgebaut und somit selbst chiral. Sie interagieren mit den Enantiomeren der Aromastoffe zu diastereomeren Molekülkomplexen, die unterschiedliche physikalische Eigenschaften besitzen und somit auch unterschiedliche Geruchseindrücke induzieren können (*König, 2002*). Einen Überblick über die sensorischen Eigenschaften optischer Isomere geben die Zusammenstellungen von *Boelens et al. (1993)*, *Koppenhoefer et al. (1994)* und *Brenna et al. (2003)*. Ein bekanntes Beispiel für die unterschiedlichen Geruchsqualitäten von Enantiomeren ist der Aromastoff Carvon, dessen (R)-Isomer den Geruch „grüner Minze“ aufweist, während das (S)-Isomer eine typische „Kümmel-Note“ besitzt (*Leitereg et al., 1971*). Die in Äpfeln vorkommende (S)-2-Methylbuttersäure zeichnet sich durch einen angenehmen „fruchtig-süßen“ Geruch aus, während das (R)-Enantiomer eine unangenehme „schweißig-käsige“ Note besitzt (*Rettinger et al., 1991*). Auch für die Enantiomere der Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester wurden von *Mosandl und Deger (1987)* unterschiedliche Aromaqualitäten festgestellt (Tabelle 2). Dass sich Enantiomere auch in ihrer Geruchsintensität unterscheiden können, zeigt das Beispiel Ethyl-3-hydroxyhexanoat: Während das (R)-Enantiomer einen Geruchsschwellenwert von 2,1 ng/l Luft aufweist, wurde für die (S)-konfigurierte Form mit 264 ng/l Luft ein ca. 100-fach höherer Wert bestimmt (*Büttner und Schieberle, 2001*).

Neben den sensorischen Differenzierungen spielen chirale Aromastoffe eine wichtige Rolle bei der Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln, Aromen und etherischen Ölen (*Marchelli et al., 1996; König et al., 1997; Ruiz del Castillo et al.,*

2003; Mosandl, 2004; Mosandl, 2007). Da enzymkatalysierte Reaktionen meist mit hoher Stereospezifität verlaufen, liegen chirale Aromastoffe oft in optisch reiner Form oder in einem für das Produkt charakteristischen Enantiomerenüberschuss vor. Beispielsweise wurde das Vorkommen von 2-Methylbuttersäure sowie der entsprechenden Ester ( $C_1-C_6$ ) als nahezu optisch reine (*S*)-Enantiomere in Äpfeln und Apfelprodukten nachgewiesen (Schumacher et al., 1998). In Rhabarber dagegen liegt 2-Methylbuttersäure mit einem Enantiomerenüberschuss zugunsten des (*R*)-Enantiomers vor (Dregus et al., 2003). Chemisch hergestellte (naturidentische) Verbindungen liegen im Gegensatz dazu meist als Racemate vor. Selten kommen racemische Zusammensetzungen bei natürlichen Aromastoffen vor. Während z.B. für Theaspiran A in roten Passionsfrüchten ein Enantiomerenüberschuss des (+)-Enantiomers von 33,4 % bestimmt wurde, liegt der Aromastoff in Stachelbeeren in racemischer Form vor (Werkhoff et al., 1993). Die Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzung erlaubt somit die Differenzierung zwischen natürlichen und naturidentischen (racemischen) Aromastoffen und stellt die Basis für die Authentizitätskontrolle von aromatisierten Produkten bzw. etherischer Öle. Voraussetzungen sind die Kenntnis der genuinen Enantiomerenverteilung sowie der Veränderungen während der Herstellung und Lagerung der Produkte bzw. Extraktion der Aromastoffe (Mosandl, 2000).

### 2.3.3 Kapillargaschromatographische Enantiomerendifferenzierung

Zur Untersuchung chiraler Verbindungen wird eine Vielzahl an instrumentellen Techniken eingesetzt. Neben Polarimetrie, Circular dichroismus, optischer Rotationsdispersion und NMR-Spektroskopie haben sich vor allem chromatographische Methoden und Kapillarelektrophorese durchgesetzt (Schreier et al. 1995; Ward, 2000; Gübitz und Schmid, 2006). So zählen heute die Dünnschichtchromatographie (TLC), Gaschromatographie (GC), Superkritische Fluid-Chromatographie (SFC), High Performance Flüssigchromatographie (HPLC) sowie neu entwickelte Elektromigrations-Techniken (Kapillarelektrophorese und Kapillarelektrochromatographie) zu den am häufigsten eingesetzten Trennmethoden. Der aktuelle Stand der Forschung beschäftigt sich mit dem Einsatz von nano-chromatographischen Verfahren zur Enantiomerentrennung, von

der man sich aufgrund kürzerer Analysenzeiten und geringerer Probenvolumina eine deutlich größere Effizienz verspricht (*Sancho und Minguillón, 2009*).

Unter der Vielzahl an instrumentellen Techniken hat sich in den letzten Jahrzehnten die Kapillargaschromatographie als führende Technik zur Enantiomerendifferenzierung etabliert (*Schurig, 2002*).

Bei diesem Verfahren können die racemischen Verbindungen nach zwei Verfahren getrennt werden. Bei der indirekten Methode, die das ältere Verfahren darstellt, werden die Enantiomere mit einem optisch reinen Hilfsreagenz zu Diastereomeren derivatisiert und anschließend gaschromatographisch an einer achiralen stationären Phase getrennt (*Schreier et al., 1995*). Dieses Verfahren wurde durch die direkte, derivatisierungsfreie Methode weitestgehend verdrängt, bei der zur Trennung chirale stationäre Phasen verwendet werden. Abhängig von den für den Trenneffekt verantwortlichen Wechselwirkungen unterscheidet man drei Arten chiraler Phasen: Aminosäure-Derivate (Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen), Metallchelate (Komplexbildung) und Cyclodextrinphasen (Einschlusseffekte) (*Schurig, 2005*). Aufgrund ihrer hohenantioselektiven Trenneigenschaften und ihrer ausgeprägten Stabilität stellen letztere heutzutage die gängigsten chiralen GC-Phasen dar. Die unterschiedlichen Ringgrößen und die vielseitigen Möglichkeiten der Derivatisierung führten bis heute zu einer Vielzahl an modifizierten Cyclodextrinen, was die direkte Trennung eines großen Substanzspektrums ermöglicht (*Bicchi, 1999; Schurig, 2001*). Zahlreiche Studien geben einen Überblick über die erfolgreiche Anwendung von Cyclodextrinphasen bei der Analyse von Aromastoffen und etherischen Ölen (*Werkhoff et al., 1993; Bicchi, 1999; König und Hochmuth, 2004*).

Gegenstand der Forschung ist weiterhin der Trennmechanismus der Cyclodextrine. Dass der vollständige Einschluss von chiralen „Gast“-Molekülen in den Cyclodextrin-„Wirt“ Grundvoraussetzung für den enantioselektiven Trenneffekt ist, wird zunehmend angezweifelt (*König, 1992; Icheln, 1993*). Im Falle einer tetraedrischen Anordnung der Substituenten an einem chiralen Zentrum wäre auch der partielle Einschluss nur eines Substituenten in den Cyclodextrin-Hohlraum denkbar, wobei die restlichen Substituenten zusätzlich in Wechselwirkung mit der chiralen Peripherie der Cyclodextrine treten können.

Ein weiterer Fortschritt auf dem Gebiet der kapillargaschromatographischen Enantiomerendifferenzierung stellte die Entwicklung der Multidimensionalen Gaschromatographie (MDGC) dar. Hierbei handelt es sich um die Kopplung zweier Trennsäulen, die durch eine spezielle Säulenschalttechnik geregelt werden können (*Schomburg, 1995*). Nach der Vortrennung der Substanzen auf einer achiralen „Vorsäule“ werden die zu analysierenden Verbindungen auf eine zweite Säule („Hauptsäule“) transferiert, wo bei Verwendung einer geeigneten chiralen stationären Phase die Trennung der Enantiomeren stattfindet. In der Literatur wird eine Reihe von Trennsäulenschaltungen beschrieben (*Mosandl, 1996; Wright, 1997*), von denen zwei Techniken den größten Einsatz finden: die „Live-T-Schaltung“ und das „Moving-Column-Stream-Switching-System (MCSS). Die Vorteile der neu entwickelten „Double-Cool-Strand Interface“-Technik (DCSI) wurden kürzlich für die gaschromatographisch-olfaktometrische Bewertung (GC/O) chiraler Aromastoffe gezeigt (*Begnaud et al., 2006; Chaintreau et al., 2006*).

Der besondere Vorteil der MDGC besteht in der direkten Trennung chiraler Verbindungen verschiedener Substanzklassen aus einer komplexen Matrix (z.B. natürlichem Extrakt) ohne vorherige Aufreinigung oder Derivatisierung (*Mosandl, 2007*). Zudem kann die Methode durch weitere analytische Techniken, wie z.B. hochauflösende Massenspektrometrie (MS), massenselektive Detektion (SIM) oder Isotopenmassenspektrometrie (IRMS) erweitert werden. Entscheidende Parameter für den erfolgreichen Einsatz der MDGC sind die Auswahl und Kombination geeigneter Trennkapillaren (achirale Vorsäule/chirale Hauptsäule) sowie die verwendeten Temperaturprogramme (*Schomburg, 1995*).

## 2.4 ENANTIOSELEKTIVE BIODKATALYSE

Als Biokatalyse wird ein Verfahren bezeichnet, in dem biologische Systeme, z.B. Enzyme, als Katalysatoren verwendet werden, wobei diese sowohl frei als auch im Zellverband vorliegen können (*Buchholz et al., 2005*). Damit stellt sie ein Bindeglied zwischen biotechnologischen und chemischen Vorgehensweisen dar. Biokatalysatoren werden seit jeher zur Herstellung von Lebensmitteln wie Brot, Bier, Milchprodukten und Fleischerzeugnissen verwendet. Heute kommen sie vermehrt auch in der Produktion von „fine chemicals“, wie z.B. Aminosäuren, und in der Herstellung von Pharmazeutika und Agrochemikalien zum Einsatz. Mit Produktionsmengen von über 10 Millionen Tonnen/Jahr zählen Dextrine, Glucose und High-Fructose-Corn-Sirup (HFCS) zu den am häufigsten unter Verwendung von Enzymen hergestellten Produkten weltweit (*Bornscheuer und Buchholz, 2005*). Entscheidende Vorteile der Biokatalyse gegenüber konventionellen Methoden zeigen sich z.B. in milderer Prozessbedingungen (pH-Bereich von 5-8 und Temperaturbereich 20-40 °C), was das Problem von unerwünschten Nebenreaktionen wie Degradation oder Isomerisierung minimiert, oder in ihrer Effizienz, da Enzyme die Reaktionsgeschwindigkeit von Synthesen auf das 10<sup>12</sup>-fache erhöhen können (*Faber, 1997; Carrea und Riva, 2000*). Darüber hinaus verlaufen enzymkatalysierte Prozesse weniger gefährlich, umweltgefährdend und energieverbrauchend. Einen entscheidenden Schritt auf dem Gebiet der Biokatalyse stellte der Fortschritt in der Gentechnologie dar. Seit die Möglichkeit besteht, Enzyme durch rekombinante Mikroorganismen herzustellen, haben die Herstellungskosten und somit die Preise für Enzyme deutlich abgenommen, während deren Stabilität und Reinheit gesteigert werden konnten (*Bornscheuer und Buchholz, 2005*).

Wie in Kapitel 2.3 gezeigt, nimmt das Interesse an enantioreinen und spezifisch funktionalisierten Substanzen in vielen Bereichen der Life Sciences stetig zu. Hierbei kommt ein weiterer entscheidender Vorteil von Enzymen gegenüber chemischen Katalysatoren zum Tragen. Enzyme können enantioselektiv wirken und sind damit in der Lage, nur eines der beiden Enantiomere in optisch reiner Form herzustellen. Hierbei spricht man von enantioselektiver Biokatalyse (*Faber, 1997, Jäger und Eggert, 2004*).

Die Methoden der enantioselektiven Synthese können anhand des verwendeten Ausgangsmaterials in drei verschiedene Kategorien unterteilt werden: Als Substrate können chirale Substanzen, Racemate oder prochirale Verbindungen dienen (*Ghanem und Aboul-Enein, 2005*):

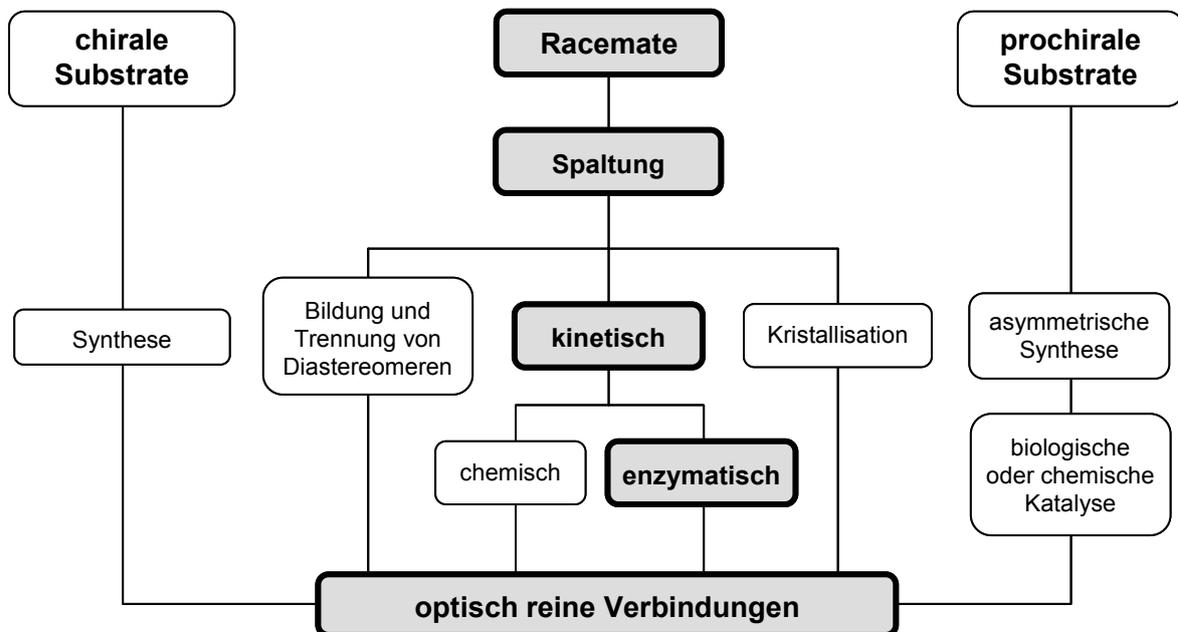


Abbildung 4: Methoden der Herstellung optisch reiner Verbindungen (nach *Ghanem und Aboul-Enein, 2005*; *Sheldon, 1993*)

Zwei der in Abbildung 4 dargestellten Synthesewege stellen Methoden der enantioselektiven Biokatalyse dar: Zum einen die asymmetrische Synthese unter Einsatz eines chiralen Katalysators ausgehend von prochiralen Substanzen, zum anderen die katalytische kinetische Racematspaltung. Der Unterschied besteht im jeweils verwendeten Ausgangsmaterial: Bei der asymmetrischen Synthese entsteht aus einem prochiralen Substrat ein optisch reines Produkt, bei der katalytischen kinetischen Racematspaltung aus einem racemischen Substrat. Die enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung (in der Abbildung hervorgehoben) stellt die mit Abstand am häufigsten angewandte Methode dar (*Ghanem und Aboul-Enein, 2005*) und wird auch in dieser Arbeit zur Herstellung optisch reiner Passionsfrucht-typischer 2-Alkylester eingesetzt.

Der Trenneffekt der enzymkatalysierten kinetischen Racematspaltung beruht auf unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten, mit denen die Enantiomere eines racemischen Gemisches vom Katalysator umgesetzt werden.

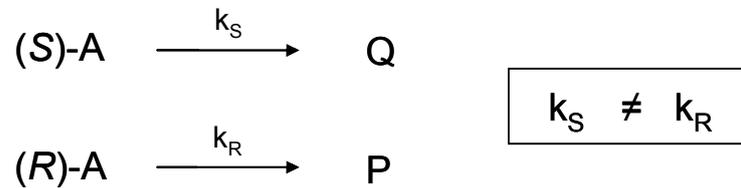


Abbildung 5: Prinzip der katalytischen kinetischen Racematspaltung (nach *Ghanem und Aboul-Enein, 2005*)

Man spricht von kinetischer Racematspaltung, wenn  $k_R \neq k_S$  ist. Im Idealfall reagiert ein Enantiomer so viel schneller als das andere, dass eine der beiden Geschwindigkeitskonstanten verschwindend klein wird. Ist beispielsweise  $k_S = 0$ , dann werden 50 % des ursprünglichen racemischen Substrates (R,S)-A zu Produkt P umgesetzt, 50 % verbleiben als optisch reines Substrat (S)-A. Aus dieser Bilanzierung wird aber auch ein Nachteil der konventionellen katalytischen kinetischen Racematspaltung ersichtlich: die Ausbeute an optisch reinen Substanzen kann maximal 50 % betragen (*Ghanem und Aboul-Enein, 2005*).

## 2.5 ENZYME

Enzyme sind die Katalysatoren biologischer Systeme. Die meisten Enzyme sind Proteine, mit der Ausnahme katalytisch aktiver RNA-Moleküle. Ein Katalysator beschleunigt eine Reaktion, ohne die Lage des Gleichgewichts zu verändern. Ohne Enzyme würden die meisten Reaktionen in biologischen Systemen nur in einem nicht wahrnehmbaren Umfang ablaufen. Die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit beruht auf der Verminderung der Aktivierungsenergie. Die Aktivierungsenergie  $\Delta G^\ddagger$  ist die Differenz zwischen der freien Enthalpie des Übergangszustands, über den die Umwandlung des Substrates S in das Produkt P läuft, und der des Substrates. Die Katalyse findet an einer bestimmten Stelle im Enzym statt, dem aktiven Zentrum. Das Substrat wird im aktiven Zentrum gebunden und umgesetzt. Ein besonderes Merkmal von Enzymen ist ihre hohe Spezifität – sowohl in der Wahl des Substrates als auch in der von ihnen katalysierten Reaktion (*Berg et al., 2003; Nelson und Cox, 2001*).

### 2.5.1 Lipasen

Lipasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und tragen den systematischen Namen Triacylglycerid-Ester-Hydrolasen (EC 3.1.1.3). Ihre natürliche Funktion ist die Hydrolyse und Wiederveresterung von Fetten und Ölen. Neben Triacylglyceriden setzen sie aber auch ein sehr breites Spektrum anderer Ester, sowohl natürlicher als auch synthetischer Herkunft, um (*Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*). Lipasen sind in vielen unterschiedlichen Lösungsmitteln reaktiv; sie katalysieren sowohl die Hydrolyse in wässrigen als auch Veresterungen und Umesterungen in organischen Medien. Die bessere Löslichkeit vieler Substrate in organischen Lösungsmitteln, die somit gesteigerten Umsatzraten sowie leichteres Entfernen des Mediums aufgrund der niedrigeren Siedepunkte im Vergleich zu Wasser, sind nur einige der vielen Gründe, weshalb Lipase-katalysierte Synthesen heute vermehrt in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden (*Ghanem und Aboul-Enein, 2005*). Lipasen benötigen keine Cofaktoren. Trotz ihres breiten Substratspektrums wirken sie oft hochgradig

enantio- und/oder regioselektiv. Die Kombination dieser Eigenschaften macht Lipasen deshalb zu idealen Katalysatoren für die synthetische organische Chemie (*Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*).

### 2.5.1.1 Struktur und Mechanismus

Obwohl sich Lipasen in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, weisen sie alle eine identische und charakteristische räumliche Struktur, die  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung, auf. Diese besteht aus acht im Zentrum stehenden, meist parallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen, umgeben von  $\alpha$ -Helices, wobei der  $\beta$ 2-Strang antiparallel zu den anderen ist. Die parallelen Stränge  $\beta$ 3 bis  $\beta$ 8 sind durch  $\alpha$ -Helices verbunden, die zu beiden Seiten der zentralen  $\beta$ -Stränge angeordnet sind (*Jäger et al., 1999; Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*).

Das aktive Zentrum besteht aus drei katalytischen Aminosäure-Bestandteilen, der katalytischen Triade: dem nucleophilen Bestandteil (Serin), dem katalytischen Säurebestandteil (Aspartat oder Glutamat), sowie dem Histidin-Bestandteil. Bei Lipasen ist der nucleophile Bestandteil immer Serin, weshalb sie auch als Serin-Hydrolasen bezeichnet werden. Dieser nucleophile Serinbestandteil ist in einem hochgradig konservierten Pentapeptid, bestehend aus Gly-X-Ser-X-Gly, lokalisiert. Dieses Pentapeptid bildet eine  $\gamma$ -ähnliche Kurve zwischen dem  $\beta$ 5 Strang und der darauf folgenden  $\alpha$ -Helix aus. Diese Anordnung wird als „nucleophiler Ellenbogen“ („nucleophilic elbow“) bezeichnet. Somit wird der nucleophile Bestandteil frei an der Oberfläche des aktiven Zentrums positioniert und erlaubt auf der einen Seite eine Bindung zum Histidin und auf der anderen Seite die Bindung eines Substrates. Eine weitere für den katalytischen Mechanismus wichtige Struktur ist die „Oxyanion-Bindungstasche“ (oxyanion hole). Diese Bindungstasche ist durch zwei NH-Gruppen der Peptidhauptkette charakterisiert, welche das während der Umsetzung entstehende Oxyanion über Wasserstoffbrücken stabilisieren.

Der Reaktionsmechanismus der Lipase-katalysierten Hydrolyse und Veresterung beruht auf dem strukturellen und funktionellen Zusammenspiel der drei aktiven Aminosäurebestandteile Serin, Aspartat (bzw. Glutamat) und Histidin (Abbildung 6).

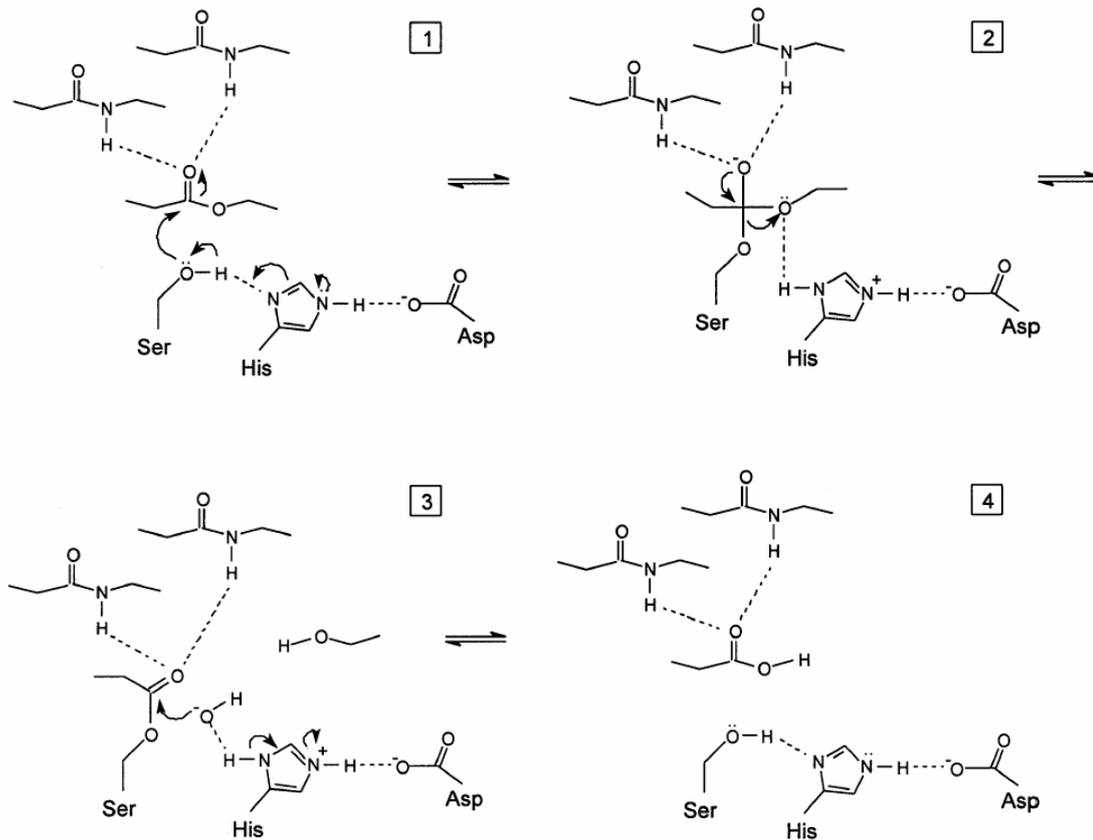


Abbildung 6: Reaktionsmechanismus von Lipasen (Jäger et al., 1999)

Nach Einlagerung des Substrates in das aktive Zentrum wird das nukleophile Serin durch den Transfer eines Protons auf das benachbarte Histidin aktiviert [1]. Dieser Protonenübergang wird durch den katalytischen Säure-Bestandteil erleichtert, der den Imidazolring des Histidins in die richtige Position bringt und Ladungen teilweise neutralisiert. Das gebildete Serin Oxyanion ( $O^-$ ) startet einen nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Esterbindung. Es entsteht ein tetraedrisches Intermediat, das durch Wasserstoffbrücken zwischen dem negativ geladenen Carbonyl-Sauerstoffatom, dem Oxyanion, und den NH-Gruppen der „Oxyanion-Bindungstasche“ stabilisiert wird [2]. Der Histidin-Bestandteil überträgt ein Proton auf das Sauerstoffatom der Alkohol-Komponente des Substrates. Die Esterbindung wird dadurch gespalten und der Alkohol als Produkt freigesetzt. Die Säure-Komponente des Substrates wird mit dem Serin-Bestandteil verestert, es entsteht ein kovalentes Intermediat, das so genannte „Acyl-Enzym“ [3]. Ein eingebrachtes Wassermolekül wird durch die Übertragung eines Protons auf Histidin aktiviert. Das gebildete Hydroxy-Ion

(OH<sup>-</sup>) greift nukleophil am Carbonyl-Kohlenstoffatom der Acyl-Gruppe an. Wieder entsteht ein tetraedrisches Intermediat, das durch Wechselwirkungen mit der Oxyanion-Bindungstasche stabilisiert wird [4]. Der Histidin-Bestandteil überträgt ein Proton auf das Sauerstoffatom der Serin-Komponente. Die Esterbindung zwischen Serin und Acyl-Gruppe wird gespalten, die Säure wird als zweites Produkt freigesetzt. Der Mechanismus kann wieder von vorne beginnen. (*Jäger et al., 1999; Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*).

Ursprünglich hatte ein lipolytisches Enzym zwei Kriterien zu erfüllen, um als „echte“ Lipase zu gelten. Es musste erstens durch das Vorhandensein einer Phasengrenzfläche aktiviert werden – ein Phänomen, das als Grenzflächenaktivität bezeichnet wird. Zweitens musste es eine so genannte *lid*-Struktur enthalten, eine Proteinschleife, welche das aktive Zentrum des Enzyms freigibt, sobald es in Kontakt mit einer Grenzfläche kommt. Diese Kriterien stellten sich aber als ungeeignet für die Klassifizierung heraus, da mittlerweile Lipasen bekannt sind, die zwar eine *lid*-Struktur aufweisen, in Gegenwart einer Grenzfläche aber nicht aktiviert werden. Deshalb ist man dazu übergegangen, Lipasen als Carboxylesterasen zu definieren, welche sowohl die Hydrolyse als auch die Synthese von langkettigen Acylglyceriden katalysieren. Ab welcher Kettenlänge der Fettsäure ein Acylglycerid als langkettig gilt, wird nicht genauer spezifiziert, trotzdem kann man ab einer Länge von zehn Kohlenstoffatomen von einem bevorzugten Lipase-Substrat sprechen. Ein Triacylglycerid mit drei Ölsäureresten kann als Standard-Substrat von Lipasen gesehen werden (*Jäger et al., 1999*).

### 2.5.1.2 Enantioselektivität

Die für die enzymatische kinetische Racematspaltung verantwortliche Enantioselektivität von Enzymen beruht auf dem Prinzip, dass sich Enantiomere in ihrer Bindungsfähigkeit an ein Enzym unterscheiden können. Dabei spielen zwei Eigenschaften eine wichtige Rolle: Zum einen die unterschiedlichen Bindungsfähigkeiten der beiden Enantiomere an das aktive Zentrum des Enzyms, die durch die Größe der Substituenten bestimmt werden; zum anderen die Bindung der Aminosäuren der katalytischen Triade an die Atome der Enantiomere. Je präziser und günstiger die Wechselwirkungen stattfinden, desto stärker kann

die Aktivierungsenergie abgesenkt werden und desto schneller wird das jeweilige Substrat umgesetzt. Sind die Wechselwirkungen ungünstig, kann die Aktivierungsenergie nicht stark genug abgesenkt werden und das jeweilige Enantiomer wird langsamer umgesetzt (*Buchholz et al., 2005*). Die experimentelle Ermittlung der Enantioselektivität (E-Wert) ist in Kapitel 3.2.4.1 dargestellt.

Für die Vorhersage der Enantiopräferenz von Lipasen wurde eine Reihe von empirischen Regeln entwickelt. Das Modell nach *Kazlauskas et al. (1991)* beschreibt die Erkennung chiraler sekundärer Alkohole und beruht auf der Größe des Substituenten am asymmetrischen Kohlenstoffatom. Hiernach besteht das aktive Zentrum des Enzyms aus zwei Taschen unterschiedlicher Größe, wobei der größere Substituent (L) des bevorzugten Enantiomers in die große Tasche und der mittelgroße Substituent (M) in die kleinere Taschen binden (Abbildung 7). Die Enantioselektivität der Lipasen ist damit umso effektiver, je mehr sich die Größen der jeweiligen Substituenten unterscheiden (*Ghanem und Aboul-Enein, 2005*).

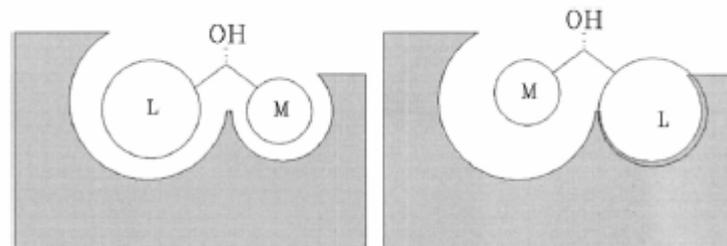


Abbildung 7: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von Lipasen nach dem Kazlauskas-Modell (*Ghanem und Aboul-Enein, 2005*).  
links: Bindung des bevorzugten Enantiomers;  
rechts: Bindung des weniger bevorzugten Enantiomers

Die Anwendbarkeit dieser Regel durch Vorhersage der Enantiopräferenz (*Kim und Cho, 1992; Lutz et al., 1992; Orrenius et al., 1998*) sowie die Steigerung der Enantioselektivität durch Variation der Substituentengröße (*Gupta und Kazlauskas, 1993; Rotticci et al., 1997*) konnte mittlerweile von verschiedenen Forschungsgruppen demonstriert werden.

Die Stereoselektivität von Lipasen kann nicht nur durch die chemische Struktur des Substrates beeinflusst werden, sondern auch durch eine Änderung der Beschaffenheit des Enzyms, wie z.B. durch Immobilisierung (*Bornscheuer, 2003; Cao, 2005*). Aber auch ein Wechsel der Reaktionsbedingungen (Temperatur, Druck) oder des Reaktionsmediums (wässrige Lösung vs. organisches

Lösungsmittel, Polarität, 2-Phasen-System) kann zu Veränderungen der Enantioselektivität führen (Kovac *et al.*, 2000; Berglund, 2001; Bornscheuer und Kazlauskas, 2006).

### 2.5.1.3 *Candida antarctica* Lipase B (CALB)

Die Hefe *Candida antarctica* produziert zwei Lipasen: Lipase A und Lipase B. Während Lipase A thermostabil und calciumabhängig ist, verhält sich Lipase B weniger thermostabil und ist calciumunabhängig. Zudem unterscheiden sich beide Enzyme in ihrer Substratspezifität. Lipase A ist sehr aktiv im Bezug auf große Triglyceride; Lipase B weist dagegen große Aktivität gegenüber vielen Estern, Alkoholen, Amiden und Thiolen auf. Aufgrund des spezifischeren Substratspektrums, ihrer ausgeprägten Stabilität sowohl in Wasser als auch organischen Lösungsmitteln und ihrer Regio- und Enantioselektivität gehört *Candida antarctica* Lipase B (CALB) mittlerweile zu einem der industriell meistgenutzten Biokatalysatoren (Anderson *et al.*, 1998; Bornscheuer und Kazlauskas, 2006).

CALB besteht aus 317 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 33 kDa. Die Herstellung erfolgt als rekombinantes Enzym in *Aspergillus*-Spezies. CALB weist die Lipase-typische  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung auf und die katalytische Triade des aktiven Zentrums besteht aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparagin (Anderson *et al.*, 1998; Høegh *et al.*, 1995). CALB unterscheidet sich von anderen Lipasen in ihrer Pentapeptid-Sequenz, wodurch die Schleife des *nucleophilic elbow* weniger stark gebogen ist. Es wird von einer *lid*-ähnlichen Struktur berichtet, die über dem Zugang des aktiven Zentrums positioniert ist (Uppenberg *et al.*, 1995), allerdings zeigt CALB keine Grenzflächenaktivität (Martinelle *et al.*, 1995). Nach Bornscheuer und Kazlauskas (2006) sollte CALB somit eher als Esterase klassifiziert werden, während Anderson *et al.* (1998) von einem Intermediat zwischen Lipase und Esterase sprechen.

