

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 HEFEN DER GATTUNG SACCHAROMYCES	1
1.2 AMINOSÄUREABSORPTION DURCH SACCHAROMYCES HEFEN	3
1.3 AROMASTOFFE DES HEFEMETABOLISMUS	6
1.3.1 Katabole Bildung der höheren Alkohole und Säuren über den Ehrlich-Pathway	7
1.3.2 Biosynthese der Ester	10
1.3.3 Anabole Bildung der höheren Alkohole, Säuren und Acetatester aus dem Kohlenhydrat-Metabolismus	11
1.3.4 Exkretion der Aromastoffe	12
1.4 EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE BILDUNG GERUCHSAKTIVER HEFEMETABOLITE	13
1.4.1 Fermentationsbedingungen	13
1.4.1.1 Kohlenstoffdioxid und Druck	13
1.4.1.2 Temperatur	14
1.4.1.3 Sauerstoff	14
1.4.2 Fermentationsmedium	16
1.4.2.1 Lipide und Fettsäuren	17
1.4.2.2 Stickstoff	18
1.4.2.3 Zucker	19
2. Ziele der Arbeit	23
3. Ergebnisse und Diskussion	25
3.1 METHODENENTWICKLUNG FÜR DIE METABOLOM-ANALYTIK	25
3.1.1 Analysenmethoden	25
3.1.1.1 Multimethode I: Nachweis von Säuren, Purinen, Pyrimidinen, Nucleosiden und Nucleotiden mittels HILIC-MS/MS	25
3.1.1.2 Multimethode II: Nachweis von Aminosäuren und stickstoffhaltigen Metaboliten mittels UPLC-MS/MS	30
3.1.1.3 Nachweis von 2-Oxosäuren als Girard-T-Derivate mittels UPLC-MS/MS	34
3.1.2 Entwicklung einer Extraktionsmethode	36
3.1.2.1 Vergleich unterschiedlicher Extraktionsprotokolle	36
3.1.2.2 Vergleich unterschiedlicher Extraktionszeiten	38
3.1.3 Validierung	40
3.1.3.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Messpräzision	40
3.1.3.2 Richtigkeit und Methodenpräzision	41
3.1.4 Minimalvalidierung der Glucose- und Ethanolbestimmung mittels qNMR	43
3.2 AMINOSÄUREABSORPTIONEN	44
3.2.1 Gruppierung der Aminosäuren	44
3.2.1.1 Obergärige Fermentationen	45
3.2.1.2 Untergärige Fermentationen	49
3.2.1.3 Diskussion	52
3.2.2 Einfluss des Mediums auf die Absorption der Aminosäuren	56

3.2.2.1	Obergärige Fermentationen	56
3.2.2.2	Untergärige Fermentationen	61
3.2.2.3	Diskussion	64
3.3	EINFLUSS DES MEDIUMS AUF DIE BILDUNG VON AROMASTOFFEN	66
3.3.1	Obergärige Fermentationen	66
3.3.2	Untergärige Fermentationen	72
3.3.3	Diskussion	78
3.4	EINFLUSS DES MEDIUMS AUF DIE BILDUNG NICHT-FLÜCHTIGER METABOLITE	80
3.4.1	Obergärige Fermentationen	80
3.4.2	Untergärige Fermentationen	86
3.4.3	Diskussion	92
3.5	FERMENTATIONEN MIT ¹³C-ISOTOPENMARKIERTEM SUBSTRAT	108
3.5.1	Vergleichbarkeit der Fermentationsansätze	108
3.5.2	Bildung der Leucin-analogen Metabolite und Aromastoffe	110
3.5.3	Bildung der Phenylalanin-analogen Metabolite und Aromastoffe	116
3.5.4	Diskussion	120
4.	Experimenteller Teil	125
4.1	CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN	125
4.1.1	Chemikalien	125
4.1.2	Materialien	131
4.1.3	Sonstiges	131
4.2	ZELLYSE UND -EXTRAKTION	132
4.2.1	Herstellung der internen Standardlösungen	132
4.2.2	Vergleich	133
4.2.2.1	Extraktionsprotokoll 1	133
4.2.2.2	Extraktionsprotokoll 2	133
4.2.2.3	Extraktionsprotokoll 3	133
4.2.2.4	Extraktionsprotokoll 4	134
4.2.3	Extraktionsdauer	134
4.2.4	Validierung	135
4.2.4.1	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	135
4.2.4.2	Messpräzision	135
4.2.4.3	Richtigkeit und Präzision	135
4.3	SYSTEMATISCHE FERMENTATIONSSTUDIEN	137
4.3.1	Durchführung der Fermentationen	137
4.3.2	Probenvorbereitung	138
4.3.3	Zellextraktion	138
4.3.4	Quantitative Bestimmungen	138
4.3.4.1	Extrazelluläre Aminosäuren mittels HILIC-MS/MS	138
4.3.4.2	Multimethode I: Intrazelluläre Säuren, Pyrimidine, Nucleoside und Nucleotide mittels HILIC-MS/MS	140
4.3.4.3	Multimethode II: Intrazelluläre Aminosäuren und stickstoffhaltige Metaboliten mittels UPLC-MS/MS	143

4.3.4.4	Intrazelluläre 2-Oxosäuren mittels UPLC-MS/MS	146
4.3.4.5	Aromastoffe mittels Headspace-GC-FID	148
4.4	FERMENTATIONEN MIT ¹³C-ISOTOPENMARKIERTEM SUBSTRAT	149
4.4.1	Durchführung	149
4.4.2	Probenvorbereitung	150
4.4.3	Zellextraktion	150
4.4.4	Extraktion von 2-Phenylacetat	150
4.4.5	Quantitative Bestimmungen	152
4.4.5.1	Ammonium mittels HPIC	152
4.4.5.2	Organische Säuren mittels HPIC	152
4.4.5.3	Aminosäuren mittels HILIC-MS/MS	153
4.4.5.4	3-Phenylpyruvat und 3-Methyl-2-oxovalerat mittels UPLC-TOF/MS	153
4.4.5.5	Leichtflüchtige Aromastoffe mittels HS-SPME-GC-IT/MS	155
4.4.5.6	2-Phenylacetat mittels GC-IT/MS	158
4.4.5.7	Ethanol und Glucose mittels qNMR	159
4.5	CHROMATOGRAPHISCHE UND SPEKTROMETRISCHE METHODEN.....	161
4.5.1	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie	161
4.5.2	Ionenchromatographie.....	161
4.5.3	Gaschromatographie-Massenspektrometrie	162
4.5.4	Quantitative Kernresonanzspektroskopie (qNMR)	163
4.6	STATISTISCHE AUSWERTUNGEN	164
4.6.1	Hauptkomponentenanalyse	164
4.6.2	weitere statistische Analysen.....	164
5.	Zusammenfassung.....	165
6.	Summary.....	171
7.	Literaturverzeichnis	175