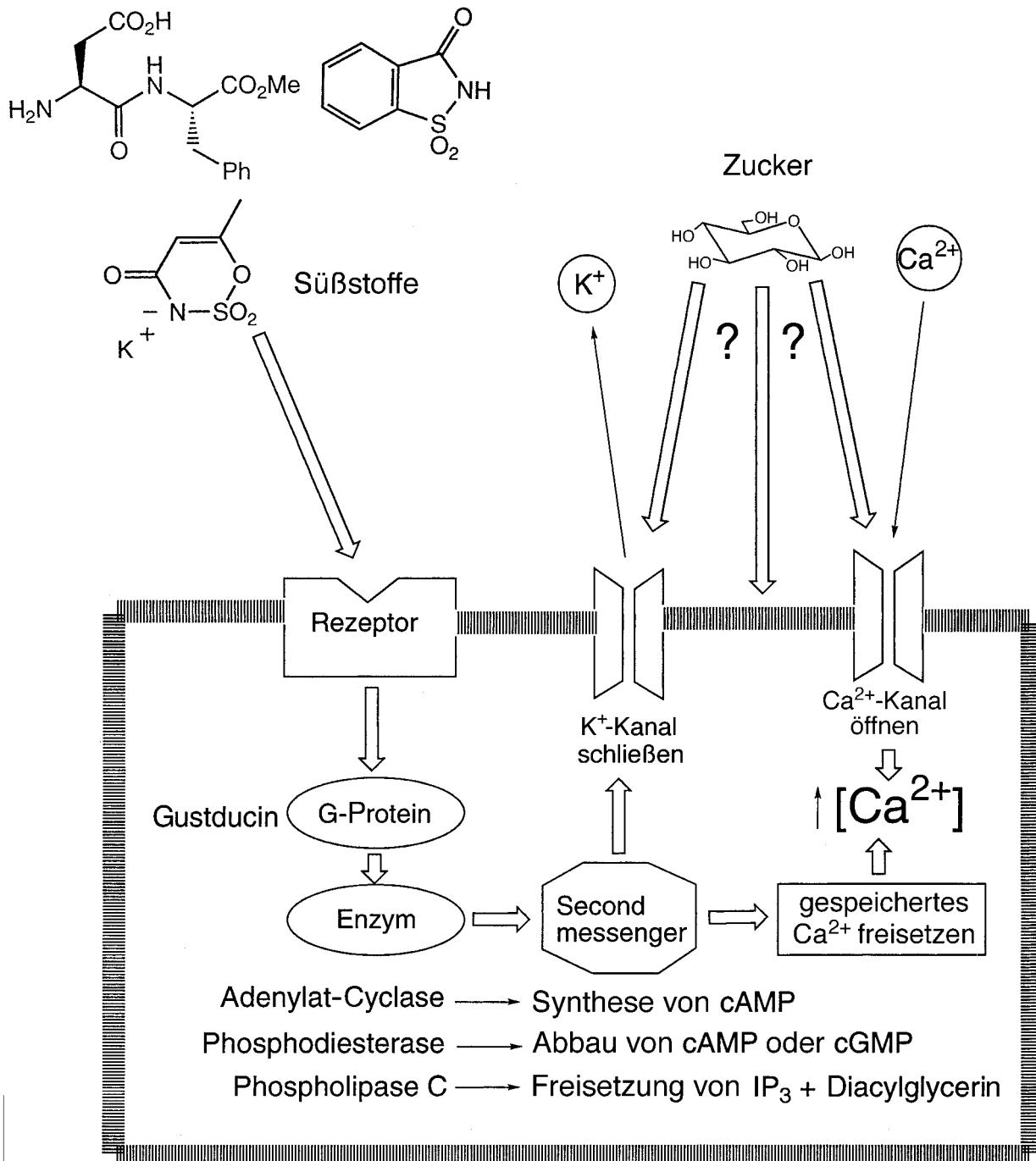


Die Geschmacksempfindung „süß“
kann durch Zucker (oben rechts),
auf anderem Wege aber auch durch
künstliche Süßstoffe (oben links)
ausgelöst werden.



Mehr über die Verwendung und
die Synthese solcher Süßstoffe er-
fahren Sie im Aufsatz von D. Ager
et al. auf den folgenden Seiten.

Synthetische nichtnutritive Süßstoffe

David J. Ager,* David P. Pantaleone, Scott A. Henderson, Alan R. Katritzky, Indra Prakash und D. Eric Walters

Nichtnutritive Süßstoffe (Süßstoffe ohne Nährwert) haben erhebliche kommerzielle Bedeutung und stehen bezüglich des Verkaufsvolumens und des Verkaufswerts zwischen den meisten pharmazeutischen Produkten und den Grundchemikalien. Die Synthese dieser Süßstoffe kann daher einmalige Aufgabenstellungen bieten. Wir stellen

hier die großtechnischen Verfahren vor, nach denen Süßstoffe derzeit in Nordamerika und Europa produziert werden. Die Eleganz einiger dieser Synthesen liegt in der einfachen Methode, die erkennen läßt, wieviel Arbeit in ihre Entdeckung und Entwicklung bis zur Produktionsreife investiert wurde. Für einige Süßstoffe werden

alternative, vor allem biochemische Herstellungsverfahren vorgestellt, da sie die chemische Totalsynthese in Zukunft ersetzen könnten.

Stichwörter: Enzymkatalyse • Organische Synthese • Süßstoffe

1. Einleitung

Energiefreie Süßstoffe haben einen bedeutenden Markt erobert. Ihre Verwendung in großem Maßstab war allerdings mit einigen ungewöhnlichen Schwierigkeiten im Hinblick auf die chemischen und biologischen Eigenschaften verbunden.^[1] Wir haben hier nur synthetische, für den Handel bestimmte Süßstoffe berücksichtigt, die alle umfangreichen biologischen Tests unterzogen wurden.^[2] Ihre Marktzulassung erinnert insofern an die Bedingungen bei frei verkäuflichen Medikamenten. Obwohl es zahlreiche süß schmeckende Verbindungen gibt, ist über ihren Wirkmechanismus relativ wenig bekannt. Wir bezeichnen diese Süßstoffe zwar als nichtnutritiv, d.h. ohne Nährwert, dennoch haben viele einen Kaloriengehalt, z.B. Aspartam. Sie werden aber zum Süßen eines Nahrungsmittels im allgemeinen in so geringen Mengen eingesetzt, daß sie keinen nennenswerten Beitrag zum Nährwert der Nahrung leisten.

Eine Verbindung, die als guter Süßstoff und für den Menschen als geeignetes Lebensmittel angesehen wird, muß neben dem süßen Geschmack eine Reihe weiterer Eigen-

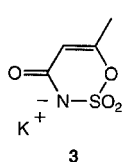
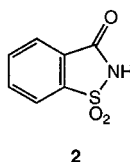
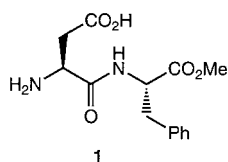
schaften haben. Zum einen sollte die Geschmacksempfindung nicht durch einen Bei- oder Nachgeschmack gestört werden. Zum anderen muß die Verbindung gesundheitlich unbedenklich und unter den Verwendungsbedingungen stabil sein. Ferner sind ökonomische Anforderungen zu erfüllen: Die Süßkraft, d.h. die Intensität des Süßgeschmacks, muß größer sein als die von Zucker, um die Herstellungskosten auszugleichen. Wir werden im folgenden nur auf die Verfahren eingehen, mit denen sich nichtnutritive Süßstoffe in Größenordnungen herstellen lassen, die sich in Nordamerika und Europa in der Praxis bewährt haben. Gemessen an den produzierten Mengen, besonders von Aspartam, liegt die Bedeutung der Süßstoffe zwischen der von Fein- und Grundchemikalien. Im Laufe der Zeit wurden für diese großtechnischen Synthesen einige elegante Verfahren entwickelt, die chemische ebenso wie biochemische Methoden umfassen.

1.1. Wirkmechanismus

Geschmacksrezeptorproteine konnten bisher weder isoliert noch eindeutig identifiziert werden. Dafür gibt es zwei Hauptgründe:

1. Rezeptoren werden üblicherweise unter Verwendung eines Liganden mit hoher Affinität (halbe Maximalbindung bei Konzentrationen im Nanomolbereich oder darunter) isoliert, damit der Verlauf der Reinigung verfolgt werden kann. Zucker lösen erst bei Konzentrationen von ca. 0.1M eine Geschmacksempfindung aus, die Erkennungsschwelle für Aspartam **1**, Saccharin **2** und Acesulfam-K **3** liegt bei wenigen mM L⁻¹. Bei diesen Konzentrationen ist es nahezu unmöglich, zwischen Rezeptor-spezifischer Bindung und

[*] Dr. D. J. Ager, Dr. D. P. Pantaleone
NSC Technologies (Monsanto)
601 East Kensington Road, Mount Prospect, Illinois 60056 (USA)
Fax: (+1) 847-506-2277
E-mail: djager@ccmail.monsanto.com
Dr. S. A. Henderson, Prof. Dr. A. R. Katritzky
Department of Chemistry, University of Florida (USA)
Dr. I. Prakash
NutraSweet-Kelco Company
601 East Kensington Road, Mount Prospect, Illinois 60056
Prof. Dr. D. E. Walters
Department of Biochemistry, Finch University of Health Sciences
Chicago Medical School, Chicago (USA)



- nichtspezifischer Bindung zu anderen Bestandteilen des Gewebes, aus dem der Rezeptor extrahiert werden soll, zu unterscheiden.
2. Geschmackszellen sind schwer zu isolieren. Diese spezialisierten Epithelzellen sind in Geschmacksknospen eingebettet und von zahlreichen nicht geschmacksempfindlichen

David J. Ager wurde 1953 in Northampton geboren. Er erhielt seinen B.Sc. am Imperial College in London und fertigte seine Doktorarbeit über siliciumorganische Chemie bei Dr. I. Fleming an der University of Cambridge an. Ein Postdoktorandenstipendium des Science Research Council ermöglichte ihm 1977 die Zusammenarbeit mit Professor R. Cookson an der University of Southampton. 1979 wurde er Senior Demonstrator an der University of Liverpool, anschließend Assistant Professor an der University of Toledo in Ohio. 1986 begann er seine Arbeit in der Abteilung für Forschung und Entwicklung der NutraSweet Company (heute NSC Technologies, Teil von Monsanto Growth Enterprises). Dr. Ager ist für die chemische Entwicklung neuer Produkte im Geschäftsbereich Feinchemikalien/Zwischenprodukte verantwortlich.



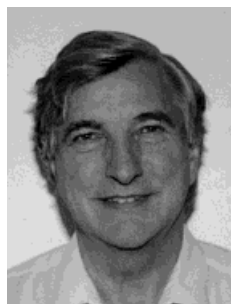
D. J. Ager



D. P. Pantaleone



S. A. Henderson



A. R. Katritzky



I. Prakash



D. E. Walters

David P. Pantaleone erhielt 1977 den B. A. für Chemie an der Lewis University in Romeoville, Illinois, und promovierte 1983 in Chemie an der Ohio State University. Seit 1983 arbeitet er bei G. D. Searle, wo er die biologische Herstellung von Aspartam untersucht. Derzeit ist er bei NSC Technologies Leiter der Forschungsgruppe Proteinbiochemie, die sich mit der Herstellung von Spezialchemikalien durch biologische Umwandlungen beschäftigt.

Scott A. Henderson wurde 1968 in Melbourne, Australien, geboren und promovierte 1996 unter der Anleitung von J. O'Connor und Dr. G. P. Savage von CSIRO, Division of Chemicals and Polymers, an der Swinburne University of Technology in Melbourne zum Ph. D. Zur Zeit ist er Postdoktorand bei Professor Katritzky an der University of Florida.

Alan R. Katritzky ist Professor und Direktor am Center for Heterocyclic Compounds der University of Florida. Zu seinen Auszeichnungen gehören Ehrendokortitel der Universitäten in Madrid (Spanien), Poznan und Danzig (Polen), East Anglia (Großbritannien), Toulouse (Frankreich) und St. Petersburg (Rußland).

Indra Prakash wurde 1956 in Muzaffarnagar, Indien, geboren. Mit der Verleihung seines M.Sc. von der University of Roorkee, Indien, erhielt er 1977 die Gold Medal for Academic Distinction. 1982 promovierte er bei Professor S. P. Singh an der Kurukshetra University, Indien, und arbeitete dann für die Union Carbide in Bhopal, Indien. Nach seiner Übersiedlung in die USA arbeitete er bei Professor Kagan, Professor Moriarty und Professor Sosnovsky. 1987 wechselte er als Senior Chemist zur Aldrich Chemical Company und wurde Principal Investigator für einen Vertrag des National Cancer Institute mit Aldrich. Derzeit leitet Dr. Prakash ein Projekt zur Entwicklung von Herstellungsverfahren für neue Süßstoffe der NutraSweet Kelco Company.

D. Eric Walters erhielt den B.Sc. in Pharmazie von der University of Wisconsin und den Ph. D. in Medizinischer Chemie von der University of Kansas. Er arbeitete zwölf Jahre in der Forschung der Pharmazeutischen und der Lebensmittelindustrie – während seiner Tätigkeit bei der NutraSweet Company vor allem auf dem Gebiet der Süßstoffe. Walters ist Mitherausgeber eines Buches über Süßstoffe.^[11a] 1991 wurde er Mitglied der Fakultät Biological Chemistry an der Chicago Medical School. Zu seinen derzeitigen Forschungsinteressen gehört die Suche nach neuen Mitteln gegen HIV-Infektionen und Parasiten sowie die Entwicklung neuer Methoden für computergestütztes Wirkstoffdesign.

Zellen umgeben. Werden sie von ihren Nervenzellen getrennt, so bilden sie sich rasch zu normalen Epithelzellen zurück. Aus diesem Grund ist es bisher nicht gelungen, geschmacksaktive Zellen in Zellkulturen zu vermehren.

