

**Untersuchungen zur Erdbeerfruchtreifung
Biosynthese von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon
und
Enzymaktivitäten während des Reifungsprozesses**

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

vorgelegt von
Thomas Raab
aus Würzburg

Würzburg 2004

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Promotionskolloquiums

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Familie

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab, TU München, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, die kompetente wissenschaftliche Betreuung und die vielfältige Unterstützung.

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

Bei Walli Seefelder bedanke ich mich für ihre nette und liebenswerte Art und ihre große Geduld beim Fertigstellen der Arbeit. Bei Tobias Hauck möchte ich mich für die einzigartige gemeinsame Zeit im „Bubenlabor“ bedanken. An die zahlreichen gemeinsamen privaten Unternehmungen werde ich mich sicher immer wieder gerne erinnern. Ich hoffe es folgen in der nächsten Zeit noch viele weitere.

Bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die stete Hilfsbereitschaft. Ein herzliches Dankeschön besonders an die LC-MS-Crew (Stefanie Diem, Diana Kemmer, Dominique Kavadias und Walli Seefelder), das GC-MS-Team (Bernhardt Weckerle und Frank Heckel) und die IRMS-Mädels (Katja Hör, Christiane Ruff, Ariane Hartlieb).

Auch bedanken möchte ich mich beim Arbeitskreis-Freising für die nette Atmosphäre während meiner Besuche. Mein Dank gilt insbesondere Stefan Lunkenbein, Dorothe Klein und Daniel Abanda für ihre Gastfreundschaft.

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

Bei Herrn Prof. R. Berger, Universität Hannover, bedanke ich mich für die Durchführung der GC-AED-Messungen.

Für die Aminosäuresequenzierung bedanke ich mich bei Frau Dr. V. Hoppe, Lehrstuhl für Physiologische Chemie II, der Universität Würzburg.

Herrn Dr. A. Aharoni, Plant Research International in Wageningen (Niederlande), gilt mein Dank für die Bereitstellung des ADH-Klons.

Dr. Fredi Brühlmann gilt mein Dank für die sorgfältige und kritische Durchsicht meiner Publikations-Manuskripte aber auch für seine Hilfsbereitschaft nach Fertigstellung der Arbeit.

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

Für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums danke ich Monika Richter, Anja Knecht und Yvonne Hübner.

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

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für die vielfältige Unterstützung im Studium und während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

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

Publikationsliste

Veröffentlichungen

Raab, T.; Hauck, T.; Knecht, A.; Schmitt, U.; Holzgrabe, U.; Schwab, W. Tautomerism of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone: Evidence for its enantioselective biosynthesis. *Chirality* **2003**, *15*, 573-578.

Raab, T.; Schmitt, U.; Hauck, T.; Knecht, A.; Holzgrabe, U.; Schwab, W. Capillary electrophoretic resolution of the enantiomers of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone, the key flavor compounds in strawberry fruit. *Chromatographia* **2003**, *57*, 501-504.

Hauck, T.; Landmann, C.; Raab, T.; Bruhlmann, F.; Schwab, W. Chemical formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2*H*]-furanone from D-fructose 1,6-diphosphate. *Carbohydrate Research* **2002**, *337*, 1185-1191.

Schwab, W.; Aharoni, A.; Raab, T.; Perez, A. G.; Sanz, C. Cytosolic aldolase is a ripening related enzyme in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*). *Phytochemistry* **2001**, *56*, 407-415.

Vorträge

Schwab, W.; Hauck, T.; Raab, T.

Biosynthesis of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (HDMF) in strawberry fruits and the yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: First evidence for an enzymatic formation.

Firmenich SA, Genf, Schweiz, **23.3.2001**.

Raab, T.; Schwab, W.

Untersuchung reifeinduzierter enzymatischer Reaktionen in Erdbeerfrüchten (*Fragaria x ananassa*).

53. Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der lebensmittelchemischen Gesellschaft, Erlangen, **7.3.2002**.

Posterbeiträge

Schwab, W.; Dahlen, T.; Wein, M.; Hauck, T.; Raab, T.

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

GDCh-Jahrestagung Chemie 2001,

Universität Würzburg, **23. - 29.09.2001**.

Schmitt, U.; Raab, T.; Hauck, T.; Schwab, W.; Holzgrabe, U.

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

16th International Symposium on Microscale Separations and Analysis, San Diego, California USA, **17. - 22.01.2003**.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	V
A EINLEITUNG	1
B KENNTNISSTAND	3
1 DIE ERDBEERE	3
2 DIE FRUCHTREIFUNG	4
2.1 ALLGEMEINES	4
2.2 FRUCHTREIFUNGSPROZESS	5
2.3 FRUCHTREIFUNG DER ERDBEERE.....	7
3 AROMA VON ERDBEEREN	10
4 2,5-DIMETHYL-3(2H)-FURANONE	12
4.1 ENTDECKUNG, VORKOMMEN UND BEDEUTUNG	12
4.2 EIGENSCHAFTEN.....	15
4.2.1 <i>Keto-Enol-Tautomerie</i>	15
4.2.2 <i>Sensorische Eigenschaften</i>	16
4.2.3 <i>Wichtige physikalisch-chemische Eigenschaften und Stabilität</i>	18
4.3 BILDUNG VON 4-HYDROXY-2,5-DIMETHYL-3(2H)-FURANON IN DER MAILLARD-REAKTION.....	19
4.3.1 <i>Die Maillard-Reaktion</i>	19
4.3.2 <i>Bildung aus unphosphorylierten Zuckern</i>	20
4.3.3 <i>Bildung aus phosphorylierten Zuckern</i>	22
4.4 BIOSYNTHESE	24
4.4.1 <i>4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon</i>	24
4.4.2 <i>2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon</i>	27
5 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	32

C	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	33
1	SUCHE NACH ZWISCHENVERBINDUNGEN DER HDMF- BIOGENESE	33
1.1	INKORPORATIONSVERSUCHE MIT RADIOAKTIV MARKIERTEM D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT	33
1.2	INKORPORATIONSVERSUCHE MIT ¹³ C-MARKIERTER D-FRUCTOSE	39
1.3	METABOLISMUS VON RADIOAKTIV MARKIERTEM D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT IN ERDBEERPROTEINEXTRAKTEN	45
1.4	UMSETZUNGSVERSUCHE MIT <i>o</i> -PHENYLENDIAMIN	48
1.4.1	<i>Analytik reaktiver α-Dicarbonylverbindungen</i>	48
1.4.2	<i>Inkorporationsversuche von Erdbeerfrüchten mit o-Phenylendiamin</i>	49
1.4.3	<i>Metabolismus von D-Fructose-1,6-diphosphat in Erdbeerproteinextrakt unter Zusatz von o-Phenylendiamin</i>	52
1.5	DISKUSSION	54
2	NACHWEIS D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT ABBAUENDER ENZYMATISCHER AKTIVITÄTEN DER ERDBEERFRUCHT	57
2.1	CHARAKTERISIERUNG VON ALDOLASE-AKTIVITÄT IN REIFENDEN ERDBEERFRÜCHTEN	57
2.1.1	<i>Klassifizierung von Aldolasen</i>	57
2.1.2	<i>Bestimmung der Aldolase-Aktivität</i>	58
2.1.3	<i>Grundlegende Aufreinigung der Aldolase-Aktivität reifender Erdbeerfrüchte</i>	59
2.1.4	<i>Charakterisierung der aus reifenden Erdbeeren isolierten Aldolase Isoenzyme</i>	60
2.1.5	<i>Verlauf der Aldolase-Aktivität während der Erdbeerfrucht-Reifung</i>	61
2.1.6	<i>Hitzestabilität und Wiederfindung der Aktivität nach Behandlung mit Säure</i>	64
2.1.7	<i>Klonierung und Sequenzanalyse des Gens der cytosolischen Aldolase der Erdbeere</i>	64

2.1.8	<i>Nachweis der Induktion der SCA1-Expression im reifenden Blütenboden durch Mikroarray-Technik und RNA-Blot Analyse</i>	65
2.1.9	<i>Diskussion</i>	66
2.2	NACHWEIS WEITERER REIFEINDUZierter ENZYME DER ERDBEERFRUCHT.....	68
2.2.1	<i>Phosphohexose-Isomerase</i>	68
2.2.2	<i>Fructosediphosphatase</i>	69
2.2.3	<i>Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase</i>	70
2.2.4	<i>6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase</i>	71
2.2.5	<i>Aufreinigung der nachgewiesenen enzymatischen Aktivitäten mittels Anionenaustauscherchromatographie</i>	72
2.2.6	<i>Diskussion</i>	73
2.3	HETEROLOGE EXPRESSION UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG EINER ALKOHOL-DEHYDROGENASE AUS ERDBEEREN (<i>FRAGARIA X ANANASSA</i> CV. ELSANTA).....	77
2.3.1	<i>Substratspezifität</i>	78
2.3.2	<i>Michaelis-Konstante und maximale Reaktionsgeschwindigkeit für Acetaldehyd</i>	78
2.3.3	<i>Diskussion</i>	80
3	BILDUNG VON HDMF IN PROTEINEXTRAKTEN REIFENDER ERDBEERFRÜCHTE	83
3.1	GEWINNUNG VON ERDBEERPROTEINEXTRAKTEN	83
3.2	INKUBATION VON CYTOSOLISCHEM ERDBEERPROTEINEXTRAKT MIT D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT	85
3.3	INKUBATION DES RÜCKSTANDES MIT ZELLWAND UND MEMBRANBESTANDTEILEN MIT D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT	85
3.4	NACHWEIS DER BILDUNG VON HDMF	86
3.4.1	<i>HPLC-DAD-Analysen</i>	86
3.4.2	<i>Massenspektrometrische Charakterisierung</i>	86
3.5	CHEMISCHE BILDUNG VON HDMF AUS D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT.....	88

3.6	NACHWEIS DER ENZYMKATALYSIERTEN METABOLISIERUNG VON D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT ZU HDMF IM CYTOSOLISCHEN PROTEINEXTRAKT AUS REIFEN ERDBEERFRÜCHTEN	90
3.6.1	<i>Hitzeinaktivierung des cytosolischen Proteinextraktes</i>	90
3.6.2	<i>Verdünnungsstudie</i>	91
3.6.3	<i>Enantioselektive Analyse von HDMF</i>	92
3.6.3.1	Einführung.....	92
3.6.3.2	Darstellung von enantiomerenangereicherten HDMF - Einsatz der MDGC unter Verwendung des „moving column switching systems“ (MCSS).....	93
3.6.3.3	Entwicklung einer neuen Methode zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von HDMF mittels Chiralphasen Kapillarzonelektrophorese.....	94
3.6.3.4	Analyse einer HDMF-Referenz mittels cKZE	96
3.6.3.5	Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit von HDMF	96
3.6.3.6	Bestimmung des optischen Drehwinkels der HDMF-Enantiomere	99
3.6.3.7	Enantioselektive Analyse von natürlichem HDMF aus Erdbeerfrüchten	99
3.6.3.8	Enantioselektive Analyse von HDMF gebildet durch cytosolischen Proteinextrakt aus Erdbeerfrüchten	100
	Analyse mittels Chiralphasen HPLC.....	100
	Analyse mittels Chiralphasen Kapillarzonelektrophorese.....	101
3.6.4	<i>Diskussion</i>	103
3.7	CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMKATALYSIERTEN BILDUNG VON HDMF AUS D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT.....	105
3.7.1	<i>Variation der Inkubationstemperatur</i>	105
3.7.2	<i>Variation des pH-Wertes</i>	106
3.7.3	<i>Einsatz unterschiedlicher Substratmengen – Michaelis-Menten-Kinetiken</i>	107
3.7.4	<i>Einfluss des Reifegrades der Erdbeerfrüchte auf die Menge an gebildetem HDMF</i>	109

3.7.5	<i>Variation der Substrate</i>	110
3.8	AUFREINIGUNG DER HDMF-BILDENDEN ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT.....	111
3.8.1	<i>Trennung anhand des Molekulargewichtes</i>	111
3.8.1.1	Ultrafiltration	111
3.8.1.2	Gelpermeationschromatographie.....	113
3.8.2	<i>Trennung durch Ionenaustauschchromatographie</i>	114
3.8.3	<i>SDS-PAGE</i>	114
3.9	SEQUENZIERUNG DES AUFGEREINIGTEN PROTEINS.....	116
3.10	DISKUSSION.....	119
D	MATERIAL UND METHODEN	125
1	MATERIAL	125
1.1	CHEMIKALIEN.....	125
1.2	ENZYME	125
1.3	PFLANZENMATERIAL	125
1.4	FÜLLMATERIALIEN FÜR DIE SÄULENCHROMATOGRAPHIE.....	125
1.5	MEMBRANFILTRATION	126
1.6	FESTPHASENEXTRAKTION.....	126
1.7	DIALYSE	126
1.8	ULTRAFILTRATION	126
1.9	PUFFERHERSTELLUNG	126
2	GERÄTE	127
2.1	SCHÜTTELINKUBATOR.....	127
2.2	UV-VIS-SPEKTRALPHOTOMETER	127
2.3	FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE	127
2.3.1	<i>Ionenaustauschchromatographie</i>	127
2.3.2	<i>Gelpermeationschromatographie</i>	128
2.4	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE (HPLC)	129
2.5	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE-TANDEMMASSEN- SPEKTROMETRIE (HPLC-MS/MS).....	132
2.6	KAPILLARGASCHROMATOGRAPHIE – MASSENSPEKTROMETRIE (HRGC-MS)....	133

2.7	GASCHROMATOGRAPHIE- ATOMEMISSIONSDETEKTION (GC-AED).....	135
2.8	CHIRALPHASEN – KAPILLARZONENELEKTROPHORESE (CKZE)	135
2.9	FLÜSSIGSZINTILLATIONSZÄHLER (LSC, LIQUID-SCINTILLATION-COUNTING) ...	135
2.10	POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (PAGE)	136
2.11	SONSTIGE GERÄTE	136
3	METHODEN	137
3.1	GRUNDLEGENDE METHODEN	137
3.1.1	<i>Quantifizierung von HDMF</i>	<i>137</i>
3.1.2	<i>Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Assay.....</i>	<i>137</i>
3.1.3	<i>Proteinbestimmung nach Bradford (1976)</i>	<i>137</i>
3.2	INKORPORATIONSVERSUCHE AN GANZEN, REIFEN ERDBEERFRÜCHTEN.....	138
3.2.1	<i>Inkorporationsversuche mit [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat.....</i>	<i>138</i>
3.2.2	<i>Inkorporationsversuche mit [U-¹³C]-D-Fructose</i>	<i>139</i>
3.2.3	<i>Inkorporationsversuche von Erdbeerfrüchten mit o-Phenylendiamin</i>	<i>140</i>
3.3	INKUBATION VON RADIOAKTIV MARKIERTEM D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT MIT ERDBEERPROTEINEXTRAKT	141
3.4	UMSETZUNG VON D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT MIT ERDBEERPROTEIN- EXTRAKT UNTER ZUSATZ VON O-PHENYLENDIAMIN	141
3.5	UNTERSUCHUNG ENZYMATISCHER AKTIVITÄTEN DER ERDBEERFRUCHT	142
3.5.1	<i>Charakterisierung einer Aldolase-Aktivität in reifenden Erdbeerfrüchten... 142</i>	
3.5.1.1	<i>Enzymassay</i>	<i>142</i>
3.5.1.2	<i>Gewinnung des geklärten Extraktes</i>	<i>143</i>
3.5.1.3	<i>Abtrennung von Pektin.....</i>	<i>143</i>
3.5.1.4	<i>Chromatographie an Diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose</i>	<i>143</i>
3.5.1.5	<i>Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S300</i>	<i>143</i>
3.5.1.6	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	<i>145</i>
3.5.1.7	<i>Berechnung des Trockengewichtes und Bestimmung von Anthocyanen.....</i>	<i>145</i>
3.5.1.8	<i>Sequenzierung und Expressions-Analyse von SCA1.....</i>	<i>145</i>
3.5.2	<i>Nachweis weiterer Enzymaktivitäten der Erdbeerfrucht</i>	<i>146</i>

3.5.2.1	Enzymassays.....	146
3.5.2.2	Gewinnung des geklärten Extraktes	148
3.5.2.3	Chromatographie an Q-Sepharose Fast Flow	148
3.5.3	<i>Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung einer Alkohol-Dehydrogenase aus Erdbeeren.....</i>	<i>148</i>
3.5.3.1	Bakterienwachstum	148
3.5.3.2	Genexpression	149
3.5.3.3	Isolierung und Reinigung der ADH	149
3.5.3.4	Enzymassay	149
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON HDMF IN PROTEINEXTRAKTEN REIFENDER ERDBEERFRÜCHTE.....	150
3.6.1	<i>Extraktgewinnung.....</i>	<i>150</i>
3.6.2	<i>Inkubation.....</i>	<i>150</i>
3.6.3	<i>Extraktion und Analyse.....</i>	<i>151</i>
3.7	ENANTIOSELEKTIVE ANALYSE VON HDMF	151
3.7.1	<i>Darstellung von einantiomerenangereichertem HDMF.....</i>	<i>151</i>
3.7.2	<i>Extraktion von HDMF aus Erdbeerfrüchten.....</i>	<i>151</i>
3.7.3	<i>HDMF durch Inkubation mit Erdbeerproteinextrakt.....</i>	<i>152</i>
3.7.4	<i>Bestimmung des optischen Drehwinkels der HDMF-Enantiomere.....</i>	<i>152</i>
3.8	CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMKATALYSIERTEN BILDUNG VON HDMF AUS D-FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT	153
3.8.1	<i>Variation des pH-Wertes</i>	<i>153</i>
3.8.2	<i>Einfluss der Temperatur</i>	<i>153</i>
3.8.3	<i>Einsatz unterschiedlicher Substratmengen - Michaelis-Menten-Kinetiken... 153</i>	
3.8.4	<i>Einfluss des Reifegrades der Erdbeerfrüchte auf die Menge an gebildetem HDMF</i>	<i>154</i>
3.8.5	<i>Variation der Substrate</i>	<i>154</i>
3.9	AUFREINIGUNG DER HDMF-BILDENDEN ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT.....	155
3.9.1	<i>Grundlegende Aufreinigungsschritte.....</i>	<i>155</i>
3.9.1.1	<i>Herstellung des geklärten Extraktes</i>	<i>155</i>
3.9.1.2	<i>Ultrafiltration.....</i>	<i>155</i>

3.9.2	<i>Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S300</i>	156
3.9.3	<i>Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose Fast Flow</i>	157
3.9.4	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	158
3.10	AMINOSÄURESEQUENZIERUNG	159
E	LITERATURVERZEICHNIS	159

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AEDA	Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (<i>aroma extract dilution analysis</i>)
AED	Atomemissionsdetektion
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C18	unpolares Festphasenmaterial mit C18-Alkylketten
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
cKZE	Chirale Kapillarzonenelektrophorese
¹³ C-NMR	¹³ C magnetische Kernresonanzspektroskopie
CoA	Coenzym A
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
dest.	destilliert
DMMF	2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2 <i>H</i>)-furanon, Methoxyfuraneol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dpm	Zerfälle pro Minute (<i>desintegrations per minute</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
ES	Elektrospray
ESI	Elektrospray-Ionisierung
eV	Elektronen-Volt
FD	Aroma-Verdünnung (<i>flavour dilution</i>)
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunden

HDMF	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon, Furaneol [®]
HEMF	4-Hydroxy-2(oder 5)-ethyl-5(oder 2)-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon, Homofuraneol
HMF	4-Hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon, Norfuraneol
¹ H-NMR	¹ H-magnetische Kernresonanzspektroskopie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRGC	Kapillargaschromatographie (<i>high resolution gas chromatography</i>)
IEC	Ionenaustauschchromatographie (<i>ion exchange chromatography</i>)
i.D.	innerer Durchmesser
IRMS	Isotopenverhältnismassenspektrometrie (<i>isotope ratio mass spectrometry</i>)
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KZE	Kapillarzonenelektrophorese
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LSC	Flüssigszintillationszählung (<i>liquid scintillation counting</i>)
M	Molarität, mol/l
<i>m/z</i>	Quotient aus Ionenmasse und Ionenladung
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MDGC-MS	Multidimensionale Gaschromatographie-Massenspektrometrie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minuten
mol	Mol
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis
N	Normalität
NAD	Nicotinamidadenin-dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenin-dinukleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenin-dinukleotid-phosphat (oxidierte Form)

NADPH	Nicotinamidadenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
NMR	Magnetische Kernresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NP	Normalphase (<i>normal phase</i>)
OMT	O-Methyltransferase
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ppm	Anteile pro Million (<i>parts per million</i>)
ppb	Anteile pro Milliarde (<i>parts per billion</i>)
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
QR	Chinon-Oxidoreduktase (<i>quinone oxidoreductase</i>)
Rf	Retentionsfaktor
RIC	Totalionenchromatogramm (<i>reconstructed ion chromatogramm</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RP18	Umkehrphase mit C18-Alkylketten (<i>reversed phase</i>)
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SAX	starker Anionenaustauscher (<i>strong anion exchange</i>)
SCA1	cytosolische Aldolase der Erdbeere (<i>strawberry cytosolic aldolase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
U- ¹⁴ C	Molekül uniform mit ¹⁴ C markiert
U- ¹³ C	Molekül uniform mit ¹³ C markiert
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V _{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
XAD	Spezialadsorberharz aus Amberlite [®]

Zusammenfassung

Die Fruchtreifung stellt einen hochkomplexen Prozess dar, der durch eine Reihe von biochemischen und physiologischen Veränderungen gekennzeichnet ist. Dies umfasst bedeutende Veränderungen von Textur, Farbe sowie die Bildung von geschmacks- und geruchsaktiven Verbindungen. Die vorliegende Arbeit präsentiert neue Erkenntnisse zur Biosynthese von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (Furaneol[®], HDMF), einer Schlüssel-Aromakomponente der Erdbeere (*Fragaria x ananassa*). Daneben lieferten die durchgeführten Versuche den Nachweis einer Reihe enzymatischer Aktivitäten in der Erdbeerfrucht und beleuchteten deren Entwicklung im Verlauf der Erdbeer-Fruchtreifung. Zum ersten Mal wurde ein Protein aus Erdbeerfrüchten isoliert, partiell sequenziert und seine Beteiligung an der enzymatischen Bildung von HDMF während der Fruchtreifung nachgewiesen.

In Inkorporationsexperimenten mit reifen, ganzen Erdbeerfrüchten sowie in Inkubationsstudien mit Erdbeerproteinextrakten wurden [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat sowie [U-¹³C]-D-Fructose eingesetzt, um Zwischenverbindungen der HDMF-Biogenese zu identifizieren. Die durchgeführten Experimente lieferten jedoch keinen Hinweis auf die Anwesenheit eines möglichen Intermediates. Inkorporations- sowie Inkubationsexperimente unter Zusatz von *o*-Phenylendiamin sollten in Anlehnung an den bekannten Reaktionsmechanismus für die Bildung von HDMF im Zuge der Maillard-Reaktion den Nachweis intermediär gebildeter, reaktiver α -Dicarbonylverbindungen liefern. Zwar wurden einige gebildete Abfangprodukte, so genannte Quinoxalinderivate, aufgrund ihrer charakteristischen UV-Spektren nachgewiesen, die Ergebnisse parallel durchgeführter Umsetzungsversuche mit [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat unter Zusatz von *o*-Phenylendiamin sprechen jedoch gegen eine Beteiligung der abgefangenen Verbindungen bei der Biogenese von HDMF.

Die Ergebnisse der Inkorporations- und Inkubationsexperimente lieferten zum ersten Mal Hinweise auf das Vorhandensein verschiedener Zucker-abbauender enzymatischer Aktivitäten in der Erdbeerfrucht. Aus reifen Erdbeerfrüchten konnten zwei Aldolase-Isoenzyme

isoliert und partiell mittels Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose sowie Gelpermeationschromatographie aufgereinigt werden. Die Isoenzyme wurden als cytosolische und plastidische Klasse I Aldolasen identifiziert. Die Zuordnung erfolgte auf der Grundlage ihres chromatographischen Verhaltens an DEAE-Cellulose, ihres nativen Molekulargewichtes (160 kDa), sowie der Molekulargewichte ihrer Untereinheiten (38 bzw. 40 kDa für die plastidische bzw. cytosolische Isoform), bestimmt durch SDS-PAGE, ihrer pH-Optima, ihrer K_m -Werte für D-Fructose-1,6-diphosphat und ihrer Inaktivierung bei niedrigen pH-Werten. In Erdbeeren der grünen und weißen Reifephase macht die cytosolische Aldolase einen Anteil von 15 bzw. 8 % an der Gesamtaktivität aus. In „pinken“ und roten Früchten ist ein dramatischer Anstieg des Anteils an cytosolischer Aldolase auf Werte von 50 bzw. 75 % zu beobachten, was eine Funktion innerhalb der Fruchtreifung impliziert. Die Gesamtaktivität nimmt zunächst im Verlauf der Fruchtreifung bis zum „pinken“ Reifestadium ab, um anschließend durch den Anstieg der cytosolischen Aldolase wieder zuzunehmen. Eine cDNA wurde geklont, die für die cytosolische Form der Aldolase aus Erdbeerfrüchten codiert (SCA1). Expressions-Analysen unter Verwendung der Mikroarray-Technik sowie mit Hilfe von RNA-Blots verdeutlichten den signifikanten Anstieg des SCA1 mRNA-Gehaltes während der Reifung.

Mit Hilfe spezifischer photometrischer Bestimmungen wurde der Erdbeerproteinextrakt auf die Anwesenheit weiterer Zucker- und Zuckerphosphat-abbauender enzymatischer Aktivitäten untersucht. So konnte die Anwesenheit von Phosphohexose-Isomerase, Fructose-diphosphatase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase sowie 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass alle Aktivitäten mit Ausnahme der Phosphohexose-Isomerase reifeinduziert sind. Mittels Anionenaustauscherchromatographie gelang die Trennung der Phosphohexose-Isomerase sowie 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase in ihre Isoenzyme.

Eine Erdbeerfrucht cDNA, die für eine Alkohol-Dehydrogenase (ADH) kodiert, wurde geklont, und in *E. coli* BL21 (De 3) pLys Bakterien transformiert. Das isolierte und gereinigte, exprimierte Protein zeigte enzymatische Aktivität gegenüber verschiedenen Aldehyden. Das Substrat mit der höchsten Umsatzrate war Acetaldehyd (K_m -Wert 43.5 μ M), daneben wurden unter anderem Hexanal, Isovaleraldehyd, Butanal und Propanal umge-

setzt. Eine mögliche Beteiligung der ADH bei der Bildung von HDMF wurde durch Umsetzungsversuche mit D-Fructose-1,6-diphosphat ausgeschlossen.

Um die proteinchemische Aufreinigung, der an der HDMF-Bildung beteiligten enzymatischen Aktivitäten aus Erdbeerproteinextrakten zu ermöglichen ist erstmals ein Verfahren zum Nachweis der biochemischen Bildung von HDMF entwickelt worden. Es wurden Inkubationsexperimente von Erdbeerproteinextrakten mit D-Fructose-1,6-diphosphat unter Zusatz der Reduktionsäquivalente NADH bzw. NADPH durchgeführt. HPLC-DAD sowie HPLC-MS Analytik konnten die Bildung von HDMF demonstrieren. Die Charakterisierung der vermuteten enzymatischen Bildung sollte die Abgrenzung gegenüber einer ebenfalls nachgewiesenen, rein chemischen Bildung von HDMF ermöglichen. So führte die Hitzebehandlung des Proteinextraktes vor der Inkubation zur Inhibierung der Bildung. Die kontinuierliche Verdünnung des Extraktes mit Puffer führte zur stetigen Abnahme der gebildeten Menge an HDMF bis auf einen konstanten Wert, der die beschriebene chemische Bildung repräsentiert. Das Temperaturoptimum der Bildung lag bei 35°C, das pH-Optimum bei pH 7. Temperaturen über 40°C, sowie pH-Werte größer als 8 und niedriger als 4 inhibierten die Bildung. Es wurden K_m -Werte von 30 μM für NADH sowie 3.5 mM für D-Fructose-1,6-diphosphat ermittelt. Auch die Abhängigkeit der HDMF-Bildung vom Reifegrad der Erdbeerfrüchte wurde untersucht. Bei Umsetzungen mit Extrakt, gewonnen aus grünen Früchten, entstand kein HDMF. Mit dem Extrakt, gewonnen aus „pinken“ Früchten, wurden etwa 60 % der HDMF-Menge von Umsetzungen mit Extrakt, gewonnen aus roten Früchten, erreicht.

Die enantioselektive Analytik des in den Inkubationsexperimenten gebildeten HDMF lieferte den eindeutigen Beweis für seine enzymkatalysierte Bildung. Erstmals konnte eine Methode mittels Chiralphasen Kapillaronenelektrophorese entwickelt werden, mit der sich die HDMF-Enantiomere mit sehr hoher Auflösung trennen lassen ($R_s = 2.6$). Die neu entwickelte Analysenmethode ermöglicht die Untersuchung der Abhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit von HDMF vom pH-Wert des Mediums. Enantiomerenangereichertes HDMF wurde dazu durch Fraktionierung mittels Chiralphasen NP-HPLC an Chiraspher NT[®] gewonnen. Im neutralen Milieu (pH 7) unterliegt HDMF einer raschen Racemisierung, wodurch jegliche Stereoinformation verloren geht. Im schwach sauren bis sau-

ren Milieu (pH 3,5-5) wurde hingegen eine nur langsam ablaufende Racemisierung beobachtet. In Inkubationsversuchen mit Erdbeerproteinextrakt bei pH 5 konnte die Bildung von enantiomerenangereichertem HDMF (32 %*ee*) demonstriert werden. Der spezifische Drehwert der HDMF-Enantiomere wurde mittels Polarimetrie einer über Chiralphasen HPLC enantiomerenangereicherten HDMF-Lösung zu $[\alpha]_D^{25} = \pm 96^\circ$ bestimmt. Das linksdrehende Isomer (-) zeigte unter den eingesetzten HPLC- wie auch cKZE-Bedingungen die höhere Mobilität im Vergleich zum rechtsdrehenden (+).

Die so nachgewiesene enzymatische Aktivität konnte mittels Ultrafiltration, Gelpermeationschromatographie (GPC) und Ionenaustauschchromatographie (IEC) partiell aufgereinigt werden. Der Aktivitätsnachweis erfolgte dabei mit Hilfe des etablierten Inkubationsverfahrens. Aktive Fraktionen von GPC und IEC wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Der beobachtete Aktivitätsverlauf korrelierte dabei mit dem Auftreten einer einzelnen Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa. Die N-terminale Blockierung des Proteins machte die selektive Spaltung mittels Bromcyan an Methioninresten zur Sequenzanalyse erforderlich. Die Spaltung des unter reduzierenden Bedingungen aufgereinigten Proteins verlief jedoch unvollständig und lieferte nur wenige Peptidfragmente, entstanden durch säurekatalysierte Hydrolyse. Die Sequenzanalyse zweier Fragmente mittels automatisiertem Edman-Abbau lieferte zwei Peptidsequenzen, die vollständige Identität mit Teilsequenzen einer stark reifeinduzierten vermuteten Chinon-Oxidoreduktase aus Erdbeeren zeigte. Das aus der korrespondierenden Proteinsequenz der in der Datenbank angegebenen Chinon-Oxidoreduktase cDNA errechnete Molekulargewicht von 34.3 kDa liefert unter Berücksichtigung möglicher Derivatisierungen der Aminosäurereste eine gute Übereinstimmung mit dem mittels SDS-PAGE bestimmten Molekulargewichtes des nativen Proteins. Innerhalb der Proteinsequenz findet sich lediglich ein Methioninrest am N-Terminus was die beobachteten Schwierigkeiten bei der Spaltung mit Bromcyan erklärt.

In weiterführenden Arbeiten gelang unserer Arbeitsgruppe (Daten unveröffentlicht) die heterologe Expression der Chinon-Oxidoreduktase. Die Bildung von HDMF unter Einsatz des exprimierten Proteins im etablierten Inkubationsverfahren lieferte den endgültigen Identitätsnachweis des im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten Enzyms als Chinon-Oxidoreduktase aus Erdbeerfrüchten. Von einer Beteiligung an der HDMF-Biogenese muss ausgegangen werden.

Summary

Fruit ripening represents a highly complex process, characterized by a series of biochemical and physiological changes. This comprises significant changes in texture and colour as well as production of odor- and flavour-active compounds. The present work reveals new insight into the biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (Furaneol[®], HDMF), a key flavour compound of strawberry (*Fragaria x ananassa*). For the first time, a protein active in the enzymatic formation of this compound during strawberry fruit ripening was isolated from the fruit, partially sequenced and characterised.

The initial series of incorporation experiments using ripe intact strawberry fruits and incubation studies using strawberry fruit extracts, both intended to identify intermediates of HDMF biosynthesis through the application of [U-¹⁴C]-D-fructose-1,6-diphosphate and [U-¹³C]-D-fructose, provided no evidence for the existence of a possible intermediate. In addition, when these experiments were performed with *o*-phenyldiamine, no reactive α -dicarbonyl compounds, which are among the known intermediates of the Maillard reaction (according to the current understanding of the mechanisms for the formation of HDMF), were found. Although some products, so-called quinoxalines were identified by their characteristic UV spectra the results of additional transformation experiments with [U-¹⁴C]-D-fructose-1,6-diphosphate after addition of *o*-phenyldiamine argue against an involvement of the trapped compounds in the biosynthesis of HDMF.

Although no evidence of intermediates was found, enzymes with sugar-degrading activities were demonstrated in strawberry fruit. Two aldolase-isoenzymes were isolated from ripe strawberry fruits and partially purified by DEAE anion exchange and Sephacryl size exclusion chromatography. The isoenzymes were identified as class I cytosol and plastid aldolase on the basis of their chromatographic behaviour on DEAE-cellulose columns, native molecular weight (160 kDa), pH optimum pattern, K_m value for D-fructose-1,6-diphosphate, tendency to be inactivated by lower pH values and SDS-PAGE subunit determination of 40 and 38 kDa, respectively. Cytosol aldolase activity was found to account for 15 and 8 % of total activity in green and white fruits, respectively, increasing dramati-

cally to 50 % in pink fruits and 75 % in red fruits. The total aldolase activity also increases after the pink ripening stage, apparently driven by the increase in cytosol aldolase activity. Both observations imply that this enzyme functions during fruit ripening. Further evidence was provided by a cloned cDNA, encoding the cytosolic form of aldolase from strawberry fruit (*SCAI*). Expression analyses with both microarrays and RNA gel blots showed that *SCAI* mRNA level increases during strawberry ripening.

Using specific photometric assays, the strawberry protein extract was tested for additional enzymatic activities relating to the degradation of sugars and sugar phosphates. Activity of fructose-1,6-diphosphatase, phosphohexose isomerase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase were all detected in the extract. Separation of phosphohexose isomerase and 6-phosphogluconate dehydrogenase isoenzymes was accomplished employing anion exchange chromatography. All enzymes except phosphohexose isomerase were found to be ripening induced.

A strawberry fruit cDNA encoding for an alcohol dehydrogenase (ADH) was cloned and transformed into *E. coli* BL21 (De 3) pLys bacteria. The isolated and purified expressed protein exhibits enzymatic activity towards different aldehydes. Acetaldehyde (K_m -value 43.5 μ M) represented the substrate with the highest conversion rate. In addition, hexanal, isovaleraldehyde, butanal and propanal were also accepted. The putative involvement of ADH within the formation of HDMF was excluded by incubation experiments of ADH with D-fructose-1,6-diphosphate.

An enzyme assay was developed to demonstrate for the first time the biochemical formation of HDMF in strawberry protein extract and to facilitate the protein purification of the enzymatic activity. Incubation experiments were performed with strawberry fruit protein extracts after addition of D-fructose-1,6-diphosphate and the reduction equivalents NADH and NADPH. HPLC-DAD as well as HPLC-MS analysis confirmed the formation of HDMF. Characterization of the presumed enzymatic formation allowed the delimitation towards a purely chemical formation of HDMF. Heat treatment of the extract prior to incubation led to inhibition of HDMF generation. Successive dilution of the extract with buffer resulted in a steady decrease in the amount of generated HDMF down to a constant amount, representing the chemical formation. The temperature optimum was around 35°C,

the pH-optimum around pH 7. Higher temperatures than 40°C as well as higher pH-values than 8 and values less than 4 inhibited HDMF generation. K_m values were determined to be 30 μM for NADH and 3.5 mM for D-fructose-1,6-diphosphate. The dependency of HDMF formation from the ripening stage of the strawberry fruits was also investigated. HDMF was not formed in incubation experiments using the extract of green fruits. About 60 % of the amount of HDMF analysed in incubation experiments with the extract of red fruits was obtained using the extract of pink fruits.

The enantioselective analysis of HDMF, formed in incubation experiments, provided unambiguous evidence for the enzymatic formation of HDMF. For the first time a cyclodextrine-modified capillary electrophoresis (CE) method was developed for this purpose, allowing a separation of HDMF enantiomers with high resolution ($R_s = 2.6$). Development of this new analysis method enabled the investigation of the influence of the pH value of the media on the kinetics of HDMF racemization. Enantiomerically enriched HDMF was obtained by fractionation, employing chiral phase HPLC on Chiraspher NT[®]. In a neutral environment (pH 7) HDMF is subjected to a rapid racemization, resulting in a loss of stereo-specific information. Under slightly acidic conditions (pH 3,5 – 5) a much slower racemization was observed. In incubation experiments with strawberry fruit protein extracts at pH 5 formation of enantiomerically enriched HDMF (32 %*ee*) was demonstrated. The specific rotation of the HDMF enantiomers could be determined to $[\alpha]_D^{25} = \pm 96^\circ$ by polarimetry of an enantiomerically enriched HDMF-solution obtained by chiral phase HPLC. The levorotatory isomer (-) showed higher mobility in contrast to the dextrorotatory isomer (+) with the employed HPLC and CE conditions in mind.

The protein exhibiting the demonstrated enzymatic activity was partially purified using ultrafiltration, gel permeation chromatography (GPC) as well as ion exchange chromatography (IEC). Using the established standard incubation method activity could be recovered. Active fractions of both GPC and IEC were analysed by SDS-PAGE. The observed distribution of activity correlated with the presence of a single protein band with a molecular weight of approximately 37 kDa. Because of N-terminal blocking the protein was selectively decomposed with cyanogen bromide at methionine residues. However, cleavage of the protein, purified under reducing conditions, was incomplete. Few peptide fragments appeared due to acid catalyzed hydrolysis. Sequence analysis of two fragments by auto-

mated Edman degradation provided two peptide sequences, exhibiting total identity with a sequence of a strongly ripening induced putative quinone oxidoreductase from strawberry. The molecular weight of 34.3 kDa calculated on the basis of the corresponding protein sequence of the quinone oxidoreductase cDNA specified in the data bank provided a good correlation with the molecular weight of the native protein determined by SDS-PAGE considering possible derivatization of amino acid residues. Furthermore there is only one methionine at the *N*-terminus explaining the incomplete cleavage of the protein with cyanogen bromide.

In subsequent experiments, our group succeeded in the heterologous expression of the strawberry quinone oxidoreductase (unpublished). Formation of HDMF in the standard incubation method, using the recombinant protein provided the ultimate evidence of the identity of the purified enzyme as quinone oxidoreductase, a protein that can be assumed to participate in HDMF biosynthesis.

A Einleitung

Rot, süß und außerordentlich aromatisch – das sind die Eigenschaften, die die Erdbeerfrüchte bei Verbrauchern weltweit so beliebt machen. Zudem ist die Erdbeere reich an Vitaminen - ihr Vitamin C-Gehalt schlägt sogar den der Zitrone - reich an Mangan und Kalium, und besitzt mit 32 kcal pro 100 g einen äußerst geringen Brennwert. Neben dem Frischverzehr findet die Frucht vor allem bei der Herstellung von Süßspeisen und Desserts Verwendung. Allerdings ist der Bedarf an Erdbeeren vor allem aber an Erdbeerprodukten so groß, dass er nur zu einem Bruchteil aus dem natürlichen Anbau gedeckt werden kann. Die Weltjahresproduktion von über 2.5 Mio. Tonnen (Hancock 1999) - in Deutschland beläuft sich die Jahresproduktion auf etwa 80000 Tonnen – reicht nach einem Bericht der Neuen Züricher Zeitung vom 26.06.2001 gerade aus, um 5 % des amerikanischen Bedarfs an „Erdbeergeschmack“ zu decken. Diesem Defizit kann nur mit Hilfe einer „künstlichen“ Herstellung von Erdbeeraroma begegnet werden. Die chemische Synthese liefert dabei nur Verbindungen, die rechtlich gesehen als „naturidentisch“ zu kennzeichnen sind. Anlage 1 der Aromenverordnung (Stand: 18.06.2001¹) hingegen erlaubt die Bezeichnung „natürlich“ für Aromastoffe auch dann, wenn sie durch biotechnologische, d.h. enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus beliebigen pflanzlichen oder tierischen Ausgangsstoffen gewonnen werden. Obwohl bei der Deklaration von Aromastoffen per Gesetz heute nicht mehr auf die Herkunft „natürlich“ oder „naturidentisch“ hingewiesen werden muss, so wird doch der Hinweis „natürliches Aroma“ von Lebensmittelherstellern sicherlich gerne auf ihren Produkten angebracht. Der Kunde stuft ein solches Produkt normalerweise als qualitativ hochwertiger ein als Produkte, die mit dem Zusatz „Aroma“ gekennzeichnet sind, wobei diese Wertschätzung bei genauer Kenntnis der Rechtslage eher fragwürdig anmutet. Auch wenn sich das Erdbeeraroma als hochkomplexe Mischung nur schwer auf einzelne Verbindungen beschränken lässt, so scheinen dennoch zwei Carbonylverbindungen, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (Furaneol[®], HDMF) und 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (Methoxyfuraneol, DMMF), eine wichtige Stellung einzunehmen (Hirvi und Honkanen, 1982; Larsen und Mitarbeiter, 1992). Grundvoraussetzung für eine

¹Aromenverordnung (Stand: 18.6.2001). <http://www.aromenhaus.de/recht/verordnung.html>.

biotechnologische Produktion dieser Aromastoffe ist aber das Wissen über deren vollständigen Biosyntheseweg. Erst kürzlich wurde von Wein und Mitarbeitern (2002) gezeigt, dass DMMF durch enzymkatalysierte Methylierung von HDMF gebildet werden kann, wodurch das Interesse an einer Aufklärung der Biosynthese von HDMF weiter zunahm. Alle bisherigen Bemühungen, den natürlichen Bildungsweg von HDMF in der Erdbeere im Detail aufzuklären, lieferten noch keine eindeutigen Beweise für eine enzymatisch katalysierte Reaktion.

Basierend auf Ergebnissen von Roscher (1998), der im Rahmen seiner Dissertation den Einbau radioaktiv markierter Substanzen in die HDMF-Struktur nach Verfütterung an Erdbeeren nachweisen konnte, war es Zielsetzung dieser Arbeit, neue detaillierte Erkenntnisse über die Biosynthese von HDMF in Erdbeeren zu erlangen. Die Metabolisierung von D-Fructose-1,6-diphosphat, der Ausgangsverbindung mit der höchsten Einbaurrate in das HDMF-Molekül, stand dabei zunächst im Mittelpunkt des Interesses. So wurden D-Fructose-1,6-diphosphat abbauende Enzyme der Erdbeerfrucht untersucht. Daneben sollten nach Applikation radioaktiv und stabil markierter Verbindungen mögliche Zwischenverbindungen der HDMF-Biogenese aus D-Fructose-1,6-diphosphat identifiziert werden. Hauptziel der vorliegenden Arbeit war schließlich der Nachweis des enzymkatalysierten Bildungsweges von HDMF sowie die Isolierung und Charakterisierung beteiligter Enzyme.

B Kenntnisstand

1 Die Erdbeere

Die Erdbeere gehört zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*). Innerhalb ihrer Gattung *Fragaria* werden anhand der Chromosomenzahl vier verschiedene Gruppen unterschieden. Durch Polyploidie sind aus den diploiden Formen (fünf Vertreter) tetraploide (zwei Vertreter), hexaploide (ein Vertreter) und octaploide Arten (drei Vertreter) entstanden. Die am häufigsten vorkommende Wildform ist *F. vesca*, die in Europa heimische Walderdbeere. Sie besitzt 14 Chromosomen und zählt zu den diploiden Arten. Eine spezielle Form von *F. vesca* wurde in den Alpen entdeckt. *F. semperflorens*, die „Monatserdbeere“. Sie blüht und fruchtet von Mai bis Oktober. Die bedeutendste kultivierte Erdbeere ist *F. x ananassa*, auch Ananaserdbeere genannt. Als Kreuzung zweier im 16. bzw. 17. Jh. aus Amerika nach Europa eingeführter octaploider Arten, der Scharlacherdbeere *F. virginiana* Duch und der Chile Erdbeere *F. chiloensis* (L.) Duch, besitzt sie 56 Chromosomen und ist ebenfalls octaploid. *F. x ananassa* unterscheidet sich von Ihren Vorläufern durch größere Früchte und von verbessertem Geschmack. Inzwischen gibt es weit über tausend Sorten mit recht unterschiedlichen Boden- und Klimaansprüchen, verschiedenem Aussehen, Geschmack und Wachshabitus. Neuere Züchtungen tendieren zu Formen mit Riesenfrüchten, was aber leider auf Kosten des Geschmacks geht (Franke, 1997; Hancock, 1999).

Dabei ist die Erdbeerfrucht in botanischem Sinne eigentlich gar keine Frucht sondern zählt zu den Scheinfrüchten. Als Sammelnussfrucht ist sie ein Aggregat, zusammengesetzt aus einer Vielzahl von Fruchtblättern, jedes mit einer einzelnen Eizelle, aus denen sich apokarp kleine Nüsschen entwickeln (Abb. B-1). Diese Samen, sie werden auch Achene genannt, stellen die eigentliche Frucht der Erdbeere dar. Der Embryo besteht aus zwei großen, semielliptischen Keimblättern, die bestimmte Proteine und Fette, aber keine Stärke enthalten. Den eigentlich genießbaren Teil der Erdbeere bildet der postfloral stark vergrößerte Blütenboden, dem die über Leitbündel verbundenen Achene aufsitzen. Er gliedert sich in das hellere Mark und die rotgefärbte Rinde (Franke, 1997; Hancock, 1999).

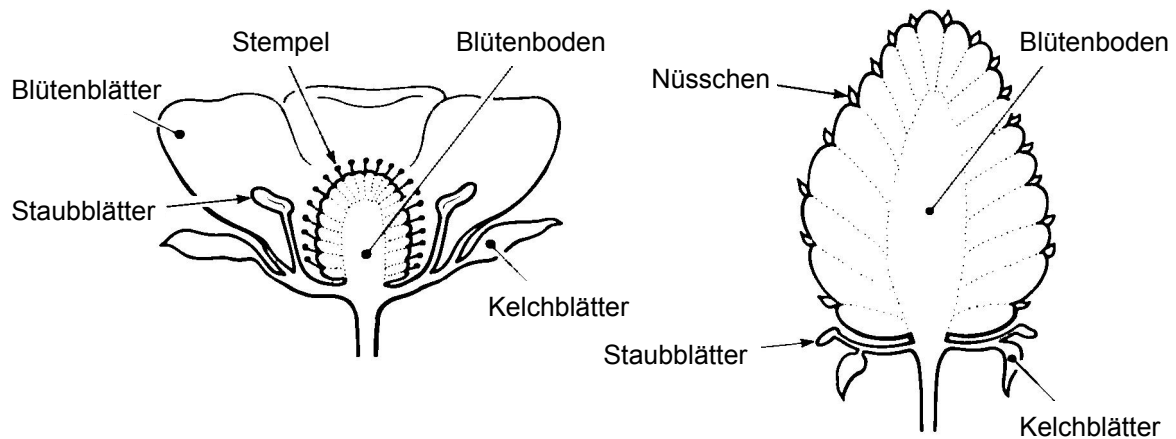


Abb. B-1: Aufbau der Erdbeerblüte und der Erdbeerfrucht.

2 Die Fruchtreifung

2.1 Allgemeines

Die Frucht durchläuft während ihrer Entwicklung drei wesentliche Phasen: Zellteilung, Zellvergrößerung und endgültige Reifung (Gillaspy und Mitarbeiter, 1993). Die Fruchtreifung stellt dabei einen hochkomplexen Vorgang dar, der durch eine ganze Reihe von biochemischen und physiologischen Veränderungen gekennzeichnet ist. Dies umfasst bedeutende Veränderungen von Textur, Farbe und dem Gehalt an gelösten Stoffen, die häufig in Zusammenhang mit der Biosynthese von geschmacks- und geruchsaktiven Verbindungen zu sehen sind. Die Reifung ist Teil eines kontinuierlichen Entwicklungsprozesses der Frucht, in dem sich auch mehrere physiologische Phasen überschneiden können (Seymour und Mitarbeiter, 1993).

Generell lässt sich eine Kategorisierung von Früchten in klimakterisch und nicht-klimakterisch treffen. Bei den klimakterischen Früchten, als typische Vertreter seien Banane, Apfel oder Tomate genannt, wird der signifikante Anstieg der Ethylenproduktion für die Initiierung der bedeutenden biochemischen und physiologischen Prozesse verantwortlich gemacht. Eine deutlich erhöhte Zellatmungsaktivität ist so während des Reifeprozesses zu beobachten. Nicht-klimakterische Früchte hingegen, wie Erdbeere, Zitrone oder Traube,

zeigen keine erhöhte Bildung von Ethylen und keine durch Ethylen verursachte Zunahme der Zellatmungsaktivität. Die Erdbeere zählt aber dennoch zu den Obstarten mit der höchsten Atmungsaktivität überhaupt. So liegt die Atmungsintensität gemessen in Watt je Tonne schon bei 0°C bei 40 und steigt bis auf einen Wert von 250 bei 50°C an. Zum Vergleich, die Atmungsaktivität des Apfels liegt bei den entsprechenden Temperaturen bei 5 bzw. 50. Angemerkt werden muss aber, dass sich eine solche Kategorisierung in klimakterisch und nicht-klimakterisch, wenn sie auch in einigen Beispielen plausibel und überzeugend wirkt, alleine auf der Grundlage der Ethylenproduktion nicht in allen Fällen aufrecht erhalten lässt (Kuntz und Mitarbeiter, 1998; Lelievre und Mitarbeiter, 1997). Während lange Zeit angenommen wurde, dass Ethylen keinerlei Bedeutung für den Reifeprozess von nicht-klimakterischen Pflanzen besitzt, mehren sich die Hinweise auf den Einfluss von Ethylen auf spezifische Prozesse, die im Zusammenhang mit der Reifung stehen, wie z.B. das „Entgrünen“ bei Zitronen (gleichzeitiger Abbau von Chlorophyll und Akkumulation von Carotinoiden) (Goldschmidt und Mitarbeiter, 1993), oder aber die Anthocyan Biosynthese in Weintrauben (Roubelakis-Angelakis und Kliewer, 1986). Daneben wurden in den nicht-klimakterischen Früchten Grapefruit und Orange Ethylen-regulierte Gene identifiziert, die im Reifungsprozess transkribiert werden (Cazzonelli und Mitarbeiter, 1998; Alonso und Mitarbeiter, 1995). Für die Regulation der Fruchtreifung der nicht-klimakterischen Früchte spielt allerdings das Phytohormon Auxin eine entscheidende Rolle (Davies und Mitarbeiter, 1997; Given und Mitarbeiter, 1988a).

2.2 Fruchtreifungsprozess

Obwohl sich verschiedene Fruchtarten in ihrem Metabolismus unterscheiden, gibt es doch grundlegende biochemische Reaktionswege, die allen Früchten und sogar anderen Pflanzenteilen gemein sind (Seymour und Mitarbeiter, 1993). So laufen in allen Früchten Respirationprozesse ab, die für die Lieferung von Energie und Kohlenstoff-Bausteinen verantwortlich sind. Hierbei spielen bestimmte Zucker und organische Säuren, die in der Vakuole der Zelle akkumuliert werden, eine Doppelrolle, da sie nicht nur Substrate für die Zellatmung darstellen, sondern auch für die Biosynthese von Geschmacks- und Aromastoffen zur Verfügung stehen. Die häufigsten organischen Säuren sind Malat und Citrat. Unter den

Zuckern dominieren D-Glucose, D-Fructose und Saccharose, allerdings in recht unterschiedlichem Verhältnis. Geht der Gehalt an organischen Säuren im Verlauf des Reifeprozesses eher zurück, so ist bei den Zuckern normalerweise eine Zunahme zu beobachten.

Einen bedeutenden Prozess während der Reifung stellt die Erweichung des Zellgewebes der Frucht dar („fruit softening“). Sie ist das Ergebnis tiefgreifender Modifikationen der Zellwand, deren Strukturelemente zu 90-95 % aus Kohlenhydratpolymeren wie Cellulose, Hemicellulose und Pektin bestehen. Daneben sind noch strukturgebende Proteine enthalten, wie z.B. Hydroxyprolin-reiche Glycoproteine. Zu den chemischen Veränderungen in der Zellwand während der Reifung gehören die Verbesserung der Löslichkeit und der Abbau von Pektin, die Abspaltung von Zuckern aus den Seitenketten des Pektins und die Reduktion des Molekulargewichts von Xyloglucan (Redgwell und Mitarbeiter, 1997). Lange Zeit wurde vornehmlich der Strukturzerfall der Zellwand als wichtigster Faktor bei der Fruchterweichung betrachtet. Eine Vielzahl von Studien beschäftigte sich daher mit dem enzymatischen Nachweis von Polygalacturonidasen, Pektinmethylesterasen, beta-Galactosidasen und Pektinlyasen und beschreibt den Nachweis deren enzymatischer Aktivität. Allerdings ist inzwischen bewiesen, dass neben der Zellwandhydrolyse auch andere Prozesse ihren Teil zu den auftretenden Texturveränderungen und zum Verlust der Festigkeit der Frucht beitragen müssen (Brummell und Mitarbeiter, 1999). Einer dieser Prozesse ist das Lockern von Zellwandbestandteilen durch das Enzym Expansin (Civello und Mitarbeiter, 1999). Einen anderen wichtigen Vorgang stellt die Depolymerisierung von hochmolekularen Hemicellulosen dar (Huber, 1984).

Ein weiterer bedeutender Aspekt der Fruchtreifung ist die Akkumulation einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten. Die für ihre Bildung notwendigen Vorstufen werden bereits während der frühen Phase der Fruchtentwicklung gebildet. Die Metabolite verhelfen der Frucht später in der Reife zu einem „attraktiven“ Erscheinungsbild und stellen auch dessen Erhalt sicher. So ist z.B. die Farbe der Beeren in den meisten Fällen in Zusammenhang mit der Akkumulation bestimmter Flavonoide, den Anthocyanen, zu sehen (Kahkonen und Mitarbeiter, 2001). Andere Früchte hingegen, wie z.B. die Tomate, erhalten ihre Färbung durch die Synthese verschiedenster Carotinoide und dem gleichzeitigen Abbau von Chlorophyll (Jacob-Wilk und Mitarbeiter, 1999). Flavonole wie Quercetin und Kaempferol, schützen die Frucht gegen Schädigung durch UV-Licht (Winkel-Shirley, 2001). Die Fes-

tigkeit im frühen Stadium der Fruchtentwicklung, ein wirksamer Schutz gegen Fraßschädlinge, ist möglicherweise in direktem Bezug zur Anreicherung polyphenolischer Verbindungen wie Tannin zu sehen (Cheng und Breen, 1991). Das Aroma von Früchten wird durch das Zusammenwirken oft hunderter verschiedener Moleküle gebildet. Diese flüchtigen Verbindungen leiten sich von mehreren bedeutenden Biosynthesewegen ab, wie z.B. den Lipoxygenase-Reaktionen (Fettsäuremetabolismus), Abbaureaktionen von Aminosäuren, oder Phenylpropanoid- sowie Isoprenoidstoffwechsel (Hornstein, 1999). Einige aromawirksame Verbindungen schützen zudem die Frucht vor Schädlingen.

Die verschiedenen Reifeprozesse laufen nicht isoliert nebeneinander ab, im Gegenteil sie sind sehr eng miteinander verbunden. So kann ein Abbauprodukt eines Stoffwechselweges das Substrat des anderen Weges in einem anderen Reifeprozess darstellen. Beispielfhaft dargestellt ist diese Koordination von Frenkel und Mitarbeitern (1998), die zeigen konnten, dass das durch den Einfluss von Methylesterasen aus Pektin der Zellwände freigesetzte Methanol direkten Einfluss auf das Aroma und den Geschmack der Frucht nehmen kann. Um einen so komplizierten Prozess wie den der Fruchtreifung erfolgreich durchlaufen zu können, müssen die Früchte eine ganze Reihe neuer reifeinduzierter Proteine bilden.

2.3 Fruchtreifung der Erdbeere

Der gesamte Fruchtreifeprozess der Erdbeere umfasst von der Anthese bis zur Ernte etwa 30 Tage. Noch vor der Anthese findet der Zellteilungsprozess statt, der etwa 15-20 % am gesamten Wachstum der Frucht ausmacht. Der Rest des Wachstums ist das Resultat von Zellvergrößerung. Das Wachstum des Blütenbodens wird hauptsächlich durch das Phytohormon Auxin kontrolliert, das wiederum in den Nüsschen biosynthetisiert wird (Nitsch, 1950; Dreher und Poovaiah, 1982; Archbold und Dennis, 1984). Daher kann es nur zur Ausbildung einer wohlgeformten Frucht kommen, wenn mehr als 30 % der Fruchtblätter befruchtet werden, wodurch eine gleichmäßige Verteilung der Achene gewährleistet wird (Day, 1993). Das Wachstum mancher Kultivare wird auch durch Substanzen wie Indolelessigsäure oder β -Naphthylelessigsäure induziert, die eine Auxin-ähnliche Wirkung zeigen (Mudge und Mitarbeiter, 1981). Obwohl Auxin das Anschwellen des Fruchtbodens verursacht, so gibt es doch auch Anzeichen dafür, dass es den Reifeprozess zu inhibieren ver-

mag. Die Zugabe von synthetischem Auxin zu Früchten, denen im grünen Stadium die Achene entfernt worden waren, führte im Vergleich mit Kontrollfrüchten, die mit Wasser behandelt wurden, zu einer verlangsamten Rotfärbung aufgrund der verminderten Akkumulation von Anthocyanen (Given und Mitarbeiter, 1988a). Von entscheidender Bedeutung für den Reifeprozess könnte daher die Abnahme der Auxinkonzentration sein, die mit dem Reifen der Achene einsetzt (Archbold und Dennis, 1984). Ethylen hingegen spielt bei der Reifung der Erdbeere als nicht-klimakterische Frucht nur eine untergeordnete Rolle. Die Applikation von Ethylen zeigt daher nur geringen Einfluss auf das Weichwerden und die Aromabildung von unreifen Früchten (Abeles und Takeda, 1990; Perkins-Veazie, 1995).

Der Prozess der Fruchtreifung der Erdbeere ist mit einer Vielzahl an biochemischen Veränderungen verbunden (Manning, 1993). Insgesamt hat man bislang etwa 50 Polypeptide nachgewiesen, die in ihrem Gehalt während des Durchlaufens der verschiedenen Stadien der Fruchtentwicklung signifikanten Änderungen unterliegen (Manning, 1994; Reddy und Poovaiah, 1987; Veluthambi und Poovaiah, 1984). Für mehrere mit Membranen assoziierte spezifische Enzyme (Civello und Mitarbeiter, 1995), der Synthese von Anthocyanen (Given und Mitarbeiter, 1988b; a) und dem Saccharose-Metabolismus (Hubbard und Mitarbeiter, 1991) konnte ein deutlicher Anstieg im Verlauf der Reifung gezeigt werden. Dennoch sind bislang die biochemischen Studien über die Physiologie der Erdbeere während der Reifung auf die Untersuchung von Ascorbinsäure-Metabolismus (Loewus, 1963; Kim und Chung, 1998), partieller Aufreinigung einer Polygalacturonase (Nogata und Mitarbeiter, 1993), UDP-Glucose:Flavonoid O-Glycosyltransferase (Cheng und Mitarbeiter, 1994), Peroxidase (Civello und Mitarbeiter, 1995; López-Serrano und Barceló, 1997), Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase (Pérez und Mitarbeiter, 1999b), Alkohol-Acyltransferase (Pérez und Mitarbeiter, 1993; Pérez und Mitarbeiter, 1996), Invertase (Poovaiah und Veluthambi, 1985) und Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) (Given und Mitarbeiter, 1988c) beschränkt. Der Grund für die begrenzte Anzahl an Studien liegt vor allem in den hohen Polyphenol- und Pektingehalten der Erdbeerfrüchte, die eine Isolierung von Enzymen erheblich erschweren. Aber auch Faktoren wie eine kurze Ernteperiode und niedriger Proteingehalt der Früchte spielen eine Rolle.

Daher haben einige Arbeitsgruppen cDNA-Bibliotheken von Wald- und Kulturerdbeeren angelegt, um die Reiferegulierung zu untersuchen und die Aromaeigenschaften zu verbessern (Manning, 1998; Medina-Escobar und Mitarbeiter, 1998; Moyano und Mitarbeiter, 1998; Medina-Escobar und Mitarbeiter, 1997). Kürzlich berichteten Aharoni und Mitarbeiter (2000) über eine umfassende Studie der Genexpression in Erdbeeren bei der sie die Mikroarray-Technologie anwendeten. Mikroarrays mit insgesamt 1701 cDNAs wurden eingesetzt, um die Genexpression von vier aufeinander folgenden Reifestadien der Erdbeerfrucht-Entwicklung zu beobachten. Mehr als 400 cDNAs zeigten signifikante Veränderungen der Expression während der Entwicklung der Frucht.