CALB zeichnet sich durch ihre Enantioselektivität gegenüber sekundären Alkoholen aus. Hierbei folgen die Umsetzungen in den meisten Fällen der Kazlauskas-Regel, d.h. (*R*)-Enantiomere werden bevorzugt umgesetzt (siehe Kapitel 2.5.1.2). Untersuchungen der Variation der Substituentengrößen zeigen,

dass Umsetzungen mit CALB hoch enantioselektiv verlaufen, wenn das Substrat einen M-Substituenten kleiner als n-Propyl und einen L-Substituenten größer als n-Propyl aufweist (Orrenius et al., 1998; Rotticci et al., 1998). Durch die Strukturaufklärung mittels Kristallisation durch Uppenberg et al. (1995) wurde eine Erklärung für die hohe Enantioselektivität von CALB gegenüber sekundären Alkoholen gefunden. Es wurde festgestellt, dass das aktive Zentrum in zwei Kanäle mit limitierter Größe aufgeteilt ist: eine „Acyl-Tasche“ für den Säureteil des Substrates und eine „Alkohol-Tasche“, in der der Alkohol-Teil bindet. Diese Konformation wird dadurch bestimmt, dass während der Umsetzung ein Proton des aktiven Histidin-Bestandteils auf das Alkohol-Sauerstoffatom übertragen werden muss (siehe Kapitel 2.5.1.1). Das aktive Zentrum von CALB ist dadurch, verglichen mit anderen Lipasen, räumlich sehr begrenzt und die katalytisch aktiven Aminosäure-Bestandteile liegen schwer zugänglich im hinteren Teil. Hier befindet sich innerhalb des Alkohol-Kanals die so genannte „Stereospezifitäts-Tasche“, eine enantioselektive Bindungsstelle für den chiralen Alkohol-Teil des Substrates. Die Alkohol-Enantiomere können in zwei verschiedenen Orientierungen in diese stereospezifische Tasche binden: Beim bevorzugt umgesetzten Enantiomer (meist (R)) positioniert sich der mittelgroße M-Substituent in diese stereospezifische Tasche, während der L-Substituent in Richtung Eingang des aktiven Zentrums zeigt. Das langsamer reagierende Enantiomer (meist (S)) muss dagegen den großen L-Substituenten in die räumlich begrenzte Stereospezifitäts-Tasche binden, was zu sterischen Hinderungen und somit niedrigeren Umsatzraten führt (Orrenius et al., 1998; Rotticci et al., 1998; Haeffner und Norin, 1999; Ottosson et al., 2001).

#### 2.5.1.4 *Candida cylindracea* Lipase (CCL)

Die Lipase aus *Candida cylindracea* (CCL) findet breite Anwendung in der Hydrolyse und Synthese von Estern. Sie ist auch unter dem Synonym *Candida rugosa* (CRL) bekannt. Einen Überblick über den Einsatz in der Biokatalyse sowie strukturelle Aspekte gibt die Arbeit von Dominguez de Maria et al. (2006).

CCL besteht aus fünf Isoenzymen mit nahezu identischen Eigenschaften. Jedes Enzym besteht aus 534 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca.

60 kDa (*Benjamin und Panday, 1998*). Da CCL ein unübliches Codon für Serin verwendet, das in anderen Wirtsorganismen für Leucin codiert, kann es nicht als rekombinantes Enzym hergestellt werden. Kommerziell erhältliches CCL ist somit eine Mischung verschiedener Isoenzyme und enthält meist geringe Mengen an Protease (*Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*).

CCL weist die Lipase-typische  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung auf. Die katalytische Triade des aktiven Zentrums besteht aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Glutamat. Des Weiteren besitzt CCL eine *lid*-Struktur und weist, im Gegensatz zu CALB, eine Grenzflächenaktivität auf (*Benjamin und Panday, 1998; Grochulski et al., 1993*). Aufgrund des vergleichsweise großen aktiven Zentrums akzeptiert CCL auch größere Substrate. So gleicht die Bindungstasche für den Säurebestandteil einem Tunnel, der groß genug für eine C<sub>18</sub>-Kohlenstoffkette ist (*Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*). Aufgrund ihres großen Substratspektrums und ihrer Fähigkeit zur Umsetzung ungewöhnlicher Substrate findet CCL vermehrt Einsatz in der Lebensmittelindustrie, wie z.B. der Produktion von Säften und Backwaren oder der Modifikation von Fetten und Ölen, aber auch in der Synthese von Aromastoffen, Pharmazeutika oder Feinchemikalien (*Benjamin und Panday, 1998; Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*).

Hinsichtlich ihrer Enantioselektivität findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben. So wird CCL einerseits als unspezifisches Enzym beschrieben (*Sonnet und Baillargeon, 1987; Gerlach et al., 1988*). Andererseits wurde gezeigt, dass CCL-katalysierte Umsetzungen hoch enantioselektiv verlaufen (*Cambou und Klibanov, 1984; Patel et al., 2000*). Zudem ist die Vorhersage der Enantiopräferenz nach dem Kazlauskas-Modell nicht verlässlich für acyclische sekundäre Alkohole (*Kazlauskas et al., 1991*).

## 2.6 SENSORIK

### 2.6.1 Allgemeine Aspekte

Sensorik bezeichnet die Wissenschaft der Wahrnehmung durch die menschlichen Sinnesorgane. Das beim Verzehr eines Lebensmittels wahrgenommene „Flavour“ stellt den Gesamtsinnesindruck aus Geschmacks-, Geruchs- und Tastempfinden dar (Belitz et al., 2008). Die beteiligten chemischen Verbindungen werden in Geschmacksstoffe und Geruchsstoffe (Aromastoffe) unterteilt. Während die Geschmacksstoffe mit den Geschmacksrezeptoren auf der Zunge wahrgenommen werden, handelt es sich bei den Aromastoffen um flüchtige Verbindungen, die in der Nasenhöhle an die Rezeptoren des Riechepithels gelangen und dort von den olfaktorischen Rezeptoren der Riehzellen erkannt werden. Wie in Abbildung 8 veranschaulicht, kann dies nicht nur durch direktes Einatmen über die Nase (orthonasal) erfolgen, sondern auch beim Verzehr eines Lebensmittels (Kauen, Schlucken) über den Rachenraum (retronasal). Bei der retronasalen Geruchswahrnehmung handelt es sich um einen präzise gesteuerten Prozess, bei dem der Aromatransfer nur zu bestimmten Zeitpunkten ermöglicht wird (Büttner et al., 2001; Büttner und Montserrat, 2005).

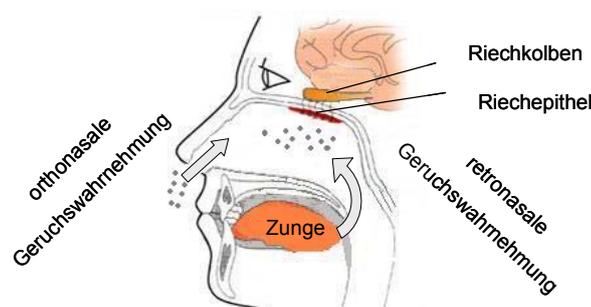


Abbildung 8: Orthonasale und retronasale Geruchswahrnehmung

Während sich der Geschmackssinn auf fünf Grundarten (süß, salzig, sauer, bitter, Umami) beschränkt, kann der Mensch mehrere tausend Geruchsqualitäten unterscheiden (Klinke et al., 2005). Entscheidend für die Wahrnehmung von Aromastoffen ist deren Schwellenwert. Während die Konzentration einer Verbindung, die gerade noch zur Erkennung der Geruchsqualität ausreicht, als *Erkennungsschwelle* bezeichnet wird, gibt die *Wahrnehmungsschwelle* den Wert

an, bei der eine Wahrnehmung des Reizes stattfindet, aber keine Zuordnung des Geruches möglich ist (*Belitz et al., 2008*). Einen Überblick über orthonasale und retronasale Geruchsschwellenwerte wichtiger Aromastoffe gibt die Zusammenfassung von *Rychlik et al. (1998)*. Das Spektrum an flüchtigen Verbindungen in einem Lebensmittel kann aus mehr als 700 Einzelsubstanzen bestehen. Von dieser Vielzahl an Verbindungen sind allerdings nur diejenige für das Aroma von Bedeutung, deren Konzentration größer ist als die Geruchsschwelle. Besondere Bedeutung erlangen dabei die Substanzen, die das charakteristische Aroma eines Lebensmittels prägen. Einen ausführlichen Überblick über diese Schlüsselaromastoffe (*character impact compounds*) gibt die Zusammenfassung von *McGorrin (2002)*.

### 2.6.2 Aromawert

Zur Beurteilung der Aromarelevanz von flüchtigen Verbindungen in einer Lebensmittelmatrix eignet sich der Begriff des Aromawertes (*Rothe und Thomas, 1963*). Er ist definiert als Verhältnis der Konzentration des Aromastoffes ( $c_x$ ) und der Geruchsschwelle der Verbindung ( $a_x$ ) im vorliegenden Lebensmittel. Eine Verbindung leistet demnach einen Beitrag zum Gesamtaroma, wenn ihre Konzentration im Lebensmittel höher ist als ihre Geruchsschwelle und der Aromawert somit größer als 1 ist. Da die Geruchsschwellen von vielen Faktoren, wie z.B. der Wahl des verwendeten Mediums oder der angewandten Bestimmungsmethode beeinflusst werden (*Van Toller, 1993; Buttery, 1999; Noble, 2002*), sollten die zur Berechnung benötigten Schwellenwerte in einer dem Lebensmittel möglichst ähnlichen Matrix bestimmt werden. Die Zusammenstellung von *Rychlik et al. (1998)* verdeutlicht die Varianz von in der Literatur genannten Geruchsschwellenwerten. Da das Prinzip des Aromawertes weder die Abhängigkeit der Geruchsintensität von der Konzentration des Aromastoffes (*Frijters, 1978*) noch additive bzw. suppressive Wechselwirkungen mit der Lebensmittelmatrix berücksichtigt (*Rothe et al., 1972; Acree, 1993*), stellt die Berechnung lediglich eine Näherungsmethode dar. Trotz dieses vereinfachten Konzeptes konnten durch die Anwendung des Aromawertes wertvolle Beiträge zur

Aufklärung verschiedener Lebensmittelaromen geleistet werden (*Grosch, 1990; Grosch, 2001*).

### 2.6.3 Methoden der sensorischen Bewertung

Allgemein lassen sich sensorische Prüfmethode in analytische und hedonische Verfahren unterteilen (*Derndorfer, 2008*). Die hedonische Prüfung stellt ein rein subjektives Verfahren in Form von Akzeptanz- oder Präferenztests dar. Bei den analytischen Prüfmethode handelt es sich dagegen um objektive Bewertungen, die je nach Durchführungsmodus als beschreibende oder bewertende Prüfung sowie Unterschiedsprüfung klassifiziert werden (*Meilgaard et al., 2006*). Als Vertreter der letztgenannten Gruppe stellt der Dreieckstest (Triangeltest) die bekannteste und am weitesten verbreitete Prüfmethode dar. Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf dem Erkennen einer abweichenden Probe aus einer Reihe von drei Proben (davon zwei identisch). Der Triangeltest unter Verwendung der „Forced-Choice-Technik“ (3-AFC), bei der eine Aussage erzwungen wird, auch wenn kein Unterschied erkennbar ist, stellt die nach internationalen Standards (ISO 4120) einzige anerkannte Methode dar (*Meilgaard, 2006; Buchecker, 2008*). Zudem hat sie sich zur Bestimmung von Geruchsschwellen etabliert.

Eine weitere Möglichkeit der sensorischen Bewertung von Aromastoffen stellt die Gaschromatographie/Olfaktometrie dar. Bei dieser Methode werden die flüchtigen Verbindungen zunächst kapillargaschromatographisch aufgetrennt und anschließend ihre Aromarelevanz am so genannten Sniffing-Port bewertet (*Delahunty et al., 2006*). Das Prinzip dieser Kombination aus einer instrumentell-analytischen und einer sensorischen Methode ist in Abbildung 9 veranschaulicht. Das Verfahren erlaubt die Bestimmung aromarelevanter flüchtiger Verbindungen aus einer komplexen Lebensmittelmatrix sowie die Bestimmung der Geruchsqualitäten und -schwellenwerten von Aromastoffen. Hierzu wird nach der von *Ullrich und Grosch (1987)* entwickelten Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) der Aromaextrakt bzw. die Stammlösung schrittweise mit Lösungsmittel verdünnt und jede Verdünnungsstufe mittels GC/O analysiert, bis kein Geruch mehr wahrgenommen werden kann. Die letzte Verdünnungsstufe, bei der der

Aromastoff noch wahrgenommen werden kann, wird als FD-Faktor (Flavor Dilution Factor) definiert.

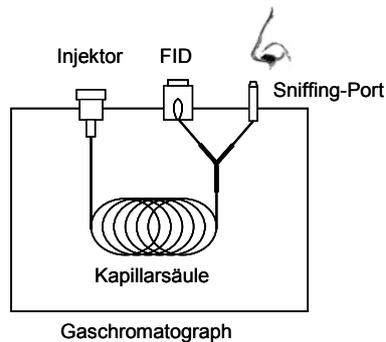


Abbildung 9: Prinzip der Gaschromatographie/Olfaktometrie (GC/O)

Analog dazu wird bei der CHARM-Analyse (Combined Hedonic Response Measurement) von *Acree et al. (1984)* ebenfalls eine schrittweise Verdünnung des Extraktes durchgeführt, wobei jedoch neben der Aromaqualität zusätzlich die Dauer des Geruchseindrucks berücksichtigt wird. Bei beiden Methoden können die Ergebnisse als Chromatogramm veranschaulicht werden, in dem die ermittelten Werte (FD- oder CHARM-Werte) über den Retentionszeiten bzw. -indices aufgetragen werden.

## 3 MATERIAL & METHODEN

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Untersuchungsmaterial

Die roten (*Passiflora edulis* Sims) und gelben Passionsfrüchte (*P. edulis* f. *flavicarpa*) aus Kolumbien wurden auf dem örtlichen Großmarkt erworben. Die gelben Passionsfrüchte aus Thailand wurden über einen Internethändler (www.Tropenkost.de) direkt per Luftfracht geordert. Die Früchte wurden bis zur Aufarbeitung bei 5 °C gelagert.

#### 3.1.2 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

Aceton	Riedel-de Haën 24201
Alkan Standardlösungen C <sub>8</sub> -C <sub>20</sub> / C <sub>21</sub> -C <sub>40</sub>	Fluka 04070 / 04071
Aluminiumoxid (basisch)	Fluka 06290
Buttersäure	Fluka 19210
Buttersäurechlorid	Fluka 19310
( <i>E</i> )-2-Decenal	Fluka 30658
Dichlormethan	Riedel-de Haën 24233
Diethylether	Riedel-de Haën 24004
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck 1.05099
4-Dimethylaminopyridin	Fluka 39405
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Riedel-de Haën 30412
Essigsäure	Fluka 45740
Essigsäurechlorid	Fluka 00990
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich 24194
Heptan	Fluka 51745
2-Heptanol	Fluka 51800
( <i>R</i> )-2-Heptanol	Fluka 07225

---

(S)-2-Heptanol	Sigma-Aldrich 340332
2-Heptanon	Frey&Lau
2-Hexanol	Sigma-Aldrich 128570
Hexansäure	Fluka 21530
Hexansäurechlorid	Fluka 21590
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haën 30407
Kieselgel (Merck 60, 0,063 – 0,200 mm)	Merck 1.07734
Methanol	Merck 1.06018
Methyl- <i>tert</i> -butylether	Oxeno 0080287316
Molekularsieb (3 Å)	Roth 8487.1
Natriumchlorid	ABCR 12313
Natriumhydrogencarbonat	Fluka 71630
Natriumsulfat (wasserfrei)	Merck 1.06649
Natriumtaurocholat	Sigma-Aldrich T4009
2-Nonanol	Fluka 974290
(S)-2-Nonanol	Sigma-Aldrich 557978
Octansäure	Fluka 21650
Octansäurechlorid	Sigma-Aldrich 04733
<i>n</i> -Pentan	Applichem A0641
2-Pentanol	Fluka 76940
(S)-2-Pentanol	Sigma-Aldrich 330515
2-Pentylacetat	Tokyo Chemical Industry Company
Pyridin	Fluka 82704
Salzsäure	Acros Organics 124620025
Stickstoff (flüssig)	Linde

Die zur Extraktion verwendeten Lösungsmittel Diethylether und *n*-Pentan wurden vor Gebrauch über Füllkörperkolonnen destilliert.

### 3.1.3 Synthese von Referenzsubstanzen

Zur Synthese der racemischen Ester wurden 20 mmol des sekundären Alkohols in einem 50 ml-Kolben in 15 ml Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 250 mg 4-Dimethylaminopyridin wurde der Kolben bis zur vollständigen Klärung der Lösung in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wurden 20 mmol Säurechlorid unter Rühren tropfenweise zugegeben und der Kolben dabei in einem Eis-Wasser-Gemisch gekühlt.

Nach 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde langsam 1 ml Methanol zugegeben, um das überschüssige Säurechlorid zu binden. Nach 30-minütigem Rühren wurde die Reaktionslösung mit einer Mischung aus Methyl-*tert*-butylether und Wasser (je 60 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und anschließend mit je 30 ml 2 N Salzsäure (2x), Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die erhaltene Lösung wurde über Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet und am Rotationsverdampfer schonend eingeengt. Der Ester wurde anschließend mittels Vakuum-Destillation oder Fraktionierung an Kieselgel/Aluminiumoxid (siehe 3.2.5.2) abgetrennt.

Zur Synthese der optisch reinen Ester wurden je 0,5 mmol optisch reiner sekundärer Alkohol und das entsprechende Säurechlorid verwendet. Aufgrund der geringen Konzentrationen erfolgte keine Aufreinigung der Ester. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde direkt zur Bestimmung der Elutionsreihenfolge an chiralen stationären Phasen eingesetzt.

### 3.1.4 Enzympräparate

Die Enzympräparate wurden ohne weitere Behandlungen eingesetzt. Die angegebenen Aktivitäten, zum Teil durch unterschiedliche Messmethoden bestimmt, wurden von Herstellerangaben übernommen.

#### Lipasen:

<i>Candida antarctica</i> Lipase B (10,9 U/mg)	Fluka 62288
<i>Candida antarctica</i> Lipase B ( $\geq 10$ U/mg) (immobilisiert auf Acrylharz)	Sigma-Aldrich L4777
<i>Candida antarctica</i> Lipase (2,9 U/mg)	Fluka 62299
<i>Candida cylindracea</i> Lipase (7,29 U/mg)	Fluka 62316
<i>Penicillium roqueforti</i> Lipase (0,65 U/mg)	Fluka 62308
<i>Aspergillus oryzae</i> Lipase (2,5 U/mg)	Fluka 62285
Schweinepankreas Lipase (30 - 90 U/mg)	Sigma-Aldrich L3126

#### Esterasen:

<i>Mucor miehei</i> Esterase (1,1 U/mg)	Fluka 46059
Schweineleber Esterase (0,2 U/mg) immobilisiert auf Eupergit <sup>®</sup> C	Fluka 46064

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 Isolierung und Anreicherung der Aromastoffe

#### 3.2.1.1 Simultane Destillation-Extraktion (SDE)

Zur Isolierung der Aromastoffe wurden 300 g rote Passionsfrucht-Pulpe bzw. 400 g gelbe Passionsfrucht-Pulpe (mit Kernen) mit 750 ml Phosphatpuffer nach Sørensen (pH-Wert 6,8) verdünnt (*Rauen, 1965*). Nach Zugabe des Internen Standards 2-Hexanol (100 µg; in Diethylether/Ethanol abs (4:1; v/v)) wurde die verdünnte Pulpe für 1 Minute gerührt und das Homogenat zur Abtrennung der Kerne durch ein Sieb gepresst. Der gewonnene Saft wurde in einen 2 l Rundkolben überführt und mittels eines Heizpilzes in einer nach *Schultz et al. (1977)* modifizierten SDE-Apparatur zum Sieden erhitzt. Als Extraktionsmittel wurden 200 ml *n*-Pentan/Diethylether (1:1; v/v) in einem 250 ml Rundkolben vorgelegt und ebenfalls mittels eines Heizpilzes erhitzt. Die SDE wurde für 2 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde der gewonnene Extrakt über Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet und an einer Vigreux Kolonne (30 cm x 2 cm I.D.) bei einer Wasserbadtemperatur von ca. 40 °C schonend auf ein Endvolumen von 1 ml eingengt.

#### 3.2.1.2 Vergleich der Isolierungsmethoden

Zur Untersuchung des Einflusses der Isolierungsmethode auf die natürliche Enantiomerenzusammensetzung der chiralen Aromastoffe wurde ein dreifacher Ansatz, wie unter 3.2.1 beschrieben, an roten Passionsfrüchten aufgearbeitet (900 g Pulpe, 2250 ml Phosphatpuffer, 300 µg Interner Standard).

Der gewonnene Saft wurde in drei Aliquote zu je ca. 1000 ml geteilt und ein Aliquot anschließend mittels SDE (siehe 3.2.1.1) extrahiert. Die beiden anderen Aliquote wurden der Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) und der Vakuum Headspace Technik (VHS) unterworfen.

### Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE)

Die Flüssig-Flüssig Extraktion erfolgte in einem Kutscher-Steudel-Extraktor (*Gattermann und Wieland, 1972*) und wurde für 24 Stunden durchgeführt. Als Extraktionsmittel wurden 200 ml *n*-Pentan/Diethylether (1:1; v/v) verwendet, welches in einem 250 ml Rundkolben mittels eines Heizpilzes zum Sieden erhitzt wurde. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet und an einer Vigreux Kolonne (30 cm x 2 cm I.D.) bei einer Wasserbadtemperatur von ca. 40 °C schonend auf ein Endvolumen von 1 ml eingengt.

### Vakuum Headspace Technik (VHS)

Der Passionsfrucht-Saft wurde in einen 2 l Rundkolben überführt und dieser an eine VHS-Apparatur nach *Werkhoff et al. (1998)* mittels eines Wasserbades auf ca. 35 °C temperiert. Es erfolgte eine dreistündige Isolierung der Aromastoffe bei einem Vakuumbereich von 1-10 mbar (Leybold-Heraus Vakuumpumpe, Typ D4A). Das wässrige Destillat wurde in drei Kühlfallen kondensiert, wobei die ersten beiden mit Wasser-Eis-Gemisch und die dritte mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Nach Ablauf des Vorganges und Auftauen der Destillate wurden diese vereinigt und mit 3 x 50 ml *n*-Pentan/Diethylether (1:1; v/v) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet und an einer Vigreux Kolonne (30 cm x 2 cm I.D.) bei einer Wasserbadtemperatur von ca. 40 °C schonend auf ein Endvolumen von 1 ml eingengt.

## **3.2.2 Identifizierung und Quantifizierung der Aromastoffe**

Die flüchtigen Verbindungen der gewonnenen Extrakte wurden mittels Kapillargaschromatographie (siehe 3.2.2.6) und Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (siehe 3.2.2.7) analysiert. Die Identifizierung der sekundären Alkohole und ihrer Ester erfolgte mit Hilfe von Referenzsubstanzen durch Vergleich der massenspektrometrischen und kapillargaschromatographischen (Retentionszeit bzw. Retentionsindex) Daten.

### 3.2.2.1 Bestimmung der Retentionsindices

Zur Bestimmung der Retentionsindices bzw. Kovats-Indices (KI) wurden *n*-Alkane als Standards verwendet, wobei die Retentionszeit der zu identifizierenden Verbindung auf die der *n*-Alkan-Serie bezogen wurde (Kovats, 1958):

$$KI = 100 \times \left[ C + \frac{RT - RT_n}{RT_{n+1} - RT_n} \right]$$

mit	KI	=	Kovats-Index
	RT	=	Retentionszeit der unbekanntten Verbindung
	RT <sub>n</sub>	=	Retentionszeit des <i>n</i> -Alkans
	RT <sub>n+1</sub>	=	Retentionszeit des <i>n</i> +1-Alkans
	C	=	Anzahl der Kohlenstoffatome des <i>n</i> -Alkans

### 3.2.2.2 Bestimmung der FID-Response-Faktoren

Die FID-Response-Faktoren wurden mit Lösungen der Referenzsubstanzen im Vergleich zum Internen Standard 2-Hexanol (jeweils 0,1 µg/µl in Diethylether) bestimmt.

$$Rf_x = \frac{P_s}{P_x}$$

mit	Rf <sub>x</sub>	=	Response-Faktor der Verbindung
	P <sub>x</sub>	=	Peakfläche der Verbindung
	P <sub>s</sub>	=	Peakfläche des IS (2-Hexanol)

### 3.2.2.3 Wiederfindungsversuche

Die Wiederfindungsfaktoren der Referenzsubstanzen wurden in Modellversuchen aus wässrigen Lösungen bestimmt. Hierzu wurden zunächst Stammlösungen der Referenzsubstanzen zusammen mit dem Internen Standard 2-Hexanol in einer Konzentration von 1µg/µl in Diethylether/Ethanol abs (4:1; v/v) hergestellt. Um Überlappungen bei der gaschromatographischen Auswertung zu vermeiden,

wurden die Substanzen auf zwei Stammlösungen verteilt: Stammlösung 1 enthielt die 2-Alkanole und 2-Heptylester und Stammlösung 2 die 2-Pentyl- und 2-Nonylester. Zur Bestimmung der Wiederfindungen aus den Originallösungen wurden jeweils 100 µl der Stammlösungen mit 900 µl *n*-Pentan/Diethylether (1:1; v/v) verdünnt und direkt zur kapillargaschromatographischen Analyse eingesetzt. Zur Bestimmung der Wiederfindungen nach der Isolierung wurden jeweils 100 µl der Stammlösungen mit 900 ml Phosphat-Puffer (pH 6,8) vermischt und mittels SDE extrahiert (wie unter 3.2.1.1 beschrieben).

Die Wiederfindungsfaktoren (Wf) der untersuchten Verbindungen wurden mit Wf-Werten des Internen Standards korrigiert und nach folgender Formel ausgewertet:

$$Wf_{rX} = \frac{P_{Xi} \cdot P_{SO}}{P_{XO} \cdot P_{Si}}$$

mit	$Wf_{rX}$	=	Relativer Wiederfindungsfaktor der Verbindung
	$P_{Xi}$	=	Peakfläche der Verbindung nach der Isolierung
	$P_{XO}$	=	Peakfläche der Verbindung in der Originallösung
	$P_{Si}$	=	Peakfläche des IS nach der Isolierung
	$P_{SO}$	=	Peakfläche des IS in der Originallösung

#### 3.2.2.4 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach der von *Hädrich und Vogelgesang (1999a, b)* beschriebenen Methode ermittelt. Hierzu wurden einer analytfreien Matrix (Diethylether) die Referenzsubstanzen in fünf verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (0,5-10 µg/kg) und jede Verdünnung in einer Zweifachbestimmung kapillargaschromatographisch untersucht. Nach Auftragen der erhaltenen Peakflächen über den zugegeben Konzentrationen wurden für jede Referenzsubstanz basierend auf die resultierende Kalibriergerade die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach folgenden Formeln berechnet:

Aus der Kalibriergeraden:  $y = a + bx$

errechnete sich die Reststandardabweichung ( $s_y$ ):

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n-2}}$$

mit  $a$  = y-Achsenabschnitt  
 $b$  = Steigung  
 $y_i$  = Peakfläche der Probe i  
 $x_i$  = Konzentration der Probe i  
 $n$  = Anzahl der Messwerte

Hieraus ergaben sich die Nachweisgrenze (NG):

$$NG = \frac{s_y}{b} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{n}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

und die Bestimmungsgrenze (BG):

$$BG = \left[ \left( \bar{y} + b(EG - \bar{x}) + s_y \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(EG - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \right) - a \right] / b$$

mit  $t_{f,\alpha}$  = 1,860 (Quantil der t-Verteilung für f=n-2 Freiheitsgrade und 95 % Wahrscheinlichkeit)  
 $\bar{x}$  = Arithmetisches Mittel aller zugesetzter Konzentrationen  
 $\bar{y}$  = Arithmetisches Mittel aller erhaltenen Peakflächen  
 $EG$  = 2 x NG

### 3.2.2.5 Quantitative Bestimmung

Die Quantifizierung der Aromastoffe erfolgte über die Peakflächen der Substanzen und die des zugesetzten Internen Standards 2-Hexanol. Vorversuche hatten gezeigt, dass 2-Hexanol kein natürlicher Bestandteil in roten und gelben Passionsfrüchten ist. Zudem wurden in die Berechnung die zuvor bestimmten FID-Response-Faktoren und die Wiederfindungsfaktoren miteinbezogen:

$$C_x = \frac{P_x \cdot Rf_x \cdot M_s \cdot W_{fs}}{P_s \cdot M \cdot Wf_{rx}}$$

mit  $C_x$  = Konzentration der Verbindung ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  
 $Rf_x$  = FID-Response-Faktor der Verbindung  
 $P_x$  = Peakfläche der zu quantifizierenden Verbindung  
 $P_s$  = Peakfläche des Internen Standards  
 $M_s$  = Masse an zugesetztem Internem Standard ( $\mu\text{g}$ )  
 $M$  = Masse an eingesetzten Passionsfrüchten (kg)  
 $W_{fs}$  = Wiederfindungsfaktor des Internen Standards  
 $Wf_{rx}$  = Relativer Wiederfindungsfaktor der Verbindung

Tabelle 3 zeigt zusammenfassend die zur Quantifizierung der sekundären Alkohole und ihrer Ester ermittelten Wiederfindungen und FID-Response-Faktoren (Rf).

Tabelle 3: Wiederfindungen (%) und FID-Responsefaktoren (Rf) der quantifizierten Verbindungen

Verbindung	Wiederfindung (%)			Rf
<b>Alkohole</b>				
2-Pentanol	94,7	±	0,5	1,09
2-Heptanol	103,7	±	0,1	1,00
2-Nonanol	112,4	±	1,4	0,85
<b>Ester</b>				
2-Pentylacetat	57,5	±	4,7	1,12
2-Pentylbutanoat	44,0	±	5,2	1,07
2-Pentylhexanoat	64,3	±	2,5	1,00
2-Pentyl-octanoat	105,6	±	3,3	1,02
2-Heptylacetat	42,8	±	5,5	1,08
2-Heptylbutanoat	52,2	±	2,4	0,99
2-Heptylhexanoat	96,6	±	5,3	1,03
2-Heptyl-octanoat	106,4	±	1,1	1,04
2-Nonylacetat	82,1	±	4,1	1,02
2-Nonylbutanoat	104,9	±	2,8	0,90
2-Nonylhexanoat	105,9	±	2,6	0,90
2-Nonyl-octanoat	103,1	±	3,2	0,96
2-Hexanol (IS)	77,0	±	6,6	1,00

### 3.2.2.6 Kapillargaschromatographie (HRGC-FID)

#### GC-SYSTEM 1

Gerät:	Carlo Erba Mega II 8575 (C.E. Instruments)
Kapillarsäule:	DB-WAX (60 m; 0,32 mm I.D.; 0,25 µm F.); J&W Scientific
Temperaturprogramm:	40 °C/5 min//4 °C/min//230 °C/25 min
Trägergas:	H <sub>2</sub> (110 kPa)
Injektor:	Splitinjektion (215 °C); Splitfluss 30 ml/min; Splitverhältnis ca. 1:10
Detektoren:	FID (230 °C) und FPD (140 °C) Effluentsplit via press-fit T-Stück ca. 1:1

### 3.2.2.7 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

#### GC-SYSTEM 2

Gerät:	GC 8000 <sup>Top</sup> -Voyager (ThermoFinnigan)
Kapillarsäule:	DB-WAX-ETR (30 m; 0,25 mm I.D.; 0,5 µm F.); J&W Sci.
Temperaturprogramm:	40 °C/5 min//4 °C/min//240 °C/25 min
Trägergas:	He (75 kPa)
Injektor:	Splitinjektion (220 °C); Splitfluss 30 ml/min; Splitverhältnis ca. 1:10
Quadrupol-Massenfilter im EI-Modus	
Ionisationsenergie:	70 eV
MS-Source Temp.:	200 °C
MS-Interface Temp.:	240 °C

### 3.2.3 Untersuchung natürlicher Enantiomerenzusammensetzungen

#### 3.2.3.1 Bestimmung kapillargaschromatographischer Kenngrößen

Zur Charakterisierung der Trennleistung der verwendeten chiralen stationären Phasen wurden drei Kenngrößen herangezogen (*Gottwald, 1995*):

Der Kapazitätsfaktor  $k$  beschreibt die Retention einer Verbindung und ist somit ein Maß für die Aufenthaltsdauer der Enantiomere in der stationären Phase. Er ist umgekehrt proportional zur Säulentemperatur und steigt so z.B. bei Senkung der Säulentemperatur.

$$k_1 = \frac{t_1 - t_0}{t_0} \quad \text{und} \quad k_2 = \frac{t_2 - t_0}{t_0}$$

- mit  $t_1$  = Bruttoretentionszeit des zuerst eluierenden Enantiomers  
 $t_2$  = Bruttoretentionszeit des später eluierenden Enantiomers  
 $t_0$  = Totzeit (Retentionszeit einer nicht zurückgehaltenen Komponente)

Der Trennfaktor  $\alpha$  ist ein Maß für die Selektivität oder die relative Peaktrennung im chromatographischen System. Je größer die Selektivität, desto besser wurden die beiden Enantiomere voneinander getrennt. Ist  $\alpha = 1$ , liegt keine Trennung vor.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{mit} \quad k_2 = \text{Kapazitätsfaktor des später eluierenden Enantiomers} \\ k_1 = \text{Kapazitätsfaktor des zuerst eluierenden Enantiomers}$$

Ein weiteres Maß für die Trennung zweier Enantiomere ist die Auflösung  $R$ , welche die „Überlappung“ der Peaks beschreibt.

$$R = 1,177 \times \left( \frac{t_2 - t_1}{w_{b1} + w_{b2}} \right) \quad \text{mit} \quad t = \text{Retentionszeit der Enantiomere} \\ w_b = \text{Peakbreite bei halber Höhe}$$

Generell wird bei einer Auflösung von  $R \geq 1,3$  eine Basislinientrennung der zu trennenden Enantiomere beobachtet.