Trotz dieser Schwierigkeiten gibt es inzwischen eine Reihe von Hinweisen darauf, daß der Sinnesindruck „süß“ in vielen Fällen von G-Protein-gebundenen Rezeptoren (GPCRs) vermittelt wird. Diese Rezeptoren sind für die Erkennung von vielen Neurotransmittern, Hormonen, Geruchsstoffen und sogar von Photonen verantwortlich. GPCRs sind in die Zellmembran eingebettete Proteine mit sieben α -Helixsegmenten. Extrazelluläre Liganden, die an den Rezeptor binden, lösen folgende Kaskade aus (Abb. 1): Durch Koordination des Liganden an den Rezeptor ändert sich die

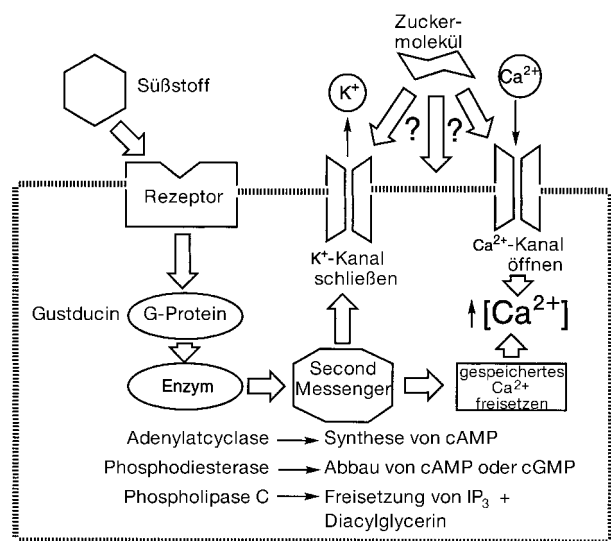


Abb. 1. Schematische Darstellung der Reizübertragung in einer Geschmackszelle. Der Reiz kann durch einen Süßstoff oder einen Zucker ausgelöst werden. Im letzten Schritt kommt es zur Depolarisierung der Zelle, die mit der Abgabe von Kaliumionen und einer starken Erhöhung der Konzentration freier intrazellulärer Calciumionen verbunden sein kann.

Konformation des Proteins, und der intrazelluläre Teil tritt mit einem oder mehreren GTP-bindenden Proteinen (den G-Proteinen) in Wechselwirkung. Die G-Proteine beeinflussen ihrerseits die Aktivität eines Enzyms, das die Menge eines „Second Messengers“ erhöht oder verringert: So kann Adenylat-Cyclase die Konzentration an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöhen, eine Phosphodiesterase cyclische Nucleotide abbauen oder eine Phospholipase Phosphatidylinositol-Lipide in Diacylglycerin und Inositoltriphosphat (IP_3) umwandeln. Diese Second Messengers (auch intrazelluläre Mediatoren genannt) können die Calciumionkonzentration oder die Aktivität von Ionenkanälen verändern, was zur Depolarisierung der Zelle führt, so daß ein Nervensignal an das Gehirn ausgesendet wird.

Margolskee et al. charakterisierten ein für die Geschmackszellen spezifisches G-Protein, das sie wegen seiner Ähnlichkeit mit Transducin, dem Protein von Retinal G, Gustducin nannten.^[3] Gustducin kann eine Phosphodiesterase aktivieren.^[4] Die Autoren konnten außerdem zeigen, daß Mäuse mit

inaktiviertem Gustducin-Gen auf süße und bittere Geschmacksstoffe schwächer reagierten.^[5] An Membranpräparaten der Geschmackszellen von Ratten wurde außerdem nachgewiesen, daß sich die Menge des Second Messengers cAMP beim Behandeln mit Saccharose oder Saccharin erhöht.^[6] Dagegen hatte Aspartam bei diesen Experimenten keinen Einfluß auf die cAMP-Konzentration; dies steht im Einklang damit, daß Ratten Aspartam nicht schmecken können.

Die Sinneswahrnehmung „süß“ kann auch unter Beteiligung von IP_3 und Calciumionen als Second Messengers übermittelt werden. Vor kurzem wurde nachgewiesen, daß sowohl Saccharose als auch Süßstoffe zu hohen intrazellulären Calciumionkonzentrationen führen.^[7] Bei den Süßstoffen werden über den Second Messenger IP_3 intrazellulär gespeicherte Calciumionen freigesetzt, während Saccharose Ionenkanäle an der Zelloberfläche öffnet, durch die extrazelluläre Calciumionen in die Zelle gelangen. Nach Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Kinnamon schließen Saccharose, Süßstoffe und cyclische Nucleoside einen Kalium-Kanal, was zur Depolarisierung der Zelle führt.^[8] Durch Schließen von Kalium-Leckkanälen sollte sich das Membranpotential der Zelle erhöhen; ob dadurch direkt eine Depolarisierung der Zelle hervorgerufen wird oder ob das erhöhte positive Potential spannungsabhängige Calciumkanäle steuert, ist bisher nicht geklärt.

Ein weiterer, bisher strittiger Punkt betrifft die Zucker. Wirken sie direkt auf ein Rezeptorprotein oder einen Ionenkanal? Manche Gründe sprechen dafür, daß Zucker nicht an spezifische Rezeptorstellen binden. Im Gegensatz zu biochemischen Wirksubstanzen wie Hormonen und Neurotransmittern, die ihre Rezeptoren im allgemeinen bei Konzentrationen von 10^{-9} – 10^{-12} M anregen, lösen Zucker erst bei hohen Konzentrationen (ca. 0.1 M) eine Geschmacksempfindung aus. Außerdem haben D- und L-Zucker bekanntlich ähnliche Süßkraft, und der Geschmack von L-Glucose gleicht dem der D-Glucose. Dies läßt darauf schließen, daß Zucker indirekt auf Rezeptoren oder Ionenkanäle wirken, indem sie die umgebenden Membranlipide beeinflussen.

Gibt es mehrere Rezeptoren für den süßen Geschmack? Vieles spricht dafür.^[9] Zum einen fällt dem Chemiker sofort die Vielfalt chemischer Verbindungen mit süßem Geschmack auf (darunter Zucker, Sulfamate, Heterocyclen, Harnstoffderivate, Arylguanidine, Peptide, Proteine, Oxime, Terpene), und es ist unwahrscheinlich, daß eine einzige Rezeptorbindungsstelle alle bekannten süß schmeckenden Verbindungen aufnehmen kann. Zum anderen ist es für Menschen bekanntlich leicht, die Geschmacksqualitäten von Süßstoffen zu unterscheiden. Die meisten Verbraucher können ohne weiteres geschmackliche Unterschiede zwischen Zucker und Süßstoffen feststellen. Außerdem tritt bei Mischungen strukturell nicht verwandter Süßstoffe (z.B. Aspartam mit Acesulfam) eine synergistische Wirkung auf, d.h., die Mischung schmeckt süßer, als aufgrund der Potentiale der einzelnen Mischungsbestandteile zu erwarten ist.^[10] Bei strukturell ähnlichen Süßstoffen wie Saccharin und Acesulfam gibt es hingegen keinen Synergismus. Um abschätzen zu können, wieviele Arten von Rezeptoren es für die Geschmacksempfindung „süß“ tatsächlich gibt, sind weitere Untersuchungen

erforderlich. Die bisherigen Erkenntnisse deuten darauf hin, daß Süßstoffe die Reaktion von Geschmackszellen nach anderen Mechanismen auslösen als Zucker. Außerdem scheinen die Rezeptoren, die den süßen Geschmack von Aspartam vermitteln, andere zu sein als die, die auf Saccharin und Acesulfam ansprechen.

1.2. Bestimmung der Süßkraft

Die Intensität eines Süßgeschmacks, die Süßkraft, läßt sich nur sensorisch von Prüfern quantitativ erfassen. Versuchstiere sind ungeeignet, weil die Geschmacksempfindung eines Tieres nicht bewertet werden kann. Außerdem gibt es in bezug auf die Süßstoffe erhebliche Unterschiede zwischen den Tierarten. Geschmacksprüfer verwenden normalerweise eine 15 cm lange lineare Skala, um den Geschmack von Süßstofflösungen zu bewerten.^[11] Die Prüfer sind so geschult, daß sie eine 5proz. Saccharoselösung bei der Skalamarke 5 cm einordnen, eine 10proz. Saccharoselösung bei 10 cm usw. Bei genügender Übung sind solche Daten recht gut reproduzierbar (im allgemeinen ± 1 Einheit). Die Prüfer bestimmen anhand von Vergleichslösungen, bei welcher Konzentration ein Süßstoff einer gegebenen Saccharosekonzentration entspricht.

Die Süßkraft wird meistens in Relation zu einer Saccharoselösung mit Standardkonzentration angegeben. So entspricht der süße Geschmack einer 0.025proz. Aspartamlösung in seiner Intensität einer 5proz. Saccharoselösung, die Süßkraft von Aspartam ist damit $5/0.025 = 200$ mal höher als die von Saccharose. Anders als bei Zuckern steigt bei Süßstoffen die Empfindungsstärke aber nicht linear mit der Konzentration. Gegenüber einer 2proz. Saccharoselösung (das entspricht etwa der Erkennungsschwelle) hat Aspartam eine 625mal stärkere Süßkraft, gegenüber einer 10proz. Lösung (das entspricht etwa der Konzentration in kohlenensäurehaltigen, alkoholfreien Getränken) aber nur eine 110mal stärkere. Die Süßkraft von Acesulfam beträgt 204, 140 und 34 bezogen auf 2-, 5- und 10proz. Saccharoselösungen. In der Literatur wird häufig eine Süßkraft angegeben, die in der Nähe der Erkennungsschwelle bestimmt wurde; der Grund hierfür ist vermutlich das Bestreben, dem eigenen neuen Süßstoff eine möglichst hohe Süßkraft zu bescheinigen. Wegen der nicht-linearen Konzentrationsabhängigkeit der Süßkraft führt die Konzentrationserhöhung ab einem gewissen Punkt nicht mehr zu einer Verstärkung des süßen Geschmacks, die Geschmacksempfindung nähert sich asymptotisch einem Maximalwert. Die mathematische Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit der Süßkraft ergibt für Aspartam, Acesulfam und Saccharin Höchstwerte, die 16.0-, 11.6- bzw. 9.0proz. Saccharoselösungen entsprechen.

2. Aspartam

Aspartam (L-Asparagyl-L-phenylalaninmethylester, APM) **1** ist heute weltweit der am meisten verwendete nutritive Süßstoff. Die Verbindung war zwar schon länger bekannt, ihr süßer Geschmack wurde aber erst 1965 durch Zufall von James Schlatter, einem Chemiker bei G. D. Searle (gehört

heute zu Monsanto) entdeckt, als er bei der Arbeit an einem Wirkstoff gegen Geschwüre seinen Finger ableckte.^[12] In der Folgezeit wurden mehrere Analoga, vor allem stabilere Ester,^[13] synthetisiert und hinsichtlich ihrer Süßkraft, ihres Geschmacksprofils und ihrer gesundheitlichen Unbedenklichkeit geprüft, doch wurde schließlich die ursprüngliche Verbindung APM bis zur Marktreife entwickelt.

Aspartam ist 160–180mal süßer als Saccharose. Es hat einen guten, rein süßen Geschmack, sein Zeit/Intensitäts-Profil unterscheidet sich aber von dem der Saccharose: Der süße Geschmack entwickelt sich langsam und hält lange an. Außerdem wirkt Aspartam in Lebensmitteln als Geschmacksverstärker. Daher entspricht die bei der Umstellung eines zuckerhaltigen Nahrungsmittels auf Aspartam benötigte Menge Süßstoff nicht unbedingt 1/160–1/180 der Zuckermenge. Aspartam ist kalorisch und liefert ca. 4 kcal g^{-1} ; da es jedoch dank seiner Süßkraft nur in sehr geringen Mengen aufgenommen wird, ist sein Beitrag zum Nährwert der Nahrung vernachlässigbar.

Die Löslichkeit in Wasser ist gering ($\approx 3 \text{ g}$ in 100 mL bei pH 3 und Raumtemperatur), nimmt aber bei höherem oder niedrigerem pH-Wert und mit steigender Temperatur zu; unter diesen Bedingungen tritt allerdings auch Zersetzung ein. Bei hohen pH-Werten cyclisiert Aspartam zum Diketopiperazin. Die Auftragung des pH-Werts gegen die Stabilität in wäßriger Lösung ergibt eine glockenförmige Kurve mit einem Stabilitätsmaximum bei pH 4.3.^[14] Bei höheren oder niedrigeren pH-Werten nimmt die Halbwertszeit von Aspartam in wäßriger Lösung rasch ab. Die meisten alkoholfreien Getränke haben einen pH-Wert von 2–3. Die Estergruppe des Aspartams ist sehr hydrolyseanfällig. Daher muß übermäßige Wärme vermieden werden, andernfalls kann rasche Zersetzung bei gleichzeitigem Verlust des süßen Geschmacks eintreten. Aspartam wurde 1981 von der amerikanischen Gesundheitsbehörde für die Verwendung in trockenen Lebensmitteln zugelassen. Zwei Jahre später wurde die Zulassung auf kohlenensäurehaltige Getränke und 1993 auf Backwaren, Süßigkeiten und kohlenäurefreie Getränke erweitert. Es kann in fast allen Lebensmittelgruppen eingesetzt werden, die Hauptmenge wird aber für Getränke gebraucht.

2.1. Chemische Synthesen

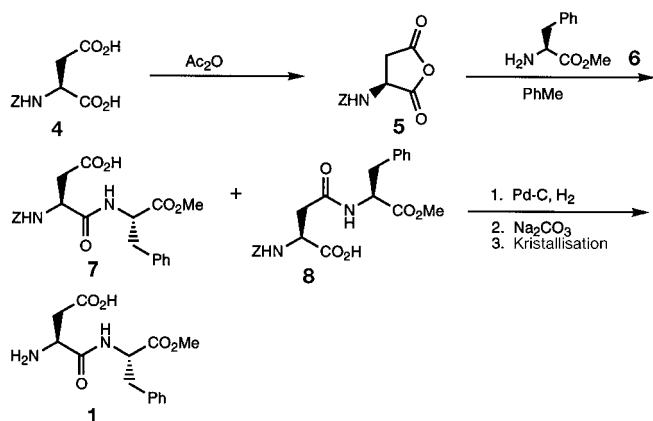
Aspartam **1** ist ein Dipeptid aus den Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Phenylalanin, und es wurden viele chemische Synthesen dafür beschrieben. Die meisten gehen von zwei entsprechend geschützten Aminosäuren aus, die nach konventionellen Methoden der Peptidsynthese miteinander verknüpft werden.^[15] Bei der Verfahrensentwicklung konzentrierte sich die Forschung im wesentlichen darauf, die Ausbeute und die Reinheit des gewünschten Produkts zu erhöhen und gleichzeitig die Bildung von Nebenprodukten, vor allem durch β -Kupplung der Asparaginsäureeinheit, zu unterdrücken. Ein erheblicher Teil der Entwicklungsarbeit wurde darauf verwendet, die gewünschte α -Kupplung durch Ändern der Reaktionsbedingungen und Blockieren der Aminogruppe von Asparaginsäure zu maximieren.^[16] Glücklicherweise kristallisiert das gewünschte Produkt aus der

Reaktionsmischung als Hydrochlorid, während die unerwünschten Isomere in Lösung bleiben.^[17]

Bei den industriell bedeutenden chemischen Verfahren wird Asparaginsäure zum Säureanhydrid dehydratisiert, das danach mit Phenylalanin oder Phenylalaninmethylester zum gewünschten Produkt verknüpft wird. Die beiden wichtigsten Verfahren, der Z- und der F-Prozeß, sind nach der jeweiligen Schutzgruppe der Asparaginsäureeinheit benannt. Bei beiden Verfahren entstehen neben dem gewünschten α -Aspartam **1** auch β -Kupplungsprodukte, die durch selektive Kristallisation entfernt werden. Da die Ausgangsverbindungen teuer sind, werden die Aminosäuren aus den Nebenprodukten und Rückständen zurückgewonnen.