Neben dem bereits erwähnten Expansin (Manning, 1998), mit seiner zellvergrößernden Wirkung, ist das Weichwerden der Erdbeerfrucht in erster Linie im Zusammenhang mit der Freisetzung von Pektinen und Hemicellulosen zu sehen (Huber, 1984; Knee und Mitarbeiter, 1977). Im Gegensatz jedoch z.B. zu Tomaten (Nogata und Mitarbeiter, 1993) spielt die endo-Polygalacturonase bei Erdbeeren nur eine untergeordnete Rolle. Den Enzymen Pektinmethylesterase und Cellulase wird dagegen große Bedeutung für das Weichwerden zugeschrieben (Huber, 1984; Abeles und Takeda, 1990; Llop-Tous und Mitarbeiter, 1999).

Die Rotfärbung der Erdbeere als Resultat einer Akkumulation von Anthocyanen, v.a. Pelargonidin-3-glucosid und Cyanidin-3-glucosid, beginnt in der weißen Entwicklungsphase der Frucht. Der Gehalt mehrerer mRNAs verschiedener Gene, assoziiert mit dem Phenylpropanoid-Metabolismus, nimmt in dieser Phase deutlich zu (Manning, 1994; 1998). Einen entscheidenden Schritt repräsentiert zusammen mit dem simultanen Auftreten der Uridindiphosphat-Glucose:Flavonoid O³-Transferase, dem letzten Enzym der Synthese von Pelargonidin-3-glucosid, die *de novo* Synthese der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL).

3 Aroma von Erdbeeren

Das Aroma der Erdbeere setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Komponenten zusammen. Bis heute wurden über 300 Verbindungen beschrieben, die an der Aromabildung beteiligt sind. Die zahlenmäßig am stärksten vertretenen Substanzklassen sind Ester, Alkohole, Säuren und Carbonylverbindungen. Daneben wurden Verbindungen wie Acetale, Lactone, Furanone, Terpene, aromatische und schwefelhaltige Substanzen gefunden (Maarse und Visscher, 1992; Honkanen und Hirvi, 1990). Es handelt sich somit um eine komplexe Mischung, die zudem sortenspezifisch große Unterschiede aufweist (Hirvi, 1982; Douillard und Guichard, 1989; Ulrich und Mitarbeiter, 1995). Trotz dieser großen Zahl an aromawirksamen Komponenten sind nur wenige tatsächlich für den typischen Erdbeergeschmack verantwortlich. Sundt (1970) beschrieb 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF, Furaneol[®]) als die wichtigste Aromakomponente in Kulturerdbeeren (*Fragaria x ananassa*), wohingegen Pyysalo und Mitarbeiter (1979) 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF, Methoxyfuraneol) als Hauptaromakomponente der Walderdbeere (*Fragaria vesca*) identifizierten. Andererseits wurden auch Ester geradkettiger, flüchtiger Carbonsäuren als die bedeutendsten Aromabestandteile betrachtet (Dirinck und Mitarbeiter, 1981), wobei in der Studie von Schreier (1980) zusätzlich noch (E)-2-Hexenal, (E)-2-Hexen-1-ol und HDMF Erwähnung fanden. Alle genannten Studien haben eine in erster Linie quantitative Betrachtung der Messergebnisse gemein. Dem Phänomen Geschmack bzw. Geruch ist damit aber nicht genüge getan. So ist generell bei der Bewertung von aromawirksamen Substanzen auf deren tatsächlichen Beitrag zum Aroma zu achten. Das sog. Aromawert-Konzept präsentiert eine Möglichkeit den Beitrag einer Verbindung am Aroma eines Lebensmittels zu spezifizieren. Der Aromawert ist dabei als Quotient aus der Konzentration des einzelnen Aromastoffes im Lebensmittel und seinem Geruchsschwellenwert definiert (Grosch, 1990). Er ist also ein Maß für die Geruchswirksamkeit und ermöglicht den direkten Vergleich mehrerer flüchtiger Komponenten in einem Lebensmittel (Rothe und Thomas, 1963). Die Ermittlung der nötigen Daten zur Berechnung von Aromawerten ist jedoch sehr fehleranfällig. Sämtliche Verbindungen in der flüchtigen Fraktion müssen identifiziert und quantifiziert werden und ihre jeweiligen Geruchs- und Geschmacksschwellenwerte bestimmt werden. Eine einfachere Möglichkeit zur Ermittlung der Bedeutung eines bestimmten Aromastoffes in einem Lebensmittel ist daher

die sog. Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (AEDA). Dabei wird die flüchtige Fraktion eines Lebensmittels schrittweise mit dem Lösungsmittel verdünnt und jede Verdünnung mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie analysiert. Es wird der Verdünnungsfaktor (Flavour-Dilution-Faktor, FD-Faktor) ermittelt, bei dem eine Verbindung gerade noch wahrnehmbar ist (Ullrich und Grosch, 1987; Acree, 1993). Eine Substanz ist demnach umso aromawirksamer, je höher der FD-Faktor ist. Eine Sättigung der Geruchsrezeptoren bei hoher Konzentration wird hierbei aber nicht berücksichtigt.

Hirvi und Mitarbeiter (1982) konnten in drei verschiedenen Erdbeersorten (Annelie, Alaska P., Senga Sengana) und in der Walderdbeere (*Fragaria vesca* L.) die höchsten Aromawerte für Ethylhexanoat, Ethylbutanoat, (E)-2-Hexenal und DMMF feststellen. Ebenfalls sortenunabhängig wurden in einer weiteren Studie HDMF und Ethylhexanoat als die Verbindungen mit den höchsten Aromawerten ermittelt. In vier^(*) von sechs Sorten (Elsanta, Elvira*, Dania, Bogota*, Pandora*, Senga Sengana*) konnte bei dieser Untersuchung Ethylbutanoat als Verbindung mit dem höchsten Aromawert festgestellt werden (Larsen und Mitarbeiter, 1992). Bei der sensorischen Analyse einer Modellaromalösung, bestehend aus den für Senga Sengana wichtigsten Komponenten, zeigte sich, dass keine Verbindung allein in der Lage ist, das natürliche Erdbeeraroma zu simulieren. Das Fehlen bzw. Vorhandensein von Substanzen bis zu einem Aromawert von 1000 teilweise sogar 100 kann in Modellaromalösungen deutliche sensorische Unterschiede hervorrufen (Larsen und Mitarbeiter, 1992). In zwei weiteren Studien wurde das Aromaprofil jeweils einer Erdbeersorte mittels AEDA untersucht und für die Verbindungen mit den höchsten FD-Faktoren zusätzlich die Aromawerte festgestellt. In der Sorte Senga Sengana wurden hierbei (Z)-3-Hexenal, DMMF, und 2-Methylbuttersäure als die entscheidenden Aromakomponenten ermittelt (Fischer und Hammer-schmidt, 1992). Bei einem vergleichbaren Vorgehen konnten Schieberle (1994) bzw. Schieberle und Hofmann (1997) HDMF, (Z)-3-Hexenal, Methylbutanoat, Ethylbutanoat und Ethyl-2-methylpropanoat als die Substanzen mit den höchsten FD-Faktoren und Aromawerten in einer nicht näher beschriebenen spanischen Erdbeersorte feststellen. Bei einer anschließenden sensorischen Überprüfung eines Modellerdbeersaftes bestehend aus den zwölf bedeutendsten Komponenten, wurden HDMF und (Z)-3-Hexenal als die wichtigsten Bestandteile identifiziert, deren Fehlen sich in einem deutlich veränderten Geruchseindruck im Vergleich zum typischen Erdbeergeruch bemerkbar machte.

Wie aus den vorgestellten Ergebnissen ersichtlich wird, ist es nahezu unmöglich, den typischen Erdbeergeschmack an einzelnen Substanzen festzumachen. So kommen verschiedene Arbeitsgruppen selbst bei der Untersuchung derselben Erdbeersorte zu verschiedenen Ergebnissen. Auffällig ist hierbei die Tatsache, dass in nahezu allen Studien entweder HDMF oder DMMF als eine der wichtigsten Aromabestandteile genannt werden. So sind die beiden Furanonderivate zweifellos als Schlüsselkomponenten des Erdbeeraromas zu betrachten.

4 2,5-Dimethyl-3(2*H*)-furanone

4.1 Entdeckung, Vorkommen und Bedeutung

4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (Furaneol[®], HDMF) wurde erstmals von Hodge (1960) bei dessen Untersuchungen zur Maillard-Reaktion nachgewiesen. Die Erhitzung der 6-Desoxyhexose Rhamnose in Gegenwart von Piperidinacetat lieferte HDMF als ein Reaktionsprodukt. Die isolierte Verbindung vermittelte den Autoren einen ausgeprägten karamellartigen bis fruchtigen Geruchseindruck. Angaben zu spektroskopischen Daten wurden jedoch nicht veröffentlicht (Hodge und Mitarbeiter, 1963). Rodin und Mitarbeiter (1965) isolierten eine intensiv nach „verbrannter Ananas“ riechende Verbindung aus dem Diethyletherextrakt von frisch gepresstem Ananassaft. Diese auch als „Ananasketon“ bezeichnete Hauptaromakomponente der Ananas konnte anhand von NMR-, UV-, Infrarot-, sowie Massenspektren als HDMF (Abb. B-2) identifiziert werden. Noch im selben Jahr wiederholten Willhalm und Mitarbeiter (1965) die von Hodge beschriebene Synthese und bestätigten durch eigene Messungen die von Rodin und Mitarbeitern vorgeschlagene Struktur. Durch Derivatisierung der Hydroxylgruppe (Methylierung und Acetylierung) konnte zudem das Vorliegen des Moleküls in der Enol-Struktur aufgezeigt werden. In den folgenden Jahren wurde HDMF vor allem im Zuge der raschen Entwicklung auf dem Gebiet der Kapillargaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie auch in zahlreichen anderen Früchten nachgewiesen wie etwa: Erdbeere (Ohloff, 1969; Sundt, 1970), arktische Moosbeere (Kallio, 1976), Himbeere (Honkanen und Mitarbeiter, 1980), Weintraube (Rapp und Mitarbeiter, 1980), Mango (Pickenhagen und Mitarbeiter, 1981) und Tomate (Buttery und Mitarbeiter, 1994). In vielen

der genannten Früchte (Ananas, Erdbeere, Mango und Tomate) liegt HDMF zusätzlich in gebundener Form, als HDMF- β -D-glucopyranosid (HDMF-Glucosid) (Honkanen und Mitarbeiter, 1994; Mayerl und Mitarbeiter, 1989) und HDMF-6'-O-malonyl- β -D-glucopyranosid (HDMF-Malonylglucosid) vor (Roscher und Mitarbeiter, 1996; Withopf und Mitarbeiter, 1997) (Abb. B-2). Interessanterweise beschränkt sich die Existenz von HDMF auf die Früchte und Blüten. Aus anderen Teilen der Pflanze, wie etwa Wurzel, Blätter oder Stängel, konnte HDMF trotz intensiver Untersuchungen bisher nicht isoliert werden (Wintoch und Mitarbeiter, 1991).

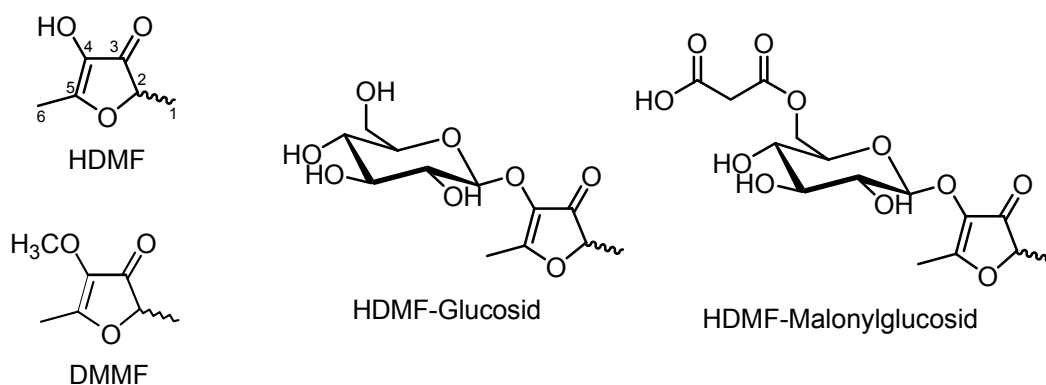


Abb. B-2: Strukturformeln von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF, Furaneol[®]), 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF, Methoxyfuraneol), HDMF- β -D-glucopyranosid (HDMF-Glucosid) und HDMF-6'-O-malonyl- β -D-glucopyranosid (HDMF-Malonylglucosid).

Neben diesen natürlichen Vorkommen findet man HDMF auch in vielen thermisch behandelten Lebensmitteln. In kohlenhydrat- und proteinhaltigen Lebensmitteln kommt es durch Hitzeeinwirkung zur so genannten Maillard-Reaktion, auch nicht-enzymatische Bräunung genannt, bei der reduzierende Zucker durch Einwirkung von Aminen dehydratisiert und zyklisiert werden (Ledl und Schleicher, 1990). Dabei entstehen eine Reihe von aromawirksamen Verbindungen, unter anderem auch HDMF. So konnte das Hydroxyfuranon im flüchtigen Anteil einer Vielzahl von gekochten und gerösteten Lebensmitteln identifiziert werden. Beispielfhaft seien Fleischprodukte wie Rindfleischbrühe (Tonsbeek und Mitarbeiter, 1968), gekochtes und geschmortes Rindfleisch (Cerny und Grosch, 1992; Guth und Grosch, 1994), Backwaren wie Brot und Brotkruste (Schieberle und Grosch, 1994), sowie Popcorn (Schieberle, 1991b), Bier (Schieberle, 1991a) und Tee (Guth und Grosch, 1993) genannt.

Da verschiedene Mikroorganismen in der Lage sind, 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone zu produzieren, wurde HDMF auch in einigen Lebensmitteln nachgewiesen, die einem fermentativen Prozess unterliegen. HDMF ist wichtiger Aromabestandteil von Emmentaler und Cheddar Käse, wobei sich hauptsächlich Milchsäurebakterien als HDMF-Produzenten herausgestellt haben (Preininger und Mitarbeiter, 1994; Preininger und Grosch, 1995; Milo und Reineccius, 1997). Eine untergeordnete Rolle spielt HDMF in Sojasauce, bei deren Herstellung verschiedene Hefen (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida*) eingesetzt werden. Das Aroma der Sojasauce wird vielmehr von dessen Ethyl-Homologen 4-Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2*H*)-furanon bzw. 4-Hydroxy-5-ethyl-2-methyl-3(2*H*)-furanon (Homofuraneol, HEMF) geprägt (Nunomura und Mitarbeiter, 1980; Sasaki und Mitarbeiter, 1991).

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

Aufgrund seines sehr breiten Vorkommens und seiner einzigartigen organoleptischen Eigenschaften wird HDMF heute synthetisch im industriellen Maßstab von der Firma Firmenich SA in Genf (Schweiz) produziert und unter dem Handelsnamen Furaneol[®] vermarktet (Ohloff, 1990). Einsatz findet es in erster Linie bei der Aromatisierung von Marmeladen, Gelees, Getränken, Eiscreme, alkoholischen Getränken und Süßwaren (Hirvi und Mitarbeiter, 1980).

Der Methylether von HDMF, 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF), wurde von Willhalm und Mitarbeitern (1965) als Reaktionsprodukt von HDMF und Diazomethan beschrieben. Hunter und Mitarbeitern (1974) gelang es, DMMF als Hauptkomponente im Aromaextrakt aus Mangopüree zu identifizieren. Zwei Jahre später wurde es als entscheidende Aromakomponente in arktischen Moosbeeren erkannt (Kallio, 1976). Vergleichbar mit HDMF konnte auch DMMF im Folgenden aus weiteren Früchten isoliert werden, nämlich Erdbeeren (Pyysalo und Mitarbeiter, 1979), Weintrauben (Rapp und Mitarbeiter, 1980), Himbeeren (Honkanen und Mitarbeiter, 1980), Ananas (Pickenhagen und Mitarbeiter, 1981), Kiwi (Takeoka und Mitarbeiter, 1986) und Brombeeren (Georgilopoulos und Gallois, 1987). Im Gegensatz zu HDMF spielt DMMF jedoch weder bei Erhitzungs- noch bei Fermentationsprozessen eine Rolle.

4.2 Eigenschaften

4.2.1 Keto-Enol-Tautomerie

Die Analytik chiraler Verbindungen mittels multidimensionaler Methoden ist auf dem Gebiet der Aromaforschung ein häufig angewendetes Mittel zur Herkunftsbestimmung bzw. Authentizitätskontrolle von Aromastoffen (Kreck und Mitarbeiter, 2001; Kreis und Mosandl, 1992; Kreis und Mosandl, 1994; Mosandl und Mitarbeiter, 1989). Nach den bisherigen Erfahrungen weisen natürlich vorkommende chirale Aromastoffe in der Regel charakteristische Enantiomerenüberschüsse auf, die auf eine stereoselektive, enzymkatalysierte Biogenese zurückzuführen sind (Bruche und Mitarbeiter, 1991). HDMF verfügt formal über ein Stereozentrum an C-2 bzw. C-5 (Abb. B-3) und ist somit als chirale Verbindung zu betrachten. Das Molekül unterliegt aufgrund der Enol-Carbonyl-Struktur jedoch einer Keto-Enol-Tautomerie wodurch diese Stereoinformation verloren geht.

Der Arbeitsgruppe um Mosandl (1990) gelang erstmals die Fraktionierung der HDMF Enantiomere mittels Chiralphasen HPLC an einer Chiraspher NT[®] Phase (Abb. C-30). Dabei wurden zwei Fraktionen erhalten, deren Enantiomerenverhältnisse mittels gaschromatographischer Analyse an einer chiralen Phase bestimmt werden konnten. Bruche und Mitarbeiter (1991) beschäftigten sich im Folgenden intensiv mit der Enantiomerenverteilung von HDMF in verschiedenen Früchten, konnten aber mittels multidimensionaler gaschromatographischer Methoden an derivatisierten Cyclodextrinphasen ausschließlich racemisches HDMF detektieren. Dies führten die Autoren auf eine säure-katalysierte Racemisierung des Moleküls zurück, was anhand eines Modelversuchs bestätigt werden konnte. Dabei unterlag enantiomerenangereichertes HDMF in essigsaurem Diethylether schneller einer Racemisierung als in den Kontrollproben (ohne Essigsäurezusatz) (Bruche und Mitarbeiter, 1991). Dennoch beobachteten Mayerl und Mitarbeiter (1989) und Wintoch und Mitarbeiter (1991) das natürliche Vorkommen von diastereomeren HDMF- β -D-glucopyranosiden im Verhältnis von ca. 3:1, was auf eine Enantiomerenanreicherung im Aglycon hindeutet. Nach enzymatischer Hydrolyse der glycosidischen Bindung konnte jedoch wiederum nur racemisches HDMF mittels multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS) detektiert werden.

Aufgrund der Keto-Enol-Struktur des Moleküls ist die Verbindung in vier tautomeren Grenzstrukturen darstellbar (Abb. B-3), wobei jedoch weder die Diketo- noch die Dienol-Form bislang isoliert bzw. nachgewiesen wurden.

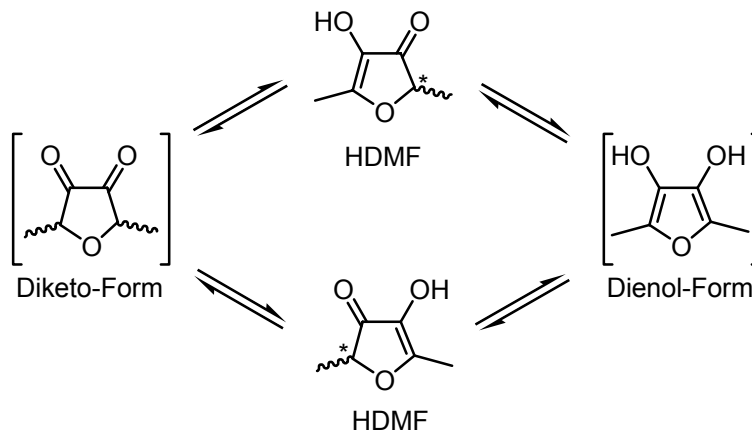


Abb. B-3: Tautomere Grenzstrukturen von HDMF.

4.2.2 Sensorische Eigenschaften

HDMF gehört aufgrund seiner strukturellen, bifunktionellen Einheit und hohen Strukturabhängigkeit seiner organoleptischen Eigenschaften der Gruppe der typischen Röstaromen (browned flavours) an. Als weitere Vertreter dieser Gruppe seien Maltol, Cycloten[®] und Sotolon genannt. Molekulare Voraussetzung für die Entwicklung karamell-ähnlicher Geruchsnoten ist die planare bzw. nahezu planare alicyclische bzw. heterocyclische Enol-Carbonyl-Struktur cyclischer Dicarbonyl-Derivate, die in der Lage ist starke Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden. Allgemein besitzen diese Aromastoffe aneinander angrenzend eine Carbonyl-, eine enolische Hydroxyl- und eine C-Alkyl-Gruppe. Jedes der drei genannten Strukturelemente und ihre Nachbarstellung zueinander ist von entscheidender Bedeutung, da sowohl die Substitution als auch der Verlust der Enol-Gruppe zu einem Verlust des typischen Karamellaromas führt (Hodge und Mitarbeiter, 1972; Ohloff, 1990). Für die olfaktorische Chemorezeption von Karamellaromen schlägt Ohloff in Anlehnung

an das Modell der Chemorezeption von Süßstoffen nach Shallenberger (1967) ein Aromastoff-Rezeptor-Modell vor. Demnach tritt eine spezifische Wechselwirkung ein, sobald die planare Enol-Carbonyl-Einheit des HDMF auf eine komplementäre Proton-Donor- (AH) und Proton-Akzeptor-Gruppe (B) der aktiven Rezeptorstelle trifft, die beide zur Ausbildung starker Wasserstoffbrückenbindungen fähig sind (Abb. B-4). Form und Größe des übrigen Molekülteils bestimmen die Qualität, die lipophilen Eigenschaften die Intensität des Aromastoffs (Ohloff, 1990).

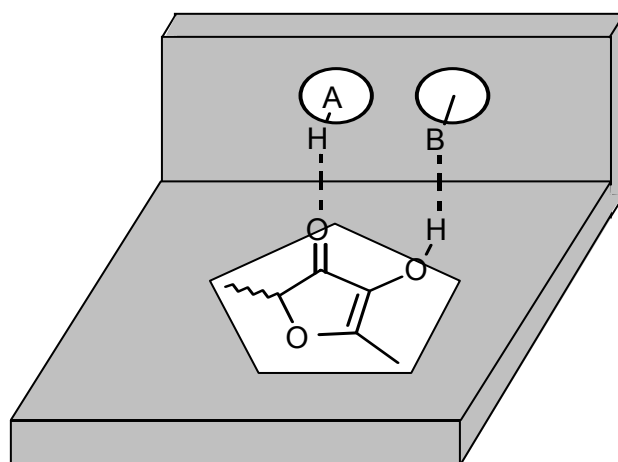


Abb. B-4: Dreipunkt-Bindungsmodell einer spezifischen Rezeptor-Interaktion von HDMF, nach Ohloff (1990).

HDMF besitzt als Reinsubstanz bzw. in hohen Konzentrationen einen karamellartigen, malzigen, süßen Geschmack, der an verbrannten Zucker erinnert. Mit zunehmender Verdünnung tritt zusätzlich ein fruchtiger Sinneseindruck auf, der dem Aroma von Erdbeeren oder Ananas ähnelt (Re und Mitarbeiter, 1973). Die beiden Enantiomere, die sich sehr gut an derivatisierten β -Cyclodextrinphasen mittels Gaschromatographie trennen lassen, unterscheiden sich von ihren sensorischen Eigenschaften her nur geringfügig. Das (-)-Enantiomer besitzt eine süße, intensiv karamellartige Note, während das (+)-Enantiomer einen insgesamt etwas schwächeren, weniger süßen, dafür aber röstigen Geruchseindruck hinterlässt (Fischer und Hammerschmidt, 1992; Bruce und Mitarbeiter, 1995). Die veröffentlichten Werte für

den Geruchsschwellenwert von HDMF reichen von 0.03 ppb bis 1700 ppb. Diese Variation über mehrere Größenordnungen ist dabei vor allem auf die starke Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel sowie vom vorherrschenden pH-Wert zurückzuführen. Aber auch unterschiedliche Geräte, Methoden und Testpersonen nehmen großen Einfluss auf die ermittelten Werte (Ohloff, 1990). Durchschnittlich kann aber ein Wert von 10-100 ppb als realistisch angesehen werden (Roscher, 1998; Schwab und Roscher, 1997).

Die Geruchseigenschaften von DMMF werden als süß, sherry-ähnlich, erdig oder muffig beschrieben. Bei dieser Verbindung ist hauptsächlich ein Enantiomer für den resultierenden Geschmack verantwortlich, da das zweite Enantiomer einen um den Faktor 1000 niedrigeren Geruchsschwellenwert aufweist (Fischer und Hammerschmidt, 1992; Larsen und Poll, 1992; Bruche und Mitarbeiter, 1995). Insgesamt ist das Methoxyfuranon weniger aromaaktiv als HDMF, da dessen Geruchsschwellenwert im Bereich 100 -1000 ppb anzusiedeln ist und damit um den Faktor zehn höher als HDMF liegt (Schwab und Roscher, 1997).

4.2.3 Wichtige physikalisch-chemische Eigenschaften und Stabilität

HDMF ist sehr gut wasserlöslich und reagiert aufgrund seiner phenol-ähnlichen Struktur schwach sauer. Eine zweiprozentige wässrige Lösung weist einen pH-Wert von 2.8 auf (Buttery und Mitarbeiter, 1995) und die Titration mit 0.5 N NaOH ergab einen pKa-Wert von ca. 8.2. Somit ist HDMF als schwächere Säure als Essigsäure (pKa=4-5), aber stärkere Säure als Phenol (pKa=9.9) einzustufen (Buttery und Ling, 1996).

HDMF ist eine in Reinform kristalline Verbindung. Bei Raumtemperatur in Gegenwart von Luftsauerstoff ist sie jedoch äußerst instabil, was sehr schnell (1 bis 2 Tage) zur Verflüssigung der Kristalle und einem veränderten sensorischen Eindruck führt (Hodge und Mitarbeiter, 1963; Willhalm und Mitarbeiter, 1965; Hofmann und Eugster, 1966; Henry und Silverstein, 1966). Eine wesentliche Verlängerung der Lagerfähigkeit (mehrere Monate) konnte durch Lagern bei Temperaturen unter 0°C in einer Stickstoffatmosphäre erreicht werden (Henry und Silverstein, 1966). Wenngleich in wässrigen Lösungen die Zersetzungsvorgänge mit verminderter Geschwindigkeit ablaufen, lässt sich bei einem neutralen pH-Wert eine Halbwertszeit von nur 12 Tagen feststellen. Ein Stabilitätsoptimum beider Verbindungen

wurde im schwach Sauren (pH 4) beobachtet, mit ermittelten Halbwertszeiten von 100 (HDMF) bzw. 320 Tagen (DMMF), die sich bei Erhöhung der Temperatur auf 50°C auf 13 bzw. 40 Tage reduzierten (Hirvi und Mitarbeiter, 1980). In Lagerstudien von HDMF in wässrigen Pufferlösungen bei pH-Werten zwischen 2 und 8 beobachteten Roscher und Mitarbeiter (1997b) die Instabilität von HDMF über den gesamten untersuchten pH-Bereich. In chlorophyllhaltiger, ethanolischer Lösung wurde zudem ein beachtlicher photooxidativer Abbau festgestellt (Chen und Mitarbeiter, 1996). DMMF unterliegt ebenfalls einem Zersetzungsprozess, der Abbau verläuft aber im Vergleich zu HDMF wesentlich langsamer (Hirvi und Mitarbeiter, 1980).

Aufgrund seiner Anfälligkeit gegenüber Hitze und Oxidation galt die gaschromatographische Analyse von HDMF lange Zeit als besonders problematisch. Die chromatographischen Verluste sind auf einen thermischen Abbau des Moleküls zurückzuführen (Flath und Forrey, 1970). Im Vergleich zum stabileren DMMF war HDMF dadurch häufig stark unterrepräsentiert. Erst ein Vergleich des Verhaltens von HDMF bei der gaschromatographischen Analyse unter Verwendung verschiedener GC-Kapillarsäulen offenbarte eine Anfälligkeit des Moleküls gegenüber aktiven Oberflächen der Trennsäule. „Fused silica Kapillarsäulen“ erwiesen sich hierbei als Säulen der Wahl mit den niedrigsten Nachweisgrenzen für HDMF (Williams und Mottram, 1981).

4.3 Bildung von 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2*H*)-furanon in der Maillard-Reaktion

4.3.1 Die Maillard-Reaktion

Im Jahre 1912 wurde erstmals die so genannte Maillard-Reaktion oder nicht-enzymatische Bräunung von L.C. Maillard beschrieben. Sie umfasst komplexe Reaktionsfolgen, die bei der Umsetzung von Amino- mit Carbonylverbindungen ablaufen. Bei den Aminokomponenten kann es sich um Aminosäuren, Amine, Peptide sowie Proteine handeln, während als Carbonylverbindungen reduzierende Zucker, Aldehyde, Ketone sowie Ascorbinsäure in Frage kommen (Chuyen, 1998). Von entscheidender Bedeutung sind diese Reaktionen vor allem für die Entwicklung von Farb-, Geschmacks- und Aromastoffen während der Zube-

ereitung von Lebensmitteln (Ledl und Schleicher, 1990). Zur Aufklärung ablaufender Reaktionsmechanismen hat sich aufgrund der Fülle an Reaktionspartnern in natürlichen Systemen und der damit verbundenen Probleme bei der Trennung, Isolierung und Reinigung einzelner Maillard-Produkte allgemein die Untersuchung von Modellreaktionsgemischen durchgesetzt (Ledl und Schleicher, 1990). Ausmaß und Produktverteilung des Maillard-Prozesses hängen entscheidend von Parametern wie Temperatur, pH-Wert und Reaktionszeit, sowie von der Reaktivität der beteiligten Reaktionspartner ab (Rizzi, 1994).

4.3.2 Bildung aus unphosphorylierten Zuckern

Bereits unter Abschnitt B-4.1 wurde auf das Vorkommen von HDMF in einer Vielzahl thermisch behandelter Lebensmittel hingewiesen. Anhand von Modellreaktionen ist seine Bildung während des Koch- bzw. Röstprozesses inzwischen sehr ausführlich untersucht worden. HDMF entsteht aus 1-Desoxydiketosen (1-Desoxyosonen) durch Zyklisierung und anschließende Dehydratisierung (Abb. B-5). Auf gleiche Weise erfolgt auch die Bildung weiterer 4-hydroxy-3(2*H*)-furanone, dem 4-Hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon (HMF, Norfuranol), sowie dem 4-Hydroxy-2(oder 5)-ethyl-5(oder 2)-methyl-3(2*H*)-furanon (HEMF, Homofuranol). Den initiierenden Schritt bei der Entstehung der 1-Desoxydiketosen stellt die Kondensation einer Aldose und einer Aminokomponente dar. Sie führt zur Bildung einer 1-Amino-1-desoxy-2-ketose, einem sog. Amadori-Produkt (Abb. B-5). Amadori-Produkte, wie z. B. 1-Desoxy-1-dibenzylamino-D-fructuronsäure, 1-Deoxy-1-L-prolino-D-fructose, 1-Deoxy-1-piperidino-D-fructose sind bereits mehrfach als Prekursoren von 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen nachgewiesen worden (Hicks und Mitarbeiter, 1974; Hicks und Feather, 1975; Mills und Hodge, 1976; Mills und Mitarbeiter, 1969). Infolge einer 2,3-Enolisierung der Amadori-Verbindung und Eliminierung des Amins am C1 des Zuckers kommt es zur Freisetzung der sehr reaktiven 1-Desoxydiketose (Abb. B-5) (Hodge und Mitarbeiter, 1972; Mills und Hodge, 1976). Aus Pentosen sowie der 6-Desoxyhexose L-Rhamnose entstandene 1-Desoxydiketosen können infolge von Zyklisierung und Dehydratisierung direkt die entsprechenden Furanoderivate HDMF und HMF freisetzen. Bei der Bildung von HDMF aus Glucose sind formal zusätzlich eine Wassereliminierung sowie ein reduktiver Reaktionsschritt erforderlich. Als wichtigste Zwischenverbindung wur-

de vielfach 3,4,5-Trihydroxy-3,5-hexadien-2-on (Acetylformoin) postuliert (Mills und Mitarbeiter, 1969; Hodge und Mitarbeiter, 1972; Hofmann und Schieberle, 1997). Der effektive Umsatz von Acetylformoin in HDMF unter Hitzeeinwirkung konnte von Schieberle (1992) eindeutig nachgewiesen werden (Abb. B-5). Im Falle des HEMF ist der ablaufende Reaktionsmechanismus noch weitgehend unbekannt. Huber postulierte in Analogie zur Bildung von HMF und HDMF eine 6,7-Dideoxyheptose als Vorläuferverbindung, die aus dem Amadori-Produkt von Pentosen durch Addition einer unbekanntes C2-Komponente gebildet wird (Huber, 1992) (Abb. B-5).

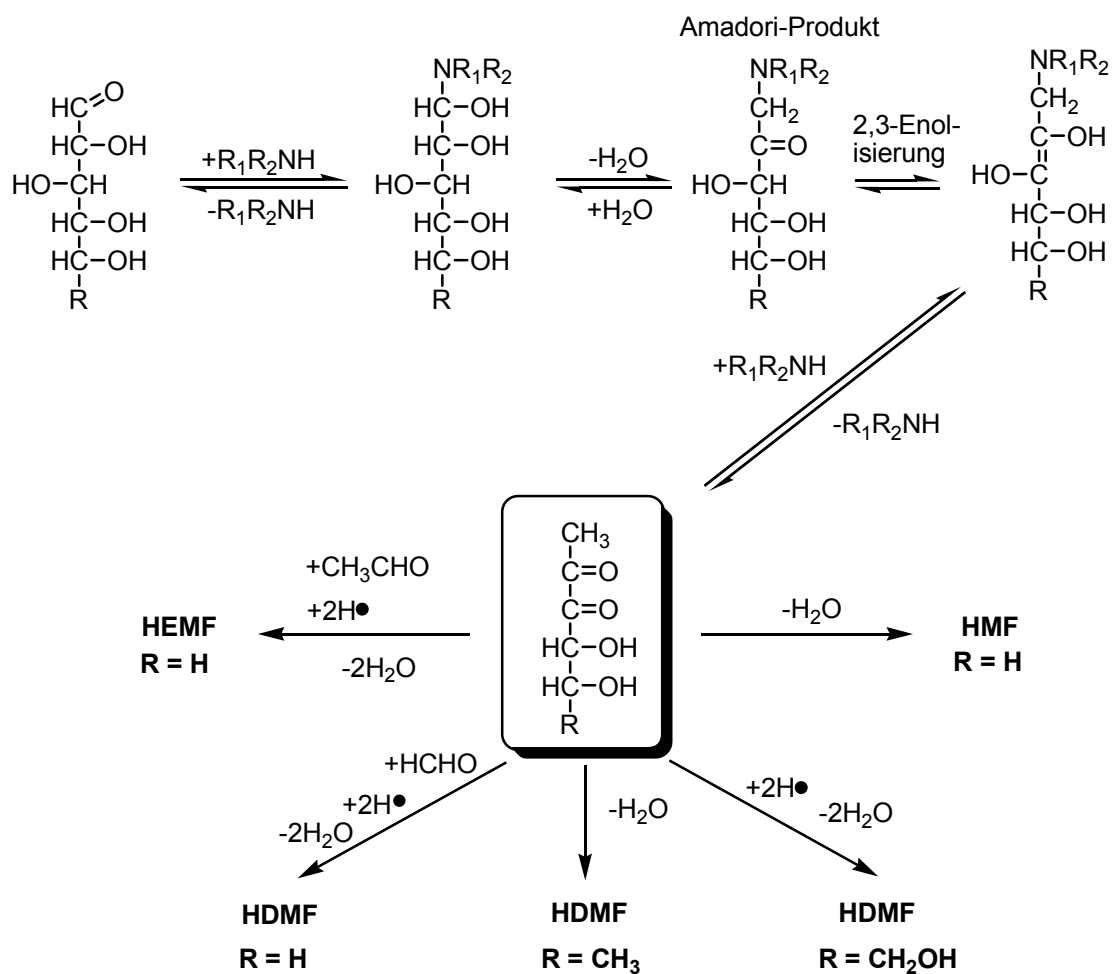


Abb. B-5: Vorgeschlagene Bildungsmechanismen von Furaneol[®] (HDMF), Norfuraneol (HMF) und Homofuraneol (HEMF) aus Pentosen, Hexosen und 6-Deoxyhexosen im Rahmen der Maillard-Reaktion nach Roscher und Schwab (1997).

Des Weiteren wurden HDMF und HEMF auch in Modellumsetzungen von Pentosen mit den Aminosäuren Glycin bzw. Alanin nachgewiesen. Versuche mit den entsprechenden ^{13}C -markierten Aminosäuren zeigten eindeutig die Addition der aus den Aminosäuren abgeleiteten Streckeraldehyde (Glycin \rightarrow Formaldehyd; Alanin \rightarrow Acetaldehyd) an ein Pentosederivat, was zur nötigen Verlängerung der Kohlenstoffkette führt (Blank und Fay, 1996) (Abb-B5).

4.3.3 Bildung aus phosphorylierten Zuckern

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

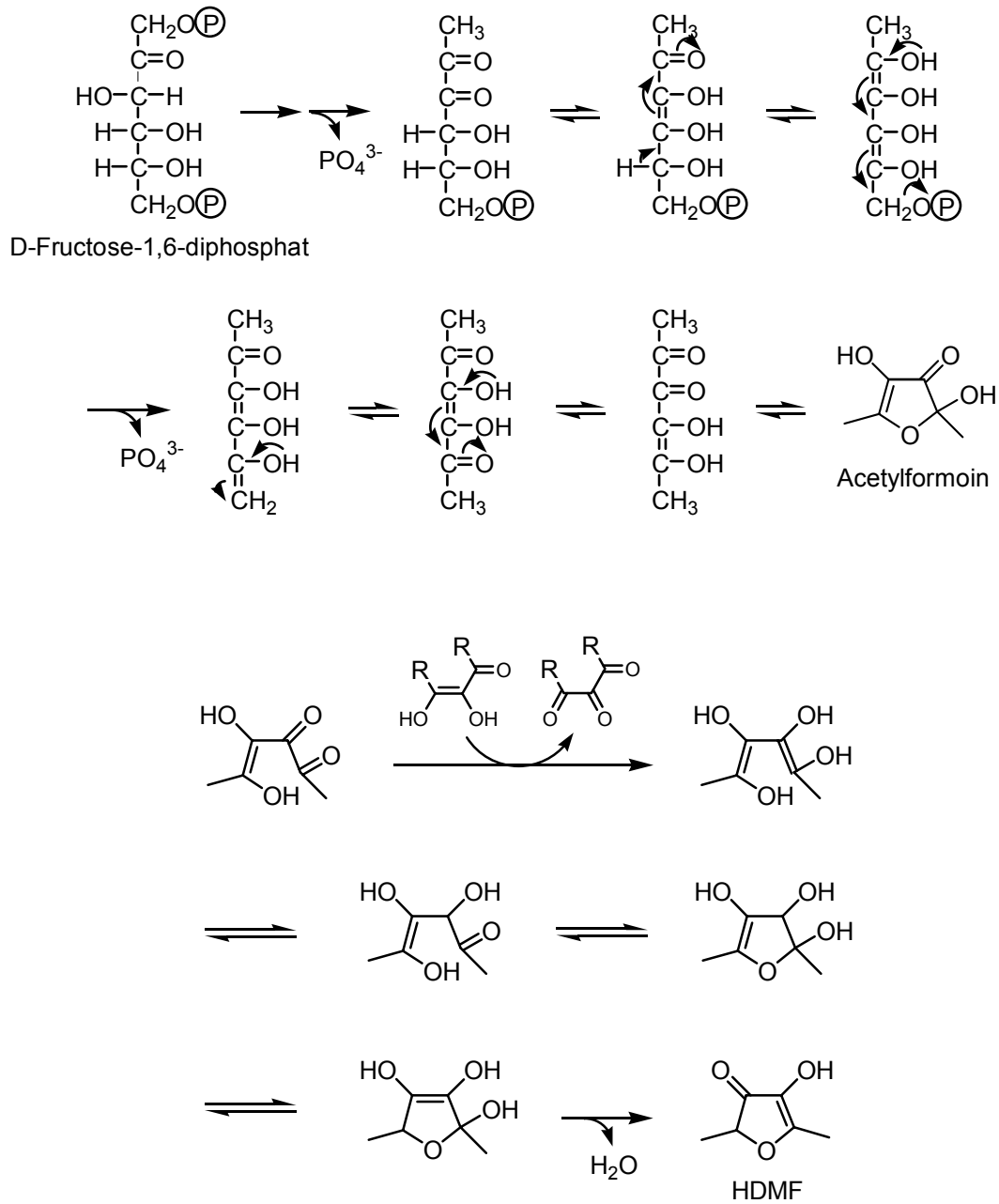
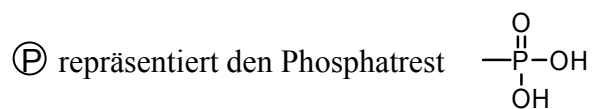


Abb. B-6: Hypothetischer Bildungsmechanismus von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat im Rahmen der Maillard-Reaktion nach Schieberle (1992).



4.4 Biosynthese

4.4.1 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon

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

Auch die Arbeiten der Gruppe um Zabetakis deuteten auf eine Beteiligung von Methylpentosen als Prekursoren von HDMF und seiner Derivate in Erdbeeren hin (Zabetakis und Holden, 1995; 1996; Zabetakis und Mitarbeiter, 1996). Die Verfütterung von 6-Deoxy-D-fructose an Erdbeerkallus-Kulturen führte zu einer deutlichen Produktion des HDMF-Glucosides (1.03 µg/g), was die Autoren auf die Verwendung von 6-Deoxy-D-fructose anstelle von D-Fructose im Saccharose-Bildungsweg zurückführten. Das entstehende Deoxyanalogon der Saccharose würde demnach in einem weiteren nicht näher charakterisierten Reaktionsschritt zum HDMF-Glucosid metabolisiert. Demnach wird HDMF erst durch Abspaltung des Glucoserestes freigesetzt. Im Widerspruch zu einer HDMF-Biosynthese über das entsprechende Glucosid stehen die Arbeiten von Sanz und Mitarbeitern (1995) und Perez und Mitarbeitern (1996). Sie konnten zeigen, dass die Konzentrationen von HDMF, DMMF und HDMF-Glucosid sehr stark mit fortschreitendem Reifegrad zunehmen. Eine nachfolgende Lagerung bei 17°C führte zu einer deutlichen Abnahme der HDMF-Konzentration und einer Zunahme der beiden HDMF-Derivate. Eine zuerst auftretende erhöhte Konzentration des HDMF-Glucosids in den Früchten, wie man sie im Falle einer Bildung von freiem HDMF über das entsprechende Glucosid erwarten würde, wurde nicht beobachtet.

Des Weiteren postulierte die Arbeitsgruppe um Zabetakis einen direkten Bildungsweg von HDMF aus 6-Deoxy-D-fructose-1-phosphat, das durch Kondensation von Dihydroxyacetonphosphat und Lactaldehyd entsteht (Abb. B-7) (Zabetakis und Holden, 1995). 1,2-Propandiol gilt als direkter Vorläufer von Lactaldehyd und wurde als natürlicher Bestandteil in Erdbeeren nachgewiesen (0.49 µg/g). Die exogene Applikation von

1,2-Propandiol an Erdbeerkallus-Kulturen führte zur signifikanten Bildung des HDMF-Glucosids (0.94 $\mu\text{g/g}$) (Zabetakis, 1997). Überraschenderweise führte der Zusatz von Lactaldehyd an Erdbeerkallus-Kulturen jedoch primär zur Bildung von freiem HDMF (26.6 $\mu\text{g/g}$) (Zabetakis und Mitarbeiter, 1999b), woraus die Autoren zwei unterschiedliche, parallel ablaufende Biosyntheserouten für HDMF und HDMF-Glucosid ableiteten (Zabetakis und Mitarbeiter, 1999a). In Erdbeer-Kallus-Kulturen, die mit *Methylobacterium extorquens* infiziert waren, konnte ohne Zusatz einer weiteren Kohlenstoffquelle die Bildung von HDMF (6 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht) und DMMF (11-12 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht) beobachtet werden (Zabetakis, 1997). Daraus wurde gefolgert, dass aus der Pflanze stammendes 1,2-Propandiol von dem Mikroorganismus zu Lactaldehyd oxidiert werden kann. Dieser kann wiederum in einer Aldolreaktion mit aus der Pflanze stammendem Dihydroxyacetonphosphat zu 6-Deoxy-D-fructose-1-phosphat reagieren und somit als Vorläufer von HDMF fungieren (Zabetakis und Mitarbeiter, 1996; 1999a).

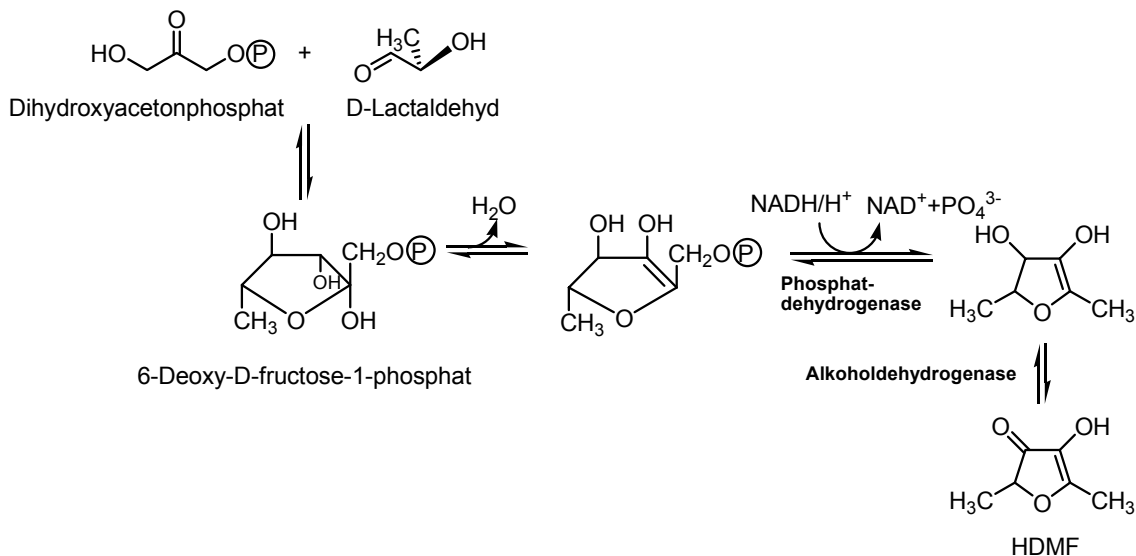
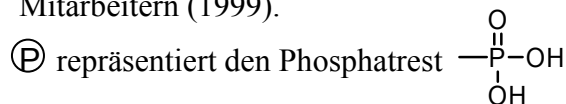


Abb. B-7: Vorgeschlagener Biosyntheseweg von HDMF (Furaneol[®]) nach Zabetakis und Mitarbeitern (1999).



Die zum Teil widersprüchlichen Theorien bezüglich der HDMF-Biosynthese inspirierten Roscher und Mitarbeiter (1998) zu weiteren Studien. Nach Applikation von verschiedenen radioaktiv markierten Substraten aus dem Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Fettsäurestoffwechsel wurde der Einbau der Markierung in die Furanonstrukturen HDMF, DMMF und dem HDMF-Glucosid mittels zweidimensionaler HPLC mit Radiodetektion bestimmt. Applikation von [^{14}C]-Fucose und [^3H]-Rhamnose an reife Erdbeeren führte nicht zum Einbau der Markierung in die Furanonstruktur, was die von Pisarnitskii und Mitarbeitern (1992) vorgeschlagene Theorie eindeutig widerlegte. Auch die Applikation von [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-Lactaldehyd führte nicht zum Einbau der Markierung in die Zielmoleküle und widerlegt damit den von Zabetakis vorgeschlagenen Biosyntheseweg (Abb. B-7). Stattdessen wurden nach Applikation der C_6 -Kohlenhydrate [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-Glucose, [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-Glucose-6-phosphat, [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-Fructose und [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-Fructose-1,6-diphosphat ein deutlicher Einbau in die Furanonstruktur bestimmt. Die Einbauraten und der daraus abgeleitete vorgeschlagene Biosyntheseweg sind in Abb. B-9 zusammengefasst. Demnach stellt D-Fructose-1,6-diphosphat den ultimativen Vorläufer von HDMF in Erdbeeren dar. Diese Ergebnisse zogen weitere Studien nach sich, in denen der Verbleib unterschiedlicher Isotopenmarkierungen im Zielmolekül bestimmt werden sollte. Nach Applikation von [$\text{U-}^{13}\text{C}$]-D-Fructose detektierte Schwab (1998) neben dem ursprünglich in der Erdbeere vorkommenden unmarkierten HDMF auch das um 6 Masseneinheiten schwerere Isotopomer, was den Verbleib der kompletten Kohlenstoffkette des Zuckers im Zielmolekül bewies. Ein um drei Masseneinheiten schwereres Isotopomer wurde nicht detektiert. Dies würde durch eine anfängliche Aldolase-katalysierte Spaltung von D-Fructose-1,6-diphosphat und anschließendem Einbau einer C3-Einheit in die Furanonstruktur gebildet werden. In weiteren Versuchen wurden erst kürzlich von Wein und Mitarbeitern (2001) [$6,6,6,5\text{-}^2\text{H}_4$]-6-Deoxyfructose-1-phosphat, [^2H]-6-Deoxy-D-glucose und [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-1-Deoxy-D-Fructose synthetisiert und an Erdbeeren appliziert. Keines dieser häufig postulierten HDMF-Vorläufermoleküle hatte jedoch eine Steigerung des Markierungsgrades von HDMF oder DMMF zur Folge (Wein und Mitarbeiter, 2001). Desoxyzucker können daher als potentielle HDMF-Vorläufer in Erdbeeren ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurden an verschiedenen Positionen deuterium- und ^{13}C -markierte D-Glucosen und D-Fructosen als wässrige Lösungen in Erdbeeren injiziert und der Verbleib der stabilen Isotope im Zielmo-

lekül massenspektrometrisch bestimmt. Die Isotopenmarkierung von [4-²H]-D-Glucose wurde nicht in die Furanonstruktur eingebaut, was man jedoch im Falle einer Biosynthese über intermediär gebildete Desoxyzucker erwarten würde (Wein und Mitarbeiter, 2001). Im Gegensatz dazu wurde [2-²H]-D-Glucose zu [1- oder 6-²H]-HDMF metabolisiert. Dieses Ergebnis ist offensichtlich auf einen Phosphohexose-Isomerase-katalysierten Wasserstofftransfer von C-2 nach C-1 bei der Umwandlung von D-Glucose-6-phosphat in D-Fructose-6-phosphat zurückzuführen (Wein und Mitarbeiter, 2001). Demnach ist das Enzym Phosphohexose-Isomerase an der Transformation von D-Glucose in HDMF beteiligt. Dies bestätigen auch Daten von Pérez und Mitarbeitern (1999a), die nach Applikation von D-Fructose-6-phosphat an Erdbeeren eine deutliche gesteigerte Furanonkonzentration (125 %) detektieren konnten.

Durch Applikation von ¹⁴C-markiertem HDMF an reife Erdbeeren gelang Roscher und Mitarbeitern (1998) der eindeutige Nachweis der Biosynthese von HDMF-Glucosid und DMMF aus HDMF (Abb. B-9).

In einer anderen Studie wurde die Bildung von HDMF durch den Hefestamm *Zygosaccharomyces rouxii* untersucht. Hecquet und Mitarbeiter (1996) konnten demonstrieren, dass nach Zugabe verschiedener Desoxyzucker bzw. Zuckerphosphate zum Kulturmedium (Endkonzentration von 5 %) die Ausbeute an HDMF gesteigert werden konnte. Der Zusatz von D-Fructose-6-phosphat bzw. 6-Desoxy-L-mannose bewirkte eine Erhöhung der HDMF-Konzentration auf 3.8 bzw. 5.0 ppm im Vergleich zu 1.8 ppm in Kontrollversuchen. Eine weitere Steigerung auf 18.0 ppm bzw. 52.4 ppm wurde durch Zugabe von 6-Desoxyhexulose bzw. D-Fructose-1,6-bisphosphat erzielt. Somit erwies sich D-Fructose-1,6-bisphosphat als der effektivste Vorläufer der HDMF-Produktion durch *Z. rouxii*.

4.4.2 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon

So vielschichtig die Biosynthese von HDMF betrachtet werden kann, so umstritten wird auch die Biogenese seines Methylethers DMMF diskutiert. Generell sind hierbei zwei Möglichkeiten denkbar. Einerseits lässt sich aufgrund der Strukturanalogie ein direkter Zusammenhang zu HDMF vermuten. DMMF könnte somit direkt aus HDMF biosynthetisiert werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass beide Verbindungen unabhängig voneinander in der

Pflanze gebildet werden. Letztere Variante bevorzugten Bruce und Mitarbeiter (1995), die die ^{13}C -Isotopengehalte von HDMF und DMMF aus Erdbeeren mit Hilfe der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) analysiert und verglichen haben. Dabei konnten sie feststellen, dass DMMF einen um 9 ‰ niedrigeren $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert aufweist als HDMF. Sollte nun DMMF direkt vom HDMF abstammen, so müsste das Kohlenstoffgrundgerüst „isotopisch“ identisch und die Abreicherung an ^{13}C einzig auf die Einführung der Methylgruppe zurückzuführen sein. Um diese Differenz zu verursachen, muss die Methylgruppe von DMMF einen $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert von -90 bis -100 ‰ aufzeigen. Die Existenz von stark abgereicherten Methylgruppen aus S-Adenosyl-L-methionin (SAM) wurde zwar berichtet, jedoch sind bisher lediglich Werte bis -43 ‰ bekannt (Weilacher und Mitarbeiter, 1996). Isotopenmessungen von aus Erdbeeren gewonnenem DMMF ergaben, dass der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der OCH_3 -Gruppe mit dem des Gesamtmoleküls im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmte (Werner, 1998). Somit kann eine Isotopendiskriminierung im Zusammenhang mit der Methylierung ausgeschlossen werden. Dementsprechend ist die Abreicherung auf eine andere Position in der Kohlenstoffkette zurückzuführen und deutet auf zwei unabhängige Biosynthesewege von HDMF und DMMF hin (Bruce und Mitarbeiter, 1995; Werner, 1998). Sollte der Anteil an ^{13}C bei allen Kohlenstoffatomen von DMMF im Vergleich zu HDMF geringer sein, erwägt Werner (1998) auch einen identischen Biosyntheseweg, setzt dann aber eine Bildung in verschiedenen Kompartimenten voraus.

Dem stehen Untersuchungen zur Bildung von HDMF, DMMF und HDMF-Glucosid in Abhängigkeit von den verschiedenen Reifestadien gegenüber. Übereinstimmend konnte bei allen drei Verbindungen beobachtet werden, dass deren Gehalte im Verlauf der Reifung stark zunehmen. HDMF steigt nahezu kontinuierlich vom Reifestadium „pink“ bis „dunkelrot“ an, wohingegen DMMF und HDMF-Glucosid zeitversetzt einen sprunghaften Anstieg beim Übergang von „rot“ nach „dunkelrot“ zeigen (Abb. B-8). Die höchsten Gehalte der drei Verbindungen wurden in überreifen Früchten ermittelt (Sanz und Mitarbeiter, 1995; Pérez und Mitarbeiter, 1996). Dieses Bildungsmuster lässt daher den Schluss zu, dass die genannten Furanone demselben Biosyntheseweg entspringen und HDMF mittels enzymatischer Methylierung bzw. Glucosylierung in DMMF und HDMF-Glucosid überführt wird. Dies könnte auch die deutliche Abnahme von HDMF bei gleichzeitigem Anstieg von DMMF in Erdbeeren nach achttägiger Lagerung bei 3°C erklären (Pickenhagen und Mitarbeiter, 1981). Ro-

schler und Mitarbeiter (1997a) untermauerten diese Hypothese, indem sie nach Applikation von S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionin (¹⁴C-SAM) radioaktiv markiertes DMMF in Erdbeeren identifizieren konnten. Folglich müsste die isotopen-markierte Methylgruppe des SAMs auf HDMF übertragen worden sein, was wiederum auf eine O-Methyltransferase-Aktivität in der Erdbeere schließen ließ. Da aber auch nach Verfütterung von 4-Hydroxy-2(oder 5)-[¹⁴C]methyl-5(oder 2)-methyl-3(2*H*)-furanon (¹⁴C-HDMF) radioaktives DMMF und HDMF-Glucosid festgestellt werden konnte, ließ sich folgende Schlussfolgerung ableiten. DMMF und HDMF-Glucosid werden aus HDMF gebildet, weshalb HDMF als direkter Vorläufer für die beiden Derivate anzusehen ist. In weiterführenden Arbeiten gelang Wein und Mitarbeitern (2002) die heterologe Expression einer Erdbeer-O-Methyltransferase in *E.coli*. Untersuchungen bezüglich der Substratspezifität zeigten, dass neben Brenzcatechin, Kaffeesäure, Kaffeeoyl-CoA und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd auch das Furanonderivat HDMF von der rekombinanten O-Methyltransferase (OMT) als Substrat akzeptiert wurde. Nach den Autoren ist dies auf die strukturelle Ähnlichkeit des Dienol-Tautomers von HDMF zu phenolischen Verbindungen zurückzuführen (Wein und Mitarbeiter, 2002).

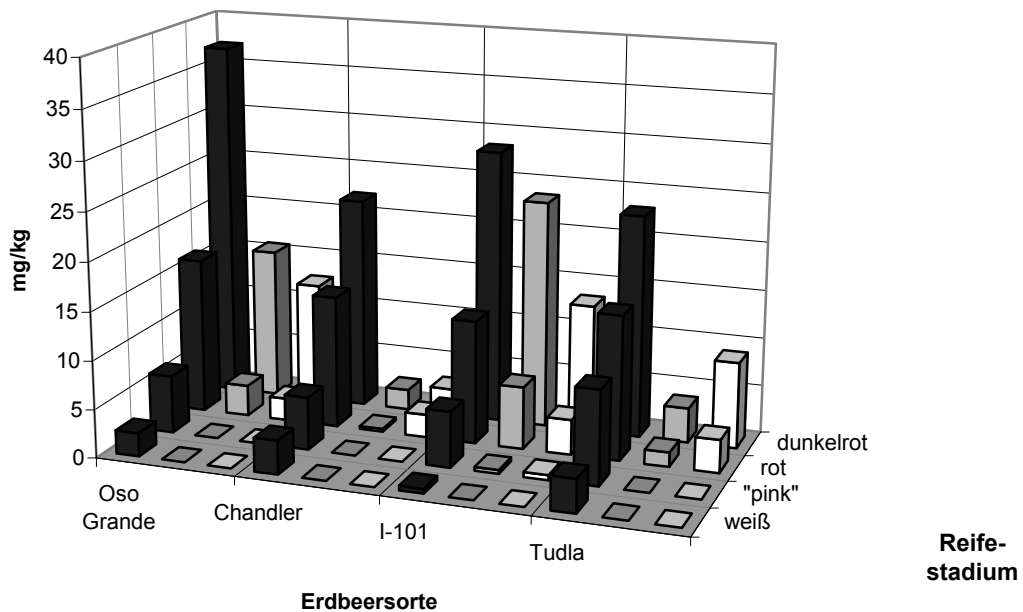


Abb. B-8: Gehalte von HDMF (■), DMMF (□) und HDMF-Glucosid (□) von vier verschiedenen Erdbeer-Sorten während der Reifung. Die Gehalte sind in mg/kg Frischgewicht angegeben. Die vier Reifestadien sind von vorne nach hinten dargestellt, wobei die rot-werdende Frucht als „pink“ bezeichnet wird (Pérez und Mitarbeiter 1996).

Noch im gleichen Jahr veröffentlichten Lavid und Mitarbeiter (2002) die Charakterisierung einer aus Erdbeeren teilweise aufgereinigten *O*-Methyltransferase. Die Eigenschaften bezüglich der Substratspezifität, des Aktivitätsoptimums und des Molekulargewichts entsprachen den beschriebenen Eigenschaften des rekombinanten Enzyms von Wein (2002).

Zusammenfassend muss ausgehend von D-Fructose-1,6-bisphosphat der in Abb. B-9 skizzierte Biosyntheseweg für HDMF und dessen Derivate angenommen werden.

