

GIVAUDAN-ROURE (INTERNATIONAL) SA
CH-1214 Vernier, Genève, Schweiz

THIS SHEET HAS BEEN
REPLACED

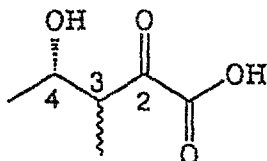
This Sheet Has Been Replaced



Ref. 6510/257

2-Keto-3-methyl-4-hydroxy-valeriansäure

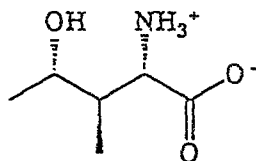
Die Erfindung betrifft zwei neue, optisch aktive Formen der 2-Keto-3-
5 methyl-4-hydroxy-valeriansäure der Formel



wobei das C-Atom 4 die (S)-Konfiguration aufweist. Das C-Atom 3 kann
10 sowohl in der (R)- als auch der (S)-Konfiguration vorliegen.

Die Erfindung betrifft auch ein mikrobiologisches Verfahren zur
Herstellung der Verbindungen I.

15 Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man 4-Hydroxy-
isoleucin (2S,3R,4S) (= L-4-Hydroxyisoleucin) der Formel



20 mit Mikroorganismen, die L-Aminosäureoxidase (EC 1.4.3.2.)-Aktivität
besitzen, umgesetzt oder mit einer L-Aminosäureoxidase umgesetzt.

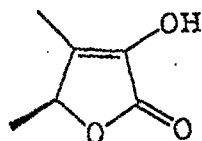
Die Verbindungen I sind interessante Zwischenprodukte zur
Herstellung des optisch aktiven, des (5S)-3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-
25 furanons der Formel

Ur/UI 7.3.94

✓	Erfindung ist neu	1
✓	Erfindung ist erfindungsfähig	2
✓	Erfindung ist gewerblich neu	3
✓	Erfindung ist gewerblich neu	4
✓	Erfindung ist gewerblich neu	5

This Sheet Has Been Replaced

- 2 -



Das Racemat von III ist eine wichtige Aromasubstanz mit einem extrem tiefen Schwellenwert (H. Sulser, M. Habegger, W. Büchi, Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1972), 148, 215).

Das vorliegende Verfahren erlaubt also, III aus einem natürlichen Rohmaterial mit Hilfe eines als natürlich geltenden Prozesses herzustellen.

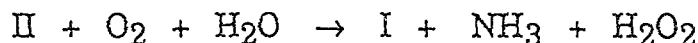
Es gelang also, ein Verfahren zu entwickeln, das die Gewinnung dieser Substanz III auf biotechnologischem Weg erlaubt.

Als Rohmaterial für I bzw. III eignen sich insbesondere Samen von Bockshornklee *Trigonellum foenum graecum* L.

Da die Samen von Bockshornklee relativ grosse Mengen (5 g / kg Samen) freies L-4-Hydroxyisoleucin enthalten (L. Fowden, H.M. Pratt, A. Smith, *Phytochemistry* (1973), 12, 1707), kann die in den Samen von Bockshornklee vorhandene freie Aminosäure II mit Hilfe des aufgefundenen Biotransformationssystems auf einfache Weise zunächst in I übergeführt werden.

Dies gelingt dadurch, dass man, wie vorne ausgeführt, II mit Mikroorganismen, die L-Aminosäureoxidase (EC 1.4.3.2.) Aktivität besitzen, umsetzt oder L-4-Hydroxyisoleucin mit einer L-Aminosäureoxidase selbst umsetzt.

Die Umsetzung verläuft also wie folgt:



Die dabei entstehenden diastereomeren Formen von 2-Keto-3-methyl-4-hydroxy-valeriansäure (I) können z.B auf einfache Weise als Metallsalze, wie die Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalze, wie das Natrium- oder Kaliumsalz, isoliert werden. Die freien Säuren sind nämlich sehr labil und



zyklisieren spontan zum optisch aktiven Lakton III.

Für die Biotransformation von II eignen sich die verschiedensten Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilze, und Algen, welche L-4-Hydroxyisoleucin in I umwandeln können.