2.1.1. Der Z-Prozeß

Bei diesem Verfahren wird Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure **4** mit Ac_2O in das Anhydrid **5** überführt (Schema 1).^[18] Durch Umsetzen von **5** mit L-Phenylalaninmethylester **6** in Toluol entsteht ein Gemisch aus Benzyloxycarbonyl- α - und - β -aspartam, **7** und **8**. Nach Abspalten der Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle wird das erhaltene Gemisch der Aspartamisomere mit Natriumcarbonat auf pH 5 gebracht, wobei APM **1** auskristallisiert.

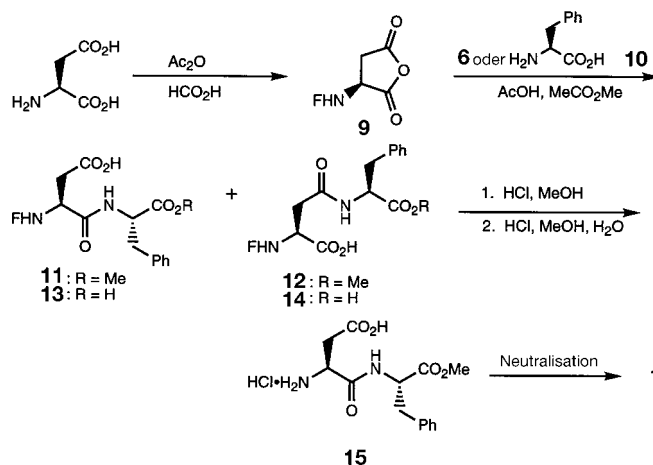


Schema 1. Synthese von Aspartam **1** nach dem Z-Verfahren (Z = Benzyloxycarbonyl).

ester **6** in Toluol entsteht ein Gemisch aus Benzyloxycarbonyl- α - und - β -aspartam, **7** und **8**. Nach Abspalten der Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle wird das erhaltene Gemisch der Aspartamisomere mit Natriumcarbonat auf pH 5 gebracht, wobei APM **1** auskristallisiert.

2.1.2. Der F-Prozeß

Bei dieser Methode wird mit Acetanhydrid/Ameisensäure in einem Reaktionsschritt die Aminogruppe der Asparaginsäure mit der Formylgruppe geschützt und das geschützte Substrat zum Anhydrid **9** dehydratisiert (Schema 2). Dieses wird anschließend entweder mit L-Phenylalanin **10**^[19] oder mit dem Methylester **6**^[20] umgesetzt. Die Abspaltung der Formylgruppe durch saure Hydrolyse ist mit einigen Nebenreaktionen verbunden, z. B. der Hydrolyse der Ester **11** und **12** und der Veresterung der Säuren **13** und **14**. Das erhaltene Gemisch aus α - und β -Produkten wird mit wässrigem Methanol in Gegenwart von Salzsäure verestert. Aus diesem Reak-



Schema 2. Synthese von Aspartam **1** nach dem F-Verfahren (F = Formyl).

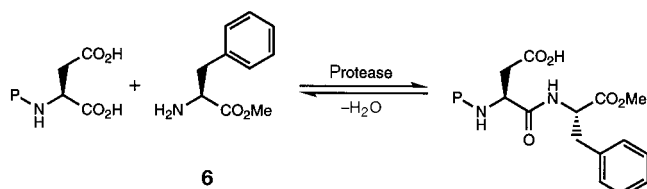
tionsgemisch kristallisiert bevorzugt α -APM-Hydrochlorid **15**, das durch Neutralisieren in APM **1** überführt wird. Dieser Prozeß läßt sich auch als Eintopfreaktion durchführen.^[21] α -APM ist außerdem aus ungeschütztem L-Asparaginsäureanhydrid zugänglich; allerdings fallen bei dieser Reaktion erhebliche Mengen an Oligopeptiden an.^[22]

2.2. Enzymatische Synthesen

Biotechnologische und biokatalytische Verfahren bei der Herstellung des synthetischen Süßstoffs Aspartam **1** sind eingehend untersucht worden. Da die Asparaginsäureeinheit zwei Carboxygruppen enthält, entstehen bei chemischen Synthesen immer α - und β -Produkte; die Verwendung von regio- und stereoselektiv wirkenden Enzymen ist daher sehr erwünscht. Wegen der Dipeptidstruktur wurden zahlreiche Varianten der umgekehrten Proteolyse wie kinetisch und thermodynamisch kontrollierte Reaktionen mit verschiedenen Enzymen und unter mehreren Reaktionsbedingungen erprobt. Andere biokatalytische Methoden zur Synthese von APM nutzen Enzyme zum Entschützen einer APM-Vorstufe, zur Aminierung von Fumarylphenylalaninmethylester oder zur Veresterung von α -L-Asparagyl-L-phenylalanin; wieder andere gehen von einem synthetischen Polypeptid aus, dem Poly(asparagylphenylalanin). Einige dieser biokatalytischen Verfahren zur Synthese von APM werden nachstehend besprochen; angesichts des Umfangs dieses Forschungsgebietes verweisen wir den Leser darüber hinaus auf andere Übersichten.^[23–25]

2.2.1. Peptidkupplung

Proteasen werden seit vielen Jahren als Katalysatoren beim Knüpfen von Peptidbindungen eingesetzt; das Verfahren ist die wichtigste biokatalytische Herstellungsmethode für APM-Vorstufen. Schema 3 zeigt ein Beispiel für die thermodynamisch kontrollierte Umkehrung der Proteasewirkung. Die N-geschützte L-Asparaginsäure wird in Gegenwart einer Protease – üblicherweise einer Metalloprotease – mit L-Phenylalaninmethylester **6** zum N-geschützten APM-Derivat ver-



Schema 3. Protease-katalysierte Synthese einer Aspartam-Vorstufe (P = Schutzgruppe).

knüpft. Dieses ist meist unlöslich, so daß das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des Peptids liegt. Durch Abspaltung der Schutzgruppe mit chemischen oder biologischen Verfahren erhält man APM.

Bei anderen Peptidkupplungen werden Serin- oder Cysteinproteasen eingesetzt, die bei der Hydrolyse von Peptidbindungen Acyl/Enzym-Zwischenprodukte bilden. Hierfür wurde die Serinprotease der Hefe, Carboxypeptidase Y, eingehend untersucht.^[26] Zur Herstellung von APM acyliert man zunächst das Enzym mit einer geschützten Asparaginsäure, normalerweise dem α -Methylester. Aus diesem acylierten Enzym und einem mit Wasser konkurrierenden Nucleophil, z. B. L-Phenylalaninmethylester (PM), entsteht APM. Obwohl der Umsatz bei dieser Art der Peptidbildung im allgemeinen gering ist, wurde das Verfahren für die industrielle APM-Synthese mit der Endopeptidase des *Staphylococcus aureus*-Stamms V8 erprobt.^[27]

In den vergangenen 20 Jahren wurde die Umkehrung der Proteasewirkung durch kinetisch oder thermodynamisch kontrollierte Reaktionen in vielen Varianten beschrieben und in zahlreichen Übersichten zusammengefaßt.^[28] Die meisten Veränderungen bei thermodynamisch kontrollierten Verfahren betrafen die Schutzgruppe P, das Enzym und die Reaktionsbedingungen. Einige bei enzymatischen APM-Synthesen häufiger verwendete Schutzgruppen sind in Tabelle 1

Tabelle 1. Schutzgruppen bei der Synthese von APM-Vorstufen durch umgekehrte Proteolyse.

Schutzgruppe	Abkürzung	Lit.
Acetoacetyl	AcAc	[25]
Acetyl	Ac	[29]
Benzoyl	Bz	[30]
Benzylloxycarbonyl	Z	[23, 24, 31, 32]
<i>tert</i> -Butoxycarbonyl	Boc	[33]
Formyl	F	[34]
Isovaleryl	Iv	[25]
(<i>p</i> -Methoxybenzyl)oxycarbonyl	Moz	[33, 35]
Phenylacetyl	PhAc	[36, 37]

zusammengefaßt. Von diesen Schutzgruppen wurde die Z-Gruppe am häufigsten eingesetzt. Werden 2 Äquiv. Phenylalaninmethylester mit 1 Äquiv. Z-Asp umgesetzt, so fällt das Produkt Z-APM·PM aus und verschiebt das Gleichgewicht bis zu einer Umsetzung von > 95%.^[35] Hierauf beruht der industrielle TOSOH-Prozeß, der bei Holland Sweetener mit Thermolysin (siehe unten) durchgeführt wird.^[24] Eine wichtige Veränderung war die Verwendung von racemischem PM anstelle des L-Isomers. Da das Enzym die Peptidbindung nur mit dem L-PM-Isomer knüpft, bildet das nicht umgesetzte D-

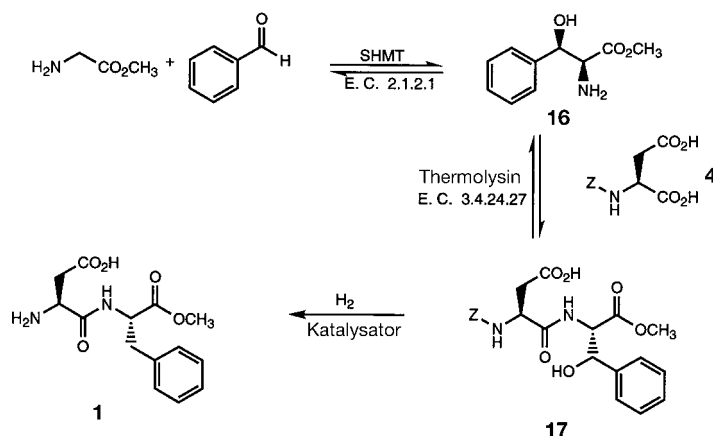
PM-Isomer das Salz und kann nach dem Ansäuern chemisch racemisiert und erneut eingesetzt werden. Eine weitere Verbesserung besteht darin, die Inaktivierung des Enzyms zu verringern, indem man ein mit Wasser nicht mischbares Lösungsmittel wie Toluol oder Isobutylmethylketon zugebt, sobald das Z-APM·D-PM-Salz auszufallen beginnt. Auf diese Weise läßt sich eine kontinuierliche Prozeßführung erreichen.^[38]

Bei dieser Biosynthese wird am häufigsten die Metalloprotease Thermolysin (EC 3.4.24.27) aus *Bacillus thermoproteolyticus* eingesetzt. Dieses Enzym ist unter dem Handelsnamen Thermoase bei Daiwa Kasei (Osaka, Japan) erhältlich.^[23] Wie der Name andeutet, widersteht das Enzym über längere Zeit hohen Temperaturen sowie einer Reihe von organischen Lösungsmitteln; es eignet sich daher ausgezeichnet für die industrielle Anwendung. Außerdem wurden unter Verwendung von Thermolysin immobilisierte Enzyme^[32, 39–41] und Membranprozesse^[42, 43] entwickelt. Auch eine stabilisierte, als CLEC (crosslinked enzyme crystal: vernetzter Enzymkristall), bezeichnete Form des Enzyms kann Z-Asp und PM miteinander verknüpfen.^[44] P-APM-Vorstufen wurden auch mit den Enzymen Papain,^[33] Pepsin,^[43, 45] Elastase aus *Pseudomonas aeruginosa*^[46] und Aminopeptidase A^[47] synthetisiert. Durch ortsspezifische Mutagenese des Gens, das eine neutrale Protease aus *Bacillus proteolyticus* kodiert, wurde bei der Verknüpfung von Z-Asp und PM ein besseres Ergebnis erzielt als mit Thermolysin.^[48]

Um das Gleichgewicht der Reaktion zu verschieben, wurden viele mit Wasser mischbare und nicht mischbare Lösungsmittelsysteme untersucht.^[49] Bei einer von Homandberg et al. beschriebenen Methode wird der Wassergehalt durch organische Cosolventien wie Glycerin und andere Glycole reduziert und so die Synthese begünstigt.^[50] Auch Lösungsmittel wie Acetonitril,^[51] Essigsäureethylester,^[32, 52] *tert*-Amylalkohol,^[40] Triethylphosphat^[53] und andere wurden erprobt.^[54] Ein Lösungsmittelgemisch aus Essigsäureethylester und *tert*-Amylalkohol hat sich mit Ausbeuten von 99% ebenfalls als effizient erwiesen.^[41]

2.2.2. Der „Phenylalanin-freie Weg“^[55]

Zu Beginn der Verfahrensentwicklung für APM-Synthesen waren die hohen Kosten und die mangelnde Verfügbarkeit von L-Phenylalanin für Chemiker und Biochemiker ein Hauptproblem, für das es zwei Lösungsmöglichkeiten gab: Man könnte L-Phenylalanin entweder als Ausgangsverbindung synthetisieren und anschließend zum Süßstoff **1** umsetzen, oder man könnte man die L-Phenylalanin-Seitenkette aus preiswerten Edukten aufbauen. So entwickelten Mitarbeiter der Firma W. R. Grace einen „Phenylalanin-freien Weg“ zu APM, bei dem L-*erythro*-Phenylserinmethylester **16** aus Glycinmethylester und Benzaldehyd mit dem Enzym Serinhydroxymethyltransferase (SHMT) hergestellt wird (Schema 4).^[56] Das Enzym reagiert zwar in bezug auf das α -Kohlenstoffatom hochstereospezifisch unter Bildung des *S*-Isomers, in bezug auf das β -Kohlenstoffatom ist die Stereoselektivität aber geringer, so daß auch L-*threo*-Phenylserin entsteht. Unter kontrollierten Reaktionsbedingungen wird jedoch das kinetisch begünstigte Produkt L-*erythro*-Phenyl-



Schema 4. Sequenz aus zwei enzymatischen Reaktionsschritten und einer chemischen Hydrierung zur Synthese von Aspartam **1** ohne Verwendung von Phenylalanin.

serin gebildet. Anschließend wird der Methylester **16** enzymatisch mit Z-Asparaginsäure **4** zum Addukt **17** verknüpft. Durch katalytische Hydrierung werden die Z-Schutzgruppe und die Hydroxygruppe unter Bildung von APM **1** abgespalten.