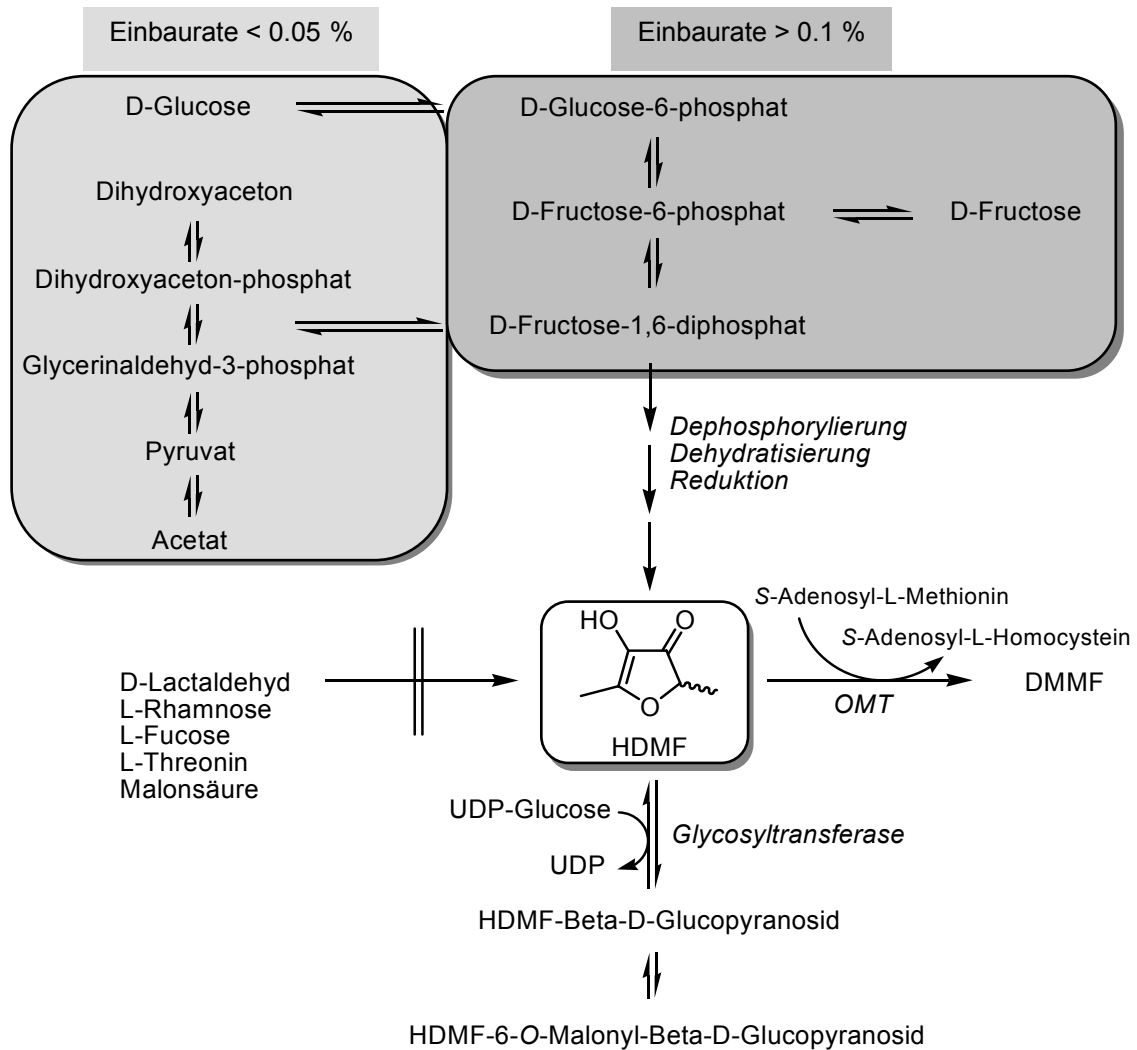


Abb. B-9: Postulierter Biosynthese- und Metabolismusweg für HDMF und seine natürlichen Derivate (Roscher 1998).

5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse zur Biosynthese von HDMF und seiner Derivate zu erlangen. Aufbauend auf den Ergebnissen von Roscher (1998) und Wein (2002) sollten weitere Fütterungsstudien mit Erdbeeren durchgeführt werden. Die Identifizierung möglicher Zwischenverbindungen des Metabolismus von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF stand dabei zunächst im Mittelpunkt. Sowohl radioaktiv als auch stabil markierte Substrate wurden hierzu eingesetzt.

Parallel zu diesen Arbeiten galt die Aufmerksamkeit der Suche nach enzymatischen Aktivitäten, die an der Biosynthese von HDMF beteiligt sind. Zunächst musste eine geeignete Protein-Extraktionsmethode etabliert werden. In Anlehnung an die Fütterungsversuche mit ganzen Erdbeerfrüchten sollten Inkubationsversuche von Erdbeerproteinextrakten durchgeführt werden. Die Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat im zellfreien Extrakt sollte den Ausgangspunkt für die Isolierung einer bei dieser Bildung beteiligten enzymatischen Aktivität liefern.

C Ergebnisse und Diskussion

1 Suche nach Zwischenverbindungen der HDMF-Biogenese

1.1 Inkorporationsversuche mit radioaktiv markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat

In ihren Applikationsversuchen mit verschiedenen radioaktiv markierten Substraten aus dem Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Fettsäurestoffwechsel konnten Roscher und Mitarbeiter (1998) den Einbau der C₆-Kohlenhydrate [U-¹⁴C]-D-Glucose, [U-¹⁴C]-D-Glucose-6-phosphat, [U-¹⁴C]-D-Fructose und [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat in die Furanonstruktur eindeutig demonstrieren. Dabei lieferte [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat die höchste Einbaurrate aller applizierten Verbindungen.

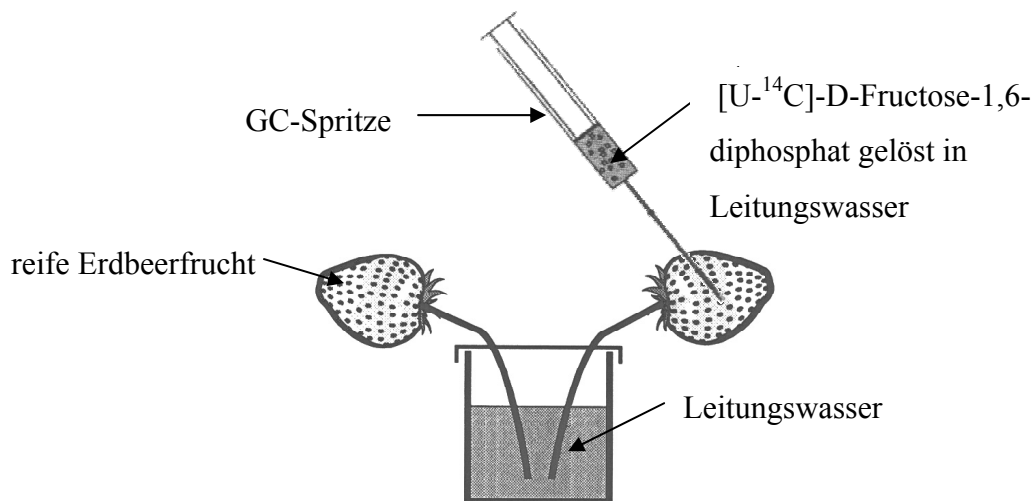


Abb. C-1: Experimentelles Vorgehen beim Inkorporationsexperiment (Inkubationsdauer: vier Tage) von reifen Erdbeerfrüchten mit [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollten weitere Inkorporationsversuche durchgeführt werden, um die Identifizierung von Intermediaten im Verlaufe der Metabolisierung von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF zu ermöglichen. Eine wässrige Lösung an uniform ^{14}C -markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat ($50\ \mu\text{l}$ äquivalent $8 \times 10^6\ \text{dpm}$) wurde an vier ganze, reife Erdbeerfrüchte appliziert. Die Stiele der Früchte wurden in Leitungswasser getaucht, um diese für die gesamte Dauer der Inkubation von vier Tagen mit ausreichend Wasser zu versorgen. Eine rasche Austrocknung der Erdbeeren sollte so verhindert werden (Abb. C-1).

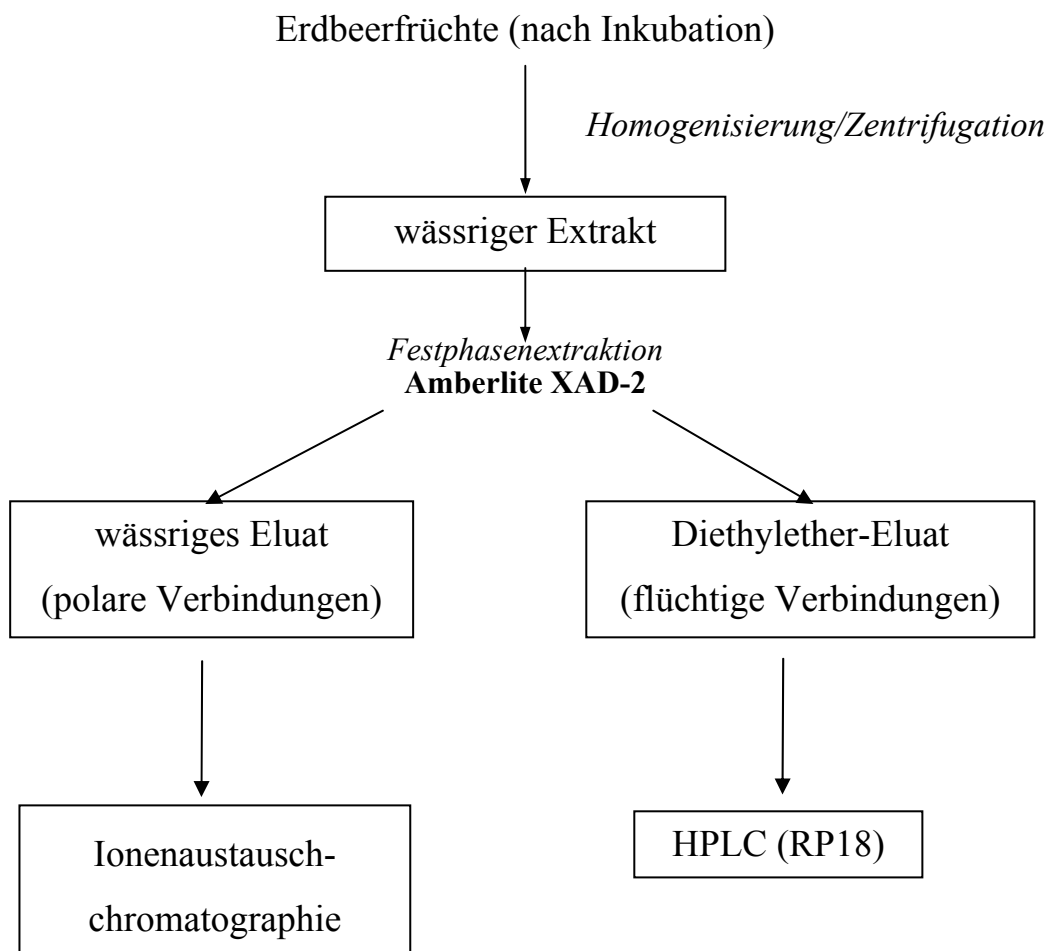


Abb. C-2: Aufarbeitungsschema bei den Inkorporationsexperimenten von ganzen Erdbeerfrüchten mit $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -D-Fructose-1,6-diphosphat.

Nach der Inkubation wurden die Früchte entsprechend dem in Abb. C-2 dargestellten Schema aufgearbeitet. Die erhaltenen Diethylether-Eluate sind mit Hilfe der *online* Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit einem Flüssigszintillationsdetektor untersucht worden (Abb. C-3). Die Auftrennung der radioaktiv markierten Verbindungen erfolgte an einer C-18 Umkehrphase (RP). Die RP-HPLC stellt eine geeignete Methode für die Analyse von ^{14}C -markiertem HDMF dar und wurde bereits erfolgreich bei der Bestimmung von Inkorporationsraten von Roscher und Mitarbeitern (1997a; 1998) eingesetzt. Neben der Detektion unbekannter radioaktiv markierter Verbindungen diente die Quantifizierung von radioaktiv markiertem HDMF der Kontrolle des Metabolisierungsverlaufes.

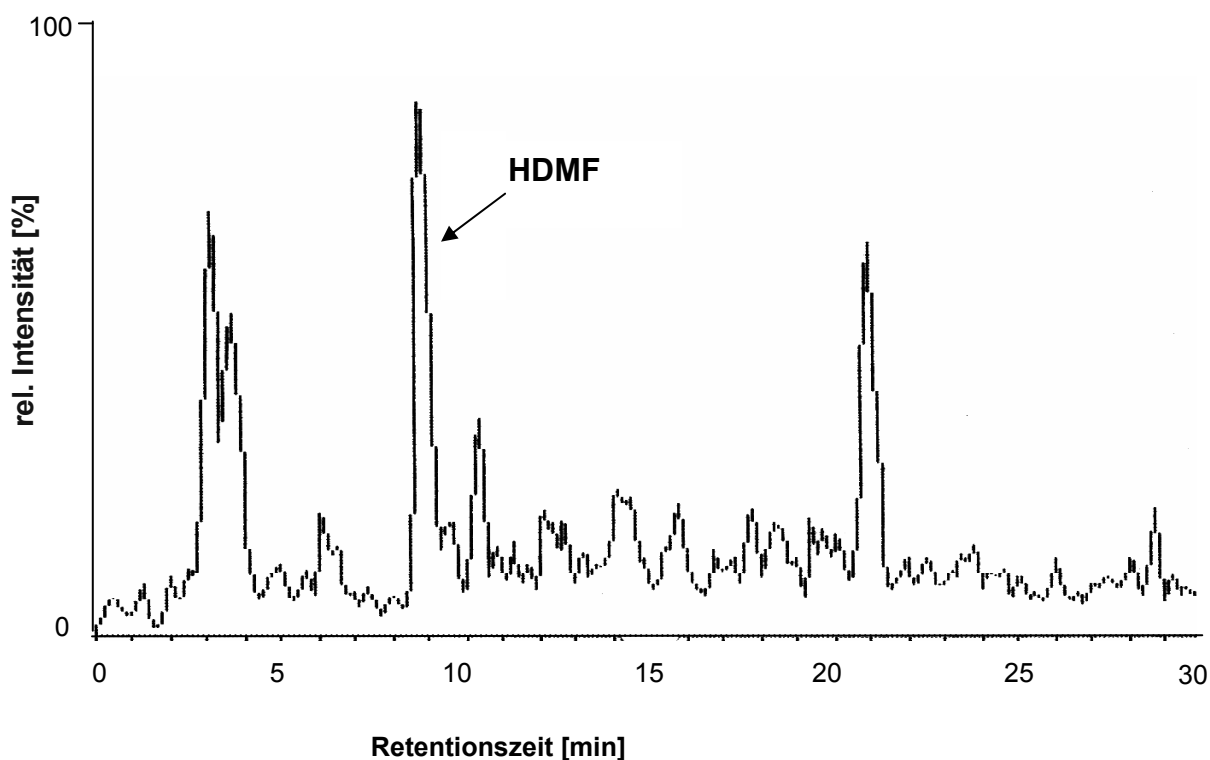


Abb. C-3: RP-18 HPLC-Analyse mit *online* Radiodetektion eines Diethylether-Extraktes. Der Extrakt wurde durch XAD-Festphasenextraktion von Erdbeeren erhalten, die mit $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -D-Fructose-1,6-diphosphat inkubiert worden waren.

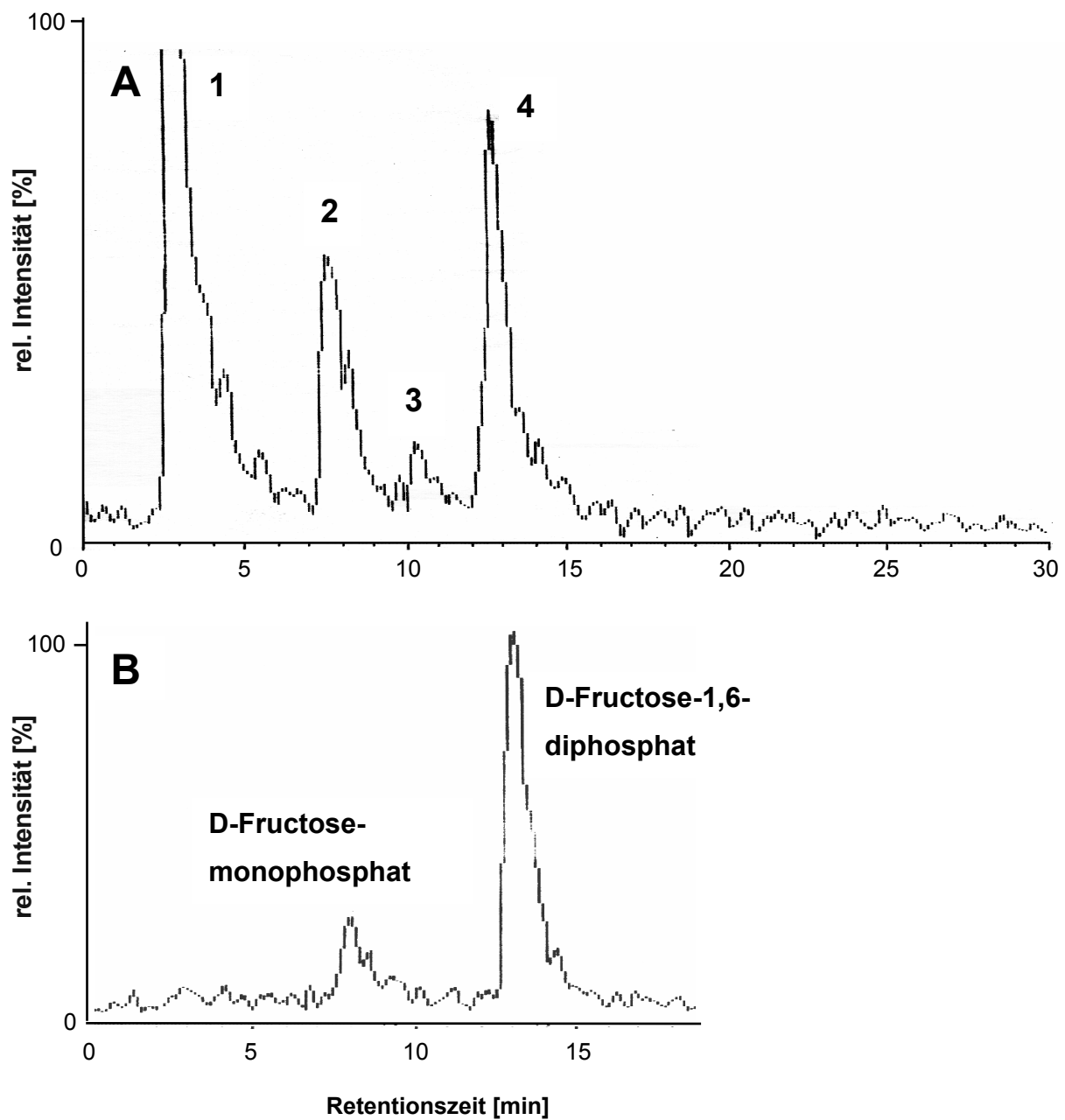


Abb. C-4: HPLC-Analyse an einer Anionenaustauscher-Phase mit *online* Radiodetektion

A eines wässrigen Extraktes, erhalten durch XAD-Festphasenextraktion von Erdbeeren, die mit $[U-^{14}C]$ -D-Fructose-1,6-diphosphat inkubiert worden waren. (1: nicht phosphorylierte Verbindungen, 2: Monophosphate, 3: Unbekannte, 4: Diphosphate)

B einer $[U-^{14}C]$ -D-Fructose-1,6-diphosphat Stammlösung.

Von weitaus größerem Interesse als die Analyse des Diethylether-Eluates war jedoch die Untersuchung des nach der Festphasenextraktion erhaltenen wässrigen Eluates. Mögliche polare Zwischenverbindungen, die im Verlaufe der Umwandlung von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF gebildet werden, wurden hier vermutet. Die Analyse des wässrigen Extraktes erfolgte mit Hilfe der HPLC an einer Anionenaustauscherphase (Abb. C-4 A).

Die Retentionszeiten der Signale 1, 2 und 4 stimmen mit denen von nicht phosphorylierten Verbindungen sowie Monophosphaten und Diphosphaten überein. Als Referenzsubstanz diente eine [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat-Stammlösung, die aufgrund von Zersetzungsreaktionen kleine Mengen an Fructose-Monophosphaten enthielt (Abb. C-4 B). Die Retentionszeit des Signals 3 in Abb. C-4 A konnte keiner untersuchten Referenzsubstanz zugeordnet werden.

Um die Identifizierung einzelner Verbindungen zu ermöglichen, wurde der gesamte wässrige Extrakt präparativ durch Säulenchromatographie an einem Dowex-Ionenaustauscher getrennt. Die Elution nicht phosphorylierter Verbindungen erfolgte zunächst mit Wasser, anschließend wurden noch auf der Säule gebundene phosphorylierte Verbindungen, aber auch andere Substanzen wie z.B. Carbonsäuren mit einer 0.4 M NaCl-Lösung eluiert.

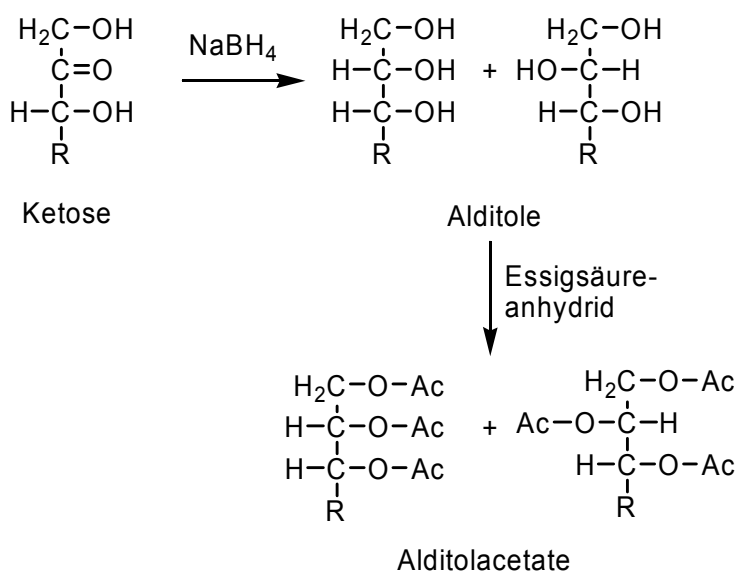


Abb. C-5: Syntheschema von Alditolacetaten aus Zuckern am Beispiel einer Ketose.



Die Verbindungen des NaCl-Eluates sind nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase mittels einer vielfach zur Identifizierung von Zuckern angewandten Methode (Abb. C-5) derivatisiert worden (Fox, 1999). Das grundlegende Reaktionsprinzip dieser Derivatisierungsmethode ist in Abb. C-4 am Beispiel einer Ketose dargestellt. Zunächst erfolgt dabei die Reduktion der Carbonylfunktion des Kohlenhydrats durch NaBH_4 und die entstandenen Alditole werden anschließend durch Essigsäureanhydrid acetyliert. Mit Ausnahme der Ketotriose Dihydroxyaceton entstehen bei der Derivatisierung von Ketosen im Reduktionsschritt stets zwei isomere Verbindungen. Die so gebildeten Alditolacetate konnten mittels Radio-Gaschromatographie analysiert werden.

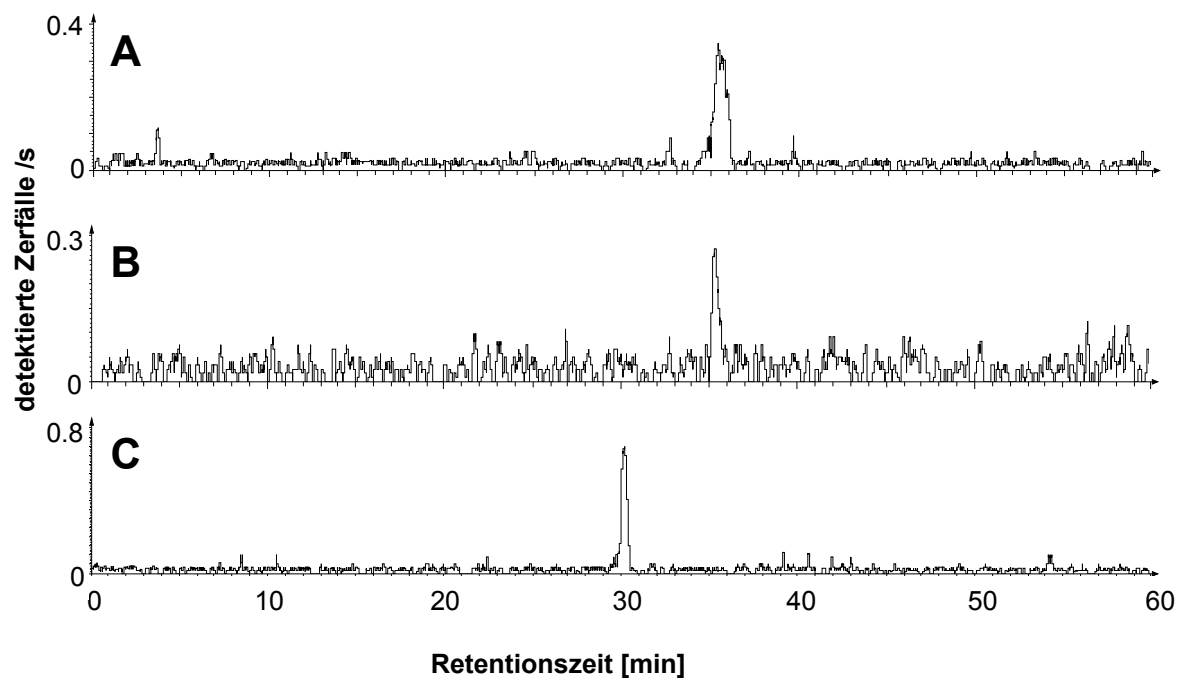


Abb. C-6: Radio-GC Analyse

- A** der durch Hydrolyse mit Phosphatase und anschließender Derivatisierung des 0.4 M NaCl-Eluates nach Aufreinigung über XAD und Anionenaustauscher erhaltenen Alditolacetate eines viertägigen Inkorporationsexperimentes reifer Erdbeerfrüchte mit $[\text{U}-^{14}\text{C}]\text{-D-Fructose-1,6-diphosphat}$,
- B** von $[\text{U}-^{14}\text{C}]\text{-D-Fructose}$ nach Derivatisierung zum Alditolacetat,
- C** von $[\text{1-}^{14}\text{C}]\text{-D-Fucose}$ nach Derivatisierung zum Alditolacetat.

Abbildung C-6 zeigt die Radio-GC-Analyse des NaCl-Eluates. Parallel wurden radioaktiv markierte Referenzsubstanzen in die entsprechenden Alditolacetate überführt und analog analysiert. Eine Auftrennung in die diastereomeren Alditolacetate wurde jedoch nicht erzielt. Die Aktivität der injizierten Probe lag jeweils bei etwa 40000 dpm (Zerfälle pro Minute) was ca. 0,5 % der eingesetzten Gesamtaktivität entspricht. Die Hauptaktivität ist innerhalb eines Signals lokalisiert, das die gleiche Retentionszeit wie Hexosen, z.B. Fructose aufweist und auf noch vorhandenes radioaktiv markiertes D-Fructose-1,6-Diphosphat oder D-Fructose-Monophosphat zurückgeführt werden kann.

Bei der angewandten Analysenmethode erfordert ein deutliches Signal eine Aktivität von mindestens 5000 dpm (Signal/Rausch 3/1). Die in die Erdbeeren injizierte Aktivität an [U- ^{14}C]-D-Fructose-1,6-diphosphat erwies sich für die Identifizierung weiterer Metabolite somit als zu gering. Als Konsequenz wurde auf die Durchführung weiterer Metabolisierungsexperimente mittels radioaktiv markierter Vorläufer verzichtet.

1.2 Inkorporationsversuche mit ^{13}C -markierter D-Fructose

In den Inkorporationsversuchen mit radioaktiv markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat konnten keine Zwischenverbindungen der HDMF-Biogenese nachgewiesen werden. Wie bereits unter B 4.4.1 erwähnt, zeigte D-Fructose in den Inkorporationsversuchen an reifen Erdbeerfrüchten nach D-Fructose-1,6-diphosphat die zweithöchste Einbaurate in die Furanonstruktur (Roscher und Mitarbeiter, 1996). Daher ist für weitere Inkorporationsversuche uniform ^{13}C -markierte D-Fructose eingesetzt worden. Hierfür wurden 30 mg [U- ^{13}C]-D-Fructose in 50 μl Wasser gelöst und jeweils in vier reife Erdbeerfrüchte injiziert.

Die Früchte wurden gemäß dem in Abb. C-2 dargestellten Schema nach Inkubationszeiten von einem, zwei, drei und vier Tagen aufgearbeitet. Die Diethylether-Eluate sind mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) auf ihren Gehalt an ^{13}C -markiertem HDMF und ^{13}C -markiertem DMMF analysiert worden. Abbildung C-7 zeigt das Totalionenchromatogramm (TIC) sowie die Ionenspuren mit den Masse-Ladungs-Verhältnissen (m/z) 128, 134, 142 und 148 des Ether-Eluates nach einer Inkubationszeit von vier Tagen.

Dabei lassen sich die Masse-Ladungs-Verhältnisse von 128 bzw. 142 den unmarkierten, die Verhältnisse von 134 bzw. 148 den markierten Furanonen zuordnen. Der bereits 1998 von Schwab beschriebene Einbau aller sechs markierten Kohlenstoffatome in die Struktur beider Hydroxyfuranone konnte durch dieses Experiment bestätigt werden.

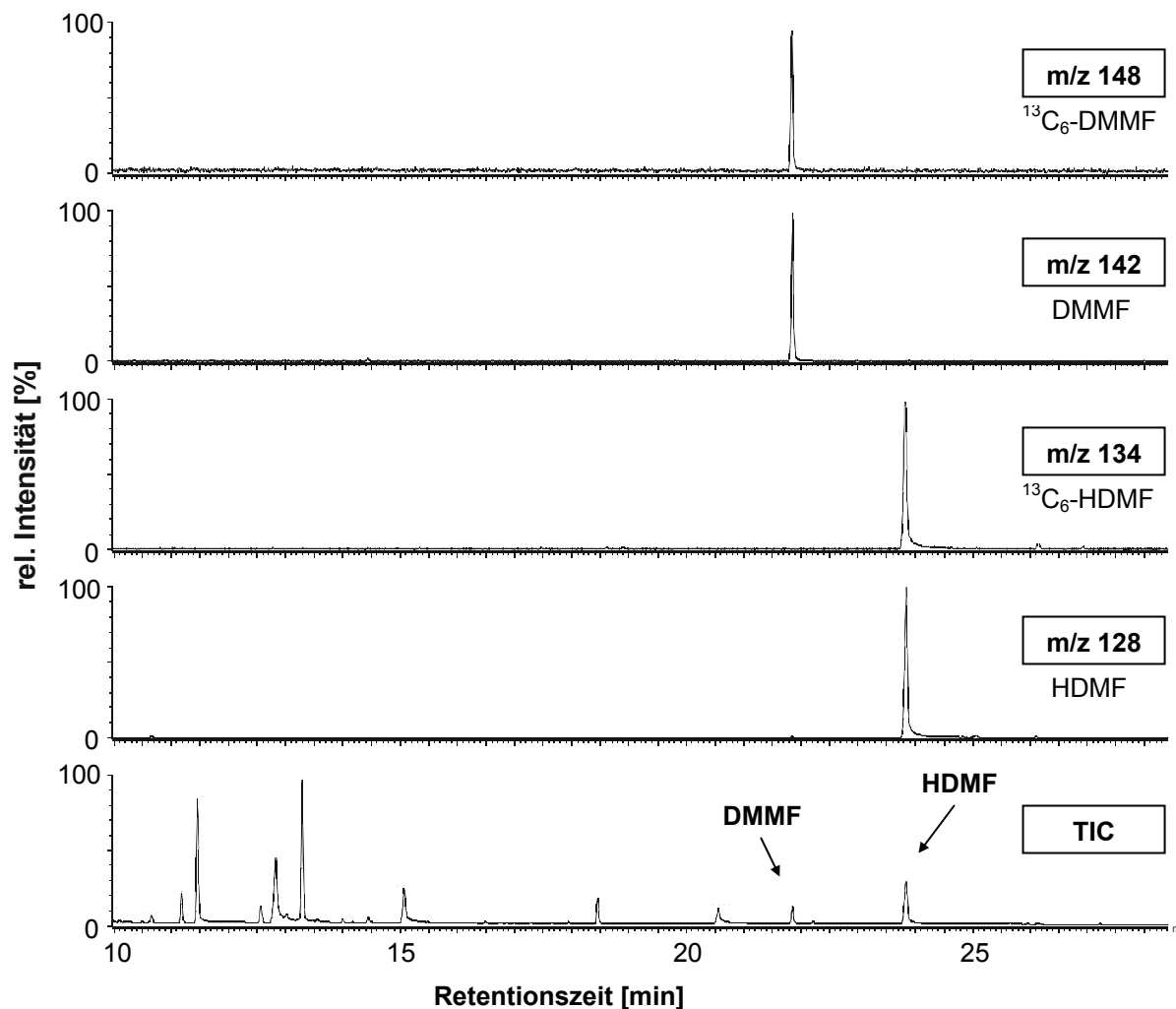


Abb. C-7: GC-MS-Analyse des Diethylether-Eluates der durch XAD-Festphasenextraktion aus einer reifen Erdbeerfrucht nach viertägiger Inkorporation mit [U-¹³C]-D-Fructose. Totalionenchromatogramm (TIC) sowie Ionenspuren mit den Masse-Ladungsverhältnissen *m/z* 128, 134, 142 and 148.

Der Markierungsgrad von HDMF wie auch DMMF kann als Quotient aus der Signalfläche des jeweiligen markierten Moleküls (m/z 134 bzw. 148) und der Summe der Signalflächen des markierten und des zugehörigen unmarkierten Moleküls berechnet werden. Er stieg im Verlauf der Inkubation deutlich von 0.3 % bzw. 0.1 % nach eintägiger Inkubation auf Werte von 19.5 % bzw. 11.7 % nach vier Tagen an (Abb. C-8).

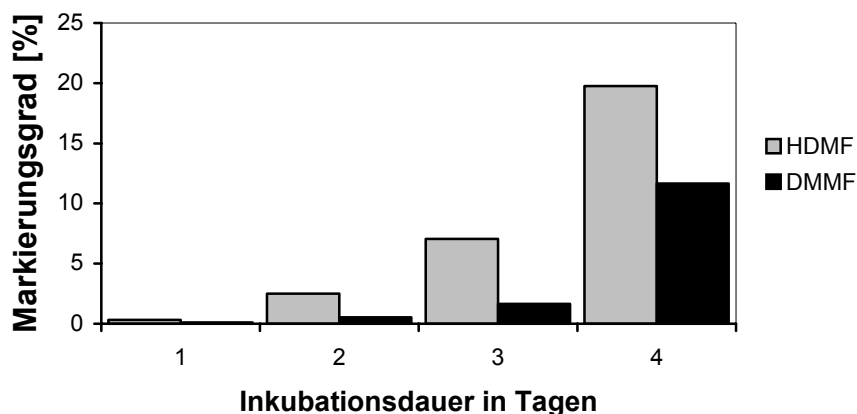


Abb. C-8: Zeitlicher Verlauf des Markierungsgrades von HDMF und DMMF berechnet als Quotient aus der Signalfläche des jeweiligen markierten Moleküls und der Summe der Signalflächen des markierten und des zugehörigen unmarkierten Moleküls.

Die präparative Trennung des nach Festphasenextraktion an XAD erhaltenen wässrigen Extraktes der ein-, zwei-, drei- und viertägigen Inkorporationsexperimente wurde mittels Anionenaustauscherchromatographie realisiert. Wie bereits beschrieben wurde mit Wasser und anschließend mit 0.4 M NaCl-Lösung eluiert. Verbindungen des wässrigen Eluates, wie auch des mit alkalischer Phosphatase behandelten NaCl-Eluates wurden zu Alditolacetaten derivatisiert und zunächst mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie analysiert (Abb. C-9 A, Abb. C-10). Die GC-MS erwies sich allerdings aufgrund der im Vergleich zu den enthaltenen unmarkierten Verbindungen zu geringen Gehalte an ^{13}C -markierten Verbindungen nicht als adäquate Analysenmethode zur Detektion markierter Umwandlungsprodukte. Daher wurden die Proben zusätzlich durch

Gaschromatographie gekoppelt mit der Atomemissionsdetektion² (GC-AED) analysiert (Abb. C-9 B/C, Abb. C-10 B/C).

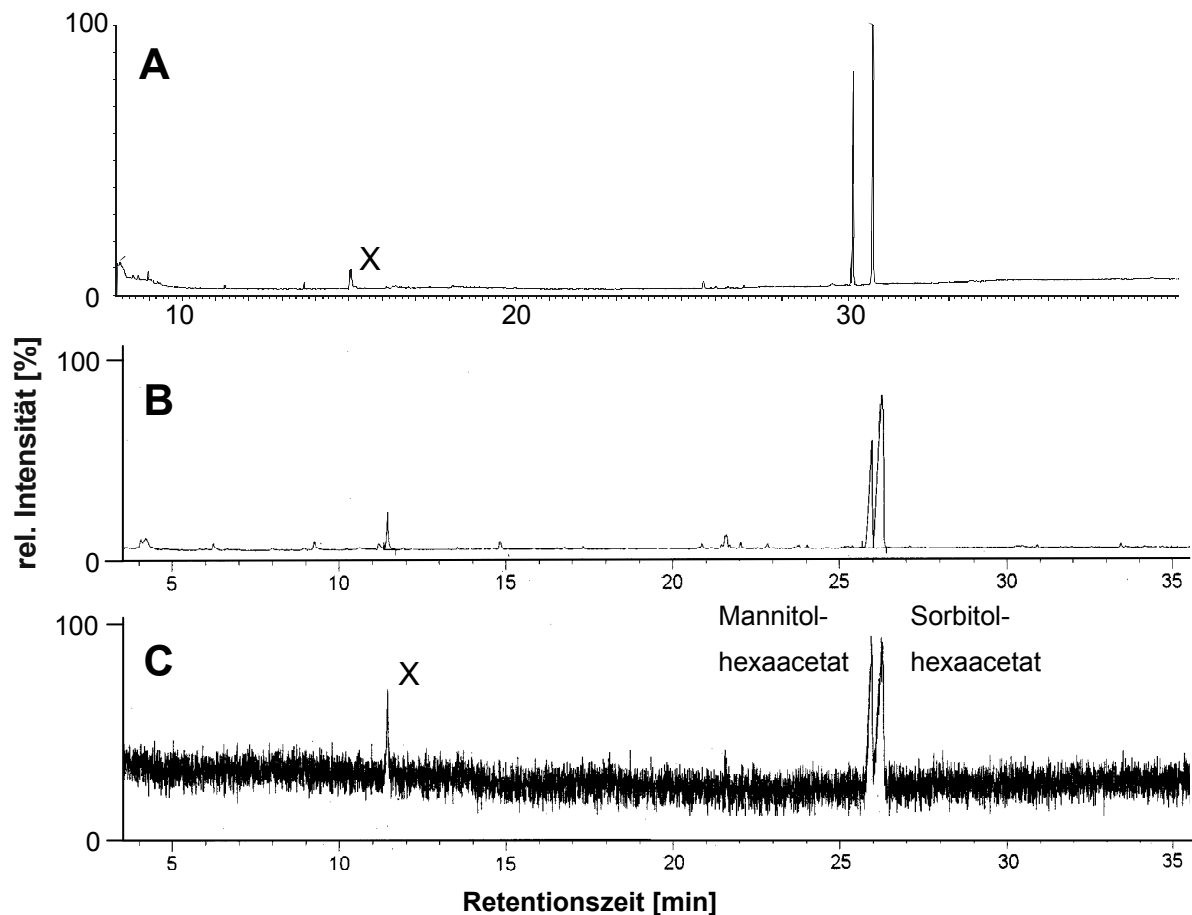


Abb. C-9: Analyse der durch Derivatisierung des wässrigen Eluates nach Aufreinigung über XAD und Anionenaustauscher erhaltenen Alditolacetate eines eintägigen Inkorporationsexperimentes reifer Erdbeerfrüchte mit [U-¹³C]-D-Fructose (nicht phosphorylierte Verbindungen).

A GC-MS-Analyse – Totalionenchromatogramm

B GC-AED-Analyse – ¹²C-Spur

C GC-AED-Analyse – ¹³C-Spur

² Diese Untersuchungen wurden dankenswerter Weise im Arbeitskreis von Prof. Berger im Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover durchgeführt.

Bei der GC-AED werden die aus der Kapillarsäule austretenden Verbindungen in einem Helium-Plasma, dem durch Mikrowellen Energie zugeführt wird, fragmentiert. Die freigesetzten Atome geben dabei charakteristische Emissionslinien ab, die mit Hilfe eines Photoarraydetektors erfasst werden können. Die GC-AED erlaubt damit nicht nur den selektiven Nachweis bestimmter Elemente, sie repräsentiert vielmehr auch ein potentes Mittel zur Suche nach stabilen Isotopen wie Deuterium, Kohlenstoff-13 oder auch Stickstoff-15. Durchgeführt wurden diese Messungen dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe Prof. Berger am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover.

Neben den isomeren Alditolacetaten der D-Fructose, dem Mannitol- und dem Sorbitolhexaacetat, wurde in allen wässrigen Eluaten nur eine weitere ^{13}C -markierte Verbindung X detektiert, die aufgrund ihres Massenspektrums jedoch nicht identifiziert werden konnte (Abb. C-9).

Bei der GC-AED Analyse des hydrolysierten und derivatisierten NaCl-Eluates wurden mehrere ^{13}C -markierte Substanzen detektiert (Abb. C-10). Zusätzlich zu den Alditolacetaten der D-Fructose (gebildet aus D-Fructose-1,6-diphosphat oder D-Fructose-Monophosphaten) konnten die Alditolacetate von Glycerin (entstanden aus Dihydroxyacetophosphat oder Glycerinaldehyd-3-phosphat) nachgewiesen werden. Die Identifizierung von Y und Z aufgrund ihrer Massenspektren gelang nicht (Abb. C-10). Allerdings kann die Beteiligung von Y und Z, wie auch die Beteiligung von Verbindung X, als Zwischenverbindungen der Umsetzung von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF ausgeschlossen werden. Da bei der Metabolisierung von $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-D-Fructose}$ $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-HDMF}$ gebildet wird, kommen als Zwischenverbindungen nur Verbindungen mit sechs ^{13}C -markierten C-Atomen in Frage (Schwab, 1998). Die mittels GC-AED Analyse nachgewiesenen ^{13}C -markierten Verbindungen besitzen allerdings höchstens drei C-Atome. Diese Aussage basiert auf den beobachteten Retentionszeiten und den erhaltenen Massenspektren der unbekannteren Verbindungen im Vergleich mit den Daten der GC-MS-Analysen von derivatisierten Referenzverbindungen, darunter Hexosen, Pentosen, Tetrosen, Triosen sowie Desoxyzucker.

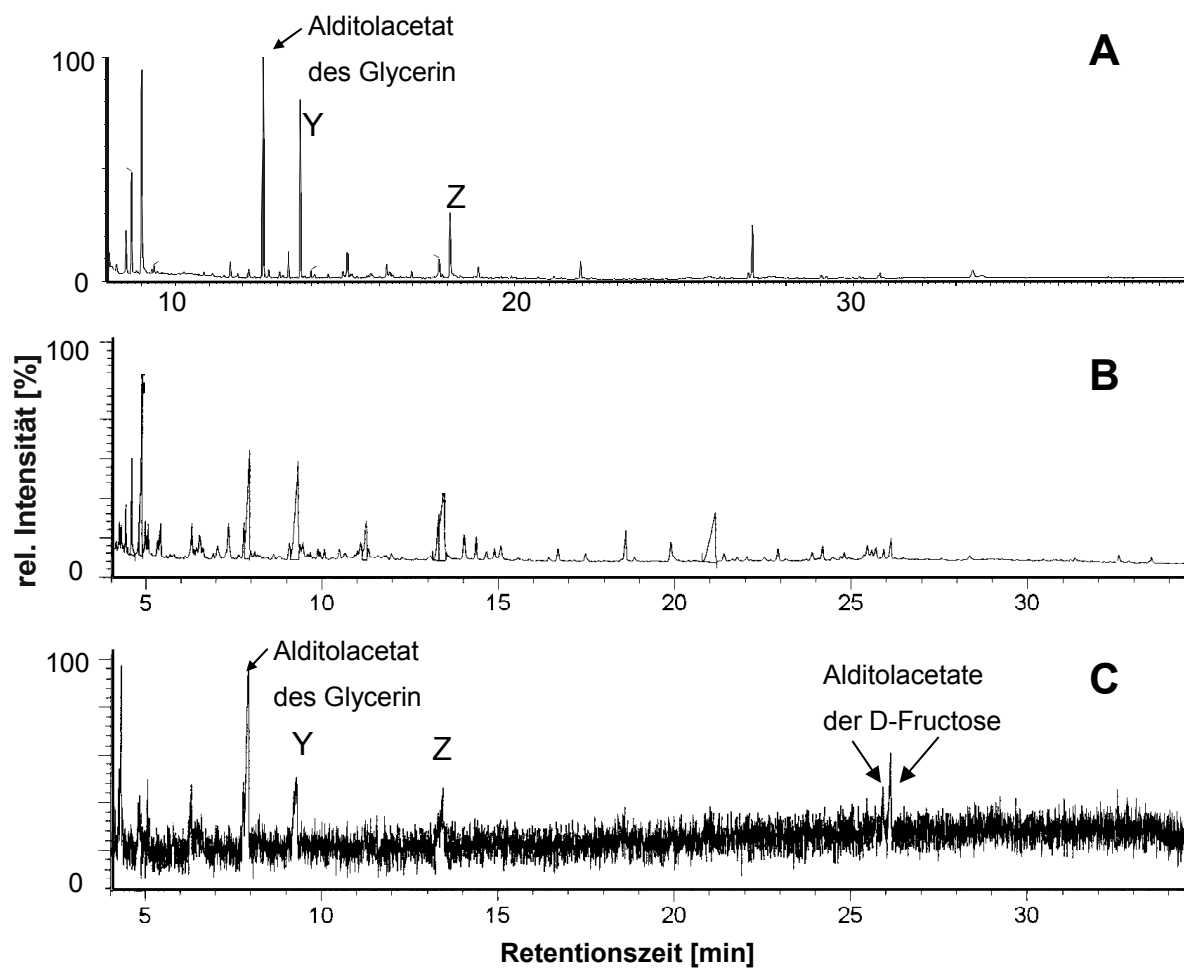


Abb. C-10: Analyse der durch Hydrolyse mit Phosphatase und anschließender Derivatisierung des 0.4 M NaCl-Eluates nach Aufreinigung über XAD und Anionenaustauscher erhaltenen Alditolacetate eines zweitägigen Inkorporationsexperimentes reifer Erdbeerfrüchte mit $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -D-Fructose.

A GC-MS-Analyse – Totalionenchromatogramm

B GC-AED-Analyse – ^{12}C -Spur

C GC-AED-Analyse – ^{13}C -Spur

1.3 Metabolismus von radioaktiv markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat in Erdbeerproteinextrakten

In dieser Studie ist [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat einem Erdbeerproteinextrakt zugesetzt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert worden. Für die Extraktgewinnung wurden reife Erdbeerfrüchte unter Zusatz von Wasser und Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) homogenisiert, das Homogenat mit NaOH auf pH 7.7 eingestellt und zentrifugiert. Durch den Zusatz von PVPP während der Extrakt-Gewinnung sollte eine Inaktivierung enzymatischer Aktivitäten durch Polyphenole verhindert werden. Der erhaltene Überstand wurde lyophilisiert. Wie unter Abschnitt C 1.1 beschrieben ist zunächst mit Hilfe der HPLC an einer Anionenaustauscher-Säule nach radioaktiv markierten Umsetzungsprodukten gesucht worden (Abb. C-11).

[U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat wurde durch den Proteinextrakt vollständig abgebaut. Es entstanden sowohl Monophosphate als auch nicht phosphorylierte Verbindungen. In einem parallel durchgeführten Kontrollexperiment mit durch Hitze inaktiviertem Erdbeerproteinextrakt fand kein Abbau von [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat statt. Der in Abb. C-10 dargestellte Abbau von [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat ist somit einer enzymatischen Katalyse zuzuschreiben.

Die Identifizierung einzelner radioaktiv markierter Umsetzungsprodukte wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) mit Radiodetektion realisiert. Eine DC-Analyse wurde direkt mit der Inkubationslösung durchgeführt, daneben wurde ein Teil der Inkubationslösung vor der DC-Analyse mit alkalischer Phosphatase behandelt.

Ein Großteil der Radioaktivität verbleibt bei der nicht hydrolysierten Inkubationslösung im Bereich des Auftragungspunktes (Signal 1 in Abb. C-12 A). Offensichtlich handelt es sich hierbei um sehr polare Verbindungen wie z.B. Monophosphate. Nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase war ein stark verringertes Signal 1 detektierbar (Abb. C-12 B). Die ursprünglichen Verbindungen wurden entweder nicht vollständig hydrolysiert, oder es sind im Verlauf der Inkubation stark polare Verbindungen (z.B. Carbonsäuren) gebildet worden. Ein deutlicher Anstieg der Intensitäten der Signale 2 und 3 durch die Hydrolyse wurde beobachtet.

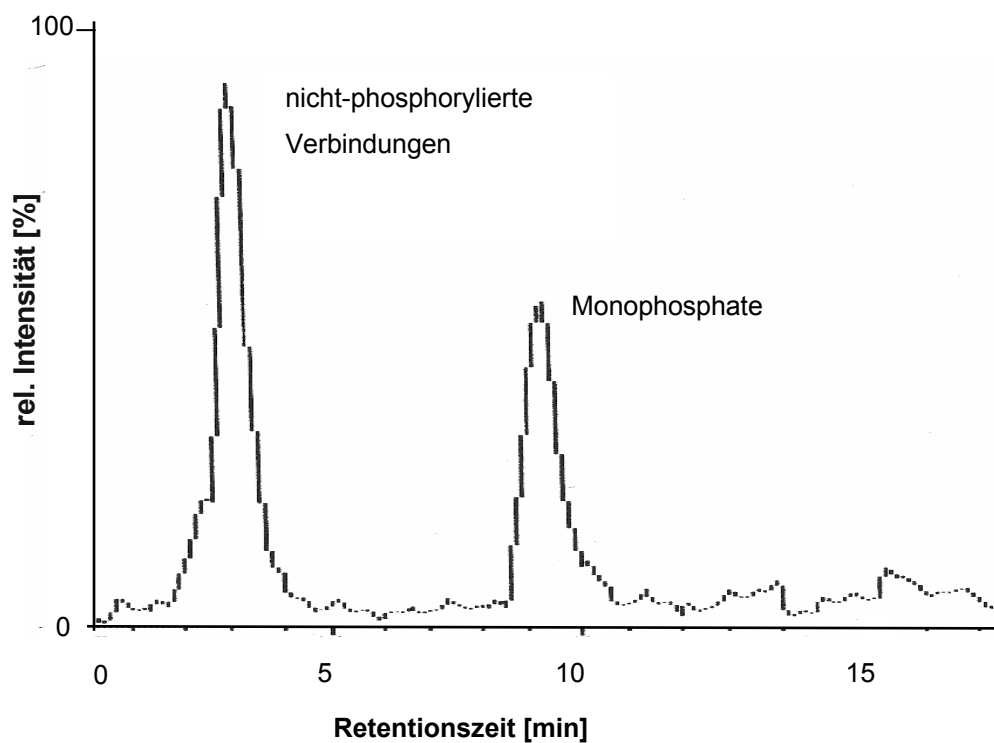


Abb. C-11: HPLC-Analyse an einer Anionenaustauscherphase mit *online* Radiodetektion eines Umsetzungsexperimentes folgender Zusammensetzung: [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat (20000 dpm), Erdbeerproteinextrakt (lyophilisiert) (2 mg), Puffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.7) (100 μ l); Gesamtvolumen: 245 μ l.

Mit Hilfe der ermittelten Retentionsfaktoren (R_f -Werte) konnten durch Vergleich mit kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen und den bisherigen Ergebnissen Zuordnungen getroffen werden. Bei Signal 2 handelt es sich vermutlich um Fructose während Signal 3 durch Dihydroxyaceton erzeugt wird.

Mit Hilfe der eingesetzten Analysenmethode ist es somit nicht gelungen Intermediate der HDMF-Biosynthese nachzuweisen. Jedoch kann die Anwesenheit solcher Verbindungen im Spurenbereich aufgrund der mangelnden Sensitivität der eingesetzten Analysenmethoden nicht ausgeschlossen werden.

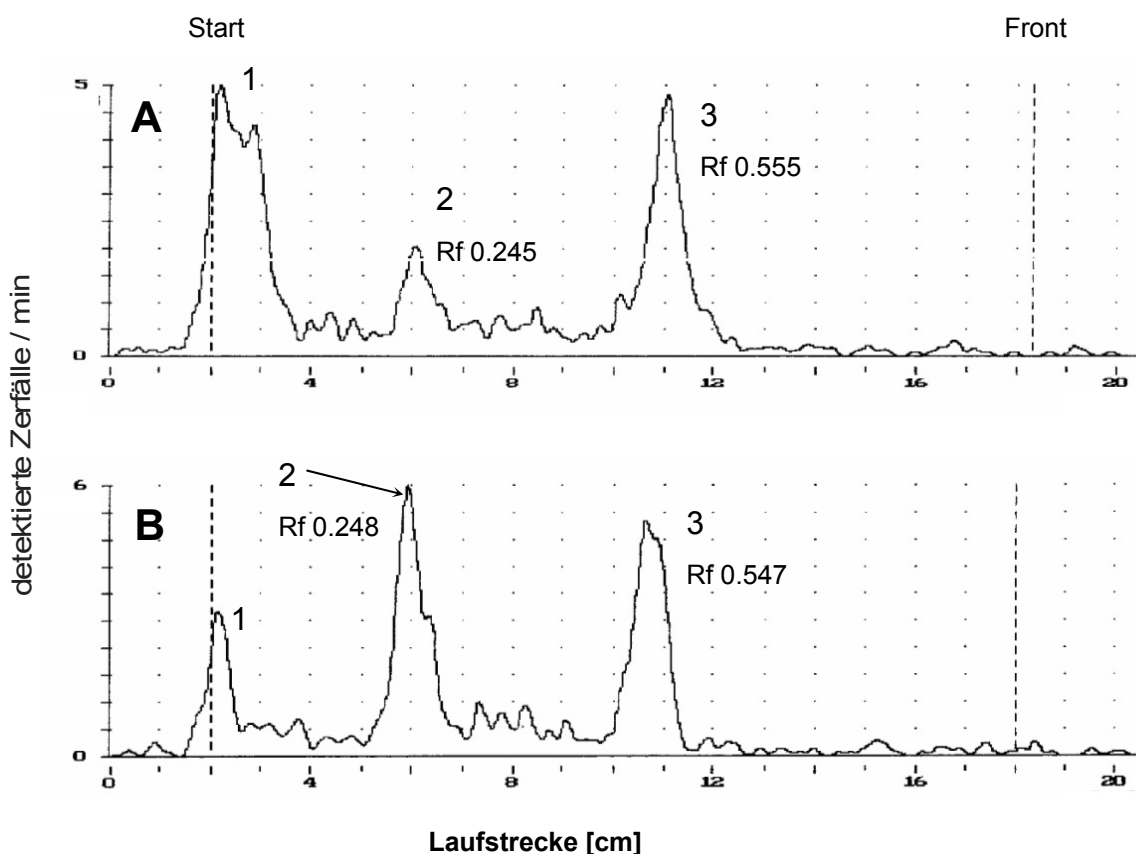


Abb. C-12: DC-Analyse mit Radiodetektion der Produkte gebildet durch

- A** Inkubation von $[U-^{14}C]$ -D-Fructose-1,6-diphosphat mit einem Erdbeerproteinextrakt,
- B** Behandlung einer aliquoten Menge der Inkubationslösung aus A mit alkalischer Phosphatase.

Der Nachweis von Fructosemonophosphat und Fructose bereits vor Behandlung mit alkalischer Phosphatase indiziert das Vorhandensein einer Phosphatase-Aktivität im Erdbeerproteinextrakt. Der Nachweis der Bildung von Dihydroxyaceton bzw. Dihydroxyacetonphosphat steht im Einklang mit der Identifikation von stabil markiertem Glycerintriacetat bei den Inkorporationsversuchen mit $[U-^{13}C]$ -D-Fructose (siehe C 1.2) und legt die Anwesenheit einer Aldolase-Aktivität in reifen Erdbeerfrüchten nahe.

1.4 Umsetzungsversuche mit *o*-Phenylendiamin

1.4.1 Analytik reaktiver α -Dicarbonylverbindungen

Die Bildung von HDMF aus Zuckern und Zuckerphosphaten auf chemischem Wege im Sinne einer Maillard-Reaktion verläuft über reaktive α -Dicarbonylstrukturen als Zwischenverbindungen (Abschnitt B 4.3). Das Auftreten solcher Verbindungen auch im Verlaufe der enzymatischen Bildung von HDMF schien daher durchaus plausibel und sollte näher untersucht werden. Für die Analyse dieser reaktiven Verbindungen sind Methoden beschrieben, die auf einer direkten Detektion der nativen α -Dicarbonylstruktur bzw. ihrer entsprechenden Alkohole nach Reduktion der Carbonylfunktionen beruhen (Kawakishi und Mitarbeiter, 1991; Zyzak und Mitarbeiter, 1995). Weitaus häufiger finden jedoch Derivatisierungen mit sog. Abfangreagenzien Anwendung. Beispielhaft seien *O*-Aryl oder *O*-Alkyl Hydroxylamine (z.B. *O*-Methylhydroxylamin), Hydrazine (z.B. Girard T Reagenz), Cysteamin, *o*-Diaminobenzol-Derivate (z. B. *o*-Phenylendiamin) und Aminoguanidin genannt. Dadurch entstehen stabile Derivate (Oxime, Osazone, Thiazolidine, Quinoxalinderivate bzw. Triazine) die mittels gängiger chromatographischer Verfahren und Detektionsmethoden einfach analysiert werden können (Nevidek und Mitarbeiter, 1992; Glomb und Tschirnich, 2001).

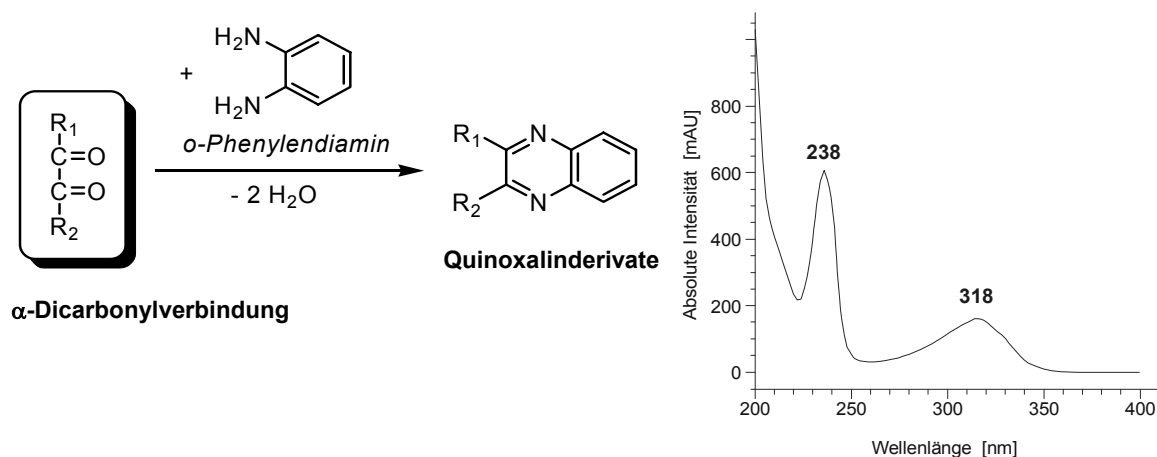


Abb. C-13: Abfangreaktion von α -Dicarbonylverbindungen mit *o*-Phenylendiamin und charakteristisches UV-Spektrum der gebildeten Quinoxalinderivate.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde zum Nachweis von α -Dicarbonylstrukturen in Erdbeerfrüchten sowie bei Umsetzungsversuchen mit Erdbeerproteinextrakten *o*-Phenylendiamin als Abfangreagenz eingesetzt. Die entstehenden Quinoxalinderivate zeichnen sich durch ihre charakteristischen UV-Spektren mit zwei Absorptionsmaxima bei ca. 238 sowie ca. 318 nm aus (Abb. C-13) (Seok und Mitarbeiter, 1996). Dies ermöglicht den Nachweis von Quinoxalinderivaten mittels HPLC-DAD (Dioden-Array-Detektion).

1.4.2 Inkorporationsversuche von Erdbeerfrüchten mit *o*-Phenylendiamin

Zur Identifizierung enthaltener α -Dicarbonylverbindungen ist eine wässrige *o*-Phenylendiamin-Lösung in eine reife, intakte Erdbeerfrucht injiziert worden. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde die Frucht unter Wasserzusatz homogenisiert, die erhaltene Suspension zentrifugiert und der wässrige Überstand mit Dichlormethan extrahiert. Die Untersuchung des Extraktes erfolgte mittels HPLC-DAD (Abb. C-14).