### GC-SYSTEM 3

Gerät:	Carlo Erba 5160 Mega Series (C.E. Instruments)
Kapillarsäule:	(I) Heptakis(2,3-di-O-methyl-6- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl)- $\beta$ -CD in SE54 (25 %; 30 m; 0,32 mm I.D.; 0,25 $\mu$ m F.) (II) Oktakis(2,3-di-O-methoxymethyl-6- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl)- $\gamma$ -CD in OV-1701vi (33 %; 30 m; 0,25 mm I.D.; 0,25 $\mu$ m F.)
Temperaturprogramm:	40 °C/2 min//2 °C/min//200 °C/10 min
Trägergas:	H <sub>2</sub> (110 kPa)
Injektor:	Splitinjektion (220 °C) Splitfluss 30 ml/min; Splitverhältnis ca. 1:15
Detektor:	FID (230 °C)

#### **3.2.3.2 Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC)**

Für die Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen der Aromastoffe wurde ein „multidimensionales“ Gaschromatographiesystem verwendet, das aus zwei gekoppelten Gaschromatographen (GC 8000 Series) bestand und mit einem *Moving Column Stream Switching System* (MCSS) ausgestattet war (Abbildung 10).

Im Glasdom befinden sich neben den Kapillaren (zum Monitordetektor bzw. Restriktionskapillare) das Ende der achiralen Vorsäule und der Anfang der chiralen Hauptsäule. In der Entkopplungsphase fließt das Eluat der Vorsäule zum Monitordetektor des ersten Ofens. Wird die Vorsäule durch eine Verschiebeeinrichtung zum Eingang der Hauptsäule geschoben, wird das Eluat auf die chirale Hauptsäule zum Hauptdetektor geleitet („Cut-Zeit“).

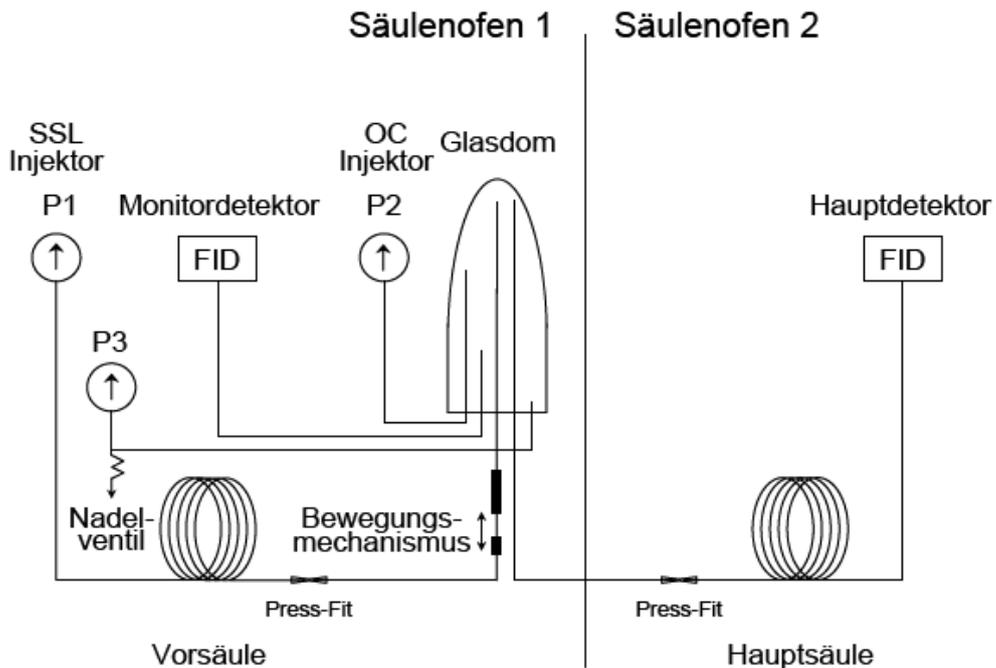


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Multidimensionalen Gaschromatographen mit MCSS

## GC-SYSTEM 4

### Säulenofen 1

Vorsäule	(I) DBWAX (60 m; 0,32 mm I.D.; 0,25 µm F.); J&W Scientific (II) DB-5 (60 m; 0,32 mm I.D.; 0,25 µm F.); J&W Scientific
Temperaturprogramm:	40 °C/5 min//4 °C/min//230 °C/25 min
Trägergas:	H <sub>2</sub> (165 kPa)
Injektor:	Splitinjektion (215 °C) Splitfluss 30 ml/min; Splitverhältnis ca. 1:15
Detektor:	FID (230 °C)

### Säulenofen 2

Hauptsäule:	Heptakis(2,3-di-O-methyl-6- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-β-CD in SE54 (25 %; 30 m; 0,32 mm I.D.; 0,25 µm F.)
Temperaturprogramm:	37 °C/10 min//2 °C/min//200 °C/15 min
Trägergas:	H <sub>2</sub> (98 kPa)
Detektor:	FID (200 °C)

Das Cyclodextrinderivat wurde nach *Schmarr (1992)* synthetisiert und charakterisiert. Die verwendete Kapillarsäule wurde analog zu den von *Grob (1986)* beschriebenen Verfahren hergestellt.

Die Untersuchung der kompletten Serie an sekundären Alkoholen und 2-Alkylestern erfolgte durch vier Kombinationen an „Cut-Fenstern“:

<u>Kombination</u>	<u>Verbindung</u>	<u>Cut-Fenster (min)</u>
(I)	2-Pentanol	12,18 - 12,35
	2-Heptanol	20,08 - 20,21
(II)	2-Heptylacetat	17,81 - 17,95
	2-Heptylbutanoat	22,93 - 23,08
	2-Heptylhexanoat	29,38 - 29,57
	2-Heptyloctanoat	35,37 - 35,51
	2-Nonylhexanoat	35,37 - 35,51
(III)	2-Pentylbutanoat	15,81 - 15,99
	2-Pentylhexanoat	23,14 - 23,22
	2-Nonylacetat	24,86 - 25,00
(IV)	2-Pentylacetat	10,34 - 10,49
	2-Pentylloctanoat	29,66 - 30,16
	2-Nonylbutanoat	29,66 - 30,16

### 3.2.3.3 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des MDGC-Transfers wurden nach der von *Hädrich und Vogelgesang (1999a, b)* beschriebenen Methode bestimmt. Hierzu wurden fünf Konzentrationen (0,5-3 µg/kg) in Zweifachbestimmung kapillargaschromatographisch untersucht und analog zu 3.2.2.4 ausgewertet.

### 3.2.4 Enzymkatalysierte kinetische Racematspaltungen

#### 3.2.4.1 Parameter

Der Enantiomerenüberschuss ee (*enantiomeric excess*) beschreibt die optische Reinheit des gebildeten Produktes oder des verbliebenen Substrates, also inwieweit ein Enantiomer im Vergleich zum anderen vorliegt. Eine optisch reine Substanz hat demnach einen Enantiomerenüberschuss von 100 %, ein Racemat von 0 % (*Chen et al., 1982b; Ghanem und Aboul-Enein, 2005*).

$$ee = \frac{P_1 - P_2}{P_1 + P_2} \times 100$$

mit  $P_1$  = Peakfläche des Enantiomers mit höherer Konzentration

$P_2$  = Peakfläche des Enantiomers mit geringerer Konzentration

Die Berechnung der Umsatzrate U erfolgte über drei verschiedene Methoden:

#### Berechnung mit Internem Standard:

Der prozentuale Gehalt an synthetisiertem Produkt wurde über die Bestimmung des nicht umgesetzten Substrates unter Berücksichtigung des Internen Standards (IS; 2-Heptanon) erhalten. Dies erfolgte auf Basis der kapillargaschromatographisch ermittelten Peakflächen (GC-SYSTEM 1) und der jeweiligen FID-Response-Faktoren.

$$c[\%] = \frac{S_x \cdot Rf_S / IS_x \cdot Rf_{IS}}{S_0 \cdot Rf_S / IS_0 \cdot Rf_{IS}} \times 100$$

und

$$U [\%] = 100 - c$$

mit  $c$  = verbliebene Substratmenge zum Zeitpunkt  $t_x$

$S_0$  = Peakfläche des Substrates zum Zeitpunkt  $t_0$

$S_x$  = Peakfläche des Substrates zum Zeitpunkt  $t_x$

$Rf_S$  = Response-Faktor des Substrates

$Rf_{IS}$  = Response-Faktor des IS

$IS_0$  = Peakfläche des IS zum Zeitpunkt  $t_0$

$IS_x$  = Peakfläche des IS zum Zeitpunkt  $t_x$

Berechnung über Enantiomerenüberschüsse (Chen et al., 1982b):

Ausgehend von einem **racemischem Substrat** wurde die Umsatzrate der Reaktion auf Basis der Enantiomerenüberschüsse des Substrates ( $ee_S$ ) und des gebildeten Produktes ( $ee_P$ ) berechnet (GC-SYSTEM 3).

$$U [\%] = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P} \times 100$$

mit  $ee_S$  = Enantiomerenüberschuss des nicht umgesetzten Substrates  
 $ee_P$  = Enantiomerenüberschuss des Produktes

Berechnung über Peakflächenverhältnisse (Chen et al., 1982b):

Ausgehend von einem **optisch angereicherten Substrat** wurde die Umsatzrate der Reaktion über die Peakflächen der Substrat-Enantiomere und der entsprechenden Produkte ermittelt (GC-SYSTEM 3).

$$U [\%] = 1 - \frac{A + B}{(A + P) + (B + Q)} \times 100$$

mit A = Peakfläche des schneller reagierenden Substrat-Enantiomers  
 B = Peakfläche des langsamer reagierenden Substrat-Enantiomers  
 P = Peakfläche des Produktes aus Substrat A  
 Q = Peakfläche des Produktes aus Substrat B

Die Enantioselektivität E stellt ein Maß für die Fähigkeit eines Enzyms dar, zwischen zwei Enantiomeren zu unterscheiden, die um die gleiche Bindungsstelle des Enzyms konkurrieren. Nicht enantioselektive Reaktionen haben einen E-Wert von 1. Umsetzungen mit  $E > 20$  sind nach *Bornscheuer und Kazlauskas (2006)* nützliche Synthesen. E-Werte, die größer als 100 sind, können nicht mehr exakt angegeben werden, da aufgrund der logarithmischen Funktion bereits kleine Änderungen der gemessenen Enantiomerenüberschüsse zu großen Änderungen des resultierenden E-Werts führen.

*Chen et al. (1982b)* entwickelten ein kinetisches Modell, mit dem die Enantioselektivität einer enzymkatalysierten Racematspaltung berechnet werden kann. Voraussetzungen für die Gültigkeit der angegebenen Formeln sind, dass ein Substrat zu genau einem Produkt umgesetzt wird, dass die Reaktion praktisch irreversibel abläuft und dass keine Produkthemmung vorliegt:

*Berechnung über Umsatzrate und Enantiomerenüberschuss des Substrates:*

$$E = \frac{\ln[(1-U) \times (1-ee_S)]}{\ln[(1-U) \times (1+ee_S)]}$$

mit U = Umgesetzte Substratmenge  
ee<sub>S</sub> = Enantiomerenüberschuss des Substrates

*Berechnung über Umsatzrate und Enantiomerenüberschuss des Produktes:*

$$E = \frac{\ln[(1-U) \times (1+ee_P)]}{\ln[(1-U) \times (1-ee_P)]}$$

mit U = Umgesetzte Substratmenge  
ee<sub>P</sub> = Enantiomerenüberschuss des Produktes

Da Enantiomerenüberschüsse im Gegensatz zu Umsatzraten oft genauer bestimmt werden können, wird die Berechnung nach *Rakels et al. (1993)* über die Enantiomerenüberschüsse von Substrat und Produkt als die präziseste angesehen (*Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*):

*Berechnung über Enantiomerenüberschüsse von Substrat und Produkt:*

$$E = \frac{\ln\left[\frac{1-ee_S}{1+(ee_S/ee_P)}\right]}{\ln\left[\frac{1+ee_S}{1+(ee_S/ee_P)}\right]}$$

mit ee<sub>S</sub> = Enantiomerenüberschuss des Substrates  
ee<sub>P</sub> = Enantiomerenüberschuss des Produktes

### 3.2.4.2 Enzymkatalysierte Veresterungen und Enzymscreening

Zum Enzymscreening und zur Synthese der Ester im Mikromaßstab wurden je 200 µmol Säure und 200 µmol Alkohol in ein mit Rührfisch bestücktes Schraubglas gegeben und in 1000 µl Heptan (getrocknet auf Molekularsieb) gelöst. Nach Zugabe von 200 µmol Internem Standard (2-Heptanon) wurde das Gemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt (250 rpm).

Der Start der Synthese erfolgte durch die Zugabe des jeweiligen Enzyms. Die dabei eingesetzten Mengen richteten sich nach der Aktivität des Enzyms in U/mg und entsprachen einer Aktivität von etwa 80 Units.

Nach 0, 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden jeweils 5 µl Probe entnommen, mit 500 µl Diethylether verdünnt und mit Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet. Die Beendigung der Reaktion erfolgte durch Abfiltrieren des Enzyms mittels Einmalspritzenfiltersystem. 1 µl wurde zur GC-Analyse verwendet (GC-SYSTEM 1 und GC-SYSTEM 3).

### 3.2.4.3 Enzymkatalysierte Hydrolysen

#### Im Puffersystem:

In ein Schraubgläschen mit Rührfisch und 1 ml Kaliumphosphat-Puffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 50mM; pH 7,4) wurden 200 µmol des zu hydrolysierenden racemischen Esters pipettiert und das Gemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt. Vor der Enzymzugabe wurde ein Aliquot von 5 µl für die Nullprobe entnommen. Der Start der Hydrolyse erfolgte durch die Zugabe von 80 Units immobilisierter *Candida antarctica* Lipase B (CALB imm). Im Verlauf der Reaktion wurden nach 1, 2, 4, und 8 Stunden je 20 µl entnommen, mit 1000 µl Pentan/Diethylether-Gemisch (1:1) extrahiert und die organische Phase mit Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet. 0,5 µl wurden zur GC-Analyse (GC-SYSTEM 3) verwendet.

#### In Natrium-Taurocholat-Lösung:

Hierzu wurden die enzymkatalysierten Hydrolysen statt in reinem Kaliumphosphat-Puffer in einem Kaliumphosphat-Puffer/Natrium-Taurocholat-Lösung - Gemisch (1:1) durchgeführt. Dazu wurden in zwei parallelen Ansätzen eine 12 mmol bzw. 24 mmol Natrium-Taurocholat-Lösung verwendet. In ein Schraubgläschen mit Rührfisch und 1ml des entsprechenden Puffer-Gemischs wurden 200 µmol Ester pipettiert, 15 Minuten gerührt und anschließend ein Aliquot von 20 µl für die Nullprobe entnommen. Nach der Zugabe von 80 Units CALB imm wurde nach 8 Stunden Reaktionszeit erneut eine Probe von 20 µl entnommen. Die Proben wurden analog zu den Hydrolysen in reinem Puffersystem (s.o.) weiterbehandelt und analysiert.

### **3.2.5 Präparative Gewinnung optisch reiner Ester**

#### **3.2.5.1 Kinetische Racematspaltung**

Zur präparativen Gewinnung der optisch reinen Ester wurden je 15 mmol sekundärer Alkohol sowie Säure in einen mit Rührfisch bestückten 100 ml Rundkolben pipettiert und in 75 ml Pentan (getrocknet auf Molekularsieb) gelöst. Das Gemisch wurde anschließend bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt. Die Synthese wurde durch Zugabe von 300 Units CALB imm gestartet. Vor der Enzymgabe und zur Kontrolle des Umsatzes während der Veresterung (nach 24 bzw. 48 Stunden) wurde ein Aliquot von 5 µl entnommen, in 500 µl Diethylether verdünnt und mit Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet. 1 µl wurde zur GC-Analyse (GC-SYSTEM 3) verwendet.

Die Reaktion wurde bei einem Umsatz von mindestens 45 % durch Abfiltrieren des Enzyms über einen Rundfilter gestoppt und das Enzym mit Pentan nachgewaschen. Das Filtrat wurde anschließend mit Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet und schonend an einer Vigreux-Kolonne (~ 35 °C Wasserbadtemperatur) auf ca. 5 ml eingeeengt.

### 3.2.5.2 Säulenchromatographische Trennung

Das eingeeengte Filtrat wurde auf eine mit Kieselgel/Aluminiumoxidgemisch (basisch) [1:1] befüllte Trennsäule gegeben. Das Kieselgel wurde zuvor bei 90 °C für 1 Stunde im Trockenschrank getrocknet. Zur Elution wurden folgende Fließmittelgemische verwendet:

(Ia) Pentan/ Dichlormethan (2:1)	300 ml	→ enthaltene Substanz: Ester
(Ib) Pentan/ Diethylether (9:1)	150 ml	→ enthaltene Substanz: Ester
(II) Diethylether	350 ml	→ enthaltene Substanz: Alkohol

Die im Reaktionsgemisch enthaltene Säure wurde durch Adsorption an Aluminiumoxid abgetrennt. Die Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer enthaltenen Substanzen kapillargaschromatographisch untersucht (GC-SYSTEM 2). Zudem erfolgte eine Bestimmung der Alkohol-Konzentration mit Hilfe von zuvor erstellten Kalibriergeraden (0,8-8 µg/µl).

### 3.2.5.3 Wiederveresterung

Die Alkohol enthaltende Fraktion wurde an einer Vigreux- Kolonne schonend auf ca. 3 ml eingeeengt, anschließend in einen 100 ml Rundkolben überführt und in ca. 40 ml Pentan (getrocknet auf Molekularsieb) verdünnt. Nach Zugabe der äquimolaren Menge Säure wurde das Gemisch bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt. Die Synthese wurde durch Zugabe von 8000 Units *Candida cylindracea* Lipase (CCL) gestartet. Vor der Enzymgabe und zur Kontrolle des Umsatzes während der Veresterung wurde (zu definierten Zeitabschnitten) ein Aliquot von 5 µl entnommen, in 500 µl Diethylether verdünnt und mit Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet. 1 µl davon wurde zur GC-Analyse (GC-SYSTEM 3) verwendet.

Die Veresterung wurde bei Erreichen des Reaktionsplateaus durch Abfiltrieren des Enzyms über einen Rundfilter gestoppt und das Enzym mit Pentan nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend schonend an einer Vigreux-Kolonne (~ 35 °C Wasserbadtemperatur) auf ca. 5 ml

eingengt. Anschließend erfolgte die säulenchromatographische Auftrennung an Kieselgel/Aluminiumoxidgemisch (basisch) [1:1] (siehe 3.2.5.2).

#### 3.2.5.4 Gewinnung der (R)- und (S)-Ester

Die (R)-Ester bzw. (S)-Ester enthaltende Fraktion wurden an einer Vigreux-Kolonnen schonend auf ca. 5 ml eingengt. Anschließend wurde das noch vorhandene Lösungsmittel unter Stickstoff bis zur Gewichtskonstanz abgeblasen und die Ausbeute an Ester gravimetrisch bestimmt.

Lösungen mit einer Konzentration von 1 µg/µl in Diethylether wurden zur Bestimmung der chemischen Reinheit (GC-SYSTEM 1) und optischen Reinheit (GC-SYSTEM 3) verwendet.

#### 3.2.5.5 Bestimmung der optischen Drehwinkel

Die optischen Drehwinkel wurden mit einem Polarimeter der Firma Schmidt & Haensch (Model Polartronic-E) in einer 2 dm-Messröhre mit Blasenfang gemessen. Als Strahlungsquelle diente eine Natriumdampfampe ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ). Die Messungen der Ester ( $c = 3 \text{ g}/100 \text{ ml}$  in Aceton) erfolgten bei einer Temperatur von 23-24 °C.

Die Berechnung der spezifischen Drehwinkel  $[\alpha]_D$  erfolgte nach folgender Formel (Rücker, 1992):

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha}{c \cdot l} \times 100$$

mit  $\alpha$  = gemessener Drehwinkel [°]  
 $c$  = Konzentration der Lösung [g/100ml]  
 $l$  = Schichtdicke [dm]

### 3.2.6 Sensorische Bewertung

#### 3.2.6.1 Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie (HRGC/O)

Zur sensorischen Bewertung der Aromastoffe wurde die Aromaextraktverdünnungsanalyse angewandt (*Ullrich und Grosch, 1987*). Hierzu wurden Stammlösungen des Standards (*E*)-2-Decenal (1 µg/µl), der Racemate (2-Pentylacetat, 2-Pentylbutanoat, 2-Heptylacetat: 130 µg/µl; 2-Pentylhexanoat, 2-Heptylbutanoat: 100 µg/µl) und der (*R*)-Ester (65 µg/µl) in Diethylether hergestellt und stufenweise im Verhältnis 1:1 mit Lösungsmittel verdünnt. Die Lösungen wurden mittels Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie sensorisch analysiert. Es erfolgte die Ermittlung der Aromaqualitäten sowie der Verdünnungsstufen *n*, bei der ein Geruch gerade noch wahrnehmbar war. Hierbei wurden die einzelnen Verdünnungen mindestens dreimal abgerochen und der Geruch als „wahrgenommen“ akzeptiert, wenn bei der Prüfung mindestens dreimal eine positive Bewertung abgegeben wurde. Aus der ermittelten höchsten Verdünnungsstufe *n* wurde der Flavour Dilution Factor (FD) berechnet:

$$FD = 2^n$$

Aus den ermittelten FD-Faktoren für Aromastoff und Standard wurden nach *Ullrich und Grosch (1987)* die Geruchsschwellen berechnet:

$$O_x = \frac{O_s \cdot C_x \cdot FD_s}{C_s \cdot FD_x}$$

- mit
- $O_x$  = Geruchsschwelle der Substanz [ng/l Luft]
  - $O_s$  = Geruchsschwelle des Standards (*E*)-2-Decenal (2,7 ng/l Luft (*Boelens und van Gemert, 1986*))
  - $C_x$  = Konzentration der Substanz [µg/µl]
  - $C_s$  = Konzentration von (*E*)-2-Decenal [µg/µl]
  - $FD_x$  = FD Faktor der Substanz
  - $FD_s$  = FD Faktor des Standards

GC-SYSTEM 5

Gerät:	Carlo Erba Fractovap 4200 (C.E. Instruments)
Kapillarsäule:	DB-WAX (55 m; 0,32 mm I.D.; 0.25 µm F.); J&W Scientific
Temperaturprogramm:	
(E)-2-Decenal:	120 °C isotherm
2-Pentylester:	60 °C/5 min//5 °C/min
2-Heptylester:	60 °C/5 min//5 °C/min
2-Nonylester:	100 °C/5 min//5 °C/min
Trärgas:	H <sub>2</sub> (100 kPa)
Injektor:	Splitinjektion (215 °C); Splitfluss 30 ml/min; Splitverhältnis ca. 1:10
Detektor:	FID (230 °C)
Sniffing-Port:	Passiv geteilte Verlängerung der Detektorbasis (230 °C); zusätzliche Einspeisung von N <sub>2</sub> als Make-up Gas (50 kPa)

GC-SYSTEM 6

Gerät:	HP5890 Series II
Kapillarsäule:	Oktakis(2,3-di-O-methoxymethyl-6- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl)- γ-CD in OV-1701vi (50 %; 30 m; 0,25 mm I.D.; 0,25 µm F.)
Temperaturprogramm:	
(E)-2-Decenal:	40 °C/5 min//10 °C/min
2-Pentylacetat:	40 °C/5 min//10 °C/min
2-Pentylbutanoat:	40 °C/2 min//10 °C/min//70 °C/15 min
2-Pentylhexanoat:	40 °C/2 min//10 °C/min//90 °C/15 min
2-Heptylacetat:	40 °C/2 min//10 °C/min//70 °C/15 min
2-Heptylbutanoat:	40 °C/2 min//10 °C/min//90 °C/15 min
Trärgas:	H <sub>2</sub> (100 kPa)
Injektor:	On-column-Injektion (40 °C)
Detektor:	FID (220 °C)
Sniffing-Port:	Passiv geteilte Verlängerung der Detektorbasis (200 °C); zusätzliche Einspeisung von N <sub>2</sub> als Make-up Gas (100 kPa)

Das Cyclodextrinderivat wurde nach *Takahisa et al. (2005a)* synthetisiert und charakterisiert. Die verwendete Kapillarsäule wurde analog zu den von *Grob (1986)* beschriebenen Verfahren hergestellt.

### 3.2.6.2 Sensorische Bewertung in Wasser (orthonasal)

Die Prüfgruppe bestand aus insgesamt 18 Nichtrauchern in einem Alter von 22 bis 60 Jahren, wobei 6 männlich und 12 weiblich waren. An den Einzeltests nahmen jeweils mindestens 12 Panelisten teil.

Zur Bestimmung der Geruchsschwellen wurde die Methodik der Dreiecksprüfung (Triangeltest) verwendet. Der Test beinhaltet die Aufgabe, aus drei Lösungen, von denen zwei identisch sind, die abweichende Probe zu erkennen.

Hierzu wurden Stammlösungen der Ester in Wasser hergestellt (100 mg/l) und diese stufenweise im Verhältnis 1:1 verdünnt. 10 ml der zu testenden Lösungen wurden in mit Glasdeckeln verschließbare Verkostungsgläser gefüllt. Dem Prüfer lagen 6 Reihen mit aufsteigender Konzentration vor, wobei eine Reihe aus zwei Gläsern Wasser und einem Glas mit Probenlösung bestand. Die Tests wurden in einem gut belüfteten Raum bei Tageslicht durchgeführt und die Temperatur der Proben entsprach der Raumtemperatur. Es wurde die „Forced-Choice“-Technik angewandt, wonach die Prüfpersonen auch bei Nicht-Wahrnehmung eines Unterschieds eine Angabe machen mussten. Um Zufallstreffer auszuschließen, wurde bei der Auswertung diejenige Probe als erste Richtige gewertet, ab der jede weitere in der Verdünnungsreihe richtig erkannt wurde.

Die Berechnung der Geruchsschwellenwerte  $G$  erfolgte nach dem in der Literatur beschriebenen Verfahren (*Meilgaard et al., 2006*):

$$G = \sqrt{c_e \cdot c_{e-1}} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} G = \text{Geruchsschwelle der einzelnen Prüfperson} \\ c_e = \text{Konzentration der ersten wahrgenommenen Probe (g/l)} \\ c_{e-1} = \text{Konzentration der vorangegangenen Probe (g/l)} \end{array}$$

Für die Ermittlung der Geruchsschwellenwerte der Prüfgruppe wurde das geometrische Mittel herangezogen:

$$\bar{G} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n G_i} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} \bar{G} = \text{Geruchsschwelle der Prüfgruppe} \\ n = \text{Anzahl der Prüfpersonen} \\ G_i = \text{Geruchsschwelle der einzelnen Prüfpersonen} \\ \prod = \text{Produkte der Geruchsschwellen der einzelnen Prüfer} \end{array}$$

### 3.2.6.3 Sensorische Bewertung in Wasser (retronasal)

Zur Bestimmung der retronasalen Geruchsqualitäten wurden zunächst 1 %-ige Lösungen der Ester in Ethanol hergestellt. Diese wurden in Konzentrationen von 5 mg/l (Acetate) bzw. 10 mg/l (Butanoate, Hexanoate, Octanoate) in 5 %-iger Zuckerlösung (Vittel) als Testmedium den Teilnehmern zur Verkostung angeboten. Die drei codierten Lösungen eines Esters (Racemat, (*R*)-, und (*S*)-Ester) wurden in einer Reihe gegeneinander verglichen. Die sensorische Bewertung der Acetate und Butanoate wurde von 5 Prüfern (davon 4 Flavoristen), der Hexanoate und Octanoate von 3 Prüfern (davon 2 Flavoristen) durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE & DISKUSSION

### 4.1 ANALYTIK VON 2-ALKYLESTERN IN PASSIONSFRÜCHTEN

#### 4.1.1 Einleitung

1983 wurde von *Engel und Tressl* in einem umfangreichen Vergleich der Passionsfrucht-Varietäten gezeigt, dass die Gruppe der 2-Alkylester zur Differenzierung zwischen roten und gelben Passionsfrüchten geeignet ist. Während die Acetate, Butanoate, Hexanoate und Octanoate der ungeradzahlig sekundären Alkohole 2-Pentanol, 2-Heptanol und 2-Nonanol Hauptkomponenten in roten Früchten darstellten, konnten sie in der gelben Varietät nicht oder lediglich als Spurenkomponenten (*Chen et al., 1982a; Werkhoff et al., 1998*) nachgewiesen werden. Die freien sekundären Alkohole 2-Pentanol und 2-Heptanol wurden als Minorkomponenten in beiden Varietäten identifiziert.

Die natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen der chiralen sekundären Alkohole wurden mittels indirekter Methode (kapillargaschromatographische Trennung der diastereomeren (*R*)-(+)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluormethylphenyllessigsäure-Ester) bestimmt (*Tressl und Engel, 1985*). Es wurde gezeigt, dass die freien Alkohole 2-Pentanol und 2-Heptanol in gelben Passionsfrüchten vorwiegend als (*S*)-Enantiomere vorliegen, während in der roten Varietät (*R*)-2-Heptanol dominiert. Für das aus 2-Heptylestern roter Früchte durch alkalische Hydrolyse freigesetzte 2-Heptanol wurde ebenfalls (*R*)-Konfiguration bestimmt.

Die für die damalige Zeit übliche indirekte Methode der Enantiomerentrennung basierte auf der Derivatisierung der chiralen Verbindungen zu Diastereomeren und beinhaltete für die Untersuchung der 2-Heptylester folgende Aufarbeitungsschritte: (I) säulenchromatographische Abtrennung der Esterfraktion aus dem Passionsfrucht-Extrakt, (II) alkalische Verseifung der Esterfraktion, (III) Anreicherung des freigesetzten Alkohols durch präparative Gaschromatographie, (IV) Derivatisierung des Alkohols mit (*R*)-(+)-MTPA und anschließende GC-Trennung der Diastereomere.

Abgesehen von einer verringerten Analysenempfindlichkeit bestand der entscheidende Nachteil dieses aufwendigen Verfahrens vor allem darin, dass eine getrennte Untersuchung der einzelnen Ester nicht möglich war.

Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der instrumentellen Analytik (MDGC) und insbesondere die Entwicklung chiraler stationärer Phasen ermöglichen nun die direkte Trennung von Enantiomeren (*Schurig, 2002*).

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen der chiralen sekundären Alkohole sowie der 2-Alkylester in roten und gelben Passionsfrüchten mittels direkter Methode unter Einsatz Multidimensionaler Gaschromatographie und Verwendung einer modifizierten Cyclodextrin-Phase.

#### **4.1.2 Qualitative und quantitative Verteilung**

Zur Isolierung der sekundären Alkohole und ihrer Ester wurde die Simultane Destillation-Extraktion (SDE) nach Likens-Nickerson angewendet. Vorversuche hatten gezeigt, dass mit Hilfe dieser Isolierungsmethode im Vergleich zu den schonenden Verfahren der Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) und der Vakuum Headspace Technik (VHS) deutlich höhere Extraktionsausbeuten an 2-Alkylestern und freien sekundären Alkoholen erzielt werden. Um säurekatalysierten Veränderungen der Aromastoffzusammensetzung entgegenzuwirken, die aus dem niedrigen pH-Wert der Passionsfrucht-Pulpe (pH 2,5-3,5) und der thermischen Behandlung des SDE-Verfahrens resultieren könnten, wurde der aus den Früchten gewonnene Saft mit Phosphatpufferlösung homogenisiert und dadurch auf einen pH-Wert von ca. 4,5 eingestellt.

Die gewonnenen Extrakte wurden mittels Kapillargaschromatographie (HRGC-FID) und Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) untersucht. Die quantitative Bestimmung der Komponenten erfolgte unter Berücksichtigung des vor der Isolierung zugesetzten Internen Standards 2-Hexanol, der GC-Korrekturfaktoren und der Wiederfindungen der Verbindungen.

Abbildung 11 zeigt die typische kapillargaschromatographische Trennung der aus roten Passionsfrüchten isolierten flüchtigen Verbindungen. Die für diese Arbeit relevanten Verbindungen sind mit Nummern gekennzeichnet.