2.2.3. Andere biokatalytische Reaktionen

Enzymatische Veresterung

Davino gelang die enzymatische Veresterung des Dipeptids Asparagylphenylalanin (AP) **18** und seiner N-geschützten Derivate mit dem Enzym Subtilisin Carlsberg bei hohen Methanolkonzentrationen (60 %) und längeren Reaktionszeiten.^[57] Wegen der niedrigen AP-Konzentrationen wäre die Durchsatzmenge bei einer Reaktion dieser Art sehr gering, und das Verfahren würde sich für die industrielle Praxis wahrscheinlich nicht eignen.

Choi und seine Mitarbeiter erprobten ein Veresterungsverfahren mit Proteasen;^[58] die besten Ergebnisse (ca. 40 % Ausbeute) erzielten sie mit α -Chymotrypsin in 25proz. wäßrigem Methanol.

Enzymatisches Entschützen

Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, wurde bei der enzymatischen Synthese von APM eine Reihe von Schutzgruppen eingesetzt, von denen einige auch bei chemischen Synthesen von **1** verwendet wurden. Die Z-Gruppe wird durch katalytische Hydrierung entfernt; ein sehr effizientes Verfahren, das nicht zur Zersetzung des entstandenen Dipeptids führt. Andere Schutzgruppen lassen sich dagegen nicht so leicht wieder abspalten; die erforderlichen Reaktionsbedingungen sind teilweise recht drastisch, so daß die Stabilität des Produkts zum Hauptproblem werden kann. Die Abspaltung der Schutzgruppen durch Enzyme oder Mikroorganismen kann daher in solchen Fällen erhebliche Vorteile bieten. N-Phenylacetyl-geschützte Peptide können mit dem Enzym Penicillinacylase (EC 3.5.1.11) entschützt werden.^[59] Fuganti

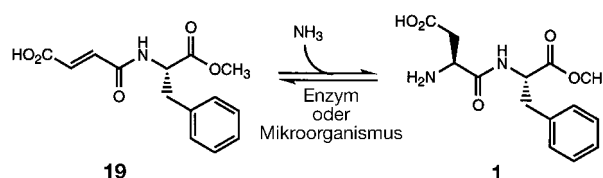
und Grasselli beschrieben die enzymatische Abspaltung dieser Schutzgruppe von der APM-Vorstufe PhAc-APM.^[36] Später veröffentlichten Stoineva et al. ein Verfahren, um *p*-substituierte Phenylacetyl-derivate von APM mit dieser Acylase zu entschützen.^[37] Aus Phthalimido-APM läßt sich die Phthalylschutzgruppe mit einem Enzym aus *Xanthobacter agilis* abspalten, wie Zmijewski und seine Mitarbeiter bei Lilly zeigen konnten.^[60]

Poly(asparagylphenylalanin)

Mit der Entwicklung der DNA-Rekombinationstechnik wurde über synthetische Gene berichtet, die in Bakterien exprimiert und für den Aufbau eines Polymers aus Asparaginsäure und Phenylalanin verwendet wurden. Dieses Polymer kann anschließend enzymatisch zum Dipeptid α -L-Asparagyl-L-phenylalanin **18** gespalten und danach enzymatisch zu APM verestert werden. Die erste Veröffentlichung stammt von Mitarbeitern bei Searle Research in High Wycombe und beschreibt Klone, deren Gene etwa 150 Wiederholungen der Asparagylphenylalanin-Einheit kodieren.^[61] Mit Trypsin gelang die Spaltung eines aus Asparagylphenylalanin-Lysin-Einheiten zusammengesetzten Polymers. Das erhaltene Tripeptid Asp-Phe-Lys liefert beim Behandeln mit Carboxypeptidase B das Dipeptid **18**,^[58] aus dem durch enzymatische Veresterung wie oben beschrieben APM entsteht. Ein Gen, das 167 Aminosäuren des N-Terminus von Prochymosin und danach (Asp-Phe)₆₁ kodiert, wurde in ein Plasmid eingeführt und in *E. coli* exprimiert;^[62] die Menge der gebildeten Einschlusskörper aus Poly(Asp-Phe) betrug etwa 11.2 % des gesamten zellulären Proteins. Diese interessante Methode ist wegen der geringen Expressionseffizienz und der notwendigen enzymatischen Spaltungs- und Veresterungsschritte aber nur begrenzt anwendbar.

Aminierung von Fumarylphenylalaninmethylester

Da sich Fumarylphenylalaninmethylester **19** chemisch einfach aus Maleinsäureanhydrid und Phenylalanin synthetisieren läßt, wurde die Möglichkeit erwogen, **19** durch Aminierung mit einem Ammoniak-Lyase-Enzym in APM **1** umzuwandeln (Schema 5). Wegen der strengen Substratspezifität



Schema 5. Aminierung von **19** zu Aspartam **1**.

der bekannten Ammoniak-Lyasen bestimmte man die Enzymaktivität in Screeningversuchen.^[63] Das Verfahren erlangte allerdings keine kommerzielle Bedeutung, da die Ausbeuten äußerst gering sind.

Direkte Kupplung

Bei einer idealen enzymatischen Kupplung würde ein Enzym L-Asparaginsäure und Phenylalaninmethylester miteinander verknüpfen. Dadurch würden die Einführung und spätere Abspaltung von teuren Schutzgruppen ebenso entfallen wie die vorangehende chemische Synthese der APM-Vorstufe. Allerdings müßte das Enzympräparat frei von Esteraseaktivität sein, da eines der Substrate eine Methoxycarbonylgruppe enthält. Paul und seine Mitarbeiter bei BioEurope (Toulouse, Frankreich) isolierten ein Enzym aus *Micrococcus caseolyticus*, mit dem diese Verknüpfung gelingt.^[64] Ausgehend von 0.2 M L-Asparaginsäure und 0.5 M Phenylalaninmethylester wurden maximal 35 mM APM erhalten. Später gelang einer anderen Arbeitsgruppe um Paul bei BioEurope die Reinigung und Charakterisierung der Aminopeptidase A (EC 3.4.11.7) aus demselben Bakterienstamm, der jetzt *Staphylococcus chromogenes* heißt.^[47] Die Geschwindigkeit der APM-Synthese mit dem gereinigten Enzym betrug anfangs 0.23 mM h⁻¹. Sie muß zweifellos wesentlich erhöht werden, bevor das Enzym für die großtechnische Synthese von APM eingesetzt werden kann.

Fermentierung

Zwei japanische Firmen erprobten Fermentierungsverfahren, mit denen APM direkt aus L-Asp und PM in einer Nährlösung mit Mikroorganismen hergestellt wird. Bei der Variante der Ajinomoto Company wird eine Lösung von L-Asp und PM mit einem ausgewählten Bakterienstamm versetzt; nach 16–24 h liegen die Ausbeuten dieser Umsetzungen zwischen 73 und 576 mg dL⁻¹.^[65] Die Toya Soda Manufacturing Company hat ein Patent für einen Fermentierungsprozeß, der eine Reihe von Bakterien- und Hefestämmen beansprucht, mit deren Hilfe sich APM synthetisieren läßt.^[66] Bei einer typischen Umsetzung wurden 1.0 M L-Asp mit 1.0 M PM unter Schütteln in phosphatgepufferter Lösung mit dem Mycel eines speziellen Pilzstamms aus einer 500-mL-Kultur inkubiert. Nach 16 h bei 37 °C wurden 100 mg (1.4 %) APM erhalten.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Fermentierungsverfahren zur Synthese von APM sind wissenschaftlich äußerst interessant, sie haben aber wegen der viel zu geringen Ausbeuten kommerziell so gut wie keine Bedeutung. Die Reaktionsausbeuten müßten erheblich gesteigert werden, bevor ein rentables Verfahren verwirklicht werden kann.

2.3. Zusammenfassung

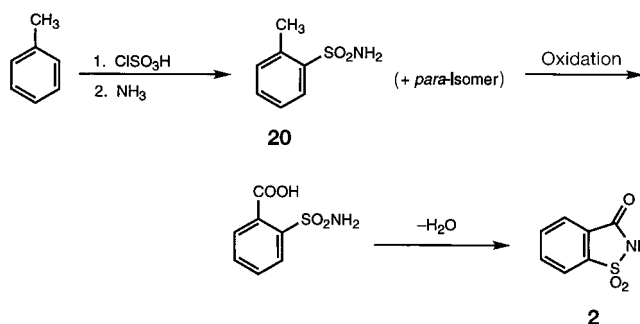
Die biochemische Produktion von APM ist nach wie vor ein Gebiet, auf dem intensiv geforscht wird. Die Holland Sweetener Company arbeitet bereits mit einem Verfahren, das diese Technologie nutzt. Die ständigen Fortschritte in der Biotechnologie lassen erwarten, daß in Zukunft weitere „grüne“ Herstellungsprozesse für **1** entwickelt werden.

3. Saccharin

Saccharin (1,2-Benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, 2-Sulfobenzoesäureimid) **2** ist zur Zeit der weltweit meistverwen-

dete nichtnutritive Süßstoff.^[67] Die Verbindung wurde 1879 zufällig von Remsen und Fahlberg an der Johns Hopkins University in Baltimore entdeckt und ist seit 1885 im Handel.^[68] Saccharin ist etwa 300mal süßer als Saccharose und dadurch im Verhältnis Kosten/Süßkraft sogar günstiger als Zucker. Aus diesem Grund ist es in den Ländern der Dritten Welt weit verbreitet. Auch während der Weltkriege, als Zucker knapp war, kam ihm erhebliche Bedeutung zu.^[67] Dank seiner chemischen Stabilität und seines geringen Preises findet dieser Süßstoff zahlreiche Anwendungen, z.B. in Zahncrème, Mundwasser und Medikamenten sowie in Nahrungsmitteln und Getränken. Allerdings hat Saccharin keinen „rein“ süßen Geschmack, einige Verbraucher bemerken einen bitteren oder metallischen Beigeschmack. Da die Stammverbindung **2** in Wasser nur schlecht löslich ist, wird der Süßstoff gewöhnlich als Natrium- oder Calciumsalz eingesetzt. Die toxikologische Unbedenklichkeit von Saccharin wurde aufgrund von Berichten über das Auftreten von Blasenkrebs bei Ratten in Frage gestellt. Die Deutung der experimentellen Befunde ist allerdings noch immer umstritten.^[67] Saccharin wird vom menschlichen Organismus bei geringer Absorption unverändert ausgeschieden.^[69]

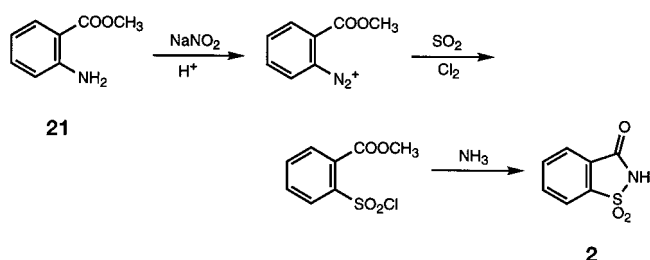
Für die chemische Synthese von Saccharin **2** gibt es zwei Hauptmethoden, nämlich die Oxidation von *o*-Toluolsulfonamid **20** und den Austausch der Aminogruppe in Anthranilsäure gegen eine schwefelhaltige Gruppe.^[70] Bei der Umsetzung von Toluol mit Chlorsulfonsäure entstehen *o*- und *p*-Toluolsulfonylchlorid, die anschließend mit Ammoniak in die Sulfonamide überführt werden (Schema 6). Das überwiegend



Schema 6. Synthese von Saccharin **2** aus Toluol.

gebildete *ortho*-Isomer kann auf dieser oder einer späteren Stufe abgetrennt werden.^[71, 72] *o*-Toluolsulfonamid **20** läßt sich unter anderem mit Kaliumpermanganat,^[71] Kaliumchromat,^[73] Chromsäure,^[74] elektrochemisch,^[75] mit Luft^[76] oder Sauerstoff^[77] zur entsprechenden Carbonsäure oxidieren. Anschließend wird das *ortho*-Isomer zum Süßstoff **2** dehydratisiert.^[73, 78]

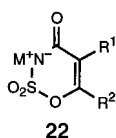
Die andere Reaktionssequenz (Schema 7), eine Variante des Maumee-Prozesses, geht von Anthranilsäure aus. Das durch Diazotierung des Anthranilsäuremethylesters **21** erhaltene Diazoniumsalz wird mit Schwefeldioxid und Chlor zum Sulfonylchlorid umgesetzt. Dieses reagiert mit Ammoniak zu Saccharin **2**.^[79] Modifikationen des Verfahrens sollen die Ausbeute und den Reinheitsgrad des Produkts verbessern.^[78] (Beim ursprünglichen Maumee-Prozeß wurde das

Schema 7. Synthese von Saccharin **2** aus Anthranilsäuremethylester **21**.

intermediäre Diazoniumsalz mit Natriumdisulfid und anschließend mit Chlor umgesetzt.^[67, 80])

4. Acesulfam-K

Die Entdeckung der Oxathiazinondioxide **22** durch Clauß und Jensen im Jahr 1970^[82] führte bei Hoechst zur Entwicklung des Zuckeraustauschstoffs



3 $R^1=H, R^2=Me, M=K$
23 $R^1=Et, R^2=Me, M=K$

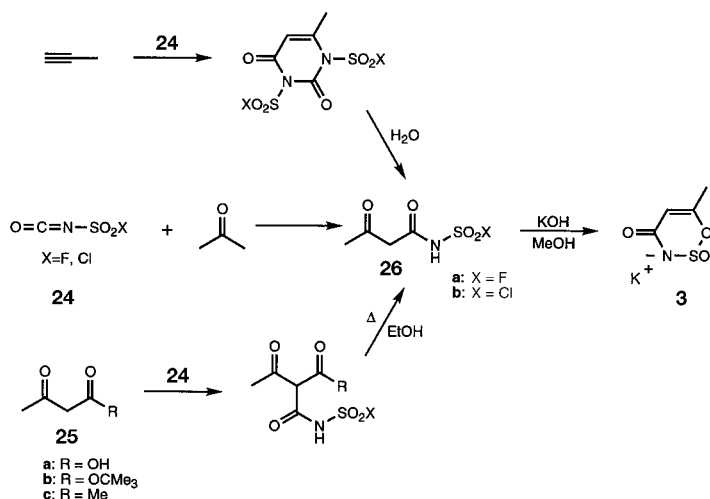
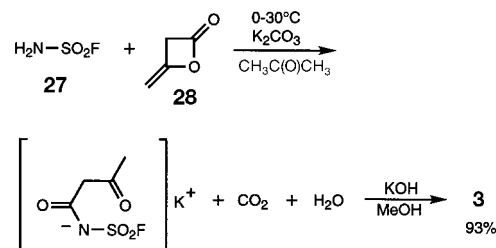
des Zuckeraustauschstoffs Acesulfam-K (Ace-K) **3**.^[81] Oxathiazinondioxide **22**, deren Substituenten R^1 und R^2 Wasserstoff oder kleine Alkylreste sind, schmecken süß. Unter den bisher entdeckten Derivaten hat **23** ($R^1=Et, R^2=Me$) zwar die größte Süßkraft, zum Handelsprodukt wurde aber Ace-K **3**

entwickelt, weil es einen reineren süßen Geschmack hat als die anderen Oxathiazinondioxide; es ist annähernd 120mal süßer als Saccharose. Im Gegensatz zu den meisten synthetischen Süßstoffen ist Acesulfam-K sehr gut in Wasser löslich.^[83] Wichtiger für die praktische Anwendung in Lebensmittelzubereitungen sind seine Hydrolysestabilität – sogar in stark sauren Getränken – und seine toxikologische Unbedenklichkeit.^[84, 85] Bei der Metabolisierung entsteht durch Ringspaltung Acetoacetamid-*N*-sulfonsäure, deren weiterer Abbau zu physiologisch unbedenklichen Verbindungen führt.^[86]