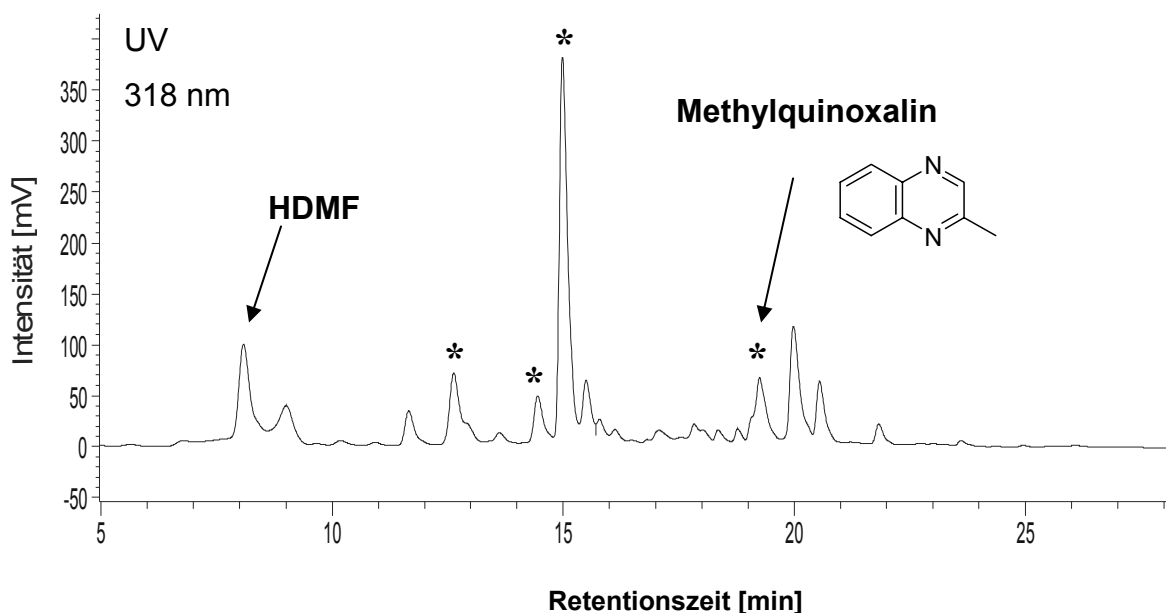


Abb. C-14: RP-HPLC Analyse mit DAD-Detektion des Dichlormethan-Extraktes eines Inkorporationsexperimentes ganzer reifer Erdbeerfrüchte mit *o*-Phenylendiamin. Verbindungen mit für Quinoxalinderivate charakteristischem UV-Spektrum sind mit * gekennzeichnet.

Anhand der charakteristischen UV-Spektren wurden im Extrakt mehrere Quinoxalinderivate nachgewiesen. Durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen entsprechender Referenzsubstanzen konnte die Verbindung Methylquinoxalin identifiziert werden.

Da die Extraktion mittels Dichlormethan keine Erfassung phosphorylierter Quinoxalinderivate zulässt, wurde ein zweiter Inkorporationsversuch mit *o*-Phenylendiamin an reifen Erdbeerfrüchten durchgeführt. Die Extraktion des wässrigen Überstandes nach Zentrifugation erfolgte mittels Festphasenadsorptionschromatographie an XAD-2 Polystyrolharz nach der von Beuerle und Mitarbeitern (1997) beschriebenen Methode. Die Methode ermöglicht eine schnelle, quantitative Abtrennung polarer Verbindungen (z.B. Proteine und Kohlenhydrate) aus dem wässrigen Erdbeerhomogenat. Die am Polystyrolharz adsorbieren verbleibenden Komponenten wurden anschließend durch Verwendung zweier Elutionsmittel unterschiedlicher Polarität in einen Aromaextrakt (Diethyletherextrakt) und einen sog. Glykosidextrakt (Methanolextrakt) aufgetrennt. Der so erhaltene Methanolextrakt ist zunächst mittels HPLC-DAD untersucht worden. Auch in diesem Fall konnten einige Quinoxalinderivate anhand ihrer charakteristischen UV-Spektren nachgewiesen werden.

Zur weiteren Untersuchung der Quinoxalinderivate wurden der Diethylether- und der Methanolextrakt mittels RP-HPLC anhand der Signale der UV-Spur bei 318 nm fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen sind anschließend mittels HPLC-MS näher untersucht worden. Die durchgeführte Fraktionierung mittels HPLC war jedoch nicht selektiv genug, um eine exakte Zuordnung der Signale in den Totalionenchromatogrammen der HPLC-MS-Analyse zu denen der UV-Spur bei 318 nm der DAD-Analyse zu ermöglichen. Die Konzentrationen der Quinoxalinderivate in den Extrakten waren unter den gewählten experimentellen Bedingungen zu gering. Zudem standen zum Zeitpunkt der Analyse auch keine entsprechenden Referenzsubstanzen zur Verfügung. Die Verbindungen konnten daher nicht eindeutig identifiziert werden.

Ein weiteres Experiment sollte die Beteiligung der nachgewiesenen Quinoxalinderivate bei der HDMF-Biosynthese klären. Dazu ist einer Erdbeerfrucht zusätzlich zu *o*-Phenylendiamin eine wässrige Lösung an [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat injiziert worden. In einem Kontrollversuch wurde auf die Injektion von *o*-Phenylendiamin verzichtet. Die Isolierung der Quinoxalinderivate erfolgte nach 6-stündiger Inkubation mittels Festphasenadsorptionschromatographie an XAD-2 Polystyrolharz. Die erhaltenen Methanolextrakte

wurden mittels RP18-HPLC fraktioniert und die Fraktionen (1 ml) mittels *offline* Flüssigszintillationsdetektion auf enthaltene Radioaktivität untersucht. Die Gegenüberstellung der Analysenergebnisse der Inkorporationsversuche mit und ohne *o*-Phenylendiamin-Zusatz zeigt eine sehr ähnliche Aktivitätsverteilung und lässt daher nicht auf die Bildung eines radioaktiv markierten Quinoxalinderivates schließen (Abb. C-15). Weitere Untersuchungen zur Identifizierung der mittels HPLC-DAD nachgewiesenen Quinoxalinderivate wurden daher nicht durchgeführt.

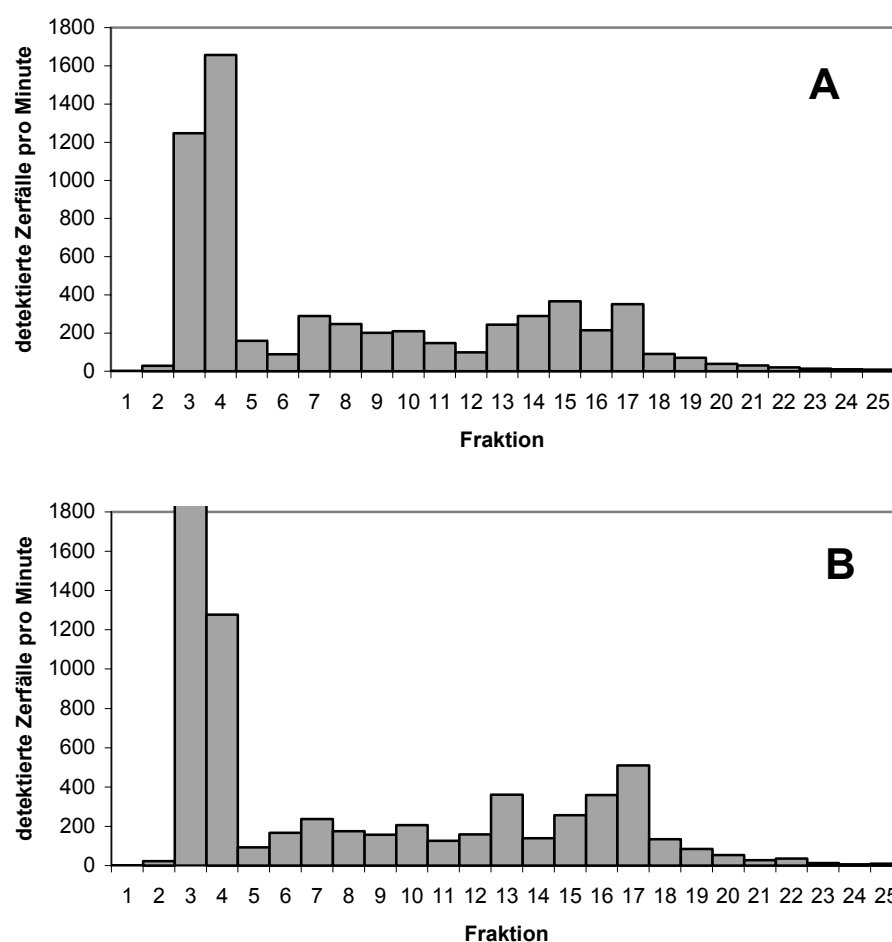


Abb. C-15: *Offline* Radiodetektion nach Fraktionierung des XAD-Methanolextraktes reifer Erdbeerfrüchte nach Inkorporation von

A [U- ^{14}C]-D-Fructose-1,6-diphosphat,

B [U- ^{14}C]- D-Fructose-1,6-diphosphat und *o*-Phenylendiamin.

1.4.3 Metabolismus von D-Fructose-1,6-diphosphat in Erdbeerproteinextrakt unter Zusatz von *o*-Phenylendiamin

Neben den Inkorporationsversuchen, die mit ganzen intakten Erdbeerfrüchten durchgeführt wurden, erfolgten auch Umsetzungsversuche mit Erdbeerproteinextrakt unter Zusatz von *o*-Phenylendiamin. Ein frisch hergestellter Rohextrakt ist dazu nach Zusatz von D-Fructose-1,6-diphosphat sowie *o*-Phenylendiamin über Nacht inkubiert worden. Als Kontrolle diente ein analoger hergestellter Inkubationsansatz unter Verwendung eines zuvor hitzebehandelten Extraktes. Erneut erfolgte die Untersuchung der Produkte mittels HPLC-DAD. In Abbildung C-16 sind die UV-Signale der HPLC-Analyse bei 318 nm der Extrakte mit unbehandelten und hitzebehandelten Proteinen gegenüber gestellt.

Deutlich ist der große Intensitätsunterschied der Signale mit den Retentionszeiten von 17.9 sowie 19.3 Minuten zu erkennen. Die entsprechenden Verbindungen konnten anhand von Referenzverbindungen als Glyoxal- sowie Methylquinoxalin identifiziert werden. Der sich daraus ableitende erhöhte Gehalt an Methylglyoxal im unbehandelten Extrakt kann auf die Präsenz einer Aldolase-Aktivität in Erdbeeren zurückzuführen sein. So beschreiben Phillips und Thornalley (1993) die Bildung von Methylglyoxal aus Dihydroxyacetonphosphat infolge einer β -Eliminierung von anorganischem Phosphat. Im Hinblick auf mögliche Intermediate der HDMF-Biogenese ergaben sich jedoch keine neuen Erkenntnisse.

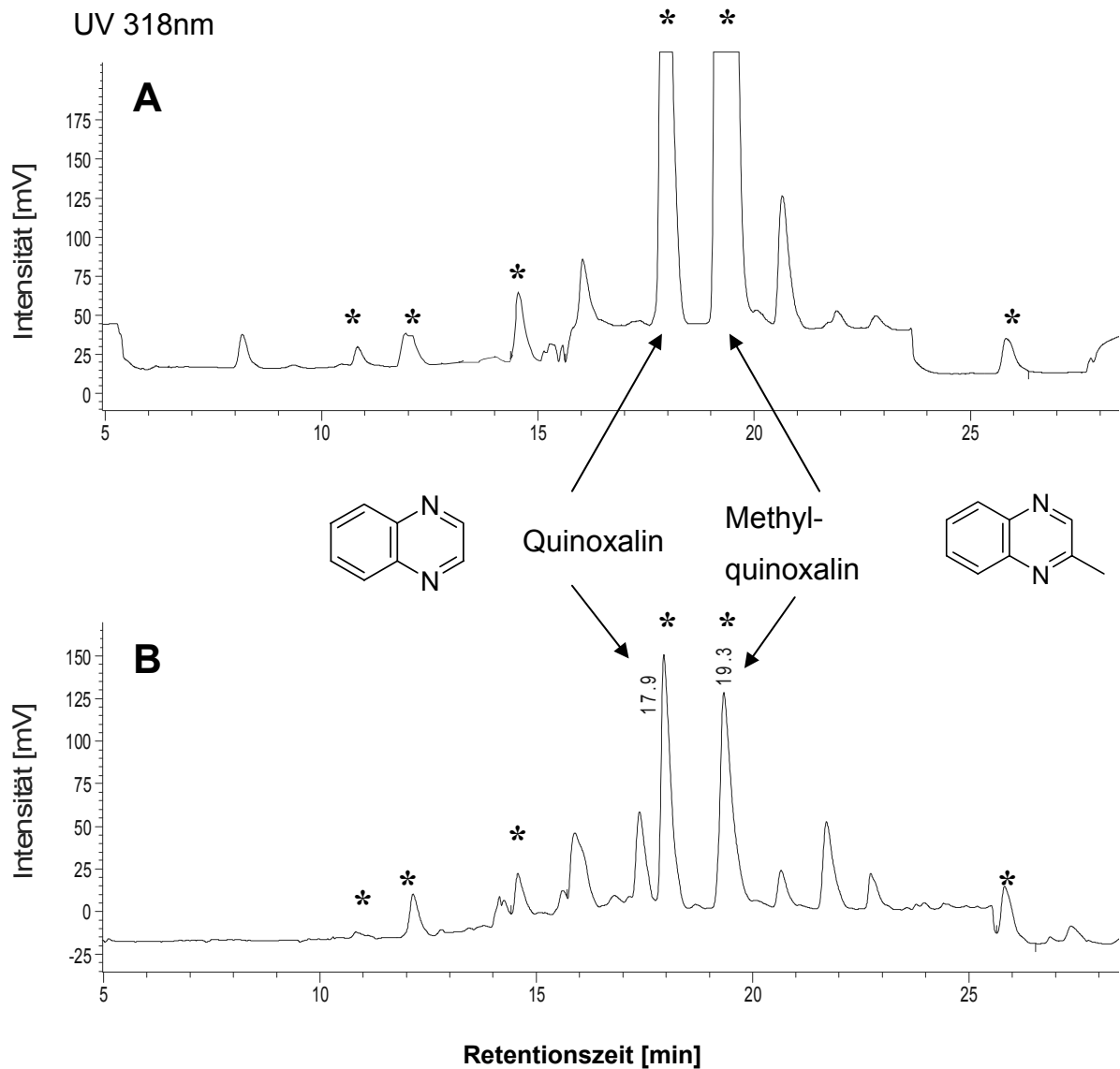


Abb. C-16: RP-HPLC-DAD-Analyse eines unbehandelten und eines hitzebehandelten Erdbeerproteinextraktes nach Applikation von D-Fructose-1,6-diphosphat und *o*-Phenylendiamin.

A UV-Chromatogramm (318 nm) des unbehandelten Extraktes;

B UV-Chromatogramm (318 nm) des hitzebehandelten Extraktes.

Verbindungen mit für Quinoxalinderivate charakteristischem UV-Spektrum sind mit * gekennzeichnet.

1.5 Diskussion

In einer Reihe von Inkorporationsexperimenten mit reifen, ganzen Erdbeerfrüchten sowie in Inkubationsstudien mit Erdbeerproteinextrakten wurden radioaktiv und stabil markierte Zucker und Zuckerphosphate eingesetzt, um mögliche Intermediate der HDMF-Biogenese zu identifizieren. Während in den Umsetzungsversuchen mit radioaktiv markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat die Sensitivität der angewandten Analysemethoden (Radio-HPLC, Radio-DC, Radio-GC) unter Berücksichtigung der eingesetzten Gesamtaktivität zum Aufspüren solcher Verbindungen zu gering schien, lieferte auch die GC-AED-Analytik bei den Experimenten mit [U-¹³C]-D-Fructose keinen Hinweis auf die Anwesenheit eines möglichen Intermediates. Eine Erklärung hierfür könnte in der hohen Reaktivität der Intermediate im Biogeneseverlauf zu suchen sein. Das Auftreten reaktiver α -Dicarbonylverbindungen schien in Anlehnung an den bekannten Reaktionsmechanismus für die Bildung von HDMF im Zuge der Maillard-Reaktion durchaus plausibel. Es wurden daher Inkorporations- sowie Inkubationsexperimente unter Zusatz von *o*-Phenylendiamin durchgeführt, um in einer Abfangreaktion reaktive α -Dicarbonylverbindungen in die entsprechenden Quinoxalinderivate zu überführen. Zwar konnten einige gebildete Quinoxalinderivate aufgrund ihrer charakteristischen UV-Spektren nachgewiesen werden, die Identifizierung mittels HPLC-MS war jedoch vor allem aufgrund des Fehlens von Referenzverbindungen nicht möglich. Da außerdem nach Coinjektion von *o*-Phenylendiamin und [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat die Bildung einer radioaktiv markierten Dicarbonylverbindung nicht beobachtet wurde führten wir die Suche nach Intermediaten der Metabolisierung von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF nicht weiter fort sondern verfolgten einen anderen Weg zur Aufklärung der Biosynthese (C 3).

Zwischenzeitlich gelang Hauck (2003) in seinen Untersuchungen zur Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch die Hefe *Zygosaccharomyces rouxii* der Nachweis und die Identifizierung einer intermediären α -Dicarbonylverbindung. Als Abfangreagenz wurde ebenfalls *o*-Phenylendiamin eingesetzt. Das mittels HPLC-MS/MS sowie NMR identifizierte Quinoxalinderivat (Q), sowie die daraus abgeleitete α -Dicarbonylverbindung, das 1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (D) sind in Abb. C-17 dargestellt. Die Verbin-

dung entsteht durch eine β -Eliminierung der Phosphatgruppe am C-1 von D-Fructose-1,6-diphosphat infolge einer initiierenden 2,3-Enolisierung. Dabei vermutet Hauck (2003), dass die Bildung von HDMF durch *Z. rouxii* Folge einer Kombination aus der chemischen Bildung von D im Nährmedium und enzymatischen Reaktionen, vermittelt durch Enzyme der Hefe ist.

Infolge dieser neuen Erkenntnisse führte Klein (Daten nicht veröffentlicht) abermals Inkorporationsversuche an Erdbeerfrüchten mit *o*-Phenylendiamin durch, konnte D jedoch nicht nachweisen. Eine Beteiligung von D an der Biosynthese von HDMF in Erdbeeren scheint daher wenig wahrscheinlich.

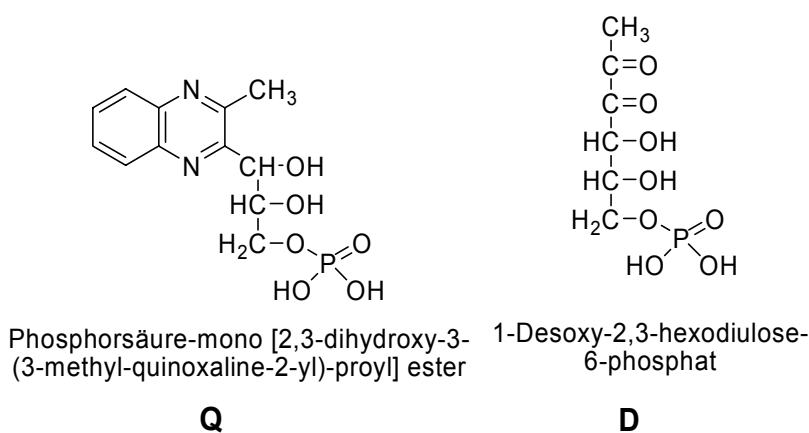


Abb. C-17: Struktur des von Hauck (2003) identifizierten Quinoxalinderivates Q und der daraus abgeleiteten entsprechenden α -Dicarbonylstruktur D.

2 Nachweis D-Fructose-1,6-diphosphat abbauender enzymatischer Aktivitäten der Erdbeerfrucht

2.1 Charakterisierung von Aldolase-Aktivität in reifenden Erdbeerfrüchten

Informationen über enzymatische Aktivitäten der Erdbeerfrucht, die in der Lage sind D-Fructose-1,6-diphosphat, den Vorläufer mit der höchsten ermittelten Einbaurrate in die HDMF-Struktur, als Substrat zu akzeptieren, sind für eine Untersuchung der HDMF-Biogenese generell von Interesse. Zum einen können diese enzymatischen Aktivitäten an der Biosynthese von HDMF beteiligt sein, zum anderen ermöglicht die Kenntnis D-Fructose-1,6-diphosphat abbauender Enzyme die spätere Manipulation des D-Fructose-1,6-diphosphat-Pools und damit der Konzentration an HDMF. Die Ergebnisse der unter C 1.2, C 1.3 sowie C 1.4 vorgestellten Experimente implizieren die Präsenz einer Aldolase-Aktivität in reifen Erdbeerfrüchten. So konnte in den Inkorporationsversuchen mit [U-¹³C]-D-Fructose die Entstehung von ¹³C-markiertem Dihydroxyacetonphosphat oder Glycerinaldehyd-3-phosphat anhand der Detektion des entsprechenden markierten Alditolacetates (Glycerintriacetat) mittels GC-AED und GC-MS nachgewiesen werden. Nach Umsetzung von [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat mit Erdbeerproteinextrakt wurde radioaktiv markiertes Dihydroxyacetonphosphat detektiert. Die Inkubation von dialysiertem Erdbeerproteinextrakt mit D-Fructose-1,6-diphosphat unter Zusatz von *o*-Phenylendiamin führte zur Bildung von Methylquinoxalin, was die Bildung von Methylglyoxal aus Dihydroxyacetonphosphat impliziert (Phillips und Thornalley, 1993). Die Aldolase Aktivität in Erdbeerfrüchten sollte daher isoliert und charakterisiert werden.

2.1.1 Klassifizierung von Aldolasen

Grundsätzlich werden zwei Arten von Aldolasen unterschieden. Klasse I Aldolasen kommen in Tieren (Rutter, 1964; Marsh und Lebherz, 1992), höheren Pflanzen (Rutter, 1964; Schnarrenberger und Mitarbeiter, 1990) sowie Farnen, Moosen und einigen eukaryotischen Algen (Schnarrenberger und Mitarbeiter, 1994) vor. Klasse II Aldolasen hingegen findet

man in primitiveren Organismen wie Hefen, Pilzen und Bakterien (Rutter, 1964; Schwelberger und Mitarbeiter, 1989). Beide Klassen lassen sich durch charakteristische Merkmale voneinander unterscheiden. So sind Klasse II Aldolasen gekennzeichnet durch ihre Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen und werden entsprechend durch Zusatz von EDTA inhibiert, während diese Verbindung keinen Einfluss auf die Reaktivität von Klasse I Aldolasen ausübt. Des Weiteren besitzen Klasse I Aldolasen homotetramere Struktur mit einem nativen Molekulargewicht von ca. 160 kDa. Klasse II Aldolasen hingegen sind Dimere mit einem nativen Molekulargewicht von ca. 75 kDa.

2.1.2 Bestimmung der Aldolase-Aktivität

Die Bestimmung der Aldolase-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines optischen Tests, basierend auf einer gekoppelten enzymatischen Reaktion unter Zusatz von Triosephosphatisomerase und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (Abb. C-18). Der Verlauf der Reaktion wurde anhand des Verbrauches von NADH bei 340 nm beobachtet.

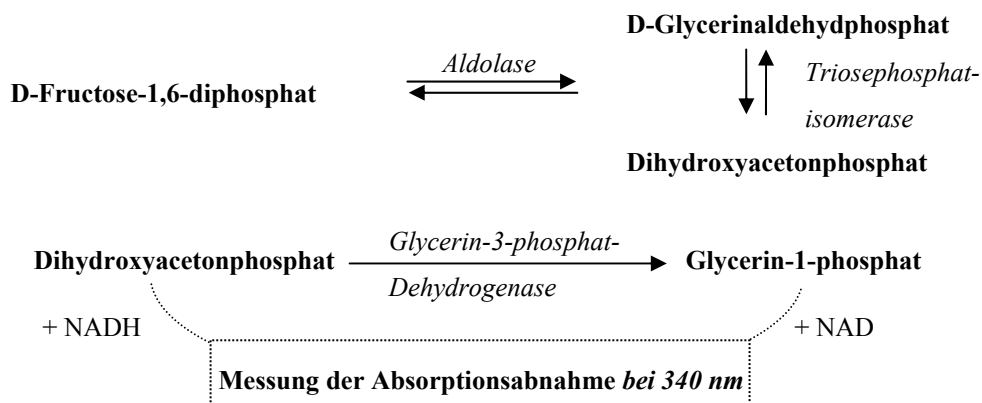


Abb. C-18: Gekoppelte enzymatische Reaktion zur Aktivitätsbestimmung der Aldolase.

2.1.3 Grundlegende Aufreinigung der Aldolase-Aktivität reifender Erdbeerfrüchte

Proteinrohextrakte wurden aus roten Erdbeerfrüchten (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa oder Elsanta) gewonnen. Enthaltene Pektin konnte durch Zusatz von bis zu 20% Ammoniumsulfat ausgefällt werden. Dies verhinderte eine Gelbildung während der weiteren Aufarbeitung. Nach Zentrifugation wurde der Überstand gegen einen 0.02 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.7) dialysiert bis die Leitfähigkeit auf einen Wert unter 1.5 mS gesunken war. Der auf diese Weise erhaltene Proteinextrakt aus Erdbeerfrüchten der Sorte Camarossa zeigte im Vergleich zu den Extrakten der Sorte Elsanta eine etwa halb so hohe Aktivität. Die weitere Aufreinigung des Extraktes erfolgte mit Hilfe einer DEAE-Cellulose Säule. Durch Elution der Proteine mittels eines linearen Gradienten von 0 bis 0.4 M KCl wurden zwei Aldolase-Isoenzyme erhalten. Ein ähnliches Elutionsverhalten ist bereits bei der Auftrennung plastidischer und cytosolischer Aldolasen beobachtet worden (Nishimura und Beevers, 1981; Lebherz und Mitarbeiter, 1984; Krueger und Schnarrenberger, 1985; Botha und O'Kennedy, 1989; Moorhead und Mitarbeiter, 1994). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und beide Isoenzyme separat mittels Gelpermeationschromatographie (Sephacryl S300) untersucht. Die Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Aldolase erfolgte mittels Sephacryl S300 Säule, welche zuvor mit einer Proteinstandard-Mischung bestehend aus Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa) und Rinderserumalbumin (67 kDa) kalibriert worden war. Zusätzlich wurde das Totvolumen mit Dextranblau sowie das Bettvolumen mit Aceton ermittelt. Die nativen Molekulargewichte der Aldolase-Isoenzyme konnten mit je 160 kDa bestimmt werden. Damit war die Zugehörigkeit beider Isoenzyme zu den Klasse I Aldolasen bestätigt (Krueger und Schnarrenberger, 1983). Tabelle 1 zeigt das für die Erdbeer-Aldolasen erarbeitete Aufreinigungsprotokoll. Erdbeeren enthalten einen hohen Anteil an Wasser und nur geringe Mengen an Protein. Die spezifischen katalytischen Aktivitäten der beiden Isoenzyme wurden zu 0.036 bzw. 0.034 U*mg⁻¹ bestimmt und sind damit im Vergleich mit den Aktivitäten einer aufgereinigten Aldolase recht gering (Hodgson und Plaxton, 1998). Dies impliziert eine unvollständige Aufreinigung der Isoenzyme aufgrund noch enthaltener zusätzli-

cher Proteine. Auf weitere Aufreinigungsschritte wurde allerdings aufgrund der geringen Proteingehalte verzichtet.

Tabelle 1. Aufreinigungsprotokoll für die Erdbeer-Aldolase Isoenzyme

Probe	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U*mg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Reinigungs- Faktor
Rohextrakt	100	443.2	0.85	0.0019	100	1
Dialysate	110	97.5	0.62	0.0063	73	3
DEAE Cel- lulose	cytosolisch: 28 plastidisch: 32	8.0 4.5	0.10 0.03	0.0125 0.0066	12 4	7 4
Sephacryl	cytosolisch: 23	0.54	0.0192	0.036	2.2	19
S300	plastidisch: 20	0.21	0.0072	0.034	0.8	18

2.1.4 Charakterisierung der aus reifenden Erdbeeren isolierten Aldolase Isoenzyme

Die partiell aufgereinigten Isoenzyme wurden mit Hilfe einer denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) näher charakterisiert. Das Auftreten mehrerer Proteinbanden bei der SDS-PAGE-Analyse verdeutlichte die unvollständige Homogenität der aufgereinigten Isoenzyme. Dennoch war eine Differenzierung der beiden Isoenzyme anhand des Auftretens einer Bande mit 40 kDa und einer zweiten mit 38 kDa in cytosolische bzw. plastidische Aldolase möglich (Lebherz und Mitarbeiter, 1984). Diese Banden konnten durch Co-Elektrophorese einer Mischung der beiden Enzyme problemlos differenziert werden. Aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens bei der Anionenaustauscherchromatographie mit DEAE-Cellulose, ihres nativen Molekulargewichtes

und der Molekulargewichte ihrer Untereinheiten konnten die beiden Isoenzyme schließlich als cytosolische und plastidische Aldolase identifiziert werden.

Die cytosolische Aldolase zeigte ein ziemlich breites pH-Maximum von pH 7.5 bis 8.5. Für die plastidische Aldolase wurde hingegen ein scharfes Maximum bei pH 8.0 beobachtet. Daneben ist auch der Einfluss einer 1 mM $MgCl_2$ bzw. einer 1 mM EDTA Konzentration auf die Aktivität der Aldolase untersucht worden. Ein Einfluss auf die Aktivität konnte jedoch weder für $MgCl_2$ noch für EDTA beobachtet werden. Dieses Ergebnis war für die beiden Vertreter der Klasse I Aldolasen zu erwarten (Gross und Mitarbeiter, 1994; Pelzer-Reith und Mitarbeiter, 1994).

Die Variation der D-Fructose-1,6-diphosphat-Konzentration resultierte in für enzymatische Einsubstratreaktionen typischen Michaelis-Menten Kinetiken. In Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten von Klasse I Aldolasen (Pelzer-Reith und Mitarbeiter, 1994) wurde für die cytosolische Aldolase ein K_m von 35 μM , für die plastidische von 40 μM bestimmt.

2.1.5 Verlauf der Aldolase-Aktivität während der Erdbeerfrucht-Reifung

Zur Abschätzung der prozentualen Anteile von cytosolischer und plastidischer Aldolase an der Gesamtaktivität im Verlauf der Fruchtreifung wurden die Isoenzyme verschiedener Reifestadien mittels Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose voneinander getrennt und die Aktivitäten bestimmt. Es sind zu jedem Reifestadium zwei Aufreinigungen durchgeführt worden. Abbildung C-19 zeigt repräsentativ die Analysendaten von roten und grünen Erdbeerfrüchten. Die enzymatische Aktivität bei niedrigen KCl-Konzentrationen ist dabei dem cytosolischen, das bei hohen KCl-Konzentrationen dem plastidischen Isoenzym zuzuordnen (Krueger und Schnarrenberger, 1983; 1985).

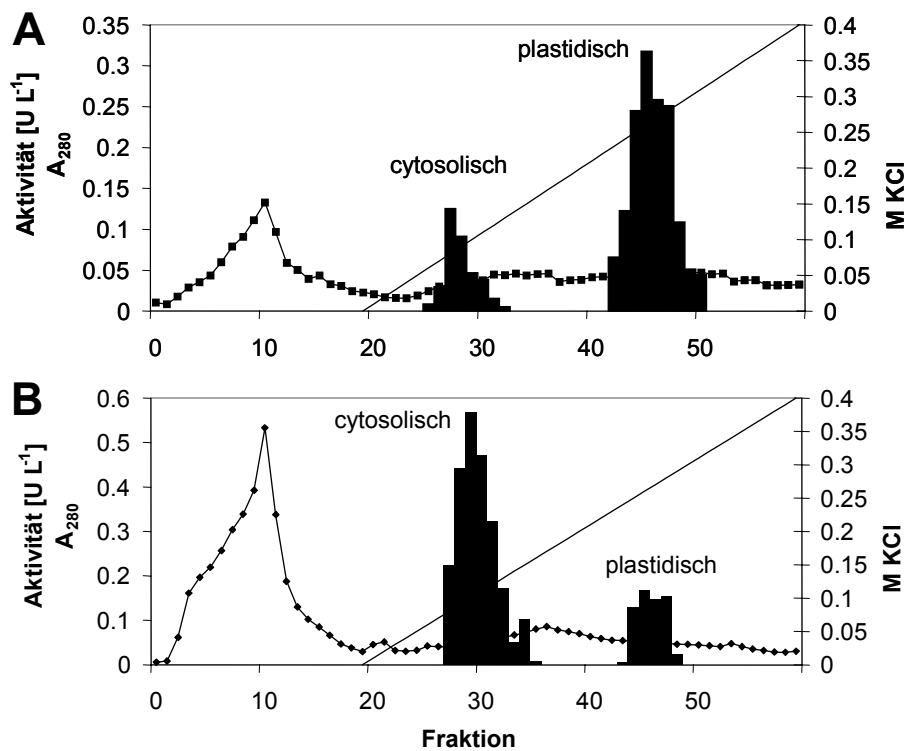


Abb. C-19: Chromatographische Trennung an DEAE-Cellulose der Aldolase-Isoenzyme erhalten aus grünen (A) und roten Erdbeerfrüchten (B).

Die Ergebnisse der Studie sind in Abbildung C-20 zusammengefasst. Während die Aktivität des cytosolischen Isoenzym nur etwa 8 bzw. 15 % an der gesamten Aldolase-Aktivität von grünen und weißen Früchten ausmacht, steigt der Anteil im Verlauf der Reifung auf Werte von 50 bzw. 75 % für „pinke“ und rote Erdbeeren. Die Aldolase-Gesamtaktivität bezogen auf das Erdbeerfrischgewicht steigt im Verlauf der Reifung an. Allerdings war der Proteingehalt der Extrakte von grünen Früchten nur etwa halb so groß wie die Gehalte der Extrakte von weißen, „pinken“ und roten Erdbeeren. Bezogen auf den Proteingehalt resultierte daher zunächst eine Abnahme der Aktivität vom grünen bis zum „pinken“ Reifestadium gefolgt vom erneuten Anstieg der Aktivität im weiteren Verlauf der Reifung.

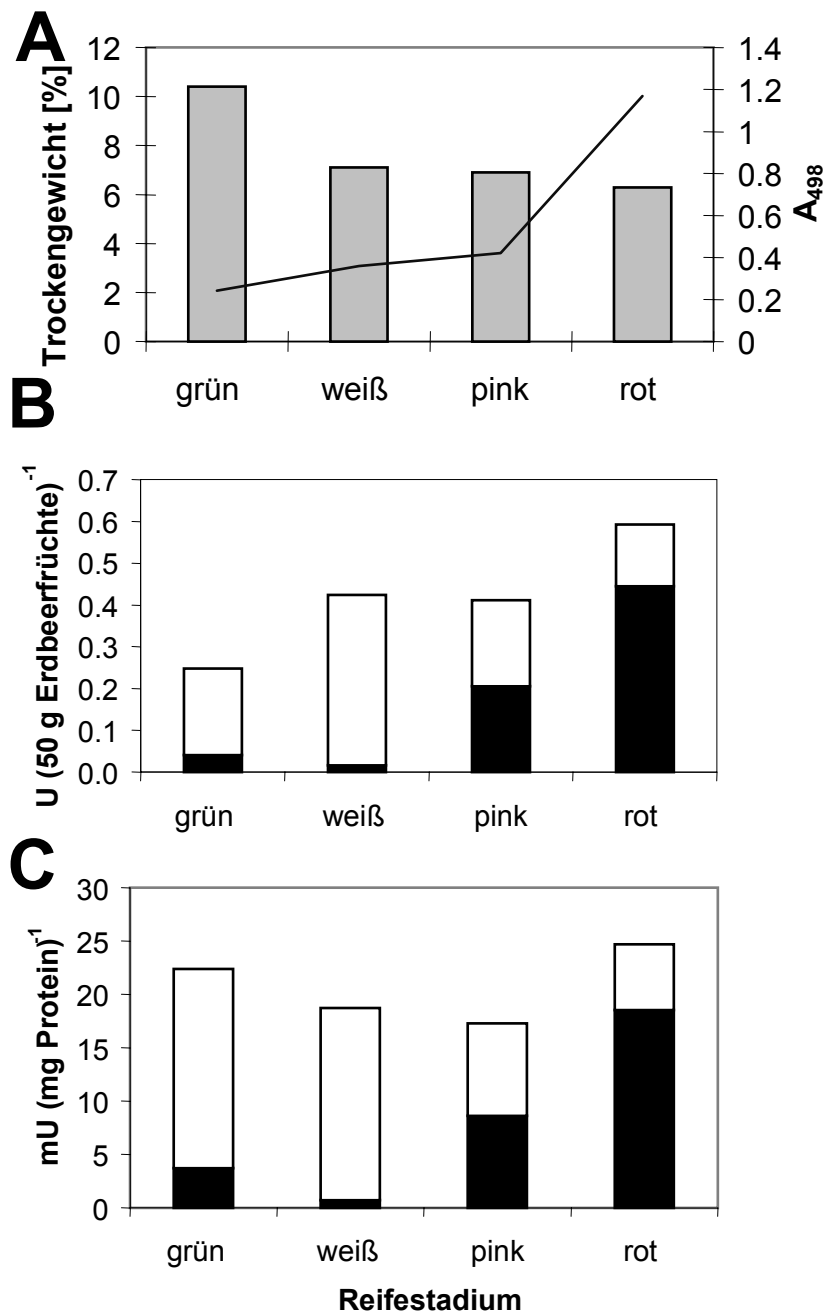


Abb. C-20: A Trockengewicht (Balken) sowie Entwicklung der Anthocyane (A_{498}) (Linie) im Verlauf der Erdbeer-Fruchtreifung.

B Verteilung der cytosolischen (schwarze Balken) und plastidischen Aldolase (weiße Balken) während der Entwicklung der Frucht bezogen auf das Erdbeer-Frischgewicht,

C wie B jedoch bezogen auf den Proteingehalt.

2.1.6 Hitzestabilität und Wiederfindung der Aktivität nach Behandlung mit Säure

Die Hitzestabilität und Wiederfindung der Aktivität nach Behandlung mit Säure wurde anhand des Rohextraktes von grünen (85 % plastidische Aldolase) und roten Erdbeeren (75 % cytosolische Aldolase) untersucht. Das cytosolische Isoenzym zeigte relativ große Beständigkeit gegenüber längerer Temperatureinwirkung von 50°C. So wurden nach 30 min etwa 74 % der enzymatischen Aktivität wieder gefunden. Die plastidische Aldolase war hingegen hitzesensitiver. So führte die Inkubation bei 50°C für 30 min zu einem Verlust an Aktivität von 40 %. Ein weiterer Unterschied der cytosolischen und plastidischen Aldolase-Isoenzyme aus Spinatblättern besteht in ihrer Fähigkeit nach einer kurzzeitigen Behandlung bei einem pH-Wert von 2.3 katalytische Aktivität wiederzuerlangen. Für die Erdbeerenzyme konnten infolge einer 10 minütigen Inkubation bei pH 2.3 nach erneuter Einstellung des pH-Wertes auf 8.0 für das cytosolische Isoenzym 82 %, für die plastidische Form aber nur 62 % der ursprünglichen enzymatischen Aktivität wieder gefunden werden.

2.1.7 Klonierung und Sequenzanalyse des Gens der cytosolischen Aldolase der Erdbeere

Aharoni und Mitarbeiter (2000) berichteten über die teilweise Sequenzierung von etwa 1100 cDNA Klonen, die willkürlich einer cDNA Bibliothek von reifen Erdbeeren entnommen worden waren. Die Suche nach Sequenzidentitäten mit Hilfe des BLAST Programms (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) führte zur Identifizierung zweier ähnlicher cDNAs, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für die cytosolische Erdbeer-Aldolase (SCA1) codieren. Die Sequenzierung einer der cDNAs (1409 Basenpaare) ergab einen offenen Leserahmen, der ein Protein mit 358 Aminosäureresten und einem daraus resultierenden errechneten Gesamtgewicht von 38.5 kDa codiert. Da Aldolasen hochgradig glykosilierte Enzyme darstellen, könnte der geringe Unterschied zwischen dem Molekulargewicht des nativen Enzyms und dem des aus dem cDNA Klon übersetzten Proteins durch Kohlenhydrateinheiten erklärt werden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von SCA1 zeigte eine 85 prozentige Identität mit den cytosolischen Aldolasen aus Kristall-Mittagsblume (*Mesembryanthemum crystallinum*; Acc. T12416), Reis (*Oryza sativa*; Acc. S65072) und Kichererbse

(*Cicer arietinum*; Acc. O65735). Die Identität mit pflanzlichen plastidischen Aldolasen (Erbse, Acc. Q01516; Reis, Acc. BAA02730; Spinat, Acc. CAA47293) ist hingegen mit Werten zwischen 48 und 56 % deutlich geringer. Des Weiteren besitzt das SCA1 Protein innerhalb seines *N*-Terminus kein für die plastidischen Aldolasen aus Pflanzen charakteristisches Transitpeptid (Pelzer-Reith und Mitarbeiter, 1993). Offensichtlich handelt es sich somit um die cytosolische Form der Erdbeer-Aldolase.

2.1.8 Nachweis der Induktion der SCA1-Expression im reifenden Blütenboden durch Mikroarray-Technik und RNA-Blot Analyse

Studien mit Genexpressions-Arrays, die 1701 Erdbeer-cDNAs umfassten, lieferten Aharoni und Mitarbeitern (2000) quantitative Daten zur SCA1-Expression in Erdbeeren. Die Analyse der Genexpression in vier aufeinander folgenden Stadien der Fruchtentwicklung (grün, weiß, pink und rot) zeigte einen 3-fachen Anstieg der SCA1-Expression vom grünen hin zum roten Reifestadium. In einem weiteren Mikroarray-Experiment wurde die Expression von SCA1 in verschiedenen Fruchtgeweben untersucht. Es wurde eine 4.5-fach stärkere Expression von SCA1 im Blütenboden festgestellt, verglichen mit der Expression in den Nüsschen (Aharoni und Mitarbeiter, nicht veröffentlichte Daten 2000). Der Anstieg der SCA1-Expression während der Fruchtentwicklung und -reifung wurde durch eine RNA-Blot Analyse bestätigt (Abb. C-21).

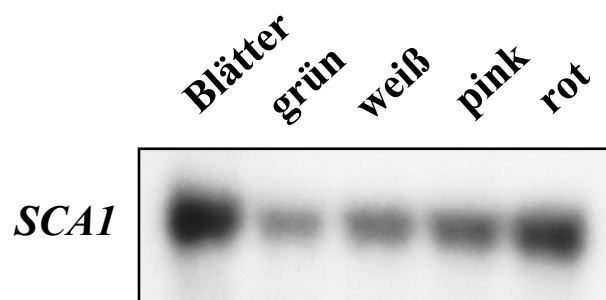


Abb. C-21: Genexpression von SCA1 in Erdbeeren. RNA Gel Blot der Gesamt-RNA isoliert aus Blättern sowie grünen, weißen, pinken und roten Früchten. Der Blot wurde mit der SCA1 cDNA hybridisiert.

2.1.9 Diskussion

Ein Erdbeerproteinextrakt wurde über Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose getrennt. Dabei konnten zwei Aldolase-Isoenzyme in reifenden Erdbeerfrüchten nachgewiesen werden. Für die Charakterisierung der Isoenzyme wurden deren Elutionsreihenfolge bei der Ionenaustauschchromatographie, Molekulargewicht, Molekulargewicht der Untereinheiten, pH Optimum, Km-Wert, Abhängigkeit von Mg^{2+} , Hitzestabilität sowie Regeneration nach Behandlung mit Säure herangezogen. Anhand ihrer Eigenschaften konnten die Isoenzyme eindeutig den cytosolischen bzw. plastidischen Aldolasen zugeordnet werden.

Während die Aldolase-Gesamtaktivität im Verlauf der Reifung zuerst abnimmt, um anschließend wieder anzusteigen, änderte sich das Verhältnis der beiden Isoenzyme in signifikanter Weise (Abb. C-20). In grünen und weißen Erdbeeren macht die cytosolische Aldolase einen Anteil von 15 bzw. 8 % an der Gesamtaktivität aus. Diese Werte stehen im Einklang mit veröffentlichten Verteilungen der Isoenzyme in grünen Blättern von Spinat, Mais, Weizen und Gerste (Lebherz und Mitarbeiter, 1984; Krueger und Schnarrenberger, 1985; Boldt und Mitarbeiter, 1994). In „pinken“ und roten Früchten ist ein dramatischer Anstieg des Anteils an cytosolischer Aldolase auf Werte von 50 bzw. 75 % zu beobachten, was eine Funktion innerhalb der Fruchtreifung impliziert. Offensichtlich wird während des gesamten Reifeprozesses kontinuierlich cytosolische Aldolase exprimiert. Im Gegensatz dazu wird die plastidische Aldolase stetig abgebaut.

Während der Reifung der Erdbeere geht die Zellvergrößerung mit massiven Veränderungen der Zellwand und der subzellularen Struktur einher. Zum Zeitpunkt des Abfallens der Blütenblätter sind in den Plastiden, dem Golgi-Apparat und den Ribosomen reichlich Stärkekörner vorhanden (Knee und Mitarbeiter, 1977). Im Verlaufe ihrer Entwicklung verlieren die Plastiden ihre Stärkekörner und werden in der reifen Frucht möglicherweise ganz abgebaut. Diese Beobachtung vermag die Abnahme der enzymatischen Aktivität der plastidischen Aldolase zu erklären, wie sie in dieser Arbeit verdeutlicht werden konnte. Obgleich die Veränderungen in den Plastiden als charakteristisch für den Alterungsprozess angesehen werden könnten, verbleiben die Mitochondrien in der reifen Frucht dennoch unverändert (Manning, 1998). Diese Ergebnisse sprechen zusammen mit dem beobachte-

ten Anstieg der enzymatischen Aktivität von cytosolischer Aldolase während der Reifung für den gesteigerten Abbau von Kohlenhydraten eher über die Glykolyse, als über den oxidativen Pentosephosphatweg.

Des Weiteren wurde eine cDNA kloniert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für die cytosolische Form der Aldolase aus Erdbeerfrüchten codiert (SCA1). Expressions-Analysen unter Verwendung der Mikroarray-Technik sowie mit Hilfe von RNA-Blots verdeutlichten den signifikanten Anstieg des SCA1 mRNA-Gehaltes während der Reifung. Untermauert wird dieses Ergebnis durch den mit Hilfe des teilweise aufgereinigten Proteins nachgewiesenen Anstieg der Aktivität der cytosolischen Aldolase während der Reifung. Die Expression von SCA1 lässt deren Beteiligung bei wichtigen Reaktionen im reifenden Fruchtboden vermuten.

Deutliche Anstiege der mRNA und des Proteingehaltes von Aldolase sind häufig im Zusammenhang mit verschiedenen Stresssituationen zu sehen. Dazu zählen anaerobe Bedingungen (Andrews und Mitarbeiter, 1994), Trockenheit und hoher Salzgehalt (Minhas und Grover, 1999). Diese Stressbedingungen führen neben der Induktion der Aldolase zusätzlich zur Induktion weiterer glykolytischer (z.B. Enolase und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und anderer Enzyme, die bei der alkoholischen Gärung eine Rolle spielen (z.B. Alkohol-Dehydrogenase und Pyruvatdecarboxylase). Minhas und Grover (1999) vermuteten, dass die glykolytischen und fermentativen Enzyme einen gewissen Grad an Flexibilität haben, der sie befähigt, sich an erhöhten Energiebedarf anzupassen und zudem Zwischenverbindungen während Stresssituationen zu liefern. Auch während der Reifung der Erdbeerfrucht durchläuft der Blütenboden verschiedene Stressbedingungen, die in einer Induktion von glykolytischen und fermentativen Enzymen, wie z.B. der Aldolase und der Pyruvatdecarboxylase, resultieren könnten. Die Expression des zuletzt genannten Enzyms zeigte eine der Aldolase vergleichbare Induktion während der Reifung der Erdbeerfrucht (Aharoni und Mitarbeiter, 2000).

2.2 Nachweis weiterer reifeinduzierter Enzyme der Erdbeerfrucht

Neben der Aldolase-Aktivität ist ein Erdbeerproteinextrakt, der entsprechend Abschnitt C 2.1 gewonnen wurde mit Hilfe spezifischer photometrischer Nachweismethoden auch auf die Präsenz weiterer Zucker-abbauender Enzyme untersucht worden. Die Veränderung der Aktivitäten der nachgewiesenen Enzyme wurde im Verlauf der Reifung verfolgt. Die Auftrennung der einzelnen Aktivitäten in ihre Isoenzyme durch Ionenaustauschchromatographie, wie bereits für die Aldolase vorgestellt, bereitete jedoch einige Schwierigkeiten, nicht zuletzt aufgrund des zur Zeit der Untersuchungen zur Verfügung stehenden inhomogenen Untersuchungsmaterials. Dennoch konnte die Auftrennung für zwei der vier nachgewiesenen Aktivitäten realisiert werden.

2.2.1 Phosphohexose-Isomerase

Das Enzym Phosphohexose-Isomerase katalysiert die Umwandlung von D-Fructose-6-phosphat in D-Glucose-6-phosphat. Auf die Beteiligung der Phosphohexose-Isomerase an der Transformation von D-Glucose in HDMF wurde bereits unter Abschnitt B-4.4.1 hingewiesen. Der Nachweis der Phosphohexose-Isomerase erfolgte über eine gekoppelte Enzymreaktion des D-Glucose-6-phosphates zum 6-Phosphogluconolacton, die durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase katalysiert wird. Dabei wird NADP zu NADPH reduziert. Die resultierende Extinktionszunahme bei 340 nm wurde mittels UV-Photometer gemessen. Extrakte, die aus Erdbeerfrüchten dreier verschiedener Reifegrade gewonnen wurden, sind auf ihre Phosphohexose-Isomerase-Aktivitäten untersucht worden. Die ermittelten Volumenaktivitäten der Proteinextrakte zeigt Abbildung C-22. Die Aktivitäten der Extrakte aus grünen und weißen Früchten erreichten etwa 61 % bzw. 89 % der Aktivität der Extrakte gewonnen aus roten Früchten. Der hohe Pektingehalt, der bei der Extraktgewinnung verwendeten Erdbeeren verhinderte allerdings eine exakte Bestimmung des jeweiligen Proteingehaltes. Die ermittelten Aktivitäten konnten daher nicht in Bezug auf die entsprechende Menge an extrahiertem Protein betrachtet werden. Ein Vergleich mit den Aktivitäten der Aldolase, dargestellt in Abb. C-20 B und C, legt jedoch die Schlussfol-

gerung nahe, dass die relativ geringen Unterschiede der Volumenaktivitäten auf eine ineffektivere Proteinextraktion bei der Gewinnung der Extrakte aus weißen vor allem aber aus grünen Erdbeerfrüchten zurückzuführen sind. Die Gesamtaktivität an Phosphohexose-Isomerase scheint daher vom Reifegrad der Erdbeerfrüchte unabhängig zu sein.

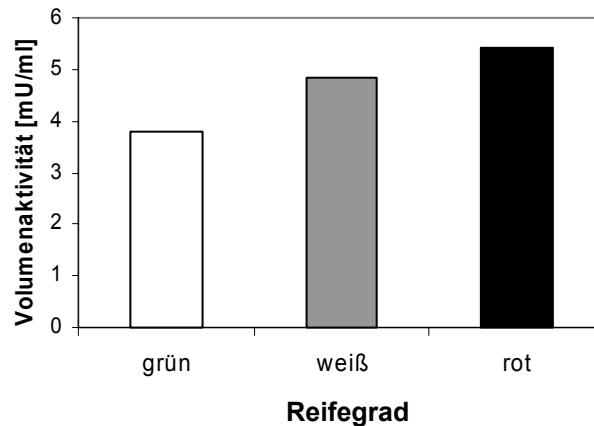


Abb. C-22: Entwicklung der Aktivität der Phosphohexose-Isomerase während der Erdbeerfruchtreifung, dargestellt in Form der Volumenaktivitäten von Proteinextrakten aus Früchten verschiedener Reifegrade.

2.2.2 Fructosediphosphatase

Das Enzym Fructosediphosphatase katalysiert die Umwandlung von D-Fructose-1,6-diphosphat zu D-Fructose-6-phosphat durch Dephosphorylierung am C1 des D-Fructose-1,6-diphosphatmoleküls.

Nachweisbar ist dieses Enzym durch Zugabe zweier Hilfsenzyme, Phosphohexose-Isomerase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Die Bildung von NADPH während der Transformation von D-Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphogluconolacton kann photometrisch verfolgt werden.

Die ermittelten Volumenaktivitäten der Proteinextrakte, die aus Erdbeerfrüchten dreier verschiedener Reifegrade isoliert wurden, sind in Abbildung C-23 dargestellt. Offensichtlich wird das Enzym Fructosediphosphatase erst im Verlauf der Fruchtreifung gebildet. Während im Extrakt aus grünen Erdbeeren eine Fructosediphosphatase-Aktivität kaum nachweisbar war, steigt sie mit zunehmender Reife deutlich an. Zwar muss auch in diesem Fall die ineffektivere Proteinextraktion bei der Gewinnung der Extrakte aus weißen und

grünen Erdbeerfrüchten berücksichtigt werden, eine Erklärung für den deutlichen Anstieg der Fructosediphosphatase-Aktivität kann sie jedoch nicht liefern.

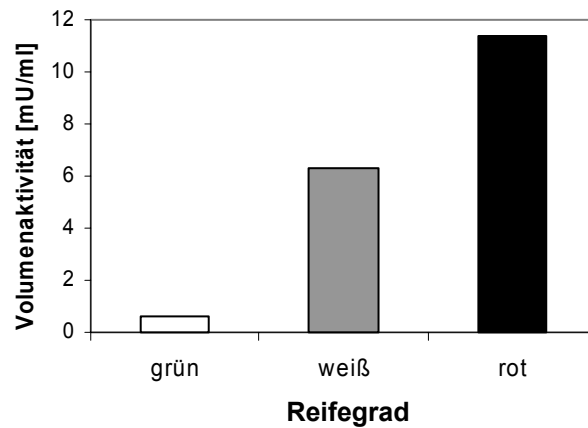


Abb. C-23: Entwicklung der Aktivität der Fructosediphosphatase während der Erdbeerfruchtreifung, dargestellt in Form der Volumenaktivitäten von Proteinextrakten aus Früchten verschiedener Reifegrade.

2.2.3 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase katalysiert die Umwandlung von D-Glucose-6-phosphat zum 6-Phosphogluconolacton. NADP wird dabei reduziert, und die Zunahme an NADPH bei 340 nm photometrisch verfolgt. Der Nachweis des Enzyms erfolgte auch hier in Proteinextrakten aus roten, weißen und grünen Früchten. Wiederum ist ein deutlicher Anstieg der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität im Verlauf des Reifeprozesses zu erkennen. In unreifen Erdbeerfrüchten war nahezu keine Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität nachweisbar (Abb. C-24).

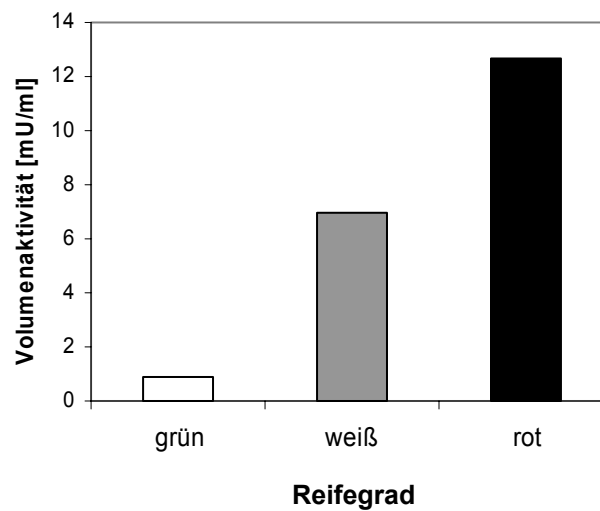


Abb. C-24: Entwicklung der Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase während der Erdbeerfruchtreifung, dargestellt in Form der Volumenaktivitäten von Proteinextrakten aus Früchten verschiedener Reifegrade.

2.2.4 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase

6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von 6-Phosphogluconsäure zu D-Ribulose-5-phosphat. Die Reduktion von NADP zu NADPH wird photometrisch verfolgt. Abbildung C-25 verdeutlicht die bei der 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase beobachtete Abhängigkeit der Aktivität vom Reifegrad. Auch im Proteinextrakt der grünen Erdbeere konnte eine geringe enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

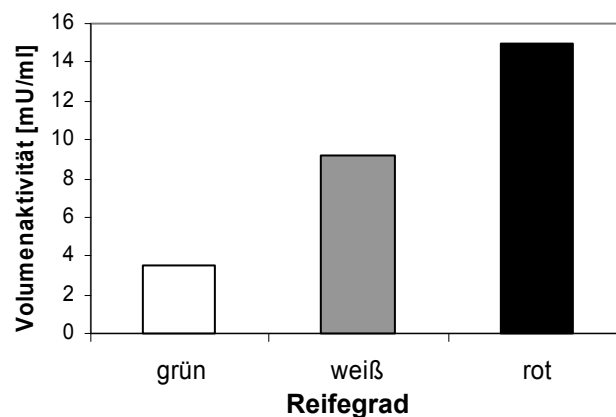


Abb. C-25: Entwicklung der Aktivität der 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase während der Erdbeerfruchtreifung, dargestellt in Form der Volumenaktivitäten von Proteinextrakten aus Früchten verschiedener Reifegrade.

2.2.5 Aufreinigung der nachgewiesenen enzymatischen Aktivitäten mittels Anionenaustauschchromatographie

Ein cytosolischer Proteinextrakt gewonnen aus reifen Erdbeerfrüchten wurde dialysiert und über eine Q-Sepharose Anionenaustauschersäule aufgetrennt. Der Nachweis der enzymatischen Aktivitäten an Fructosediphosphatase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase sowie Phosphohexose-Isomerase erfolgte jeweils in aufgesammelten 10 ml Fraktionen.

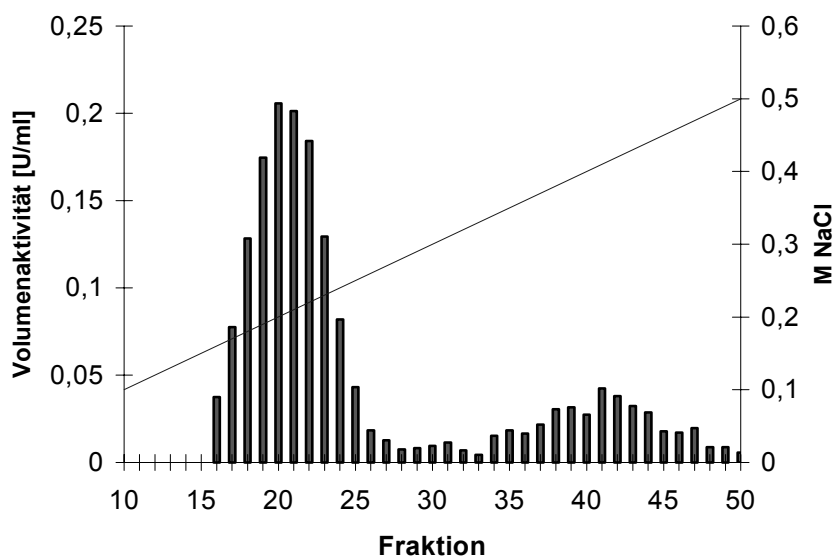


Abb. C-26: Auftrennung der Phosphohexose-Isomerase-Isoenzyme aus reifen Erdbeerfrüchten durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose.

Zwei der untersuchten enzymatischen Aktivitäten konnten nach der Ionenaustauschchromatographie eindeutig nachgewiesen werden, die der Phosphohexose-Isomerase und der 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase. Es wurde jeweils eine Trennung in zwei Isoenzyme beobachtet. Die Gesamtaktivitäten der beiden Isoenzyme waren bei der 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase etwa gleich groß (Abb. C-27). Bei der Phosphohexose-Isomerase hingegen überwog deutlich die Aktivität des zuerst eluierenden Isoenzym (Abb. C-26). Laut Backhausen und Mitarbeiter (1997), die eine Trennung der beiden Isoenzyme der Phosphohexose-Isomerase aus Spinat mittels Anionenaustauschchromatographie realisieren konnten, handelt es sich bei dem zuerst eluierenden Isoenzym um das cytosolische und beim zweiten um das plastidische Isoenzym.

Die außerordentlich hohen Pektingehalte der halbreifen und unreifen Erdbeerfrüchte verhinderten die Trennung der Extrakte mittels Ionenaustauscherchromatographie. Pektin gelierte während der chromatographischen Trennung aus.

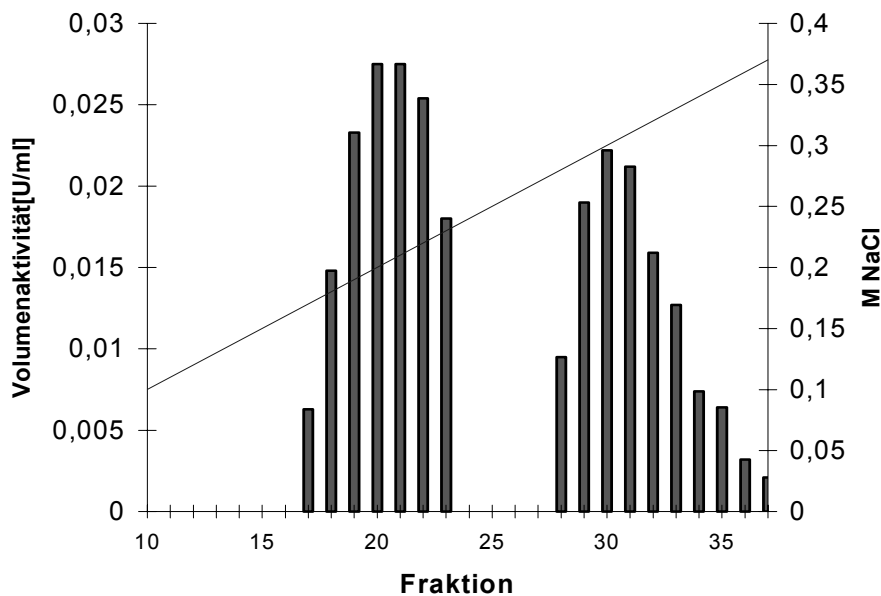


Abb. C-27: Auftrennung der 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase-Isoenzyme aus reifen Erdbeerfrüchten durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose.