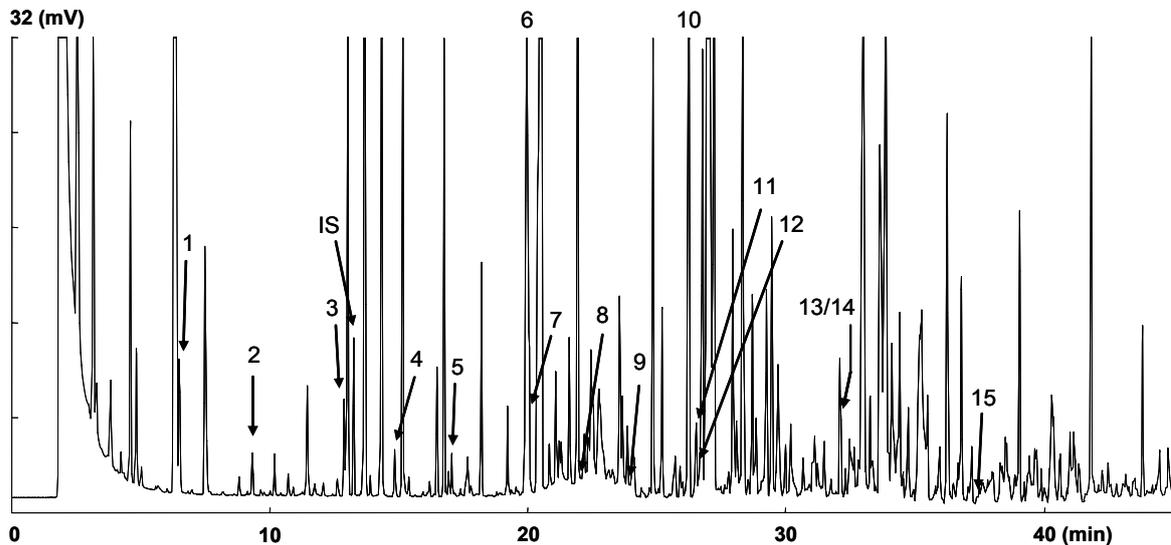


Abbildung 11: Kapillargaschromatographische Trennung (DB-WAX) sekundärer Alkohole und ihrer Ester aus roten Passionsfrüchten  
 (IS = Interner Standard 2-Hexanol. Die angegebenen Nummern entsprechen den Verbindungen in Tabelle 4. GC-Bedingungen siehe Material & Methoden)

Die quantitative Verteilung der 2-Alkylester und der freien sekundären Alkohole ist in Tabelle 4 dargestellt. In den drei untersuchten Chargen roter Passionsfrüchte aus Kolumbien konnten die komplette Reihe der Acetate, Butanoate, Hexanoate und Octanoate von 2-Pentanol, 2-Heptanol und 2-Nonanol sowie die freien sekundären Alkohole nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Alkohol-Komponente dominierte die Gruppe der 2-Heptylester, während im Bezug auf den Fettsäure-Anteil die Butanoate und Hexanoate vorherrschend waren. Als quantitativ bedeutendste Vertreter wurden 2-Heptylbutanoat (3800-4710 µg/kg) und 2-Heptylhexanoat (2400-10500 µg/kg) bestimmt.

Tabelle 4: Konzentrationen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) sekundärer Alkohole und ihrer Ester in roten Passionsfrüchten

Nr. <sup>c</sup>	Verbindung	KI <sup>a</sup> (DB-Wax)	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
			Charge <sup>b</sup>		
			I <sup>d</sup>	II <sup>e</sup>	III <sup>e</sup>
<b>Alkohole</b>					
2	2-Pentanol	1125	98 $\pm$ 19	38	154
5	2-Heptanol	1328	68 $\pm$ 13	415	455
9	2-Nonanol	1525	< 2	< 2	< 2
<b>Ester</b>					
1	2-Pentylacetat	1074	138 $\pm$ 37	104	692
3	2-Pentylbutanoat	1216	459 $\pm$ 171	34	247
7	2-Pentylhexanoat	1407	438 $\pm$ 122	143	1192
12	2-Pentyl-octanoat	1605	70 $\pm$ 30	190	385
4	2-Heptylacetat	1266	215 $\pm$ 38	946	974
6	2-Heptylbutanoat	1401	3800 $\pm$ 628	3669	4710
10	2-Heptylhexanoat	1591	2403 $\pm$ 215	10499	9867
14	2-Heptyl-octanoat <sup>f</sup>	1788	72 $\pm$ 6	1227	603
8	2-Nonylacetat	1466	< 2	47	24
11	2-Nonylbutanoat	1600	187 $\pm$ 20	344	226
13	2-Nonylhexanoat <sup>f</sup>	1787	17 $\pm$ 3	267	131
15	2-Nonyl-octanoat	1982	< 2	< 2	< 2

<sup>a</sup> Kovats Retentionsindex.

<sup>b</sup> Herkunftsland: Kolumbien

<sup>c</sup> Nummern entsprechen den Verbindungen in Abb. 11.

<sup>d</sup> Mittelwert aus 3 Bestimmungen  $\pm$  Standardfehler.

<sup>e</sup> Einfache Bestimmung.

<sup>f</sup> Verbindungen nicht getrennt; Konzentrationen berechnet unter Berücksichtigung des Verhältnisses charakteristischer MS-Fragmente:  $m/z$  127 (2-Heptyl-octanoat) und 99 (2-Nonylhexanoat).

Abbildung 12 zeigt ein typisches GC-Chromatogramm der aus gelben Passionsfrüchten isolierten flüchtigen Verbindungen. Generell wurde hier im Vergleich zu den roten Früchten ein weniger komplexes Aromastoff-Spektrum beobachtet. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch bei der Gruppe der 2-Alkylester wider.

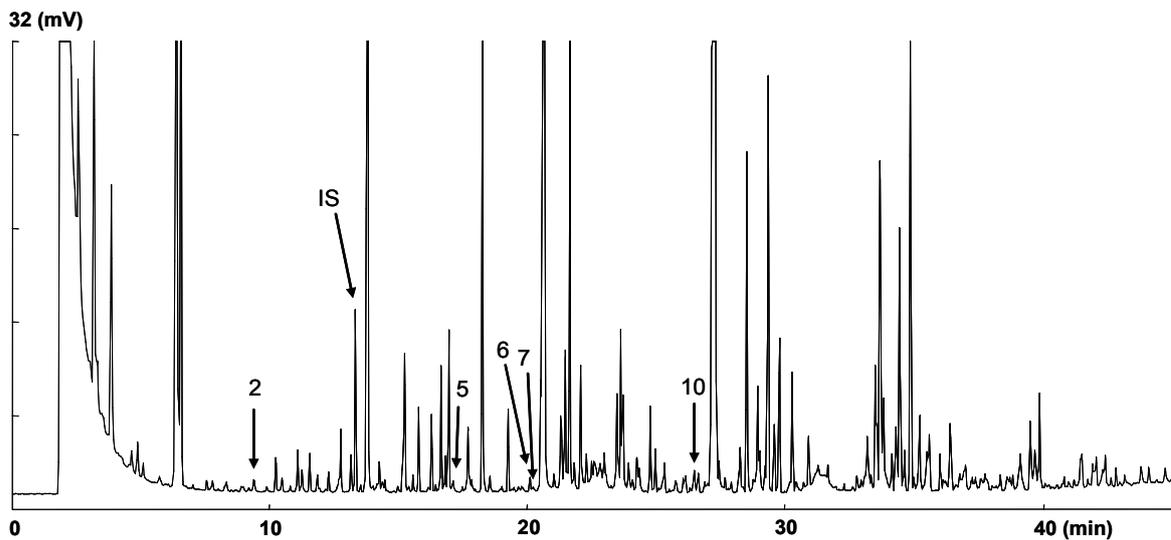


Abbildung 12: Kapillargaschromatographische Trennung (DB-WAX) sekundärer Alkohole und ihrer Ester aus gelben Passionsfrüchten  
(IS = *Internal Standard 2-Hexanol*. Die angegebenen Nummern entsprechen den Verbindungen in Tabelle 4. GC-Bedingungen siehe *Material & Methoden*)

Tabelle 5 zeigt die quantitative Verteilung der 2-Alkylester sowie der freien sekundären Alkohole in gelben Passionsfrüchten verschiedener Herkunftsländer. Verglichen mit der roten Varietät wurden sowohl bei Früchten aus Thailand als auch Kolumbien die Ester 2-Heptylbutanoat und -hexanoat lediglich als Minorkomponenten nachgewiesen. Abgesehen von 2-Pentylhexanoat, was ebenfalls in geringen Konzentrationen identifiziert wurde, konnten keine weiteren 2-Alkylester nachgewiesen werden.

Als freie sekundäre Alkohole wurden Spuren an 2-Pentanol und 2-Heptanol bestimmt. 2-Nonanol konnte im Vergleich zu den roten Passionsfrüchten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 5: Konzentrationen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) sekundärer Alkohole und ihrer Ester in gelben Passionsfrüchten

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	KI (DB-Wax) <sup>c</sup>	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a</sup>	
			Thailand	Kolumbien
<b>Alkohole</b>				
2	2-Pentanol	1125	22 $\pm$ 4	35 $\pm$ 3
5	2-Heptanol	1328	15 $\pm$ 11	2 $\pm$ 1
9	2-Nonanol	1525	n.n. <sup>d</sup>	n.n.
<b>Ester</b>				
1	2-Pentylacetat	1074	n.n.	n.n.
3	2-Pentylbutanoat	1216	n.n.	n.n.
7	2-Pentylhexanoat	1407	< 2	13 $\pm$ 3
12	2-Pentyl-octanoat	1605	n.n.	n.n.
4	2-Heptylacetat	1266	n.n.	n.n.
6	2-Heptylbutanoat	1401	31 $\pm$ 13	2 $\pm$ 1
10	2-Heptylhexanoat	1591	36 $\pm$ 16	10 $\pm$ 1
14	2-Heptyl-octanoat	1788	n.n.	n.n.
8	2-Nonylacetat	1466	n.n.	n.n.
11	2-Nonylbutanoat	1600	n.n.	n.n.
13	2-Nonylhexanoat	1787	n.n.	n.n.
15	2-Nonyl-octanoat	1982	n.n.	n.n.

<sup>a</sup> Mittelwert aus 3 Bestimmungen  $\pm$  Standardfehler.

<sup>b</sup> Nummern entsprechen Verbindungen in Abb. 11 und Abb. 12.

<sup>c</sup> Kovats Retentionsindex.

<sup>d</sup> nicht nachweisbar (Nachweisgrenze: 0,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den bereits bekannten Untersuchungen an flüchtigen Verbindungen in gelben Passionsfrüchten überein, bei denen bislang ebenfalls nur einzelne 2-Alkylester als Spurenkomponenten nachgewiesen werden konnten (*Chen et al., 1982a; Werkhoff et al., 1998*).

Durch den Vergleich der beiden Varietäten in der vorliegenden Arbeit konnte die Rolle der 2-Alkylester als Markersubstanzen zur Differenzierung zwischen roten und gelben Passionsfrüchten bestätigt werden (*Engel und Tressl, 1983*).

### 4.1.3 Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen

Zur Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen wurde die Methodik der Multidimensionalen Gaschromatographie (MDGC) angewendet. Die Kopplung der Trennsäulen wurde mit Hilfe eines *Moving Column Stream Switching Systems* (MCSS) geregelt. Zur Vortrennung der flüchtigen Verbindungen des Extraktes wurde eine achirale DB-WAX-Kapillarsäule bzw. zur Verifizierung der Ergebnisse eine achirale DB-5-Kapillarsäule verwendet. In Vorversuchen wurde eine Reihe an modifizierten Cyclodextrin-Phasen hinsichtlich ihrer Eignung zur Trennung der Enantiomere der 2-Alkylester und sekundären Alkohole untersucht.

Von *Maas et al. (1995)* werden die Trennungen von kurzkettigen sekundären Alkoholen (C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>) auf einer Oktakis(2,3-di-O-butyl-6-O-*tert*-butyldimethylsilyl)- $\gamma$ -cyclodextrinphase beschrieben. Die kurzkettigen Ester (Acetate und Butanoate) von 2-Pentanol und 2-Heptanol wurden mittels einer Heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin- bzw. einer Heptakis(2,3,6-tri-O-pentyl)- $\beta$ -cyclodextrinphase (Lipodex C<sup>®</sup>) getrennt (*Mosandl et al., 1991; Bernreuther, 1992*). Mit der erst kürzlich beschriebenen, neuartig modifizierten Cyclodextrinphase Oktakis(2,3-di-O-methoxymethyl-6-O-*tert*-butyldimethyl-silyl)- $\gamma$ -CD (2,3-MOM- $\gamma$ -CD) wurden für die Gruppe der kurzkettigen 2-Alkylester ungewöhnlich hohe Trenneigenschaften gezeigt (*Takahisa et al., 2005b; Engel et al., 2008*). Die kapillargaschromatographischen Kenngrößen der 2,3-MOM- $\gamma$ -CD-Phase sind in Tabelle 6 angegeben. Wie die Ergebnisse zeigen, nimmt die Trennleistung für Ester mit zunehmender Kettenlänge jedoch stark ab.

Als chirale stationäre Phase zur Trennung der sekundären Alkohole und ihrer Ester wurde für die vorliegende Arbeit eine Heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -Cyclodextrinphase (2,3-DIME- $\beta$ -CD) gewählt. Die Verwendung dieser CD-Phase wurde bereits für die Enantiomerentrennung Passionsfrucht-typischer Schwefelaromastoffe (*Weber et al., 1994*) sowie anderer chiraler Aromastoffe (*Dietrich et al., 1992*) gezeigt. Wie die Ergebnisse in Tabelle 6 veranschaulichen, konnte mit dieser Phase eine Basislinientrennung aller untersuchten 2-Alkylester erreicht werden (Auflösung  $R \geq 1,3$ ).

Tabelle 6: Kapillargaschromatographische Kenngrößen chiraler stationärer Cyclodextrin-Phasen

Verbindung	2,3-MOM- $\gamma$ -CD <sup>a</sup>			2,3-DIME- $\beta$ -CD			
	T (°C)	k <sub>1</sub> <sup>b</sup>	$\alpha$ <sup>c</sup>	T (°C)	k <sub>1</sub>	$\alpha$	R <sup>d</sup>
<b>Alkohole</b>							
2-Pentanol	40	11,70	1,10	40	13,73	1,03	0,83
2-Heptanol	60	22,76	1,05	65	19,44	1,04	1,7
2-Nonanol	80	17,84	1,00	90	18,90	1,00	-
<b>Ester</b>							
2-Pentylacetat	35	13,10	2,44	40	14,82	2,54	34,85
2-Pentylbutanoat	60	13,00	1,68	65	14,72	1,21	11,44
2-Pentylhexanoat	85	14,60	1,14	95	15,06	1,07	4,22
2-Pentyl octanoat	110	17,12	1,03	120	14,84	1,03	2,13
2-Heptylacetat	60	15,80	1,30	70	14,50	1,82	33,43
2-Heptylbutanoat	85	14,10	1,15	90	17,46	1,13	7,67
2-Heptylhexanoat	110	14,20	1,03	120	14,09	1,05	3,00
2-Heptyl octanoat	135	14,97	1,01	140	15,34	1,03	2,02
2-Nonylacetat	90	14,00	1,10	100	13,35	1,39	20,02
2-Nonylbutanoat	110	14,10	1,05	120	13,50	1,06	3,85
2-Nonylhexanoat	130	15,90	1,01	140	15,27	1,03	2,23
2-Nonyl octanoat	150	19,03	1,00	155	19,14	1,02	1,65

<sup>a</sup> Takahisa *et al.*, (2005b) (2-Nonanol, 2-Pentyl-, 2-Heptyl-, 2-Nonyl octanoat: eigene Daten).

<sup>b</sup> Kapazitätsfaktor des zuerst eluierenden Enantiomers.

<sup>c</sup> Trennfaktor.

<sup>d</sup> Auflösung.

(Berechnungen siehe Material & Methoden)

In Abbildung 13a ist exemplarisch die Enantiomerentrennung racemischer 2-Heptylester dargestellt. Die Elutionsreihenfolgen der Enantiomere der sekundären Alkohole und ihrer Ester wurden durch Co-Injektion mit optisch reinen Referenzsubstanzen bestimmt. Abhängig von ihrem Elutionsverhalten wurden 4 Kombinationen an „Cut-Fenstern“ festgelegt, die den MDGC-Transfer und die Enantiomerentrennung des kompletten Spektrums an 2-Alkylestern und sekundären Alkoholen ermöglichten (siehe Material & Methoden). Lediglich für 2-Heptyl octanoat und 2-Nonylhexanoat konnte mit den verwendeten Vorsäulen sowie auf der chiralen Hauptsäule keine Trennung erreicht werden.

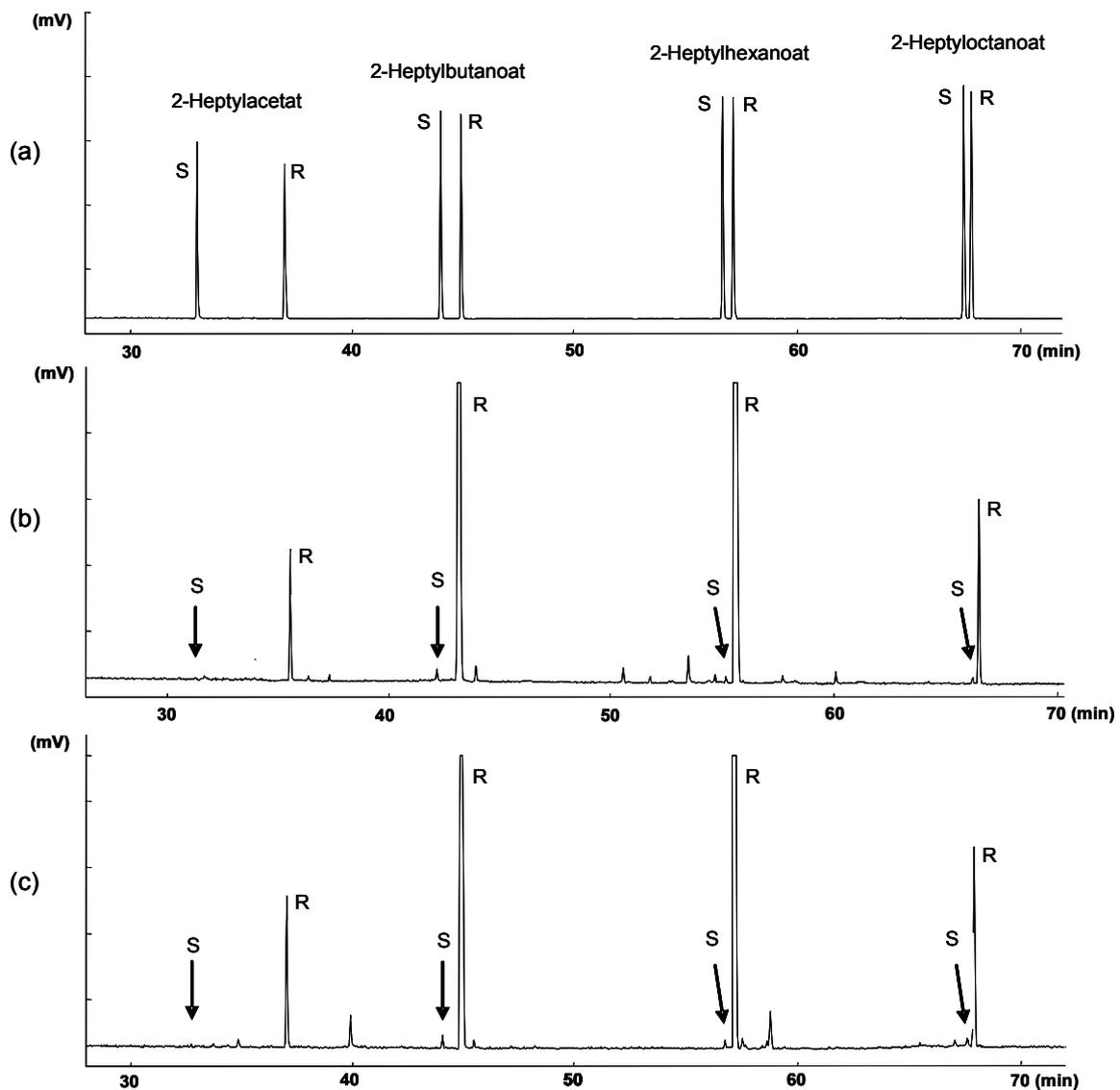


Abbildung 13: Kapillargaschromatographische Trennung der Enantiomere von 2-Heptylester auf 2,3-DIME- $\beta$ -CD mittels MDGC (GC-Bedingungen siehe Material & Methoden).  
 a) racemische Referenzsubstanzen (Vorsäule: DB-5)  
 b) 2-Heptylester aus SDE-Extrakt roter Passionsfrüchte (Vorsäule: DB-WAX)  
 c) 2-Heptylester aus SDE-Extrakt roter Passionsfrüchte (Vorsäule: DB-5)

Abbildung 13b zeigt die Enantiomerenzusammensetzung der 2-Heptylester in roten Passionsfrüchten. Die Vortrennung der Ester wurde mittels einer polaren achiralen DB-WAX-Phase durchgeführt. Zur Verifizierung der Ergebnisse und zur Ausschließung des Transfers von coeluerenden Substanzen wurden alle Trennungen mit einer Vorsäule unterschiedlicher Polarität (DB-5) wiederholt (Abbildung 13 c). Der Vergleich der beiden Chromatogramme demonstriert, dass mit beiden Verfahren ein einheitliches Ergebnis erzielt wurde: Die 2-Heptylester in roten Passionsfrüchten liegen nahezu optisch rein als (*R*)-Enantiomere vor.

Die Enantiomerenzusammensetzungen der 2-Alkylester und der freien sekundären Alkohole in roten Passionsfrüchten sind in Tabelle 7 gegenübergestellt. Der Vergleich zeigt, dass in allen Chargen für die komplette Reihe der homologen 2-Alkylester hohe Überschüsse der jeweiligen (*R*)-Enantiomere ermittelt werden konnten. Für die quantitativ dominierenden Ester 2-Heptylbutanoat und 2-Heptylhexanoat wurden im Durchschnitt Überschüsse von 98,8 % (*R*) bzw. 99,6 % (*R*) erhalten. Die maximalen Anteile der jeweiligen (*S*)-Enantiomere betragen 2,3 % bzw. 0,7 %.

Tabelle 7: Enantiomerenzusammensetzungen (%) sekundärer Alkohole und ihrer Ester aus roten Passionsfrüchten

Verbindung	Enantiomerenzusammensetzung (%)					
	Charge					
	I <sup>a</sup>		II <sup>b</sup>		III <sup>b</sup>	
	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )
<b>Alkohole</b>						
2-Pentanol	70,8	29,2	85,5	14,5	84,3	15,7
2-Heptanol	85,7	14,3	92,5	7,5	72,0	28,0
2-Nonanol	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	-
<b>Ester</b>						
2-Pentylacetat	> 98,0 <sup>d</sup>		> 95,3		> 98,2	
2-Pentylbutanoat	99,2	0,8	> 89,9		92,9	7,1
2-Pentylhexanoat	> 98,7		93,5	6,5	96,4	3,6
2-Pentyl octanoat	> 97,9		98,8	1,2	> 98,9	
2-Heptylacetat	> 98,4		> 99,5		> 98,6	
2-Heptylbutanoat	99,4	0,6	99,2	0,8	97,7	2,3
2-Heptylhexanoat	99,8	0,2	99,8	0,2	99,3	0,7
2-Heptyl octanoat <sup>e</sup>	> 98,8		99,1	0,9	98,6	1,4
2-Nonylacetat	-	-	> 96,3		> 87,7	
2-Nonylbutanoat	98,2	1,8	97,5	2,5	96,9	3,1
2-Nonylhexanoat <sup>e</sup>	> 98,8		99,1	0,9	98,6	1,4
2-Nonyl octanoat	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Mittelwert aus 3 Bestimmungen (vereinigter Extrakt aus 3 Aufarbeitungen).

<sup>b</sup> Mittelwert aus 3 Bestimmungen (einfache Aufarbeitung).

<sup>c</sup> unterhalb der Bestimmungsgrenze (Alkohole: < 0,7 µg/kg; Ester: < 1,2 µg/kg).

<sup>d</sup> Werte "größer als (>)" berechnet unter Berücksichtigung der Peakfläche der Bestimmungsgrenze für das zweite Enantiomer.

<sup>e</sup> Coelution der Enantiomere.

Für die Gruppe der 2-Pentylester wurden geringere Überschüsse der (*R*)-Enantiomere ermittelt. Bei den Ester-Homologen, die in niedrigeren Konzentrationen enthalten waren, konnten die jeweiligen (*S*)-Enantiomere nicht oder lediglich unterhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden. In diesen Fällen konnten die Verhältnisse nicht exakt berechnet werden, sondern wurden unter Berücksichtigung der Peakfläche der Bestimmungsgrenze ermittelt und mit dem Vorzeichen „>“ angegeben (GDCh, 2001).

Für die in roten Passionsfrüchten vorkommenden freien Alkohole 2-Pentanol und 2-Heptanol wurden ebenfalls deutliche Überschüsse der jeweiligen (*R*)-Enantiomere festgestellt, allerdings weniger stark ausgeprägt als bei den entsprechenden Estern.

Die ermittelten Enantiomerenzusammensetzungen der freien sekundären Alkohole und ihrer Ester in gelben Passionsfrüchten sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Enantiomerenzusammensetzungen (%) sekundärer Alkohole und ihrer Ester aus gelben Passionsfrüchten

Verbindung	Enantiomerenzusammensetzung (%) <sup>a</sup>			
	Thailand		Kolumbien	
	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )	( <i>R</i> )	( <i>S</i> )
<b>Alkohole</b>				
2-Pentanol	49,7	50,3	51,7	48,3
2-Heptanol	29,1	70,9	42,5	57,5
2-Nonanol	n.n. <sup>b</sup>	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Ester</b>				
2-Pentylacetat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Pentylbutanoat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Pentylhexanoat	-	-	89,1	10,9
2-Pentyl octanoat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Heptylacetat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Heptylbutanoat	87,2	12,8	> 84,6 <sup>c</sup>	
2-Heptylhexanoat	93,1	6,9	94,4	5,6
2-Heptyl octanoat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Nonylacetat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Nonylbutanoat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Nonylhexanoat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Nonyl octanoat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

<sup>a</sup> Mittelwert aus 3 Bestimmungen (vereinigter Extrakt aus 3 Aufarbeitungen).

<sup>b</sup> unterhalb der Nachweisgrenze (< 0,4 µg/kg)

<sup>c</sup> Werte „größer als (>)“ berechnet unter Berücksichtigung der Peakfläche der Bestimmungsgrenze für das zweite Enantiomer.

Bei den in geringen Konzentrationen nachgewiesenen Estern 2-Pentylhexanoat, 2-Heptylbutanoat und 2-Heptylhexanoat dominierten ebenfalls die entsprechenden (*R*)-Enantiomere. Allerdings wurden deutlich geringere Überschüsse als bei den entsprechenden Estern der roten Varietät ermittelt. Unterschiede bezüglich der Enantiomerenzusammensetzung zeigten sich auch in der Gruppe der freien sekundären Alkohole. Während 2-Pentanol und 2-Heptanol in roten Passionsfrüchten vorwiegend in Form der (*R*)-Enantiomere vorlagen, dominierte bei den gelben Früchten (*S*)-2-Heptanol und für 2-Pentanol wurden nahezu racemische Verhältnisse bestimmt.

#### **4.1.4 Einfluss der Isolierungsmethode auf die natürliche Enantiomerenzusammensetzung**

Von *Brat et al. (2000)* wurde gezeigt, dass verschiedene Methoden (LLE, SDE, VHS) zur Isolierung der flüchtigen Verbindungen aus Passionsfrüchten geeignet sind. Für die vorliegende Arbeit wurde das Verfahren der SDE gewählt, da Vorversuche gezeigt hatten, dass hiermit deutlich höhere Extraktionsausbeuten an sekundären Alkohole und 2-Alkylestern erzielt werden (z.B. 30 % mehr als mit LLE).

Um jedoch Veränderungen der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen, bedingt durch die thermische Behandlung des SDE-Verfahrens, ausschließen zu können, wurde ein Vergleich mit den schonenden Verfahren LLE und VHS durchgeführt. Die für die sekundären Alkohole 2-Pentanol und 2-Heptanol sowie die quantitativ dominierenden Ester 2-Heptylbutanoat und 2-Heptylhexanoat erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 gegenübergestellt. Der Vergleich der Isolierungsmethoden zeigt, dass die Bedingungen der Isolierungsmethoden keinen Einfluss auf die natürlichen Enantiomerenverhältnisse hatten.

Tabelle 9: Enantiomerenzusammensetzungen der mittels verschiedener Isolierungsmethoden aus roten Passionsfrüchten isolierten sekundären Alkohole und ihrer Ester

Verbindung	Enantiomerenzusammensetzung (%) <sup>a</sup>					
	SDE <sup>b</sup>		LLE <sup>c</sup>		VHS <sup>d</sup>	
	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
<b>Alkohole</b>						
2-Pentanol	60,2	39,8	58,6	41,4	59,2	40,8
2-Heptanol	84,6	15,4	85,1	14,9	84,2	15,8
2-Nonanol	- <sup>e</sup>	-	-	-	-	-
<b>Ester</b>						
2-Pentylacetat	> 90,2 <sup>f</sup>		> 90,2		> 90,7	
2-Pentylbutanoat	> 95,4		> 94,9		> 95,3	
2-Pentylhexanoat	> 94,6		> 95,9		> 95,3	
2-Pentyl-octanoat	96,5	3,5	96,3	3,7	> 92,8	
2-Heptylacetat	> 97,0		> 97,1		> 96,9	
2-Heptylbutanoat	99,4	0,6	99,4	0,6	99,4	0,6
2-Heptylhexanoat	99,8	0,2	99,8	0,2	99,8	0,2
2-Heptyl-octanoat <sup>g</sup>	99,3	0,7	99,2	0,8	> 92,5	
2-Nonylacetat	-	-	-	-	-	-
2-Nonylbutanoat	98,4	1,6	98,5	1,5	> 97,4	
2-Nonylhexanoat <sup>g</sup>	99,3	0,7	99,2	0,8	> 92,5	
2-Nonyl-octanoat	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Mittelwert aus 3 Bestimmungen.

<sup>b</sup> Simultane Destillation-Extraktion.

<sup>c</sup> Flüssig-Flüssig Extraktion.

<sup>d</sup> Vakuum Headspace Technik.

<sup>e</sup> unterhalb der Bestimmungsgrenze (Alkohole: < 0,7 µg/kg; Ester: < 1,2 µg/kg).

<sup>f</sup> Werte "größer als (>)" berechnet unter Berücksichtigung der Peakfläche der Bestimmungsgrenze für das zweite Enantiomer.

<sup>g</sup> Coelution der Enantiomere.

#### 4.1.5 Zusammenfassung und biogenetische Aspekte

Durch die Untersuchungen der qualitativen und quantitativen Verteilungen der sekundären Alkohole und ihrer Ester konnte bestätigt werden, dass die Gruppe der 2-Alkylester geeignet ist zur Differenzierung zwischen roten und gelben Passionsfrüchten (*Engel und Tressl, 1983*). Während die homologen Ester als

Hauptkomponenten in der roten Varietät bestimmt werden konnten, wurden sie in gelben Früchten nicht oder lediglich als Minorkomponenten nachgewiesen.

Die Methodik der MDGC unter Verwendung einer modifizierten Cyclodextrin-Phase ermöglichte die direkte Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzung der einzelnen Ester und freien sekundären Alkohole. Dass die Hauptvertreter 2-Heptylacetat, -butanoat, -hexanoat und -octanoat in roten Passionsfrüchten nahezu als optisch reine (*R*)-Enantiomere vorliegen, bestätigte das mittels indirekter Methode (Derivatisierung zu Diastereomeren) für die Gruppe der 2-Heptylester erhaltene Ergebnis (*Tressl und Engel, 1985*). Darüber hinaus konnte auch für die einzelnen Ester des 2-Pentanol sowie des 2-Nonanol ein Überschuss der jeweiligen (*R*)-Enantiomere gezeigt werden. Aufgrund der Empfindlichkeit der angewandten Methodik wurde ersichtlich, dass die Ester allerdings nicht in optisch reiner Form vorliegen. Die nachgewiesenen Anteile der (*S*)-Enantiomere variierten je nach Charge und Alkohol-Komponente. Zudem konnten die gegensätzlichen Konfigurationen des freien sekundären Alkohols 2-Heptanol in roten und gelben Passionsfrüchten bestätigt werden.

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, werden die 2-Alkylester im Zuge der Biosynthese durch Veresterung der entsprechenden sekundären Alkohole gebildet, wobei als reaktionskatalysierende Enzyme Alkohol-Acyltransferasen vermutet werden (*Sanz et al., 1997*). Die hohen Gehalte an nahezu optisch reinen (*R*)-2-Alkylestern in roten Passionsfrüchten lassen auf den ersten Blick eine hohe Enantioselektivität der beteiligten Enzyme zugunsten der (*R*)-Alkohole vermuten. Betrachtet man allerdings die niedrigen Gehalte an (*S*)-konfigurierten freien sekundären Alkohole, wird deutlich, dass die Veresterungen nicht über eine „in-vivo-Racematspaltung“ verlaufen, bei der nur ein Enantiomer selektiv verestert wird, während das andere Stereoisomer (in diesem Fall (*S*)-Alkohol) als nicht umgesetztes Substrat angereichert wird. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass die freien 2-Alkanole bereits vor der Veresterung als (*R*)-Enantiomere vorliegen. Als Grund hierfür liegt die stereoselektive Reduktion der entsprechenden 2-Methylketone nahe (*Tressl und Engel, 1985*). Diese sind als flüchtige Verbindungen in Passionsfrüchten bekannt (*Whitfield und Last, 1986; Shibamoto und Tang, 1990*) und konnten auch im Rahmen dieser Arbeit in den SDE-Extrakten der roten sowie der gelben Varietät nachgewiesen werden.