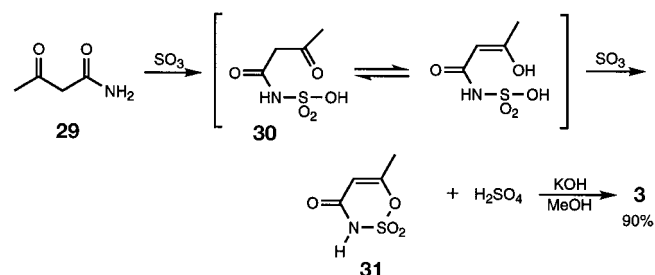
4.1. Chemische Syntheseverfahren

Die ersten Synthesen von Ace-K gehen von Chlor- oder Fluorsulfonylisocyanat **24** aus. Das Verfahren eignet sich zwar zur Herstellung zahlreicher Oxathiazinondioxid-Derivate, doch gehen wir hier nur auf die Synthese von Ace-K **3** ein (Schema 8). Clauß und Jensen veröffentlichten 1973 eine detaillierte Übersicht über die Synthesen von Oxathiazinondioxid.^[84] Bei der Umsetzung von Chlor- oder Fluorsulfonylisocyanat **24** mit Propin,^[82] Aceton,^[81, 87, 88] Acetessigsäure **25a**,^[89] *tert*-Butylacetoacetat **25b**^[90] oder Acetylaceton **25c**^[87] entstehen die *N*-(Halogensulfonyl)acetoacetamide **26**, die sich mit Kaliumhydroxid in Methanol zu Ace-K **3** cyclisieren lassen. Die Salze von *N*-(Fluorsulfonyl)acetoacetamid **26a** entstehen auch durch Umsetzung von Diketen **28** mit Amidosulfonsäurefluorid **27** (dem Produkt der partiellen Hydrolyse von Fluorsulfonylisocyanat) in Gegenwart organischer Stickstoffbasen^[91] oder anorganischer Basen^[92] (Schema 9). Unter heterogenen Reaktionsbedingungen wird be-

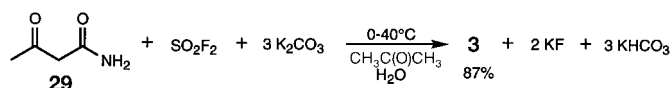
vorzugt Kaliumcarbonat verwendet, weil das gebildete *N*-(Fluorsulfonyl)acetoacetamid-Salz kristallin anfällt.^[92, 93] Diese beiden Verfahren liefern zwar hohe Ausbeuten an Ace-K **3**, ihre industrielle Anwendung wird aber durch die schwierige Herstellung und Handhabung von Chlor- und Fluorsulfonylisocyanat eingeschränkt.

Schema 8. Synthesen von Ace-K **3** aus Halogensulfonylisocyanaten **24** über Sulfonylacetylacetamide **26**.Schema 9. Synthese von Ace-K **3** aus Amidosulfonsäurefluorid **27**.

Bei einem anderen Verfahren wird Acetoacetamid **29** mit mindestens zwei Äquivalenten Schwefeltrioxid umgesetzt (Schema 10).^[94] Dabei entsteht zunächst wahrscheinlich *N*-Sulfonylacetoacetamid **30**, das anschließend durch ein zweites

Schema 10. Synthese von Ace-K **3** aus Acetoacetamid **29** und Schwefeltrioxid.

Äquivalent Schwefeltrioxid zum Oxathiazinondioxid **31** dehydratisiert wird. Durch Neutralisieren mit Kaliumhydroxid erhält man schließlich Ace-K **3**.^[95] Auch bei der Reaktion von Acetoacetamid **29** mit Sulfurylfluorid und Kaliumcarbonat entsteht Ace-K **3** in hoher Ausbeute (Schema 11).^[96] Einige



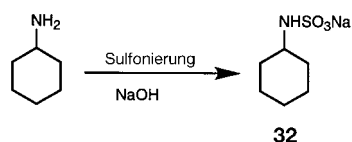
Schema 11. Synthese von Ace-K **3** aus Acetoacetamid **29** und Sulfurylfluorid.

andere Fluorsulfonylverbindungen, z. B. Chlorsulfonylfluorid, Pyrosulfonylfluorid und Chlorpyrosulfonylfluorid, eignen sich ebenfalls für diese Umsetzung, die besten Ausbeuten an Ace-K **3** werden aber mit Sulfurylfluorid erzielt. Sie sind sogar noch höher, wenn als Lösungsmittel wäßriges Aceton (1–12 Massen-% Wasser) verwendet wird.

5. Cyclamate

Cyclamate sind Salze der Cyclohexylsulfamidsäure (Cyclohexylaminosulfonsäure). Natriumcyclamat **32** (oft auch nur als Cyclamat bezeichnet) findet Verwendung als energiefreier Zuckeraustauschstoff, das Calciumsalz wird bei Natriumarmen Diäten eingesetzt. Cyclamate sind unter anderem in Kanada erhältlich. Der süße Geschmack wurde 1937 von Michael Sveda, einem Studenten an der University of Illinois, durch Zufall entdeckt.^[73, 97] Das Patent wurde 1942 auf DuPont angemeldet und später Eigentum der Abbott Laboratories in Illinois. Abbott beantragte 1950 die Zulassung NDA (New Drug Application). Natriumcyclamat wurde 1958 von der amerikanischen Gesundheitsbehörde als gesundheitlich unbedenklicher (GRAS = Generally Regarded As Safe) Süßstoff eingestuft. 1966 wurden jedoch Berichte veröffentlicht, nach denen Natriumcyclamat im Darmtrakt zu Cyclohexylamin metabolisiert werden kann, das nachweislich Chromosomenschäden bei Tieren hervorruft und im Gemisch mit Saccharin (10:1) bei Ratten Tumore auslöst.^[98] Schließlich verbot die amerikanische Gesundheitsbehörde 1970 die Verwendung von Cyclamaten. Abbott Laboratories führte weitere Unbedenklichkeitsstudien durch und reichte zwei Petitionen ein, die aber abgewiesen wurden. Cyclamate dürfen in den USA nicht mehr verwendet werden.

Natriumcyclamat ist 30mal süßer als Saccharose, hat allerdings einen bitteren Nachgeschmack. Bei Mischungen mit Saccharin tritt eine synergistische Süßkraftverstärkung auf. Es ist in Wasser löslich und über einen breiten pH- und Temperaturbereich stabil. Für die einfache Verbindung **32** sind viele chemische Synthesen beschrieben; alle Verfahren nutzen die Sulfonierung von Cyclohexylamin (Schema 12) –



Schema 12. Synthese von Natriumcyclamat **32**.

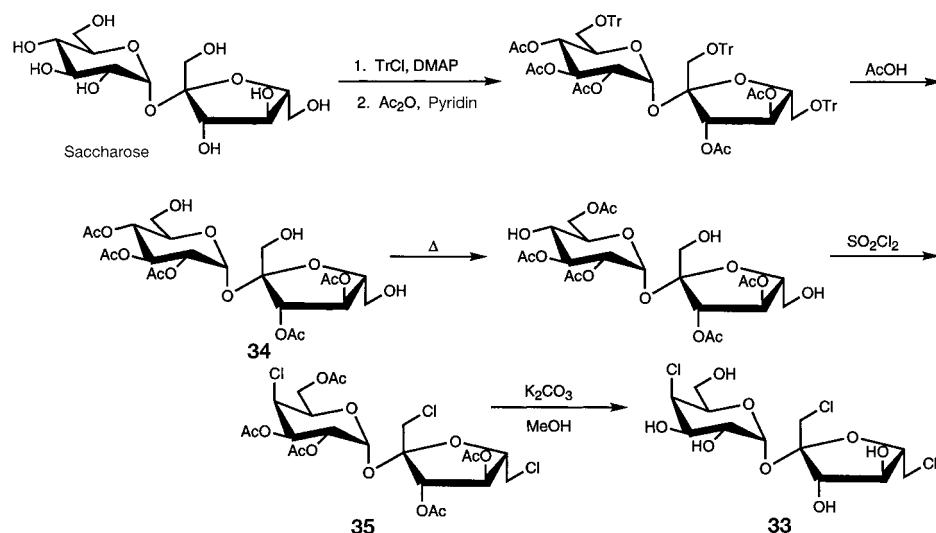
entweder mit Sulfaminsäure oder einem ihrer Salze oder mit Schwefeltrioxid.^[99] Angesichts des Marktverbots in den USA und der einfachen Struktur des Moleküls wird in diesen Süßstoff nur wenig Forschungsarbeit investiert.

6. Sucralose

Sucralose (4,1',6'-Trichlor-4,1',6'-tridesoxygalactosaccharose, TGS) **33** ist ein Trichlordisaccharid, das zur Zeit in Kanada und Australien als nichtnutritiver Süßstoff verwendet wird; die Zulassung für den US-amerikanischen Markt steht noch aus. Die Verbindung wurde bei der systematischen Synthese von Saccharosederivaten entdeckt. Man hatte herausgefunden, daß sich durch Substitution bestimmter Hydroxygruppen gegen ein Halogenatom die Süßkraft drastisch erhöht.^[100] Bei der Firma Tate and Lyle entschied man sich für die Weiterentwicklung von Sucralose.^[101, 102] In den USA ist es für McNeil Speciality (eine Tochterfirma von Johnson & Johnson) lizenziert. Sucralose ist 450–650mal süßer als Saccharose. Es hat einen angenehmen süßen Geschmack und gleicht sowohl hinsichtlich seiner Geschmacksqualität als auch seines Zeit/Intensitätsprofils sehr stark der Saccharose. Die synergistische Wirkung mit anderen nutritiven^[103] und nicht-nutritiven Süßstoffen^[104] ist mäßig. Die Verbindung ist in Wasser sehr gut löslich und über einen breiten pH- und Temperaturbereich stabil. Wird Sucralose aber bei höheren Temperaturen gelagert, so kann es zu Entfärbungen und zur Freisetzung von HCl kommen.^[105]

6.1. Chemische Synthesen

Die Synthese von TGS **33** erfordert eine Reihe von Reaktionsschritten zur selektiven Einführung und Abspaltung von Schutzgruppen, so daß die 4-Hydroxygruppe unter Konfigurationsumkehr gegen ein Chloratom ausgetauscht werden kann (Schema 13).^[102, 106] Außerdem muß zwischen den primären Hydroxygruppen der beiden Zuckerbausteine differenziert werden. Zunächst werden die beiden primären Hydroxygruppen mit der voluminösen Tritylgruppe geschützt und danach die sekundären Hydroxygruppen mit Acetanhydrid oder Acetylchlorid verestert.^[107] Durch Abspalten der Trityl-Schutzgruppen erhält man **34**, das in Isobutylmethylketon und Essigsäure unter Rückfluß auf 125 °C erhitzt wird. Unter diesen Bedingungen wandert die Acetylgruppe in der Glucoseeinheit von der C4-Position zur primären Hydroxygruppe. Mit diesem Schlüsselschritt der Synthese gelingt es, gleichzeitig die primäre Hydroxygruppe des Glucosebausteins für die nachfolgende Chlorierung zu schützen und die sekundäre OH-Gruppe an C4 selektiv zu entschützen. Durch Umsetzen mit Sulfurylchlorid werden die freien Hydroxygruppen substituiert, und aus dem entstandenen Trichlordisaccharid **35** erhält man nach Abspalten der Schutzgruppen Sucralose.^[108] Wegen der Konfigurationsinversion an C4 der Glucoseeinheit ist das gebildete Produkt eine Trichlorgalactosylfructose. Die Chlorierung wurde auch mit anderen Reagentien wie Phosgen oder Thionylchlorid in Gegenwart von Triphenylphosphanoxid oder -sulfid durchgeführt.^[109] Die Möglichkeit, Sucralose aus Saccharose-6-estern herzustellen, führte zu einer Reihe von chemischen und enzymatischen Synthesen für diese Verbindungen.^[110] Die chemischen Methoden beruhen auf der regioselektiven Spaltung eines 4,6-Orthoesters.^[111]



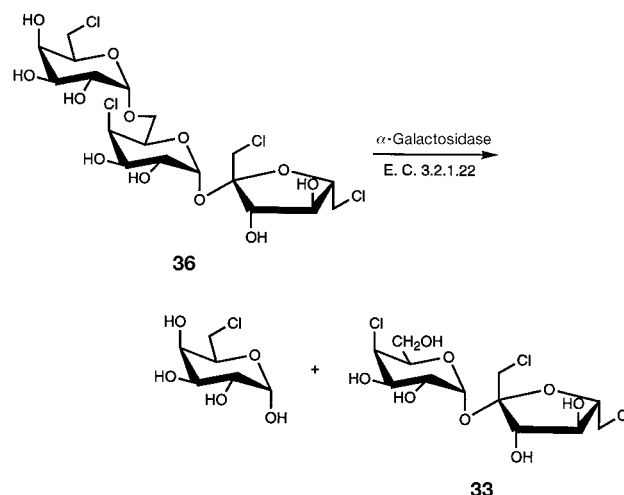
Schema 13. Synthese von TGS **33** aus Saccharose. Die 4-Hydroxygruppe wird durch chemische Umwandlungen selektiv entschützt. DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, Tr = Triphenylmethyl (Trityl).