2.2.6 Diskussion

Bei den Untersuchungen von Erdbeerproteinextrakten verschiedener Reifegrade mit Hilfe spezifischer photometrischer Methoden konnten mehrere Enzym-Aktivitäten nachgewiesen werden. Diese Enzyme sind an wichtigen Stoffwechselfvorgängen der Frucht, wie der Saccharose-Synthese, Gluconeogenese und dem oxidativen Pentosephosphatweg beteiligt.

Das Enzym Phosphohexose-Isomerase katalysiert die reversible Isomerisierung zwischen D-Glucose- und D-Fructose-6-phosphat. Mehrfach wurden in Pflanzen (Spinat, Sonnenblume, Blumenkohl, *Clarkia xantiana*, Castorbohne), aber auch speziell in Früchten (Avocado, Banane), eine plastidische und eine cytosolische Isoform des Enzyms beschrieben

(Backhausen und Mitarbeiter, 1997; Weeden und Gottlieb, 1982; Nishimura und Beevers, 1981; Goldring und Mitarbeiter, 1985; Cordenunsi und Mitarbeiter, 2001). Die Phosphohexose-Isomerase-Aktivität spielt eine entscheidende Rolle innerhalb der Kohlenstofffixierung in Pflanzen, da sie für die Bildung von Stärke und Saccharose, den beiden Endprodukten der Photosynthese, benötigt wird. In den Chloroplasten katalysiert die Phosphohexose-Isomerase den initialen Schritt der Stärke-Synthese während im Cytosol äquivalente Mengen an D-Glucose- und D-Fructose-6-phosphat zur Synthese von Saccharose benötigt werden. Für die Erdbeere wurde eine nahezu konstante Phosphohexose-Isomerase-Aktivität im Verlauf der Erdbeerfruchtreifung beobachtet. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass diese konstante Aktivität auf eine kontinuierliche Abnahme des plastidischen und einer gleichzeitigen kontinuierlichen Zunahme des cytosolischen Isoenzym im Verlauf der Fruchtentwicklung zurückzuführen ist. Für eine geringe cytosolische Aktivität im frühen Reifestadium spricht die von Forney und Breen (1986) beobachtete schwache Akkumulation von Saccharose bis etwa zur Hälfte des Reifeprozesses. Die im Folgenden gesteigerte Saccharose-Bildung kann als Hinweis auf einen Anstieg der cytosolischen Aktivität gewertet werden. Durch Ionenaustauschchromatographie konnte ein deutliches Übergewicht der cytosolischen im Vergleich zur plastidischen Aktivität in reifen Erdbeerfrüchten ähnlich der Aldolase-Aktivität nachgewiesen werden.

Es wurde ein deutlicher Anstieg der Fructosediphosphatase-Aktivität während der Reifung beobachtet. Ein solch signifikanter Anstieg innerhalb der Fruchtreifung an Fructosediphosphatase wurde bereits mehrfach für Mango-Früchte beschrieben (Kumar und Selvaraj, 1990; Satyan und Patwardhan, 1984), bei denen im unreifen bzw. halbreifen Entwicklungsstadium keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Das Enzym Fructosediphosphatase ist von großer Bedeutung für den Stoffwechselfvorgang der Gluconeogenese innerhalb derer sie D-Fructose-1,6-diphosphat zu D-Fructose-6-phosphat unter Phosphat-Abspaltung hydrolysiert. In Mangos konnte zudem die Reifeinduktion weiterer wichtiger gluconeogener Enzyme, wie Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Glucose-6-Phosphatase nachgewiesen werden (Satyan und Patwardhan, 1984). Erst die Untersuchungen dieser Aktivitäten in der Erdbeerfrucht würden Aussagen über eine mögliche Induktion der Gluconeogenese im Verlauf der Reifung zulassen.

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wird häufig als Schlüssel-Enzym des oxidativen Pentosephosphat-Cyclus beschrieben. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Glucose-6-phosphat zum 6-Phosphoglucono- δ -lacton als ersten Schritt dieses bedeutenden Stoffwechselweges, der für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH sorgt und zudem Zuckerphosphat-Intermediate als wichtige Ausgangsverbindungen für sekundäre Pflanzen-Produkte liefert (Copeland und Turner, 1987). Ein weiteres Enzym innerhalb des oxidativen Pentosephosphat-Cyclus ist die 6-Phosphoglucono-Dehydrogenase, die im weiteren Reaktionsverlauf 6-Phosphogluconat unter Decarboxylierung in Ribulose-5-phosphat überführt. Beide Aktivitäten konnten im Erdbeerproteinextrakt nachgewiesen werden und beide zeigten einen deutlichen Aktivitäts-Anstieg an im Reifeverlauf. Eine solche Reifeinduktion der genannten Aktivitäten wurde bereits für reife Mango-Früchte nachgewiesen (Modi und Reddy, 1967). Ein Anstieg der Aktivität an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase im Verlauf der Reifung ist zudem beschrieben für Äpfel (Mamedov und Mitarbeiter, 1997), Litchi (Singh und Mitarbeiter, 1997) und Oliven (Donaire und Mitarbeiter, 1984). Mehrfach wurde auch von der Trennung der genannten Enzyme in die entsprechenden plastidischen und cytosolischen Isoformen berichtet, so z.B. für Kartoffeln (Wendt und Mitarbeiter, 2000) oder Spinat (Schnarrenberger und Mitarbeiter, 1973). In unseren Untersuchungen konnte die 6-Phosphoglucono-Dehydrogenase-Isoenzyme im reifen Erdbeerproteinextrakt mittels Anionenaustauschchromatographie getrennt werden. Sie zeigten etwa gleich große Aktivität.

Unsere Untersuchungen beweisen, wie dies auch bereits bei einigen anderen Früchten gezeigt wurde, dass im Verlauf der Fruchtreifung entscheidende Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel stattfinden. Zum einen verändern sich die Anteile von cytosolischer und plastidischer enzymatischer Aktivität an der Gesamtaktivität der Enzyme in den Früchten, zum anderen werden mehrere Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels neu gebildet. Im Verlauf der Fruchtreifung kommt es somit zu einem Abbau der Stärkedepots sowie zur Akkumulation von D-Glucose, D-Fructose und Saccharose. Phosphorylierte Kohlenhydratderivate spielen hierbei eine wichtige Rolle und wurden als effiziente Vorläufer von HDMF identifiziert (Roscher, 1998). Die Bildung hoher Gehalte an phosphorylierten Kohlenhydratderivaten während der Fruchtreifung könnte auch das ausschließliche

Auftreten von HDMF in Früchten erklären (Hubbard und Pharr, 1992). In keinem anderen Pflanzenteil wurde HDMF bisher gefunden.

2.3 Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung einer Alkohol-Dehydrogenase aus Erdbeeren (*Fragaria x ananassa* cv. Elsanta)

Wie in Kapitel C 2.1.6 geschildert gelang Aharoni und Mitarbeitern (2000) die teilweise Sequenzierung von etwa 1100 cDNA Klonen, die willkürlich einer cDNA Bibliothek von reifen Erdbeeren entnommen worden waren. Die Suche nach Sequenzidentitäten mit Hilfe des BLAST Programms (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) lieferte neben der Identifizierung zweier ähnlicher cDNAs, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für die cytosolische Erdbeer-Aldolase (SCA1) kodieren auch eine cDNA einer Alkohol-Dehydrogenase (ADH). Da rein formal im Verlauf der Metabolisierung von D-Fructose-1,6-diphosphat zum HDMF ein Reduktionsschritt erforderlich ist, sollte eine mögliche Beteiligung der ADH bei der Bildung von HDMF untersucht werden. Die Charakterisierung ist zudem von Interesse, da den NAD- bzw. NADP-abhängigen ADH-Aktivitäten eine bedeutende Rolle in der Geschmacks- und Geruchsbildung reifender Erdbeerfrüchte zugeschrieben wird (Mitchell und Jelenkovitch, 1995). Vor allem Ethyl- und Methyl-ester von Butan- und Hexansäure stellen neben Alkoholen eine wichtige Komponente des Aromas dar (Larsen und Poll, 1992; Pérez und Mitarbeiter, 1996; Pérez und Mitarbeiter, 1992).

Für die Versuche wurde der vollständige offene Leserahmen (ORF) in den Expressionsvektor pRSET B (Invitrogen) kloniert³, und dieses Konstrukt anschließend in *E. coli* BL21 (De 3) pLys Bakterien transformiert. Die Aufreinigung des exprimierten Proteins erfolgte durch His-Tag-Affinitätschromatographie.

³ Der ADH-Klon wurde dankenswerter Weise von Dr. A. Aharoni des Plant Research International in Wageningen (Niederlande) zur Verfügung gestellt.

2.3.1 Substratspezifität

Die Erdbeer-Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität sollte zunächst im Hinblick auf ihre Substratspezifität charakterisiert werden. Dazu wurde die Aktivität des heterolog exprimierten Enzyms unter Verwendung äquivalenter Konzentrationen verschiedener Substrate in einem photometrischen Assay bestimmt. Die in Folge der Oxidation des Cosubstrates NADH beobachtete Extinktionsabnahme bei 340 nm wurde als Maß für die Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität herangezogen. Acetaldehyd erwies sich dabei als Substrat mit der höchsten Umsatzrate, gefolgt von Hexanal, Isovaleraldehyd und Butanal. Substrate mit geringer Akzeptanz waren Formaldehyd und Aceton (Abb. C-28).

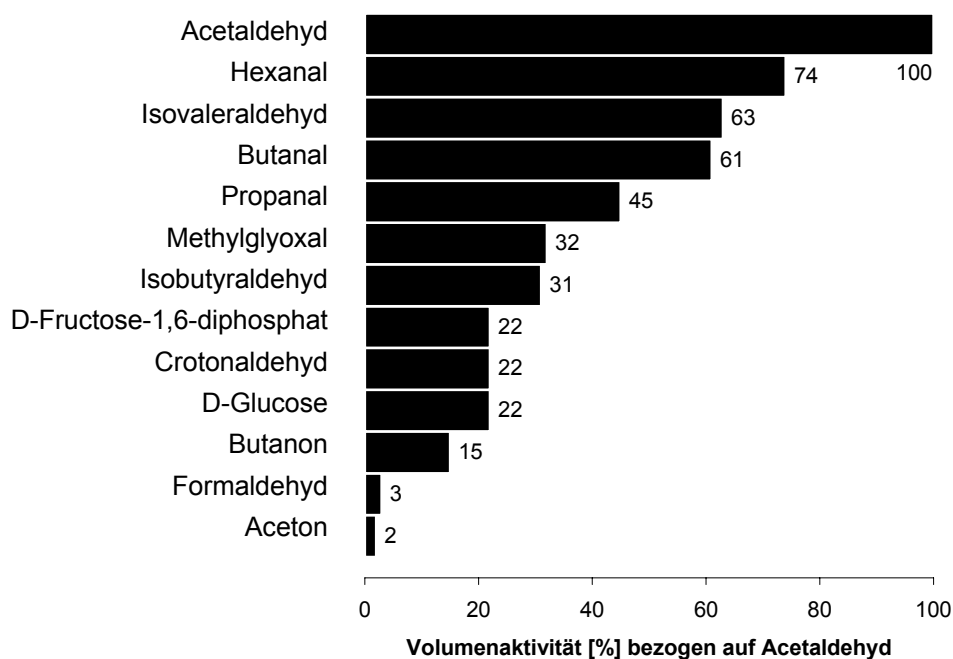


Abb. C-28: Substratspezifität einer Alkohol-Dehydrogenase aus Erdbeeren.

2.3.2 Michaelis-Konstante und maximale Reaktionsgeschwindigkeit für Acetaldehyd

Für Acetaldehyd als Substrat mit der höchsten Umsatzrate ist die Michaelis-Konstante sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt worden. Dazu wurde die zugegebene Menge an Acetaldehyd zwischen $3.3 \cdot 10^{-6}$ und $6.6 \cdot 10^{-3}$ mol/l variiert und die jeweilige Extinktionsabnahme bei 340 nm photometrisch vermessen. In Abb. C-29 A ist die Abhän-

gigkeit der Volumenaktivität von der eingesetzten Substratkonzentration graphisch dargestellt. Die Daten lieferten eine Michaelis-Konstante der untersuchten Alkohol-Dehydrogenase aus Erdbeerfrüchten für Acetaldehyd von $43.5 \mu\text{M}$, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit liegt beim Linearisierungsverfahren nach Hanes (Abb. C-29 B) bei $21.3 \text{ mol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

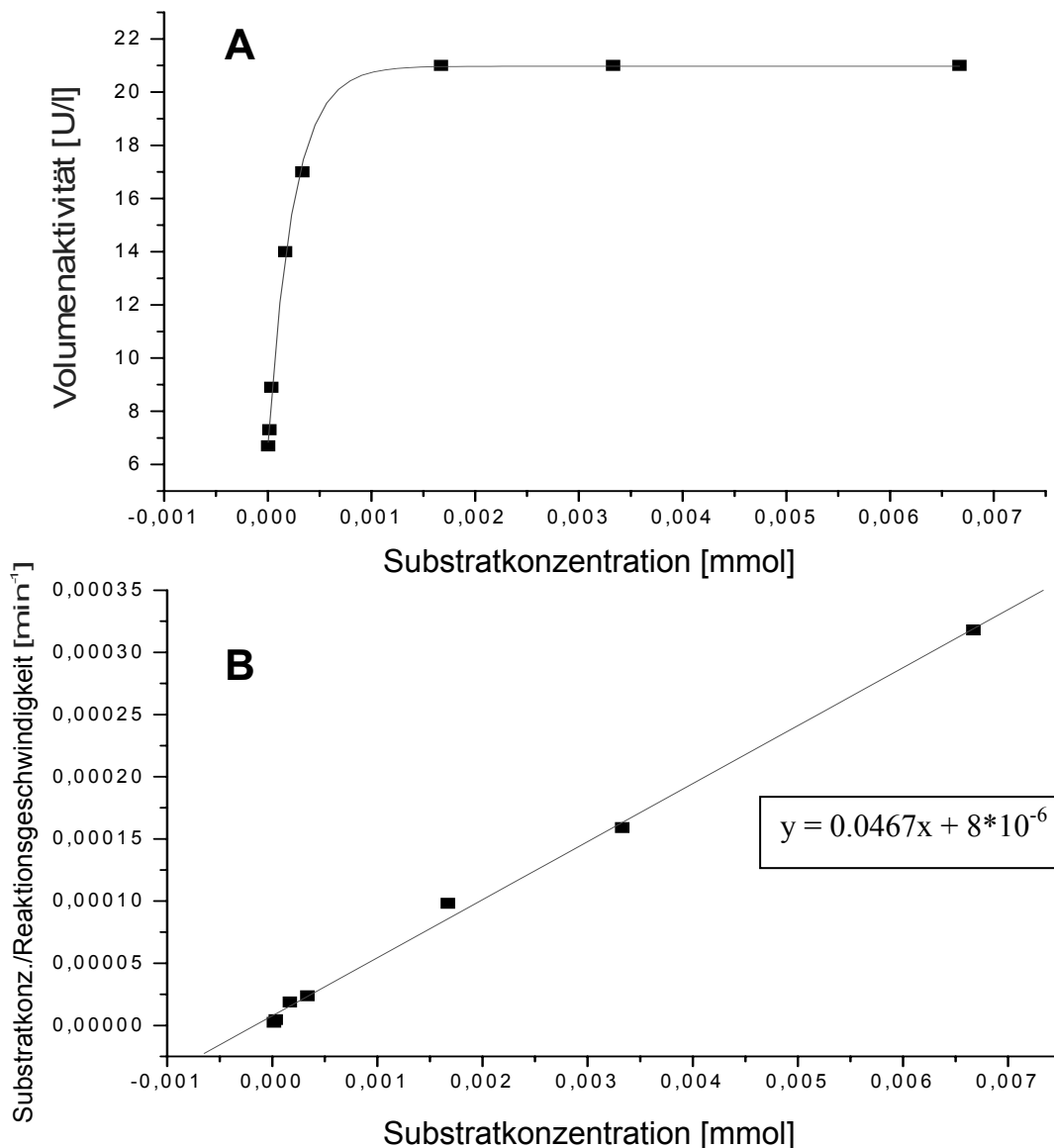


Abb. C-29: **A** Michaelis-Menten-Kinetik der rekombinanten ADH aus Erdbeerfrüchten;
Substrat: Acetaldehyd
B Auswertung nach Hanes

2.3.3 Diskussion

Aus einer Erdbeerfrucht cDNA Bibliothek wurde ein Vollängen-Klon in *E. coli* transformiert und heterolog exprimiert. Für das exprimierte und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigte Protein konnte eindeutig eine Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden. Unter den eingesetzten Substraten zeigte Acetaldehyd die höchste Umsatzrate. Der K_m -Wert wurde mit $43.5 \mu\text{M}$, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit $21.3 \text{ mol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bestimmt. Auch für das Substrat D-Fructose-1,6-diphosphat konnte eine, wenn auch geringe Aktivität im photometrischen Test nachgewiesen werden. Wie Hauck (2003) zeigen konnte, kann HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat als Folge einer chemischen Umlagerung sowie einer Reduktion durch nichtenzymatischen Hydridtransfer von NADH auf eine aus D-Fructose-1,6-diphosphat abgeleitete Zwischenverbindung (vgl. C 3.5) gebildet werden. Daneben konnte er die enantioselektive Bildung von HDMF durch die Hefe *Z. rouxii* nachweisen und schlussfolgerte die enzymatische Reduktion einer aus D-Fructose-1,6-diphosphat chemisch gebildeten Zwischenverbindung durch Enzyme der Hefe. Die Katalyse einer solchen Reduktion durch die ADH aus Erdbeeren war daher denkbar. Als Folge hätte sich dies im Inkubationsexperiment in einer im Vergleich zur Blindreaktion gesteigerten Menge an gebildetem HDMF bemerkbar machen müssen. Die in den Umsetzungsversuchen mit D-Fructose-1,6-diphosphat in Gegenwart der Alkohol-Dehydrogenase mittels HPLC nachweisbaren Mengen an HDMF lagen allerdings im Bereich der chemischen Bildung. Daher wurden keine weiteren Untersuchungen im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung der ADH bei der Biogenese von HDMF durchgeführt.

Wie bereits erwähnt wird NAD- bzw. NADP-abhängigen ADH-Aktivitäten jedoch eine bedeutende Rolle in der Geschmacks- und Geruchsbildung reifender Erdbeerfrüchte zugeschrieben (Mitchell und Jelenkovitch, 1995). Für die aus Erdbeeren untersuchten ADH-Isoenzyme wurden breite Substratspezifitäten beschrieben. So werden unter anderem Alkohole und Aldehyde umgesetzt, die entweder direkt oder aber als ihre entsprechenden Esterprodukte zum Erdbeeraroma beitragen. Auch in anderen Früchten wie Mango (Selvaraj, 1989), Oliven (Salas und Sanchez, 1998) und Tomaten (Prestage und Mitarbeiter, 1999; Speirs und Mitarbeiter, 1998) spielen ADH-Aktivitäten eine wichtige Rolle bei der Bildung flüchtiger Aromastoffe. Daneben sind ADHs verantwortlich für die Bildung

bestimmter C₆-Alkohole (Hexanol, E-2-Hexenol und Z-3-Hexenol) als wichtige Vertreter der sogenannten „Grünnoten“ (Hatanaka, 1993).

3 Bildung von HDMF in Proteinextrakten reifender Erdbeerfrüchte

Die Suche nach Zwischenverbindungen der Biogenese von HDMF unter Einsatz radioaktiv und stabil markierter Prekursoren lieferte keine Hinweise auf die Existenz von Intermediaten. Zwar konnten einige Metabolite der eingesetzten Zucker und Zuckerphosphate v.a. mit Hilfe der GC-AED-Analyse bzw. GC-MS-Analyse identifiziert werden, aufgrund ihrer geringen Kohlenstoffkettenlänge kamen sie aber nicht als potentielle Zwischenverbindungen in Frage. Da kein Intermediat nachgewiesen werden konnte bestand die Möglichkeit einer direkten Umwandlung von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF. Es wurden daher andere Wege gesucht, um Informationen über die Biosynthese von HDMF zu erhalten. Erfolg versprechend schien demnach der Versuch einer proteinchemischen Aufreinigung von Erdbeerproteinextrakten hinsichtlich der mehrfach in ganzen Erdbeerfrüchten beschriebenen HDMF-bildenden Aktivität. Um eine Aufreinigung zu ermöglichen, galt es jedoch zunächst zellfreie Extrakte reifer Erdbeerfrüchte zu gewinnen und geeignete Inkubationsbedingungen für den Nachweis einer HDMF-Bildung zu etablieren. In zeitgleich durchgeführten Inkubationsexperimenten konnte Hauck (2003) die Bildung von HDMF in cytosolischen Proteinextrakten, die aus der Hefe *Zygosaccharomyces rouxii* gewonnen wurden, nach Zusatz von D-Fructose-1,6-diphosphat, sowie von reduzierten und nicht reduzierten Nicotinamiddinucleotiden demonstrieren. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde daher auch für die Experimente mit Erdbeerproteinextrakten gewählt.

3.1 Gewinnung von Erdbeerproteinextrakten

Die Gewinnung von zellfreien Proteinextrakte erfolgte durch Homogenisierung ganzer Erdbeerfrüchte mit Wasser unter Zusatz von Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) zur Vermeidung der Inaktivierung enzymatischer Aktivitäten durch Anthocyane (Abb. C-30). Nach Neutralisation mit NaOH wurde das Homogenat zunächst bei 5000 g und der Überstand anschließend bei 40 000 g zentrifugiert. Um das aus der Erdbeerfrucht extrahierte, natürliche HDMF abzutrennen, wurde der Überstand der zweiten Zentrifugation mit den noch in Lösung befindlichen Proteinen gegen Phosphat-Puffer (pH 7.5) dialysiert. Neben diesem

dialysierten cytosolischen Proteinextrakt ist auch der im zweiten Zentrifugationsschritt erhaltene Rückstand (mit Zellwand- und Membranbestandteilen) nach mehrmaligem Waschen mit Wasser für Inkubationsversuche mit D-Fructose-1,6-diphosphat verwendet worden. Die gesamte Aufarbeitung erfolgte bei einer Temperatur von 4°C, um einen Verlust an enzymatischer Aktivität zu vermeiden.

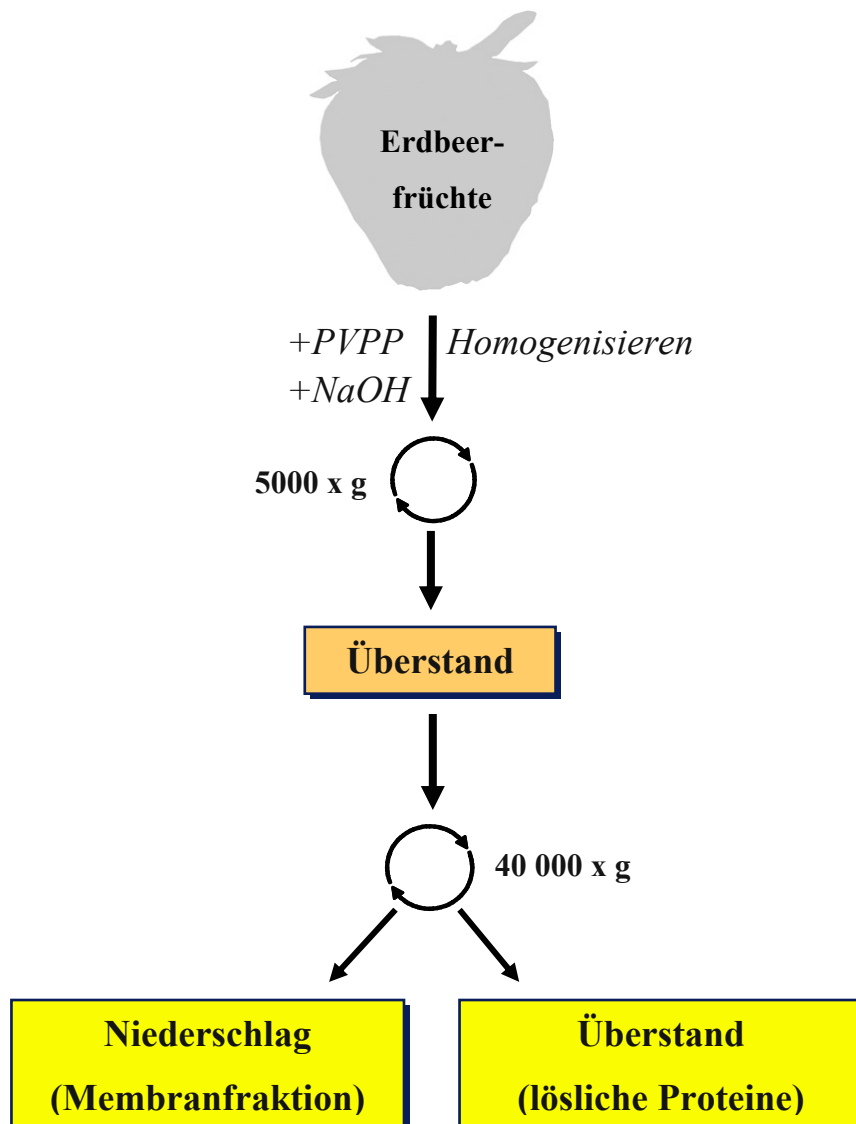


Abb. C-30: Gewinnung von Proteinextrakten aus Erdbeeren.

3.2 Inkubation von cytosolischem Erdbeerproteinextrakt mit D-Fructose-1,6-diphosphat

Ein frisch hergestellter, dialysierter, cytosolischer Proteinextrakt wurde bei pH 7.5 mit D-Fructose-1,6-diphosphat und den Nicotinamidadenindinucleotiden NAD, NADH, NADP und NADPH bei 30°C inkubiert. Da während der Biotransformation von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF formal eine Reduktion stattfinden muss, erfolgte der Zusatz von Reduktionsäquivalenten. Nicotinamidadenindinucleotide fungieren als Cofaktoren der meisten bekannten Dehydrogenasen und eine mögliche Beteiligung an der HDMF-Bildung war durchaus vorstellbar. Nach 24 Stunden wurden die apolaren Verbindungen durch Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen extrahiert. Die Analyse des Diethylether-Extraktes mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 285 nm lieferte ein einzelnes Signal, dessen Retentionszeit mit der einer kommerziellen HDMF-Referenz übereinstimmte (Abb. C-31 A). In einem Kontrollexperiment wurde der dialysierte, cytosolische Extrakt ohne Zugabe von D-Fructose-1,6-diphosphat unter sonst analogen Bedingungen inkubiert. Bei der RP-HPLC Analyse konnte allerdings keine UV-aktive Verbindung detektiert werden. Die detektierte Verbindung entsteht folglich aus dem extern zugesetzten D-Fructose-1,6-diphosphat. Nachfolgende Untersuchungen sollten den eindeutigen Nachweis der Bildung von HDMF in diesem Inkubationsexperiment liefern.

3.3 Inkubation des Rückstandes mit Zellwand und Membranbestandteilen mit D-Fructose-1,6-diphosphat

Der Rückstand, der bei der Gewinnung des cytosolischen Extraktes beim Zentrifugieren mit 40000 g anfällt, wurde nach mehrmaligem Waschen ebenfalls für verschiedene Inkubationsversuche verwendet. Die Inkubationen erfolgten in einem 100 mM Phosphat-Puffer pH 7 suspendiert nach Zugabe von Fructose-1,6-diphosphat bei 30°C. Nach 24 h wurde erneut zentrifugiert, und die apolaren Verbindungen durch Festphasenextraktion an RP18-Kartuschen aus dem wässrigen Überstand extrahiert. Bei der Analyse des Diethylether-Extraktes mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 285 nm konnte das gleiche Signal wie in den Inkubationsversuchen mit dialysiertem Proteinextrakt detektiert werden. Für die

Bildung der UV-aktiven Verbindung war hier jedoch im Gegensatz zum cytosolischen Extrakt kein Zusatz von Reduktionsäquivalenten nötig. In einem Kontrollexperiment ohne Zugabe von D-Fructose-1,6-diphosphat unter sonst analogen Bedingungen konnte keine UV-aktive Verbindung detektiert werden. Aufgrund der im Vergleich zum cytosolischen Extrakt aufwendigeren Proteinaufreinigung, wurden keine weiteren Inkubationsversuche mit Membran- und Zellwandbestandteilen durchgeführt.

3.4 Nachweis der Bildung von HDMF

3.4.1 HPLC-DAD-Analysen

Die HPLC-DAD-Analyse des Diethylether-Extraktes sowohl des Inkubationsansatzes mit cytosolischem Extrakt (C 3.2), als auch mit dem Rückstand (C 3.3) lieferte für die entstandene Verbindung ein UV-Spektrum mit einem Maximum bei 285 nm. Das erhaltene Spektrum sowie die Retentionszeit stimmten mit den Daten einer authentischen HDMF-Referenz überein und ließen somit auf die Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in den Proteinextrakten aus reifen Erdbeerfrüchten schließen.

3.4.2 Massenspektrometrische Charakterisierung

Anhand von HPLC-MS-Analysen wurde für die Verbindung im positiven Modus ein Pseudomolekülion m/z 170 bestimmt (Abb. C-31 B). Dies entspricht dem Acetonitriladdukt des einfach protonierten Molekülions von HDMF. Das Produktionenspektrum war gekennzeichnet durch das einfach protonierte Molekülion m/z 129 und den Verlust von Kohlenmonoxid, der zur Bildung des Fragmentions m/z 101 führte (Abb. C-31 D). Die erhaltenen Daten waren identisch mit den Daten einer authentischen HDMF-Referenzverbindung. Durch eine zusätzliche Analyse mittels HRGC-MS konnte die Anwesenheit von HDMF im Extrakt bestätigt werden.

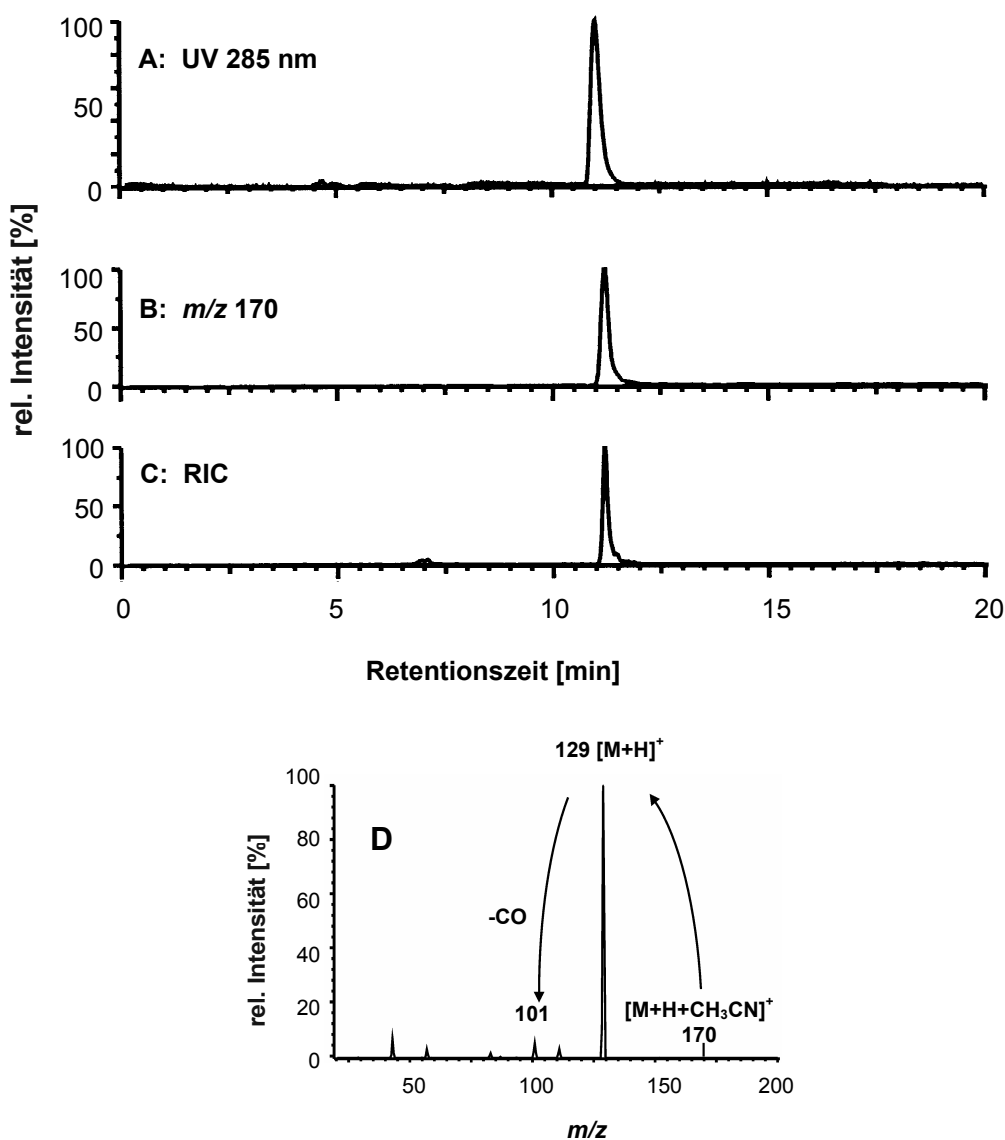


Abb. C-31: HPLC-UV-ESI-MS-Analyse eines dialysierten cytosolischen Proteinextraktes aus reifen Erdbeerfrüchten nach Applikation von D-Fruktose-1,6-diphosphate, NAD, NADH, NADP und NADPH (Inkubation: 24 Stunden; 30°C);

A UV-Chromatogramm (285 nm);

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

C Totalionenchromatogramm (RIC);

D Produktionenspektrum von HDMF.

Die massenspektrometrischen Analysen erbrachten somit den endgültigen Nachweis der Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in zellfreiem cytosolischem Proteinextrakt aus reifen Erdbeerfrüchten.

3.5 Chemische Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat

Weitere Versuche sollten klären, inwieweit der cytosolische Proteinextrakt bei der Bildung von HDMF bei dem unter Abschnitt C 3.2 beschriebenen Inkubationsexperiment beteiligt ist. Ein frisch hergestellter Proteinextrakt wurde aliquotiert und mit D-Fructose-1,6-diphosphat in An- und Abwesenheit der Nicotinamidadenindinucleotide inkubiert. Parallel wurden Reagenzienleerwerte im entsprechenden Puffer angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Proben wie oben erwähnt extrahiert und analysiert (Abb. C-32). Es zeigte sich, dass die Zugabe der Nicotinamidadenindinucleotide unabdingbare Voraussetzung für die Bildung von HDMF ist (Abb. C-32 C). Allerdings wurde auch im Kontrollversuch ohne Zusatz von Erdbeerproteinextrakt HDMF nachgewiesen (Abb. C-32 B), wenn auch in deutlich geringerer Menge als bei der Inkubation mit cytosolischem Extrakt (Abb. C-32 A). Offensichtlich kann HDMF auf rein chemischem Wege aus D-Fructose-1,6-diphosphat gebildet werden. In weiterführenden Untersuchungen konnten Hauck und Mitarbeiter (2002) schließlich die beobachtete chemische Bildung von HDMF unter Einsatz von deuteriertem NADH auf einen nicht-enzymatischen Hydridtransfer von der reduzierten Form des Cofaktors auf die Kohlenhydratstruktur zurückführen. Die weit- aus größere Menge an HDMF, die unter Anwesenheit des Proteinextraktes entstanden war, deutete jedoch auf die Existenz eines zusätzlichen enzymkatalysierten Bildungsweges hin. Zwar konnte die Menge an chemisch gebildetem HDMF durch den alleinigen Zusatz der reduzierten Nicotinamidadenindinucleotide NADH bzw. NADPH nochmals etwa um die Hälfte reduziert werden (Daten nicht abgebildet), da aber die Mengen an gebildeten HDMF bei Inkubationsexperimenten mit unterschiedlichen Erdbeerextrakten starken Schwankungen unterlagen, sollten weiterführende Experimente zusätzliche Beweise einer enzymatischen Metabolisierung liefern.

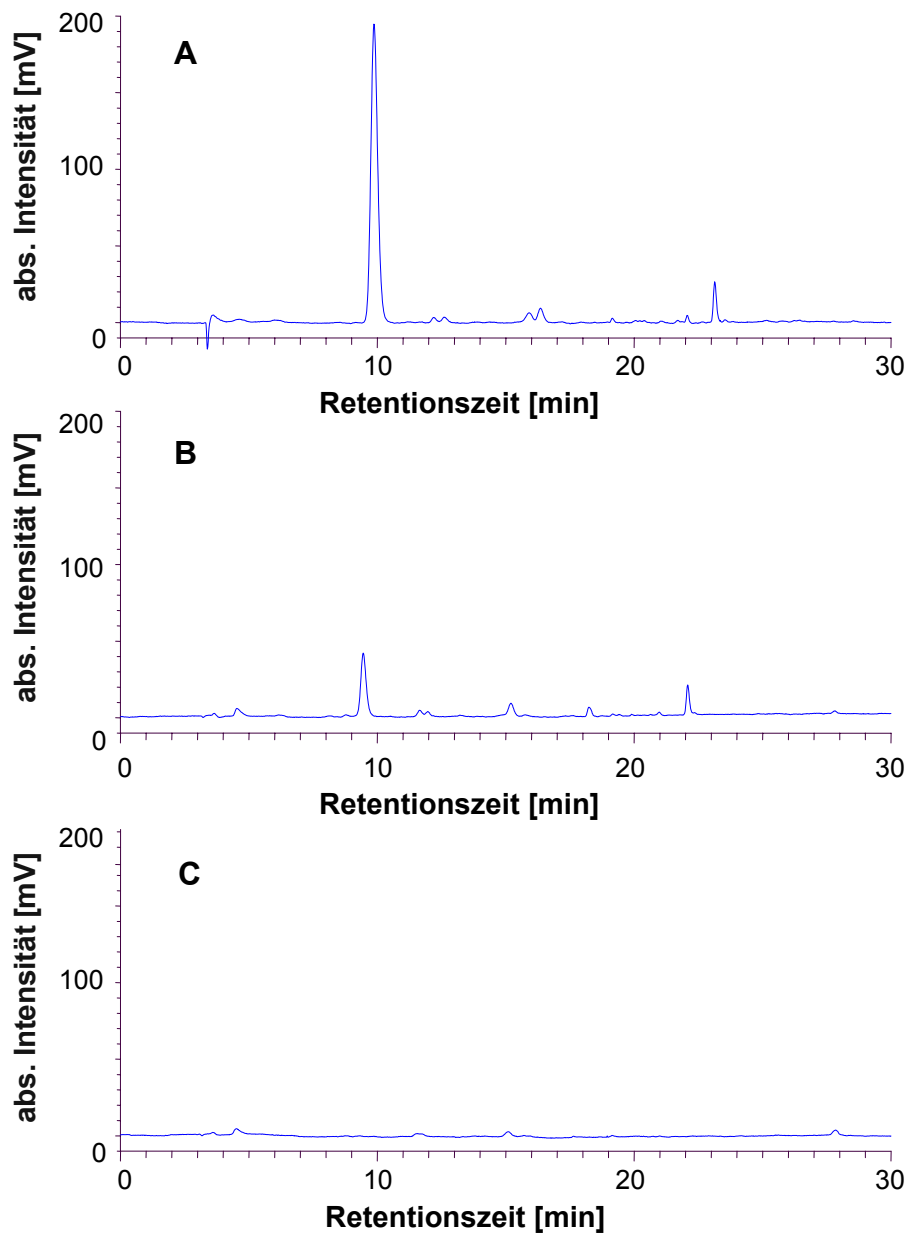


Abb. C-32: RP-HPLC-UV-Analysen von Extrakten verschiedener Inkubationsansätze (Inkubation: 24 Stunden; 30°C; 20 mM Tris-HCl, pH 7.5);

- A** Dialysierter cytosolischer Proteinextrakt aus reifen Erdbeerfrüchten mit D-Fructose-1,6-diphosphat sowie NAD, NADH, NADP und NADPH;
- B** Pufferlösung mit D-Fructose-1,6-diphosphat sowie NAD, NADH, NADP und NADPH;
- C** Dialysierter cytosolischer Proteinextrakt aus reifen Erdbeerfrüchten mit D-Fructose-1,6-diphosphat.

3.6 Nachweis der enzymkatalysierten Metabolisierung von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF im cytosolischen Proteinextrakt aus reifen Erdbeerfrüchten

3.6.1 Hitzeinaktivierung des cytosolischen Proteinextraktes

Durch Hitzebehandlung (siedendes Wasserbad, 10 min) eines dialysierten cytosolischen Erdbeerproteinextraktes sollten die enthaltenen Enzyme thermisch inaktiviert werden. Nach dem Abkühlen wurde der Extrakt nach Zusatz von D-Fructose-1,6-diphosphat sowie NADH über Nacht inkubiert. Eine nicht hitzebehandelte aliquote Menge des Extraktes ist parallel unter analogen Bedingungen inkubiert worden.

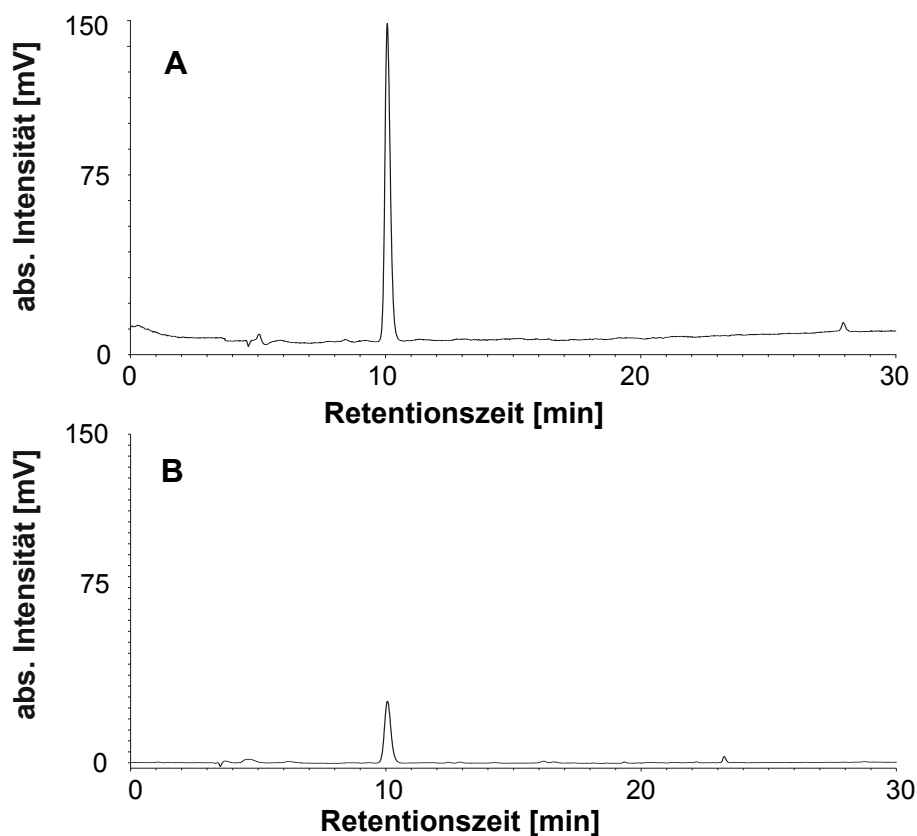


Abb. C-33: RP-HPLC-UV-Analyse eines Inkubationsansatzes von D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH mit
A dialysiertem cytosolischem Proteinextrakt
B hitzebehandeltem, dialysiertem cytosolischem Proteinextrakt.

HDMF wurde fast ausschließlich in der Inkubationslösung des nicht hitzebehandelten Extraktes gebildet (Abb. C-33). Die geringe Menge an HDMF im thermisch behandelten Extrakt lässt sich wiederum auf die bereits beschriebene chemische Bildung zurückführen.

3.6.2 Verdünnungsstudie

Der Zusammenhang zwischen eingesetzter Gesamtproteinmenge und der Menge an gebildetem HDMF sollte durch Inkubationsexperimente mit stufenweise verdünntem dialysiertem cytosolischem Proteinextrakt untersucht werden. Mit zunehmender Verdünnung wurde eine kontinuierliche Abnahme der gebildeten HDMF-Menge beobachtet (Abb. C-34). Der HDMF-Gehalt näherte sich schließlich bei höheren Verdünnungen einem konstanten Wert an, der auf die beschriebene chemische Bildung ohne Beteiligung des cytosolischen Extraktes zurückgeführt werden kann. Bei hohen Proteingehalten hingegen scheint die enzymkatalysierte Bildung gegenüber der chemischen zu dominieren.

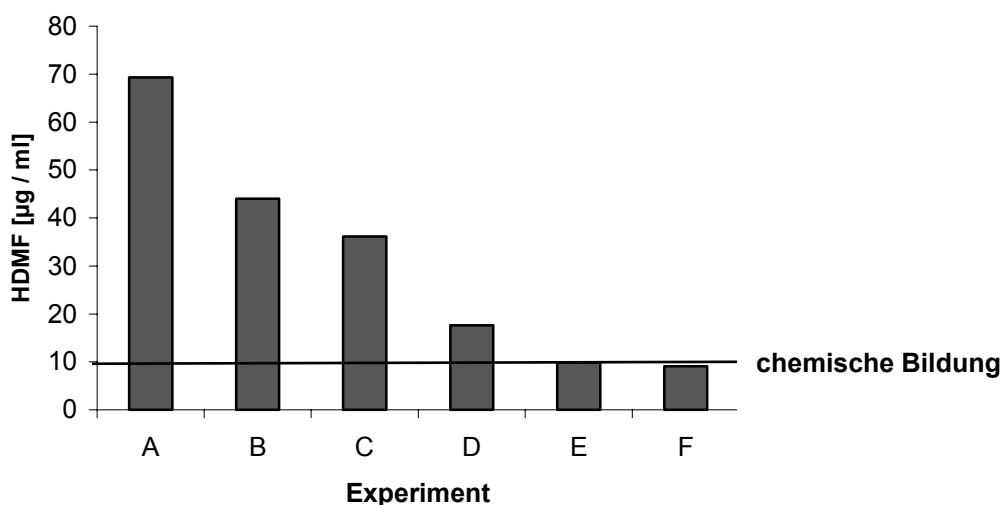


Abb. C-34: Durch RP-HPLC-UV-Analyse ermittelte HDMF-Konzentrationen in Umsetzungsversuchen von D-Fruktose-1,6-diphosphat unter Zusatz von NADH mit
A unverdünntem cytosolischem Erdbeerproteinextrakt,
B Extrakt mit Puffer im Verhältnis 1:2 verdünnt,
C Extrakt mit Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt,
D Extrakt mit Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt,
E Extrakt mit Puffer im Verhältnis 1:50 verdünnt,
F Extrakt mit Puffer im Verhältnis 1:100 verdünnt.

3.6.3 Enantioselektive Analyse von HDMF

3.6.3.1 Einführung

Natürliche chirale Aromastoffe zeigen charakteristische Enantiomerenverhältnisse, wobei in der Regel aufgrund einer stereoselektiven, enzymkatalysierten Biosynthese ein Enantiomer im Überschuss vorliegt. HDMF verfügt über ein asymmetrisches Kohlenstoffatom an C-2 bzw. C-5 und ist somit als chirale Verbindung zu betrachten. Frühere Studien beschäftigten sich bereits sehr intensiv mit der enantioselektiven Analyse von natürlichem, aus verschiedenen Früchten extrahiertem HDMF, wobei jedoch ausschließlich racemisches HDMF nachgewiesen wurde (Bruche und Mitarbeiter, 1991). Dennoch kann eine stereoselektive Biosynthese von HDMF nicht ausgeschlossen werden, da HDMF aufgrund seiner Enol-Oxo-Struktur einer Keto-Enol-Tautomerie unterliegt, durch die jegliche Stereoinformation verloren geht (Bruche und Mitarbeiter, 1991). Mosandl und Mitarbeitern (1990) gelang erstmals die Trennung der beiden HDMF-Enantiomere mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC). Hierbei kamen eine derivatisierte Cyclodextrinphase als Hauptsäule und eine achirale Vorsäule zum Einsatz, die durch ein sog. „Live-T-Stück“ (Platin-Iridium-Legierung) miteinander gekoppelt waren. Die Analyse von enantiomerenangereichertem HDMF demonstrierte jedoch die Racemisierung des Moleküls während der gaschromatographischen Analyse. Die Autoren führten die beobachtete Racemisierung auf die hohen Temperaturen im „Live-T-Stück“ und auf die Verwendung von Wasserstoff als Trägergas zurück (Bruche und Mitarbeiter, 1991).

Eine schonendere Methode stellt die von Mosandl und Mitarbeitern (1990) vorgestellte Trennung mittels Chiralphasen HPLC an einer Chiraspher NT[®]-Säule dar. Bei diesem Säulenmaterial handelt es sich um einen Poly-(*N*-Acryloyl-L-phenylalaninethylester) gebunden an Silicagel-Partikel (Abb. C-35). Die Enantiomerentrennung beruht in erster Linie auf der Ausbildung unterschiedlich stabiler Einschlussverbindungen der Enantiomere in den asymmetrischen Hohlräumen des vernetzten Polymers. Allerdings konnte mittels dieser Methode keine Basislinientrennung der beiden HDMF-Enantiomere erreicht werden, weshalb ihre Anwendung keine genauen Aussagen über das Enantiomeren-Verhältniss zulässt (Mosandl und Mitarbeiter, 1990).

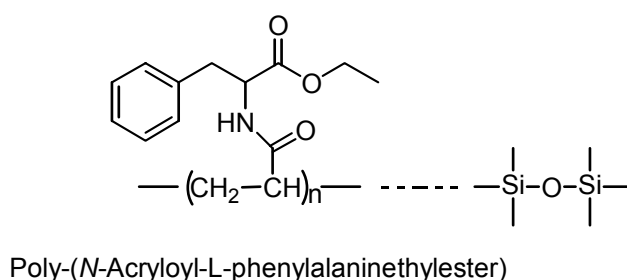


Abb. C-35: Struktur des Säulenmaterials einer Chiraspher NT[®] HPLC-Säule: Poly-(*N*-Acryloyl-L-phenylalaninethylester), gebunden an Silicagel Partikel.

3.6.3.2 Darstellung von enantiomerenangereicherten HDMF - Einsatz der MDGC unter Verwendung des „moving column switching systems“ (MCSS)

Die HDMF-Enantiomere einer kommerziellen HDMF-Referenz wurden mit Hilfe der Chiralphasen HPLC semipräparativ getrennt und beide optischen Isomere getrennt voneinander gesammelt. Die erneute Analyse der gesammelten Fraktionen mit Hilfe der Chiralphasen HPLC demonstrierte die signifikante Enantiomerenanreicherung der Proben (Daten nicht abgebildet). Eine Racemisierung im Verlaufe der HPLC-Analytik konnte nicht beobachtet werden.

Das auf diese Weise gewonnene enantiomerenangereicherte HDMF sollte mit Hilfe der MDGC unter Einsatz einer zu den Versuchen von Bruce und Mitarbeitern (1991) alternativen Kopplungstechnik dem so genannten „moving column switching system“ (MCSS) analysiert werden. Allerdings wurde auch bei der Verwendung dieser schonenderen Kopplungstechnik unter Vermeidung des Kontaktes mit Metall während starker thermischer Belastung eine Racemisierung des Hydroxyfuranons beobachtet. Es wird daher eine Racemisierung des Moleküls bereits im Injektor-System des GC-Systems vermutet. Eine Racemisierung im Verlaufe der Chromatographie an der chiralen Trennsäule kann aufgrund der beobachteten guten Trennung der HDMF-Enantiomere ausgeschlossen werden. Gaschromatographische Methoden sind daher für die enantioselektive Analyse von HDMF nicht geeignet.

3.6.3.3 Entwicklung einer neuen Methode zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von HDMF mittels Chiralphasen Kapillaronenelektrophorese

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

Das Trennprinzip der Kapillaronenelektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld, wobei die Ladung der Teilchen die Migrationsrichtung vorgibt. Anwendung finden heute üblicherweise Fused-Silica-Kapillaren, die Innendurchmesser von 10 – 100 μm aufweisen. Die Kapillare wird mit einer Pufferlösung gefüllt und ihre Endungen in je ein Reservoir mit der gleichen Pufferlösung eingetaucht. Innerhalb der Reservoirs befinden sich Platinelektroden, die über eine Hochspannungsquelle miteinander verbunden sind (Abb. C-36). Durch Anlegen einer Spannung von bis zu 30 kV ergibt sich je nach Länge der Kapillare (25 bis 75 cm) ein unterschiedlich starkes elektrisches Feld. Die entstehende Joulsche Wärme kann aufgrund des günstigen Volumen-Oberflächen-Verhältnisses der Kapillaren effektiv abgeleitet werden (Christians, 2001).

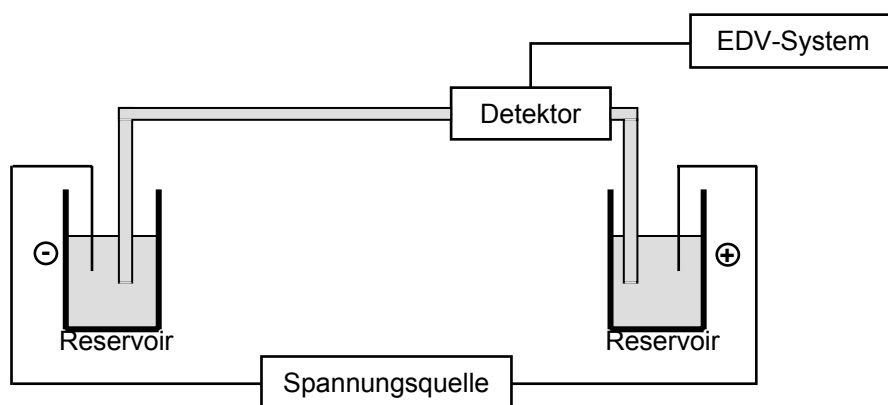


Abb. C-36: Schematischer Aufbau eines Kapillaronenelektrophorese-Gerätes (Christians, 2001).

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

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die aus $\alpha(1,4)$ -glycosidisch verknüpften D-Glucosemolekülen aufgebaut sind. Sie werden durch Einwirkung von Cyclodextringlycosyltransferasen von *Bacillus macerans* auf Stärke erhalten. Dabei entstehen in erster Linie aus 6, 7 oder 8 Glucopyranosemolekülen aufgebaute Cyclodextrine, die als α , β und γ -Cyclodextrine bezeichnet werden.

Cyclodextrine wurden in der Kapillaronenelektrophorese erfolgreich für die Enantiomerentrennung einer Vielzahl von chiralen Analyten eingesetzt (Holzgrave und Christians, 2002). Sie besitzen die Eigenschaft mit dem Analyten Komplexe in Form von Einschluss-

verbindungen zu bilden, die durch sekundäre Wechselwirkungen, wie z. B. Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte stabilisiert werden (Szejtli, 1988). Für die Trennung von neutralen chiralen Analyten, die im elektrischen Feld keine eigene elektrophoretische Mobilität besitzen, hat sich der Einsatz von negativ geladenen Cyclodextrinen (sulfatierte und carboxylierte Cyclodextrine) bewährt. Das anionische Cyclodextrin wandert im elektrischen Feld zur Anode und transportiert infolge von Einschlussverbindungen den Analyten in die gleiche Richtung. Aufgrund von unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten werden die Enantiomere getrennt (Christians, 2001).

3.6.3.4 Analyse einer HDMF-Referenz mittels cKZE

Die Analyse einer HDMF-Referenzprobe wurde unter Verwendung einer Fused-Silica-Kapillare (30/40.2 cm, i.D. 50 μm) durchgeführt.⁴ Als Puffer diente eine 50 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 4), der 20 mM Heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD) zugesetzt waren. Die Probenlösung wurde mit Druck injiziert (hydrodynamische Injektion) und die Trennung bei 25°C unter Anlegung einer Spannung von 10 kV durchgeführt. Die Detektion erfolgte photometrisch (UV-VIS) bei 280 nm. Mittels der beschriebenen Methode ließen sich die HDMF-Enantiomere innerhalb von 20 Minuten mit einer Enantiomerenauflösung von $R_s = 2.6$ trennen (Abb. C-38 A).

R_s -Werte werden allgemein nach folgender Formel berechnet:

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

3.6.3.5 Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit von HDMF

Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Methoden zur Analyse der natürlichen Verteilung der HDMF-Enantiomere sind Kenntnisse der Racemisierungsgeschwindigkeit des HDMF-Moleküls. Mit Hilfe der cKZE sollte die Racemisierungsgeschwindigkeit von

⁴ Diese Untersuchungen wurden dankenswerter Weise von U. Schmitt im Arbeitskreis von Prof. U. Holzgrabe am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt.

HDMF in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums bestimmt werden. Dazu wurde nach Trennung der Enantiomere an Chiraspher NT[®] enantiomerenangereichertes HDMF aufgefangen und in Pufferlösungen der pH-Werte 2, 3.8, 5 und 7 überführt. Obwohl eine Basislinientrennung der HDMF-Enantiomere mit Hilfe der Chiralphasen HPLC an Chiraspher NT[®] nicht zu realisieren war, lagen die Enantiomerenüberschüsse der getrennt gesammelten optischen Isomere bei Werten von über 80 %*ee*. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Lösungen mittels cKZE auf ihr Enantiomerenverhältnis analysiert. Der Verlauf der Racemisierung der einzelnen Proben ist anhand ihrer *ee*-Werte (*e*nantiomeric *e*xcess) in Abb. C-37 dargestellt.

Enantiomerenüberschüsse werden allgemein nach folgender Formel berechnet (Schurig und Weber, 1983):

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

Werden zur Trennung der Enantiomere wie im gegebenen Fall chromatographische Methoden angewandt, können zur Berechnung anstelle der Stoffmengen die Flächen unter den Signalen beider Enantiomere herangezogen werden.

Die Ergebnisse verdeutlichen eine starke Abhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit vom pH-Wert. Während im neutralen Bereich innerhalb von 48 Stunden eine vollständige Racemisierung beobachtet werden konnte, änderte sich der *ee*-Wert im leicht sauren Bereich (pH 3.8 – 5) im gleichen Zeitraum nur geringfügig um ca. 2%. Im stärker sauren Milieu (pH 2) tritt erneut eine Zunahme der Racemisierungsgeschwindigkeit auf. Diese Daten beweisen die deutlich langsamer ablaufende Keto-Enol-Tautomerisierung des HDMF-Moleküls im sauren Milieu gegenüber dem neutralen Milieu. Im schwach sauren pH-Bereich erreicht die Geschwindigkeit der Keto-Enol-Tautomerie ein Minimum.

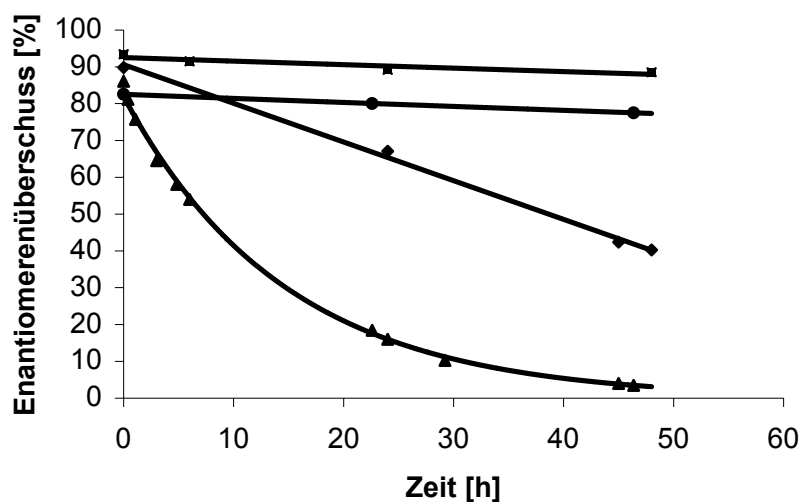


Abb. C-37: Zeitlicher Verlauf der Racemisierung von HDMF bei pH 2 (◆), pH 3.8 (●), pH 5 (■) und pH 7 (▲).

Bestätigt wurde die gezeigte pH-Abhängigkeit der Racemisierung von HDMF durch NMR-Studien von Hauck (2003). Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie beobachtete Hauck den Austausch des am C-2 des Furanonrings gebundenen Protons gegen Deuterone aus dem Medium ($^2\text{H}_2\text{O}$). Im neutralen Milieu fand ein vollständiger Austausch des C-2 Protons binnen 24 Stunden statt, wohingegen bei pH 5 und pH 2.1 Abnahmen der Signalintensitäten von nur 10 % bzw. 35 % beobachtet wurden. Nach 72 Stunden waren bei pH 5 nur 25 % der C-2-Protonen durch Deuterone ersetzt. Auch Daten von Capon und Kwok (1989) bestätigen die mittels cKZE beobachtete Abhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit vom pH-Wert. Bei ihren Untersuchungen zur pH-Wert-Abhängigkeit der Ketonisierung von 3-Hydroxyfuran beobachteten sie im Bereich von pH 3.5 bis pH 5.5 eine maximale Stabilität der Ketoform.

Die Ergebnisse zeigen, dass Untersuchungen zur Enantiomerenanreicherung von HDMF im leicht sauren Milieu stattfinden müssen. Neutrale pH-Werte hingegen eignen sich aufgrund der schnellen Racemisierung nicht für derartige Untersuchungen.