Bevorzugte Organismen sind solche mit hoher Aktivität an L-Aminosäureoxidase. Dazu gehören Algen der Gattung *Amphiroa*, *Gymnogongrus* u.a.; Pilze der Gattung *Neurospora* u.a.; Bakterien der Gattung *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Corynebacterium* u.a. Besonders gut geeignet sind Bakterien der Gattung *Proteus*, *Providencia* und *Morganella*, z.B.

Proteus vulgaris (DSM 2140,3265)
15 *Proteus mirabilis* (ATCC 15290)
Providencia rettgeri (ATCC 9250)
Morganella morganii (DSM 30117)

oder Pilze der Gattung *Neurospora* wie z. B.
20 *Neurospora crassa* (FGSC 988 und 2963); alle diese Mikroorganismen sind der Öffentlichkeit zugänglich

Die Mikroorganismen werden vor der eigentlichen Biotransformation zweckmässigerweise in Submerskultur auf einem geeigneten Nährmedium gezüchtet. Dazu können sowohl die üblichen komplexen als auch chemisch definierten Medien verwendet werden, vorausgesetzt, es findet eine Neusynthese der für die Biotransformation nötigen L-Aminosäureoxidase statt. Die entsprechende Technik ist dem Fachmann auf dem betreffenden Gebiet bekannt. Die Nährmedien enthalten neben geeigneten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zweckmässigerweise anorganische Salze, Spurenelemente und freie Aminosäuren.

Als Kohlenstoffquellen verwendet man beispielsweise Zucker, vorzugsweise Glucose oder Saccharose. Als Stickstoffquelle kommen sowohl anorganische wie organische Verbindungen in Betracht, beispielsweise Ammoniumsalze, vorzugsweise Ammoniumsulfat und Ammoniumnitrat, Nitrate, Hefeextrakt oder Peptone usw.



Ueblicherweise enthält das Nährmedium noch Salze, z.B. Sulfate, Phosphate oder Chloride, insbesondere der Elemente Magnesium, Kalium und Calcium, sowie die Spurenelemente Eisen, Zink, Mangan, Bor, Kobalt, Kupfer und Molybdän. Im Fall von *Neurospora crassa* ist die Zugabe des Vitamins Biotin unentbehrlich.

Die verwendeten freien Aminosäuren stammen zweckmässigerweise aus Proteinhydrolysaten, vorzugsweise aus Casein- und Soyaproteinhydrolysaten oder bei einzelnen Aminosäuren aus entsprechenden Fermentationen. Bevorzugt sind dabei Leucin, Methionin und Phenylalanin.

Das Mengenverhältnis der genannten Nährstoffe hängt zweckmässigerweise von der Art der Fermentation ab und wird im Einzelfall zweckmässigerweise in einer dem Fachmann bekannten Weise festgelegt. Beispielsweise eignen sich zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens Glukose- oder Saccharosekonzentrationen im Bereich von ca. 5 bis ca. 50 g/L, bevorzugt sind Konzentrationen im Bereich von ca. 10 bis ca. 20 g/L. Das als Stickstoffquelle bevorzugte Ammoniumsulfat oder Ammoniumnitrat setzt man im Bereich von ca. 0.03 bis ca. 5 g/L ein, besonders von ca. 0.06 bis ca. 2 g/L.

Die verwendeten Mineralsalze werden zweckmässigerweise im Bereich von ca. 0.05 bis ca. 10 g/L, insbesondere von ca. 0.1 bis ca. 5 g/L eingesetzt. Die Spurenelemente verwendet man in der Regel in einem Konzentrationsbereich von jeweils ca. 0.005 bis ca. 20 mg/L, besonders von ca. 0.01 bis ca. 5 mg/L, z.B. eingesetzt als wässrige Lösung.

Die als Aminosäurenquelle verwendeten Proteinhydrolysate werden zweckmässigerweise im Bereich von ca. 5 bis ca. 50 g/L, insbesondere von ca. 10 bis ca. 20 g/L eingesetzt. Den Zusatz von freien Aminosäuren, wie Leucin, Methionin oder Phenylalanin wählt man zweckmässigerweise im Bereich von ca. 0.1 bis ca. 5 g/L, insbesondere von ca. 0.2 bis ca. 2 g/L.