6.2. Enzymatische Verfahren

Die chemische Synthese von Kohlenhydratderivaten ist im allgemeinen weitaus schwieriger als Reaktionen von Amino- oder Nucleinsäuren, weil eine Synthesemethode fehlt, bei der die stereochemische und regioselektive Kontrolle gewährleistet ist.^[112] Mit der Verwendung von Enzymen und Mikroben zur selektiven Funktionalisierung komplexer Moleküle lassen sich organische Synthesen erweitern, wie das wachsende Forschungsgebiet der Biokatalyse dokumentiert.^[113] Eine solche regio- und stereochemische Kontrolle ist bei der Synthese des synthetischen Süßstoffs Sucralose **33** erforderlich.

6.2.1. Trisaccharidspaltung

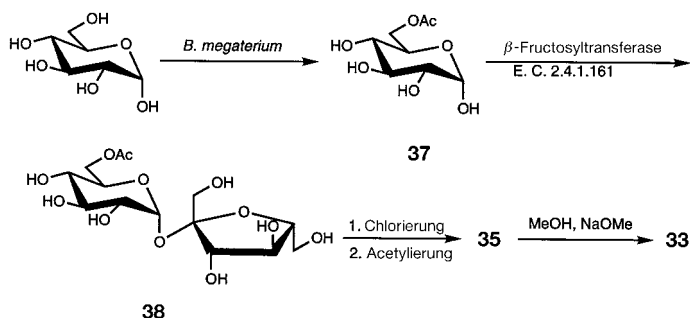
Bei diesem Verfahren entsteht aus dem Trisaccharid Raffinose (6-*O*- α -D-Galactopyranosylsaccharose) durch chemische Chlorierung mit Thionylchlorid in Gegenwart von Triphenylphosphan und Triphenylphosphanoxid zunächst Tetrachlorraffinose **36** (TCR, *O*- α -D-6-Chlor-6-desoxygalactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-4-chlor-4-desoxygalactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-1,6-dichlor-1,6-didesoxyfructofuranosid) (Schema 14). TCR wird als Heptaacetat isoliert, aus dem nach Hydrolyse der Estergruppen die 6-Chlor-6-desoxygalactosyleinheit enzymatisch mit einer α -Galactosidase aus der 6-Position unter Bildung von TGS **33** abgespalten wird.^[114, 115] Die hierfür verwendete α -Galactosidase (EC 3.2.1.22) wird auch bei der industriellen Verarbeitung von Zuckerrüben eingesetzt, wo sie die Zuckerproduktion durch Hydrolyse der Raffinose in Zuckerrübenmelasse unterstützt.^[116] Dieses käufliche Enzym stammt aus dem Pilzstamm *Mortierella vinacea* var. *raffinoseutilizer* (ATCC 20034), aber auch andere Pilzstämme mit dieser Aktivität, darunter *Circinella muscae*, *Absidia griseola* und *Aspergillus niger*, konnten isoliert werden.^[114] Die Ausbeuten für die Umwandlung von TCR **36** in TGS **33** betragen – abhängig von den Reaktionsbedingungen – 60–70 %.



Schema 14. Abspaltung von 6-Chlor-6-desoxygalactose durch enzymatische Hydrolyse mit einer α -Galactosidase.

6.2.2. Bioorganische Synthese^[117]

Auch ein anderes Herstellungsverfahren für TGS nutzt die Kombination chemischer und biokatalytischer Umwandlungen.^[118] Glucose wird von *Bacillus megaterium* in Glucose-6-acetat **37** mit einer maximalen Konzentration von 15 g L⁻¹ umgewandelt (Schema 15). Eine aus *Bacillus subtilis* gewon-

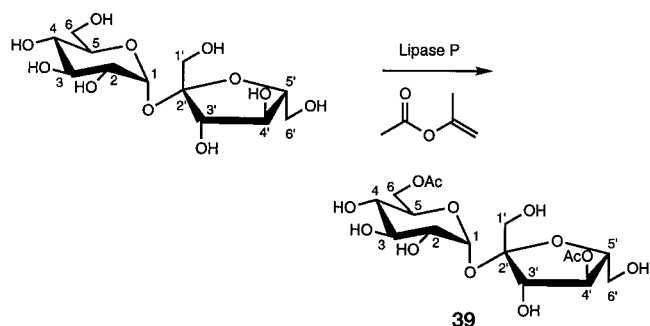


Schema 15. Synthese von TGS **33** aus Glucose durch eine Kombination chemischer und biochemischer Umsetzungen.

nene spezifische β -Fructosyltransferase (E. C. 2.4.1.161) bildet aus Saccharose als Fructosyldonor und **37** als Acceptor Saccharose-6-acetat **38** in Konzentrationen von maximal 120 g L^{-1} , was einer Ausbeute von 58 % entspricht. Die nachfolgende chemische Chlorierung und Acetylierung liefert in 39 % Ausbeute 4,1',6',6'-Trichlor-4,1',6'-tridesoxygalactosaccharosepentaacetat **35**, aus dem man durch chemische Esterseifung TGS **33** in 90 % Ausbeute erhält. Diese Synthesesequenz für TGS aus zwei biokatalytischen und zwei chemischen Reaktionsschritten zeigt, wie sich beide Ansätze erfolgreich zu einem Herstellungsprozeß verbinden lassen.^[119]

6.2.3. Regioselektive Acylierung:

Wie Klivanov diskutierte, sind regioselektive Reaktionen von Kohlenhydraten wegen der zahlreichen Hydroxygruppen chemisch besonders schwierig.^[120] Die Katalyse derartiger Umsetzungen durch Enzyme in organischen Lösungsmitteln ist gut untersucht und für den Syntheschemiker eine Alternative zu den komplizierten chemischen Reaktionen.^[121] Dordick et al. haben die enzymatische Herstellung der TGS-Vorstufe **39** aus Saccharose beschrieben (Schema 16).^[122] Dabei wurden die Hydroxygruppen an C4' und

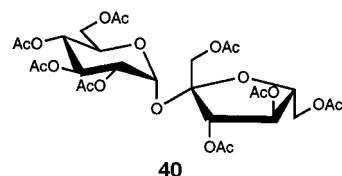


Schema 16. Regioselektive Acetylierung von Saccharose mit Isopropenylacetat zu 6,4'-Di-O-acetylsaccharose **39**.

C6 von Saccharose mit Isopropenylacetat und Lipase P (*Pseudomonas* sp.) der Firma Amano acetyliert. Die Chlorierung des Zwischenprodukts **39** liefert TGS **33**.

6.2.4. Regioselektive Desacylierung:

Palmer und Terradas sowie Bornemann et al. synthetisierten nach dieser Methode Vorstufen von TGS.^[123] Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, desacylieren ausgewählte Enzyme Saccharoseoctaacetat **40** unter spezifischen Reaktionsbedin-



gungen (organisches Lösungsmittel, pH-Wert) regioselektiv zu potentiellen Zwischenprodukten der TGS-Herstellung. Dazu gehören 2,3,4,6,1',3',6'-Heptaacetylsaccharose, 2,3,4,3',4'-Pentaacetylsaccharose und 2,3,6,3',4'-Pentaacetylsaccharose.

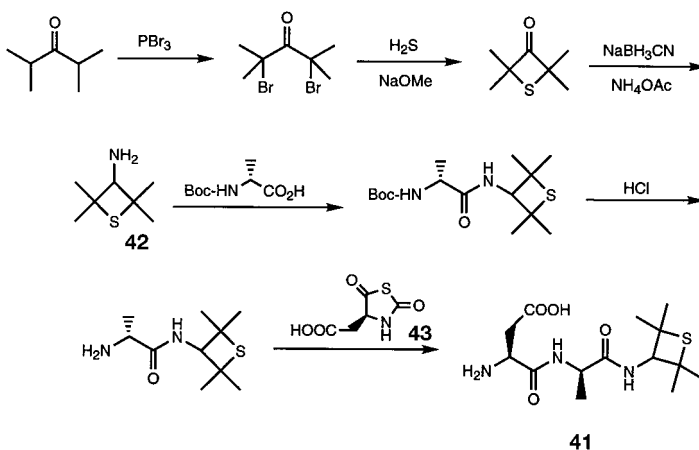
Tabelle 2. Regioselektivität der Desacetylierung von **40** mit ausgewählten Enzymen.^[123]

Enzym	Firma	Quelle	Positionen
Lipasen			
AY 30	Amano	<i>Candida cylindracea</i>	4', 1'
PPL	Sigma	Schweinepankreas	4'
AP12	Amano	<i>Aspergillus niger</i>	4, 6
SP-435	Novo	<i>Candida antarctica</i>	6', 1'
Proteasen			
Alcalase	Novo	<i>Bacillus licheniformis</i>	1', 6'
Proleather	Amano	<i>Bacillus subtilis</i>	1', 6'
Carbohydrasen (α -Galactosidase)	Amano	<i>Aspergillus niger</i>	4

7. Alitam

Alitam **41**, ein Süßstoff mit Nährwert, der sich von einem Dipeptid ableitet, wurde 1983 bei Pfizer im Rahmen gezielter Forschungen entdeckt.^[124–126] Es wird derzeit in Australien, China und Mexiko verwendet, die Zulassung in den USA ist beantragt. Alitam ist 2000mal süßer als Saccharose und ist angenehm süß ohne Nachgeschmack. Sein Zeit/Intensitäts-Profil gleicht dem von Aspartam, Alitam ist aber stabiler. Bei pH 2–4 ist seine Lebensdauer doppelt so hoch wie die von Aspartam. Alitam entwickelt in alkoholfreien Getränken gelegentlich einen Beigeschmack, der sich durch Zugabe von EDTA minimieren oder sogar ganz vermeiden läßt.^[127] Im Gemisch mit Saccharin tritt Geschmackssynergismus auf.

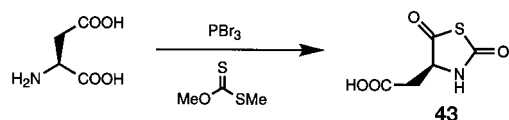
Alitam ist aus den Aminosäuren L-Asparaginsäure und D-Alanin und einer Tetramethylthietaneinheit aufgebaut. Bei der Synthese werden diese drei Bausteine durch konventionelle Techniken der Peptidkupplung miteinander verknüpft;^[125] dabei ist die Reihenfolge der Verknüpfung nicht entscheidend. Das Aminothietan **42** wird aus Diisopropylketon hergestellt (Schema 17): Durch Bromierung mit Phos-



Schema 17. Synthese von Alitam **41**.

phortribromid wird 2,4-Dibrom-2,4-dimethylpentan-3-on gebildet, das beim Behandeln mit Schwefelwasserstoff in Gegenwart von Natriummethoxid zu 2,2,4,4-Tetramethyl-3-oxothietan cyclisiert. Die reduktive Aminierung des Ketons mit Ammoniumacetat und Natriumcyanoborhydrid oder

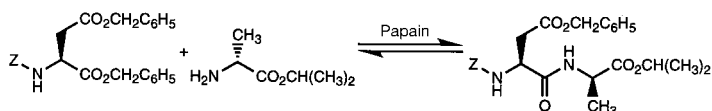
durch Erhitzen mit Formamid und Ameisensäure (Leuckart-Reduktion) liefert das Aminotetramethylthietan **42**. Dieser Baustein wird erst mit Boc-geschütztem D-Alanin und nach Abspalten der Schutzgruppe mit der aktivierten Asparagyl-einheit **43** verknüpft (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl). Schema 18 zeigt die Aktivierung von L-Asparaginsäure als Thiocarbonylsäureanhydrid **43**.^[124, 125, 128]



Schema 18. Synthese des Thiocarbonylsäureanhydrids **43** von L-Asparaginsäure.

7.1. Enzymatische Verfahren

Alitam wird in den meisten Fällen mit chemischen Methoden synthetisiert. Als Dipeptidamid bietet sich Alitam aber auch für enzymatische Peptidkupplungen an. So verwendeten Barbas und Wong das Enzym Papain zur Herstellung einer Alitam-Vorstufe (Schema 19).^[129] Im Anschluß an

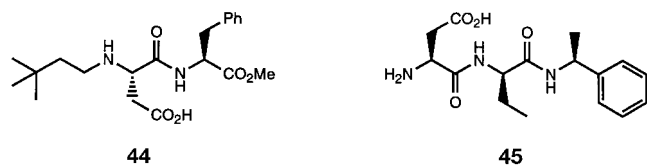


Schema 19. Verknüpfung von Dibenzyl-Z-L-aspartat mit D-Alaninisopropylester bei der Synthese von Alitam **41**.

die Peptidkupplung werden die Z- und die Benzylschutzgruppe hydrogenolytisch abgespalten; der resultierende Dipeptidester, L-Asp-D-Ala-(O*i*Pr), kann danach chemisch mit **42** zu Alitam verknüpft werden.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Zahlreiche Firmen und universitäre Arbeitsgruppen beschäftigen sich weiterhin mit der Suche nach neuen nicht-nutritiven synthetischen Süßstoffen und ihrer Entwicklung. Aus ökonomischen Gründen müssen die Verbindungen eine äußerst hohe Süßkraft (verglichen mit der von Saccharose) im Verhältnis zur Masse haben. Viele dieser Süßstoffe sind für die Verwendung in Handelsprodukten bisher nicht zugelassen, und ihre kommerzielle Entwicklung steht noch aus. Bei dieser potentiell neuen Generation von Süßstoffen findet sich eine Reihe von Funktionalitäten; unter den Verbindungen gibt es Dipeptidderivate wie **44** und **45**,^[130, 131] Guanidine^[132] und Harnstoffderivate.^[133] Bevor einer dieser Süßstoffe der



neuen Generation für den Gebrauch zugelassen wird, muß noch viel Arbeit geleistet werden. Dazu gehört auch die Entwicklung praktikabler Produktionsverfahren, wenngleich die Produktionsvolumina im Vergleich zu denen der oben besprochenen Süßstoffe dank der deutlich gesteigerten Süßkraft erheblich kleiner sind. Wegen der kleineren Volumina hat die Verbesserung von Produktionsverfahren für kleine Mengen auch geringere kommerzielle Auswirkungen.

Für einen dieser Süßstoffe der nächsten Generation, Neotam **44**, wurde von Monsanto bei der amerikanischen Gesundheitsbehörde die Zulassung beantragt. Diese Verbindung schmeckt etwa 8000mal süßer als Saccharose und hat einen reinen Süßgeschmack. Sie kann durch reduktive Alkylierung von Aspartam **1** hergestellt werden.^[131] Dieser neue Süßstoff ist anscheinend auch unter verschiedenen Bedingungen stabiler als **1**. Wegen dieser verbesserten Eigenschaften sowie des Kostenvorteils ist Neotam **44** vielversprechend als Süßstoff der nächsten Generation.