3.6.3.6 Bestimmung des optischen Drehwinkels der HDMF-Enantiomere

Die Analyse der HDMF-Enantiomere mit Hilfe der cKZE erlaubte die genaue Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses und lieferte damit die Voraussetzung für die Ermittlung des optischen Drehwertes der HDMF-Enantiomere. Mit Hilfe der Chiralphasen HPLC an Chiraspher NT[®] wurden die beiden optischen Isomere des HDMF wie zuvor beschrieben semipräparativ getrennt. Der optische Drehwert der erhaltenen enantiomerenangereicherten HDMF-Lösungen wurde mittels Polarimetrie gemessen. Die cKZE lieferte die genauen Enantiomerenverhältnisse der HDMF-Isomere in den beiden Probenlösungen und der absolute HDMF-Gehalt wurde mit Hilfe der RP-HPLC-UV bestimmt. Aus den ermittelten Daten konnte der spezifische Drehwert der Enantiomere mit $[\alpha]_D' = \pm 96^\circ$ berechnet werden. Dabei zeigte das linksdrehende Isomer (-) unter den eingesetzten HPLC-Bedingungen die höhere Mobilität im Vergleich zum rechtsdrehenden (+). Beide chirale Trennmethode, Chiralphasen HPLC und cKZE, wiesen die gleiche Elutionsreihenfolge der Isomere auf. Der ermittelte Wert muss allerdings als Näherungswert angesehen werden. Die geringen HDMF-Konzentrationen (ca. 0.2 mg/l), die in der geringen Trennkapazität der Chiralphasen HPLC begründet sind und die damit verbundenen geringen absoluten Drehwerte der Probenlösungen stellen potentielle Fehlerquellen bei den durchgeführten Untersuchungen dar.

3.6.3.7 Enantioselektive Analyse von natürlichem HDMF aus Erdbeerfrüchten

HDMF konnte bisher aus einer ganzen Reihe von Früchten (Ohloff, 1969; Sundt, 1970; Kallio, 1976; Honkanen und Mitarbeiter, 1980; Rapp und Mitarbeiter, 1980; Pickenhagen und Mitarbeiter, 1981; Buttery und Mitarbeiter, 1994), Fermentationsprodukten (Preininger und Mitarbeiter, 1994; Preininger und Grosch, 1995; Milo und Reineccius, 1997) und aus Insekten (Farine und Mitarbeiter, 1993) isoliert werden. Bisher wurde allerdings mit Hilfe der Chiralphasen GC nur racemisches HDMF in Erdbeeren und Ananas gefunden (Bruche und Mitarbeiter, 1991). Dennoch kann eine stereoselektive Biosynthese, gefolgt von rascher Racemisierung durch Tautomerisierung, nicht ausgeschlossen werden (Roscher und Mitarbeiter, 1997b). Daher sollte das Enantiomerenverhältnis des HDMF aus Erdbeerfrüchten mit Hilfe der cKZE untersucht werden. Reife Erdbeerfrüchte wurden nach Zugabe von Wasser homogenisiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand filtriert. HDMF ist

mittels Diethylether extrahiert und mit Hilfe der Chiralphasen HPLC und cKZE analysiert worden. Es konnte bestätigt werden, dass aus Erdbeeren isoliertes HDMF, wie bereits durch Bruce und Mitarbeiter (1991) veröffentlicht, racemisch ist (Abb.C-38 B). Eine Racemisierung von HDMF wäre jedoch bereits in der Frucht, evtl. durch Lagerung im neutralen pH-Bereich, möglich. Aufgrund der geringen Aufarbeitungszeit kann eine Racemisierung während der Aufarbeitung ausgeschlossen werden.

3.6.3.8 Enantioselektive Analyse von HDMF gebildet durch cytosolischen Proteinextrakt aus Erdbeerfrüchten

Die bisher dargestellten Ergebnisse, die mit den Inkubationsansätzen mit cytosolischem Erdbeerproteinextrakt erzielt wurden, deuteten darauf hin, dass mindestens ein Reaktionsschritt der Bildung von HDMF enzymatisch katalysiert wird. Als eindeutiger Beleg einer enzymatischen Katalyse muss sicherlich der Nachweis einer enantioselektiven Bildung von HDMF gelten. Voraussetzung für einen solchen Nachweis war allerdings die Variation der bisherigen Standardinkubationsbedingungen. Um eine rasche Racemisierung schon während der Inkubation zu vermeiden, wurde in Abweichung von den bisherigen Versuchen nicht im Neutralen (pH 7) sondern im leicht Sauren (pH 5) inkubiert. Aufgrund dieser für enzymatische Reaktionen recht drastischen pH-Wert Änderung musste mit einer deutlichen Aktivitätseinbuße gerechnet werden. Vorversuche hatten aber bereits gezeigt, dass auch bei einem pH-Wert von 5.0 HDMF gebildet wird.

Analyse mittels Chiralphasen HPLC

Ein frisch hergestellter cytosolischer Proteinextrakt aus reifen Erdbeerfrüchten wurde aliquotiert und gegen Phosphatpufferlösung der pH-Werte 7 und 5 dialysiert. Die dialysierten Extrakte sind mit D-Fructose-1,6-diphosphat unter Zusatz von NADH inkubiert worden. Daneben wurde in einem Kontrollversuch D-Fructose-1,6-diphosphat mit NADH in einer Pufferlösung mit pH 5 umgesetzt. Die Extraktion des gebildeten HDMF erfolgte mittels Diethylether. Nach Konzentrierung des Diethylether-Extraktes wurde mit n-Pentan rückverdünnt, da sich hohe Diethyletherkonzentrationen in den Proben negativ auf die chromatographische Trennung der HDMF-Enantiomere auswirkten. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Chiralphasen HPLC an Chiraspher NT[®] mit UV-Detektion bei 285 nm (Abb.

C-38 C-E). Auch wenn die Trennleistung der Chiralphasen HPLC an Chiraspher NT[®] keine Aussagen über exakte Enantiomerenverhältnisse zulässt, wird im Inkubationsversuch bei pH 5 dennoch eine Anreicherung des (-)-Isomers gegenüber dem (+)-Enantiomer deutlich. Im neutralen pH-Bereich, sowie bei der chemischen Bildung von HDMF im Kontrollversuch ist hingegen keine Anreicherung eines der beiden Enantiomere erkennbar. Dem Hinweis auf eine enantioselektive Bildung von HDMF bei pH 5 sollte mit Hilfe der cKZE bestätigt werden.

Analyse mittels Chiralphasen Kapillarzonenelektrophorese

Die vereinigten organischen Extrakte der beschriebenen Inkubationsexperimente bei pH 5 bzw. pH 7 wurden konzentriert und mittels RP-HPLC aufgereinigt. Die hierbei gesammelten, HDMF-enhaltenden Fraktionen wurden bis fast zur Trockne konzentriert, Ammoniumacetat-Puffer (pH 4.0) zugefügt und die erhaltenen Lösungen mit Hilfe der CD-modifizierten KZE analysiert. Während das Inkubationsexperiment bei pH 5 einen charakteristischen Enantiomerenüberschuss von 32 %*ee* aufwies (Abb. C-38 D), wurde im Inkubationsexperiment bei pH 7 racemisches HDMF gebildet (Abb. C-38 C). Bei pH 5 war, wie nach den Ergebnissen der Chiralphasen HPLC-Analytik zu erwarten, das (-)-HDMF als zuerst eluierendes Enantiomer im Vergleich zu seinem optischen Isomer (+)-HDMF angereichert. Damit gelang erstmals der Nachweis einer enantioselektiven Biosynthese von HDMF bei Inkubationsversuchen mit Erdbeerproteinextrakt. Im Gegensatz dazu ist, wie bereits erwähnt, aus Erdbeerfrüchten extrahiertes HDMF racemisch (Abb. C-38 B). Es wird daher angenommen, dass die HDMF-Biosynthese in der intakten Frucht in Kompartimenten wie z.B. dem Cytosol stattfindet, die durch einen neutralen pH-Wert gekennzeichnet sind.

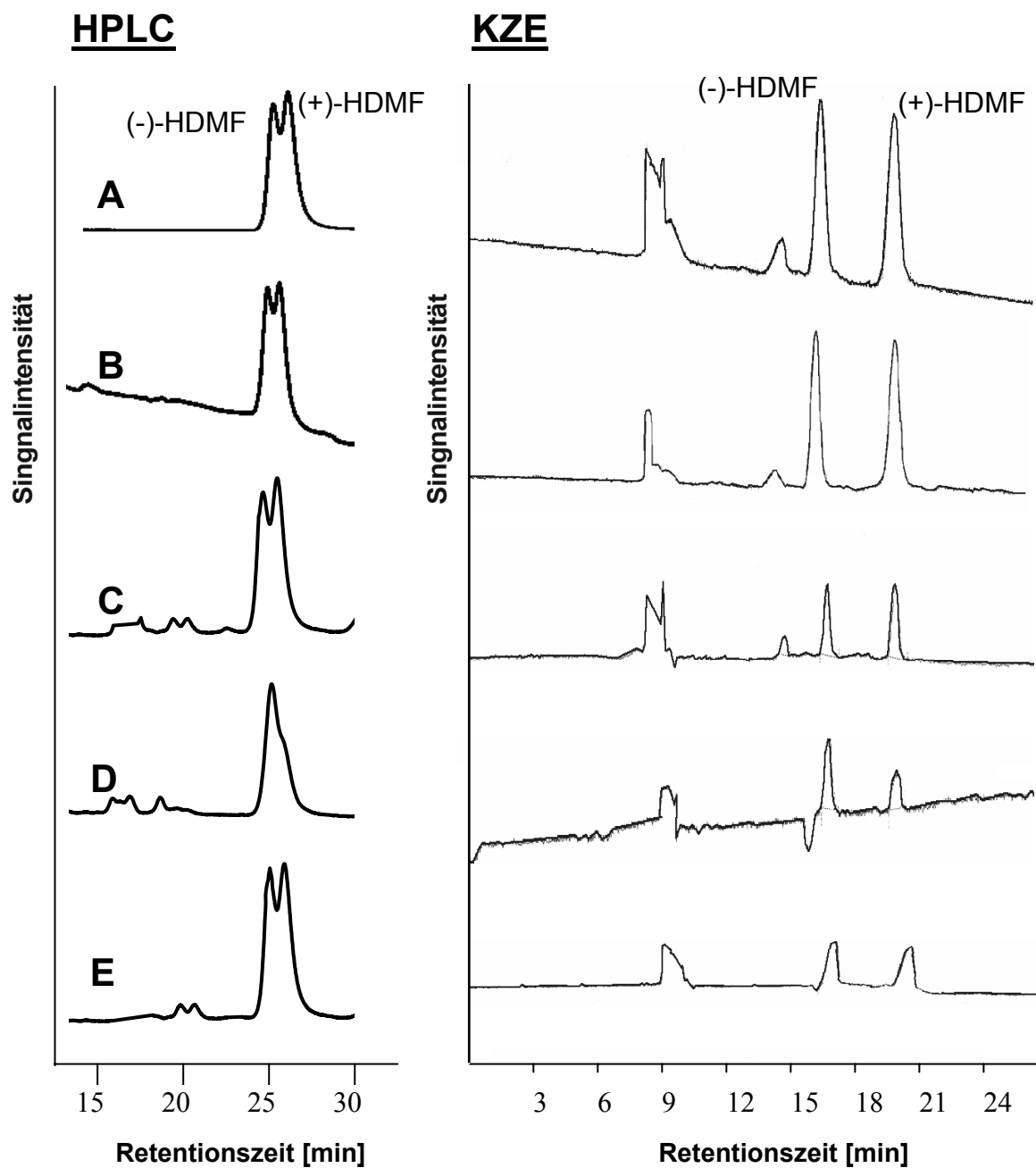


Abb. C-38: Chiralphasen HPLC- und cKZE-Analyse von HDMF (UV 285 nm);
A kommerzielle racemische HDMF-Referenz;
B natürliches HDMF extrahiert aus reifen Erdbeerfrüchten;
C HDMF gebildet durch einen Erdbeerproteinextrakt bei pH 7;
D HDMF gebildet durch einen Erdbeerproteinextrakt bei pH 5;
E chemisch aus D-Fruktose-1,6-diphosphat und NADH gebildetes HDMF bei pH 5.

3.6.4 Diskussion

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

Die neu entwickelte Analysenmethode ermöglichte die Untersuchung der Abhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit der HDMF-Enantiomere vom pH-Wert des Mediums. Enantiomerenangereichertes HDMF wurde dazu durch Fraktionierung mittels Chiralphasen HPLC gewonnen. Im neutralen Milieu unterliegt HDMF einer raschen Racemisierung, wodurch jegliche Stereoinformation verloren geht. Im schwach-sauren bis sauren Milieu läuft hingegen eine langsame Racemisierung ab. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Hauck (2003) der mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie die pH-Abhängigkeit der Tautomerisierung von HDMF charakterisierte. Die Einstellung des Keto-Enol-Gleichgewichts wird allgemein sowohl durch Säuren als auch durch Basen katalysiert. Da im HDMF-Molekül jedoch elektronenanziehende Substituenten in α -Stellung zur Carbonylfunktion stehen (Hydroxylfunktion an C-4 und der Sauerstoff im Furanonring), ist die Basizität der Carbonylfunktion und damit auch die katalytische Beschleunigung der Keto-Enol-Tautomerie durch Säuren deutlich herabgesetzt. Die Abgabe des α -Protons (H-2) ist andererseits dadurch im Basischen deutlich erleichtert, was eine beschleunigte basenkatalysierte Keto-Enol-Tautomerie zur Folge hat (Christen, 1977). Grundvoraussetzung für den Nachweis einer Enantiomerenanreicherung ist demzufolge ein schwach-saurer bis saurer pH-Wert des Mediums. Dementsprechend war enantiomerenangereichertes HDMF trotz geringerer Ausbeute nur beim Inkubationsversuch mit pH 5 nachweisbar. Die hohe Geschwindigkeit der Keto-Enol-Tautomerie im Neutralen resultierte in einer Racemisierung des bei pH 7 gebildeten HDMF bereits während der Inkubation.

Erstmalig gelang somit der Nachweis einer enantioselektiven Biosynthese von HDMF in Inkubationsexperimenten mit Erdbeerproteinextrakt. Generell ist dies zeitgleich mit dem Nachweis der Bildung von enantiomerenangereichertem HDMF durch die Hefe *Z. rouxii*

(Hauck, 2003) der erste Beweis der enantioselektiven enzymatischen Biosynthese von HDMF. Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse konnte damit eindeutig die Beteiligung eines Enzyms an der Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in den Erdbeerproteinextrakten demonstriert werden. Basierend auf der neu entwickelten cKZE-Analysenmethode, den erhaltenen Informationen zur Racemisierung des HDMF-Moleküls wurden im Hinblick auf weitere Studien wichtige Grundlagen geschaffen.

3.7 Charakterisierung der enzymkatalysierten Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat

Vor der endgültigen Aufreinigung der nachgewiesenen enzymatischen Aktivität sollte diese durch weitere Inkubationsexperimente detailliert charakterisiert werden. Faktoren wie Inkubationstemperatur, pH-Wert, Substratmenge und –art und nicht zuletzt die Abhängigkeit der Aktivität vom Reifegrad der Erdbeeren sollten untersucht werden.

3.7.1 Variation der Inkubationstemperatur

Erdbeerproteinextrakte wurden nach C 3.2 isoliert und mit D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH bei Temperaturen zwischen 20° und 50°C für 24 h inkubiert. Nach RP-18-Festphasenextraktion erfolgte die Bestimmung der HDMF-Konzentrationen mittels RP-HPLC. Einem stetigen Anstieg an Aktivität von 20° bis hin zu 37°C folgte eine deutliche Abnahme bei weiterer Temperaturerhöhung auf 50°C, möglicherweise aufgrund einsetzender Denaturierung (Abb. C-39).

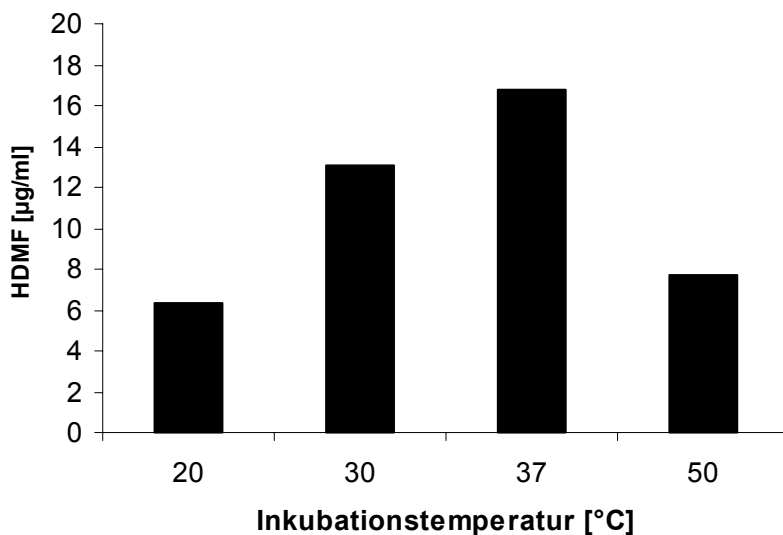


Abb. C-39: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die ermittelte HDMF-Konzentrationen bei Umsetzungsversuchen von D-Fructose-1,6-diphosphat mit dialysiertem cytosolischem Erdbeerproteinextrakt unter Zusatz von NADH.

3.7.2 Variation des pH-Wertes

Erdbeerproteinextrakte wurden nach C 3.2 isoliert und mit D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH bei pH-Werten im Bereich von pH 3 bis pH 9 für 24 h inkubiert. Nach RP-18-Festphasenextraktion erfolgte die Bestimmung der HDMF-Konzentrationen mittels RP-HPLC. Der Verlauf der ermittelten HDMF-Konzentrationen zeigt ein eindeutiges Maximum der Bildung bei pH 7 (Abb. C-40). Während höhere pH-Werte zu einer drastischen Abnahme der HDMF-Konzentrationen (pH 8) führen, nimmt die Menge an gebildetem HDMF hin zu niedrigeren pH-Werten etwas langsamer ab und ermöglichte so den Nachweis der Bildung von enantiomerenangereichertem HDMF (C 3.6.3.8). Höhere pH-Werte als 8 und niedrigere als 4 resultierten schließlich in einer vollständigen Inhibierung der HDMF-Synthese. Im Gegensatz dazu hatte der pH-Wert bei der rein chemischen Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH keinen Einfluss auf die gebildete Menge.

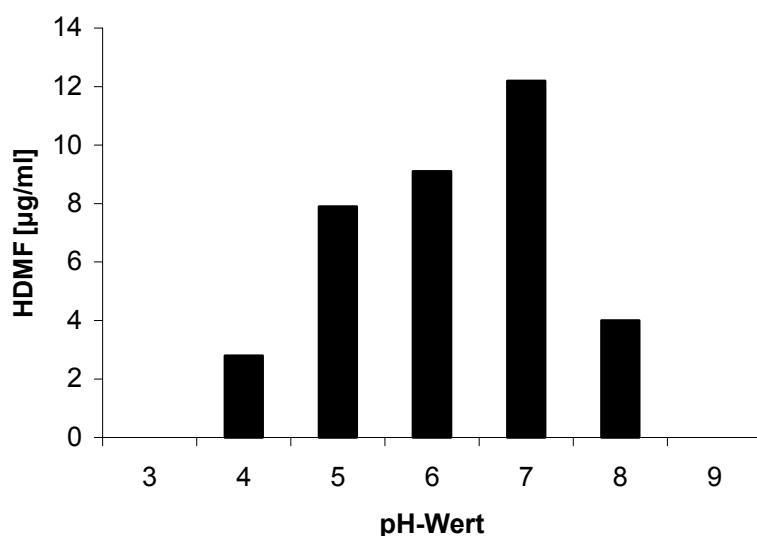


Abb. C-40: Einfluss des pH-Wertes des Inkubationsansatzes auf die ermittelte HDMF-Konzentrationen bei Umsetzungsversuchen von D-Fructose-1,6-diphosphat mit dialysiertem cytosolischem Erdbeerproteinextrakt unter Zusatz von NADH.

3.7.3 Einsatz unterschiedlicher Substratmengen – Michaelis-Menten-Kinetiken

Erdbeerproteinextrakte wurden nach C 3.2 isoliert und mit steigender Menge an D-Fructose-1,6-diphosphat sowie NADH bei 30°C für 24 h inkubiert. Nach RP-18-Festphasenextraktion erfolgte die Bestimmung der HDMF-Konzentrationen mittels RP-HPLC. Die Synthese von HDMF stellt eine Reaktion zweiter Ordnung mit den Substraten D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH dar. Zur Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetiken musste daher jeweils ein Substrat im Überschuss zugegeben werden, um eine Reaktion pseudoerster Ordnung zu erhalten. Die Menge des zweiten Substrates wurde jeweils in bestimmten Bereichen variiert. Sowohl bei der Variation von D-Fructose-1,6-diphosphat als auch von NADH wurden typische Michaelis-Menten-Kinetiken erhalten (Abb. C-41). Die K_m -Werte wurden graphisch zu 3.5 mM für D-Fructose-1,6-diphosphat sowie 30 μ M für NADH bestimmt.

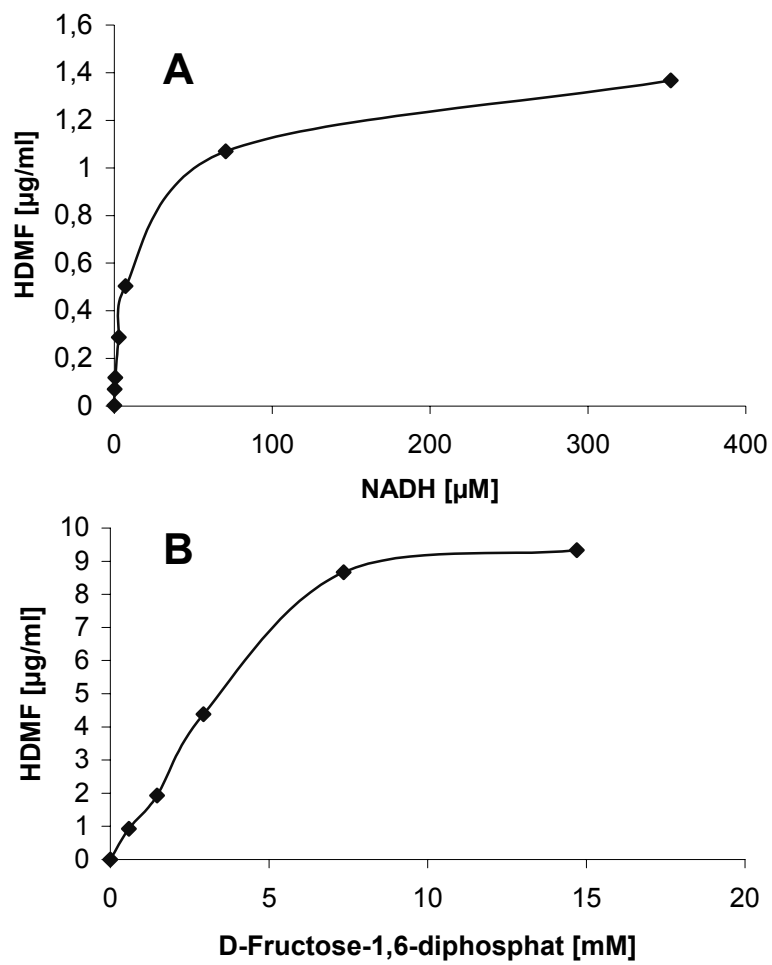


Abb. C-41: Michaelis-Menten-Kinetiken der HDMF-bildenden enzymatischen Aktivität aus Erdbeeren
A für NADH,
B für D-Fructose-1,6-diphosphat.

3.7.4 Einfluss des Reifegrades der Erdbeerfrüchte auf die Menge an gebildetem HDMF

Die Entwicklung der HDMF-bildenden Aktivität sollte im Verlauf der Erdbeerfruchtreifung untersucht werden. Es wurden Proteinextrakte dreier verschiedener Reifegrade gewonnen (grün, pink, rot) und diese mit D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH inkubiert. Beim Inkubationsexperiment mit dem Extrakt grüner Erdbeeren konnte kein HDMF detektiert werden. Die HDMF-Konzentration bei der Umsetzung mit dem Extrakt pinker Beeren lag bei etwa 60 % verglichen mit der Konzentration bei der Umsetzung mit roten Früchten (Abb. C-42).

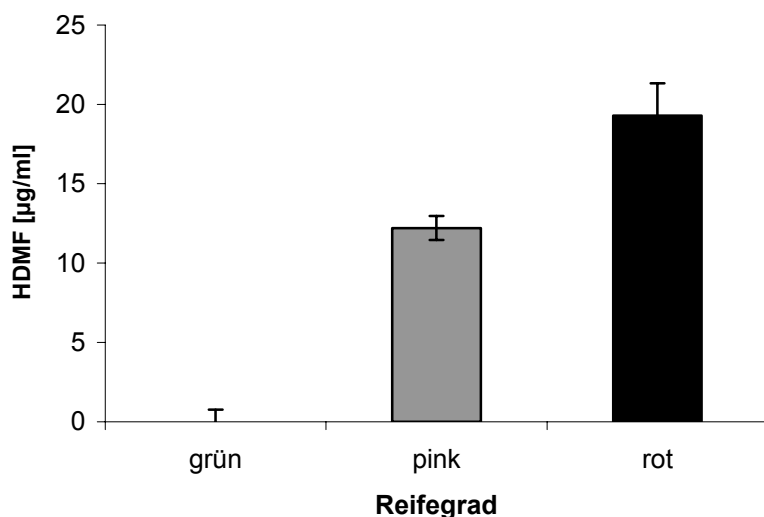


Abb. C-42: Einfluss des Reifegrades der verwendeten Erdbeeren auf die ermittelten HDMF-Konzentrationen bei Umsetzungsversuchen von D-Fructose-1,6-diphosphat mit dialysiertem cytosolischem Erdbeerproteinextrakt unter Zusatz von NADH.

Die Ergebnisse deuteten eindeutig auf eine reifeinduzierte Expression des für die Bildung von HDMF verantwortlichen Enzyms hin. Die Daten korrelieren gut mit Untersuchungen der HDMF-Gehalte von Erdbeerfrüchten verschiedener Reifegrade (Sanz und Mitarbeiter, 1995; Pérez und Mitarbeiter, 1996). Zur Extraktgewinnung wurde jeweils das gleiche Erd-

beerfrischgewicht eingesetzt. Die extrahierte Proteinmenge wurde nicht berücksichtigt. Alleine auf die bereits beschriebene (C 2.2.2) ineffektivere Proteinextraktion bei der Gewinnung der Extrakte aus weißen und grünen Erdbeerfrüchten kann der beobachtete signifikante Anstieg der Menge an gebildetem HDMF jedoch nicht zurückgeführt werden.

3.7.5 Variation der Substrate

Erdbeerproteinextrakte wurden nach C 3.2 isoliert und mit äquivalenten Stoffmengen verschiedener Substrate sowie NADH bei 30°C für 24 h inkubiert. Nach RP-18-Festphasenextraktion erfolgte die Bestimmung der HDMF-Konzentrationen mittels RP-HPLC. D-Fruktose-1,6-diphosphat zeigte dabei die höchste Umsatzrate gefolgt von D-Fruktose-6-phosphat, D-Glucose-6-phosphat und D-Glucose (Abb. C-43). Diese Daten bestätigen die von Roscher und Mitarbeitern (1998) ermittelten Inkorporationsraten nach Applikation der entsprechenden radioaktiv markierten Verbindungen an ganze Erdbeerfrüchte und den daraus abgeleiteten Biosynthese- und Metabolismusweg für HDMF (Abb. B-9).

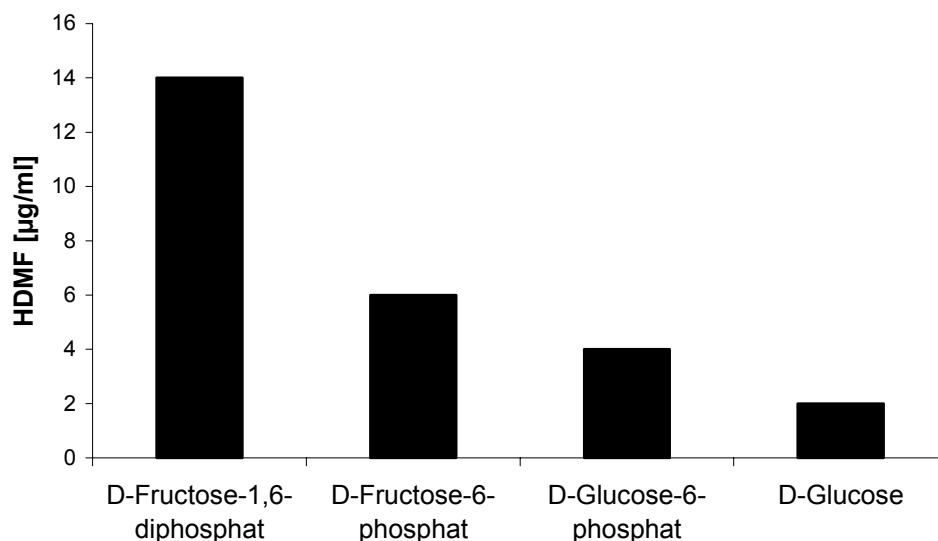


Abb. C-43: Ermittelte HDMF-Konzentrationen bei Umsetzungsversuchen von D-Fruktose-1,6-diphosphat, D-Fruktose-6-phosphat, D-Glucose-6-phosphat und D-Glucose mit dialysiertem cytosolischem Erdbeerproteinextrakt unter Zusatz von NADH.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des eingesetzten Reduktionsäquivalentes auf die HDMF-Bildung während der Inkubation untersucht. Dazu wurden Erdbeerproteinextrakte mit D-Fructos-1,6-diphosphat unter Zusatz von NADH bzw. NADPH inkubiert. Die gebildete Menge an HDMF erwies sich als unabhängig vom verwendeten Reduktionsäquivalent. NADH und NADPH wurden gleich gut akzeptiert.

3.8 Aufreinigung der HDMF-bildenden enzymatischen Aktivität

Alle bisherigen Inkubationsexperimente wurden mit dialysiertem Erdbeerproteinextrakt durchgeführt. Auf der Grundlage der gesammelten Daten sollte nun versucht werden, die HDMF-bildende enzymatische Aktivität proteinchemisch aufzureinigen. Dazu musste zunächst eine zur Dialyse alternative, schnellere Methode gefunden werden, um natürliches HDMF der Erdbeere von den Proteinen zu separieren. Lange Aufarbeitungszeiten sollten im Hinblick auf den Erhalt an enzymatischer Aktivität vermieden werden. Es wurde daher die Gelfiltration an einer Bio-Gel[®]-Säule (Polyacrylamid-Gel) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 6000 Da eingesetzt, um enthaltene Proteine selektiv von Verbindungen mit kleinem Molekulargewicht zu trennen. Der Elutionszeitpunkt der Proteine wurde mit Hilfe der photometrischen Proteinbestimmungsmethode nach Bradford ermittelt. Nach der Aufreinigung über die Bio-Gel[®]-Säule konnte die HDMF-bildende Aktivität in der Proteinfraction wieder gefunden werden.

3.8.1 Trennung anhand des Molekulargewichtes

3.8.1.1 Ultrafiltration

Eine erste Abschätzung des Molekulargewichtes erfolgte mittels Ultrafiltration, bei der Membranen mit Ausschlussgrenzen von 10, 30, 50 und 100 kDa verwendet wurden. Ein über Bio-Gel[®] entsalzter Extrakt wurde so in Fraktionen bestimmter Molekulargewichtsbereiche separiert und diese mit D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH inkubiert. HDMF wurde fast ausschließlich in der Fraktion mit Molekulargewichten zwischen 30 und 50 kDa gebildet. Kleine Mengen an HDMF konnten auch in der Fraktion mit Molekulargewichten

zwischen 10 und 30 kDa nachgewiesen werden (Abb. C-44). Das Molekulargewicht des gesuchten Proteins muss deshalb etwa 30 kDa betragen.

Für die weitere Aufreinigung wurden die Fraktionen zwischen 10 und 50 kDa vereinigt und durch erneute Ultrafiltration mit einer 10 kDa Membran entsalzt und konzentriert.

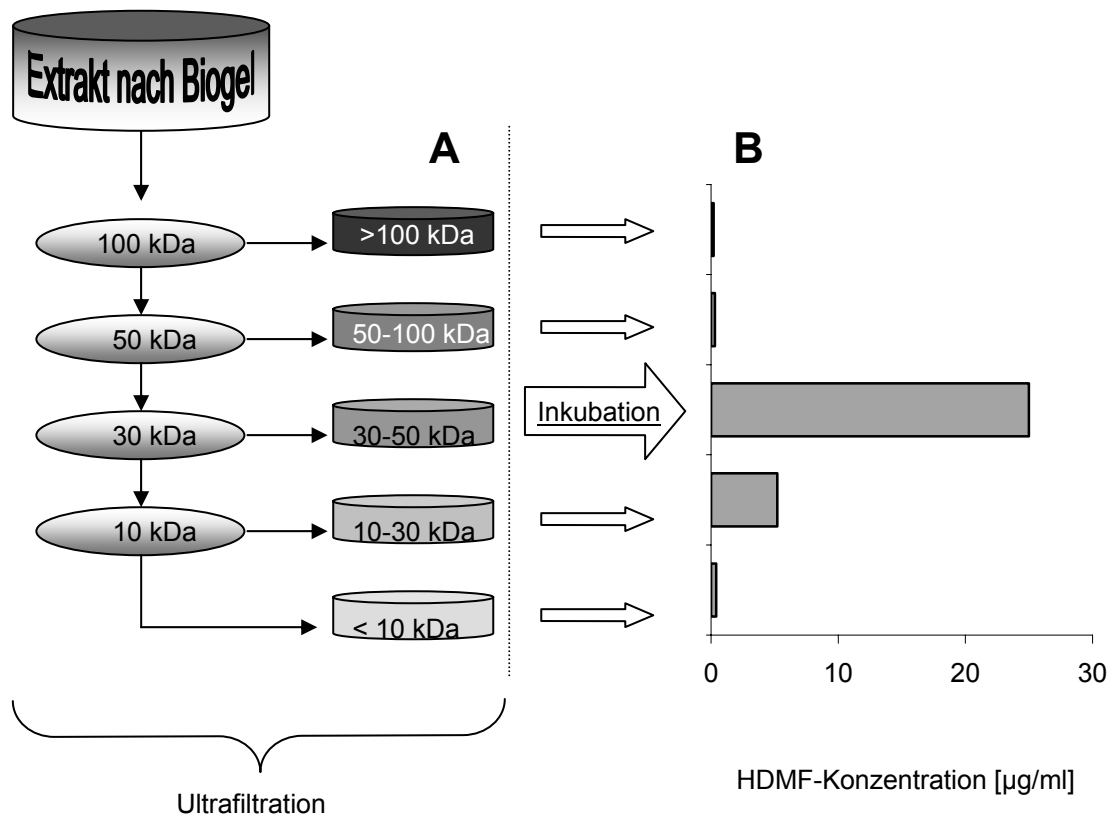


Abb. C-44: A Schematische Darstellung der Trennung eines über Bio-Gel[®] vorgereinigten Erdbeerproteinextraktes in verschiedene Molekulargewichtsbereiche mittels Ultrafiltration unter Verwendung von Membranen definierter Ausschlussgrenzen

B Aktivitätsverlauf bestimmt durch Inkubation der erhaltenen Fraktionen mit D-Fruktose-1,6-diphosphat und NADH und anschließender Quantifizierung des gebildeten HDMF mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm.

3.8.1.2 Gelpermeationschromatographie

Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie (GPC) sollte die erhaltene Proteinfraction des Molekulargewichtsbereichs zwischen 10 und 50 kDa weiter aufgereinigt werden. Zudem erlaubt die Gelfiltration nach Kalibrierung mit Markersubstanzen eine Abschätzung des Molekulargewichts des gesuchten Enzyms. Es wurden Fraktionen zu 4 ml gesammelt und einzeln mit D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH inkubiert. Abb.C-45 A zeigt den Verlauf der wieder gefundenen Aktivität.

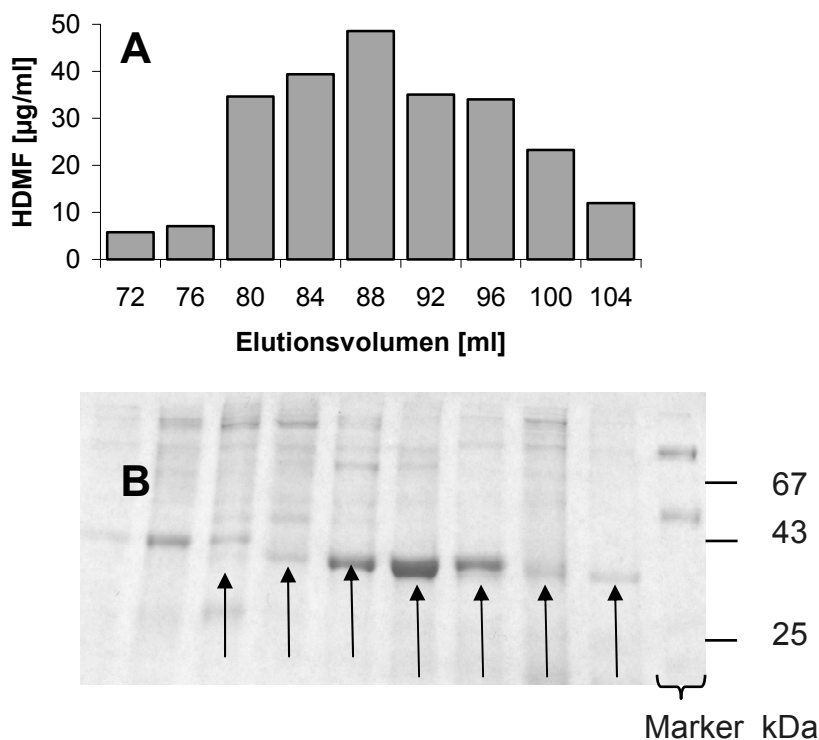


Abb. C-45: Trennung der durch Ultrafiltration eines Erdbeerproteinextraktes erhaltenen, 10-50 kDa Fraktion mittels GPC an Sephacryl S300.

A Aktivitätsverlauf, bestimmt durch Inkubation der gesammelten Fraktionen mit D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH und anschließender Quantifizierung des gebildeten HDMF mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm

B SDS-PAGE-Analyse der aktiven Fraktionen; mit der Aktivität korrelierende Proteinbanden sind durch Pfeile markiert.

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts des gesuchten Proteins wurde die Sephacryl S300 Säule mit einer Proteinstandard-Mischung bestehend aus Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) sowie Ribonuclease A (14 kDa) kalibriert. Zusätzlich ist das Totvolumen mit Dextranblau sowie das Bettvolumen mit Aceton bestimmt worden. Das native Molekulargewicht konnte zu ca. 30 kDa bestimmt werden. Aufgrund des Fraktionsvolumens von 4 ml und der damit ungenauen Bestimmung des Elutionsvolumens ist dies jedoch lediglich ein Näherungswert. Dennoch korreliert er gut mit der Abschätzung des Molekulargewichts durch die Ultrafiltrationsexperimente.

3.8.2 Trennung durch Ionenaustauschchromatographie

Alle bisher verwendeten Aufreinigungsverfahren beruhen auf der Trennung von Molekülen alleine anhand ihrer Molekulargewichte. Damit ist aber die Aufreinigung von Proteinen ähnlicher Molekulargewichte nahezu ausgeschlossen. Für die weitere Isolierung der HDMF-bildenden Aktivität wurde daher die Ionenaustauschchromatographie (IEC) an Q-Sepharose gewählt. Ein Extrakt ist über Bio-Gel[®] und anschließender Ultrafiltration vorgereinigt worden. Die entsalzte Proteinlösung des Molekulargewichtsbereiches 10-50 kDa wurde auf das Säulenmaterial aufgetragen und die Säule mit Kalibrierpuffer gespült. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen 0 bis 0.4 M NaCl-Gradienten. Es wurden jeweils 10 ml Fraktionen gesammelt und durch Inkubation mit D-Fruktose-1,6-diphosphat und NADH auf enzymatische Aktivität im Hinblick auf eine HDMF-Bildung untersucht. Die Aktivität konnte innerhalb der Fraktionen 8 bis 13 wieder gefunden werden (Abb. C-46 A).

3.8.3 SDS-PAGE

Die aktiven Fraktionen, die sowohl nach GPC- als auch nach IEC-Fraktionierung erhalten wurden, wurden mit Hilfe der SDS-PAGE untersucht. Dazu sind die Fraktionen zunächst durch wiederholte Ultrafiltration entsalzt und anschließend zur Trockne lyophilisiert worden. Der Rückstand wurde in Probenpuffer aufgenommen und Aliquote zur SDS-PAGE-Analytik herangezogen. Die beobachteten Aktivitäten korrelierten auffällig mit der Präsenz einer einzelnen Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa (Abb. C-45 B,

Abb. C-46 B). Da diese Proteinbande jeweils bei den beiden unterschiedlichen chromatographischen Trennverfahren in den Fraktionen gefunden wurde, in denen enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde eine Beteiligung bei der HDMF-Biosynthese vermutet. Das Protein sollte daher isoliert und sequenziert werden.

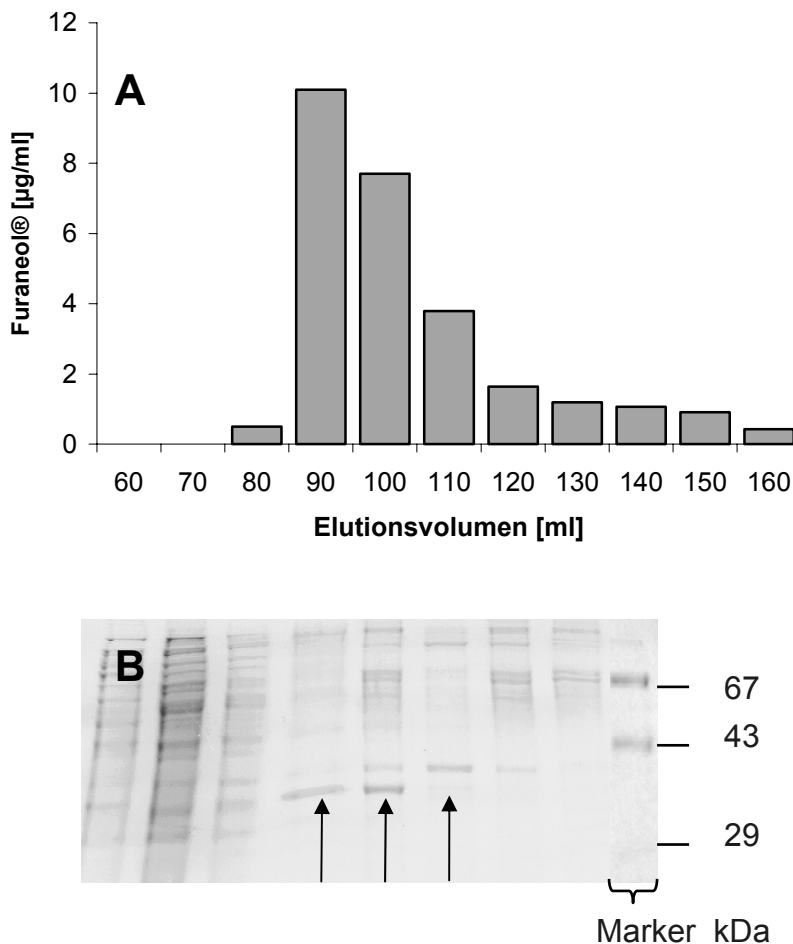


Abb. C-46: Aufreinigung der durch Ultrafiltration eines Erdbeerproteinextraktes erhaltenen 10-50 kDa Fraktion, durch Ionenaustauschchromatographie.

A Aktivitätsverlauf bestimmt durch Inkubation der gesammelten Fraktionen mit D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH und anschließender Quantifizierung des gebildeten HDMF mittels RP-HPLC-UV bei 285 nm

B SDS-PAGE-Analyse der aktiven Fraktionen; mit der Aktivität korrelierende Proteinbanden sind durch Pfeile markiert.

3.9 Sequenzierung des aufgereinigten Proteins

Die Aliquote der aktiven Fraktionen, die durch GPC (C 3.8.1.2) und IEC (C 3.8.2) erhalten wurden, wurden vereinigt und zur Sequenzanalyse⁵ herangezogen. Nach elektrophoretischer Trennung (Abb. C-47 A) der vereinigten Fraktionen sind die Proteine mittels Elektroblothing im Semi-Dry-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen und immobilisiert worden. Nach dem Anfärben zeigte sich jeweils eine Hauptproteinbande (Abb. C-47 A). Anhand seiner Wanderungstrecke konnte das Molekulargewicht zu 37 kDa bestimmt werden.

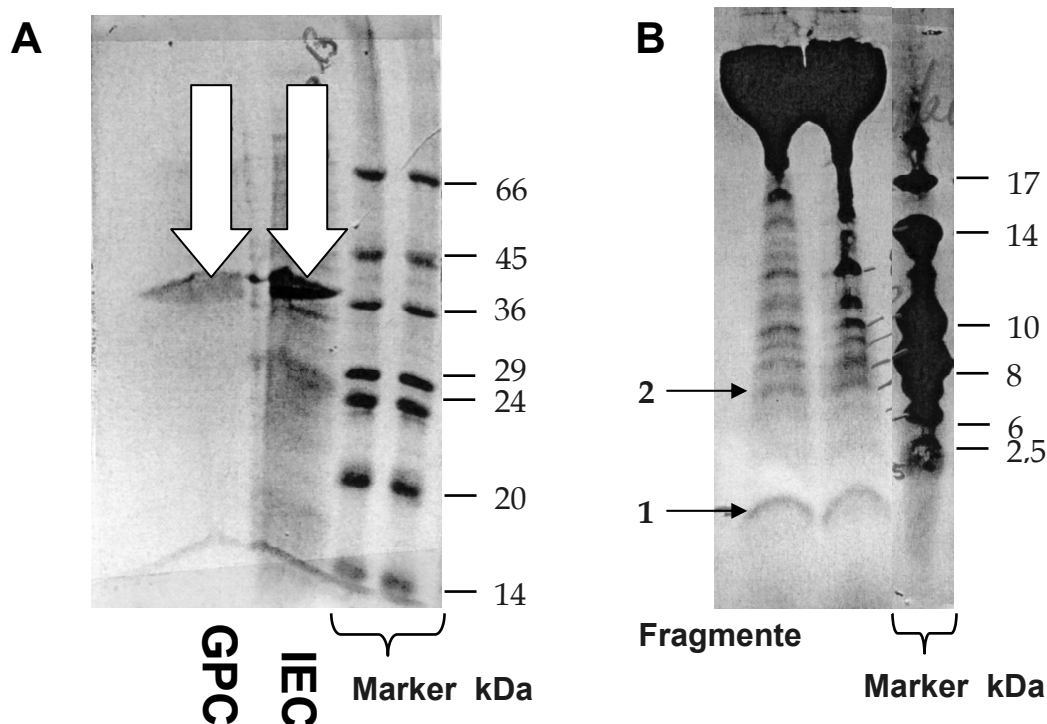


Abb. C-47: A PAGE der vereinigten aktiven Fraktionen nach Auftrennung eines Erdbeerproteinextraktes mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) sowie Ionenaustauschchromatographie (IEC);

B PAGE der markierten Banden nach Spaltung mittels Bromcyan.

⁵ Diese Untersuchungen wurden dankenswerter Weise von Dr. V. Hoppe im Arbeitskreis von Prof. J. Hoppe am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II der Universität Würzburg durchgeführt.

Die Proteinbande wurde anschließend ausgeschnitten, das Protein eluiert und zur Sequenzierung einem automatisierten Edman-Abbau unterzogen. Dabei reagiert im initiierten Schritt Phenylisothiocyanat (Edman-Reagens) bei milden alkalischen Bedingungen mit der N-terminalen Aminogruppe des Proteins unter Bildung ihres Phenylthiocarbamoyl-Addukts. Dieses Produkt wird mit wasserfreier Fluorwasserstoffsäure behandelt, wodurch der N-terminale Rest selektiv als Thiazolinon-Derivat abgespalten wird. Durch Behandlung mit wässriger Säure entsteht daraus das stabilere Phenylthiohydantoin-Derivat, das mittels HPLC durch Vergleich mit Standardreagenzien identifiziert werden kann. Trotz ausreichender Proteinmenge schlug der Sequenzierungsversuch jedoch fehl und legte so die Vermutung einer N-terminalen Blockierung durch Acetylierung nahe. Daher sollte das Protein vor einer erneuten Sequenzierung zunächst durch Einwirkung von Bromcyan selektiv an den Methioninresten in Peptidfragmente gespalten werden. Die Reaktion wird in saurer Lösung durchgeführt, die die meisten Proteine denaturiert, sodass im Normalfall die Spaltung an allen Methioninresten auftritt. Die erhaltene Proteinlösung wurde erneut durch PAGE unter Verwendung eines von Schägger und Jagow (1987) entwickelten Geles zur Trennung niedermolekularer Peptide untersucht (Abb. C-47 B). Die überwiegende Proteinmenge verblieb dabei jedoch im oberen Bereich des Trenngeles. Offensichtlich konnte keine zufriedenstellende Spaltung mittels Bromcyan realisiert werden. Als Ursache kam eine Oxidation der Methioninreste durch Luftsauerstoff im Verlauf des Aufreinigungsprozesses in Betracht. Daher wurde erneut ein Erdbeerproteinextrakt gewonnen und wie oben geschildert aufgereinigt, diesmal allerdings unter Zusatz des reduzierenden Agens Mercaptoethanol. Allerdings konnte auch hier nach Behandlung mit Bromcyan bei der anschließenden PAGE keine quantitative Spaltung des 37 kDa Proteins beobachtet werden. Das Auftreten mehrerer Peptidfragmente bei der PAGE wurde auf säurekatalysierte Spaltungsreaktionen zurückgeführt. Einige dieser Fragmente sind einem automatisierten Edman-Abbau unterzogen worden. Das kleinste Peptidfragment mit einem Molekulargewicht von etwa 1000 Da (Abb. C-47 B, Fragment 1) lieferte dabei eine Sequenz mit einer Länge von zehn Aminosäuren, von denen sieben eindeutig durch HPLC-Analytik identifiziert werden konnten.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Peptidfragmentes mit korrespondierenden Proteinsequenzen bereits sequenzierter Erdbeerfrucht cDNAs, der mit Hilfe des BLAST Pro-

grammes (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) durchgeführt wurde, lieferte eine vollständige Identität (Abb. C-48) der sieben nachgewiesenen Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz einer möglichen Chinon-Oxidoreduktase (AAO22131). Die Sequenz der vermuteten Chinon-Oxidoreduktase wurde von der Arbeitsgruppe Medina-Escobar und Mitarbeiter (1997) beim zufälligen Mustern einer cDNA-Bibliothek aus Erdbeerfrüchten (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) erhalten. Genexpressionsanalysen zeigten einen starken Anstieg der Expression während der Fruchtreifung (unveröffentlichte Daten). Zur Absicherung der ermittelten Identität wurde die Sequenz eines weiteren Fragmentes bestimmt (Abb. C-47 B, Fragment 2). Bedingt durch die geringe Proteinmenge konnten vier aus einer Folge von fünf Aminosäureresten bestimmt werden. Wiederum lieferte der Identitätsvergleich dieser Sequenz mit der Aminosäuresequenz der potentiellen Chinon-Oxidoreduktase vollständige Übereinstimmung (Abb. C-48).

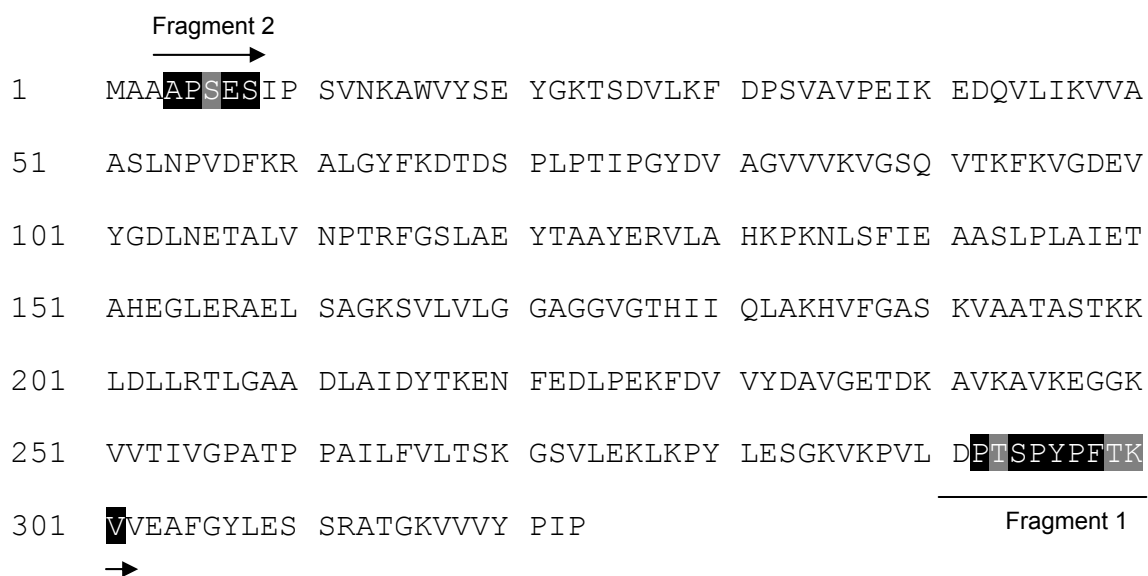


Abb. C-48: Aminosäuresequenz einer Chinon-Oxidoreduktase (Accession Nr. AAO22131) aus Erdbeeren. Sequenzidentitäten mit den Peptidfragmenten der 37 kDa Proteinbande, die durch säurekatalysierte Spaltung erhalten wurden, sind schwarz hinterlegt. Die grau hinterlegten Aminosäurereste konnten nicht eindeutig bestimmt werden.

3.10 Diskussion

Nach Inkubation eines dialysierten cytosolischen Proteinextraktes aus frischen, reifen Erdbeerfrüchten mit D-Fructose-1,6-diphosphat unter Zusatz des Reduktionsäquivalentes NADH konnte die Bildung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF, Furaneol[®]) nachgewiesen werden. Die Abgrenzung von einer ebenfalls auftretenden rein chemischen Bildung von HDMF ohne Beteiligung von Erdbeerproteinextrakt konnte durch die Charakterisierung der enzymatischen Bildung hinsichtlich der eingesetzten Extraktmenge, des Einflusses einer Hitzebehandlung und des Einflusses des pH-Wertes, vor allem aber durch den Nachweis einer enantioselektiven Bildung von HDMF mittels cKZE getroffen werden. Auf der Grundlage des etablierten Inkubations-, Extraktions- und Analyseverfahrens wurde ein cytosolischer Erdbeerproteinextrakt hinsichtlich der enthaltenen HDMF-bildenden Aktivität zunächst mittels Ultrafiltration anschließend mittels GPC und IEC weiter aufgereinigt. Die Verteilung der Aktivität nach den beiden chromatographischen Trennverfahren lässt auf die Beteiligung eines einzelnen Enzyms bei der beobachteten Bildung von HDMF im Proteinextrakt schließen. Die SDS-PAGE Analytik der aktiven Fraktionen nach IEC und GPC lenkte die Aufmerksamkeit auf eine einzelne Proteinbande, die in allen aktiven Fraktionen der beiden unterschiedlichen Aufreinigungsmethoden zu finden war und deren Intensität gut mit der beobachteten Aktivitätsverteilung korrelierte. Das Molekulargewicht des Proteins beträgt etwa 37 kDa. Offensichtlich liegt das Protein als Monomer vor. Die N-terminale Sequenz konnte aufgrund einer N-terminalen Blockierung nicht bestimmt werden. Die Sequenzanalyse zweier Peptidfragmente, die durch säurekatalysierte Spaltung erhalten wurden, lieferten beim automatisierten Edman-Abbau zwei Peptidsequenzen, die vollständige Identität mit Teilsequenzen einer möglichen Chinon-Oxidoreduktase aus Erdbeeren aufwiesen. Das aus der Proteinsequenz errechnete Molekulargewicht beträgt 34.3 kDa und liegt damit im Größenbereich der für das aufgereinigte Protein ermittelten 37 kDa, zumal eventuelle Derivatisierungen (z.B. Glycosylierung) einzelner Aminosäurereste bei der Berechnung keine Berücksichtigung finden. Als außergewöhnlich muss das Fehlen von Methioninresten (mit Ausnahme des ersten Aminosäurerestes) innerhalb der Chinon-Oxidoreduktase-Sequenz gelten. Die unvollständige Spaltung des Proteins bei der Behandlung mit Bromcyan kann somit erklärt werden. Methionin ist in

pflanzlichen Proteinen zu 1-2 % vertreten (Belitz und Mitarbeiter, 2001). Mit einer durchschnittlichen relativen Häufigkeit von 1.7 % als Berechnungsgrundlage (<http://micro.magnet.fsu.edu/aminoacids/pages/methionine.html>), liegt damit die Wahrscheinlichkeit für das Fehlen innerhalb der Sequenz bei lediglich 0.39 %. Neben den ermittelten Sequenz-Identitäten kann dies als weiteres wichtiges Identifizierungsmerkmal bewertet werden. Bei der beschriebenen Chinon-Oxidoreduktase handelt es sich um ein stark reifeinduziertes Enzym. Sowohl die Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Extrakten unterschiedlicher Reifegrade als auch die während der Reifung der Erdbeerfrucht ansteigenden HDMF-Mengen passen somit ins Bild (Sanz und Mitarbeiter, 1995; Pérez und Mitarbeiter, 1996). Nam und Mitarbeiter (1999) konnten auch in der Walderdbeere *Fragaria vesca* ebenfalls einen cDNA Klon nachweisen, der für eine Chinon-Oxidoreduktase (CAA04767) kodiert. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz stimmt dabei exakt mit der Sequenz der Chinon-Oxidoreduktase aus Kulturerdbeeren überein. Enzyme, die an der HDMF Biogenese beteiligt sind, sollten generell sowohl in Kulturerdbeeren als auch in Walderdbeeren nachweisbar sein.

Pflanzenzellen enthalten mehrere verschiedene Typen NAD(P)H-abhängiger Chinon-Oxidoreduktasen (NQR): lösliche, Plasmamembran-gebundene und fest in mikrosomalen Membranen verankerte Formen. Lösliche NQR wurden bislang in Zuckerrüben (Trost und Mitarbeiter, 1995), in Tabakblättern (Sparla und Mitarbeiter, 1996), sowie im Hypocotyl von Zucchini (Trost und Mitarbeiter, 1997) untersucht. NQR werden häufig als funktionales Analogon der DT-Diaphorase von Säugetieren beschrieben (Trost und Mitarbeiter, 1995; Sparla und Mitarbeiter, 1996; Sparla und Mitarbeiter, 1998; Sparla und Mitarbeiter, 1999a). Wie DT-Diaphorasen (Iyanagi, 1987; Li und Mitarbeiter, 1995) sind NQR in der Lage Chinone durch den unmittelbaren Transfer zweier Elektronen zu entsprechenden Hydrochinonen umzuwandeln (Trost und Mitarbeiter, 1995; Sparla und Mitarbeiter, 1996) (Abb. C-49). Diese Fähigkeit unterscheidet sie grundsätzlich von Flavoreduktasen wie NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase oder NADH-Dehydrogenasen, die ein-Elektron-Chinon-Reduktionen katalysieren und damit zur Bildung reaktiver Semichinon-Zwischenverbindungen führen (Testa, 1995; Sparla und Mitarbeiter, 1998).

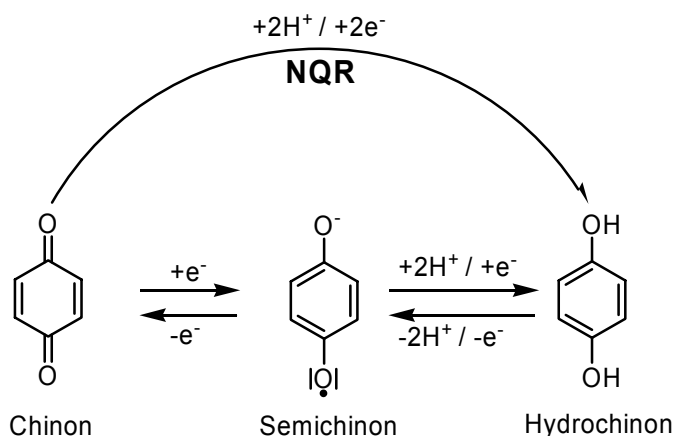


Abb. C-49: Allgemeiner Reaktionsmechanismus der Reduktion von Chinonen zu Hydrochinonen durch ein-Elektron-Transfer über reaktive Semichinone, sowie durch zwei-Elektronen-Transfer katalysiert durch NAD(P)H-abhängige Chinon-Oxidoreduktasen (NQR).

