

19. Die Stellung der Brenztraubensäure in der Biosynthese der Carotinoide

von E. C. Grob, R. Büttler und V. Grundbacher.

(14. XII. 55.)

Einleitung.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit¹⁾ haben wir, auf Grund bisher gewonnener experimenteller Ergebnisse, einen möglichen Weg der Carotinbildung bei *Mucor hiemalis* Wehmer diskutiert. Aus der Art und Weise, wie die C-Atome der dem Pilz als C-Quelle verabreichten Essigsäure in der β -Carotinmolekel eingebaut werden²⁾, vermuten wir, dass die Essigsäure als Acetyl-Coenzym A über Acetoacetyl-Coenzym A in β -Methylcrotonsäure umgewandelt werde. In gleicher Richtung weist auch die carotinfördernde Wirkung der Pantothersäure³⁾. Die β -Methylcrotonsäure ist ja schon früher von verschiedenen Seiten als eine mögliche C₅-Vorstufe der nach dem Isoprenbauprinzip aufgebauten Naturstoffe angesprochen worden.

Die Essigsäure bzw. das Na-Acetat ist aber für *Mucor hiemalis* nicht die normale C-Quelle. Gewöhnlich verwendet man Glucose, die übrigens auch eine bessere Entwicklung des Pilzes gewährleistet als Na-Acetat. Der auf Glucose gewachsene *Mucor hiemalis* bildet ebenfalls recht beträchtliche Mengen Carotinoide.

Beim Kohlenhydratabbau in lebenden Organismen wird als Zwischenprodukt die Brenztraubensäure gebildet, welche ja bekanntlich im Kohlenhydratstoffwechsel eine wichtige Schlüsselstellung einnimmt. Die Annahme, dass auch bei *Mucor hiemalis* die entstandene Brenztraubensäure in Essigsäure bzw. Acetyl-Coenzym A umgewandelt werde, liegt recht nahe. Somit könnte auch die Brenztraubensäure beim Aufbau der Carotinoide Verwendung finden. Die Umwandlung der Brenztraubensäure in Essigsäure kann im lebenden Organismus auf verschiedenen Wegen erfolgen. So einmal auf direktem Wege, durch oxydative Decarboxylierung, oder aber auch auf dem Umweg über den Krebs'schen Cyclus. Im letzteren Falle wird die Brenztraubensäure nach dem untenstehenden, vereinfachten Schema in Citronensäure überführt, wobei die letztere in Gegenwart von Coenzym A, wie J. R. Stern et al.⁴⁾ gezeigt haben, Acetyl-Coenzym A abspalten kann und der Rest, die Oxallessigsäure, erneut in den Cyclus eingreift.

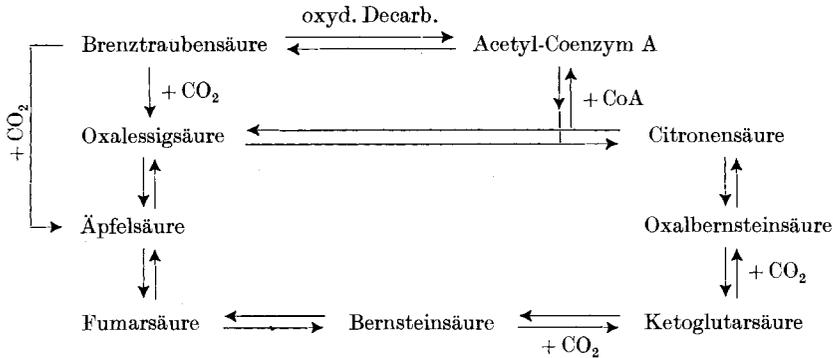
¹⁾ E. C. Grob & R. Büttler, *Experientia* **11**, 259 (1955).

²⁾ E. C. Grob & R. Büttler, a) *Experientia* **10**, 250 (1954); b) *Helv.* **37**, 1908 (1954); c) *Helv.* **38**, 1313 (1955).

³⁾ E. C. Grob, V. Grundbacher & W. H. Schopfer, *Experientia* **10**, 378 (1954).

⁴⁾ J. R. Stern, B. Shapiro, E. R. Stadtman & S. Ochora, *J. biol. Chemistry* **193**, 703 (1951).