Eingegangen am 7. März 1997,
ergänzte Fassung am 6. März 1998 [A 216]
Übersetzt von Dr. Silke Gräf, Leverkusen

- [1] a) *Alternative Sweeteners* (Hrsg.: L. O. Nabors, R. C. Gelardi), Marcel Dekker, New York, **1986**; b) *Progress in Sweeteners* (Hrsg.: T. H. Grenby), Elsevier, London, **1989**.
- [2] *Aspartame: Physiology and Biochemistry* (Hrsg.: L. D. Stegink, L. J. Filer), Marcel Dekker, New York, **1984**.
- [3] S. K. McLaughlin, P. J. McKinnon, R. F. Margolskee, *Nature (London)* **1992**, 357, 563.
- [4] L. Ruiz-Avila, S. K. McLaughlin, D. Wildman, P. J. McKinnon, A. Robichon, N. Spickofsky, R. F. Margolskee, *Nature (London)* **1995**, 376, 80.
- [5] G. T. Wong, K. S. Gannon, R. F. Margolskee, *Nature (London)* **1996**, 381, 796.
- [6] B. J. Striem, U. Pace, U. Zehavi, M. Naim, D. Lancet, *Biochem. J.* **1989**, 260, 121.
- [7] S. J. Bernhardt, M. Naim, U. Zehavi, B. Lindemann, *J. Physiol.* **1996**, 490, 325.
- [8] T. A. Cummings, C. Daniels, S. C. Kinnamon, *J. Neurophysiol.* **1996**, 75, 1256.
- [9] D. E. Walters, G. E. DuBois, M. S. Kellogg in *Mechanisms of Taste Transduction* (Hrsg.: S. A. Simon, S. D. Roper), CRC, Orlando, FL, **1993**, S. 463.
- [10] B. T. Carr, S. D. Pecore, K. M. Gibes, G. E. DuBois in *Flavor Measurement* (Hrsg.: C.-T. Ho, C. H. Manley), Marcel Dekker, New York, **1993**, S. 219.
- [11] a) *Sweeteners: Discovery, Molecular Design, and Chemoreception* (Hrsg.: D. E. Walters, F. T. Orthoefer, G. E. DuBois), American Chemical Society, Washington, DC, **1991**; b) G. E. DuBois, D. E. Walters, S. S. Schiffman, Z. S. Warwick, B. J. Booth, S. D. Pecore, K. Gibes, B. T. Carr, L. M. Brands in Lit. [11 a], S. 261.
- [12] J. M. Schlatter (G. D. Searle and Co.), US-A 3492131, **1970**.
- [13] a) R. H. Mazur, J. A. Reuter, K. A. Swiatek, J. M. Schlatter, *J. Med. Chem.* **1973**, 16, 1284; b) R. H. Mazur, J. M. Schlatter, A. H. Goldkamp, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 2684.
- [14] R. H. Mazur, A. Ripper in *Developments in Sweeteners, Vol. 1* (Hrsg.: C. A. M. Hough, K. J. Parker, A. J. Vlitos), Applied Science, London, **1979**, S. 125.
- [15] a) J. B. Hill, H. L. Dryden (G. D. Searle and Co.), US-A 4440677, **1984** [*Chem. Abstr.* **1984**, 101, 38834]; b) J. B. Hill, H. L. Dryden (G. D. Searle and Co.), EP-B 130464 A1, **1985** [*Chem. Abstr.* **1985**, 103, 37737].
- [16] C.-P. Yang, C.-S. Su, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 5186.
- [17] a) G. L. Bachman, B. D. Vineyard (Monsanto Co.), US-A 4173562, **1979** [*Chem. Abstr.* **1980**, 92, 76929]; b) J. S. Tou, B. D. Vineyard,

- J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4982; c) J. S. Tou, B. D. Vineyard (Monsanto Co.), EP-B 221878 A2, **1987** [*Chem. Abstr.* **1987**, *107*, 176482].
- [18] Y. Ariyoshi, M. Nagano, N. Sato, A. Shimizu, J. Kirimura (Ajinomoto Co. Inc.), US-A 3786039, **1974**.
- [19] J. B. Hill, Y. Gelman (NutraSweet Co.), US-A 4946988, **1990** [*Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 123088].
- [20] W. H. J. Boesten (Stamcarbon B. V.), US-A 3879372, **1975**.
- [21] J. B. Hill, Y. Gelman, H. L. Dryden, R. Erickson, K. Hsu, M. R. Johnson (NutraSweet Co.), US-A 5053532, **1991** [*Chem. Abstr.* **1992**, *116*, 42071].
- [22] N. Uchiyama, N. Yasuda, T. Yamatani, Y. Ariyoshi, K. Toi, N. Sato (Ajinomoto Co. Inc.), US-A 3798206, **1974**.
- [23] K. Oyama, S. Irino, H. Hagi, *Methods Enzymol.* **1987**, *136*, 503.
- [24] K. Oyama in *Chirality in Industry* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, Chichester, **1992**, S. 237.
- [25] D. P. Pantaleone, R. N. Dikeman in *Science for the Food Industry of the 21st Century* (Hrsg.: M. Yalpani), ATL, Mt. Prospect, **1993**, S. 173.
- [26] a) K. Breddam, *Carlsberg Res. Commun.* **1986**, *51*, 83; b) S. Aasmul-Olsen, P. Thorbek, F. Widmer, S. Hansen (Carlsberg Biotechnology Ltd.), WO-B 9001555, **1990** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 55437].
- [27] a) A. D. Bennett (Celltech Ltd.), WO-B 8801650 A1, **1988** [*Chem. Abstr.* **1988**, *109*, 91273]; b) M. G. Boston, A. J. Poulouse (Genencor Inc.), EP-B 269390 A2, **1988** [*Chem. Abstr.* **1988**, *109*, 228773].
- [28] a) J. S. Fruton, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1982**, *53*, 239; b) I. M. Chaiken, A. Komoriya, M. Ohno, F. Widmer, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1982**, *7*, 385; c) H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Konnecke, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 85; d) W. Kullmann, *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC, Boca Raton, **1987**; e) P. Heiduschka, J. Dittrich, A. Barth, *Pharmazie* **1990**, *45*, 164; f) V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1440; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1437.
- [29] T. Takemoto, Y. Toshihide, N. Masao (Ajinomoto Co. Inc.), JP-B 62074296 A2, **1987** [*Chem. Abstr.* **1987**, *107*, 95611].
- [30] D. C. Ulmer, M. S. Rosendahl (Synthetech Inc.), US-A 4935355, **1990** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 130752].
- [31] Y. Isowa, M. Ohmori, T. Ichikawa, K. Mori, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 2611.
- [32] K. Nakanishi, T. Kamikubo, R. Matsuno, *Bio/Technology* **1985**, *3*, 459.
- [33] S. T. Chen, K. T. Wang, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4589.
- [34] a) J. J. Likos, G. I. Glover (Monsanto Co.), EP-B 149594 A2, **1985** [*Chem. Abstr.* **1985**, *103*, 138094]; b) D. R. Durham, *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 2277.
- [35] Y. Isowa, M. Ohmori, K. Mori, T. Ichikawa, Y. Nonaka, K. Kihara, K. Oyama, H. Satoh, S. Nishimura (Toyo Soda Manufacturing Co. Ltd. und Sagami Chemical Research Center), US-A 4165311, **1979**.
- [36] C. Fuganti, P. Grasselli, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3191.
- [37] I. B. Stoineva, B. P. Galunsky, V. S. Lozanov, I. P. Ivanov, D. D. Petkov, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1115.
- [38] T. Harade, S. Irino, Y. Kunisawa, K. Oyama (Holland Sweetener Co.) EP-B 768384 A1, **1997** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 316399].
- [39] K. Nakanishi, A. Takeuchi, R. Matsuno, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *32*, 633.
- [40] T. Nagayasu, M. Miyayama, T. Tanaka, T. Sakiyama, K. Nakanishi, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 1118.
- [41] M. Miyayama, T. Tanaka, T. Sakiyama, K. Nakanishi, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46*, 631.
- [42] G. A. Iacobucci (Coca-Cola Co.), US-A 5002871, **1991**.
- [43] G. A. Iacobucci, D. J. Brose, R. J. Ray, P. V. Eikeren (Coca-Cola Co.), US-A 5350681, **1994**.
- [44] R. A. Persichetti, N. L. S. Clair, J. P. Griffith, M. A. Navia, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2732.
- [45] M. P. Bemquerer, P. Adlercreutz, M. Tominaga, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 448.
- [46] a) K. H. Lee, P. M. Lee, Y. S. Siaw, K. Morihara, *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 779; b) K. H. Lee, P. M. Lee, Y. S. Siaw, K. Morihara, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1993**, *56*, 375.
- [47] a) D. Auriol, F. Paul, I. Yoshpe, J. C. Gripon, P. Monsan, *Biomed. Biochim. Acta* **1991**, *50*, 163; b) I. Yoshpe-Besancon, D. Auriol, F. Paul, P. Monsan, J. C. Gripon, B. Ribadeau-Dumas, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *211*, 105.
- [48] H. Nagao, T. Yoneya, T. Miyake, A. Aoyama, K.-I. Kai, S.-I. Kidokoro, Y. Miki, K. Endo, A. Wada (Sagami Chemical Research Center und Holland Sweetener Co.), US-A 5496710, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 283176].
- [49] K. Oyama in *Biocatalysis in Organic Media* (Hrsg.: C. Laane, J. Tramper, M. D. Lilly), Elsevier Science, Wageningen, Niederlande, **1986**, S. 209.
- [50] G. A. Homandberg, J. A. Mattis, M. Laskowski, *Biochemistry* **1978**, *17*, 5220.
- [51] A. T. Gross (W. R. Grace and Co.), US-A 5002872, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 181547].
- [52] K. S. Ahn, I. Y. Lee, I. H. Kim, Y. H. Park, S. B. Lee, *J. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *4*, 204.
- [53] J. B. Hill, S. O. Roczniak, (NutraSweet Co.), US-A 4892820, **1990** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 38836].
- [54] K.-A. Hwang, S. B. Lee, K. H. Lee, *Biotechnol. Lett.* **1995**, *17*, 71.
- [55] C. Bull, D. R. Durham, A. Gross, R. J. Kupper, J. F. Walter in *Biocatalytic Production of Amino Acids and Derivatives* (Hrsg.: J. D. Rozzell, F. Wagner), Wiley, New York, **1992**, S. 241.
- [56] a) A. B. Chmurny, A. T. Gross, R. J. Kupper, R. L. Roberts (W. R. Grace and Co.), US-A 4710583, **1987**; b) A. B. Chmurny, A. T. Gross, R. J. Kupper, R. L. Roberts (W. R. Grace and Co.), US-A 4810817, **1989**; c) A. B. Chmurny, A. T. Gross, R. J. Kupper, R. L. Roberts (W. R. Grace and Co.), US-A 4873359, **1989**.
- [57] A. A. Davino (G. D. Searle and Co.), US-A 4293648, **1981** [*Chem. Abstr.* **1982**, *96*, 20471].
- [58] S. Y. Choi, H. S. Kim, S. Y. Lee, R. M. Bock, *J. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *2*, 1.
- [59] a) J. G. Shewale, B. S. Deshpande, V. K. Sudhakaran, S. S. Ambedkar, *Process Biochem. Int.* **1990**, *25*, 97; b) H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 911.
- [60] B. S. Briggs, J. Milton, J. Zmijewski (Eli Lilly and Co.), US-A 5445959, **1995** [*Chem. Abstr.* **1995**, *123*, 250104].
- [61] M. T. Doel, M. Eaton, E. A. Cook, H. Lewis, T. Patel, N. H. Carey, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 4575.
- [62] T. Murata, S. Horinouchi, T. Beppu, *J. Biotechnol.* **1993**, *28*, 1993.
- [63] a) W. Chung, Y. M. Goo, *Arch. Pharmacol. Res.* **1988**, *11*, 139; b) A. Nakayama, Y. Torigoe (Showa Denko K. K.), JP-B 63185395 A2, **1988** [*Chem. Abstr.* **1989**, *110*, 37815]; c) J. Xu, W. Wu, S. Jin, W. Yao, *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* **1994**, *25*, 53 [*Chem. Abstr.* **1996**, *125*, 56323].
- [64] a) F. Paul, D. Auriol, P. Monsan, *Ann. NY Acad. Sci.* **1988**, *542*, 351; b) F. Paul, F. Duchiron, P. Monsan (Société Française Hoechst), US-A 4916062, **1990**.
- [65] a) K. Yokozeki, K. Kubota (Ajinomoto Co. Inc.), EP-B 124313 A2, **1984** [*Chem. Abstr.* **1985**, *102*, 60780]; b) Jpn. Kokai Tokkyo Koho (Ajinomoto Co. Inc.), JP-B 60062998 A2, **1985** [*Chem. Abstr.* **1986**, *103*, 121708]; c) K. Yokozeki, K. Kubota (Ajinomoto Co. Inc.), JP-B 61035797 A2, **1986** [*Chem. Abstr.* **1986**, *104*, 205536].
- [66] T. Harada, H. Takemoto, T. Igarashi (Toyo Soda Manufacturing Co. Ltd.), US-A 4506011, **1985**.
- [67] G. J. Walter, M. L. Mitchell in *Alternative Sweeteners* (Hrsg.: L. O. Nabors, R. C. Gelarde), Marcel Dekker, New York, **1986**, S. 15.
- [68] C. Fahlberg, I. Remsen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1879**, *12*, 469.
- [69] a) A. G. Renwick, *Food Chem. Toxicol.* **1985**, *23*, 429; b) A. G. Renwick, *Food Chem.* **1985**, *16*, 281; c) T. W. Sweatman, A. G. Renwick, C. D. Burgess, *Xenobiotica* **1981**, *11*, 531; d) W. A. Colburn, I. Bekersky, H. P. Blumenthal, *J. Clin. Pharmacol.* **1981**, *21*, 147.
- [70] M. V. Zubair, M. M. A. Hassan, *Anal. Profiles Drug Subst.* **1984**, *13*, 487.
- [71] D. S. Tarbell, A. T. Tarbell, *J. Chem. Educ.* **1978**, *55*, 161.
- [72] H. Cassebaum, M. Meyer, H. Higler, H. Herzberg, W. von der Ohe, J. Viehrig (VEB Fahlberg-List), DE-B 289264, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 91860].
- [73] L. F. Andrieth, M. Sveda, *J. Org. Chem.* **1944**, *9*, 89.
- [74] a) F. Huba, R. G. Banner (Diamond Shamrock Corp.), US-A 3899501, **1975** [*Chem. Abstr.* **1976**, *84*, 17323]; b) C. Chen, D. Gao, M. Deng, G. Ye (VR China), CN-B 85101615, **1985** [*Chem. Abstr.* **1987**, *107*, 39800].