Chinone selbst sind chemisch reaktive Verbindungen, die in der Lage sind, wichtige Biomoleküle wie Glutathion, Proteine, Flavine und Thiole zu oxidieren. Semichinone übertragen Elektronen auf molekularen Sauerstoff und führen damit zur Bildung von Superoxid Radikalen und anderen reaktiven Sauerstoff-Spezies, die äußerst aggressiv sind und Membranen, Proteine sowie Nucleinsäuren zu schädigen vermögen (Sparla und Mitarbeiter, 1998). Hydrochinone hingegen sind wesentlich stabiler und werden im lebenden Pflanzengewebe *O*-konjugiert, wodurch sie ihre Redox-Eigenschaften verlieren. Daher könnte eine wichtige Funktion von NQR darin liegen, Pflanzenzellen vor oxidativen Schäden zu bewahren (Sparla und Mitarbeiter, 1999b). Laskowski und Mitarbeiter (2002) berichteten kürzlich über die heterologe Expression eines primär Auxin-induzierten Gens aus *Arabidopsis* (FQR1), welches für eine Flavin-bindende Chinon-Reduktase kodiert. Das Protein soll als Detoxifizierungs-Enzym beim Schutz gegen Auxin-induzierten oxidativen Stress eine Rolle spielen. Bereits drei Jahre zuvor konnten Sparla und Mitarbeiter (1999b) ebenfalls einen NQR-Klon aus *Arabidopsis thaliana* isolieren, in *E. coli* exprimieren und charakterisieren. Wrobel und Mitarbeitern (2002) gelang die Expression einer NAD(P)H-abhängigen Chinon-Reduktase der parasitischen Pflanze *Tryphisaria versicolor*.

Sowohl strukturell, als auch im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber Inhibitoren wie Dicumarol weisen NQR und DT-Diaphorase von Säugetieren jedoch deutliche Unterschiede auf (Sparla und Mitarbeiter, 1999b). DT-Diaphorase sind FAD-haltige, A-stereospezifische Dehydrogenasen mit einer Dimerstruktur aus Untereinheiten zwischen 26 und 31 kDa (Ernster, 1987; Jaiswal und Mitarbeiter, 1990). Hingegen enthalten die bislang untersuchten löslichen NQR Flavinmononucleotid (FMN) als Cosubstrat, besitzen homotetramere Strukturen mit Untereinheiten im Bereich von 22 bis 24 kDa, ein natives Molekulargewicht von etwa 90 kDa, und der Hydridtransfer von NAD(P)H zum Flavin ist B-stereospezifisch (Sparla und Mitarbeiter, 1996). Strukturell gesehen passen somit die Untersuchungsdaten des im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten Enzyms als Monomer mit einem nativen Molekulargewicht von 37 kDa nicht mit den bislang veröffentlichten Daten für lösliche NQR zusammen. Allerdings beschreiben Spitsberg und Coscia (1984) die teilweise Aufreinigung von Chinon-Oxidoreduktasen aus löslichen Extrakten verschiedener Pflanzen mit nativen Molekulargewichten im Bereich zwischen 38 und 53 kDa.

Neben den bislang beschriebenen löslichen NQR sind auch einige wenige Untersuchungen zu Plasmamembran- (PM) gebundenen Formen von Chinon-Oxidoreduktasen veröffentlicht worden. So konnten Luster und Buckhout (1989) unter Verwendung von Durochinon als Elektronenakzeptor eine Chinon-Reduktase aus der Plasmamembran von Maiswurzeln isolieren. Zwei verschiedene NAD(P)H-Dehydrogenasen wurden aus der PM von Zwiebelwurzeln isoliert, von denen eine vorwiegend Chinonstrukturen als Substrate akzeptiert (Serrano und Mitarbeiter, 1994). In den bereits erwähnten Arbeiten von Trost und Mitarbeitern (1997) sowie Sparla und Mitarbeitern (1996) wurde neben den löslichen NQR auch PM-gebundene NQR untersucht. Lösliche und PM-gebundene Formen zeigten starke Ähnlichkeiten hinsichtlich Substrat- und Inhibitorspezifität. Die beobachtete HDMF-Bildung in den unter C 3.3 beschriebenen Umsetzungsversuchen mit dem bei der Gewinnung des cytosolischen Extraktes erhaltenen Rückstandes aus Membranen und Zellwandbestandteilen könnte somit auf die Anwesenheit einer zusätzlichen PM-gebundenen Chinon-Oxidoreduktase in Erdbeerfrüchten hinweisen.

In nachfolgenden Arbeiten gelang unserer Arbeitsgruppe (Daten nicht veröffentlicht) die heterologe Expression der beschriebenen Chinon-Oxidoreduktase aus Erdbeeren. Nach Inkubation des aufgereinigten, in *E.coli* exprimierten Proteins mit D-Fructose-1,6-

diphosphat unter Zusatz von NADH konnte ebenfalls die Entstehung von HDMF demonstriert werden. Somit handelt es sich bei dem aus Erdbeerfrüchten aufgereinigten Enzym um ein Protein mit hoher Homologie zu Chinon-Oxidoreduktasen. Die bisher mit dem exprimierten Protein durchgeführten Untersuchungen bestätigen vollständig, die mit dem nativen Protein erhaltenen Daten. Eine Beteiligung des Enzyms bei der HDMF-Biogenese ist demnach bewiesen. Allerdings stellt D-Fructose-1,6-diphosphat sicherlich nicht das eigentliche Substrat der Erdbeer-NQR dar. Der relativ hohe K_m -Wert für D-Fructose-1,6-diphosphat sowie die ungewöhnlich lange Inkubationsdauer von 24 h in den Inkubationsexperimenten belegen diese Vermutung. Es wird daher die Beteiligung mindestens eines weiteren Enzyms bei der HDMF-Biogenese in der Erdbeere vermutet. Die Bildung von HDMF in den Inkubationsansätzen mit Erdbeerproteinextrakt könnte das Resultat einer Kombination aus nicht-enzymatischer Metabolisierung von D-Fructose-1,6-diphosphat und enzymatischer Reduktion einer entstandenen Zwischenverbindung durch die aus Erdbeerfrüchten isolierte NQR sein. Eine solche Kombination aus nicht-enzymatischen Reaktionen und enzymatischer Reduktion beschreibt auch Hauck (2003) bei seinen Untersuchungen zur Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat durch die Hefe *Z. rouxii*. Hauck konnte im Hefe-Nährmedium die Bildung der reaktiven α -Dicarbonylverbindung 1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (Abb. C-17), entstanden durch chemische Transformation aus D-Fructose-1,6-diphosphat, nachweisen. In den vorgestellten Umsetzungsversuchen mit *o*-Phenylendiamin (C 1.4) ist diese Verbindung jedoch weder im Inkubationsversuch mit Erdbeerproteinextrakt, noch in der Erdbeerfrucht selbst gefunden worden. Dennoch kann das Auftreten einer α -Dicarbonylverbindung als Intermediat bei der Bildung von HDMF in der Erdbeere nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Reduktion von α -Dicarbonylverbindungen durch die identifizierte Erdbeer-NQR wäre durchaus denkbar. So beschreiben Schlegel und Mitarbeiter (1998) eine Aldo-Keto-Reduktase aus Rattenleber, die neben aromatischen Chinonen auch α -Dicarbonylverbindungen als Substrate akzeptiert. Unter C 3.5 wurde auf die rein chemische Bildung von HDMF in Kontrollversuchen hingewiesen. Hauck (2003) konnte durch Applikation von deuteriertem NADH den nicht-enzymatischen Hydridtransfers von NADH auf eine aus D-Fructose-1,6-diphosphat abgeleitete Zwischenverbindung nachweisen. Die Hydrid-Ionen wurden dabei selektiv auf die Positionen C-5 oder C-6 übertragen (vgl. Abb. B-2). Die Katalyse dieser

Reduktion durch die Erdbeer-NQR wäre ebenfalls denkbar. So berichteten Mano und Mitarbeiter (2002) von einer NQR aus Arabidopsis, die die selektive Reduktion von 2-Alkenalen, wie z.B. (3E)-Hexenal, zu den entsprechenden Alkanalen katalysiert ohne dabei die Aldehydfunktion zu reduzieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit den ersten Beweis für die Beteiligung eines Enzymes der Erdbeere an der Biogenese des bedeutenden Aromastoffes HDMF liefern konnte. Die Etablierung eines Standardinkubationsverfahrens schaffte die Voraussetzung zur Aufreinigung und zur Identifikation dieses Enzyms als Chinon-Oxidoreduktase. Ein wichtiger Ansatzpunkt zur weiteren Aufklärung des vollständigen Biosyntheseweges steht damit zur Verfügung. Auch Möglichkeiten für die biotechnologische Gewinnung von HDMF wurden so eröffnet.

D Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.A.-Qualität von den Firmen Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und ICN (Eschwege, Deutschland) bezogen. Lösungsmittel sind zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert worden. [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat (153.4 mCi/mmol ; 13261.2 MBq/g) und [U-¹³C]-D-Fructose (99 % Atom % ¹³C) wurden von Omichron Biochemicals (South Bend, IN, USA) bezogen.

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

1.2 Enzyme

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase, Phosphohexose-Isomerase, Triosephosphatisomerase, Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase sowie Alkalische Phosphatase wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

1.3 Pflanzenmaterial

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden Freilanderdbeeren der Art *Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta, cv. Corona sowie cv. Polka benutzt.

1.4 Füllmaterialien für die Säulenchromatographie

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

1.5 Membranfiltration

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

1.6 Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion wurden C18-Kartuschen (500 mg, 3 ml) der Firma IST (Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

1.7 Dialyse

Für die Dialyse sind Dialyseschläuche der Firma Serva (Heidelberg, Deutschland) mit 16 mm bzw. 25 mm Durchmesser und einer Ausschlussgrenze von 12 kDa verwendet worden.

1.8 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration erfolgte mit Centriprep[®] Zentrifugalfiltern mit YM-10, YM-30, YM-50 sowie YM-100 MW Membranen (Amicon, Beverly, MA).

1.9 Pufferherstellung

Die Tris-Puffer wurden durch Titration der entsprechenden Menge an Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) mit Salzsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Phosphatpuffer sind durch Mischen von 1 M Di-Kaliumhydrogenphosphat- und 1 M Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösungen und anschließende Verdünnung mit bidest. Wasser hergestellt worden.

2 Geräte

2.1 Schüttelinkubator

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

Temperatur: 30°C

Schüttelgeschwindigkeit: 150 upm

2.2 UV-VIS-Spektralphotometer

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

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

2.3 Flüssigchromatographie

LC: Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

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

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

Fraktionensammler: FRAC-100 (Pharmacia) mit 12 ml Polystyrolröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Steuerung: Controller LCC 500-Plus (Pharmacia)

2.3.1 Ionenaustauschchromatographie

Cytosolische Aldolase

Säule: DEAE-Cellulose (1.5 x 9.5 cm) (Sigma)

Fließmittel: A: 20 mM Tris-HCl (pH 7.7)

B: 0.4 M NaCl in 20 mM Tris-HCl

Fluss: 0.4 ml/min

Gradient: Linear 0 ml: 0 % B; 200 ml: 100 % B

Fraktionsvolumen: 4 ml

Fructosediphosphatase, Phosphohexose-Isomerase, 6-Phosphogluconäuredehydrogenase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Säule: Q Sepharose Fast Flow[®] (2.6 x 23 cm)
Äquilibriumspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8)
Fließmittel: A: 20 mM Tris-HCl (pH 8)
B: 500 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl (pH 8)
Fluss: 2 ml/min
Gradient: Linear 0 ml: 0 % B; 500 ml: 100 % B
Fraktionsvolumen: 10 ml
Detektion: UV-Absorption (206 nm)
Schreibergeschwindigkeit: 1 mm / min

Chinon-Oxidoreduktase

Säule: Q Sepharose Fast Flow[®] (2.6x23 cm)
Äquilibriumspuffer: 20 mM Phosphat (pH 8)
Fließmittel: A: 20 mM Phosphat (pH 8)
B: 400 mM NaCl in 20 mM Phosphat (pH 8)
Fluss: 2 ml/min
Gradient: Linear 0 ml: 0 % B; 400 ml: 100 % B
Fraktionsvolumen: 10 ml

2.3.2 Gelpermeationschromatographie

Cytosolische Aldolase, Chinon-Oxidoreduktase

Säule: Sephacryl S300 (1.6 x 60 cm) (Sigma)
Fließmittel: 0.2 M Phosphat (pH 8)
Fluss: 0.2 ml/min
Fraktionsvolumen: 4 ml

2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC 1:	Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensystem:	HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf, und Dynamic Mixing Chamber (Knauer, Berlin)
Degasser:	4-Wege-Degasser (Knauer)
Mischkammer:	dynamische Mischkammer (Knauer)
Autosampler:	Basic Marathon (Spark, Emmen)
Injektor:	Vier-Wege-Ventil Nr. 7125 (Rheodyne), Probenschleife 200 μ l
Trennsäule :	Eurospher 100 C-18250 \times 4.6 mm; 5 μ m) (Knauer)
Fließmittel :	A: 0.05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril
Fluss:	1 ml/min
Gradient :	0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 30 min: 20 - 100 % B
Detektoren:	UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer) und/oder Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (ELSD, <u>E</u> vaporative <u>L</u> ight <u>S</u> catter- <u>r</u> ing <u>D</u> etector), Modell Sedex 55 (Sedere, Alfortville, Frankreich); Temperatur: 40°C, Druck 2.4 atm, Luft als Evaporationsgas
Datenaufnahme und -auswertung:	Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin)
Ausgabe:	HP-Drucker (Hewlett Packard)
HPLC 2:	Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin)
Pumpensystem:	HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf, und Dynamic Mixing Chamber (Knauer, Berlin)
Degasser:	4-Wege-Degasser (Knauer)
Mischkammer:	dynamische Mischkammer (Knauer)
Autosampler:	Basic Marathon (Spark, Emmen)
Injektor:	Vier-Wege-Ventil Nr. 7125 (Rheodyne), Probenschleife 50 μ l
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18(250 \times 4.6 mm; 5 μ m) (Knauer, Berlin)

- Fließmittel: A: 0.05 % Ameisensäure in Wasser
B: Acetonitril
- Fluss: 1 ml/min
- Gradient: 0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 30 min: 20 - 100 % B
- Detektor: UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer)
- Datenaufnahme
und -auswertung: Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin)
- Ausgabe: HP-Drucker (Hewlett Packard)
- HPLC 3:** Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Serie
- Pumpen: Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten,
1100 Serie
- Injektor: Rheodyne 7125 Probenventil, Probenschleife 100 µl
- Trennsäule: Eurospher 100 C-18 (250 × 4.6 mm; 5 µm) (Knauer)
- Fließmittel: A: 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser
B: Acetonitril
- Fluss: 1 ml/min
- Gradient: 0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 30 min: 20 - 100 % B
- Detektor: Hewlett Packard Photodiodenarray 1100 Serie mit Hewlett Packard
Aufnahme- und Auswertesoftware
- Ausgabe: HP-Drucker (Hewlett Packard)
- HPLC 4:** Analytische HPLC von Gilson Abimed (Abimed, Langenfeld,
Deutschland)
- Pumpen: 2 x Gilson Abimed Pumpe Model 303 mit analytischem Pumpenkopf
- Injektor: Gilson Abimed Sample Injector Model 231, Probenschleife 200 µl
- Trennsäule: Eurospher 100 C-18 (250 × 4.6 mm; 5 µm) (Knauer)
- Fließmittel: A: 0.05 % Ameisensäure in Wasser
B: Acetonitril
- Fluss: 0.7 ml/min
- Gradient: 0 - 15 min: 5 - 20 % B; 15 - 35 min: 20 - 100 % B

Detektor: Knauer-UV-Spektralphotometer mit analytischer Meßzelle (10 mm)
Steuerung/Daten-
verarbeitung: Gilson 712 HPLC Controller, Version 1.02
Ausgabe: HP-Drucker (Hewlett Packard)

HPLC 5: Analytische Niederdruckgradientenanlage (Knauer, Berlin, Deutschland)

Degasser: Knauer

Pumpe: Knauer Maxi-Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf

Mischkammer: Knauer Dynamische Mischkammer

Injektor: Knauer A0258 Probenventil, Probenschleife 20 µl

Trennsäule: Chiraspher NT[®] (240 × 4 mm i.d.; 5 µm) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Fließmittel: A: n - Pentan
B: Diethylether
Fluss: 0.8 ml/min

Gradient: 0 – 60 min: 30 % B

Detektor: Knauer-UV-Spektralphotometer mit analytischer Messzelle (10 mm)

Steuerung und Daten-

verarbeitung: Knauer Eurochrom 2000

Ausgabe: HP-Drucker (Hewlett Packard)

HPLC 6: Analytische HPLC von Waters (Waters, Milford, USA)

Pumpen: 2 x Waters-Pumpe Model 510 mit analytischem Pumpenkopf

Injektor: Rheodyne 7125 Probenventil, Probenschleife 100 µl

Fließmittel: A: 0.05 % Ameisensäure in Wasser
B: Acetonitril

Trennsäule1: Eurospher 100 C-18 (250 × 4.6 mm; 5 µm) (Knauer)

Gradient1: 0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 35 min: 20 - 100 % B

Fluss: 1 ml/min

Trennsäule 2:	Nucleosil 100-10 SB (250 × 4 mm; 10 µm) (Macherey & Nagel, Düren)
Fließmittel 2:	A: Wasser B: 1 M NH ₄ CHOO, pH 4
Gradient 2:	0 min: 5 % B; 20 min: 100 % B
Fluss:	1 ml/min
Detektoren:	Multiwavelength-UV-Spektralphotometer S-3702 (SOMA) <i>Online</i> Flüssigszintillationsdetektor Flo-one (Canberra Packard)
Ausgabe:	Integrator CR-6-A (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)

2.5 Hochleistungsflüssigchromatographie- Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

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

Tandemmassenspektrometer:

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

2.6 Kapillargaschromatographie – Massenspektrometrie (HRGC-MS)

System 1

GC:	Fisons Instruments GC 8060 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)
Autosampler:	Fisons AS 800
Injektor:	Split-Splitless-Injektor (1:20), Temperatur: 250°C
Trennsäule:	J&W DB-Wax 20M (30 m \times 0.25 mm i.D. ; df = 0.25 μm) (J&W, Folsom, CA, USA)
Temperaturprogr.:	50°C (3 min isotherm) - 4°C/min - 220°C
Trärgas:	Helium 5.0, 2 ml/min (bei 50°C)
MS:	Fisons Instruments MD 800 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)
Massenbereich:	41 - 250 u
Scandauer:	0.45 s + 0.05 s delay

Temperaturen: Ionenquelle: 220°C, Kopplungsteile: 250°C
Ionisation: Elektronenstoßionisierung (EI+), 70 eV
Kathodenstrom: 1.8 mA
Quellendruck: 10 nbar
Photomultiplier: 350 V
Datenaufnahme
und -auswertung: Masslab für Windows (Fisons, Egelsbach, Deutschland)
Xcalibur für Windows (Fisons Instruments, Mainz, Deutschland)

System 2

GC: Agilent 6890 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca, USA)
Autosampler: Agilent 7683 Serie Injector
Injektor: Split-Splitless-Injektor (1:20), Temperatur : 250°C
Trennsäule: J&W HP-5 (30 m × 0.25 mm i.D.; df = 0.25 µm) (J&W, Folsom, CA, USA)
Temperaturprogr.: 60°C - 5°C/min - 300°C
Trägergas: Helium 5.0, 1 ml/min konstanter Fluss

MS: Agilent 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca, USA)
Massenbereich: 39 - 500 u
Scandauer: 3.17 Scans/s
Temperaturen: Ionenquelle: 230°C, Transferline: 230°C, Quadrupol: 150°C
Ionisation: Elektronenstoßionisierung (EI+), 70 eV
Quellendruck: 10 nbar
Photomultiplier: 1500 V
Datenaufnahme: MS Chemstation
Datentransfer: Mass transit
Datenauswertung: Xcalibur für Windows (Fisons Instruments, Mainz, Deutschland)

2.7 Gaschromatographie- Atomemissionsdetektion (GC-AED)⁶

Trennsäule: MN Optima 5-MS; 30 m x 0.25 mm i.d., $d_f = 0.25 \mu\text{m}$

Gradient: 100°C – 5°/min – 270°C (10 min isotherm)

Detektor: Agilent G2350A

2.8 Chiralphasen – Kapillarzonenelektrophorese (cKZE)

Gerät: P/ACE system MDQ (Beckman, Fullerton, CA, USA)

Injektion: hydrodynamische Injektion am anodischen Ende der Kapillare
(0.5 psi, 10 sec)

Trennsäule: Fused silica (30/40.2 cm, i.D. 50 μm)

Temperatur: 25°C

Spannung: 10 kV

Laufpuffer: 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 4) + 20 mM Heptakis-(2,3-O-diacetyl-6-O-sulfato)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD)

Waschlösungen: 0.1 M NaOH (2 min), Laufpuffer (2 min)

Detektor: UV-Spektralphotometer mit variabler Wellenlänge (Knauer)

Ausgabe: HP-Drucker (Hewlett Packard)

2.9 Flüssigszintillationszähler (LSC, Liquid-Scintillation-Counting)

Gerät: Rackbeta 1214 LKB (Wallac, Freiburg, Deutschland)

Photomultiplier: 10°C

Messkammer: 10°C

Messzeit: 1 bzw. 10 min

⁶ Die GC-AED-Messungen wurden freundlicherweise am Institut für Lebensmittelchemie (Leiter Prof. R. Berger) der Universität Hannover durchgeführt.

LSC-Vials:	20 ml (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande)
Szintillationscocktail:	Emulsifier-Safe™ (Packard Bioscience)
Automatische	
Löschkorrektur:	Standard-Kanalverhältnismethode mit ²²⁶ Ra als externen Standard
Auswertung:	Software „ <i>Ultra-Term</i> ®“ (Wallac)

2.10 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Elektrophorese-Apparatur:	Mini Protean II, BioRad Laboratories
Netzgeräte:	Desaga 1200/200 (Desaga, Heidelberg) Pharmacia LKB-ECPS 3000/150)
Schüttelgerät:	Diffusionsentfärbe-Apparatur, Desaga
Gele:	Ready Gel Tris-Tricine Gel 10–20% resolving gel, 4% stacking gel, 12-well, 20 µl, 8.6 x 6.8 cm (W x L)

2.11 Sonstige Geräte

pH-Meter:	Labor-pH-Meter (Knick, Berlin, Deutschland)
Waagen:	Mettler PL 300 (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) Sartorius BP 210 S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Ultraschallbad:	Branson 1210 Bandelin Sonorex TK 52
Rotavapor:	Büchi Rotavapor und Büchi Vakuum System B-173 und Büchi Vakuum Controller B-720 (Büchi, Konstanz, Deutschland)
Kühlzentrifuge:	Typ Universal 16R, Rotor 1616 & 1614 (Hettich) Beckman Typ J2-21 (Rotoren: JA10 und JA20)
Zentrifugen:	Hettich EBA 12 (Rotor: Universal 30 F)
Lyophilisator:	Christ Alpha 1 - 4; 0.1 mbar (Christ, Osterode, Deutschland)
Polarimeter:	Perkin Elmer 241
Radio-Dünnschicht-Scanner:	Linear Analyzer (Berthold, Wildbad, Deutschland)

3 Methoden

3.1 Grundlegende Methoden

3.1.1 Quantifizierung von HDMF

Die Quantifizierung von HDMF erfolgte mittels RP-HPLC-UV-Analyse bei 285 nm anhand einer Kalibriergeraden, die unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen HDMF-Referenz bei 285 nm ermittelt wurde (HPLC 2).

Kalibrierfunktion: $y = 1267.2 x$ mit $y = \text{Signalfläche (mV * min)}$
 $X = \text{HDMF-Konzentration (}\mu\text{g / ml)}$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0.9994$

3.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Assay

Für die Proteinbestimmung wurden 50 μl der Probelösung mit 950 μl BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure / CuSO_4 - 50 / 1) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte mittels Photometer bei 562 nm. Als Blindwert diente eine gleichbehandelte Probe, die statt der Probenlösung 50 μl Puffer enthielt. Eine Kalibriergerade wurde mit einer Kälber Serumalbumin (Bovine serum albumin, BSA)-Stammlösung erstellt.

3.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Reaktionslösung nach Bradford wurde wie folgt hergestellt:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden in 50 ml 95% Ethanol gelöst, 100 ml einer 85 % Phosphorsäure zugegeben und die Lösung auf einen Liter aufgefüllt. Die entgültigen Konzentrationen in der Lösung betragen somit 0.01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7% Ethanol und 8.5% Phosphorsäure (Bradford, 1976).

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels Mikroassay:

100 µl der zu vermessenden Probe wurden zu 1 ml Bradford-Lösung pipettiert und die Lösung nach intensivem Schütteln nach zwei Minuten am Photometer bei 595 nm vermessen. Der Blindwert enthielt statt der zu messenden Probe 100 µl Puffer. Eine Kalibriergerade wurde mit einer Kälber Serumalbumin (Bovine serum albumin, BSA)-Stammlösung erstellt.

3.2 Inkorporationsversuche an ganzen, reifen Erdbeerfrüchten

3.2.1 Inkorporationsversuche mit [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat

Eine wässrige Lösung an uniform ¹⁴C-markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat (50 µl äquivalent 8×10^6 dpm) wurde mit Hilfe einer GC-Spritze in vier ganze, reife Erdbeerfrüchte appliziert. Die Stiele der Früchte tauchten während des Inkubationszeitraums in Leitungswasser. Die Aufarbeitung der Früchte erfolgte nach der von Roscher und Mitarbeitern (1998) beschriebenen Methode. Das erhaltene Diethylether-Eluat wurde vorsichtig auf ca. 1 ml eingengt, der Rückstand in 200 µl Wasser überführt und der Diethylether mit Hilfe eines Stickstoffstroms abgeblasen. Die Analyse der erhaltenen Lösung erfolgte mittels RP18-HPLC mit *online* Flüssigszintillationsdetektion (vgl. D-2.4; HPLC 6). Das wässrige Eluat wurde lyophilisiert, der Rückstand in 500 µl Wasser aufgenommen und mittels HPLC mit *online* Flüssigszintillationsdetektion an einer Anionenaustauscher-Phase untersucht (vgl. D-2.4; HPLC 6).

Die weitere Auftrennung des wässrigen Eluates erfolgte in präparativer Weise durch Säulenchromatographie an einem Dowex-Ionenaustauscher. Der gesamte wässrige Extrakt wurde auf die Säule (20 cm x 2.5 cm) aufgetragen. Zunächst wurde mit 100 ml Wasser und anschließend mit 100 ml 0.4 M NaCl-Lsg. eluiert und Fraktionen zu je 10 ml gesammelt. Aliquote Mengen aller Fraktionen sind am Szintillationszähler auf die enthaltene Radioaktivität untersucht worden. Die Radioaktivität enthaltenden Fraktionen 2-5 des Durchlaufes sowie die Radioaktivität enthaltenden Fraktionen 12-17 (phosphorylierten Verbindungen) wurden jeweils vereinigt, lyophilisiert und die Rückstände in 5 ml Wasser aufgenommen. Fraktionen 12-17 wurden 10 h mit alkalischer Phosphatase (20 U) behandelt. Die Lösungen der vereinigten Fraktionen 2-5 sowie 12-17 sind mit einem Überschuss an NaBH₄ (ca. 50 mg) versetzt worden. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde überschüssiges NaBH₄

durch den Zusatz von 15 ml einer verdünnten methanolischen Essigsäurelösung (Methanol/Wasser/Essigsäure; 70:27:3; v/v/v) entstört und durch wiederholtes Nachfüllen und Abdampfen von Methanol (4- bis 5-mal) im Trockenschrank bei 110°C entfernt. Der trockene Rückstand wurde anschließend mit 1 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Extraktion gebildeter Alditolacetate erfolgte durch Zugabe von 2 ml Chloroform. Pyridin wurde im Folgenden durch wiederholtes Ausschütteln mit einer 8 % CuSO₄ in Wasser Lösung entfernt (4-mal mit jeweils 5 ml). Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurden die Chloroformphasen im Stickstoff-Strom einkonzentriert und mittels Radio-GC analysiert.

3.2.2 Inkorporationsversuche mit [U-¹³C]-D-Fructose

Eine wässrige Lösung (50µl) von 30 mg [U-¹³C]-D-Fructose wurde mit Hilfe einer GC-Spritze jeweils in vier reife Erdbeerfrüchte injiziert. Die Früchte sind nach der von Roscher und Mitarbeitern (1998) beschriebenen Methode nach Inkubationszeiten von einem, zwei, drei und vier Tagen getrennt voneinander aufgearbeitet worden. Die Diethylether-Eluate wurden nach Einengen auf etwa 200µl mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) auf ihren Gehalt an ¹³C-markiertem HDMF und ¹³C-markiertem DMMF analysiert. Die weitere Auftrennung des wässrigen Eluates erfolgte in präparativer Weise durch Säulenchromatographie an einem Dowex-Ionenaustauscher. Der gesamte wässrige Extrakt wurde auf eine Säule (20 cm x 2.5 cm) aufgetragen, mit 100 ml Wasser (Eluat A) und anschließend mit 100ml 0.4 M NaCl-Lsg. eluiert (Eluat B). Eluat A und B wurden lyophilisiert, die Rückstände in 2 ml Wasser aufgenommen und Lösung B 10 h mit alkalischer Phosphatase (20 U) behandelt. Lösung A und B sind mit einem Überschuss an NaBH₄ (ca. 50 mg) versetzt worden. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde überschüssiges NaBH₄ durch den Zusatz von 15 ml einer verdünnten methanolischen Essigsäure-Lösung (Methanol/Wasser/Essigsäure; 70:27:3; v/v/v) entstört und durch wiederholtes Nachfüllen und Abdampfen von Methanol (4- bis 5-mal) im Trockenschrank bei 110°C entfernt. Der trockene Rückstand wurde anschließend mit 1 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Extraktion gebildeter Alditolacetate erfolgte durch Zugabe von 2 ml Chloroform. Pyri-

din wurde im Folgenden durch wiederholtes Ausschütteln mit einer 8 % CuSO₄ in Wasser Lösung entfernt (4-mal mit jeweils 5 ml). Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurden die Chloroformphasen im Stickstoff-Strom einkonzentriert und mittels GC-MS sowie GC-AED analysiert.

3.2.3 Inkorporationsversuche von Erdbeerfrüchten mit *o*-Phenylendiamin

Inkorporation mit *o*-Phenylendiamin

50 µl einer wässrigen *o*-Phenylendiamin-Lösung (1 M) wurden mit Hilfe einer GC-Spritze in eine reife, intakte Erdbeerfrucht (ca. 10 g) appliziert. Nach einer Inkubationszeit von 6h ist die Frucht unter Zusatz von 20 ml Wasser mit einem Ultra-Turrax homogenisiert worden. Nach Zentrifugation wurde der wässrige Überstand 3-mal mit je 20ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethanextrakte wurden zunächst am Rotationsverdampfer, anschließend im Stickstoffstrom bei 40°C bis zur Trockne eingeengt, die Rückstände in je 300µl einer Wasser/Methanol-Mischung (2:1) aufgenommen und direkt mittels HPLC-DAD untersucht.

Alternativ zur Extraktion mit Dichlormethan ist der wässrige Überstand nach Zentrifugation auf eine mit Wasser konditionierte XAD-Festphasensäule (30 cm × 2.5 cm) gegeben worden. Die Säule wurde mit 100 ml Wasser gewaschen und anschließend im Luftstrom trocken geblasen. Die Elution unpolarer Verbindungen erfolgte anschließend mit 200 ml Diethylether und die Elution phosphorylierter Verbindungen mit 200 ml Methanol. Die methanolische Phase wurde am Rotationsverdampfer, anschließend im Stickstoffstrom bei 40°C auf ca. 0.4 ml eingeengt. Der Extrakt ist mittels RP-HPLC-DAD sowie HPLC-MS/MS analysiert worden.

Inkorporation mit *o*-Phenylendiamin und [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat

Eine wässrige Lösung an uniform ¹⁴C-markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat (140 µl äquivalent 22x10⁶ dpm) wurde mit Hilfe einer GC-Spritze jeweils an zwei ganze, reife Erdbeerfrüchte appliziert. In eine der Früchte wurden zusätzlich 50 µl einer wässrigen *o*-Phenylendiamin-Lösung (1 M) injiziert. Nach 84 h Inkubation erfolgte die Aufarbeitung der Früchte nach der von Roscher und Mitarbeitern (1998) beschriebenen Methode. Das

erhaltene Methanoleluat wurde am Rotationsverdampfer, anschließend im Stickstoffstrom bei 40°C auf ca. 0.5 ml eingengt. Die Fraktionierung des Methanolextraktes erfolgte mittels RP18-HPLC in gleiche Volumenteile von je 1 ml. Aliquote Mengen dieser Fraktionen wurden in Plastikschaubgefäßen mit je 10 ml Szintillationscocktail versetzt und am Flüssigszintillationszähler vermessen.

3.3 Inkubation von radioaktiv markiertem D-Fructose-1,6-diphosphat mit Erdbeerproteinextrakt

Zur Gewinnung des Erdbeerproteinextraktes wurden 100 g reife, tiefgefrorene Erdbeeren mit 200 ml Wasser und 15 g Polyvinylpolypyrrolidon im Mixer homogenisiert und anschließend mit 1 N NaOH auf ca. pH 7.7 eingestellt. Anschließend ist zentrifugiert und der Überstand durch ein Baumwollgewebe filtriert worden. Es wurden etwa 200 ml Erdbeerproteinextrakt bzw. etwa 6 g Erdbeerenzypulver (=Lyophilisat) nach dem Lyophilisieren erhalten.

2 mg des Pulvers wurden in 100 µl Puffer (0.1M Tris-HCl, pH 7.7) mit [U-¹⁴C]-D-Fructose-1,6-diphosphat (20000 dpm) über Nacht inkubiert (Gesamtvolumen: 245 µl). Die Analyse der Inkubationslösung erfolgte direkt mittels HPLC mit *online* Flüssigszintillationsdetektion an einer Anionenaustauscher-Phase (D-2.4; HPLC 6).

Die Inkubationslösung wurde aliquotiert und ein Aliquot mit 2 U alkalischer Phosphatase behandelt. Die unbehandelte sowie mit alkalischer Phosphatase behandelte Inkubationslösung ist auf eine Kieselgel DC-Platte (20x20 cm) aufgetragen worden. Als Fließmittel diente ein Acetonitril/Wasser-Gemisch (85:15). Die Detektion radioaktiv markierter Verbindungen erfolgt mit Hilfe eines Radio-Dünnschichtscanners.

3.4 Umsetzung von D-Fructose-1,6-diphosphat mit Erdbeerproteinextrakt unter Zusatz von *o*-Phenylendiamin

100 ml eines frisch hergestellten cytosolischen Proteinextraktes (Anschnitt D-3.6.1) wurden nach Zusatz von 600 mg D-Fructose-1,6-diphosphat sowie 27 mg *o*-Phenylendiamin über Nacht inkubiert. Als Kontrollexperiment diente ein analoger Inkubationsansatz unter

Verwendung zuvor hitzeinaktivierten Extraktes (siedendes Wasserbad, 10 min). Nach einer Inkubationszeit von 24 h sind die Inkubationsansätze 3-mal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert worden. Die vereinigten Dichlormethanextrakte wurden zunächst am Rotationsverdampfer, anschließend im Stickstoffstrom bei 40°C bis zur Trockne eingengt, die Rückstände in je 300µl einer Wasser/Methanol-Mischung (2:1) aufgenommen und direkt mittels HPLC-DAD untersucht.

3.5 Untersuchung enzymatischer Aktivitäten der Erdbeerfrucht

3.5.1 Charakterisierung einer Aldolase-Aktivität in reifenden Erdbeerfrüchten

3.5.1.1 Enzymassay

Die Bestimmung der Aldolase-Aktivität erfolgte durch Kopplung der Aldolase-Reaktion mit den Reaktionen der Triosephosphatisomerase und der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase. Der Verbrauch an NADH wurde bei 25°C innerhalb von 60 min in Intervallen von 10 min anhand der Extinktionsabnahme bei 340 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen. Die Standard-Umsetzungsbedingungen in einem Endvolumen von 1 ml waren 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 3 mM MgCl₂, 1 mM D-Fructose-1,6-diphosphat, 0.1 U ml⁻¹ Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, 1 U ml⁻¹ Triosephosphatisomerase, 0.15 mM NADH. Alle Umsetzungen wurden durch die Zugabe von D-Fructose-1,6-diphosphat gestartet und wenn nötig um eine vorhandene NADH Oxidase Aktivität korrigiert, indem D-Fructose-1,6-diphosphat nicht zur Reaktionsmischung zugegeben wurde. Ein Unit an Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym die zur Spaltung von 1 µmol D-Fructose-1,6-diphosphat (gleichzusetzen mit 2 µmol oxidiertem NADH) pro Minute bei 25°C führt. Die spezifische Aktivität wurde in Units pro mg Protein angegeben. In allen Fällen war die Umsetzungsgeschwindigkeit proportional zur Menge an eingesetztem Enzym und verlief auch bei längeren Reaktionszeiten linear. Die K_m Werte der Michaelis-Menten Gleichung wurden mit Hilfe des Linearisierungsverfahrens nach Lineweaver-Burk bestimmt.

3.5.1.2 Gewinnung des geklärten Extraktes

Gefrorene Erdbeerfrüchte (50 g) verschiedener Reifegrade wurden unter Zusatz von 10 g Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) und 100 ml Wasser im Mixer homogenisiert und umgehend mit 5-8 ml 1 N NaOH (je nach Reifegrad) auf pH 7.7 eingestellt. Alle anderen Standard-Methoden führten zur Gelbildung. Die Suspension ist 25 min bei 34 000 g zentrifugiert worden. Der Proteinextrakt wurde entweder gegen 20 mM Tris-HCl (pH 7.7) dialysiert oder direkt für weitere Aufarbeitungsschritte herangezogen.

3.5.1.3 Abtrennung von Pektin

Gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung wurde innerhalb von 30 min zum Proteinextrakt zugegeben bis eine 20 % Sättigung erreicht war. Die leicht trübe Lösung ist 30 min in der Kälte gerührt und dann 25 min bei 34 000 g zentrifugiert worden. Der Rückstand bestehend aus gallertartigem pektinhaltigem Material wurde verworfen, da er keine Aldolase-Aktivität aufwies. Der Überstand wurde solange gegen 20 mM Tris (pH 7.7) dialysiert bis die Leitfähigkeit unter 1.5 mS lag.

3.5.1.4 Chromatographie an Diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose

Die Auftrennung der Aldolase Isoenzyme erfolgte durch Chromatographie an Diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose (Sigma). Der dialysierte Proteinextrakt wurde auf das zuvor mit 20 mM Tris-HCl konditionierte Säulematerial gegeben und mit 200 ml eines linearen Gradienten von 0-0.4 M KCl in 20 mM Tris-HCl (pH 7.7) bei einer Flussrate von 0.4 ml min⁻¹ eluiert. Es wurden Fraktionen (4 ml) gesammelt. Das Elutionsverhalten der beiden Aldolase-Isoenzyme entsprach dem in der Literatur angegebenen Verhalten (Krueger und Schnarrenberger, 1983; Botha und O'Kennedy, 1989). Fraktionen, die cytosolische sowie plastidische Aldolase enthielten wurden jeweils vereinigt und lyophilisiert.

3.5.1.5 Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S300

Die lyophilisierten Aldolase Isoenzyme wurden in 2-4 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7.7) gelöst und auf eine Sephacryl S300 Gelpermeationschromatographie-Säule (1.6 x 60 cm) gegeben. Die Proteine sind mit 0.2 M Tris-HCl (pH 7.7) bei einer Flussrate von 0.2 ml min⁻¹ eluiert worden. Es wurden Fraktionen (4 ml) gesammelt, mittels Photometer bei 280 nm vermessen und auf ihre Aldolase Aktivität hin untersucht. Die Fraktionen die Aktivität

aufwiesen wurden vereinigt und lyophilisiert. Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Aldolase ist die Sephacryl S300 Säule mit einer Proteinstandard-Mischung bestehend aus Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa) und Rinderserumalbumin (67 kDa) von Amersham Pharmacia Biotech kalibriert worden. Zusätzlich wurde das Totvolumen mit Dextranblau sowie das Bettvolumen mittels Aceton bestimmt. Die Verteilungskoeffizienten K_D wurden gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes der einzelnen Proteinstandards aufgetragen (Abb. D-1). Die Bestimmung der nativen Molekulargewichte erfolgte aus der berechneten Geradengleichung mit Hilfe der ermittelten Elutionsvolumina der Aldolase Isoenzyme.

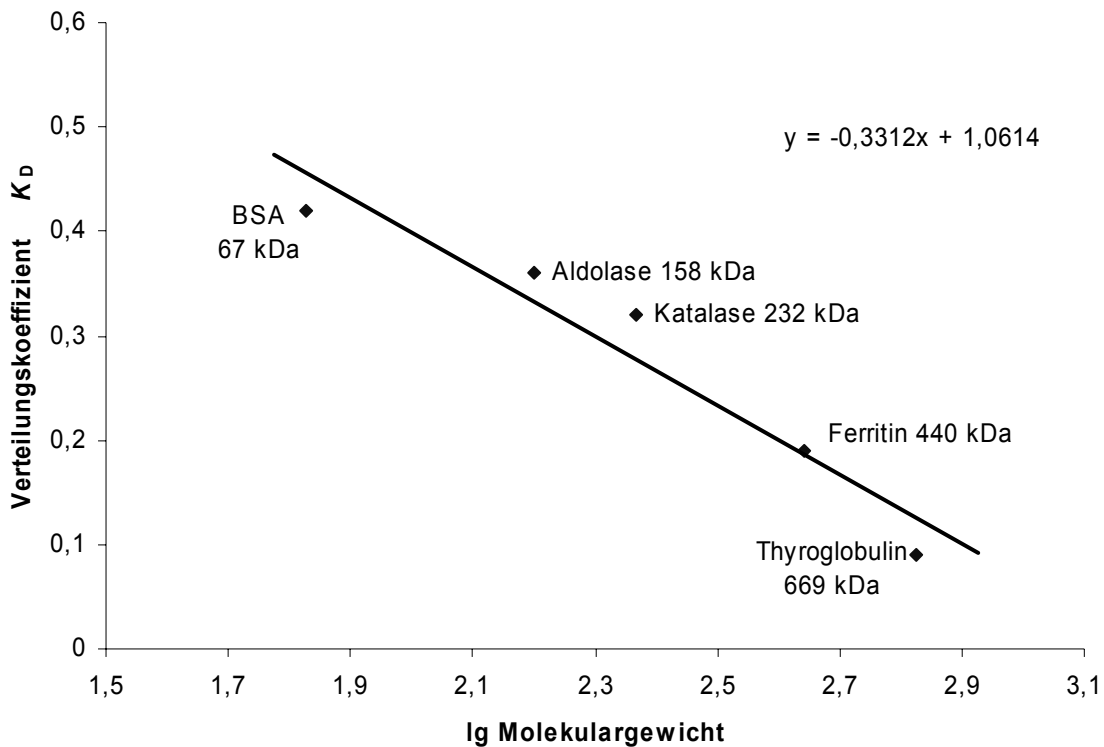


Abb. D-1: Ermittelte Kalibriergerade für die Molekularmassenbestimmung der gereinigten Aldolase-Isoenzyme mittels GPC an Sephacryl S300. Die Verteilungskoeffizienten K_D sind gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes der einzelnen Proteinstandards aufgetragen.

3.5.1.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) als diskontinuierliche (Disk)-Elektrophorese in einer Mini-Protean II Aparatur von BioRad durchgeführt. Die Polypeptide wurden auf 1 mm dicken Gelplatten mit 12 % Polyacrylamid und 0.1 % Sodium Dodecyl Sulfat getrennt (Trenngel) (Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid 37.5:1). Das Sammelgel enthielt 3 % Polyacrylamid. Alle Proben wurden vor dem Auftragen mit SDS Probenpuffer (250 mM Tris pH 6.8, 10 % SDS, 40 % Glycerin, 20 % Mercaptoethanol, 0.05 % Bromophenol Blue) für 3 min bei 100°C behandelt. Die Gele sind solange mit einer konstanten Stromstärke von 40 mA entwickelt worden bis eine konstante Spannung von 150 V erreicht wurde. Die Bestimmung des Molekulargewichts M_r der Untereinheiten erfolgte anhand der Laufstrecke folgender Proteinstandards: Phosphorylase B (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carbonanhydrase (30 kDa), Sojabohnen Trypsininhibitor (20.1 kDa) und α -Lactalbumin (14.4 kDa). Die relativen Mobilitäten der Standardproteine wurden gegen den dekadischen Logarithmus der Molekularmassen aufgetragen. Aus der berechneten Geradengleichung wurde mit Hilfe der ermittelten relativen Mobilitäten der Aldolase Untereinheiten die Molekulargewichte M_r bestimmt. Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Blau oder mit Silber (Heukeshoven und Dernick, 1985).

3.5.1.7 Berechnung des Trockengewichtes und Bestimmung von Anthocyanen

Zur Berechnung des Trockengewichtes wurden 5 g Erdbeeren verschiedener Reifegrade gewogen, homogenisiert und bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Es wurden Extrakte durch Homogenisieren von 1 g Erdbeeren verschiedener Reifegrade unter Zugabe von 1 ml Wasser hergestellt und bei 498 nm zur Bestimmung des Gehaltes an Anthocyan vermessen.

3.5.1.8 Sequenzierung und Expressions-Analyse von SCA1

Die DNA Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des „dye terminator cycle sequencing Ready Reaction kit“ von Applied Biosystems (Foster City, CA) sowie des Applied biosystems 310 DNA sequencer. Die Suche nach Sequenzidentitäten wurde mit dem „advanced basic local alignment search tool“, Blast X server (Altschul und Mitarbeiter, 1990) und der nicht-redundanten Protein-Datenbank des National Center für biotechnologische Informa-

tion (www.ncbi.nlm.nih.gov, BankIt359018, AF308587) durchgeführt. Zur DNA und Protein Sequenzanalyse wurde die Software DNASTAR (DNASTAR Inc.; Madison WI) eingesetzt. Die Gesamt-RNA von Erdbeerpflanzen aus dem Gewächshaus wurde nach der von Schultz und Mitarbeitern (1994) beschriebenen Methode gewonnen. Zur Gel-Blot Analyse der RNA wurden 10 µg mit Glyoxal (1.5 M) denaturierter Gesamt-RNA elektrophoretisch getrennt und auf einen Hybond H⁺ Membran (Amersham) geblottet. Die Hybridisierung der gesamten SCA1 cDNA wurde mit zufällig markierten Olinucleotid-Primern (Feinberg und Vogelstein, 1984) durchgeführt. Nach der Fixierung (2 h 80°C) sind die Blots wie von Angenent und Mitarbeitern (1992) beschrieben hybridisiert worden. Der RNA Gel-Blot wurde zweimal für 30 min in 0.1 X SSC sowie 0.1 % SDS bei 65°C gewaschen. Eine detaillierte Beschreibung der Mikroarray-Experimente wurde bereits von Aharoni und Mitarbeitern (2000) dargestellt.

3.5.2 Nachweis weiterer Enzymaktivitäten der Erdbeerfrucht

3.5.2.1 Enzymassays

Phosphohexose-Isomerase

Die Bestimmung der Phosphohexose-Isomerase-Aktivität erfolgte durch Kopplung der Phosphohexose-Isomerase-Reaktion mit der Reaktion der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Der Verbrauch an NADP wurde bei 25°C innerhalb von 30 min in Intervallen von 2 min anhand der Extinktionszunahme bei 340 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen. Die Standard-Umsetzungsbedingungen in einem Endvolumen von 2 ml waren 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4 mM MgCl₂, 3.8 mM D-Fructose-6-phosphat, 1 U ml⁻¹ Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 0.15 mM NADP. Alle Umsetzungen wurden durch die Zugabe von D-Fructose-6-phosphat gestartet. Ein Unit an Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die zur Umwandlung von 1 µmol D-Fructose-6-phosphat (gleichzusetzen mit 1 µmol reduziertem NADP) pro Minute bei 25°C führt.

Fructosediphosphatase

Die Bestimmung der Phosphohexose-Isomerase-Aktivität erfolgte durch Kopplung der Phosphohexose-Isomerase-Reaktion mit der Reaktion der Phosphohexose-Isomerase sowie der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Der Verbrauch an NADP wurde bei 25°C inner-

halb von 30 min in Intervallen von 2 min anhand der Extinktionszunahme bei 340 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen. Die Standard-Umsetzungsbedingungen in einem Endvolumen von 2 ml waren 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4 mM MgCl₂, 3.8 mM D-Fructose-1,6-phosphat, 1 U ml⁻¹ Phosphohexose-Isomerase, 1 U ml⁻¹ Glucose-6-phosphatdehydrogenase, 0.15 mM NADP. Alle Umsetzungen wurden durch die Zugabe von D-Fructose-1,6-phosphat gestartet. Ein Unit an Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die zur Umwandlung von 1 µmol D-Fructose-1,6-phosphat (gleichzusetzen mit 1 µmol reduziertem NADP) pro Minute bei 25°C führt.

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität wurde nach Zugabe von Glucose-6-phosphat direkt anhand des Verbrauchs an NADP bei 25°C bestimmt. Es wurde innerhalb von 30 min in Intervallen von 2 min die Extinktionszunahme bei 340 nm gemessen. Die Standard-Umsetzungsbedingungen in einem Endvolumen von 2 ml waren 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4 mM MgCl₂, 3.8 mM Glucose-6-phosphat, 0.15 mM NADP. Alle Umsetzungen wurden durch die Zugabe von Glucose-6-phosphat gestartet. Ein Unit an Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die zur Umwandlung von 1 µmol Glucose-6-phosphat (gleichzusetzen mit 1 µmol reduziertem NADP) pro Minute bei 25°C führt.

6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase

Die 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase-Aktivität wurde nach Zugabe von 6-Phosphogluconsäure direkt anhand des Verbrauchs an NADP bei 25°C bestimmt. Es wurde innerhalb von 30 min in Intervallen von 2 min die Extinktionszunahme bei 340 nm gemessen. Die Standard-Umsetzungsbedingungen in einem Endvolumen von 2 ml waren 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4 mM MgCl₂, 3.8 mM 6-Phosphogluconsäure, 0.15 mM NADP. Alle Umsetzungen wurden durch die Zugabe von 6-Phosphogluconsäure gestartet. Ein Unit an Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die zur Umwandlung von 1 µmol 6-Phosphogluconsäure (gleichzusetzen mit 1 µmol reduziertem NADP) pro Minute bei 25°C führt.

3.5.2.2 Gewinnung des geklärten Extraktes

Frische Erdbeerfrüchte (200 g) verschiedener Reifegrade wurden unter Zusatz von 15 g Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) und 100 ml Wasser im Mixer homogenisiert und umgehend mit 1 N NaOH auf pH 7.7 eingestellt. Alle anderen Standard-Methoden führten zur Gelbildung. Die Suspension ist 30 min bei 40 000 g zentrifugiert worden. Der Proteinextrakt wurde entweder gegen 20 mM Tris-HCl (pH 7.7) dialysiert oder direkt für weitere Aufarbeitungsschritte herangezogen.

3.5.2.3 Chromatographie an Q-Sepharose Fast Flow

Die Trennung der Isoenzyme der Phosphohexose-Isomerase und 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase erfolgte durch Chromatographie an Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia). Der dialysierte Proteinextrakt reifer Erdbeerfrüchte wurde auf das zuvor mit 20 mM Tris-HCl konditionierte Säulematerial gegeben und mit 500 ml eines linearen Gradienten von 0-0.5 M KCl in 20 mM Tris-HCl (pH 7.7) bei einer Flussrate von 2 ml min⁻¹ eluiert. Es wurden Fraktionen (10 ml) gesammelt und auf ihre Aktivitäten an Phosphohexose-Isomerase und 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase getestet.

3.5.3 Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung einer Alkohol-Dehydrogenase⁷ aus Erdbeeren

3.5.3.1 Bakterienwachstum

Eine Kolonie der auf einer Agar-Platte gewachsenen Bakterien wurde in 10 ml LB-Medium (10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Yeast Extract - mit „Millipore-Wasser“ auf 1 l aufgefüllt, autoklaviert), 6 µl Chloramphenicol- (34 mg/ml) und 10 µl Ampicillin-Lösung (100 mg/ml) angezogen und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Von dieser Bakterien-Lösung sind 2.5 ml mit 100 ml LB-Medium, 60 µl Chloramphenicol und 100 µl Ampicillin verdünnt worden. Die so erhaltene Lösung wurde bei

⁷ Der ADH-Klon wurde dankenswerter Weise von Dr. A. Aharoni des Plant Research International in Wageningen (Niederlande) zur Verfügung gestellt.

37°C und 200 rpm für 1-4 h im Schüttelschrank inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0.4 und 0.6 wurde die Genexpression gestartet.

3.5.3.2 Genexpression

Pro 100 ml der unter D 3.5.3.1 erhaltenen Lösung wurden zum Start der ADH-Expression 100 µl 1 M IPTG-Lösung hinzugegeben. Exprimiert wurde im Schüttelinkubator bei 16-18°C über Nacht.

3.5.3.3 Isolierung und Reinigung der ADH

Die Isolierung und Reinigung erfolgte nach dem *Talon™ Metal Affinity Resins User Manual* (2001). Zum Aufschluss der Bakterien wurde die über Nacht inkubierte Lösung (D 3.5.3.2) bei 2000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert worden. Das erhaltene Pellet wurde mit 2 ml gekühltem Wasch-/Extraktions-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 7) in einen gekühlten Mörser überführt und dort im Verhältnis 1:1 mit Glas-Beads (Firma Sigma) vermischt. Diese Mischung wurde für 10 min gemörsert, bis ein Homogenat entstand, welches bei 10000 g für 20 min zentrifugiert wurde.

Der das exprimierte Protein enthaltende Überstand wurde mit Talon™ Harz, das zuvor mit Wasch-/Extraktionspuffer äquilibriert wurde, vermischt und für 20 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. In dieser Zeit bindet das His-Tag an das Cobalt-Harz. Nach erfolgter Adsorption ist für 5 min bei 1500 g zentrifugiert worden. Der Überstand wurde entnommen und verworfen, der Rückstand zweimal mit Wasch-/Extraktionspuffer gewaschen. Die Desorption des rekombinanten Enzyms erfolgte durch Zugabe von 2 ml Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol, pH 7) zum Rückstand. Nach Zentrifugation und einmaligem Nachwaschen mit weiteren 2 ml Elutionspuffer wurden die Überstand vereinigt.

3.5.3.4 Enzymassay

Die Bestimmung der Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität erfolgte nach Zugabe verschiedener Substrate direkt anhand des Verbrauchs an NADH bei 25°C. Es wurde innerhalb von 30 min in Intervallen von 2 min die Extinktionsabnahme bei 340 nm gemessen. Die Standard-Umsetzungsbedingungen in einem Endvolumen von 3 ml waren 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0), 6.7 mM Substrat und 0.2 mM NADH. Alle Umsetzungen wurden durch die Zu-

gabe des jeweiligen Substrates gestartet. Für die Bestimmung der Michaelis-Konstanten wurde die Substratkonzentration zwischen 0.33 mM und 6.7 mM variiert.

3.6 Untersuchungen zur Bildung von HDMF in Proteinextrakten reifender Erdbeerfrüchte

3.6.1 Extraktgewinnung

Ca. 200 g Erdbeeren wurden mit 20 g Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) und 200 ml dest. Wasser versetzt und kurze Zeit im Mixer homogenisiert. Das Gemisch wurde mit 1 N-NaOH auf pH 7.0 eingestellt und anschließend für 25 Minuten bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand ist über Glaswolle filtriert und der Rückstand verworfen worden. Es erfolgte eine nochmalige Zentrifugation für 25 Minuten bei 40000 g. Der Überstand wurde wieder über Glaswolle filtriert und der Rückstand, der u.a. Zellwandbestandteilen und Membranen enthielt wurde nach mehrmaligem Waschen mit Wasser direkt für Umsetzungsversuche herangezogen.

Um bereits vorhandenes HDMF abzutrennen, ist der Überstand dreimal gegen Phosphat-Puffer (3 l / 100 mM, pH 7) für jeweils vier Stunden dialysiert worden (Ausschlussgrenze 1200 Da). Der erhaltene cytosolische Proteinextrakt wurde für die Inkubationsversuche eingesetzt. Die gesamte Aufarbeitung fand soweit möglich unter Kühlung statt, um die Enzymaktivitäten zu erhalten.

3.6.2 Inkubation

In einem Plastikröhrchen mit Schraubverschluss wurden zu 20 ml dialysiertem cytosolischem Proteinextrakt 20 mg Fructose-1,6-diphosphat und jeweils 1 mg an NAD, NADH, NADP sowie NADPH gegeben. Nach Zugabe von 2 ml 1 M Phosphatpuffer (pH 7) sind die Proben gegebenenfalls mit 1 N-NaOH bzw. 1 N-HCl auf pH 7.0 eingestellt worden. Die Inkubation der Proben erfolgte im Schüttelschrank bei 30°C für 24 Stunden.

Bei den Inkubationen des Rückstandes mit Membranen und Zellwandbestandteilen wurde dieser in 10 ml 100 mM Phosphat-Puffer (pH 7) suspendiert und nach Zugabe von 20 mg Fructose-1,6-diphosphat ebenfalls 24 Stunden bei 30°C im Schüttelschrank inkubiert.

3.6.3 Extraktion und Analyse

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Proben zentrifugiert und die Überstände separat auf konditionierte RP18-Kartuschen (500 mg, ICT, Bad Homburg) aufgetragen. Die Kartuschen sind mit jeweils 1 ml H₂O nachgewaschen und anschließend die apolaren Verbindungen mit jeweils 3 ml Diethylether eluiert worden. Dem über Na₂SO₄ getrocknetem organischen Extrakt wurden 100 µl H₂O zugesetzt. Das organische Lösungsmittel wurde im leichten Stickstoffstrom vorsichtig abgeblasen und die verbleibende wässrige Phase mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 285 nm analysiert.

3.7 Enantioselektive Analyse von HDMF

3.7.1 Darstellung von einantiomerenangereichertem HDMF

Die HDMF Enantiomere wurden semipräparativ mittels HPLC an einer chiralen Phase (D-2.4 HPLC 5) isoliert. Die Trennung der Enantiomere erfolgte unter Verwendung eines Gemisches an Pentan/Diethylether (7:3) als mobile Phase bei einer Flussrate von 0.8 ml/min und einer Detektionswellenlänge von 285 nm. Unter diesen Bedingungen eluierten die HDMF Enantiomere bei 27 und 28 min. Die gesammelten Fraktionen wurden eingengt, 500 µl eines 50 millimolaren Ammoniumacetat Puffers (pH-Werte 2, 3.8, 5, und 7) zugesetzt, und das organische Lösungsmittel im leichten Stickstoffstrom entfernt.

3.7.2 Extraktion von HDMF aus Erdbeerfrüchten

Erdbeerfrüchte (50 g) wurden unter Zusatz der gleichen Menge an Wasser in einem Mixer homogenisiert und zentrifugiert (5,000 g; 10 min). Der filtrierte Überstand ist 3-mal mit dem gleichen Volumen an Diethylether extrahiert worden. Die vereinigten Diethylether-Extrakte wurden eingengt, 500 µL 0.05 M Ammoniumacetat Puffer (pH 4) zugesetzt, und das organische Lösungsmittel im leichten Stickstoffstrom entfernt. Die erhaltenen wässri-

gen Lösungen wurden durch 0.22 µm Membranfilter (Carl Roth, Karlsruhe) filtriert und mittels cKZE⁸ analysiert.

3.7.3 HDMF durch Inkubation mit Erdbeerproteinextrakt

Ein gemäß Abschnitt D-3.6.1 hergestellter Proteinextrakt ist gegen 3 L eines 0.1 M Phosphat Puffers bei pH 5 und pH 7 dialysiert (4 x) worden um natürlich enthaltenes HDMF abzutrennen. D-Fructose-1,6-diphosphat (500 mg) und NADH (5 mg) wurden mit 100 ml des dialysierten cytosolischen Proteinextraktes für 24 h inkubiert und anschließend mit 100 ml Diethylether (3x) extrahiert. Die vereinigten Diethylether-Extrakte sind über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt worden. Wasser (100 µl) wurde zugefügt und das organische Lösungsmittel im leichten Stickstoffstrom entfernt. Die Isolierung von HDMF erfolgte semipräparativ mittels RP-HPLC. Fraktionen, die HDMF enthielten wurden gesammelt und mit einem Stickstoffstrom konzentriert. Nach Zusatz von 500 µl 0.05 M Ammoniumacetat Puffer (pH 4) wurde das organische Lösungsmittel im leichten Stickstoffstrom entfernt. Die erhaltenen wässrigen Lösungen wurden durch 0.22 µm Membranfilter (Carl Roth, Karlsruhe) filtriert und mittels CD-modifizierter KZE analysiert.

3.7.4 Bestimmung des optischen Drehwinkels der HDMF-Enantiomere

Die HDMF Enantiomere sind mittels Chiralphasen HPLC getrennt und einzeln gesammelt worden. Die Proben wurden konzentriert und der optische Drehwert mittels Polarimetrie bestimmt (Perkin Elmer 241). Die Berechnung des spezifischen Drehwertes erfolgte anhand der folgenden Formel:

$$[\alpha]_D^t = 100 \times \alpha / l \times c$$

mit $[\alpha]_D^t$ als spezifischer Drehwert bei der Temperatur t (°C), α als gemessener Drehwert, l als Länge der Probenröhre (dm) und c als Konzentration der Probe (g pro 100 ml). Die

⁸ Die cKZE-Untersuchungen wurden dankenswerter Weise von U. Schmitt im Arbeitskreis von Prof. U. Holzgrabe am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt.

Konzentration der Probe wurde mittels RP-HPLC unter Berücksichtigung einer Kalibrierfunktion bestimmt.