Das für die Züchtung von *Neurospora crassa* notwendige Vitamin Biotin setzt man zweckmässigerweise im Bereich von ca. 1 bis ca. 20 µg/L ein, besonders von ca. 2 bis ca. 5 µg/L.



Die Fermentationstemperatur hängt in wesentlichen vom verwendeten Mikroorganismus ab und bewegt sich zweckmässigerweise im Bereich von ca. 10 bis ca. 50 °C, insbesondere von ca. 20 bis ca. 37 °C. Der pH-Wert des Nährmediums liegt normalerweise im Bereich von ca. 4 bis ca. 10, vorzugsweise von ca. 5 bis ca. 8. Die bevorzugte Fermentationsdauer - nämlich bis zur Beendigung des Wachstums - liegt zwischen ca. 10 und ca. 100 Stunden, insbesondere zwischen ca. 18 und ca. 72 Stunden.

Nach der Fermentation werden die Zellen zweckmässigerweise mechanisch vom Nährmedium getrennt, gewaschen und direkt für die Transformation eingesetzt. Für die Umsetzung von L-4-Hydroxyisoleucin (II) können aber auch immobilisierte Zellen oder aus Zellen hergestellte Rohextrakte, sowie - z.B. isolierte - Präparate von L-Aminosäureoxidase in freier oder immobilisierter Form verwendet werden. Da der Umsetzung ein oxidativer Prozess zugrunde liegt, wird das Reaktionsgemisch vorzugsweise intensiv geschüttelt oder zusätzlich belüftet.

Die Isolierung des Enzyms aus den Zellen, falls erwünscht, kann in dem Fachmann bekannter Weise erfolgen, also z.B. mittels mechanischem Aufschluss, und Reinigung, z.B. Ionenaustauschchromatographie und/oder Adsorptionschromatographie, etc.

Die Biotransformation wird vorzugsweise in einem pH-Bereich von ca. 4 bis ca. 8, insbesondere von ca. 5 bis ca. 7, durchgeführt. Ueblicherweise erfolgt die erfindungsgemässe Umsetzung bei einer Temperatur von ca. 10 bis ca. 40°C, vorzugsweise bei 20 bis 37°C. Das Edukt L-4-Hydroxyisoleucin (II) wird in einer Menge von ca. 0.5 bis ca. 5 % (w/v), bevorzugt von ca. 1 bis ca. 2 %, in der Reaktionslösung eingesetzt.

Das Verhältnis von II: Enzymmenge wird zweckmässigerweise so gewählt, dass die Reaktion nicht zu viel Zeit beansprucht, also z.B. ca. 6 - ca. 24 Stunden nicht überschreitet, was mit wenigen Versuchen abgeklärt werden kann.

Nach abgeschlossener Umsetzung, deren Verlauf durch (konventionelle) Aminosäurenanalyse (auf die erfolge Konsumption von II)verfolgt werden kann, wird das Reaktionsgemisch in für γ -Hydroxysäuren bekannter Weise lactonisiert, also zweckmässigerweise

mit Säure, z.B. mit verdünnter Phosphorsäure, auf einen pH-Wert von ca. 1 bis ca. 3, bevorzugt von ca. 1.5 bis ca. 2.5, angesäuert und anschliessend durch Erhitzen lactonisiert. Die Hitzebehandlung erfolgt zweckmässigerweise in einem Temperaturbereich zwischen ca. 70 bis ca. 95°C, vorzugsweise bei ca. 80°C während ca. 20 bis ca. 90 Minuten, bevorzugt ca. 30 bis ca. 60 Minuten.

Die Lösung kann mit einem organischen Lösungsmittel wie einem Ester, besonders Essigsäureethylester oder einem Ether wie Methyl-tert.butylether nach bekannten Methoden, beispielsweise in einer Gegenstromextraktionsanlage, extrahiert werden. Anschliessend wird das Lösungsmittel zweckmässigerweise destillativ entfernt und das Produkt in einem in der Aromenindustrie geläufigen Träger aufgenommen, wie dies z.B. Öle, vor allem Erdnussoel oder z.B. Triethylcitrat, sind.