In gelben Passionsfrüchten wurden deutlich geringe Konzentrationen an 2-Alkylestern bestimmt. Die erhaltenen Enantiomerenüberschüsse der Ester deuten auf eine Enantiopräferenz der beteiligten Alkohol-Acyltransferasen zugunsten der (*R*)-Alkohole hin. Die Enantiomerenverteilungen der freien sekundären Alkohole lassen vermuten, dass diese im Gegensatz zu den roten Passionsfrüchten vor der Veresterung in einem nahezu racemischen Verhältnis vorliegen.

Die erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass sich rote und gelbe Passionsfrüchte in ihren Konzentrationen sowie Enantiomerenzusammensetzungen an 2-Alkylestern unterscheiden. Allgemein können hierfür unterschiedliche Aktivitäten und Enantioselektivitäten der an der Biosynthese beteiligten Schlüsselenzyme als Ursache gesehen werden.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass Passionsfrüchte deutliche metabolische Unterschiede zu Bananen aufweisen, in denen ebenfalls die sekundäre Alkohole und 2-Alkylester als typische flüchtige Verbindungen nachgewiesen wurden. Im Gegensatz zu Passionsfrüchten wurden hier für freies 2-Pentanol und 2-Heptanol sowie deren Acetate und Butanoate hohe Überschüsse der jeweiligen (*S*)-Enantiomere bestimmt (*Gessner et al., 1988; Fröhlich et al., 1989; Schubert et al., 1991; Bernreuther, 1992*).

## 4.2 ENZYMKATALYSIERTE GEWINNUNG DER 2-ALKYLESTER

### 4.2.1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat sich der Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren in vielen Bereichen der organischen Synthese etabliert. Die Vorteile biokatalytischer Umsetzungen zeigen sich in ihrer Chemo-, Regio- und Stereoselektivität sowie in mildereren Reaktionsbedingungen (*Faber, 1997*). Zudem verlaufen biokatalytische Prozesse meist weniger gefährlich, umweltgefährdend und energieverbrauchend als konventionelle chemische Methoden (*Carrea und Riva, 2000*). Unter den Biokatalysatoren zählen Hydrolasen, insbesondere Lipasen, zu den am meisten verwendeten Enzymen. Sie katalysieren sowohl Hydrolysen in wässrigen als auch Veresterungen in organischen Medien. Neben ihrem breiten Substratspektrum zeichnen sie sich vor allem durch ihre hohe Enantioselektivität aus (*Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*). Die am häufigsten angewandte Methode der enantioselektiven Biokatalyse stellt die enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung dar (*Ghanem und Aboul-Enein, 2005*). Hierbei wird selektiv nur ein Enantiomer des racemischen Substrates zum optisch reinen Produkt umgesetzt, während das andere im Reaktionsprozess angereichert wird.

Sekundäre Alkohole stellen geeignete Substrate für die Lipase-katalysierte Racematspaltung dar und gehören zu den bestuntersuchten Verbindungen im Bereich der enantioselektiven Biokatalyse (*Bornscheuer und Kazlauskas, 2006*). Zur Vorhersage der Enantiopräferenz von Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole wurde eine empirische Regel erstellt, die auf dem Größenvergleich der Substituenten am Stereozentrum des chiralen Alkohols basiert (*Kazlauskas et al., 1991*).

Das Potenzial enzymkatalysierter Umsetzungen zur Gewinnung der Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester in optisch reiner Form wurde bislang nur von wenigen Arbeitsgruppen erforscht. Bei der Verwendung von Schweinepankreas Lipase als Biokatalysator zur Veresterung der sekundären Alkohole mit kurzkettigen (*Engel, 1988; Engel et al., 1989*) und mittelkettigen (*Gerlach et al., 1989*) Fettsäuren konnte eine Enantiopräferenz für die jeweiligen (*R*)-Alkohole beobachtet werden. Allerdings waren die erhaltenen Umsatzraten

und Enantioselektivitäten nicht geeignet für eine effektive Anwendung im präparativen Maßstab oder konnten nur durch zusätzlichen Arbeitsaufwand (Gerlach und Schreier, 1989) gesteigert werden. Dass *Candida antarctica* Lipase B ein geeignetes Enzym zur Gewinnung optisch reiner Acetate von 2-Pentanol und 2-Heptanol darstellt, wurde von Patel et al. (2000) sowie Dlugy und Wolfson (2007) gezeigt. Allerdings wurde die Möglichkeit zur Herstellung der übrigen Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester nicht untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit war es (I) kommerzielle Lipase- und Esterasepräparate hinsichtlich ihrer Eigenschaft zur enantioselektiven Veresterung sekundärer Alkohole mit kurzkettigen Fettsäuren zu untersuchen, (II) den Einfluss der Kettenlängen der Substrate auf die enzymkatalysierten Synthese- und Hydrolysereaktionen zu analysieren und (III) basierend auf den erhaltenen Ergebnissen eine Methode zur Gewinnung der optisch reinen Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester im präparativen Maßstab zu entwickeln.

#### 4.2.2 Enzymscreening

Neun kommerziell erhältliche Enzympräparate mikrobiellen und tierischen Ursprungs wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur enzymkatalysierten kinetischen Racematspaltung von chiralen sekundären Alkoholen untersucht. Als Testansatz diente die Veresterung von racemischem 2-Heptanol mit Buttersäure im organischen Lösungsmittel Heptan. Die mittels der verwendeten Lipasen und Esterasen nach 24 Stunden erhaltenen Umsatzraten (%) und Enantioselektivitäten (E) sind in Tabelle 10 dargestellt.

Die erreichten Umsatzraten erstreckten sich über einen Bereich von 0,1 - 56,6 %. Mit Ausnahme der Lipase aus *Penicillium roqueforti* und Schweineleber Esterase zeigten alle verwendeten Enzyme Enantiopräferenz für den (*R*)-Alkohol. Die höchste Umsatzrate wurde mit *Candida cylindracea* Lipase (CCL) erzielt. Allerdings zeigte das Enzym nahezu keine Selektivität bezüglich der Enantiomere des verwendeten Substrates. In der Literatur gilt die Lipase sowohl als hoch enantioselektives (Cambou und Klivanov, 1984; Patel et al., 2000) als auch unselektives (Sonnet und Baillargeon, 1987; Gerlach et al., 1988) Enzym. Zudem

ist bekannt, dass die Enantiopräferenz von CCL stark von der Polarität des Reaktionsmediums abhängt (Ueji *et al.*, 1992).

Tabelle 10: Enzymscreening zur kinetischen Racematspaltung von 2-Heptanol durch Veresterung mit Buttersäure

Enzympräparate	Umsatz <sup>a</sup> (%)	ee <sub>Ester</sub> (%)	ee <sub>Alkohol</sub> (%)	E <sup>b</sup>
<b>Lipasen</b>				
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	47,0	99,8 (R)	88,4 (S)	> 100
<i>Candida antarctica</i> Lipase B (imm.)	49,1	99,1 (R)	95,5 (S)	> 100
<i>Candida antarctica</i>	6,0	36,3 (R)	2,3 (S)	2,2
<i>Candida cylindracea</i>	56,6	6,6 (R)	8,6 (S)	1,2
<i>Penicillium roqueforti</i>	1,0	57,1 (S)	0,6 (R)	3,7
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,1	> 99,9 (R)	0,1 (S)	> 100
Schweinepankreas Lipase	1,7	85,4 (R)	1,5 (S)	12,9
<b>Esterasen</b>				
<i>Mucor miehei</i>	4,7	> 99,9 (R)	4,9 (S)	> 100
Schweineleber Esterase	24,1	2,7 (S)	2,7 (R)	1,2

Bedingungen siehe Material & Methoden (Reaktionszeit: 24 h)

ee, Enantiomerenüberschuss; E, Enantioselektivität.

<sup>a</sup> berechnet nach Chen *et al.* (1982b).

<sup>b</sup> berechnet nach Rakels *et al.* (1993).

Die höchsten Esterbildungsraten bei nahezu ausschließlicher Umsetzung des (R)-Alkohols wurden mit freier und immobilisierter *Candida antarctica* Lipase B (CALB) erzielt. In beiden Fällen wurde als Produkt 2-Heptylbutanoat mit einer optischen Reinheit von > 99,0 % erhalten. Dies zeigt, dass mit Umsatzraten von 47 % bzw. 49 % der maximale Umsatz einer „idealen“ Racematspaltung von 50 % nahezu erreicht wurde.

CALB gilt als hoch effizienter Biokatalysator und die Anwendung in der organischen Synthese wurde bereits umfangreich zusammengefasst (Anderson *et al.*, 1998; Bornscheuer und Kazlauskas, 2006). Es ist bekannt, dass die Lipase hohe Aktivität und Stereoselektivität gegenüber sekundären Alkoholen aufweist. In den meisten Fällen folgen die Umsetzungen dem Kazlauskas-Modell (Kazlauskas *et al.*, 1991), welches auf dem Größenunterschied des mittelgroßen M-

Substituenten und des großen L-Substituenten am Stereozentrum des Substrates basiert. Durch Variation der Substituenten konnte gezeigt werden, dass die Enantioselektivität von CALB gegenüber sekundären Alkoholen am größten ist, wenn der M-Substituent kleiner als n-Propyl und der L-Substituent größer als n-Propyl ist (Orrenius et al., 1998; Rotticci et al., 1998). Der zum Enzymscreening eingesetzte kurzkettige sekundäre Alkohol 2-Heptanol erfüllt diese molekularen Voraussetzungen.

### 4.2.3 Enzymkatalysierte Veresterungen

Aufgrund der im Enzymscreening erzielten hohen Umsatzraten sowie Enantioselektivitäten wurden freie (CALB) und immobilisierte *Candida antarctica* Lipase B (CALB imm) als Biokatalysatoren für die weiteren Untersuchungen gewählt. Es sollte der Einfluss der Kettenlängen der sekundären Alkohole und der kurzkettigen Fettsäuren (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) auf die Lipase-katalysierte Synthese der Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester untersucht werden. Abbildung 14 zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf der Veresterungen von 2-Heptanol mittels CALB imm.

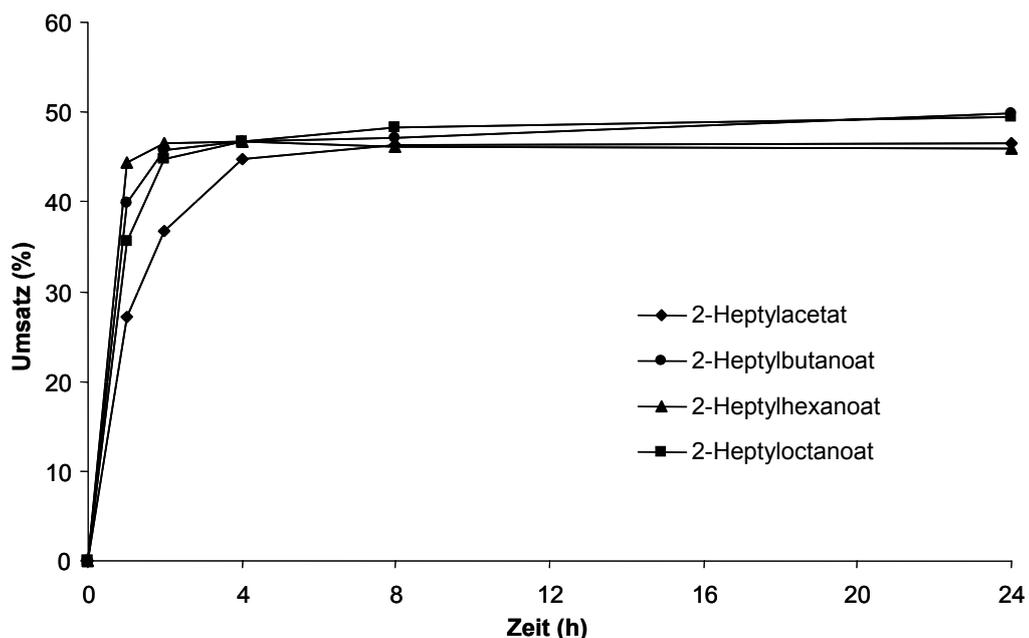


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Synthese von 2-Heptylestern durch kinetische Racematspaltung von 2-Heptanol mit CALB imm

Bei allen synthetisierten 2-Alkylestern wurde die maximale Umsatzrate von fast 50 % bereits nach 2 bis 4 Stunden erreicht. Lediglich der Vergleich der initialen Esterbildungsrate (bis 2 Stunden) zeigt einen Unterschied bezüglich der Kettenlängen der eingesetzten homologen Fettsäuren. Während die Veresterungen mit Buttersäure und Hexansäure am schnellsten abliefen, erreichten die Synthesen der jeweiligen Acetate und Octanoate langsamer ihre Maximalrate. Der insgesamt schnelle Umsatz der Substrate beweist, dass die verwendete Lipase in dem gewählten Reaktionsmedium Heptan eine hohe Aktivität aufweist. Von *Dlugy und Wolfson (2007)* wurde in Chlorbenzol eine deutlich niedrigere Umsatzrate erhalten.

Der stereochemische Verlauf der Synthesen wurde durch Trennung der Enantiomere von Substrat und erhaltenem Produkt an Heptakis(2,3-Di-O-methyl-6-O-*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -Cyclodextrin als chiraler stationärer Phase beobachtet. Abbildung 15 zeigt exemplarisch die kapillargaschromatographische Trennung des Produktes und des nicht umgesetzten Substrates für die Veresterung von 2-Heptanol mit Hexansäure katalysiert durch CALB imm.

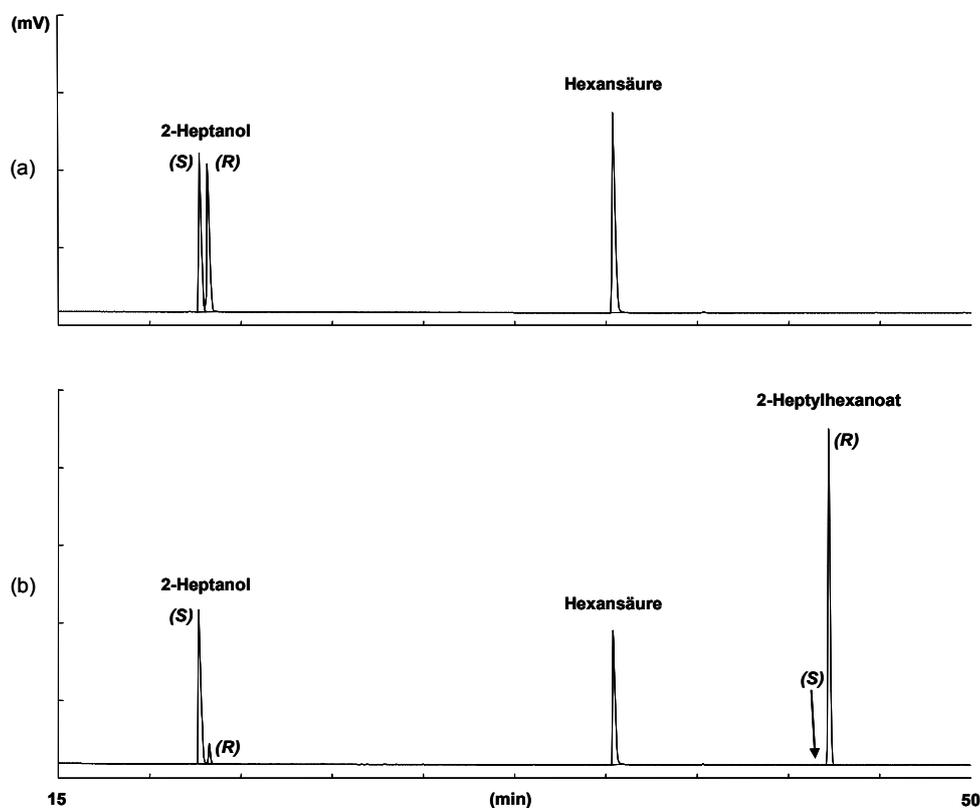


Abbildung 15: Kinetische Racematspaltung von 2-Heptanol durch CALB imm-katalysierte Veresterung mit Hexansäure (GC-Bedingungen siehe Material & Methoden)  
 a) vor Enzymzugabe  
 b) nach 24 Stunden Reaktionszeit

Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde (*R*)-2-Heptylhexanoat erhalten, während der (*S*)-Alkohol in hoher optischer Reinheit [91,7 % (*S*); 8,3 % (*R*)] angereichert wurde.

Die Umsatzraten und Enantioselektivitäten der Synthesen aller homologen 2-Alkylester mit CALB und CALB imm als Biokatalysator sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Enantioselektive Synthesen der 2-Alkylester mit CALB und CALB imm

		Umsatz <sup>a</sup> (%)	ee <sub>Ester</sub> <sup>b</sup> (%)	ee <sub>Alkohol</sub> <sup>c</sup> (%)	E <sup>d</sup>
CALB	2-Pentylacetat	52,1	83,6	85,3	30
	2-Pentylbutanoat	53,2	81,4	93,1	33
	2-Pentylhexanoat	52,0	85,3	87,5	36
	2-Pentyl-octanoat	49,5	93,0	86,4	77
CALB imm	2-Pentylacetat	46,1	99,2	82,0	> 100
	2-Pentylbutanoat	43,9	99,7	73,6	> 100
	2-Pentylhexanoat	45,2	99,1	73,7	> 100
	2-Pentyl-octanoat	47,6	99,1	82,8	> 100
CALB	2-Heptylacetat	42,3	99,4	86,5	> 100
	2-Heptylbutanoat	47,1	99,8	88,4	> 100
	2-Heptylhexanoat	46,9	99,3	87,4	> 100
	2-Heptyl-octanoat	47,2	99,5	89,8	> 100
CALB imm	2-Heptylacetat	46,5	99,8	83,6	> 100
	2-Heptylbutanoat	49,8	99,1	95,5	> 100
	2-Heptylhexanoat	46,0	99,9	83,4	> 100
	2-Heptyl-octanoat	49,5	99,8	95,3	> 100
CALB	2-Nonylacetat	46,8	99,8	- <sup>e</sup>	> 100
	2-Nonylbutanoat	47,5	99,1	- <sup>e</sup>	> 100
	2-Nonylhexanoat	46,2	99,8	- <sup>e</sup>	> 100
	2-Nonyl-octanoat	46,2	99,8	- <sup>e</sup>	> 100

Bedingungen siehe Material & Methoden (Reaktionszeit: 24 h)

ee, Enantiomerenüberschuss; E, Enantioselektivität.

<sup>a</sup> berechnet mit Internem Standard 2-Heptanon.

<sup>b</sup> Enantiomerenüberschuss des (*R*)-Enantiomers.

<sup>c</sup> Enantiomerenüberschuss des (*S*)-Enantiomers.

<sup>d</sup> 2-Pentyl- und 2-Heptylester berechnet nach *Rakels et al. (1993)*; 2-Nonylester berechnet über Enantiomerenüberschuss des Produktes (ee<sub>P</sub>) nach *Chen et al. (1982b)*.

<sup>e</sup> Enantiomere von 2-Nonanol nicht getrennt.

Der Vergleich der verwendeten Enzyme zeigt einen Unterschied in der Gruppe der 2-Pentylester. Die Verwendung der nicht immobilisierten CALB führte zu Umsatzraten  $> 50\%$ . Dies impliziert die Synthese eines größeren Anteils an (S)-2-Pentylestern, was sich in verringerten optischen Reinheiten der synthetisierten (R)-Ester und somit geringeren Enantioselektivitäten ( $E < 100$ ) widerspiegelte. Als Ursache hierfür könnte eine Veränderung der Selektivität des Enzyms gesehen werden, die aus dem Schritt der Immobilisierung resultieren kann (*Bornscheuer, 2003; Cao, 2005*). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Beschaffenheit der Immobilisierungs-Oberfläche zu signifikanten Veränderungen der Enantioselektivität von CALB führt (*Palomo et al., 2002; Palomo et al., 2007*). Im Falle des für diese Arbeit verwendeten Enzyms wird vermutlich durch die Bindung an die Immobilisierungs-Oberfläche (makroporöses Acrylharz) eine deutliche Stabilität der Konformation des aktiven Zentrums, insbesondere der „Stereospezifitäts-Tasche“ (siehe Kapitel 2.5.1.3) erzielt, was zur ausschließlichen Anlagerung des bevorzugten (R)-Alkohols führt (*Orrenius et al., 1998; Rotticci et al., 1998*). Bei der nicht immobilisierten CALB ist diese Stabilität der Enzym-Konformation weniger stark ausgeprägt, weshalb eine Anlagerung des (S)-Alkohols an die leichter zugängliche Bindungstasche ermöglicht wird. Dass dieses Phänomen lediglich beim sekundären Alkohol 2-Pentanol, bei dem der Unterschied zwischen den Substituenten im Vergleich zu 2-Heptanol weniger groß ist, beobachtet werden konnte, stützt diese Erklärung. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde auf die Veresterung von 2-Nonanol mit CALB imm verzichtet.

#### 4.2.4 Enzymkatalysierte Hydrolysen

Von *Patel et al. (2000)* und *Dlugy und Wolfson (2007)* wurde über die hohe Enantioselektivität von CALB gegenüber den Acetaten von 2-Pentanol bzw. 2-Heptanol berichtet. In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Herstellung der kompletten Reihe an optisch reinen (S)-2-Alkylestern untersucht werden. Die Lipase-katalysierten Racematspaltungen der zuvor synthetisierten racemischen Ester wurden in wässriger Puffer-Lösung durchgeführt. Die zeitlichen Verläufe der CALB imm-katalysierten Hydrolysen der 2-Heptylester sind in Abbildung 16 gegenübergestellt.

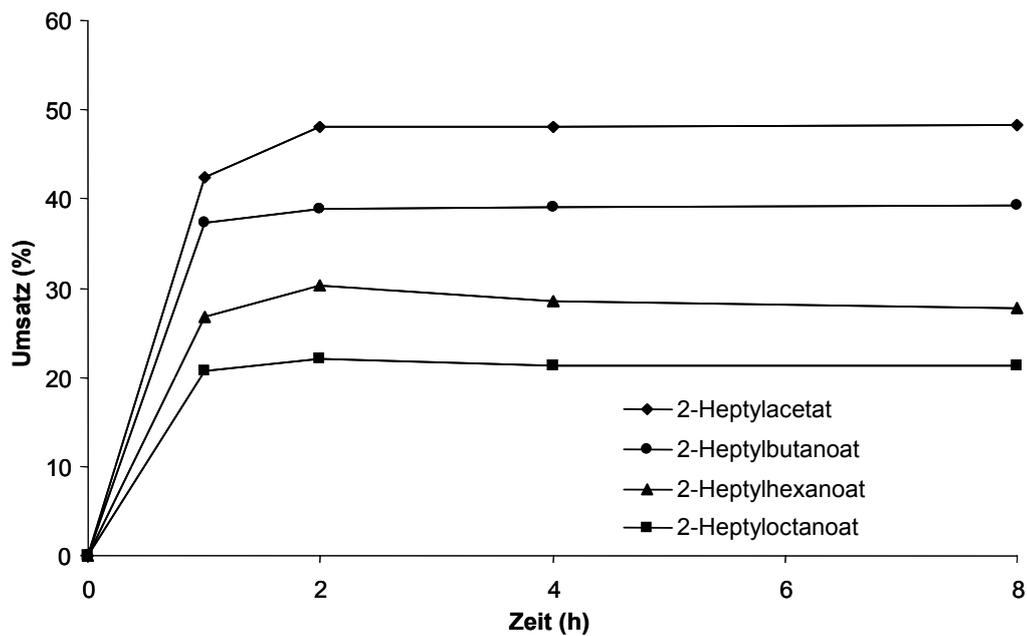


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von 2-Heptylestern durch kinetische Racematspaltung mit CALB imm

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, nehmen die Hydrolyseraten mit zunehmender Kettenlänge der Ester ab. Dieses Phänomen wurde auch bei den Hydrolysen der 2-Pentyl- und 2-Nonylester beobachtet.

Wie die Ergebnisse in Tabelle 12 zeigen, verliefen die Hydrolysereaktionen hoch enantioselektiv. Es wurde ausschließlich der (*R*)-Ester zum entsprechenden Alkohol hydrolysiert, während der nicht umgesetzte (*S*)-Ester angereichert wurde. Die maximal erzielbare Umsatzrate der konventionellen kinetischen Racematspaltung beträgt 50 %. Wie die erhaltenen Hydrolyseraten zeigen, wurde diese ideale Umsatzrate lediglich in der Gruppe der Acetate erreicht. Für 2-Nonyloctanoat, den Ester mit der größten Kettenlänge, wurde nach 8 Stunden lediglich eine Hydrolyserate von 19 % erhalten. Da die Racematspaltungen in wässrigem Medium (Kaliumphosphat-Puffer) durchgeführt wurden, wurde eine schlechtere Löslichkeit der längerkettigen Ester und somit geringeren Verfügbarkeit für den katalytischen Prozess als Ursache für die Abnahme der Hydrolyseraten vermutet.

Tabelle 12: Enantioselektive Hydrolysen der 2-Alkylester mit CALB imm

	Umsatz <sup>a</sup> (%)	ee <sub>Ester</sub> <sup>b</sup> (%)	ee <sub>Alkohol</sub> <sup>c</sup> (%)	E <sup>d</sup>
2-Pentylacetat	48,6	94,6	> 99,9	> 100
2-Pentylbutanoat	42,6	74,3	> 99,9	> 100
2-Pentylhexanoat	36,8	58,3	> 99,9	> 100
2-Pentyl octanoat	29,8	42,4	> 99,9	> 100
2-Heptylacetat	48,3	93,4	> 99,9	> 100
2-Heptylbutanoat	39,3	64,7	> 99,9	> 100
2-Heptylhexanoat	27,7	38,3	> 99,9	> 100
2-Heptyl octanoat	21,4	27,2	> 99,9	> 100
2-Nonylacetat	49,0	96,2	- <sup>e</sup>	> 100
2-Nonylbutanoat	37,2	59,4	- <sup>e</sup>	> 100
2-Nonylhexanoat	27,6	38,1	- <sup>e</sup>	> 100
2-Nonyl octanoat	19,0	23,5	- <sup>e</sup>	> 100

Bedingungen siehe Material & Methoden (Reaktionszeit: 8 Stunden)

ee, Enantiomerenüberschuss; E, Enantioselektivität.

<sup>a</sup> berechnet nach *Chen et al. (1982b)*.

<sup>b</sup> Enantiomerenüberschuss des (S)-Enantiomers.

<sup>c</sup> Enantiomerenüberschuss des (R)-Enantiomers.

<sup>d</sup> berechnet über Enantiomerenüberschuss des Substrates (ee<sub>S</sub>) nach *Chen et al. (1982b)*.

<sup>e</sup> Enantiomere von 2-Nonanol nicht getrennt; Umsatz berechnet unter der Annahme, dass ausschließlich (R)-2-Nonanol gebildet wird.

Durch den Zusatz des Gallensalzes Natrium-Taurocholat als Emulgator konnte für eine Reihe von Esterase-katalysierten Hydrolysereaktionen eine Umsatzsteigerung gezeigt werden (*Barman, 1969; Miller, 2004*). Es ist bekannt, dass die Aktivität einiger Esterasen, wie z.B. Cholesterolesterasen, von der Konzentration an Gallensalzen beeinflusst wird (*Vahouny und Treadwell, 1969*). Da *Candida antarctica* Lipase B als Esterase bzw. als Intermediat zwischen Esterase und Lipase klassifiziert wird (*Bornscheuer und Kazlauskas, 2006; Anderson et al., 1998*), wurde der Einfluss der Natrium-Taurocholats auf die für diese Arbeit relevanten Hydrolysereaktionen untersucht.

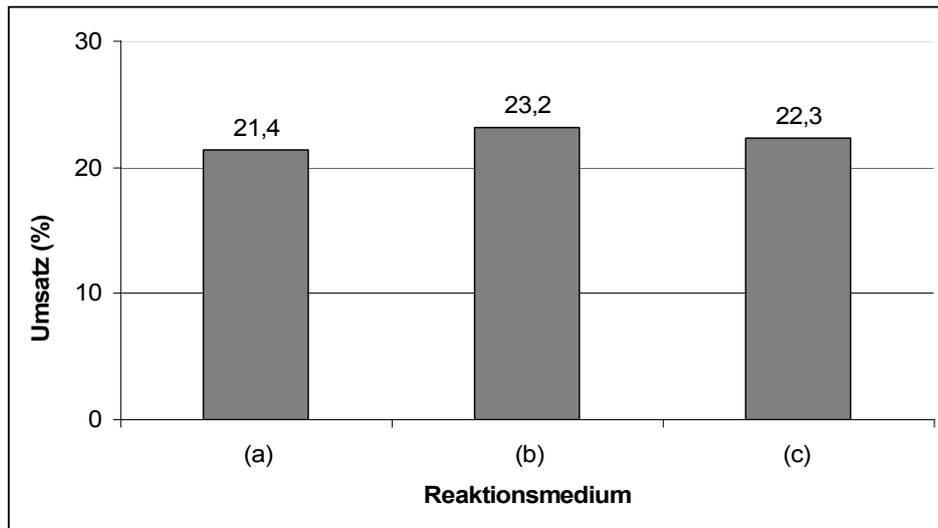


Abbildung 17: Umsatzraten der Hydrolyse von 2-Heptyloctanoat in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Reaktionsmediums  
a) Kaliumphosphat-Puffer  
b) Kaliumphosphat-Puffer : 12 mM Natrium-Taurocholat-Lösung (1:1; v/v)  
c) Kaliumphosphat-Puffer : 24 mM Natrium-Taurocholat-Lösung (1:1; v/v)

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, hatte die Verwendung von Natrium-Taurocholat zur Erhöhung der Löslichkeit von 2-Heptyloctanoat im Reaktionsmedium keinen Einfluss auf die Aktivität des verwendeten Enzyms bzw. die Umsatzrate der Hydrolyse.

Die für die Acetate erzielten hohen Umsatzraten und Enantioselektivitäten stimmten mit den kürzlich gezeigten Daten von *Patel et al. (2000)* und *Dlugy und Wolfson (2007)* überein. Die mit steigender Kettenlänge der Ester sinkenden Umsatzraten und die daraus resultierenden niedrigen optischen Reinheiten der (S)-Ester erwiesen sich jedoch als nicht geeignet für die Gewinnung der kompletten Reihe an homologen 2-Alkylestern im präparativen Maßstab.

## 4.2.5 Gewinnung optisch reiner 2-Alkylester

Die Vorversuche im Mikromaßstab zeigten, dass aufgrund der hohen Umsatzraten und Enantioselektivitäten die Lipase-katalysierte Racematspaltung der sekundären Alkohole mittels immobilisierter *Candida antarctica* Lipase B (CALB imm) geeignet ist zur Gewinnung optisch reiner Passionsfrucht-typischer (*R*)-2-Alkylester. Durch Übertragung der erarbeiteten Ergebnisse auf einen präparativen Maßstab sollten die Ester in quantitativen Ausbeuten gewonnen werden, die weiterführende Untersuchungen, wie z.B. polarimetrische Messungen oder sensorische Bewertungen ermöglichen.

Weitere Vorteile der Veresterungsreaktion spiegeln sich in der kommerziellen Verfügbarkeit und dem direkten Einsatz der Substrate sowie der Durchführung in organischem Lösungsmittel wider, wodurch die im Vergleich zur Hydrolysereaktion nötigen Synthesen der Substrate und Extraktionsschritte aus dem wässrigen Medium entfallen. Zur verlustärmeren Wiedergewinnung der Produkte aus dem Reaktionsprozess wurde aufgrund des niedrigeren Siedepunktes (wasserfreies) Pentan anstatt Heptan als Reaktionsmedium gewählt. Vorversuche hatten gezeigt, dass der Wechsel des verwendeten organischen Lösungsmittels keine Veränderung der Enantioselektivität des Enzyms bewirkt.

### 4.2.5.1 Gewinnung der (*R*)-2-Alkylester

Die entwickelte Methode zur Gewinnung der optisch reinen Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt. Zur Herstellung der (*R*)-Ester wurde ein äquimolarer Ansatz (15 mmol) von sekundärem Alkohol und Carbonsäure sowie CALB imm als Biokatalysator verwendet. Nach Abschluss der Reaktion und schonendem Einengen der Reaktionslösung an einer Vigreux-Kolonne erfolgte eine säulenchromatographische Auftrennung der Komponenten. Durch die Verwendung einer Kieselgel/Aluminiumoxid-Mischung (1:1) konnte die nicht umgesetzte Säure, die zu einer Kontamination sowohl der Ester- als auch der Alkoholfraktion führen würde, durch Adsorption an das Säulenmaterial entfernt werden. Dass die Verwendung von Aluminiumoxid als Adsorbens keine

Veränderung der Ausbeuten oder Verteilung der zu trennenden Verbindungen bewirkt, wurde von *Renner (1979)* beschrieben.