- [75] a) J. Hlavaty, V. Bakos, J. Volke, *J. Appl. Electrochem.* **1987**, *17*, 1228; b) B. Müller, D. Spengler, S. Engelmann, L. Schröder, H. Matschiner (VEB Fahlberg-List), DE-B 237 682, **1986** [*Chem. Abstr.* **1987**, *106*, 102 274]; c) B. Müller, D. Spengler, H. Matschiner, A. Müller, H. Herzberg, C. Stöckel, S. Engelmann, G. Timme (VEB Fahlberg-List), DE-B 248 611, **1987** [*Chem. Abstr.* **1988**, *108*, 175 954].
- [76] P. Mounier (Societes des Usines Chimique Rhone-Poulenc), FR-B 2086 539, **1972** [*Chem. Abstr.* **1972**, *77*, 88 489].
- [77] Toray Industries, JP-B 59055 877, **1984** [*Chem. Abstr.* **1984**, *101*, 110 907].
- [78] W. Koike, T. Kimoto, S. Matsui (Ihara Chemicals Co. Ltd.), DE-B 261 6612, **1977** [*Chem. Abstr.* **1977**, *86*, 171 108].
- [79] P. Tonne, H. Jaedicke (BASF AG), EP-B 52 750, **1982** [*Chem. Abstr.* **1982**, *97*, 182 396].
- [80] Anonymus, *Chem. Eng.* **1954**, *61*, 128.
- [81] K. Clauß, H. Jensen (Hoechst AG), DE-B 2001 017, **1971** [*Chem. Abstr.* **1971**, *75*, 129 843].
- [82] K. Clauß, H. Jensen, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 119.
- [83] G. W. von Rymon Lipinski, *Food Sci. Technol.* **1991**, *47*, 1.
- [84] K. Clauß, H. Jensen, *Angew. Chem.* **1973**, *85*, 965; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1973**, *12*, 869.
- [85] a) G. W. von Rymon Lipinski in *Alternative Sweeteners* (Hrsg.: L. O. Nabors, R. C. Gelarde), Marcel Dekker, New York, **1986**, S. 89; b) G. W. von Rymon Lipinski, *Food Sci. Technol.* **1991**, *48*, 11.
- [86] a) D. G. Mayer, F. H. Kemper, *Acesulfam-K*, Marcel Dekker, New York, **1991**; b) G. W. von Rymon Lipinski, *Food Sci. Technol.* **1986**, *17*, 89; c) G. W. von Rymon Lipinski, *Food Chem.* **1985**, *16*, 259.
- [87] K. Clauß, H.-J. Friedrich, H. Jensen, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1974**, *4*, 561.
- [88] a) K. Clauß, H. Pietsch, E. Schmidt, H. Jensen (Hoechst AG), DE-B 2434 564, **1976** [*Chem. Abstr.* **1976**, *84*, 135 729]; b) J. Sander, K. Clauß, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 138; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 131.
- [89] K. Clauß, E. Schmidt, H. Pietsch, H. Jensen (Hoechst AG), DE-B 2434 549, **1976** [*Chem. Abstr.* **1976**, *84*, 180 307].
- [90] a) K. Clauß, H. Schnabel, H. Jensen (Hoechst AG), DE-B 2327 804, **1975** [*Chem. Abstr.* **1975**, *82*, 171 097]; b) K. Clauß, H. Jensen (Hoechst AG), DE-B 2264 235, **1975** [*Chem. Abstr.* **1975**, *83*, 433 89].
- [91] H. Pietsch, K. Clauß, H. Jensen, E. Schmidt (Hoechst AG), DE-B 2453 063, **1977** [*Chem. Abstr.* **1977**, *86*, 105 973].
- [92] A. H. Linkies, D. B. Reuschling (Hoechst AG), US-A 4618 545, **1986** [*Chem. Abstr.* **1986**, *104*, 50 570].
- [93] A. H. Linkies, D. B. Reuschling, *Synthesis* **1990**, 405.
- [94] D. B. Reuschling, A. H. Linkies, W. Reimann, O. Schweikert, K. E. Mack (Hoechst AG), DE-B 3531 359 A1, **1987** [*Chem. Abstr.* **1987**, *107*, 23 367].
- [95] a) G. Roscher, H. Litterer, A. Engelmann, W. D. Kaufmann, B. Laugwitz, H. D. Schnabel (Hoechst AG), WO-B 93 19055 A1, **1993** [*Chem. Abstr.* **1994**, *120*, 245 170]; b) D. B. Reuschling, A. H. Linkies, W. Reimann, O. Schweikert, K. E. Mack, W. Ebertz (Hoechst AG), DE-B 3531 358 A1, **1987** [*Chem. Abstr.* **1987**, *107*, 134 331]; c) E. Weber, P. Eckhardt, D. B. Reuschling, A. H. Linkies (Hoechst AG), DE-B 3531 357 A1, **1987** [*Chem. Abstr.* **1987**, *107*, 39 866]; d) J. Schütz, O. Schweikert (Hoechst AG), DE-B 3527 070 A1, **1987** [*Chem. Abstr.* **1987**, *106*, 176 428].
- [96] E. Schmidt (Hoechst AG), K. Clauß, US-A 4625 024, **1986** [*Chem. Abstr.* **1986**, *105*, 242 81].
- [97] L. F. Andrieth, M. Sveda (E. I. du Pont de Nemours), US-A 22, 75 125, **1942**.
- [98] R. W. Kasperon, N. Primach in *Alternative Sweeteners*, (Hrsg.: L. O. Nabors, R. C. Gelarde), Marcel Dekker, New York, **1986**, S. 71.
- [99] a) H. S. McQuaid, D. J. Loder (E. I. du Pont de Nemours), US-A 2804 472, **1957**; b) D. Mueller, R. Trefzer (Ciba), US-A 3060 231, **1962**; c) O. G. Birsten, J. Rosin (Baldwin-Montrose Chemical Co.), US-A 3366 670, **1968** [*Chem. Abstr.* **1968**, *69*, 35 561]; d) M. Frifelder, B. Meltsner (Abbott Labs.), US-A 3194 833, **1965**.
- [100] a) L. Hough, S. P. Phadnis, *Nature (London)* **1976**, *263*, 500; b) L. Hough, *Chem. Soc. Rev.* **1985**, *14*, 357.
- [101] a) M. R. Jenner, D. Waite (Talres Development), US-A 4343 934, **1982**; b) L. Hough, S. P. Phadnis, R. A. Khan (Tate and Lyle plc), US-A 4435 440, **1984**; c) M. R. Jenner in Lit. [11 a], S. 68.
- [102] M. R. Jenner, D. Waite, G. Jackson, J. C. Williams (Talres Development), US-A 4362 869, **1982**.
- [103] P. K. Beyts, D. W. Lillard, C. K. Batterman (Tate and Lyle plc), US-A 5380 541, **1995**.
- [104] P. K. Beyts, Z. Latymer (Tate and Lyle plc), US-A 4495 170, **1985**.
- [105] G. Jackson (Tate and Lyle plc), GB-B 2169 601 A1, **1986**.
- [106] P. H. Fairclough, L. Hough, A. R. Richardson, *Carbohydr. Res.* **1975**, *40*, 285.
- [107] G. H. Sankey, N. J. Homer (Tate and Lyle plc), EP-B 260 978 A2, **1988** [*Chem. Abstr.* **1988**, *109*, 110 843].
- [108] a) G. Jackson, M. R. Jenner, D. Waite, J. C. Williams (Tate and Lyle plc), GB-B 2065 648 A, **1980**; b) W. Tully, N. M. Vernon, P. A. Walsh (McNeilab Inc.), EP-B 220 907 A2, **1987** [*Chem. Abstr.* **1988**, *108*, 22 207].
- [109] a) E. A. O'Brien, T. O'Conner, M. R. J. Tuite, L. High (McNeilab Inc.), GB-B 2182 039 A1, **1987** [*Chem. Abstr.* **1988**, *108*, 187 199]; b) R. A. Khan, G. H. Sankey, P. J. Simpson, N. M. Vernon (Tate and Lyle plc), GB-B 2222 827 A1, **1990** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 152 966]; c) N. J. Homer, G. Jackson, G. H. Sankey, P. J. Simpson (Tate and Lyle plc), EP-B 354 050 A2, **1990** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 59 767].
- [110] a) R. E. Walkup, J. L. Navia, N. M. Vernon (Noramco Inc.), US-A 4980 463, **1990** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 72 137]; b) J. Mentech (Beghin-Say S. A.), EP-B 356 304 A2, **1990** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 41 216].
- [111] a) A. R. Khan, K. Smith, A. Pelter, J. Zhao (Tate and Lyle plc), GB-B 2255 975 A1, **1992** [*Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 147 978]; b) G. H. Sankey (Tate and Lyle plc), EP-B 515 145 A1, **1992** [*Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 102 393]; c) P. J. Simpson (Tate and Lyle plc), US-A 4889 928, **1989** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 67 39]; d) P. J. Simpson (Tate and Lyle plc), EP-B 260 979 A2, **1988** [*Chem. Abstr.* **1988**, *109*, 110 844].
- [112] a) R. L. Halcomb, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 694; b) K. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503.
- [113] a) *Chirality in Industry* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, Chichester, **1992**; b) C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Vol. 12*, Elsevier, Oxford, **1994**.
- [114] E. B. Rathbone, K. S. Mufti, R. A. Khan, P. S. J. Cheetham, A. J. Hacking, J. S. Dordick (Tate and Lyle plc), US-A 4826 962, **1989**.
- [115] C. Bennett, J. S. Dordick, A. J. Hacking, P. S. J. Cheetham, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 211.
- [116] J. C. Linden, *Enzyme Microb. Technol.* **1982**, *4*, 130.
- [117] E. B. Rathbone, A. J. Hacking, P. S. J. Cheetham (Tate and Lyle plc), US-A 4617 269, **1986**.
- [118] J. D. Jones, A. J. Hacking, P. S. J. Cheetham, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 203.
- [119] J. L. Navia, R. E. Walkup, N. M. Vernon, D. S. Nelditch (McNeil-PPC, Inc.), US-A 5498 709, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 343 978].
- [120] A. M. Klivanov, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 114.
- [121] a) M. Therisod, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5638; b) Y.-F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C.-H. Wong, *ibid.* **1988**, *110*, 7200; c) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, **1995**, S. 294.
- [122] a) J. S. Dordick, A. J. Hacking, R. A. Khan (Tate and Lyle plc), US-A 5128 248, **1992**; b) J. S. Dordick, A. J. Hacking, R. A. Khan (Tate and Lyle plc), US-A 5270 460, **1993**.
- [123] a) D. C. Palmer, F. Terradas, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1673; b) D. C. Palmer, F. Terradas (McNeil-PPC, Inc.), US-A 5445 951, **1995** [*Chem. Abstr.* **1995**, *123*, 254 704]; c) S. Bornemann, J. M. Cassells, C. L. Combes, J. S. Dordick, A. J. Hacking (Tate and Lyle plc), US-A 5141 860, **1992**.
- [124] T. M. Brennan, M. E. Hendrick (Pfizer Inc.), US-A 4411 925, **1983** [*Chem. Abstr.* **1984**, *101*, 22 238].
- [125] C. Sklavounos (Pfizer Inc.), US-A 4375 430, **1983** [*Chem. Abstr.* **1983**, *99*, 6056].
- [126] R. C. Glowaky, M. E. Hendrick, R. E. Smiles, A. Torres in Lit. [11 a], S. 57.
- [127] R. C. Glowaky, C. Sklavounos, A. Torres (Pfizer Inc.), EP-B 038 693 A2, **1993**.
- [128] a) F. J. Vinick, S. Jung, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 1315; b) F. J. Vinick (Pfizer Inc.), US-A 4256 897, **1981** [*Chem. Abstr.* **1981**, *95*, 43 658].

- [129] C. F. Barbas III, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 533.
- [130] a) G. A. King, J. G. Sweeney, *Org. Prep. Proced. Int.* **1997**, 29, 177; b) J. G. Sweeney, L. L. D'Angelo, E. A. Ricks, G. A. Iacobucci, *J. Agric. Food. Chem.* **1995**, 43, 1969; c) L. L. D'Angelo, J. D. Sweeney (Coca-Cola Co.), US-A 5286509, **1994**; d) W. H. J. Boesten, B. H. N. Dassen, J. C. S. Kleinjans, B. van Aken, S. van der Wal, N. K. de Vries, H. E. Schoemaker, E. M. Meijer, *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 154; e) G. A. King, J. G. Sweeney, G. A. Iacobucci, *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 52; f) J. M. Janusz (Proctor and Gamble Co.), US-A 4692512, **1987** [*Chem. Abstr.* **1990**, 112, 117612]; g) Y. Yuasa, A. Nagakura, H. Tsuruta, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 6891; h) L. A. Palova, T. V. Komarova, Y. A. Davidovich, S. Rogozhin, *Russ. Chem. Rev.* **1981**, 50, 316; i) C. Nofre, J.-M. Tinti (Université Claude Bernard, Lyon), FR-B 2719592 A1, **1995** [*Chem. Abstr.* **1996**, 124, 233167]; j) C. Nofre, J.-M. Tinti (Université Claude Bernard, Lyon), EP-B 321368 A1, **1989** [*Chem. Abstr.* **1990**, 112, 77962]; k) R.-H. Mattern, Y. Amino, E. Bennedetti, M. Goodman, *J. Peptide Res.* **1997**, 50, 286.
- [131] a) C. Nofre, J.-M. Tinti (Université Claude Bernard, Lyon), *World Patent*, WO 9729122, **1997**; b) C. Nofre, J.-M. Tinti (Université Claude Bernard, Lyon), *World Patent*, WO 9530688 A1, **1995**.
- [132] a) J.-M. Tinti, C. Nofre in Lit.[11 a], S. 88; b) C. Nofre, J.-M. Tinti (Université Claude Bernard, Lyon), US-A 4921939, **1990** [*Chem. Abstr.* **1991**, 114, 23559]; c) C. Nofre, J.-M. Tinti, F. Chatzopoulos-Ouar (Université Claude Bernard, Lyon), EP-B 241395 A2, **1987** [*Chem. Abstr.* **1988**, 109, 190047]; d) C. Nofre, J.-M. Tinti (Université Claude Bernard, Lyon), EP-B 195731 A2, **1986** [*Chem. Abstr.* **1987**, 107, 7604].
- [133] a) J.-M. Tinti, C. Nofre, *Flavor Foods* **1996**, 77; b) C. Nofre, J.-M. Tinti (Université Claude Bernard, Lyon), WO-B 9622971 A1, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, 125, 222441]; c) C. Nofre, J.-M. Tinti (Université Claude Bernard, Lyon), EP-B 511087 A1, **1992** [*Chem. Abstr.* **1993**, 118, 37899].