Das nach der biotechnologischen Umsetzung von (II) anfallende zellfreie Reaktionsgemisch mit einem Gehalt an I kann aber auch direkt mit einem Träger wie Maltodextrin oder einem anderen Stärkederivat gemischt und (sprüh)getrocknet werden. Dieses Produkt kann als Aromenvorläufer von (III) für die Aromatisierung ausgesuchter Lebensmittelprodukte eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um Lebensmittelprodukte, die einer thermischen Behandlung unterworfen werden. Eine Hitzebehandlung (Kochen, Backen, Fritieren, Grillieren, Rösten, Behandlung mit Mikrowellen usw.) erfolgt zweckmässigerweise in einem Temperaturbereich zwischen ca. 80 und ca. 250°C während ca. 2 bis ca. 30 Minuten. Die Dosierung des Vorläufers (I) kann beispielsweise zwischen ca. 1 ppb bis ca. 5 ppm (im Endprodukt) variiert werden.

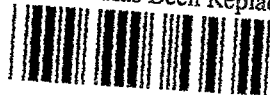
Die folgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung.

Beispiel 1

Isolierung und Charakterisierung von 2-Keto-3-methyl-4-hydroxyvaleriansäure (= Hydroxy-3-methyl-2-keto-pentansäure) (I)

a) Isolierung von L-4-Hydroxyisoleucin (II) aus Samen von Bockshornklee *Trigonella foenum graecum* L.





Die Extraktion und Reinigung von L-4-Hydroxyisoleucin wurde nach L. Fowden, H.M. Pratt und A. Smith (*Phytochemistry* (1973); 12, 1707) durchgeführt. Aus 4 kg Samen von *Trigonella foenum graecum* L. wurden 12 g gereinigtes L-4-Hydroxyisoleucin isoliert (Ausbeute 62 %). Reinheit: 5 > 97 % (Aminosäuren-analyse). Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +32.3$ °(c 1 (d.h. 1 g/100 ml), H₂O); Literaturwert: 31.0 °.

b) Biotransformation von L-4-Hydroxyisoleucin (II) mit *Morganella morganii*

10

Morganella morganii (DSM No. 30117) wurde im Nährmedium A (Tabelle 1) in einem Fermenter bei pH 7 und einer Temperatur von 30°C während 20 Stunden kultiviert. Anschliessend wurden die Zellen zentrifugiert, mit 0.02 M Natriumphosphatpuffer (pH 7.0) gewaschen und 15 in 0.05 M Natriumphosphatpuffer pH 7.0 resuspendiert und es wurde auf eine optische Dichte von 20 bei 650 nm (bzw. O.D. 0,2 nach 100-facher Verdünnung) eingestellt. Diese Zellsuspension wurde in einen Schüttelkolben gegeben und mit 7.7 mmol L-4-Hydroxyisoleucin pro Liter versetzt. Nach einer Inkubation von 6 Stunden bei 30°C auf einer Schüttelmaschine 20 war die vorgelegte Menge L-4-Hydroxyisoleucin vollständig umgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Reaktionsgemisch abgetrennt und der erhaltene Ueberstand lyophilisiert.

Tabelle 1: Nährmedium A

25

	Glucose	10.0 g/L
	Caseinhydrolysat	10.0 g/L
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	11.9 g/L
	KH ₂ PO ₄	4.5 g/L
30	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g/L
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g/L
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	4 mg/L
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 mg/L

35 c) Isolierung des Natriumsalzes von 2-Keto-3-methyl-4-hydroxyvaleriansäure (I)

Der gefriergetrocknete Rückstand wurde mit Methanol extrahiert



und das Natriumsalz von (I) in üblicher Weise durch Zugabe von Methyl-tert.butylether ausgefällt. Die bisher unbekannte Substanz zeigte die folgenden physikalischen Eigenschaften:

5	Schmelzpunkt:	144°C (Zers.)
	Optische Drehung:	$[\alpha]_D^{20}$: +18.49° (c 0.84 in Methanol)
	IR:	1720 cm ⁻¹ , 1630 cm ⁻¹ , 1390 cm ⁻¹ , 1130 cm ⁻¹
	¹ H-NMR:	δ = 4.18 ppm (2 x q), 3.18 (2 x q), 1.20 (2 x d), 1.05 (2 x d)
10	MS:	(Elektronenspray-Ionisation) 145.1 (M ⁻), 101.1, 57.2 313.1 (2M-Na ⁺), 481.3 (3M-2Na ⁺), 649.4 (4M-3Na ⁺), 817.6 (5M-4Na ⁺), (Anionen- Clusters).

15

d) Umsetzung von 2-Keto-3-methyl-4-hydroxy-valeriansäure (I) in (5S)-3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (III)

840 mg des Natriumsalzes von (I) wurden in 50 mL H₂O gelöst und
20 mit verdünnter Phosphorsäure auf pH 2.0 gebracht. Die Lösung wurde
während 30 Minuten auf 85°C gehalten und nach Erkalten mit 2 x 50 ml
Essigsäureethylester extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels fielen
320 mg (Ausbeute 50%) von (III) an. Die mit präparativer Dünnschicht-
chromatographie (Kieselgel 60) gereinigte Substanz (III) zeigte eine
25 optische Drehung von: $[\alpha]_D^{20}$: 21.66° (c 1.0 in Chloroform).

Beispiel 2

Zellen von *Morganella morganii* wurden, wie in Beispiel 1
30 beschrieben, in einem Fermenter gezüchtet, zentrifugiert, gewaschen und
anschliessend auf eine Dichte von 20 (650 nm) eingestellt. Nach Zugabe von
7.7 mmol L-4-Hydroxyisoleucin pro Liter wurde die Zellsuspension in einem
Erlenmeyerkolben bei 30°C geschüttelt. Nach 18 Stunden war die vorgelegte
Menge L-4-Hydroxyisoleucin vollständig umgesetzt. Die Zellen wurden
35 durch Zentrifugation vom Reaktionsgemisch abgetrennt und der klare
Ueberstand mit verdünnter Phosphorsäure auf pH 2.5 eingestellt. Nach
Erhitzen (30 Minuten, 80°C) wurde die Lösung 2 mal mit dem halben
Volumen von Essigsäureethylester extrahiert. Nach Entfernung des



Lösungsmittel fiel ein gelbliches Öl an. Ausbeute von (III): 65%.

Beispiel 3

5 Gemäss Beispiel 1 wurden Zellen von *Morganella morganii* in einem
Fermenter gezüchtet, zentrifugiert und anschliessend mit Wasser
gewaschen. Die Zellen wurden in 2% Natriumalginat resuspendiert und bei
Raumtemperatur tropfenweise in eine gerührte Lösung von CaCl_2 (2%)
eingetragen. Die in kleinen Kugeln anfallenden immobilisierten Zellen
10 wurden gründlich mit Wasser gewaschen und anschliessend für die
Umsetzung von L-4-Hydroxyisoleucin verwendet. Dabei wurde ein Teil
sedimentierte, immobilisierte Zellen mit 2 Teilen einer Lösung von L-4-
Hydroxyisoleucin versetzt (11.25 mmol/L) und bei 30°C in einem
Erlenmeyerkolben geschüttelt. Nach 24 Stunden war die vorgelegte
15 Menge 4-Hydroxyisoleucin vollständig umgesetzt. Die immobilisierten
Zellen wurden über eine Nutsche vom Reaktionsgemisch abgetrennt und
mit Wasser sorgfältig gewaschen. Das klare Filtrat wurde wie in Beispiel 2
weiter behandelt. Ausbeute an (III): 60%.