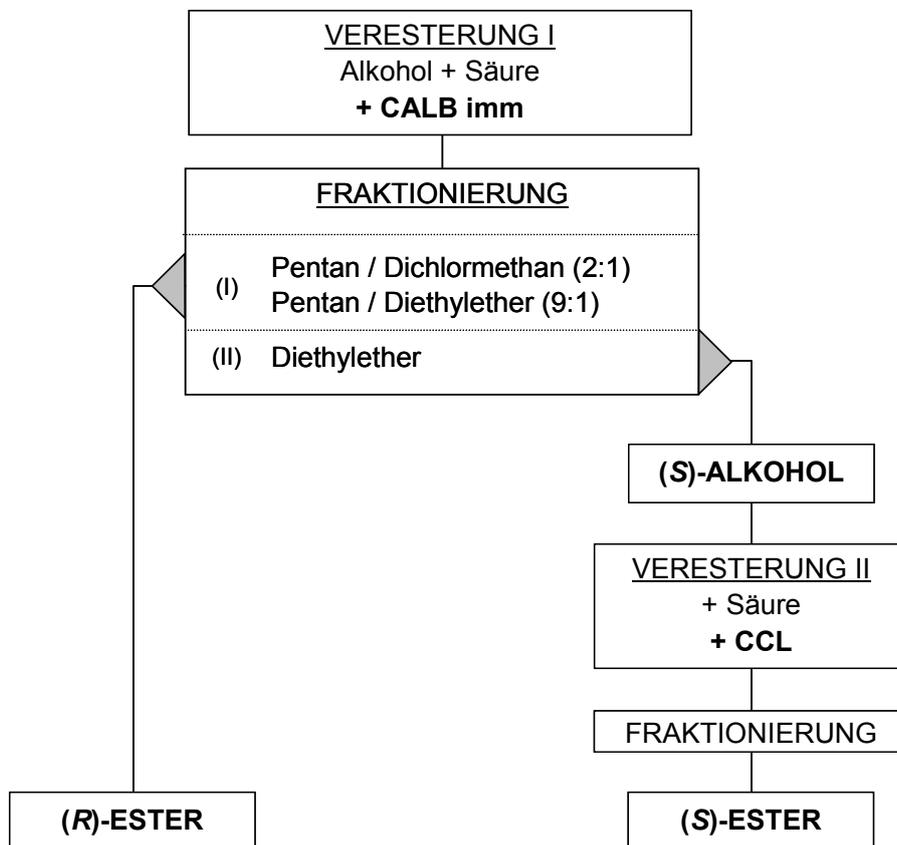


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Gewinnung optisch reiner bzw. angereicherter Passionsfrucht-typischer 2-Alkylester.

Die synthetisierten (*R*)-Ester wurde nach schonender Entfernung des leichtflüchtigen Elutionsmittels an einer Vigreux-Kolonnen als chemisch reine Substanzen gewonnen. Die erzielten Ausbeuten sowie die chemischen und optischen Reinheiten der Produkte sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die (*R*)-Ester wurden als optisch reine Substanzen gewonnen ( $ee > 99,9\%$ ). Die im Vergleich zu den Veresterungen im Mikromaßstab für alle Ester erhaltenen leicht niedrigeren maximalen Enantiomerenüberschüsse ( $ee$  99,1 - 99,9 %) könnten zum einen auf den Wechsel des Lösungsmittels (Pentan statt Heptan) zurückgeführt werden. Die Beeinflussung der Enantioselektivität von CALB durch Beschaffenheit des Mediums wurde von *Orrenius et al. (1995)* beschrieben. Das Verfahren des

„Medium-Engineerings“ zur Optimierung u.a. der Stereoselektivität von Enzymkatalysierten Synthesen wurde kürzlich umfassend zusammengefasst (*Carrea und Riva, 2008*). Zum anderen könnte ein optimiertes Enzym-Substrat-Verhältnis durch die im präparativen Maßstab vergleichsweise geringere eingesetzte Enzymmenge als Ursache gesehen werden.

Tabelle 13: Ausbeuten sowie chemische und optische Reinheiten der gewonnenen (*R*)-2-Alkylester

<b>(<i>R</i>)-Ester</b>	<b>(<i>R/S</i>)-Alkohol<sup>a</sup></b>	<b>Ausbeute</b>	<b>Ausbeute</b>	<b>chem. Reinheit<sup>b</sup></b>	<b>opt. Reinheit<sup>c</sup></b>
	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(mol%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
2-Pentylacetat	1,32	0,81	41,5	99,7	> 99,9
2-Pentylbutanoat	1,32	1,02	43,2	99,7	> 99,9
2-Pentylhexanoat	1,32	1,21	43,4	99,3	> 99,9
2-Pentyl octanoat	1,32	1,40	43,6	99,0	> 99,9
2-Heptylacetat	1,74	1,04	43,8	99,5	> 99,9
2-Heptylbutanoat	1,74	1,27	45,6	99,6	> 99,9
2-Heptylhexanoat	1,74	1,47	45,8	99,7	> 99,9
2-Heptyl octanoat	1,74	1,57	43,2	99,2	> 99,9
2-Nonylacetat	2,16	1,16	41,4	99,8	> 99,9
2-Nonylbutanoat	2,16	1,29	40,0	99,7	> 99,9
2-Nonylhexanoat	2,16	1,46	40,2	99,7	> 99,9
2-Nonyl octanoat	2,16	1,78	43,8	99,1	> 99,9

Herstellungs- und GC-Bedingungen siehe Material & Methoden

<sup>a</sup> zur Racematspaltung eingesetzter racemischer Alkohol.

<sup>b</sup> ermittelt durch kapillargaschromatographische Analyse.

<sup>c</sup> kapillargaschromatographisch ermittelter Enantiomerenüberschuss (*ee*) des Esters.

Im Vergleich zu anderen Studien lag der Fokus dieser Arbeit neben der Stereoselektivität vor allem auf der effektiven Gewinnung der chemisch reinen Produkte. Die maximale Ausbeute an optisch reinen Substanzen kann bei der konventionellen kinetischen Racematspaltung lediglich 50 % (entspricht 50 mol%) betragen. Die erhaltenen Ausbeuten (für alle gewonnenen Ester > 40 mol%) sowie die chemischen Reinheiten (> 99 %) demonstrieren, dass das durchgeführte Aufarbeitungs- und Fraktionierungsverfahren eine effektive Trennung der Reaktionskomponenten bei lediglich geringen Verlusten garantiert. Die beschriebene säulenchromatographische Aufreinigung bietet eine geeignete Alternative zu bereits beschriebenen Methoden (*Gerlach und Schreier, 1989*;

*Irimescu et al., 2003; Berkessel et al., 2006*). Die bekannten Vorteile von immobilisierten Enzymen, wie z.B. der einfachen Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch sowie der hohen Stabilität, konnten durch das angewandte Verfahren für immobilisierte *Candida antarctica* Lipase B bestätigt werden (*Bornscheuer, 2003*). Die Mehrfachverwendung des Enzyms wurde durch einen erneuten Einsatz der wiedergewonnenen Lipase in einem Testansatz untersucht, wobei weder Einbußen in der Aktivität noch in der Enantioselektivität festgestellt werden konnten.

#### 4.2.5.2 Gewinnung der (S)-2-Alkylester

Die Ergebnisse der Hydrolysereaktionen im Mikromaßstab zeigten, dass dieser Reaktionsweg nicht geeignet ist zur präparativen Gewinnung der kompletten Reihe an Passionsfrucht-typischen 2-Alkylestern. Eine Möglichkeit der Enzymkatalysierten Herstellung optisch reiner (S)-Ester bietet die Verwendung so genannter „Anti-Kazlauskas“-Lipasen. Allerdings sind nur wenige Lipasen bekannt, die entgegengesetzte Stereoselektivität hinsichtlich der Kazlauskas-Regel zeigen. In den meisten Fällen sind sie nicht kommerziell erhältlich und somit nur durch großen Aufwand zu gewinnen (*Bosch et al., 2004; Nagy et al., 2006*). Die Enantiopräferenz von (S)-konfigurierten sekundären Alkoholen wurde für *Candida cylindracea* Lipase (*Ueji et al., 1992*) sowie kürzlich für Weizenkeim-Lipase (*Xia et al., 2009*) gezeigt. Jedoch wurden für aliphatische Substrate nur sehr geringe Umsatzraten und Enantioselektivitäten erzielt. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch für die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Enzympräparate erhalten.

Eine Alternative zur kinetischen Racematspaltung stellt die Gewinnung der (S)-Ester mittels einer unspezifischen Lipase ausgehend von einem bereits optisch reinen bzw. angereicherten Alkohol dar. Wie in Abbildung 18 veranschaulicht, wurde somit der in der enantioselektiven Veresterung mit CALB imm nicht umgesetzte, aber dafür stark optisch angereicherte (S)-Alkohol nach Wiedergewinnung aus dem Reaktionsprozess als Substrat für eine erneute Veresterung eingesetzt. Aufgrund des im Enzymscreening gezeigten hohen Umsatzes bei unselektiver Umsetzung wurde hierfür Lipase *Candida cylindracea* (CCL) als Biokatalysator gewählt. Nach Beendigung der Reaktion und erneuter Trennung der Reaktionskomponenten mittels Fraktionierung an Kieselgel-

Aluminiumoxid (1:1) wurde der optisch angereicherte (*S*)-Ester als chemisch reine Substanz gewonnen.

Abbildung 19 zeigt exemplarisch den stereochemischen Verlauf der CCL-katalysierten Wiederveresterung des optisch angereicherten sekundären Alkohols 2-Heptanol mit Buttersäure. Als Produkt der Umsetzung wurde optisch angereichertes 2-Heptylbutanoat mit einem Enantiomerenverhältnis von 91 % (*S*) : 9 % (*R*) erhalten.

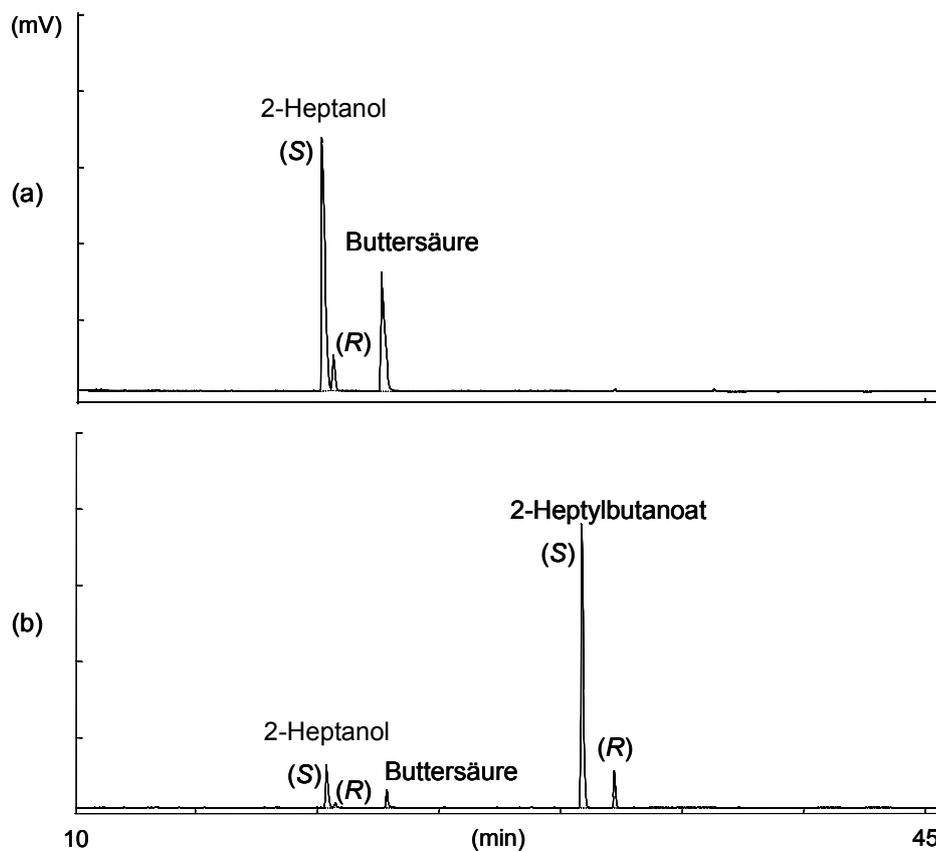


Abbildung 19: CCL-katalysierte Wiederveresterung von optisch angereichertem 2-Heptanol mit Buttersäure (GC-Bedingungen siehe Material & Methoden)

a) vor Enzymzugabe  
b) nach 120 h Reaktionszeit

Mittels der gezeigten Methode konnte die komplette Reihe der homologen (*S*)-Alkylester mit optischen Reinheiten von 81,4 % bis 88,2 % gewonnen werden (Tabelle 14). Aufgrund der hohen Umsatzraten sowie der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurden wie bei der Gewinnung der (*R*)-2-Alkylester ebenfalls Ausbeuten > 40 mol% und sehr hohe chemische Reinheiten erzielt.

Tabelle 14: Ausbeuten sowie chemische und optische Reinheiten der gewonnenen (S)-2-Alkylester

(S)-Ester	Ausbeute	Ausbeute	chem. Reinheit <sup>a</sup>	opt. Reinheit <sup>b</sup>
	(g)	(mol%)	(%)	(%)
2-Pentylacetat	0,78	40,0	99,6	81,4
2-Pentylbutanoat	0,96	40,4	99,5	83,9
2-Pentylhexanoat	1,13	40,3	99,6	83,1
2-Pentyl octanoat	1,34	41,7	99,0	83,7
2-Heptylacetat	0,95	40,1	99,0	82,6
2-Heptylbutanoat	1,23	43,9	99,3	82,7
2-Heptylhexanoat	1,37	42,6	99,7	86,9
2-Heptyl octanoat	1,46	40,1	99,2	82,3
2-Nonylacetat	1,14	40,9	99,8	82,9
2-Nonylbutanoat	1,30	40,7	99,9	88,2
2-Nonylhexanoat	1,46	40,1	99,8	84,3
2-Nonyl octanoat	1,83	45,1	99,4	84,0

Herstellungs- und GC-Bedingungen siehe Material & Methoden

<sup>a</sup> ermittelt durch kapillargaschromatographische Analyse.

<sup>b</sup> kapillargaschromatographisch ermittelter Enantiomerenüberschuss (*ee*) des Esters.

#### 4.2.5.3 Polarimetrische Untersuchung der gewonnenen Ester

Enantiomere besitzen identische chemische und physikalische Eigenschaften, mit der Ausnahme ihrer Wechselwirkung mit linear polarisiertem Licht. Dieses physikalische Phänomen wird als optische Aktivität bezeichnet. Die Enantiomere drehen die Schwingungsebene um denselben Betrag, aber in unterschiedliche Richtungen. Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich bei den (*R*)-Alkylestern um linksdrehende Verbindungen handelt, während die (*S*)-konfigurierten Ester die Schwingungsebene linear polarisierten Lichtes nach rechts drehen (*Mosandl und Deger, 1987*). Allerdings wurden die spezifischen Drehwinkel  $\alpha_D$  bislang noch nicht beschrieben. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Herstellungsverfahren konnten die optisch reinen (*R*)-2-Alkylester bzw. die optisch angereicherten (*S*)-Alkylester als chemisch reine Substanzen sowie in hohen quantitativen Ausbeuten gewonnen werden, was eine polarimetrische Analyse der einzelnen Enantiomere

ermöglichte. Die gemessenen spezifischen Drehwinkel  $\alpha_D$  der 2-Alkylester sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Spezifische Drehwinkel  $\alpha_D$  der gewonnenen (R)- und (S)-2-Alkylester

	(R)-Ester		(S)-Ester		
	opt. Reinheit	$\alpha_D^a$	opt. Reinheit	$\alpha_D^b$	$\alpha_{D \text{ calc.}}^c$
	(%)	( $^\circ$ )	(%)	( $^\circ$ )	( $^\circ$ )
2-Pentylacetat	> 99,9	- 16,01	81,4	+ 13.08	+ 13.03
2-Pentylbutanoat	> 99,9	- 16,61	83,9	+ 14.02	+ 13.94
2-Pentylhexanoat	> 99,9	- 15,01	83,1	+ 12.49	+ 12.47
2-Pentyl octanoat	> 99,9	- 13,43	83,7	+ 11.22	+ 11.24
2-Heptylacetat	> 99,9	- 6,32	82,6	+ 5.29	+ 5.22
2-Heptylbutanoat	> 99,9	- 9,40	82,7	+ 7.81	+ 7.77
2-Heptylhexanoat	> 99,9	- 9,45	86,9	+ 8.37	+ 8.22
2-Heptyl octanoat	> 99,9	- 8,88	82,3	+ 7.44	+ 7.31
2-Nonylacetat	> 99,9	- 4,51	82,9	+ 3.67	+ 3.74
2-Nonylbutanoat	> 99,9	- 7,27	88,2	+ 6.51	+ 6.41
2-Nonylhexanoat	> 99,9	- 8,19	84,3	+ 6.77	+ 6.90
2-Nonyl octanoat	> 99,9	- 7,89	84,0	+ 6.61	+ 6.63

Bedingungen siehe Material & Methoden

<sup>a</sup> gemessener spezifischer Drehwinkel

<sup>b</sup> um den Enantiomerenanteil des (R)-Esters verringerter gemessener spezifischer Drehwinkel.

<sup>c</sup> berechneter spezifischer Drehwinkel [ $\alpha_{D \text{ calc.}} = (\alpha_D (R) \times ee (S)) / ee (R)$ ].

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die allgemeine Beschreibung der Drehrichtung der Ester von *Mosandl und Deger (1987)*. Bei den (R)-2-Alkylestern handelt es sich um linksdrehende, bei den (S)-Eestern um rechtsdrehende Verbindungen. Allgemein lässt sich der Trend feststellen, dass die Drehwinkel mit zunehmender Kettenlänge der Ester abnehmen. Zur Kontrolle der Messwerte wurden die Drehwinkel der (S)-Alkylester über ihre Enantiomerenüberschüsse und die bereits für die optisch reinen (R)-Enantiomere erhaltenen Drehwerte berechnet.

#### 4.2.6 Zusammenfassung

Die Lipase-katalysierte kinetische Racematspaltung mittels Veresterung der sekundären Alkohole 2-Pentanol, 2-Heptanol und 2-Nonanol in organischem Lösungsmittel sowie die Hydrolyse der Acetate, Butanoate, Hexanoate und Octanoate in wässrigem Medium bestätigte die beschriebene hohe Aktivität und Enantioselektivität von *Candida antarctica* Lipase B (Anderson et al., 1998; Bornscheuer und Kazlauskas, 2006). Basierend auf den Ergebnissen eines Enzymscreenings und den Versuchen im Mikromaßstab wurde folgende Methode zur Gewinnung der optisch reinen Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester im präparativen Maßstab entwickelt:

- (I) Gewinnung der optisch reinen (*R*)-2-Alkylester ausgehend von den racemischen sekundären Alkoholen mittels Lipase-katalysierter kinetischer Racematspaltung und *Candida antarctica* Lipase B als Biokatalysator.
- (II) Säulenchromatographische Trennung der gewonnenen Produkte und der nicht umgesetzten Substrate an Kieselgel/Aluminiumoxid (1:1).
- (III) Gewinnung der optisch angereicherten (*S*)-2-Alkylester durch Wiederveresterung der nicht umgesetzten Alkohole mit unselektiver *Candida cylindracea* Lipase.

Aufgrund der hohen Enantioselektivität der *Candida antarctica* Lipase B wurden die (*R*)-2-Alkylester als optisch reine Substanzen gewonnen. Darüber hinaus wurde durch die hohen Umsätze der kinetischen Racematspaltung eine starke optische Anreicherung der nicht umgesetzten Alkohole erhalten. Durch gezielte Wiederveresterung der aufgereinigten Alkohole mit der unselektiven Lipase *Candida cylindracea* konnten die (*S*)-Alkylester in optisch angereicherter Form ( $ee > 81\%$ ) gewonnen werden. Durch die säulenchromatographische Abtrennung der Ester aus dem Reaktionsgemisch an Kieselgel/Aluminiumoxid (1:1) wurden die Ester als chemisch reine Substanzen erhalten. Aufgrund der erhaltenen Estermengen und der hohen chemischen Reinheiten konnten zum ersten Mal die spezifischen Drehwinkel  $\alpha_D$  der einzelnen Ester beschrieben werden. Das linksdrehende Verhalten der (*R*)-2-Alkylester und die rechtsdrehende Eigenschaft der (*S*)-2-Alkylester wurden bestätigt (Mosandl und Deger, 1987).

Die Gesamtausbeuten an (*R*)- und (*S*)-Ester von bis zu 90 mol% zeigen, dass das entwickelte Verfahren eine sehr effiziente Methode zur Gewinnung optisch reiner

bzw. angereicherter Ester darstellt. Durch die Wiedergewinnung und erneute Veresterung des im ersten Reaktionsschritt nicht umgesetzten Substrates konnte die limitierende Eigenschaft der konventionellen kinetischen Racematspaltung wirtschaftlich genutzt werden. Darüber hinaus zeichnet sich das Verfahren durch einen geringen Arbeits- und Kostenaufwand aus.

## 4.3 SENSORISCHE BEWERTUNG DER 2-ALKYLESTER

### 4.3.1 Einleitung

Aufgrund ihres angenehmen exotischen Aromas zählen Passionsfrüchte zu den beliebtesten tropischen Früchten. Mit ihrer angenehmen blumig-fruchtigen Note unterscheiden sich rote Passionsfrüchte deutlich von der gelben Varietät, die ein eher typisch schweflig-exotisches Aroma besitzt (*Engel und Tressl, 1983*). In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl an flüchtigen Aromastoffen identifiziert, die einen Beitrag zum Gesamtaroma der roten und gelben Passionsfrüchte leisten (*Whitfield and Last, 1986; Shibamoto and Tang, 1990*).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die chiralen 2-Alkylester charakteristische flüchtige Verbindungen in roten Passionsfrüchten darstellen und nahezu ausschließlich als (*R*)-Enantiomere vorliegen.

Es ist bekannt, dass sich Enantiomere in ihren sensorischen Eigenschaften unterscheiden können. Dabei können sowohl Unterschiede hinsichtlich der Geruchsqualitäten als auch der Geruchsintensitäten auftreten. Letztere werden durch den „Wahrnehmungsschwellenwert“, d.h. der Konzentration einer Substanz, bei der ein Unterschied des Geruchs im Vergleich zu einer Substanz-freien Matrix wahrgenommen werden kann, ausgedrückt (*Noble, 2002*). Einen umfangreichen Überblick der sensorischen Eigenschaften von Enantiomeren geben die Arbeiten von *Boelens et al. (1993)*, *Koppenhoefer et al. (1994)* und *Brenna et al. (2003)*. Dass sich die Enantiomere der Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester in ihren Aromaqualitäten unterscheiden und die jeweiligen (*S*)-Ester charakteristische fruchtige Ester-Noten aufweisen, wurde von *Mosandl und Deger (1987)* postuliert. Allerdings wurde der Einfluss der Enantiomere auf das Aroma der jeweiligen Racemate bislang nicht untersucht. Zudem liegen bislang keine Daten über die Geruchsschwellenwerte der homologen Enantiomere und Racemate vor.

Das Ziel dieser Arbeit war der direkte Vergleich der sensorischen Eigenschaften der homologen Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester. Hierzu wurden die mittels enantioselektiver Biokatalyse gewonnenen optisch reinen (*R*)-Ester und optisch angereicherten (*S*)-Ester sowie die Racemate untersucht. Ihre Geruchsqualitäten und -schwellenwerte wurden sowohl in Wasser als auch mittels

Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC/O) in Luft bestimmt. Abschließend sollte basierend auf diesen Ergebnissen der Beitrag der 2-Alkylester auf das Gesamtaroma roter Passionsfrüchte abgeschätzt werden.

#### 4.3.2 Bewertung mittels Gaschromatographie/Olfaktometrie (GC/O)

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Gaschromatographie/Olfaktometrie (GC/O) als effektive Methode zur sensorischen Bewertung von Aromastoffen in Lebensmitteln etabliert (*Blank, 1997; Mistry et al., 1997; d'Acampora Zellner et al., 2008; Plutowska und Wardencki, 2008*). Bei diesem Verfahren, das eine Kombination aus einer instrumentell-analytischen und einer sensorischen Methode darstellt, werden die einzelnen Substanzen zunächst kapillargaschromatographisch getrennt und anschließend am so genannten „Sniffing Port“ sensorisch bewertet. Die Kombination dieser Technik mit der von *Ullrich und Grosch (1987)* entwickelten Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) erlaubt neben der Ermittlung von Schlüsselaromastoffen aus einer komplexen Lebensmittelmatrix auch die Bestimmung von Geruchsschwellenwerten von Referenzsubstanzen. Hierbei wird der Extrakt bzw. die Stammlösung so lange schrittweise verdünnt und abgerochen, bis kein Geruch mehr festgestellt werden kann. Die Konzentration des Aromastoffes ist folglich unter seine Geruchsschwelle gesunken.

Die sensorische Bewertung von Enantiomeren kann ausgehend von einem Racemat durch Trennung der Stereoisomere an einer geeigneten chiralen Phase durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz enantiomerenreiner Verbindungen. Da die 2-Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester mittels der in Kapitel 4.2.5.1 beschriebenen Methode als optisch reine Verbindungen (*R*)-Enantiomere (ee > 99,9 %) gewonnen wurden, konnten diese direkt unter Verwendung einer achiralen Phase untersucht werden. Die erhaltenen sensorischen Eigenschaften wurden mit denen der jeweiligen Racemate verglichen.

Tabelle 16: Sensorische Bewertung der (*R*)-Enantiomere und Racemate der 2-Alkylester mittels achiraler GC/O

	<b>Geruchsqualität<sup>a</sup></b>		<b>Geruchsschwellenwert<sup>b</sup></b> (ng/l Luft)
2-Pentylacetat	( <i>R</i> )	fruchtig, frisch	175 - 350
	( <i>R,S</i> )	fruchtig (Ananas, Birne)	175 - 350
2-Pentylbutanoat	( <i>R</i> )	tropisch, Banane	700 - 1400
	( <i>R,S</i> )	tropisch, Banane	700 - 1400
2-Pentylhexanoat	( <i>R</i> )	tropisch, muffig	700 - 1400
	( <i>R,S</i> )	tropisch, Banane, leicht blumig	1400 - 2800
2-Pentyl-octanoat	( <i>R</i> )	leicht fruchtig, säuerlich	5600 - 11200
	( <i>R,S</i> )	leicht fruchtig, dumpf säuerlich	5600 - 11200
2-Heptylacetat	( <i>R</i> )	fruchtig, leicht säuerlich	90 - 180
	( <i>R,S</i> )	fruchtig, säuerlich, blumig	90 - 180
2-Heptylbutanoat	( <i>R</i> )	tropisch, Banane	350 - 700
	( <i>R,S</i> )	tropisch, Banane, leicht blumig	350 - 700
2-Heptylhexanoat	( <i>R</i> )	chemisch, dumpf fruchtig	1400 - 2800
	( <i>R,S</i> )	muffig, dumpf fruchtig (überreif)	1400 - 2800
2-Heptyl-octanoat	( <i>R</i> )	unspezifisch, frisch	11200 - 22400
	( <i>R,S</i> )	ethanolisch, frisch	22400 - 44800
2-Nonylacetat	( <i>R</i> )	blumig, seifig	90 - 180
	( <i>R,S</i> )	blumig, stechend, dumpf seifig	90 - 180
2-Nonylbutanoat	( <i>R</i> )	fruchtig, süß, Banane	1400 - 2800
	( <i>R,S</i> )	dumpf fruchtig, Banane	1400 - 2800
2-Nonylhexanoate	( <i>R</i> )	Lösungsmittel, leicht muffig	5600 - 11200
	( <i>R,S</i> )	Lösungsmittel, leicht schweißig	11200 - 22400
2-Nonyl-octanoat	( <i>R</i> )	Lösungsmittel, frisch	22400 - 44800
	( <i>R,S</i> )	leicht Lösungsmittel, frisch	44800 - 89600

GC-Bedingungen siehe Material & Methoden

<sup>a</sup> Geruchsqualität der Stammlösungen (Racemat 130 µg/µl; (*R*)-Ester 65 µg/µl).

<sup>b</sup> niedriger Wert entspricht der nicht mehr wahrgenommenen Konzentration, hoher Wert entspricht der gerade noch wahrgenommenen Konzentration.

Die in Tabelle 16 gegenübergestellten Aromaqualitäten zeigen eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den (*R*)-Enantiomeren und den entsprechenden Racematen. Im Allgemeinen wurden die kurzkettigen Ester vorwiegend mit fruchtigen und blumigen Noten beschrieben. Verglichen mit den Acetaten war der fruchtige Charakter bei den Butanoaten deutlich intensiver ausgeprägt und wurde unanhängig von der Alkohol-Komponente als tropisch und an Bananen erinnernd beschrieben. Ein übereinstimmendes Ergebnis für die 2-Pentylester wurde von *Shiota (1993)* gezeigt, die das racemische Acetat ebenfalls als fruchtig mit einer Birnen-Bananen-Note und das Butanoat als Bananen-ähnlich beschrieben. Die Geruchsqualitäten der homologen Aromastoffe veranschaulichen, dass mit steigender Kettenlänge der Ester der fruchtige Charakter abnimmt und dafür die Dominanz unangenehmer Noten, wie z.B. muffig, chemisch und Lösungsmittel-ähnlich, zunimmt. Dieser Trend konnte durch die aus der Literatur bekannten Daten für aliphatische Ester bestätigt werden. *Boelens et al. (1983)* beschrieben Ester mit einer Säureeinheit von C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> ebenfalls als fruchtiger als Ester mit C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> und beobachteten eine deutliche Abnahme des fruchtigen Charakters bei Säureeinheiten größer als C<sub>6</sub>.

Für die Geruchsschwellen wurden Bereiche angegeben, wobei der höhere Wert der Konzentration entspricht, bei der die Substanz gerade noch wahrgenommen wurde. Der niedrigere Wert beschreibt die Konzentration, bei der kein Geruch mehr feststellbar war. Wie auch bei den Geruchsqualitäten konnten hier ebenfalls große Übereinstimmungen zwischen den optisch reinen (*R*)-Enantiomeren und den racemischen 2-Alkylestern beobachtet werden. In den Fällen, in denen unterschiedliche Geruchsschwellen erhalten wurden, beschränkten sich die Abweichungen lediglich auf eine Verdünnungsstufe. Hinsichtlich der Geruchsschwellen wurde ein klarer Trend beobachtet: Innerhalb einer Alkohol-Gruppe nehmen die Werte mit steigender Kettenlänge der Ester zu. Für die Acetate von 2-Heptanol und 2-Nonanol wurden die niedrigsten Geruchsschwellen bestimmt (90-180 ng/l Luft), während für das racemische 2-Nonyloctanoat ein 500-fach höherer Wert (44800-89600 ng/l Luft) erhalten wurde.

Aufgrund ihrer Enantiomerenüberschüsse (*ee* > 81 %) konnte die Untersuchung der (*S*)-Ester mittels der achiralen GC/O-Methode nicht durchgeführt werden, da bereits kleine Kontaminationen der geruchsaktiven (*R*)-Enantiomere zu

Verfälschungen der sensorischen Eindrücke führen könnten. Die Bewertung von nicht optisch reinen Verbindungen setzt eine Trennung der Enantiomere an einer geeigneten chiralen stationären Phase voraus. Aufgrund ihrer ungewöhnlich hohen Trennleistung für kurz-kettige 2-Alkylester (Tabelle 6) wurde die von *Takahisa et al. (2005a)* neuartig modifizierte Oktakis(2,3-di-O-methoxymethyl-6-O-tert-butyl-dimethyl-silyl)- $\gamma$ -CD-Phase gewählt. Abbildung 20 veranschaulicht, dass durch Verwendung dieser chiralen stationären Phase eine Trennung der Enantiomere auch bei den zur Sensorik benötigten hohen Konzentrationen erreicht werden konnte. Die Konzentrationen entsprechen den für 2-Pentylacetat und 2-Pentylhexanoat ermittelten höchsten (a und c) sowie niedrigsten (b und d) Geruchsschwellenwerten (Tabelle 17).

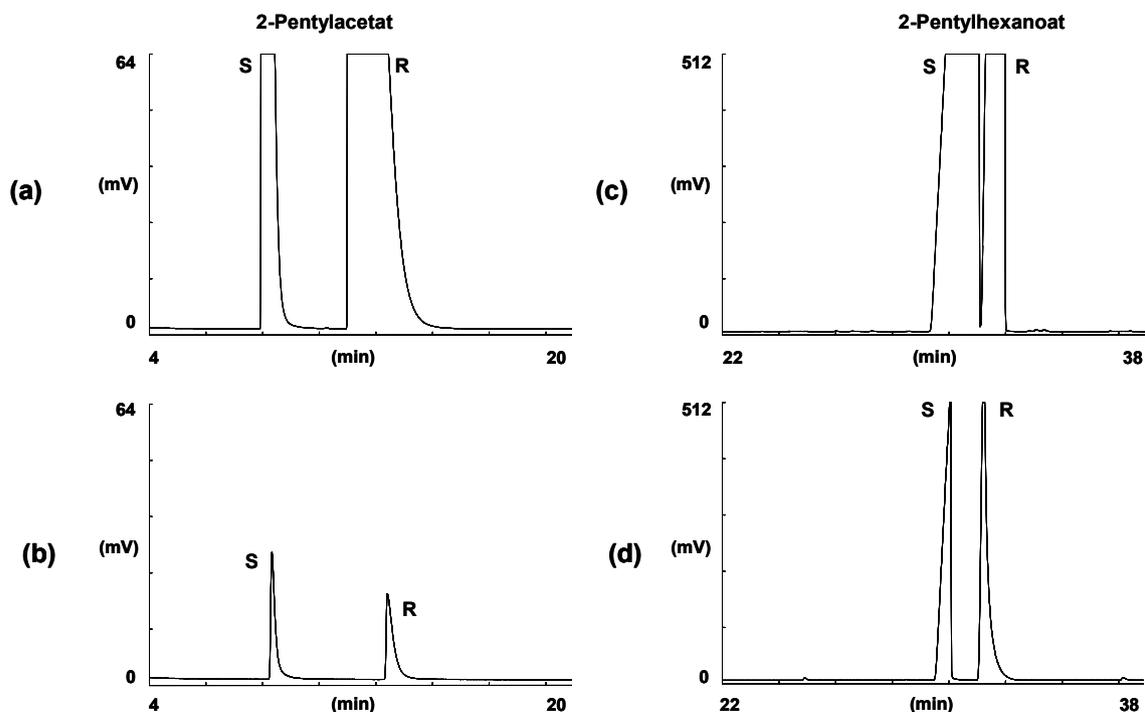


Abbildung 20: Kapillargaschromatographische Trennung der Enantiomere von 2-Pentylacetat und 2-Pentylhexanoat auf 2,3-MOM-6-TBDMS- $\gamma$ -CD (Temperaturprogramm: 40°C/2 min //2°C/min//200°C/10 min)

Weitere GC-Bedingungen siehe Material & Methoden (GC-System 3).