3.8 Charakterisierung der enzymkatalysierten Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat

3.8.1 Variation des pH-Wertes

Aliquote Mengen eines Erdbeerproteinextraktes wurden gegen 100 mM Puffer Lösungen im pH-Bereich von pH 3 bis pH 10 dialysiert. Im Bereich von pH 3 – pH 4 ist ein verdünnter Citrat-Phosphat Puffer nach McIlvaine verwendet worden. Phosphat Puffer wurde im Bereich von pH 5 – pH 7, Tris-Cl-Puffer im Bereich von pH8 – pH 10 eingesetzt. Zu je 20 ml dialysiertem Extrakt wurden 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und jeweils 1 mg NADH zugesetzt. Der pH-Wert der Ansätze wurde kontrolliert und ggf. mit 1 N-NaOH bzw. 1 N-HCl auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Analyse der Proben erfolgte nach einer Inkubationszeit von 30 Stunden bei 30°C wie unter Abschnitt D-3.6.3 beschrieben.

3.8.2 Einfluss der Temperatur

Aliquoten Mengen (20 ml) eines dialysierten, cytosolischen Proteinextraktes (100 mM Phosphatpuffer pH 7.0) wurden 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und jeweils 1 mg NADH zugesetzt. Der pH-Wert der Ansätze ist kontrolliert und ggf. mit 1 N-NaOH bzw. 1 N-HCl auf pH 7.0 eingestellt worden. Die Proben wurden bei Temperaturen im Bereich von 20°C bis 50°C für 30 Stunden inkubiert. Extraktion und Analyse erfolgte gemäß Abschnitt D-3.6.3.

3.8.3 Einsatz unterschiedlicher Substratmengen - Michaelis-Menten Kinetiken

Aliquoten Mengen (20 ml) eines dialysierten, cytosolischen Proteinextraktes (100 mM Phosphatpuffer pH 7.0) wurden jeweils 200 mg D-Fructose-1,6-diphosphat zugesetzt. Die Menge an NADH im Inkubationsansatz wurde im Bereich von 0 bis 5 mg NADH variiert.

Entsprechend sind in einem parallel durchgeführten Experiment zu aliquoten Mengen (20 ml) des dialysierten cytosolischen Proteinextraktes jeweils 5 mg NADH zugesetzt und die Menge an D-Fructose-1,6-diphosphat im Inkubationsansatz wurde im Bereich von 0 bis 100 mg variiert worden. Der pH-Wert der Ansätze wurde kontrolliert und ggf. mit 1 N-NaOH bzw. 1 N-HCl auf pH 7.0 eingestellt. Die Proben wurden bei Temperaturen im Bereich von 20°C bis 50°C für 30 Stunden inkubiert. Extraktion und Analyse erfolgte gemäß Abschnitt D-3.6.3.

3.8.4 Einfluss des Reifegrades der Erdbeerfrüchte auf die Menge an gebildetem HDMF

Jeweils 20 ml von dialysierten, cytosolischen Proteinextrakten (100 mM Phosphatpuffer pH 7.0) gewonnen aus unreifen, halbreifen und reifen Erdbeerfrüchten wurden 20 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und jeweils 1 mg NADH zugesetzt. Der pH-Wert der Ansätze ist kontrolliert und ggf. mit 1 N-NaOH bzw. 1 N-HCl auf pH 7.0 eingestellt worden. Die Proben wurden bei Temperaturen im Bereich von 20°C bis 50°C für 30 Stunden inkubiert. Extraktion und Analyse erfolgte gemäß Abschnitt D-3.6.3.

3.8.5 Variation der Substrate

Aliquoten Mengen (20 ml) eines dialysierten, cytosolischen Proteinextraktes (100 mM Phosphatpuffer pH 7.0) wurden jeweils 0.3 mmol D-Fructose-1,6-diphosphat, D-Fructose-6-phosphat, D-Glucose-6-phosphat und D-Glucose und jeweils 1 mg NADH zugesetzt. Außerdem wurden einem Aliquot 0.3 mmol D-Fructose-1,6-diphosphat sowie 1 mg NADPH zugesetzt. Der pH-Wert der Ansätze ist kontrolliert und ggf. mit 1 N-NaOH bzw. 1 N-HCl auf pH 7.0 eingestellt worden. Die Proben wurden bei Temperaturen im Bereich von 20°C bis 50°C für 30 Stunden inkubiert. Extraktion und Analyse erfolgte gemäß Abschnitt D-3.6.3.

3.9 Aufreinigung der HDMF-bildenden enzymatischen Aktivität

3.9.1 Grundlegende Aufreinigungsschritte

3.9.1.1 Herstellung des geklärten Extraktes

100 g Erdbeeren sind mit 10 g Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) und 100 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) versetzt und kurze Zeit im Mixer homogenisiert worden. Das Gemisch wurde mit 1 N-NaOH auf pH 7.0 eingestellt und anschließend für 25 Minuten bei 14000 g zentrifugiert. Es erfolgte eine nochmalige Zentrifugation des filtrierten Überstandes für 25 Minuten bei 40000 g. Der Überstand wurde erneut über Glaswolle filtriert und der Rückstand verworfen. Anstelle der Dialyse sind niedermolekulare Verbindungen säulenchromatographisch an Bio-Gel[®] mit einer Ausschlussgrenze von 6000 Da von den höhermolekularen Verbindungen abgetrennt worden. Dazu wurden 20 ml Extrakt auf die Säule (2.5 x 20 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) bei einem Fluss von 3 ml min⁻¹. Es wurden Fraktionen (10 ml) gesammelt und nach Bradford (vgl. D-3.1.3) auf ihren Proteingehalt untersucht. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Die Überprüfung der HDMF-bildenden Aktivität erfolgte mit Hilfe des Standardinkubations-Experimentes (D-3.6.2).

3.9.1.2 Ultrafiltration

Unter Verwendung von Ultrazentrifugationsfiltern mit molekularen Ausschlussgrenzen von 10, 30, 50 und 100 kDa wurde der Extrakt in Fraktion mit unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen (<10 kDa, 10 kDa - 30 kDa, 30 kDa - 50 kDa, 50 kDa - 100 kDa, > 100 kDa) aufgetrennt. Die erhaltenen Lösungen sind erneut mit Hilfe des Standardinkubations-Experimentes untersucht worden. HDMF-Bildung wurde im Molekulargewichtsbereich zwischen 10 kDa und 50 kDa beobachtet. Der Extrakt nach D-3.9.1.1 wurde daher standardmäßig zunächst mit einem Ultrazentrifugationsfilter mit 10 kDa filtriert, der erhaltene Überstand (> 10 kDa) anschließend mit einem Ultrazentrifugationsfilter mit 50 kDa. Der Durchlauf der zweiten Filtration (10 - 50 kDa) wurde für weitere Aufreinigungsverfahren (GPC, IEC) verwendet.

3.9.2 Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S300

Eine Sephacryl S-300 HR FPLC Säule (1.6 x 60 cm; Pharmacia) ist mit 20 mM Phosphatpuffer, pH 7.0 äquilibriert worden. Die entsalzten und konzentrierten Protein-Lösungen wurden auf die Säule aufgetragen und mit 20 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) bei einer Flussrate von 0.2 ml min^{-1} eluiert. Aliquote Mengen (1 ml) der erhaltenen 4 ml-Fractionen wurden mit D-Fructose-1,6-diphosphat (20 mg) unter Zusatz von NADH (1 mg) 24 h inkubiert. Der pH-Wert ist vor der Inkubation nochmals überprüft und ggf. mit 1 N-NaOH bzw. 1 N-HCl auf pH 7.0 eingestellt worden. Die Extraktion und Analyse erfolgte gemäß Abschnitt D-3.6.3. Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts des unbekanntes Proteins wurde die Sephacryl S300 Säule mit einer Proteinstandard-Mischung bestehend aus Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinder-serumalbumin (67 kDa) Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa) und Ribonuclease A (14 kDa) von Amersham Pharmacia Biotech kalibriert. Zusätzlich wurde das Totvolumen mit Dextranblau sowie das Bettvolumen mittels Aceton bestimmt. Die Verteilungskoeffizienten K_D wurden gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes der einzelnen Proteinstandards aufgetragen (Abb. D-2). Aus der berechneten Geradengleichung ist das native Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins bestimmt worden.

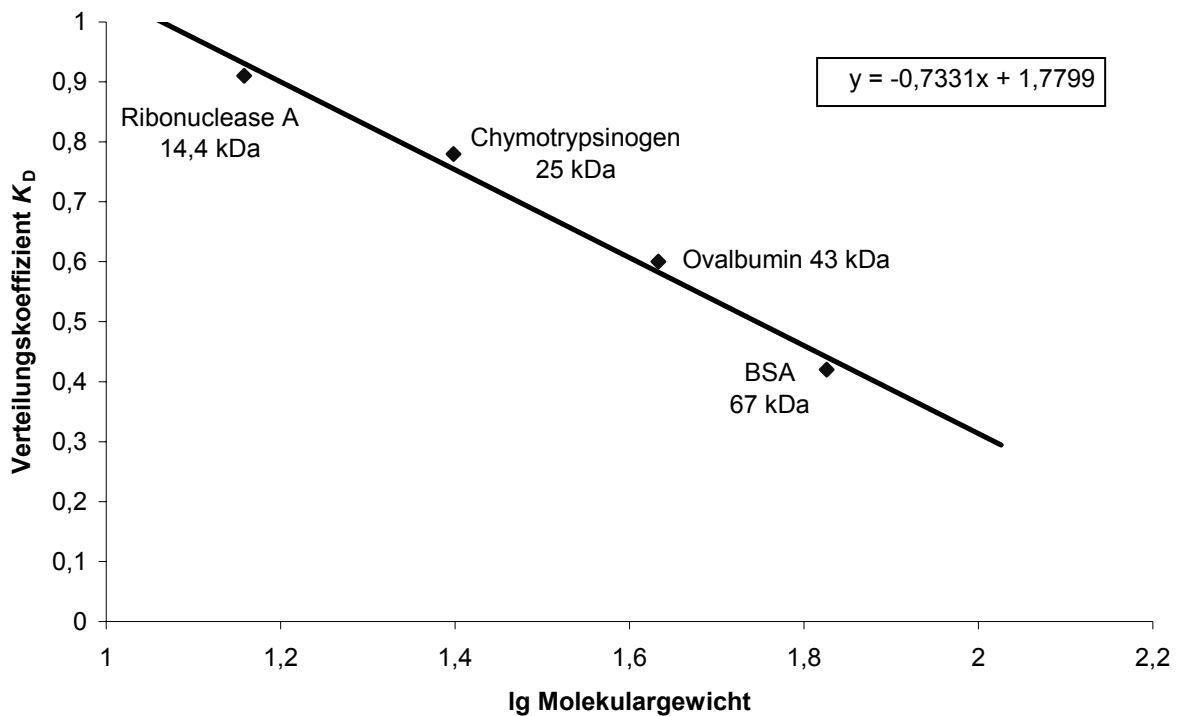


Abb. D-2: Kalibriergerade zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes mittels GPC an Sephacryl S300. Die Verteilungskoeffizienten K_D wurden gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes der einzelnen Proteinstandards aufgetragen.

3.9.3 Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose Fast Flow

Eine Q-Sepharose Fast Flow Säule (2.6 x 20 cm) ist mit 20 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) äquilibriert und ein über Bio-Gel[®] entsalzter Erdbeerproteinextrakt auf das Säulenmaterial aufgetragen worden. Die Elution erfolgte unter Verwendung eines linearen Gradienten (400 ml) von 0-0.5 M NaCl in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) bei einer Flussrate von 1.0 ml min⁻¹. Aliquote Mengen (2 ml) der erhaltenen 10 ml-Fractionen wurden mit D-Fructose-1,6-diphosphat (20 mg) unter Zusatz von NADH (1 mg) 24 h inkubiert. Die Extraktion und Analyse erfolgte gemäß Abschnitt C 3.6.3.

3.9.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE ist nach Laemmli (1970) als diskontinuierliche (Disk)-Elektrophorese in einer Mini-Protean II Aparatur von BioRad durchgeführt worden. Es wurden Ready Tris-Tricine Gele (16.5 %) von BioRad eingesetzt. Die enzymatische Aktivität enthaltenden Fraktionen, die durch GPC sowie IEC erhalten wurden, wurden einzeln mittels Ultrafiltration entsalzt, anschließend lyophilisiert und in 20 μ l Probenpuffer (BioRad) aufgenommen. Nach Zusatz von 4 μ l Mercaptoethanol sind die Proben 3 min auf dem siedenden Wasserbad erhitzt worden. Das Elektroden-Puffer Konzentrat wurde von BioRad bezogen und musste vor Gebrauch verdünnt werden. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Nach erfolgter Trennung wurden die Gele in einer Lösung mit Coomassie-Blau (0.1 %) in Ethanol-Eisessig-Wasser (10:10:80) für 30 min gefärbt und danach in Ethanol-Eisessig-Wasser (10:10:80) entfärbt. Die verwendeten Standards (Pharmacia) zur Abschätzung des Molekulargewichtes waren BSA (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), sowie Chymotrypsinogen A (25 kDa). Die Retentionsfaktoren der Markerproteine wurden gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen (Abb. D-3). Aus der berechneten Geradengleichung wurde das Molekulargewicht der Hauptproteinbande bestimmt.

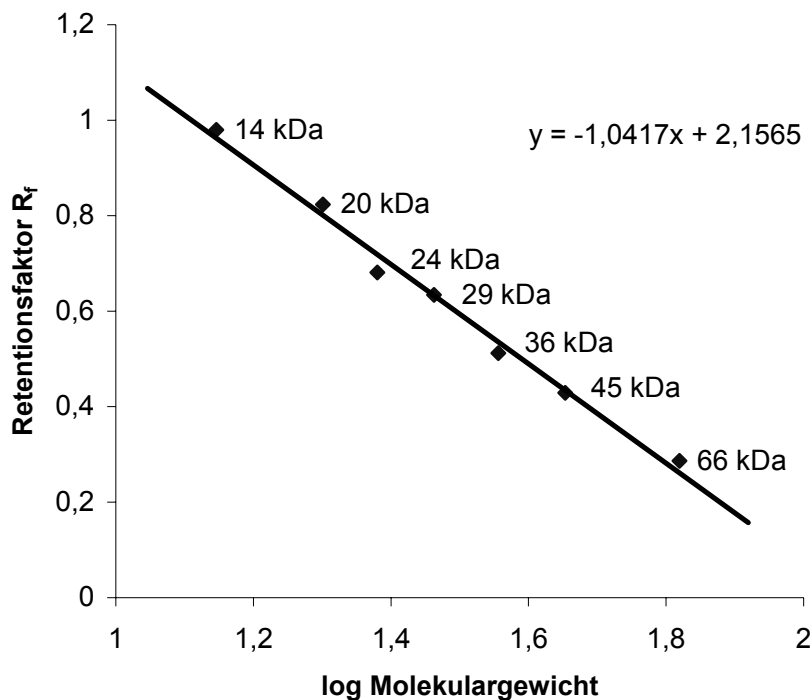


Abb. D-3: Kalibriergerade für die Molekularmassenbestimmung der Hauptproteinbande mittels PAGE nach Reinigung über GPC sowie IEC. Die Retentionsfaktoren der Markerproteine wurden gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen.

3.10 Aminosäuresequenzierung⁹

12 Filterpapiere und eine PVDF-Membran wurden entsprechend der Größe des SDS-PAGE-Gels zugeschnitten und vor dem Blot-Vorgang im Transferpuffer bestehend aus einem 35 mM 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CAPS)-Puffer (pH 10) mit 0,7 mM 3-Mercapto-propionsäure, 30 % (v/v) MeOH und 0,1 % (w/v) SDS äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte im so genannten „Semi-Dry“-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) mit der „Transblot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell“ der Firma BioRad, bestehend aus einer Platten-

⁹ Die Aminosäuresequenzierung wurde freundlicherweise von Dr. V. Hoppe im Arbeitskreis von Prof. J. Hoppe am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II der Universität Würzburg durchgeführt.

elektrode und dem Blotsandwich. Auf der Anodenseite wurden nacheinander 6 Filterpapiere, die PVDF-Membran, das Gel und die restlichen 6 Filterpapiere aufgelegt. Nach dem Verschließen mit der Kathodenplatte wurden die Proteine bei einem konstanten Stromfluss von 72 mA für 2 h transferiert. Danach sind die an die PVDF-Membran adsorbierten Proteine mit Coomassie-Blau gefärbt und die Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 37 kDa ausgeschnitten worden. Durch automatisierten Edman-Abbau sollte die N-terminale Aminosäuresequenz bestimmt werden. Aufgrund einer N-terminalen Blockierung des Proteins scheiterte jedoch diese Bestimmung. Daher sollten interne Sequenzen des Peptids untersucht werden. In einem zweiten Versuch wurde die Proteinbande aus dem oben erwähnten SDS-PAGE-Gel herausgeschnitten und über Nacht bei 25°C in Ameisensäure mit 5 % (w/v) Bromcyan geschüttelt. Am darauf folgenden Tag ist der Überstand abgetrennt und die verbleibenden Gelstücke erneut zweimal mit jeweils 100 µl Ameisensäure gewaschen worden. Der Überstand und die Waschlösung wurden vereinigt und in der SpeedVac getrocknet. Die eluierten Peptide wurden im Anschluss elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel nach Schägger und Jagow (1987) getrennt. Nach erneutem Elektroblothing der Peptide auf eine PVDF-Membran und Anfärben mit Coomassie-Blau wurden die Peptidbanden abgetrennt. Nach automatisiertem Edman-Abbau erfolgte die Bestimmung der Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptidfragmente durch die Analyse der nacheinander vom *N*-Terminus abgespaltenen Aminosäuren als Phenylthiohydantoin (PTH)-Derivate mittels HPLC-Trennung an einer Applied Biosystems Apparatur Modell 476A. Mit den erhaltenen Peptidsequenzen wurden Identitätssuchen mit Hilfe von öffentlichen Proteinsequenz-Datenbanken (Swiss Prot, PIR, PRF, nr-aa, GenBank, und EMBL) durchgeführt.

E Literaturverzeichnis

- Abeles, F. B.; Takeda, F.** Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Sci. Hort.* **1990**, *42*, 269-275.
- Acree, T. E.** Bioassays for flavor. *Flavor science, sensible principles and techniques*; T. A. Acree and R. Teranishi, Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, **1993**; pp 1-20.
- Aharoni, A.; Keizer, L. C. P.; Bouwmeester, H. J.; Sun, Z. K.; Alvarez-Huerta, M.; Verhoeven, H. A.; Blaas, J.; van Houwelingen, A.; 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.; Ap, O. C.** Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* **2000**, *12*, 647-661.
- Alonso, J. M.; Chamaro, J.; Granell, A.** Evidence for the involvement of ethylene in the expression of specific RNAs during maturation of the orange, a non-climateric fruit. *Plant Mol. Biol.* **1995**, *29*, 385-390.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403-410.
- Amini, A.** Recent developments in chiral capillary electrophoresis and application of this technique to pharmaceutical and biomedical analysis. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3107-3130.
- Andrews, D. L.; MacAlpine, D. M.; Johnson, J. R.; Kelley, P. M.; Cobb, B. G.; Drew, M.** Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. *Plant Physiol.* **1994**, *106*, 1575-82.
- Angenent, G. C.; Busscher, M.; Franken, J.; Mol, J. N.; van Tunen, A. J.** Differential expression of two MADS box genes in wild type and mutant petunia flowers. *Plant Cell* **1992**, *4*, 983-993.
- Archbold, D. D.; Dennis, F. G., Jr.** Quantification of free ABA and free conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1984**, *109*, 330-335.
- Backhausen, J. E.; Jöstingmeyer, P.; Scheibe, R.** Competitive inhibition of spinach leaf phosphoglucose isomerase isoenzymes by erythrose 4-phosphate. *Plant Science* **1997**, *130*, 121-131.
- Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P.** Lehrbuch der Lebensmittelchemie; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **2001**.

- Beuerle, T.; Schreier, P.; Schwab, W.** (R)-3-hydroxy-5(Z)-octenyl b-D- glucopyranoside from *Malus sylvestris* fruits. *Natural Product Letters* **1997**, *10*, 119-124.
- Blank, I.; Fay, L. B.** Formation of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone through Maillard reaction based on pentose sugar. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 531-536.
- Boldt, R.; Pelzer-Reith, B.; Boerner, T.; Schnarrenberger, C.** Aldolases in barley (*Hordeum vulgare* L.): properties and repression of the plastid enzyme in the plastome mutant "albostrians". *J. Plant Physiol.* **1994**, *144*, 282-6.
- Botha, F. C.; O'Kennedy, M. M.** Characterization of the cytosolic aldolase from germinating *Phaseolus vulgaris* seeds. *J. Plant Physiol.* **1989**, *135*, 433-8.
- Bruche, G.; Dietrich, A.; Mosandl, A.** Stereoisomeric flavour compounds LXXI: Determination of the origin of aroma-active dihydrofuranones. *Z. Lebensm. Unters. Forsch* **1995**, *201*, 249-252.
- Bruche, G.; Schmarr, H.-G.; Bauer, A.; Mosandl, A.; Rapp, A.; Engel, L.** Stereoisomere Aromastoffe. LI: Stereodifferenzierung chiraler Furanone. Möglichkeiten und Grenzen der herkunftsspezifischen Aromastoff-Analyse. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, *193*, 115-118.
- Brummell, D. A.; Harpster, M. H.; Dunsmuir, P.** Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Mol. Biol.* **1999**, *39*, 161-169.
- Buttery, R. G.; Ling, L. C.** Direct formation of 4-Alkoxy derivatives from 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and aliphatic alcohols. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1512-1514.
- Buttery, R. G.; Takeoka, G. R.; Krammer, G. E.; Ling, L. C.** Identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and 5-methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in fresh and processed tomato. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1994**, *27*, 592-594.
- Buttery, R. G.; Takeoka, G. R.; Ling, L. C.** Furanol: Odor threshold and importance to tomato aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1638-1640.
- Capon, B.; Kwok, F. C.** Tautomerism of the monohydroxy derivatives of five-membered oxygen, nitrogen, and sulfur heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5346-5356.
- Cazzonelli, C. I.; Cavallaro, A. S.; Botella, J. R.** Cloning and characterization of ripening-induced ethylene biosynthetic genes from non-climateric pineapple (*Ananas comosus*) fruits. *Aust. J. Plant. Physiol.* **1998**, *25*, 513-518.
- Cerny, C.; Grosch, W.** Evaluation of potent odorants in roasted beef by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 322-325.

- Chankvetadze, B.; Burjanadze, N.; Pintore, G.; Strickmann, D.; Bergenthal, D.; Blaschke, G.** Chiral recognition of verapamil by cyclodextrins studied with capillary electrophoresis, NMR spectroscopy, and electrospray ionization mass spectrometry. *Chirality* **1999**, *11*, 635-644.
- Chen, C.-W.; Shu, C.-K.; Ho, C.-T.** Photosensitized oxidative reaction of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2361-2365.
- Cheng, G. W.; Breen, P. J.** Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *J. Am. Soc. Horticult. Sci.* **1991**, *116*, 865-869.
- Cheng, G. W.; Malencik, D. A.; Breen, P. J.** UDP-glucose:-flavonoid O-glucosyltransferase from strawberry fruit. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1435-1439.
- Christen, H. R.** Grundlagen der organischen Chemie; Sauerländer: Diesterweg-Salle, **1977**; Vol. 4.
- Christians, T.** Kapillarelektrophoretische Trennung chiraler 1,4-Dihydropyridine mit nativen und anionischen Cyclodextrinen sowie mit einem neu synthetisierten, carbomylierten β -Cyclodextrin-Derivat: Dissertation, Universität Würzburg, **2001**.
- Chuyen, N. V.** Maillard reaction and food processing: Application aspects. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *434*, 213-235.
- Civello, P. M.; Martinez, G. A.; Chaves, A. R.; Anon, M. C.** Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2596-2601.
- Civello, P. M.; Powell, A. L.; Sabehat, A.; Bennett, A. B.** An Expansin Gene Expressed in Ripening Strawberry Fruit. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 1273-1279.
- Copeland, L.; Turner, J. F.** The regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway. *The Biochemistry of Plants* **1987**, *11*, 107-125.
- Copper, C. L.; Davis, J. B.; Sepaniak, M. J.** Mechanisms of enantiomeric resolution in cyclodextrin-modified capillary electrophoretic separations of binaphthyl compounds. *Chirality* **1995**, *7*, 401-8.
- Cordenunsi, B. R.; Nascimento, J. R. O.; Mota, R. V.; Lajolo, F. M.** Phosphoglucose isomerase from bananas: partial characterization and relation to main changes in carbohydrate composition during ripening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 2174-2180.

- Davies, C.; Boss, P. K.; Robinson, S. P.** Treatment of grape berries, a nonclimateric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiol.* **1997**, *115*, 1155-1161.
- Day, D.** Strawberries; Grower Digest Series No. 3. Nexus Buisness Communications: London, **1993**.
- Dirinck, P. J.; De Pooter, H. L.; Willaert, G. A.; Schamp, N. M.** Flavor quality of cultivated strawberries: The role of the sulfur compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 316-321.
- Donaire, J. P.; Belver, A.; Rodriguez-Garcia, M. I.; Megias, L.** Lipid biosynthesis, oxidative enzyme activities and cellular changes in growing olive fruit. *Revista Espanola de Fisiologia* **1984**, *40*, 191-203.
- Douillard, C.; Guichard, E.** Comparison of multidimensional analysis of concentrations of volatile compounds in fourteen frozen strawberry varieties. *Sci. Aliments* **1989**, *9*, 53-76.
- Dreher, T. W.; Poovaiah, B. W.** Changes in auxin content during development in strawberry fruits. *J. Growth Regul.* **1982**, *1*, 267-276.
- Ernster, L.** DT diaphorase: a historical review. *Chemica Scripta* **1987**, *27A*, 1-13.
- Farine, J. P.; Le Quere, J. L.; Duffy, J.; Semon, E.; Brossut, R.** 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, two components of the male sex pheromone of *Eurycotis floridana* (Walker) (Insecta Blattidae, Polyzosteriinae). *J. Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57*, 2026-2030.
- Feinberg, A. P.; Vogelstein, B.** A technique for radio labelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Adendum Analyt Biochem* **1984**, *137*, 266-267.
- Fischer, N.; Hammerschmidt, F.-J.** A contribution to the analysis of fresh strawberry flavour. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1992**, *14*, 141-148.
- Flath, R. A.; Forrey, R. R.** Volatile components of smooth cayenne pineapple. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, *18*, 306-309.
- Forney, C. F.; Breen, P. J.** Sugar content and uptake in the strawberry fruit. *J. Am. Soc. Hortic Sci.* **1986**, *111*, 241-247.
- Fox, A.** Carbohydrate profiling of bacteria by gas chromatography-mass spectrometry and their trace detection in complex matrices by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, *843*, 287-300.
- Franke, W.** Nutzpflanzenkunde; Thieme: Stuttgart; New York, **1997**.

- Frenkel, C.; Peters, J. S.; Tieman, D. M.; Tiznado, M. E.; Handa, A. K.** Pectin methylesterase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4293-4296.
- Georgilopoulos, D. N.; Gallois, A. N.** Aroma compounds of fresh blackberries (*Rubus laciniata* L.). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 374-380.
- Gillaspy, G.; Ben-David, H.; Gruissem, W.** Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell* **1993**, *5*, 1439-1451.
- Given, N. K.; Venis, M. A.; Grierson, D.** Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* **1988a**, *174*, 402-6.
- Given, N. K.; Venis, M. A.; Grierson, D.** Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *J. Plant Physiol.* **1988b**, *133*, 25-30.
- Given, N. K.; Venis, M. A.; Grierson, D.** Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from strawberry fruit and its synthesis during ripening. *J. Plant Physiol.* **1988c**, *133*, 31-7.
- Glomb, M. A.; Tschirnich, R.** Detection of α -dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5543-5550.
- Goldring, A.; Zamir, D.; Degani, C.** Duplicated phosphoglucose isomerase genes in avocado. *Theoretical and Applied Genetics* **1985**, *71*, 491-494.
- Goldschmidt, E. E.; Huberman, M.; Goren, R.** Probing the role of endogenous ethylene in the de-greening of citrus fruit with ethylene antagonists. *Plant Growth Regul.* **1993**, *12*, 325-329.
- Grosch, W.** Analyse von Aromastoffen. *Chemie unserer Zeit* **1990**, *24*, 82-85.
- Gross, W.; Bayer, M. G.; Schnarrenberger, C.; Gebhart, U. B.; Maier, T. L.; Schenk, H. E. A.** Two distinct aldolases of class II type in the cyanoplasts and in the cytosol of the alga *Cyanophora paradoxa*. *Plant Physiol.* **1994**, *105*, 1393-8.
- Guth, H.; Grosch, W.** Identification of potent odorants in static headspace samples of green and black tea powders on the basis of aroma extract dilution analysis (AEDA). *Flavour Fragrance J.* **1993**, *8*, 173-178.
- Guth, H.; Grosch, W.** Identification of the character impact odorants of stewed beef juice by instrumental analyses and sensory studies. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2862-2866.
- Hancock, J. F.** Strawberries; CABI Publishing: Wallingford, **1999**.
- Hatanaka, A.** The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1201-1218.

- Hauck, T.** Zuckerphosphate als Vorläufer von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen - Biochemische Transformation durch die Hefe *Zygosaccharomyces rouxii* und chemische Bildung unter physiologischen Bedingungen; Dissertation: Universität Würzburg, **2003**.
- Hauck, T.; Landmann, C.; Raab, T.; Bruhlmann, F.; Schwab, W.** Chemical formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone from D-fructose 1,6-diphosphate. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1185-1191.
- Hecquet, L.; Sancelme, M.; Bolte, J.; Demuyne, C.** Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1357-1360.
- Henry, D. W.; Silverstein, R. M.** A rational synthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, a flavor component of pineapple. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2391-2394.
- Heukeshoven, J.; Dernick, R.** Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **1985**, *6*, 103-112.
- Hicks, K. B.; Feather, M. S.** Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxy-3(2H)-furanone, a component of beef flavor, from Amadori products. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 957-960.
- Hicks, K. B.; Harris, D. W.; Feather, M. S.; Loepky, R. N.** Production of 4-hydroxy-3(2H)-furanone, a component of beef flavor, from a 1-amino-1-deoxy-D-fructofuronic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1974**, *22*, 724-725.
- Hirvi, T.** Mass fragmentographic and sensory analysis in the evaluation of the aroma of some strawberry varieties. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1982**, *16*, 157-161.
- Hirvi, T.; Honkanen, E.** The volatiles of two new strawberry cultivars, "Annelie" and "Alaska Pioneer", obtained by backcrossing of cultivated strawberries with wild strawberries, *Fragaria vesca*, Rügen and *Fragaria virginiana*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1982**, *175*, 113-116.
- Hirvi, T.; Honkanen, E.; Pyysalo, T.** Stability of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in aqueous buffer solutions. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1980**, *13*, 324-325.
- Hodge, J. E. Novel reductones and methods of making them.; Patent 2.936.308: USA, 1960.
- Hodge, J. E.; Fisher, B. E.; Nelson, H. A.** Dicarbonyls, reductones, and heterocyclics produced by reaction of reducing sugars with secondary amine salts. *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* **1963**, *83*, 84-92.
- Hodge, J. E.; Mills, F. D.; Fisher, B. E.** Compounds of browned flavor derived from sugar-amine reactions. *Cereal Sci. Today* **1972**, *17*, 34-40.

- Hodgson, R. J.; Plaxton, W. C.** Purification and characterization of cytosolic fructose-1, 6-bisphosphate aldolase from endosperm of germinated castor oil seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *355*, 189-96.
- Hofmann, A.; Eugster, C. H.** Synthese von 2,5-Dimethyl-3-hydroxy- Δ^2 -furenidon-(4), einer Aromakomponente der Ananasfrucht. *Helv. Chim. Acta* **1966**, *49*, 53-56.
- Hofmann, T.; Schieberle, P.** Identification of potent aroma compounds in thermally treated mixtures of glucose/cysteine and rhamnose/cysteine using aroma extract dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 898-906.
- Holzgrabe, U.; Christians, T.** The use of cyclodextrin-modified capillary electrophoresis in the determination of the enantiomeric purity. *J. Capillary Electrophor.* **2002**, *7*, 23-29.
- Honkanen, E.; Hirvi, T.** The flavour of berries. In *Food flavours part C. The flavour of fruits*; I. D. Morton and A. J. Macleod, Eds.; Elsevier: New York, **1990**; pp 125-193.
- Honkanen, E.; Pyysalo, T.; Hirvi, T.** The aroma of finnish wild raspberries, *Rubus idaeus*, L. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1980**, *171*, 180-182.
- Honkanen, E.; Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.** Isolation and identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone glucoside from tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1595-1597.
- Hornstein, I.** Fruit flavor biogenesis. In *Flavor chemistry: thirty years of progress*; M. M. Leahy; R. G. Roderick; R. Teranishi and E. L. Wick, Eds.; Kluwer Academic / Plenum Publishing Corporation: New York, **1999**; pp 275-285.
- Hubbard, N. L.; Pharr, D. M.; Huber, S. C.** Saccharose phosphate synthase and other Saccharose-metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiologia Plantarum* **1991**, *82*, 191-6.
- Hubbard, N. L.; Pharr, D. M.** Developmental changes in carbohydrate concentration and activities of sucrose metabolizing enzymes in fruits of two *Capsicum annum* L. genotypes. *Plant Science* **1992**, *86*, 33-39.
- Huber, D. J.** Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *J. Food Sci.* **1984**, *49*, 1310-15.
- Huber, U. A.** Homofuraneol: A powerful tool to prepare and improve sophisticated high quality flavors. *Perfum. Flavour* **1992**, *17*, 15-19.
- Hunter, G. L. K.; Bucek, W. A.; Radford, T.** Volatile components of canned Alphonso mango. *J. Food Sci.* **1974**, *39*, 900-903.

- Iyanagi, T.** On the mechanisms of one- and two-electron transfer by flavin enzymes. *Chemica Scripta* **1987**, *27A*, 31-6.
- Jacob-Wilk, D.; Holland, D.; Goldschmidt, E. E.; Riov, J.; Eyal, Y.** Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase 1 gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *Plant J.* **1999**, *20*, 653-661.
- Jaiswal, A. K.; Burnett, P.; Adesnik, M.; McBride, O. W.** Nucleotide and deduced amino acid sequence of a human cDNA (NQO2) corresponding to a second member of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene family. Extensive polymorphism at the NQO2 gene locus on chromosome 6. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1899-906.
- Kahkonen, M. P.; Hopia, A. I.; Hainonen, M.** Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4076-4082.
- Kallio, H.** Identification of vacuum steam-distilled aroma compounds in the press juice of arctic bramble, *Rubus, arcticus* L. *J. Food Sci.* **1976**, *41*, 555-562.
- Kawakishi, S.; Tsunehiro, J.; Uchida, K.** Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211*, 167-171.
- Kim, I. J.; Chung, W. I.** Molecular characterization of a cytosolic ascorbate peroxidase in strawberry fruit. *Plant Science* **1998**, *133*, 69-77.
- Knee, M.; Sargent, J. A.; Osborne, D. J.** Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *J. Exp. Bot.* **1977**, *28*, 377-96.
- Kreck, M.; Scharrer, A.; Bilke, S.; Mosandl, A.** Stir bar sorptive extraction (SBSE) - enantio-MDGC-MS, a rapid method for the enantioselective analysis of chiral flavour compounds in strawberries. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *213*, 389-394.
- Kreis, P.; Mosandl, A.** Chiral Compounds of essential oils XII: Authenticity control of rose oils, using enantioselective multidimensional gas chromatography. *Flavour Fragr. J.* **1992**, *7*, 187-193.
- Kreis, P.; Mosandl, A.** Chiral compounds of essential oils XVI: Enantioselective multidimensional gas chromatography in authenticity control of balm oil. *Flavour Fragr. J.* **1994**, *9*, 257-260.
- Krueger, I.; Schnarrenberger, C.** Purification, subunit structure and immunological comparison of fructose-bisphosphate aldolases from spinach and corn leaves. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *136*, 101-6.
- Krueger, I.; Schnarrenberger, C.** Development of cytosol and chloroplast aldolases during germination of spinach seeds. *Planta* **1985**, *164*, 109-14.

- Kumar, R.; Selvaraj, Y.** Fructose 1,6-bisphosphatase in ripening mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *Indian J. Exp. Biology* **1990**, *28*, 284-286.
- Kuntz, M.; Chen, H. C.; Simkin, A. J.; Romer, S.; Shipton, C. A.; Drake, R.; Schuch, W.; Bramley, P. M.** Upregulation of two ripening-related genes from a non-climacteric plant (pepper) in a transgenic climacteric plant (tomato). *Plant J.* **1998**, *13*, 351-361.
- Kyhse-Andersen, J.** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1984**, *10*, 203-9.
- Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- Larsen, M.; Poll, L.** Odor thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Z. Lebensm. Unters. Forsch* **1992**, *195*, 120-3.
- Larsen, M.; Poll, L.; Olsen, C. E.** Evaluation of the aroma composition of some strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) cultivars by use of odour threshold values. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 536-539.
- Laskowski, M. J.; Dreher, K. A.; Gehring, M. A.; Abel, S.; Gensler, A. L.; Sussex, I. M.** FQR1, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. *Plant Physiol.* **2002**, *128*, 578-590.
- Lavid, N.; Schwab, W.; Kafkas, E.; Koch-Dean, M.; Bar, E.; Larkov, O.; Ravid, U.; Lewinsohn, E.** Aroma biosynthesis in strawberry: S-adenosylmethionine:Furaneol *O*-methyltransferase activity in riping fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2002**.
- Lebherz, H. G.; Leadbetter, M. M.; Bradshaw, R. A.** Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplast forms of spinach leaf fructose diphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 1011-17.
- Ledl, F.; Schleicher, E.** Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper - neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 597-626.
- Lelievre, J. M.; Latche, A.; Jones, B.; Bouzayen, M.; Pech, J. C.** Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Plant* **1997**, *101*, 727-739.
- Li, R.; Bianchet, M. A.; Talalay, P.; Amzel, L. M.** The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemo-

- therapy: Mechanism of the two-electron reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 10815.
- Llop-Tous, I.; Dominguez-Puigjaner, E.; Palomer, X.; Vendrell, M.** Characterization of two divergent endo-beta-1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 1415-1422.
- Loewus, F. A.** Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry* **1963**, *2*, 109-128.
- López-Serrano, M.; Barceló, A. R.** Kinetic properties of (+)-catechin oxidation by a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. *J.Food Sci.* **1997**, *62*, 676-679.
- Luster, D. G.; Buckhout, T. J.** Purification and identification of a plasma membrane associated electron transport protein from maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiol.* **1989**, *91*, 1014-19.
- Maarse, H.; Visscher, C. A.** Volatile compounds in food. Qualitative and quantitative data. TNO Biotechnology and Chemistry Institute, Zeist, The Netherlands: 3. Ergänzungsband zur 6. Auflage 1989, **1992**.
- Mamedov, Z. M.; Gyul'akhmedov, S. G.; Blutantseva, E. A.; Sal'kova, E. G.** Activity of NADPH-forming enzymes during growth and ripening of apples. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* **1997**, *33*, 334-338.
- Manning, K.** Soft fruit. *Biochem. Fruit Ripening* **1993**, 347-77.
- Manning, K.** Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta* **1994**, *194*, 62-68.
- Manning, K.** Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* **1998**, *205*, 622-631.
- Mano, J.; Torii, Y.; Hayashi, S.; Takimoto, K.; Matsui, K.; Nakamura, K.; Inzé, D.; Babiychuk, E.; Kushnir, S.; Asada, K.** The NADPH:quinone oxidoreductase P1-zeta-crystallin in Arabidopsis catalyzes the alpha,beta-hydrogenation of 2-alkenals: detoxication of the lipid peroxide-derived reactive aldehydes. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 1445-1455.
- Marsh, J. J.; Lebherz, H. G.** Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends in Biochemical Sciences* **1992**, *17*, 110-13.
- Mayerl, F.; Näf, R.; Thomas, A. F.** 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone glucoside: Isolation from strawberries and synthesis. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 631-633.

- Medina-Escobar, N.; Cardenas, J.; Moyano, E.; Caballero, J. L.; Munoz-Blanco, J.** Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol. Biol.* **1997**, *34*, 867-877.
- Medina-Escobar, N.; Cardenas, J.; Munoz-Blanco, J.; Caballero, J. L.** Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. *Plant Mol. Biol.* **1998**, *36*, 33-42.
- Mills, F. D.; Baker, B. G.; Hodge, J. E.** Amadori compounds as nonvolatile flavor precursors in processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 723-727.
- Mills, F. D.; Hodge, J. E.** Amadori compounds: Vacuum thermolysis of 1-deoxy-1-L-proline-D-fructose. *Carbohydr. Res.* **1976**, *51*, 9-21.
- Milo, C.; Reineccius, G. A.** Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild cheddar-cheese. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3590-3594.
- Minhas, D.; Grover, A.** Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. *Plant Science (Shannon, Ireland)* **1999**, *146*, 41-51.
- Mitchell, W. C.; Jelenkovitch, G.** Characterizing NAD- and NADP-dependent alcohol dehydrogenase enzymes of strawberries. *J. Am. Soc. Hortic Sci.* **1995**, *120*, 798-801.
- Modi, V. V.; Reddy, V. V. R.** Carotogenesis in ripening mangoes. *Indian J. Exp. Biology* **1967**, *5*, 233-235.
- Moorhead, G. B. G.; Hodgson, R. J.; Plaxton, W. C.** Copurification of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and cytosolic aldolase from endosperm of germinating castor oil seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *312*, 326-35.
- Mosandl, A.; Bruche, G.; Askari, C.; Schmarr, H.-G.** Stereoisomeric flavor compounds XLIV: Enantioselective analysis of some important flavor molecules. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 660-662.
- Mosandl, A.; Hener, U.; Hagenauer-Hener, U.; Kustermann, A.** Stereoisomeric flavor compounds XXXII: Direct enantiomer separation of chiral gamma-lactones from food and beverages by multidimensional gas chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, *12*, 532-536.
- Moyano, E.; Portero-Robles, I.; Medina-Escobar, N.; Valpuesta, V.; Munoz-Blanco, J.; Caballero, J. L.** A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiol.* **1998**, *67*, 711-716.

- Mudge, K. M.; Narayanan, K. R.; Poovaiah, B. W.** Control of strawberry fruit set and development with auxins. *J. Am. Soc. Hortic Sci.* **1981**, *106*, 80-84.
- Nam, Y. W.; Tichit, L.; Leperlier, M.; Cuerq, B.; Marty, I.; Lelievre, J. M.** Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.* **1999**, *39*, 629-36.
- Nevidek, W.; Ledl, F.; Fischer, W.** Detection of 5-hydroxymethyl-2-methyl-3(2H)-furanone and α -dicarbonyl compounds in reaction mixtures of hexoses and pentoses with different amines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 222-228.
- Nishimura, M.; Beevers, H.** Isoenzymes of sugar phosphate metabolism in endosperm of germinating castor beans. *Plant Physiol.* **1981**, *67*, 1255-1258.
- Nitsch, J. P.** Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *Am. J. Bot.* **1950**, *37*, 629-636.
- Nogata, Y.; Ohta, H.; Voragen, A. G. J.** Polygalacturonase in strawberry fruits. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 617-620.
- Nunomura, N.; Sasaki, M.; Yokotsuka, T.** Studies on flavor components in shoyu. Part VI. Shoyu (Soy Sauce) flavor components: Acidic fractions and the characteristic flavor component. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 339-351.
- Ohloff, G.** Chemie der Geruchs- und Geschmacksstoffe. *Fortschr. Chem. Forsch.* **1969**, *12*, 185-253.
- Ohloff, G.** Riechstoffe und Geruchssinn - Die molekulare Welt der Düfte; Springer: Berlin, **1990**.
- Pelzer-Reith, B.; Penger, A.; Schnarrenberger, C.** Plant aldolase: cDNA and deduced amino acid sequences of the chloroplast and cytosol enzyme from spinach. *Plant Mol. Biol.* **1993**, *21*, 331-40.
- Pelzer-Reith, B.; Wiegand, S.; Schnarrenberger, C.** Plastid class I and cytosol class II aldolase of *Euglena gracilis*. Purification and characterization. *Plant Physiol.* **1994**, *106*, 1137-44.
- Pérez, A. G.; Olías, R.; Olías, J. M.; Sanz, C.** Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and derivatives in in vitro grown strawberries. *J. Agric. Food Chem.* **1999a**, *47*, 655-658.
- Pérez, A. G.; Rios, J. J.; Sanz, C.; Olías, J. M.** Aroma components and free amino acids in strawberry variety Chandler during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2232-2235.
- Pérez, A. G.; Sanz, C.; Olías, J. M.** Partial purification and some properties of alcohol acyltransferase from strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1462-1466.

- Pérez, A. G.; Sanz, C.; Olías, R.; Olías, J. M.** Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activity in ripening strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1999b**, *47*, 249-253.
- Pérez, A. G.; Sanz, C.; Olías, R.; Olías, J. M.; Ríos, J. J.** Evolution of strawberry alcohol acetyltransferase activity during fruit development and storage. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3286-3290.
- Perkins-Veazie, P.** Growth and ripening of strawberry fruit. *Hort. Rev.* **1995**, *17*, 267-297.
- Phillips, S. A.; Thornalley, P. J.** The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 101-105.
- Pickenhagen, W.; Velluz, A.; Passerat, J.-P.; Ohloff, G.** Estimation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone (FURANEOL[®]) in cultivated and wild strawberries, pineapples and mangoes. *J. Sci. Food Agric.* **1981**, *32*, 1132-1134.
- Pisarnitskii, A. F.; Demechenko, A. G.; Egorov, I. A.; Cvelesiani, R. K.** Methylpentoses are probable precursors of furanones in fruits. *Appl. Biochem. Microbiol.* **1992**, *28*, 97-100.
- Poovaliah, B. W.; Veluthambi, K.** Auxin regulated invertase activity in strawberry fruits. *J. Am. Soc. Hortic Sci.* **1985**, *110*, 258-261.
- Preininger, M.; Grosch, W.** Determination of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF) in cultures of bacteria. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, *201*, 97-98.
- Preininger, M.; Rychlik, M.; Grosch, W.** Potent odorants of the neutral volatile fraction of swiss cheese (Emmentaler). In *Trends in flavour research*; H. Maarse and D. J. van der Heij, Eds., **1994**; pp 267-270.
- Prestage, S.; Linfoth, R. S. T.; Taylor, A. J.; Lee, E.; Speirs, J.; Schuch, W.** Volatile production in tomato fruit with modified alcohol dehydrogenase activity. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 131-136.
- Pyysalo, T.; Honkanen, E.; Hirvi, T.** Volatiles of wild strawberries, *Fragaria vesca* L., compares to those of cultivated berries, *Fragaria x ananassa* cv. Senga Sengana. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, *27*, 19-22.
- Rapp, A.; Knipser, W.; Engel, L.; Ullemeyer, H.; Heimann, W.** Fremdkomponenten im Aroma von Trauben und Weinen interspezifischer Rebsorten. I. Die Erdbeernote. *Vitis* **1980**, *19*, 13-23.
- Re, L.; Maurer, B.; Ohloff, G.** A simple synthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (furanol) an important aroma component of pineapple and strawberry. *Hel. Chim. Acta* **1973**, *56*, 1882-1894.

- Reddy, A. S. N.; Poovaiah, B. W.** Accumulation of a glycine rich protein in auxin-deprived strawberry fruits. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987**, *147*, 885-91.
- Redgwell, R. J.; MacRae, E.; Hallett, I.; Fischer, M.; Perry, J.; Harker, R.** In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* **1997**, *203*, 162-173.
- Rizzi, G. P.** The Maillard reaction in food. In *Maillard reactions in chemistry, food, and health*; T. P. Labuza; G. A. Reineccius; V. M. Monnier; J. O'Brian and J. W. Baynes, Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **1994**; pp 11-19.
- Rodin, J. O.; Himel, C. M.; Silverstein, R. M.; Leeper, R. W.; Gortner, W. A.** Volatile flavor and aroma components of pineapple. Isolation and tentative identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J. Food Sci.* **1965**, *30*, 280-285.
- Roscher, R.** Biosynthese und Metabolismus von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanon (Furaneol[®]); Dissertation: Universität Würzburg, **1998**.
- Roscher, R.; Bringmann, G.; Schreier, P.; Schwab, W.** Radiotracer Studies on the Formation of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in Detached Ripening Strawberry Fruits. *J. Agr. Food Chem.* **1998**, *46*, 1488-1493.
- Roscher, R.; Herderich, M.; Steffen, J.-P.; Schreier, P.; Schwab, W.** 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone 6'-O-malonyl- β -D-glucopyranoside in strawberry fruits. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 155-159.
- Roscher, R.; Schreier, P.; Schwab, W.** Metabolism of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in Detached Ripening Strawberry Fruits. *J. Agr. Food Chem.* **1997a**, *45*, 3202-3205.
- Roscher, R.; Schwab, W.; Schreier, P.** Stability of naturally occurring 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone derivatives. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1997b**, *204*, 438-441.
- Rothe, M.; Thomas, B.** Aromastoffe des Brotes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1963**, *119*, 302-310.
- Roubelakis-Angelakis, K. A.; Kliever, W. M.** Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries. *Am. J. Enol. Vit.* **1986**, *37*, 275-280.
- Rutter, W. J.** Evolution of aldolase. *Federation Proceedings* **1964**, *23*, 1248-57.
- Salas, J. J.; Sanchez, J.** Alcohol dehydrogenases from olive (*Olea europaea*) fruit. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 35-40.
- Sanz, C.; Richardson, D. G.; Pérez, A. G.** 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and derivatives in strawberries during ripening. In *Fruit Flavors, Biogenesis, Characterization, and Authentica-*

- tion; R. L. Rouseff and M. M. Leahy, Eds.; ACS Symposium Series No. 596, American Chemical Society: Washington DC, **1995**; pp 268-275.
- Sasaki, M.; Nunomura, N.; Matsudo, T.** Biosynthesis of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone by yeasts. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 934-938.
- Satyan, S. H.; Patwardhan, M. V.** Enzymes related to gluconeogenesis and organic acid metabolism in ripening fruits. *J. Food Sci. Technol.* **1984**, *21*, 175-177.
- Schaegger, H.; Von Jagow, G.** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **1987**, *166*, 368-79.
- Schieberle, P.** Primary odorants in pale lager beer. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991a**, *193*, 558-565.
- Schieberle, P.** Primary odorants in popcorn. *J. Agric. Food Chem.* **1991b**, *39*, 1141-1144.
- Schieberle, P.** Formation of furaneol in heat-processed foods. *ACS Symp. Ser.* **1992**, *490 (Flavor Precursors)*, 164-174.
- Schieberle, P.** Heat-induced changes in the most odour-active volatiles of strawberries. In *Trends in Flavour research*; H. Maarse and D. J. Van der Heij, Eds.; Elsevier: Amsterdam, **1994**; pp 345-351.
- Schieberle, P.; Grosch, W.** Potent odorants of rye bread crust-differences from the crumb and from wheat bread crust. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1994**, *198*, 292-296.
- Schieberle, P.; Hofmann, T.** Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 227-232.
- Schlegel, B. P.; Ratnam, K.; Penning, T. M.** Retention of NADPH-linked quinone reductase activity in an aldo-keto reductase following mutation of the catalytic tyrosine. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11003-11011.
- Schnarrenberger, C.; Jacobshagen, S.; Mueller, B.; Krueger, I.** Evolution of isozymes of sugar phosphate metabolism in green algae. *Progress in Clinical and Biological Research* **1990**, *344*, 743-64.
- Schnarrenberger, C.; Oeser, A.; Tolbert, N. E.** Two isoenzymes of glucose 6-phosphat dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *154*, 438-448.

- Schnarrenberger, C.; Pelzer-Reith, B.; Yatsuki, H.; Freund, S.; Jacobshagen, S.; Hori, K.** Expression and sequence of the only detectable aldolase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *313*, 173-8.
- Schreier, P.** Quantitative composition of volatile constituents in cultivated strawberries, *Fragaria ananassa* cv. Senga Sengana, Senga Litessa and Gourmella. *J. Sci. Food Agric.* **1980**, *31*, 2266-2269.
- Schultz, D. J.; Craig, R.; Cox-Foster, D. L.; Mumma, R. O.; Medford, J. I.** RNA isolation from recalcitrant plant tissue. *Plant Mol. Biol.* **1994**, *12*, 310-316.
- Schurig, V.; Weber, R.** Derivatization-free enantiomer separation of chiral alcohols and ketones by high-resolution complexation gas chromatography. *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 797-8.
- Schwab, W.** Application of stable isotope ratio analysis explaining the bioformation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in plants by a biological Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2266-2269.
- Schwab, W.; Roscher, R.** 4-Hydroxy-3(2H)-furanones: Natural and Maillard products. *Recent Res. Devel. in Phytochemistry* **1997**, *1*, 643-673.
- Schwelberger, H. G.; Kohlwein, S. D.; Paltauf, F.** Molecular cloning, primary structure and disruption of the structural gene of aldolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 301-8.
- Selvaraj, Y.** Studies of enzymes in the biogenesis of lipid-derived volatiles in ripening mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *J. Food Biochem.* **1989**, *12*, 289-99.
- Seok, Y.-J.; Yang, K.-S.; Kim, S.-T.; Huh, W.-K.; Kang, S.-O.** Characterization of quinoxaline derivatives of dehydro-D-erythroascorbic acid. *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 1085-1095.
- Serrano, A.; Cordoba, F.; Gonzalez-Reyes, J. A.; Navas, P.; Villalba, M. M.** Purification and characterization of two distinct NAD(P)H dehydrogenases from onion (*Allium cepa* L.) root plasma membrane. *Plant Physiol.* **1994**, *106*, 87-96.
- Seymour, G. B.; Taylor, J. E.; Tucker, G. A.** Biochemistry of fruit ripening; Chapman and Hall: London, **1993**.
- Shallenberger, R. S.; Acree, T. E.** Molecular theory of sweet taste. *Nature* **1967**, *216*, 480-2.
- Singh, A. K.; Mishra, M.; Kumar, R.; Prasad, U. S.** Isoenzyme pattern of respiratory enzymes associated with ripening and senescence of litchi fruits. *Indian J. Plant Physiol.* **1997**, *2*, 181-185.

- Sparla, F.; Preger, V.; Pupillo, P.; Trost, P.** Characterization of a novel NADH-specific, FAD-containing, soluble reductase with ferric citrate reductase activity from maize seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999a**, *363*, 301-308.
- Sparla, F.; Tedeschi, G.; Pupillo, P.; Trost, P.** Molecular characterization of NAD(P)H:quinone oxidoreductase of tobacco leaves. *Protoplasma* **1998**, *205*, 52-58.
- Sparla, F.; Tedeschi, G.; Pupillo, P.; Trost, P.** Cloning and heterologous expression of NAD(P)H:quinone reductase of *Arabidopsis thaliana*, a functional homologue of animal DT-diaphorase. *FEBS Letters* **1999b**, *463*, 382-386.
- Sparla, F.; Tedeschi, G.; Trost, P.** NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase of tobacco leaves is a flavin mononucleotide-containing flavoenzyme. *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 249-258.
- Speirs, J.; Lee, E.; Holt, K.; Yong-Duk, K.; Scott, N. S.; Loveys, B.; Schuch, W.** Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 1047-1058.
- Spitsberg, V. L.; Coscia, C. J.** Quinone reductases of higher plants. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *127*, 67-70.
- Sundt, E.** The development and future of flavour research. *Naeringsmiddelindustrien* **1970**, *23*, 5-13.
- Szejtli, J.** Cyclodextrins in diagnostics. *Kontakte (Darmstadt)* **1988**, 31-6.
- Takeoka, G. R.; Güntert, M.; Flath, R. A.; Wurz, R. E.; Jennings, W.** Volatile constituents of kiwi fruit (*Actinidia chinensis* Planch.). *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 576-578.
- Terabe, S.; Otsuka, K.; Nishi, H.** Separation of enantiomers by capillary electrophoretic techniques. *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 295-319.
- Testa, B.** The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics: Biochemistry of Redox Reactions, **1995**.
- Tonsbeek, C. H. T.; Plancken, A. J.; van der Weerdhof, T.** Components contributing to beef flavor. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and its 2,5-dimethyl homolog from beef broth. *J. Agric. Food Chem.* **1968**, *16*, 1016-1021.
- Trost, P.; Bonora, P.; Scagliarini, S.; Pupillo, P.** Purification and properties of NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase of sugar beet cells. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 452-8.
- Trost, P.; Foscarini, S.; Preger, V.; Bonora, P.; Vitale, L.; Pupillo, P.** Dissecting the diphenylene iodonium-sensitive NAD(P)H:quinone oxidoreductase of zucchini plasma membrane. *Plant Physiol.* **1997**, *114*, 737-746.
- 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.

- Ulrich, D.; Rapp, A.; Hoberg, E.** Analyse des Erdbeeraromas - Quantifizierung der flüchtigen Komponenten in Kulturerdbeervarietäten und der Walderdbeere. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, *200*, 217-220.
- Veluthambi, K.; Poovaiah, B. W.** Auxin-regulated polypeptide changes at different stages of strawberry fruit development. *Plant Physiol.* **1984**, *75*, 349-53.
- Weeden, N. F.; Gottlieb, L. D.** Dissociation, reassociation, and purification of plastid and cytosolic phosphoglucose isomerase isoenzymes. *Plant Physiol.* **1982**, *69*, 717-723.
- Weilacher, T.; Gleixner, G.; Schmidt, H. L.** Carbon isotope pattern in purine alkaloids a key to isotope discriminations in C₁ compounds. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1073-1077.
- Wein, M.** Biosynthese und Metabolismus von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon in Erdbeeren. Chemisch-analytische, biochemische und molekularbiologische Studien; Dissertation: Universität Würzburg, **2002**.
- Wein, M.; Lavid, N.; Lunkenbein, S.; Lewinsohn, E.; Schwab, W.; Kaldenhoff, R.** Isolation, cloning and expression of a multifunctional O-methyltransferase capable of forming 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits. *Plant J.* **2002**, *6*, 755-765.
- Wein, M.; Lewinson, E.; Schwab, W.** Metabolic fate of isotopes during the biological transformation of carbohydrates to 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2427-2432.
- Wendt, U. K.; Wenderoth, I.; Tegeler, A.; von Schaewen, A.** Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal* **2000**, *23*, 723-733.
- Werner, R. A.** Entwicklung neuer Verfahren für die on-line 18O/16O- und 2H/1H- Isotopeverhältnismessung und ihre Anwendung zur Authentizitäts- und Herkunftsbestimmung bei Naturstoffen; Dissertation: Technische Universität München, **1998**.
- Willhalm, B.; Stoll, M.; Thomas, A. F.** 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-one. *Chem. Ind.* **1965**, *18*, 1629-1630.
- Williams, A. A.; Mottram, D. S.** Gas chromatographic analysis of furaneol. *HRC & CC, Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications* **1981**, *4*, 421-2.
- Winkel-Shirley, B.** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 485-493.

- Wintoch, H.; Krammer, G.; Schreier, P.** Glycosidically bound aroma compounds from two strawberry fruit species, *Fragaria vesca* f. *semperflorens* and *Fragaria ananassa*, cv. Korona. *Flavour Fragrance J.* **1991**, *6*, 209-215.
- Withopf, B.; Richling, E.; Roscher, R.; Schwab, W.; Schreier, P.** Sensitive and Selective Screening for 6'-O-Malonylated Glucoconjugates in Plants. *J. Agr. Food Chem.* **1997**, *45*, 907-911.
- Wrobel, R. L.; Matvienko, M.; Yoder, J. I.** Heterologous expression and biochemical characterization of an NAD(P)H:quinone oxidoreductase from the hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris, France)* **2002**, *40*, 265-272.
- Zabetakis, I.** Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1997**, *50*, 179-183.
- Zabetakis, I.; Gramshaw, J. W.; Robinson, D. S.** The biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives in strawberry. In *Flavour Science - Recent Developments*; A. J. Taylor and D. S. Mottram, Eds.; The Royal Soc. Chem.: Cambridge, **1996**; pp 90-93.
- Zabetakis, I.; Gramshaw, J. W.; Robinson, D. S.** 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis - a review. *Food Chem.* **1999a**, *65*, 139-151.
- Zabetakis, I.; Holden, M. A.** A study of strawberry flavour biosynthesis. In *Bioflavour 95: Analysis - Precursor studies - Biotechnology*; P. Etievant and P. Schreier, Eds.; INRA Editions: Paris, **1995**; pp 211-216.
- Zabetakis, I.; Holden, M. A.** The effect of 6-deoxy-D-fructose on flavour bioformation from strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus culture. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* **1996**, *45*, 25-29.
- Zabetakis, I.; Moutevelis-Minakakis, P.; Gramshaw, J. W.** The role of 2-hydroxypropanal in the biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one in strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus cultures. *Food Chem.* **1999b**, *64*, 311-314.
- Zyzak, D. V.; Richardson, J. M.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W.** Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *316*, 547-554.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Untersuchungen zur Erdbeerfruchtreifung - Biosynthese von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon und Enzymaktivitäten während des Reifungsprozesses“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Würzburg, den

ThomasRaab

Lebenslauf

Name: Thomas Raab
Anschrift: Paul-Ehrlich-Straße 24
Geboren: 16.04.1976 in Würzburg
Religion: römisch-katholisch
Eltern: Kinderkrankenschwester Monika Raab, geb. Gutermuth
Diplommathematiker Walther Raab

Schulausbildung: September 1982 bis Juli 1986
Grundschule: Waltherschule in Würzburg/Heidingsfeld

September 1986 bis Juli 1995
Städt. Schönborn-Gymnasium Würzburg
Allgemeine Hochschulreife

Studium: November 1995 bis Dezember 1999
Lebensmittelchemie an der Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker am 7. Februar 2000

Februar 2003 bis Juli 2003
Lebensmittelchemisches Praktikum am Landesamt für Gesundheit
und Lebensmittelsicherheit Nordbayern in Erlangen
Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker im Juli 2003

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