Beispiel 4

20 *Providencia rettgeri* (ATCC 9250) wurde im Nährmedium A (Tabelle
1) in einem Fermenter bei pH 7 und einer Temperatur von 30°C während
20 Stunden gezüchtet. Anschliessend wurden die Zellen zentrifugiert, mit
25 0.02 M Natriumphosphatpuffer pH 7.0 gewaschen und in 0.1 M Natrium-
phosphatpuffer pH 7.2 resuspendiert und eine optische Dichte von 20 bei 650
nm eingestellt. Diese Zellsuspension wurde in einen Schüttelkolben
gegeben und mit 7.7 mmol 4-Hydroxyisoleucin pro Liter versetzt. Nach
einer Inkubation bei 30°C von 18 Stunden auf einer Schüttelmaschine war
30 die zugegebene Menge L-4-Hydroxyisoleucin vollständig umgesetzt. Die
Zellen wurden durch Zentrifugation vom Reaktionsgemisch abgetrennt und
der Ueberstand wie in Beispiel 2 weiter behandelt. Ausbeute an (III): 60%.

Beispiel 5

35 *Neurospora crassa* (FGSC 988) wurde im Nährmedium B (Tabelle 2)
in 2 Liter Schüttelkolben bei pH 6.0 und einer Temperatur von 25°C
während 48 Stunden gezüchtet. Das Mycel wurde durch 4 Lagen



- Baumwollgaze filtriert, mit Wasser gut gewaschen und gefriergetrocknet und anschliessend mit einem Homogenisator fein pulversiert. 5 g Mycelpulver wurden mit 50 mL 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2 vermischt und bei 4°C während 30 Minuten gerührt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt und der klare Ueberstand mit 7.7 mmol L-4-Hydroxyisoleucin pro Liter versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden bei 30°C war die vorgelegte Menge L-4-Hydroxyisoleucin vollständig umgesetzt. Die Umwandlung der gebildeten 4-Hydroxyketosäure (I) in (III) erfolgte gemäss Beispiel 2.
- 10 Ausbeute: 60%.

Tabelle 2: Nährmedium B

	Saccharose	20.0 g/L
15	Natriumcitrat · 5 H ₂ O	3.0 g/L
	KH ₂ PO ₄	5.0 g/L
	(NH ₄)NO ₃	0.08 g/L
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g/L
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 g/L
20	L-Phenylalanin	0.73 g/L
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	5.0 mg/L
	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	1.0 mg/L
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.25 mg/L
	MnSO ₄ · 1 H ₂ O	0.05 mg/L
25	H ₃ BO ₃	0.05 mg/L
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.05 mg/L

Beispiel 6

- 30 Der in Beispiel 5 beschriebene Rohextrakt wurde zur kovalenten Immobilisierung von L-Aminosäureoxidase verwendet. 50 ml Extrakt wurde gegen 1.0 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 dialysiert und mit 10 g Acrylharzperlen Eupergit® (Röhm Pharma, Weiterstadt, Deutschland) vermischt. Diese Suspension wurde während 24 Stunden bei Raum-
- 35 temperatur stehengelassen und das Harz anschliessend mit 2 L 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 gewaschen. Das immobilisierte Enzympräparat wurde, wie in Beispiel 3 beschrieben, mit L-4-Hydroxyisoleucin (7.7 mM) während 24 Stunden bei 30°C umgesetzt. Die Trennung

des immobilisierten Enzyms vom Reaktionsgemisch erfolgte durch Abnutschen, und der Ueberstand wurde wie in Beispiel 2 beschrieben weiter behandelt. Die Ausbeute an (III) betrug 55%.

5

Beispiel 7Ahornsiruparoma

Zwei Ahornsiruparomen wurden gemäss folgender Zusammen-
10 setzung hergestellt:

		<u>Gewichtsteile</u>	
		<u>A</u>	<u>B</u>
	Peru Balsam	5	5
15	Vanilla Extrakt	50	50
	Buttersäure (natürlich)	5	5
	Furonol (natürlich 15%)	10	10
	Röstbase (roast base) natürlich	5	5
	III (0,1% in Triacetin)	-	150
20	gemäss Beispiel 2		
	Triacetin	<u>925</u>	<u>775</u>
		1000	1000

Ein Vergleich der obigen Aromen zeigt, dass die Anwesenheit von
25 150 Teilen von (III) in B diesem Aroma den typischen süssen, karamell-
artigen würzigen Charakter von Ahornsirup verleiht und zur Verstärkung
des Körpers wesentlich beiträgt. Dieses Aroma kann z.B. in einem
Milchdrink in einer Konzentration von 0,1% eingesetzt werden.—