- a) 2-Pentylacetat: Konzentration entspricht 11200 ng/l Luft.
- b) 2-Pentylacetat: Konzentration entspricht 175 ng/l Luft.
- c) 2-Pentylhexanoat: Konzentration entspricht 34000 ng/l Luft.
- d) 2-Pentylhexanoat: Konzentration entspricht 2150 ng/l Luft.

Die Geruchsqualitäten und Schwellenwerte der kurz-kettigen (*S*)- und (*R*)-2-Alkylester, für die mittels der verwendeten chiralen Phase eine ausreichende Enantiomerentrennung erreicht wurde, sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Die sensorische Bewertung der getrennten Enantiomerenpaare der 2-Alkylester zeigt deutliche Unterschiede der Geruchsqualitäten und auch Schwellenwerte. Mit Ausnahme von 2-Heptylacetat dominierten die (*R*)-Enantiomere durch einen intensiveren fruchtigen Charakter. Die Untersuchungen von *Jordán et al. (2001)* untermauern diesen Trend, die flüchtige Verbindungen eines Bananen-Extraktes mittels GC/O analysierten und 2-Pentylacetat als krautig, süß und blumig beschrieben. Das natürliche Vorkommen dieser Verbindung in Bananen als nahezu optisch reiner (*S*)-Ester ist bekannt (*Gessner et al., 1998; Fröhlich et al., 1989; Bernreuther, 1992; Schubert et al., 1991*).

Zudem wurden für die (*R*)-Enantiomere bis zu 16-fach niedrigere Geruchsschwellenwerte im Vergleich zu den jeweiligen (*S*)-Enantiomeren bestimmt.

Tabelle 17: Sensorische Bewertung der (*S*)- und (*R*)-2-Alkylester mittels chiraler GC/O

		Geruchsqualität <sup>a</sup>	Geruchsschwellenwert <sup>b</sup> (ng/l Luft)
2-Pentylacetat	( <i>S</i> )	fruchtig (Apfel), grün, würzig	5600 - 11200
	( <i>R</i> )	fruchtig (Ananas, Birne)	175 - 350
2-Pentylbutanoat	( <i>S</i> )	schwach tropisch, Banane	2800 - 5600
	( <i>R</i> )	tropisch, Banane	700 - 1400
2-Pentylhexanoat	( <i>S</i> )	schwach fruchtig	17200 - 34000
	( <i>R</i> )	tropisch, Banane, schwach blumig	2150 - 4300
2-Heptylacetat	( <i>S</i> )	fruchtig, grün, schwach würzig	1400 - 2800
	( <i>R</i> )	würzig, krautig, blumig	350 - 700
2-Heptylbutanoat	( <i>S</i> )	schwach fruchtig	8600 - 17200
	( <i>R</i> )	tropisch, Banane, schwach blumig	2150 - 4300

GC-Bedingungen siehe Material & Methoden

<sup>a</sup> Geruchsqualität der Stammlösungen (2-Pentylacetat, -butanoat, 2-Heptylacetat: 130 µg/µl; 2-Pentylhexanoat, 2-Heptylbutanoat: 100 µg/µl).

<sup>b</sup> niedriger Wert entspricht der nicht mehr wahrgenommenen Konzentration, hoher Wert entspricht der gerade noch wahrgenommenen Konzentration.

Die Untersuchung der racemischen Verbindungen bestätigte die bereits beschriebenen sensorischen Eigenschaften der optisch reinen (*R*)-Enantiomere (Tabelle 16). Der Vergleich der mittels achiraler und chiraler GC/O erhaltenen

Geruchsschwellen zeigte eine maximale Abweichung um lediglich zwei Verdünnungsstufen.

Der von *Mosandl und Deger (1987)* postulierte Trend, dass sich die (S)-Enantiomere durch deutlich fruchtigere Noten auszeichnen, konnte durch die mittels GC/O erhaltenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Die Untersuchungen zeigten vielmehr, dass die (R)-Ester aufgrund ihres stärker ausgeprägten fruchtigen Charakters und ihrer niedrigeren Geruchsschwellenwerte eine größere Aromarelevanz aufweisen und das Aroma der Racemate prägen.

### 4.3.3 Orthonasale Bewertung in Wasser

Die Wahrnehmung von Aromastoffen wird von einer Vielzahl an Faktoren beeinflusst, wie z.B. der angewandten Bestimmungsmethode oder den jeweiligen Untersuchungsbedingungen (Medium, Temperatur, Lichtverhältnisse) (*Van Toller, 1993; Buttery, 1999; Noble, 2002*). Um eine umfangreichere Aussage bezüglich der organoleptischen Eigenschaften der 2-Alkylester zu erhalten, wurde deshalb eine weitere Methode zur sensorischen Bewertung der flüchtigen Verbindungen angewendet. Hierbei wurden die Geruchsqualitäten und Schwellenwerte der mittels Lipase-katalysierter Racematspaltung gewonnenen optisch reinen (R)-Enantiomere bzw. der angereicherten (S)-Enantiomere und der Racemate in Wasser bestimmt. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Kontamination mit weiteren geruchsaktiven Substanzen konnte aufgrund der hohen chemischen Reinheiten der 2-Alkylester (> 99 %) nahezu ausgeschlossen werden.

Im Rahmen eines Sensorik-Panels wurden die Aromaqualitäten verglichen und nach dem Verfahren der „Forced-Choice“-Technik durch Dreiecksprüfung („Triangeltest“) die orthonasalen Geruchsschwellenwerte bestimmt. Die Ergebnisse der sensorischen Bewertungen der 2-Alkylester in Wasser sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Orthonasale Geruchsqualitäten und Geruchsschwellenwerte der 2-Alkylester in Wasser

		Geruchsqualität <sup>a</sup>	Geruchsschwellenwert (µg/l Wasser)
2-Pentylacetat	(S)	leicht erdig, Walnuss	52
	(R)	fruchtig, frisch, Kleber	7
	(R,S)	fruchtig, frisch	46
2-Pentylbutanoat	(S)	süß, blumig	46
	(R)	fruchtig, Banane	138
	(R,S)	fruchtig, künstlich	82
2-Pentylhexanoat	(S)	weich, leicht fruchtig	82
	(R)	Lösungsmittel, Radieschen	232
	(R,S)	Radieschen, leicht fruchtig	1392
2-Pentyl octanoat	(S)	frisch, würzig, krautig	146
	(R)	Heu, grasig	82
	(R,S)	frisch, grasig, würzig	52
2-Heptylacetat	(S)	wässrig, schwach fruchtig	293
	(R)	Kümmel	130
	(R,S)	Kümmel, leichte Dillnote	146
2-Heptylbutanoat	(S)	künstlich fruchtig, frisch	138
	(R)	künstlich fruchtig (Banane)	232
	(R,S)	künstlich fruchtig, kühlend	55 / 58 / 62 <sup>b</sup>
2-Heptylhexanoat	(S)	Lösungsmittel, leicht muffig	116
	(R)	Lösungsmittel, muffig	174
	(R,S)	Lösungsmittel, chemisch, modrig	1171
2-Heptyl octanoat	(S)	leicht süßlich-fruchtig	929
	(R)	chemisch, frische Wandfarbe	195
	(R,S)	chemisch, Lack	1171
2-Nonylacetat	(S)	frisch, fruchtig, leicht blumig	110
	(R)	stechend, erdig, chemisch	58
	(R,S)	frisch, fruchtig, erdig	219
2-Nonylbutanoat	(S)	chemisch, künstlich fruchtig, stechend	261
	(R)	chemisch, künstlich fruchtig	261
	(R,S)	chemisch, künstlich fruchtig	310
2-Nonylhexanoate	(S)	chemisch, frische Wandfarbe, Lack	1655
	(R)	modrig, muffig	1105
	(R,S)	chemisch, modrig, leicht pilzig	3125
2-Nonyl octanoat	(S)	schwach, frische Wandfarbe	3125
	(R)	wässrig, unspezifisch	1563
	(R,S)	frische Wandfarbe, chemisch	369

Bedingungen siehe Material & Methoden

<sup>a</sup> Geruchsqualitäten der Stammlösungen (Konzentration: 100 mg/l).

<sup>b</sup> Werte von 3 Durchführungen (Standardabweichung: ± 4 µg/l)

Durch orthonasales Abriechen der wässrigen Stammlösungen konnte bei allen untersuchten 2-Alkylestern beobachtet werden, dass sich die Enantiomere in ihren Geruchsqualitäten unterscheiden. Während die Unterschiede zum Teil sehr stark ausgeprägt waren, wie z.B. im Falle des 2-Pentylbutanoats, bei dem das (S)-Enantiomer als blumig-süß und der (R)-Ester als fruchtig und Bananen-ähnlich beschrieben wurde, wurden bei einigen Estern nur Abweichungen innerhalb der Grundnote festgestellt. Die Aromaqualität des Racemates wurde bei den meisten Estern durch beide Stereoisomere geprägt. Bei einigen Estern allerdings konnte eine stärkere Dominanz der (R)-Enantiomere beschrieben werden, wie z.B. bei racemischem 2-Pentyl- und 2-Heptylacetat. Der mittels GC/O ermittelte Trend, dass die kurzkettigen Ester durch einen angenehmen, vorwiegend fruchtigen Charakter geprägt sind, der mit zunehmender Kettenlänge abnimmt, konnte durch die in Wasser erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden.

Dass sich die Enantiomere der einzelnen Ester in ihren sensorischen Eigenschaften unterscheiden, zeigen auch die ermittelten Schwellenwerte. Mit Ausnahme des 2-Nonylbutanoats wurden bei allen Verbindungen Unterschiede in der Geruchsintensität der Stereoisomere beobachtet. Die größten Schwellenwertsunterschiede wurden bei 2-Heptylhexanoat (Faktor 5) und 2-Pentylacetat (Faktor 7) festgestellt. Im Vergleich zu den mittels GC/O erhaltenen Ergebnissen konnte bei der Beurteilung in Wasser jedoch keine Regelmäßigkeit der Aromaintensität eines Enantiomers beobachtet werden. Auch ein einheitlicher Trend hinsichtlich der Prägung des Racemates konnte nicht festgestellt werden. Für racemisches 2-Pentylhexanoat wurde z.B. ein im Vergleich zu den einzelnen Enantiomeren deutlich höherer Geruchsschwellenwert erhalten, während für racemisches 2-Nonyloctanoat ein gegensätzliches Verhalten beobachtet wurde. Dies könnte auf additive bzw. suppressive Effekte der Enantiomere zurückgeführt werden (Meilgaard *et al.*, 2006). Dass die Durchführung der Methode eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Geruchsschwellenwerte erlaubt, wurde am Beispiel des racemischen 2-Heptylbutanoats gezeigt.

Die erhaltenen Geruchsschwellenwerte bestätigen, dass sich die Enantiomere der 2-Alkylester aufgrund ihrer verschiedenen Aromaqualitäten unterscheiden lassen. Die untersuchten (S)-Enantiomere lagen nicht in optisch reiner Form vor, sondern beinhalteten einen Anteil von ca. 10 % (R)-Ester. Selbst bei den Estern, bei denen die (R)-Enantiomere vergleichsweise niedrigere Geruchsschwellenwerte

aufweisen und somit als geruchsintensiver anzusehen sind, konnte keine Überlagerung des Aromas der jeweiligen (S)-Enantiomere festgestellt werden.

#### 4.3.4 Retronasale Bewertung in Wasser

Das beim Verzehr eines Lebensmittels wahrgenommene „Flavour“ stellt das Zusammenspiel von Geruchs-, Geschmacks- und Tastempfinden dar (*Belitz et al., 2008*). Hierbei kommt der retronasalen Geruchswahrnehmung, bei der die Aromastoffe über den Rachenraum zu den Geruchsrezeptoren transportiert werden, eine große Bedeutung zu (*Büttner, 2004*). Wie stark sich die orthonasalen und retronasalen Geruchsschwellenwerte voneinander unterscheiden können, zeigen die Zusammenstellungen von *Rychlik et al. (1998)* und *Belitz et al. (2008)*. Um die bereits erhaltenen Ergebnisse der sensorischen Eigenschaften zu erweitern, wurden die retronasalen Geruchsqualitäten der 2-Alkylester untersucht. Hierzu wurden wässrige Lösungen der (R)- und (S)-Enantiomere sowie der Racemate von einem geschulten Sensorik-Panel (darunter professionelle Flavoristen) verkostet und bewertet. Im Anschluss wurden die aromaintensivsten Verbindungen der Ester bestimmt.

Die Ergebnisse in Tabelle 19 zeigen, dass sich die Enantiomere der 2-Alkylester auch in ihrer retronasalen Wahrnehmung deutlich unterscheiden. Allgemein wurden die Ester vorwiegend als fruchtig und süß beschrieben, wobei auch hier mit steigender Kettenlänge der Ester eine Zunahme eher unangenehmer Noten (seifig, fettig, ranzig) beobachtet wurde. Unterschiede zwischen den Stereoisomeren wurden auch in ihrer Aromaintensität festgestellt, wobei kein eindeutiger Trend hinsichtlich eines Enantiomers erkannt werden konnte. Die retronasal wahrgenommenen Intensitäten zeigten allerdings eine sehr gute Übereinstimmung mit den orthonasal bestimmten Geruchsschwellenwerten der Enantiomere. So wurden z.B. ebenfalls (R)-2-Pentylacetat und (R)-2-Heptyloctanoat als aromaintensivere Enantiomere beschrieben. Für diese Ester wurden deutlich niedrigere orthonasale Schwellenwerte im Vergleich zu den (S)-Enantiomeren gezeigt (Tabelle 18). Auch die Ergebnisse von intensitätsgleichen Stereoisomeren (2-Nonylbutanoat und -hexanoat) konnten bestätigt werden.

Tabelle 19: Retronasale Geruchsqualitäten der 2-Alkylester in Wasser

Geruchsqualität <sup>a</sup>		
2-Pentylacetat	(S)	chemisch, fruchtig, esterig
	(R)*	fruchtig (Rhabarber), esterig, Filberton-Note, metallisch, Rum
	(R,S)	fruchtig (Rhabarber), esterig, Rum, chemisch
2-Pentylbutanoat	(S)*	schwach grün, esterig, würzig, parfümistisch
	(R)	esterig, fruchtig (Banane), holzig, süß
	(R,S)	Tutti-Frutti, getrocknete Banane, süß
2-Pentylhexanoat	(S)	exotisch, grün, wachsig, seifig, schwerfruchtig, esterig, holzig
	(R)*	seifig, schwerfruchtig, holzig, wachsig, fruchtig
	(R,S)	süß, fruchtig, esterig
2-Pentyl octanoat	(S)	wachsig, seifig
	(R)*	wachsig, seifig, aldehydig, Gemüse
	(R,S)	holzig, seifig, wachsig, erdig
2-Heptylacetat	(S)	fruchtig (Birne), esterig, süß, balsamisch, blumig
	(R)*	fruchtig (Birne), grün, blumig, würzig, parfümistisch
	(R,S)	fruchtig (Birne), esterig, ranzig, würzig, aldehydig, fettig
2-Heptylbutanoat	(S)*	blumig, fettig, aldehydig, würzig, chemisch, fruchtig, esterig
	(R)	fruchtig, überreif, fettig, Birnenschale, ranzig,
	(R,S)	grün, fruchtig (Birne), süß, blumig, esterig
2-Heptylhexanoat	(S)	wachsig, seifig
	(R)	wachsig, seifig, fettig,
	(R,S)*	aldehydig, wachsig, seifig
2-Heptyl octanoat	(S)	Birne, süß, leicht fettig
	(R)*	Birne, süß, fettig
	(R,S)	Birne, süß, fettig
2-Nonylacetat	(S)*	seifig, aldehydig, schwach süß,
	(R)	fettig, metallisch, leicht seifig, süß, leichte Anis-Note
	(R,S)	sehr seifig, fettig, aldehydig, blumig
2-Nonylbutanoat <sup>b</sup>	(S)	süß, fruchtig, leicht fettig, wachsig
	(R)	wachsig, aldehydig, fettig, blumig
	(R,S)	fettig, süß, leicht fruchtig
2-Nonylhexanoate <sup>b</sup>	(S)	ranzig, fettig, chemisch
	(R)	fettig, leicht ranzig
	(R,S)	fettig, ranzig, leicht chemisch
2-Nonyl octanoat	(S)	seifig, wachsig, fettig
	(R)	seifig, wachsig, fettig
	(R,S)*	seifig, wachsig, fettig, fruchtig

Bedingungen siehe Material & Methoden

\* als aromaintensivste Verbindung eines Esters bewertet.

<sup>a</sup> Geruchsqualitäten der Stammlösungen (Konzentration: 10 mg/l bzw. 5 mg/l (Acetate)).

<sup>b</sup> keine Unterschiede hinsichtlich der Intensität feststellbar.

### 4.3.5 Berechnung des Aromawertes

Die Kenntnis der Konzentration eines Aromastoffes in einem Lebensmittel und dessen Geruchsschwellenwert in einer Lebensmittel-ähnlichen Matrix erlaubt die Bestimmung des Aromawertes (*Rothe und Thomas, 1963*). Eine Verbindung leistet demnach einen Beitrag zum Gesamtaroma, wenn der Aromawert  $> 1$  ist.

Zur Ermittlung der Aromawerte wurden die ermittelten Konzentrationen an 2-Alkylestern roter Passionsfrüchte aus 3 Chargen verwendet. Da durch die Untersuchungen der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen gezeigt werden konnte, dass die Ester nahezu ausschließlich als (*R*)-Enantiomere vorkommen, wurden die für diese Verbindungen in Wasser ermittelten Geruchsschwellenwerte zur Berechnung herangezogen. Wie aus Tabelle 20 ersichtlich, wurden für alle 2-Pentyl- und 2-Heptylester Aromawerte  $> 1$  berechnet. Hohe Werte wurden für die quantitativ dominierenden Ester 2-Heptylbutanoat und 2-Heptylhexanoat ermittelt. Aufgrund des sehr niedrigen Geruchsschwellenwertes wies das in niedrigeren Konzentrationen enthaltene 2-Pentylacetat ebenfalls einen Aromawert von 44 auf.

Tabelle 20: Aromawerte der 2-Alkylester in roten Passionsfrüchten

Verbindung	Konzentration <sup>a</sup>	Geruchsschwellenwert <sup>b</sup>	Aromawert <sup>c</sup>
	( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	( $\mu\text{g}/\text{l}$ Wasser)	
2-Pentylacetat	311	7	44
2-Pentylbutanoat	247	138	1,8
2-Pentylhexanoat	591	232	2,5
2-Pentyl octanoat	215	82	2,6
2-Heptylacetat	712	130	5,5
2-Heptylbutanoat	4060	232	18
2-Heptylhexanoat	7590	174	44
2-Heptyl octanoat	634	195	3,3
2-Nonylacetat	36	58	0
2-Nonylbutanoat	252	261	1,0
2-Nonylhexanoat	138	1105	0
2-Nonyl octanoat	$< 2$	1563	0

<sup>a</sup> Mittelwert aus 3 Chargen (siehe Tabelle 4).

<sup>b</sup> Geruchsschwellenwerte der (*R*)-2-Alkylester (siehe Tabelle 18).

<sup>c</sup> Aromawert = Quotient aus Konzentration und Geruchsschwelle.

#### 4.3.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die mittels Lipase-katalysierter Racematspaltung präparativ gewonnenen optisch reinen (*R*)-2-Alkylester und die optisch angereicherten (*S*)-Ester wurden mittels GC/O sowie als wässrige Lösungen sensorisch bewertet und die Ergebnisse mit den für racemische Mischungen erhaltenen Daten verglichen.

Der kapillargaschromatographisch-olfaktometrische Vergleich der (*R*)-Ester und der entsprechenden Racemate zeigt eine klare Übereinstimmung der Geruchsqualitäten sowie der Schwellenwerte. Durch Enantiomerentrennung der kurzkettigen Ester an einer geeigneten stationären Phase konnte gezeigt werden, dass sich (*S*)-Enantiomere durch deutlich höhere Geruchsschwellenwerte auszeichnen.

Bei der orthonasalen und retronasalen Bewertung der 2-Alkylester in Wasser konnte dagegen kein Trend bezüglich der Aromaintensität der Enantiomere festgestellt werden.

Unabhängig von der angewandten Prüfmethode konnte gezeigt werden, dass sich die Enantiomere der Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester sowohl in ihren Aromaqualitäten als auch Intensitäten deutlich unterscheiden. Dass sich die jeweiligen (*S*)-Enantiomere aufgrund ihrer charakteristischen Frucht-Noten von den jeweiligen (*R*)-Enantiomeren abgrenzen, konnte hierbei nicht bestätigt werden (*Mosandl und Deger, 1987*). Im Allgemeinen wurde festgestellt, dass der fruchtige Charakter mit zunehmender Kettenlänge der Ester abnimmt und dafür die Dominanz eher unangenehmer Noten (fettig, seifig, chemisch) steigt.

Die ermittelten Geruchsschwellenwerte sowie die Kenntnis des natürlichen Vorkommens der 2-Alkylester in roten Passionsfrüchten ermöglichten die Berechnung der Aromawerte. Inwieweit diese flüchtigen Verbindungen das Gesamtaroma der roten Passionsfrüchte prägen, kann über die zum Teil hohen Aromawerte nicht definiert werden. Die durchgeführten sensorischen Methoden ermöglichen lediglich eine isolierte Betrachtung der Ester, da additive oder suppressive Effekten sowohl der Aromastoffe untereinander als auch mit der Lebensmittel-Matrix nicht berücksichtigt werden.

Allerdings konnte durch die Untersuchung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen und die Bestimmung der Geruchsschwellenwerte der präparativ gewonnenen Enantiomere in einem Passionsfrucht-ähnlichen Medium

zum ersten Mal gezeigt werden, dass Vertreter der Gruppe der 2-Alkylester eine potenzielle Aromarelevanz in roten Passionsfrüchten aufweisen. Eine Aufklärung des konkreten Beitrages zum Gesamtaroma könnte durch weiterführende sensorische Untersuchungen, wie z.B. die Herstellung von Rekombinaten, erfolgen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gehalte und natürlichen Enantiomerenverhältnisse von 2-Alkylestern in roten (*Passiflora edulis* Sims) und gelben (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) Passionsfrüchten untersucht. Hierzu wurden die Acetate, Butanoate, Hexanoate und Octanoate der ungeradzahligen sekundären Alkohole 2-Pentanol, 2-Heptanol und 2-Nonanol durch Anwendung der Simultanen Destillation-Extraktion isoliert und mittels Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert. Durch die erhaltenen qualitativen und quantitativen Verteilungen konnte bestätigt werden, dass die 2-Alkylester Markersubstanzen in roten Passionsfrüchten darstellen.

Die Methodik der Multidimensionalen Gaschromatographie unter Verwendung einer modifizierten Cyclodextrinphase ermöglichte die direkte Bestimmung der natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen der homologen Ester und freien sekundären Alkohole. Die Untersuchungen zeigten, dass die 2-Alkylester in roten Passionsfrüchten nahezu als optisch reine (*R*)-Enantiomere vorkommen, während für die in gelben Früchten als Minor Komponenten enthaltenen Ester weniger stark ausgeprägte Enantiomerenüberschüsse erhalten wurden. Für die freien sekundären Alkohole wurden gegensätzliche Konfigurationen in den beiden Passionsfrucht-Varietäten bestimmt. Die erhaltenen Gehalte und Enantiomerenzusammensetzungen an sekundären Alkoholen und ihren Estern geben Hinweise darauf, dass sich gelbe und rote Passionsfrüchte in ihren an der Biosynthese beteiligten Schlüsselenzymen unterscheiden.

Basierend auf den Ergebnissen eines Enzymscreenings und der Untersuchung von Synthese- und Hydrolysereaktionen wurde eine Methode zur Gewinnung der optisch reinen Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester im präparativen Maßstab entwickelt. Ausgehend von den racemischen sekundären Alkoholen wurden durch enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung unter Verwendung der enantioselektiven *Candida antarctica* Lipase B die optisch reinen (*R*)-Ester gewonnen. Die nicht umgesetzten Substrate wurden nach säulenchromatographischer Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch einer Wiederveresterung mit der nichtspezifischen Lipase *Candida cylindracea* unterzogen, um so die optisch angereicherten (*S*)-Ester zu erhalten. Neben den

erhaltenen hohen optischen Reinheiten zeichnete sich die Methode durch sehr hohe Umsatzausbeuten und chemische Reinheiten der Produkte aus. Dies ermöglichte erstmals die Bestimmung der spezifischen Drehwinkel der Ester.

Zum anderen konnte aufgrund der hohen optischen und chemischen Reinheiten eine Bestimmung der sensorischen Eigenschaften der gewonnenen Enantiomere erfolgen. Hierzu wurden die optisch reinen (*R*)-Ester und optisch stark angereicherten (*S*)-Ester als wässrige Lösungen sowie mittels Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie untersucht und die Ergebnisse mit den für die Racemate erhaltenen Daten verglichen. Unabhängig von der angewandten Prüfmethode konnte gezeigt werden, dass sich die Enantiomere der Passionsfrucht-typischen 2-Alkylester in ihren Aromaqualitäten und Geruchsschwellen deutlich unterscheiden.

Auf Basis der erhaltenen Geruchsschwellen in Wasser und des Vorkommens in roten Passionsfrüchten wurden die Aromawerte der einzelnen 2-Alkylester bestimmt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass Vertreter der Gruppe der 2-Alkylester einen Beitrag zum Gesamtaroma roter Passionsfrüchte leisten.

## 6 LITERATUR

- Acree, T. E.; Barnard, J.; Cunningham, D. G. A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chem.* **1984**, *14*, 273-286.
- Acree, T. E. Bioassays for flavor. In *Flavor Science. Sensible principles and techniques*; Acree, T. E., Teranishi, R., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, 1993; pp. 1-20.
- Adams, D. R.; Bhatnagar, S. P.; Cookson, R. C.; Stanley, G.; Whitfield, F. B. Synthesis and structures of Edulan I and II. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1974**, *12*, 469-470.
- Aharoni, A.; Keizer, L. C. P.; Bouwmeester, H. J.; Sun, Z.; Alvarez-Huerta, M.; Verhoeven, H. A.; Blaas, J.; van Houwelingen, A. M. M. L.; De Vos, R. C. H.; van der Voet, H.; Jansen, R. C.; Guis, M.; Mol, J.; Davis, R. W.; Schena, M.; van Tunen, A. J.; O'Connell, A. P. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* **2000**, *12*, 647-661.
- Anderson, E. M.; Larsson, K. M.; Kirk, O. One biocatalyst – many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16*, 181-204.
- Barman, T. E. *Enzyme handbook Vol. II*, 1. Auflage; Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, 1969.
- Barron, D.; Etiévant, P. X. The volatile constituents of strawberry jam. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1990**, *191*, 279-285.
- Barron, L. D. Chirality and life. *Space Sci. Rev.* **2008**, *135*, 187-201.
- Beekwilder, J.; Alvarez-Huerta, M.; Neef, E.; Verstappen, F. W. A.; Bouwmeester, H. J.; Aharoni A. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1865-1878.
- Begnaud, F.; Starkenmann, C.; Van de Waal, M.; Chaintreau, A. Chiral multidimensional gas chromatography (MDGC) and chiral GC-Olfactometry with a Double-Cool-Strand Interface: Application to malodors. *Chem. Biodiversity* **2006**, *3*, 150-160.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, 2008.
- Benjamin, S.; Panday, A. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* **1998**, *14*, 1069-1087.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemie*, 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, 2003.
- Berger, R. G.; Drawert, F.; Kollmannsberger, H. Geruchsaktive Spurenkomponenten des Bananenaromas. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1986**, *10*, 120-124.

- Berglund, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 13-22.
- Berkessel, A.; Sebastian-Ibarz, M. L.; Müller, T. N. Lipase/Aluminum-catalyzed dynamic kinetic resolution of secondary alcohols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6567-6570.
- Bernreuther, A. *Analytik chiraler Aromastoffe anhand multidimensionaler Gaschromatographie mit chiralen Phasen*. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, 1992.
- Bicchi, C.; D'Amato, A.; Rubiolo, P. Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields. *J. Chromatogr. A* **1999**, *843*, 99-121.
- Blank, I. Gas chromatography-olfactometry in food aroma analysis. In *Techniques for analyzing food aroma*, Marsili, R., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1997; pp. 293-329.
- Boelens, H.; Haring, H. G.; Takken, H. J. The influence of molecular structure on olfactive quality (a quantitative approach). *Chem. Ind.* **1983**, *1*, 26-30.
- Boelens, M. H.; Van Gemert, L. J. Physicochemical parameters related to organoleptic properties of flavour components. In *Developments in food flavour*. Birch, G. G., Lindley, M. G. Eds., Elsevier: London, 1986; pp. 23-49.
- Boelens, M. H.; Boelens, H.; Van Gemert, L. J. Sensory properties of optical isomers. *Perfumer & Flavorist* **1993**, *18*, 1-16.
- Bornscheuer, U. T. Enzymimmobilisierung: ein Weg zu verbesserten Biokatalysatoren. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3458-3459.
- Bornscheuer, U. T.; Buchholz, K. Highlights in biocatalysis – historical landmarks and current trends. *Eng. Life Sci.* **2005**, *5*, 309-323.
- Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in organic synthesis – regio- and stereoselective biotransformations*, 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2006.
- Bosch, B.; Meissner, R.; Berendes, F.; Koch, R. Anti-Kazlauskas lipasen. Eur. Pat. Appl. 2004, EP 1 418 237 A2.
- Brat, P.; Brillouet, J.-M.; Reynes, M.; Cogat, P.-O.; Ollé, D. Free volatile components of passion fruit puree obtained by flash vacuum-expansion. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6210-6214.
- Brenna, E.; Fuganti, C.; Serra, S. Enantioselective perception of chiral odorants. *Tetrahedron: Asymmetrie* **2003**, *14*, 1-42.
- Buchecker, K. *Sensorik*; Behr's Verlag: Hamburg, 2008.

- Buchholz, K.; Kasche, V.; Bornscheuer U. T. *Biocatalysts and enzyme technology*, Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2005.
- Büttner, A.; Schieberle, P. Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed grapefruit juice (*Citrus paradisi Macfayden*) by quantitation and flavor reconstitution experiments. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, *49*, 1358-1363.
- Büttner, A.; Beer, A.; Hannig, C.; Settles, M. Observation of the swallowing process by application of videofluoroscopy and real-time magnetic resonance imaging – consequences for retronasal aroma stimulation. *Chem. Senses* **2001**, *26*, 1211-1219.
- Büttner, A. Spaß an Essen und Trinken – Retronasale Geruchswahrnehmung. *Nachrichten aus der Chemie* **2004**, *52*, 540-543.
- Büttner, A.; Montserrat, M. Retronasal aroma perception - a closer look at psychophysical interaction phenomena. In *State-of-the-art in flavour chemistry and biology*; Hofmann, T., Rothe, M., Schieberle, P.; Eds.; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie: Garching, 2005; pp. 3-11.
- Buttery, R. G. Flavor chemistry and odor thresholds. In *Flavor chemistry: Thirty years of progress*. Teranishi, R., Wick, E. L., Horstein, I., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publisher: New York, 1999; pp. 353-366.
- Cambou, B.; Klibanov, A. M. Comparison of different strategies for the lipase-catalyzed preparative resolution of racemic acids and alcohols: asymmetric hydrolysis, esterification, and transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26*, 1449-1454.
- Cao, L. Immobilized enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 217-226.
- Carrea, G.; Riva, S. Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese. *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2313-2341.
- Carrea, G.; Riva, S. Medium Engineering. In *Asymmetric organic synthesis with enzymes*; Gotor, V., Alfonso, I., Garcia-Urdiales, E., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008; pp. 3-20.
- Casimir, D. J.; Whitfield, F.B. Flavour impact values: a new concept for assigning numerical values for the potency of individual flavour components and their contribution to the overall flavour profile. *Ber. Int. Fruchtsaft-Union; Wiss.-Techn. Komm.* **1978**, *15*, 325-345.
- Chaintreau, A.; Begnaud, F.; Starkenmann, C. Novel concept of multidimensional gas chromatography. New capabilities for chiral analysis and olfactometric detection. *Developments in food science* **2006**, *43*, 559-564.
- Chen, C.-C.; Kuo, M.-C.; Hwang, L. S.; Wu, J. S.-B.; Wu, C.-M. Headspace components of passion fruit juice. *J. Agric. Food Chem.* **1982 a**, *30*, 1211-1215.

- Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.
- d'Acampora Zellner, B.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 123-143.
- Delahunty, C. M.; Eyres, G.; Dufour, J.-P. Gas chromatography-olfactometry. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2107-2125.
- Demole, E.; Enggist, P.; Winter, M.; Furrer, A.; Schulte-Elte, K. H.; Egger, B.; Ohlhoff, G. Megastigma-5,8-dien-4-on, ein Aromastoff der gelben Passionsfrucht und des Virginia-Tabaks. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 67-75.
- Derndorfer, E. *Lebensmittelsensorik*, 2. Auflage; Facultas Universitätsverlag: Wien, 2008.
- Dietrich, A.; Maas, B.; Messer, W.; Bruche, G.; Karl, V.; Kaunzinger, A.; Mosandl, A. Stereoisomeric flavor compounds, Part LVIII: The use of heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-tert-butyl-dimethylsilyl)- $\beta$ -cyclodextrin as chiral stationary phase in flavor analysis. *J. High Resolut. Chrom.* **1992**, *15*, 590-593.
- Dlugy, C.; Wolfson, A. Lipase catalyzed glycerolysis for kinetic resolution of racemates. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2007**, *30*, 327-330.
- Dominguez de Maria, P.; Sánchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 180-196.
- Dregus, M.; Schmarr, H.-G.; Takahisa, E.; Engel, K.-H. Enantioselective analysis of methyl-branched alcohols and acids in rhubarb (*Rheum rhabarbarum* L.) stalks. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7086-7091.
- El-Sharkawy, I.; Manriquez, D.; Flores, F. B.; Regad, F.; Bouzayen, M.; Latché, A.; Pech, J.-C. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Mol. Biol.* **2005**, *59*, 345-362.
- Engel, K.-H.; Tressl, R. Differentiation of yellow and purple passion fruits by investigation of their ester composition. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1983**, *8*, 33-39.
- Engel, K.-H. Investigation of chiral compounds in biological systems by chromatographic micromethods. In *Bioflavour '87*. Schreier, P., Ed.; de Gruyter Verlag: Berlin, Germany, 1988; pp 75-88.
- Engel, K.-H.; Bohnen, M.; Tressl, R.; Kinetic resolution of heptan-2-ol-enantiomers by lipase-catalyzed esterification in organic solvent. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1989**, *188*, 144-147.
- Engel, K.-H.; Tressl, R. Identification of new sulfur-containing volatiles in yellow passion fruits (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 2249-2252.

- Engel, K.-H.; Dregus, M.; Becker, Ch.; Reder, H.; Takahisa, E. Analytical and sensory characterization of chiral flavor compounds via capillary gas chromatography on cyclodextrins modified by acetal-containing side chains. In *Food Flavor. Chemistry, sensory evaluation and biological activity*; Tamura, H., Ebeler, S. E., Kubota, K., Takeoka, G. R., Eds.; American Chemical Society: Washington, 2008; pp. 25-35.
- Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry*, 3. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 1997.
- Frijters, J. E. R. A critical analysis of the odour unit number and its use. *Chem. Sens. Flav.* **1978**, *3*, 227-233.
- Fröhlich, O.; Huffer, M.; Schreier, P. Chirality evaluation of 2-heptanol and Z-4-hepten-2-ol from banana fruits using multidimensional gas chromatography. *Z. Naturforsch.* **1989**, *44 c*, 555-558.
- Gattermann, L.; Wieland, H. *Die Praxis des organischen Chemikers. Teil 1. Allgemeine Arbeitsanweisungen*, 42. Auflage; de Gruyter Verlag: Berlin, New York, 1972.
- GDCh, Lebensmittelchemische Gesellschaft. Enantioselektive Analyse zur Natürlichkeitsbewertung von Aromastoffen. *Lebensmittelchemie* **2001**, *55*, 24-26.
- Gerlach, D.; Missel, C.; Schreier, P. Screening of lipases for the enantiomer resolution of R,S-2-octanol by esterification in organic medium. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, *186*, 315-318.
- Gerlach, D.; Lutz, D.; Mey, B.; Schreier, P. Enantioselective lipase catalyzed esterification in organic medium for preparation of optically active secondary alcohols. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1989**, *189*, 141-143.
- Gerlach, D.; Schreier, P. Esterification in organic media for preparation of optically active secondary alcohols: effects of reaction conditions. *Biocatal.* **1989**, *2*, 257-263.
- Gessner, M.; Deger, W.; Mosandl, A. Stereoisomeric flavour compounds. XXI. Chiral aroma compounds in foods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, *186*, 417-421.
- Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* **2005**, *17*, 1-15.
- Gibka, J.; Glinski, M.; Gora, J.; Kijenski, J. Synthesis and odour characteristics of some aliphatic C-7 – C-13 ketones and alcohols and their derivatives. *Chemia Spozywca I Biotechnologia*, **1998**, *802*, 65-74.
- Gottwald, W. *GC für Anwender*. VCH-Verlag: Weinheim, 1995.
- Grob, K. *Making and manipulating capillary columns for gas chromatography*. Huethig Verlag: Heidelberg, 1986.

- Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Smith, P.; Harrison, D.; Rubin, B.; Cygler, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12843-12847.
- Grosch, W. Enzymatische Bildung von Aromastoffen aus Lipiden. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* **1987**, *41*, 40-46.
- Grosch, W. Analyse von Aromastoffen. *Chemie in unserer Zeit* **1990**, *24*, 82-89.
- Grosch, W. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem. Senses* **2001**, *26*, 533-545.
- Gübitz, G.; Schmid, M. G. Chiral separation principles in chromatographic and electromigration techniques. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *32*, 159-179.
- Gupta, A. K., Kazlauskas, R. J. Substrate modification to increase the enantioselectivity of hydrolases. A route to optically-active cyclic allylic alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 879-888.
- Hädrich, J.; Vogelgesang, J. Konzept 2000 – Ein statistischer Ansatz für die analytische Praxis. Teil 1: Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze (1. Mitteilung). *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **1999 a**, *95*, 428-436.
- Hädrich, J.; Vogelgesang, J. Konzept 2000 – Ein statistischer Ansatz für die analytische Praxis. 2. Mitteilung: Berechnungsbeispiele. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **1999 b**, *95*, 495-499.
- Haeffner, F.; Norin, T. Molecular modelling of lipase catalysed reactions. Prediction of enantioselectivities. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 591-600.
- Herrmann, K. Passionsfrüchte und Passionsfruchtsaft: Übersicht über ihre Inhaltsstoffe. *Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung* **1995**, *2*, 61-68.
- Hiu, D. N.; Scheuer, P. J. The volatile constituents of passion fruit juice. *J. Food Sci.* **1961**, *26*, 557-563.
- Høegh, I.; Patkar, S.; Halkier, T.; Hansen, M. T. Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Can. J. Bot.* **1995**, *73*, 869-875.
- Icheln, D. *Synthese selektiv substituierter Cyclodextrine und ihre Anwendung in der enantioselektiven Kapillargaschromatographie*. Dissertation, Universität Hamburg, 1993.
- Irimescu, R.; Saito, T.; Kato, K. Enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols by esterification with FA under vacuum. *JAOCS* **2003**, *80*, 659-663.
- Jäger, K.-E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 315-351.

- Jäger, K.-E.; Eggert, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr. Opin. Chem. Biotechnol.* **2004**, *15*, 305-313.
- Jordán, M. J.; Tandon, K.; Shaw, P. E.; Goodner, K. L. Aromatic profile of aqueous banana essence and banana fruit by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry (GC-O). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4813-4817.
- Jordán, M. J.; Goodner, K. L.; Shaw, P. E. Characterization of the aromatic profile in aqueous essence and fruit juice of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa degner*) by GC-MS and GC/O. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1523-1528.
- Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.
- Kim, M.-J.; Cho, H. *Pseudomonas* lipases as catalysts in organic synthesis: specificity of lipoprotein lipase. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, *19*, 1411-1413.
- Klinke, R.; Pape, H.-C.; Silbernagel, S. *Physiologie*, 5. Auflage; Thieme Verlag: 2005; pp. 713-726.
- König, W. A. *Gas chromatographic enantiomer separation with modified cyclodextrins*. Hüthig Buch Verlag: Heidelberg, 1992.
- König, W. A.; Fricke, C.; Saritas, Y.; Momeni, B.; Hohenfeld, G. Adulteration or natural variability? Enantioselective gas chromatography in purity control of essential oils. *J. High Resol. Chromatogr.* **1997**, *20*, 55-61.
- König, W. A. Chirality in the natural world – odours and tastes. In *Chirality in natural and applied science*; Lough, W. J., Wainer, I. W., Eds.; Blackwell Science: Oxford, Berlin, 2002; pp 261-284.
- König, W. A.; Hochmuth, D. H. Enantioselective gas chromatography in flavor and fragrance analysis: strategies for the identification of known and unknown plant volatiles. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 423-439.
- Koppenhoefer, B.; Behnisch, R.; Epperlein, U.; Holzschuh, H.; Bernreuther, A.; Piras, P.; Roussel, C. Enantiomeric odor differences and gas chromatographic properties of flavors and fragrances. *Perfumer & Flavorist* **1994**, *19*, 1-14.
- Kovac, A.; Scheib, H.; Pleiss, J.; Schmid, R. D.; Paltauf, F. Molecular basis of lipase stereoselectivity. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 61-77.
- Kovats, E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1. Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta.* **1958**, *41*, 1915-1932.

- Kurihara, N.; Miyamoto, J. *Chirality in agrochemicals*; John Wiley & Sons: Chichester, 1998; pp. 1-8.
- Leitereg, T. J.; Guadagni, D. G.; Harris, J.; Mon, T. R.; Teranishi, R. Chemical and sensory data supporting the difference between the odors of the enantiomeric carvones. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 785-787.
- Li, D.; Xu, Y.; Xu, G.; Gu, L.; Li, D.; Shu, H. Molecular cloning and expression of a gene encoding alcohol acyltransferase (*MDAAT2*) from apple (cv. Golden Delicious). *Phytochemistry*, **2006**, *67*, 658-667.
- Liu, S.; Yang, F.; Li, J.; Zhang, C.; Ji, H.; Hong, P. Physical and chemical analysis of *Passiflora* seeds and seed oil from China. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2008**, *59*, 706-715.
- Lutz, D.; Huffer, M.; Gerlach, D.; Schreier, P. Carboxylester-lipase-mediated reactions. In *Flavor Precursors. Thermal and enzymatic conversions*; Teranishi, R., Takeoka, G. R., Güntert, M., Eds.; American Chemical Society: Washington D.C, 1992; pp. 32-45.
- Maarse, H.; Visscher, C. A. *Volatile compounds in food. Qualitative and quantitative data. Volume II*. 6. Auflage; TNO-CIVO Food analysis institute: Zeist, 1989; pp. 768-784.
- Maas, B.; Dietrich, A.; Bartschat, D.; Mosandl, A. *tert*-Butyldimethylsilylated cyclodextrins: versatile chiral stationary phases in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **1995**, *33*, 223-228.
- Maier, N. M.; Franco, P.; Lindner, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 3-33.
- Marchelli, R.; Dossena, A.; Palla, G. The potential of enantioselective analysis as a quality control tool. *Trends Food Sci. Technol.* **1996**, *7*, 113-119.
- Martinelle, M.; Holmquist, M.; Hult, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1258*, 272-276.
- McGorrin, R. J. Character impact compounds: Flavors and off-flavors in foods. In *Flavor, fragrance and odor analysis*; Marsili, R. Ed.; Marcel Dekker: New York, Basel, 2002; pp. 375-413.
- Meilgaard, M.; Civille, G. V.; Carr, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*, 4. Auflage; CRC Press: Boca Raton, 2006.
- Miller, A. *Analytik von Minorlipiden: Ferulasäureester von Phytosterolen ( $\gamma$ -Oryzanol) in Reis*. Dissertation, Technische Universität München, 2004.

- Mistry, B. S.; Reineccius, T.; Olson, L. K. Gas chromatography-olfactometry for the determination of key odorants in foods. In *Techniques for analyzing food aroma*, Marsili, R., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1997; pp. 265-292.
- Mortimer, C. E. *Chemie – Das Basiswissen der Chemie*, 8. Auflage; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 2003.
- Morton, J. F. *Passifloraceae*. In *Fruits of warm climates*; Morton Publishers: Miami, 1987; pp. 320-335.
- Mosandl, A.; Deger, W. Stereoisomeric flavor compounds. XVII. Chiral carboxylic esters – synthesis and properties. *Z. Lebensm. Unters. Forsch* **1987**, *185*, 379-382.
- Mosandl, A.; Fischer, K.; Hener, U.; Kreis, P.; Rettinger, K.; Schubert, V.; Schmarr, H.-G. Stereoisomeric flavor compounds. 48. Chiroselective analysis of natural flavors and essential oils using multidimensional gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1131-1134.
- Mosandl, A. Echtheitsbewertung von Fruchtaromen mittels enantioselektiver Kapillargaschromatographie. *Flüss. Obst* **1996**, *63*, 386-390.
- Mosandl, A. Natürliche Duft- und Aromastoffe – Echtheitsbewertung mittels enantioselektiver Kapillar-GC und/oder Isotopenverhältnismassenspektrometrie. In *Analytiker-Taschenbuch*; Günzler, H. Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2000; Band 21, pp. 37-63.
- Mosandl, A. Authenticity assessment: a permanent challenge in food flavor and essential oil analysis. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 440-449.
- Mosandl, A. Enantioselective analysis. In *Flavourings*; Ziegler, H. Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2007; pp. 664-703.
- Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B. The chemistry of food flavour, I. Volatile constituents of passionfruit, *Passiflora edulis*. *Aust. J. Chem*, **1972**, *25*, 1921-1933.
- Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B. The flavour of purple passionfruit. *Food Technol. Aust.* **1973**, *25*, 446-448.
- Näf, F.; Decorzant, R.; Willhalm, B.; Velluz, A.; Winter, M. Structure and synthesis of two novel ionones identified in the purple passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). *Tetrahedron Lett.* **1977**, *16*, 1413-1416.
- Nagy, V.; Toke, E. R.; Keong, L. C.; Szatzker, G.; Ibrahim, D.; Omar, I. C.; Szakacs, G.; Poppe, L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2006**, *39*, 141-148.
- Nelson, D.; Cox, M. *Lehninger Biochemie*, 3. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 2001.

- Noble, A. C. Sensory methods of flavour analysis. In *Food flavour technology*; Taylor, A. J., Ed.; Sheffield Academic Press: Sheffield, 2002; pp. 252-275.
- Nozaki, M.; Suzuki, N.; Oshikubo, S. Production of chiral flavour components by enzymatic methods. In *Flavour Science: Recent developments*; Taylor, A. J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1996; pp. 168-171.
- Nyanzi, S. A.; Carstensen, B.; Schwack, W. A comparative study of fatty acid profiles of *Passiflora* seed oils from Uganda. *JAOCS* **2005**, *82*, 41-44.
- Orrenius, C.; Norin, T.; Hult, K.; Carrea, G. The *Candida antarctica* lipase B catalysed kinetic resolution of seudenol in non-aqueous media of controlled water activity. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 3023-3030.
- Orrenius, C.; Haeffner, F.; Rotticci, D.; Öhrner, N.; Norin, T.; Hult, K. Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16*, 1-15.
- Ottosson, J.; Rotticci-Mulder J. C.; Rotticci, D.; Hult, K. Rational design of enantioselective enzymes requires considerations of entropy. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1769-1774.
- Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of ( $\pm$ )- $\alpha$ -hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1337-1345.
- Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical animation. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1119-1127.
- Parliment, T. H. Some volatile constituents of passion fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 1043-1045.
- Patel, R. N.; Banerjee, A.; Nanduri, V.; Goswami, A.; Comezoglu, F. T. Enzymatic resolution of racemic secondary alcohols by Lipase B from *Candida antartica*. *JAOCS* **2000**, *77*, 1015-1019.
- Patel, B. K.; Hutt, A. J. Stereoselectivity in drug action and disposition: an overview. In *Chirality in drug design and development*; Reddy, I. K.; Mehvar, R., Eds.; Marcel Dekker: New York, Basel, 2004; pp. 139-190.
- Pickenhagen, W.; Brönner-Schindler, H. Enantioselective synthesis of (+)- and (-)-*cis*-2-methyl-4-propyl-1,3-oxathiane and their olfactive properties. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 947-952.
- Piras, P.; Roussel, C. A screening study of ChirBase molecular database to explore the expanded chiral pool derived from the application of chiral chromatography. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2008**, *46*, 839-847.

- Plutowska, B.; Wardencki, W. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – a review. *Food Chem.* **2008**, *107*, 449-463.
- Prestwich, G. D.; Whitfield, F. B.; Stanley, G. Synthesis and structures of dihydroedulan I and II trace components from the juice of *Passiflora edulis* Sims. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2945-2948.
- Rakels, J. L. L.; Straathof, A. J. J.; Heijnen, J. J. A simple method to determine the enantiomeric ration enantioselective biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1051-1056.
- Rauen, H. H. *Biochemisches Taschenbuch*. 1. Auflage. Springer Verlag: Berlin, 1965.
- Renner, R. *Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen von Aromastoffen einiger Biere*. Dissertation, Technische Universität, Berlin, 1979.
- Rettinger, K.; Burschka, C.; Scheeben, P.; Fuchs, H.; Mosandl, A. Chiral 2-alkylbranched acids, esters and alcohols. Preparation and stereospecific flavour evaluation. *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 965-968.
- Rothe, M.; Thomas, B. Aromastoffe des Brotes. Versuch einer Auswertung chemischer Geschmacksanalysen mit Hilfe des Schwellenwertes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1963**, *119*, 302-311.
- Rothe, M.; Wölm, G.; Tunger, L.; Siebert, H.-J. Schwellenkonzentrationen von Aromastoffen und ihre Nutzung zur Auswertung von Aromaanalysen. *Die Nahrung* **1972**, *16*, 483-495.
- Rotticci, D.; Orrenius, C.; Hult, K.; Norin, T. Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 359-362.
- Rotticci, D.; Haeffner, F.; Orrenius, C.; Norin, T.; Hult, K. Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **1998**, *5*, 267-272.
- Rücker, G. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik : Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysemethoden*, 2. Auflage; Wiss. Verl.-Ges.: Stuttgart; 1992.
- Ruiz del Castillo, M. L.; Caja, M. M.; Herraiz, M. Use of the enantiomeric composition for the assessment of the authenticity of fruit beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1284-1288.
- Rychlik, M.; Schieberle, P.; Grosch, W. *Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants*. TUM, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie und Institut für Lebensmittelchemie, Garching, 1998.

- Sancho, R.; Minguillón, C. The chromatographic separation of enantiomers through nanoscale design. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 797-805.
- Sanz, C.; Olias, J. M.; Perez, A. G. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*; Tomás-Barberán, F. A., Robins, R. J., Eds.; Oxford University Press Inc.: New York, 1997; pp 125-155.
- Schmarr, H.-G. *Beiträge zur On-line LC-GC Kopplung und modifizierte Cyclodextrine als chirale stationäre Phasen in der Kapillar-GC*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main, 1992.
- Schnabel, K.-O.; Belitz, H.-D.; von Ranson, C. Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung bei Geruchsstoffen. 1. Mitteilung: Wahrnehmungsschwellenwerte und Geruchsqualitäten von gesättigten aliphatischen und alicyclischen Verbindungen mit Sauerstoff-Funktion. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, *187*, 215-223.
- Schomburg, G. Two-dimensional gas chromatography: principles, instrumentation, methods. *J. Chromatogr. A* **1995**, *703*, 309-325.
- Schreier, P.; Bernreuther, A.; Huffer, M. *Analysis of chiral organic molecules. Methodology and applications*. Walter de Gruyter: Berlin, New York, 1995.
- Schubert, V.; Diener, R.; Mosandl, A. Enantioselective multidimensional gas chromatography of some secondary alcohols and their acetates from banana. *Z. Naturforsch.* **1991**, *46 c*, 33-36.
- Schultz, T. H.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Eggling, S. B.; Teranishi, R. Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 446-449.
- Schumacher, K.; Asche, S.; Heil, M.; Mittelstädt, F.; Dietrich, H.; Mosandl, A. Methyl-branched flavor compounds in fresh and processed apples. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4496-4500.
- Schurig, V. Separation of enantiomers by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 275-299.
- Schurig, V. Chiral separations using gas chromatography. *Trends anal. chem.* **2002**, *21*, 647-661.
- Schurig, V. Contributions to the theory and practice of the chromatographic separation of enantiomers. *Chirality* **2005**, *17*, 205-226.
- Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* **2008**, *54*, 712-732.
- Sheldon, R. A. *Chirotechnology – industrial synthesis of optically active compounds*, Marcel Dekker: New York, 1993.

- Shibamoto, T.; Tang C. S. Minor tropical fruits – mango, papaya, passion fruit and guava. In *Food Flavours. Part C. The flavour of fruits*; Morton, I. D., MacLeod, A. J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1990; pp. 221-280.
- Shiota, H. New esteric components in the volatiles of banana fruit (*Musa sapientum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2056-2062.
- Singer, G.; Heusinger, G.; Fröhlich, O.; Schreier, P.; Mosandl, A. Chirality evaluation of 2-methyl-4-propyl-1,3-oxathiane from the yellow passion fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 1029-1033.
- Sonnet, P. E.; Baillargeon, M. W. Kinetic resolution of secondary alcohols with commercial lipases: application to rootworm sex pheromone synthesis. *J. Chem. Ecol.* **1987**, *13*, 1279-1292.
- Spindler, F.; Früh, T. Chiral acylanilides and chiral triazole-related fungicides. In *Chirality in agrochemicals*; Kurihara, N., Miyamoto, J., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1998; pp. 141-173.
- Takahisa, E.; Engel, K.-H. 2,3-Di-O-methoxymethyl-6-O-*tert*-butyldimethylsilyl- $\gamma$ -cyclodextrin, a new class of cyclodextrin derivatives for gas chromatographic separation of enantiomers. *J. Chromatogr. A* **2005 a**, *1063*, 181–192.
- Takahisa, E.; Engel, K.-H. 2,3-Di-O-methoxymethyl-6-O-*tert*-butyldimethylsilyl- $\beta$ -cyclodextrin, a useful stationary phase for gas chromatographic separation of enantiomers. *J. Chromatogr. A* **2005 b**, *1076*, 148–154.
- Takeoka, G.; Buttery, R. G.; Ling, L. Odour thresholds of various branched and straight chain acetates. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* **1996**, *29*, 677-680.
- Teranishi, R.; Flath, R. A.; Guadagni, D. G.; Lundin, R. E.; Mon, T. R.; Stevens, K. L. Gas chromatographic, infrared, proton magnetic resonance, mass spectral, and threshold analyses of all pentyl acetates. *Flavor Chemistry* **1966**, *14*, 253-262.
- Teubner, C. *Das große Buch der Exoten*, Teubner Edition: Füssen, 1990; pp. 72-75.
- Tressl, R.; Drawert, F.; Heimann, W.; Emberger, R. Gaschromatographische Bestandsaufnahme von Bananen-Aromastoffen. *Z. Naturforschg.* **1969 a**, *24 b*, 781-783.
- Tressl, R.; Drawert, F.; Heimann, W. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestandsaufnahme von Erdbeer-Aromastoffen. *Z. Naturforschg.* **1969 b**, *24 b*, 1201-1202.
- Tressl, R.; Drawert, F.; Heimann, W.; Emberger, R. Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten. VI. Mitteilung. Ester, Alkohole, Carbonylverbindungen und Phenoläther des Bananenaromas. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1970**, *142*, 313-321.

- Tressl, R.; Drawert, F. Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten. XIII. Mitt.: Einbau von 8-<sup>14</sup>C-Caprylsäure in Bananen- und Erdbeeraromastoffe. *Z. Naturforsch.* **1971**, *26 b*, 774-779.
- Tressl, R.; Engel, K.-H. Formation of esters and terpenoids in passion fruits and their importance to quality evaluation. In *Instrumental analysis of food*; Charalambous, G., Inglett, G., Eds.; Academic Press: New York; Vol 1, 1983, pp. 153-182.
- Tressl, R.; Engel, K.-H. Biogenesis of chiral aroma constituents and their analytical characterization at trace level. In *Progress in flavour research 1984*; Adda, J., Ed.; Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, 1985, pp. 441-455.
- Ueji, S.; Fujino, R.; Okubo, N.; Miyazawa, T.; Kurita, S.; Kitadani, M.; Muromatsu, A. Solvent-induced inversion of enantioselectivity in lipase-catalyzed esterification of 2-phenoxypropionic acids. *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 163-168.
- Ullrich, F.; Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 277-282.
- Uppenberg, J.; Öhrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T. A. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838-16851.
- Vahouny, G. V.; Treadwell, C. R. Pancreatic sterol ester hydrolase. In *Methods in enzymology*; Clayton, R. B., Ed.; Academic Press: New York, London, 1969; Vol. 15, pp. 537-543.
- Vanderplank, J. *Passion flowers*, 2. Auflage, Cassell: London, 1996.
- Van Toller, S. The psychology and neuropsychology of flavor. In *Flavor Measurement*; Ho, C.-T.; Manley, C. H., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1993; pp. 199-218.
- Vollhardt, K. P. C. ; Schore, N. E. *Organische Chemie*, 4. Auflage; Wiley-VCH: Weinheim, 2007.
- Ward, T. J. Chiral separations. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4521-4528.
- Watson, R. R.; Zibadi, S.; Rafatpanah, H.; Jabbari, F.; Ghasemi, R.; Ghafari, J.; Afrasiabi, H.; Foo, L. Y.; Faridhosseini, R. Oral administration of the purple passion fruit peel extract reduces wheeze and cough and improves shortness of breath in adults with asthma. *Nutrition Research* **2008**, *28*, 166-171.
- Weber, B.; Dietrich, A.; Maas, B.; Marx, A.; Olk, J.; Mosandl, A. Stereoisomeric flavour compounds. 66. Enantiomeric distribution of the chiral sulphur-containing alcohols in yellow and purple passion fruits. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1994**, *199*, 48-50.

- Weber, B.; Maas, B.; Mosandl, A. Stereoisomeric flavor compounds. 72. Stereoisomeric distribution of some chiral sulfur-containing trace components of yellow passion fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2438-2441.
- Werkhoff, P.; Brennecke, S.; Bretschneider, W.; Güntert, M.; Hopp, R.; Surburg, H. Chirospecific analysis in essential oil, fragrance and flavor research. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *196*, 307-328.
- Werkhoff, P.; Güntert, M.; Krammer, G.; Sommer, H.; Kaulen, J. Vacuum headspace method in aroma research: Flavor chemistry of yellow passion fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1076-1093.
- Whitfield, F. B.; Stanley, G.; Murray, K. E. Concerning the structures of edulan I and II. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *2*, 95-98.
- Whitfield, F. B.; Stanley, G. The structure and stereochemistry of edulan I and II and the stereochemistry of the 2,5,5,8a-tetramethyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2H-1-benzopyrans. *Aust. J. Chem.* **1977**, *30*, 1073-1091.
- Whitfield, F. B.; Sugowdz, G.; Casimir, D. J. (6E,2E) and (6Z,2E)-6-(but-2-enylidene)-1,5,5-trimethylcyclohex-1-ene: important volatile constituents of the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Chem. Ind.* **1977**, *12*, 502-503.
- Whitfield, F. B.; Sugowdz, G. The 6-(but-2'-enylidene)-1,5,5-trimethylcyclohex-1-enes: important volatile constituents of the juice of the purple passionfruit *Passiflora edulis*. *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 891-903.
- Whitfield, F. B.; Last, J. H. The flavour of the passionfruit – a review. In *Progress in Essential Oil Research*; Brunke, E.-J., Ed.; Walter de Gruyter-Verlag: Berlin, New York, 1986; pp. 3-48.
- Winter, M.; Klöti, R. Über das Aroma der gelben Passionsfrucht (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Helv. Chim. Acta* **1972**, *55*, 1916-1921.
- Winter, M.; Furrer, A.; Willhalm, B.; Thommen, W. Identification and synthesis of two new organic sulfur compounds from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1613-1620.
- Winter, M.; Schulte-Elte, K. H.; Velluz, A.; Limacher, J.; Pickenhagen, W.; Ohloff, G. XVIII. Aromastoffe der roten Passionsfrucht. Zwei neue Edulanderivate. *Helv. Chim. Acta*, **1979 a**, *62*, 131-134.
- Winter, M.; Näf, F.; Furrer, A.; Pickenhagen, W.; Giersch, W.; Meister, A.; Willhalm, B.; Thommen, W.; Ohloff, G. XVIII. (Z)-4,7-Octadiensäure-äthylester und (Z)-Buttersäure-3,5-hexadienylester, zwei neue Aromastoffe der roten Passionsfrucht. *Helv. Chim. Acta* **1979 b**, *62*, 135-139.

- Wright, D. W. Application of multidimensional gas chromatography techniques to aroma analysis. In *Techniques for analyzing food aroma*; Marsili, R., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1997; pp. 113-141.
- Xia, X.; Wang, Y.-H.; Yang, B.; Wang, X. Wheat germ lipase catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols in non-aqueous media. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 83-87.
- Zibadi, S.; Watson, R. R. Passion fruit (*Passiflora edulis*). Composition, efficacy and safety. *Evid. Based Integrative Med.* **2004**, *1*, 183-187.

## LEBENS LAUF

<b>Persönliche Angaben</b>	
Hedwig Strohalm (geb. Reder) Geboren am 30.08.1978 in Pfaffenhofen a. d. Ilm	
<b>Berufserfahrung</b>	
seit 02/09	Produktspezialistin TÜV Süd Product Service, München
<b>Promotion und Studium</b>	
08/05 – 01/09	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU München, Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie, Freising-Weihenstephan
08/04 – 07/05	Lebensmittelchemisches Praktikum am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Würzburg und Erlangen Abschluss: 2. Staatsexamen
10/99 – 07/04	Studium der Lebensmittelchemie an der TU München und Julius-Maximilians-Universität Würzburg Abschluss: 1. Staatsexamen
<b>Berufsorientierung und Schule</b>	
09/98 – 08/99	Freiwilliges Soziales Jahr Evangelisches Altenpflegeheim Ebenhausen
09/89 – 06/98	Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen a. d. Ilm Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
09/85 – 08/89	Grundschule Wolnzach

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht oder als Manuskript eingereicht:

### **Publikationen:**

**Reder, H.; Dregus, M.; Wahl, A.; Engel, K.-H.** Kapillargaschromatographische Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzungen sekundärer Alkohole und ihrer Ester in roten und gelben Passionsfrüchten. *Lebensmittelchemie* **2007**, *61*, 147.

**Strohalm, H.; Dregus, M.; Wahl, A.; Engel, K.-H.** Enantioselective analysis of secondary alcohols and their esters in purple and yellow passion fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10339-10344.

**Reder H.; Dregus, M.; Wahl, A.; Engel, K.-H.** Analytische und sensorische Bewertung chiraler Ester sekundärer Alkohole aus roten Passionsfrüchten. *Lebensmittelchemie* **2008**, *62*, 91.

**Engel, K.-H.; Dregus, M.; Becker, Ch.; Reder, H.; Takahisa, E.** Analytical and sensory characterization of chiral flavor compounds via capillary gas chromatography on cyclodextrins modified by acetal-containing side chains. In *Food Flavor – Chemistry, Sensory Evaluation, and Biological Activity*, Tamura, H.; Ebeler, S. E.; Kubota, K.; Takeoka, G. R., Eds.; 2008; pp. 25-35.

**Strohalm, H.; Weiher, M.; Engel, K.-H.** Enzymkatalysierte kinetische Racematspaltungen: Herstellung Passionsfrucht-typischer Ester. *Lebensmittelchemie* **2008**, *62*, 132.

**Strohalm, H.; Dold, S.; Pendzialek, K.; Weiher, M.; Engel, K.-H.** Biotransformations of secondary alcohols and their esters: Enantioselective esterification and hydrolysis. *Weurman Symposium Series*. Im Druck.

**Strohalm, H.; Dold, S.; Pendzialek, K.; Weiher, M.; Engel, K.-H.** Lipase-catalyzed kinetic resolution: Preparation of optically pure esters of secondary alcohols. *J. Agric. Food Chem.* **2010** (submitted).

### Vorträge und Poster:

**Reder, H.; Dregus, M.; Wahl, A.; Engel, K.-H.** Kapillargaschromatographische Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzungen sekundärer Alkohole und ihrer Ester in roten und gelben Passionsfrüchten. Jahrestagung des Regionalverbandes der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (GDCh), Würzburg, 13.03.2007.

**Strohalm H.; Dregus, M.; Wahl, A.; Engel, K.-H.** Analytische und sensorische Bewertung chiraler Ester sekundärer Alkohole aus roten Passionsfrüchten. 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen-Nürnberg, 10.-12.09.2007.

**Strohalm, H.; Weiher, M.; Engel, K.-H.** Enzymkatalysierte kinetische Racematspaltungen: Herstellung Passionsfrucht-typischer Ester. Jahrestagung des Regionalverbandes der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (GDCh), Oberschleißheim, 04.03.2008.

**Strohalm, H.; Dold, S.; Weiher, M.; Engel, K.-H.** Biotransformations of secondary alcohols and their esters: Enantioselective esterification and hydrolysis. 12. Weurman Flavour Research Symposium, Interlaken, Schweiz, 01. - 04.07.2008.