Beispiel 8Walnussaroma

5		<u>Gewichtsteile</u>	
		<u>A</u>	<u>B</u>
	Kakaoschalenextrakt	50	50
	Vanillaextrakt	10	10
	Oelsäure	30	30
10	Walnussbase (natürlich)	10	10
	III (0,1% in Triacetin)		120
	gemäss Beispiel 2		
	Propylenglykol	<u>900</u>	<u>780</u>
		1000	1000

15

Ein Vergleich der obigen Aromen zeigt, dass die Anwesenheit von 120 Teilen (III) in B diesem Aroma den typischen Walnussaromacharakter verleiht und zur Verstärkung der Nuss- und Fettnoten wesentlich beiträgt. Dieses Aroma kann z.B. in einem Milchdrink in einer Konzentration von 20 0,1% eingesetzt werden.

This Sheet Has Been Replaced



Beispiel 9HVP-freie Braune Sauce

- 5 Eine HVP-freie braune Sauce wurde gemäss folgender Zusammensetzung hergestellt:

	<u>Bestandteil</u>	<u>Gewichtsteile</u>
10	Weissmehl	370
	Rinderfett	145
	Modifizierte Stärke	145
	Hefeextrakt	97
	Kochsalz	80
15	Tomatenpulver	60
	Maltodextrin	53,7
	Mononatriumglutamat	30
	Karamelpulver	10
	Kurkuma	4,5
20	Gewürzmischung (Spice'N'Easy®)	
	(Zwiebel-, Knoblauch- und	
	Rosmarinextrakt)	4,8
		1000

- 25 Beim Erhitzen der Sauce in Anwesenheit des Aromenvorläufers I (2 ppm) wird der Geschmack deutlich in Richtung Fleisch, Bouillon, HVP und Salz verstärkt.



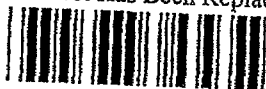
Beispiel 10

Crackers

5	<u>Bestandteil</u>	<u>Gewichtsteile</u>
	Weissmehl	575
	Pflanzenfett	150
	Magermilchpulver	37
10	Puderzucker	15
	Süssmolkepulver	10,2
	Hefeautolysat	10,0
	Ammoniumbicarbonat	10,0
	Kochsalz	10,0
15	Natriumhydrogenpyrophosphat	1,0
	Weisser Pfeffer	0,4
	Paprika	0,4
	Wasser	181
	Aromenvorläufer (I)	1 ppm
20		

Beim Backen des Crackerteigs (230°C, 10 Min.) in Anwesenheit des Aromenvorläufers (I) wird das Raumaroma (room flavour) und der Geschmack des Produkts in Richtung würzig, bouillonartig und krautig verstärkt.

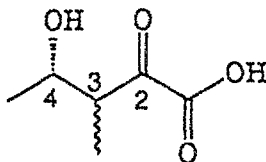
This Sheet Has Been Replaced





Patentansprüche

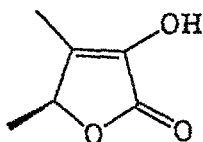
1. 4S-Hydroxy-3-methyl-2-ketopentansäuren der Formel



5

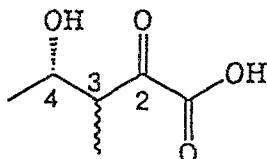
2. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man L-4-Hydroxyisoleucin (2S,3R,4S) mit einer L-Aminosäureoxidase bzw. einem dieses Enzym
10 enthaltenden Mikroorganismus umsetzt.

3. Verfahren zur Herstellung von optisch aktivem (5S)-3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon



15

dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung



20

in an sich bekannter Weise lactonisiert.

4. Verwendung der Verbindungen I gemäss Anspruch 1 als Aromenvorläufer.

25

5. Verwendung des, insbesondere gemäss Verfahren des Anspruchs 3 hergestellten, Hydroxyfuranons III als Aromastoff.