Vereinfachtes Schema der Acetyl-A-Bildung.



Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass die carotinogene Wirkung der Citronensäure⁵⁾ auf der Bildung von Acetyl-Coenzym A beruht. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Untersuchungen, die sich auf die Rolle der Brenztraubensäure als Vorstufe bei der Carotinbildung beziehen. Einer späteren Mitteilung bleibt es vorbehalten, die Möglichkeiten der Umwandlung Brenztraubensäure-Acetyl-Coenzym A eingehender zu besprechen.

Die Hemmung der Carotinoidbildung bei auf Glucose-Nährlösung gezüchtetem *Mucor hiemalis* durch Natriumfluorid.

Durch NaF wird die Bildung der Brenztraubensäure beim Kohlenhydratabbau gehindert, indem NaF das Enzym Enolase, welches die Umwandlung von 2-Phosphoglycerinsäure in Phosphoenolbrenztraubensäure besorgt, ausserordentlich stark hemmt. In der Tat lassen sich in den wachsenden Kulturen von *Mucor hiemalis*, die durch NaF gehemmt worden sind, bedeutend kleinere Mengen Brenztraubensäure nachweisen als in den ungehemmten Kulturen, wie Tab. 1 zeigt.

Tabelle 1.

	4. Tag	6. Tag	10. Tag
Ungehemmte Kulturen . .	0,51 mg	0,59 mg	0,11 mg BTS/g T.G.
Gehemmte Kulturen . . .	0,24 mg	0,12 mg	0,048 mg BTS/g T.G.

BTS = Brenztraubensäure; T.G. = Trockengewicht des Pilzes.

Falls die Brenztraubensäure wirklich Vorstufe der Essigsäure bzw. des Acetyl-Coenzym A ist, muss der Ausfall an Brenztraubensäure durch NaF-Hemmung auch einen Ausfall an Acetyl-Coenzym A nach sich ziehen. Ein Ausfall an letzterem muss dann auch zu einer Herabsetzung der Carotinproduktion des Organismus führen. Wie die Tab. 2a zeigt, entsprechen die experimentellen Ergebnisse genau den

⁵⁾ W. H. Schopfer & E. C. Grob, *Experientia* 6, 419 (1950).

Erwartungen. Zusatz steigender Mengen NaF zur Nährlösung hat einen rapiden Abfall des β -Carotingehaltes im Pilzkörper zur Folge. (Die in der Tab. angegebenen Werte sind Durchschnittswerte, die aus 4 Versuchen zu je 3 Kulturen erhalten wurden.) Wie man aus Tab. 3a entnehmen kann, wird das Trockengewicht pro Kultur durch die zugesetzten Mengen NaF nicht wesentlich beeinflusst.

Wird nun an Stelle der Glucose Na-Acetat als C-Quelle eingesetzt, so sollte nach dem oben Gesagten die Carotinbildung durch NaF nicht beeinflusst werden, sofern der Hemmstoff nicht ein anderes Enzymsystem der Carotinbildung betrifft. Wie Tab. 2b zeigt, liess sich dies ebenfalls durch das Experiment bestätigen. Auch wird in diesem Falle durch NaF die Entwicklung des Pilzes nicht beeinflusst (Tab. 3b).

Tabelle 2.

Nährlösung	Kultur-dauer	Kontrolle	NaF-Zusatz pro 25 cm ³ Nährlösung			
			5 · 10 ⁻⁵	1 · 10 ⁻⁴	2 · 10 ⁻⁴	5 · 10 ⁻⁴ M
a) Glucose	8 Tage	101,7	87,4	51,8	16,0	8,6 γ Carotin/g
		100%	86%	51%	15,8%	8,5%
	14 Tage	84,8	71,7	37,3	12,0	8,7 γ Carotin/g
		100%	85%	44%	14%	10%
b) Na-Acetat	8 Tage	111,5	126,3	103,3	104,1	104,5 γ Carotin/g
		100%	113%	90%	91%	91%
	14 Tage	232,2	126,3	239,8	247,8	241,1 γ Carotin/g
		100%	102%	103%	107%	104%

Tabelle 3.

Nährlösung	Kultur-dauer	Kontrolle	NaF-Zusatz pro 25 cm ³ Nährlösung			
			5 · 10 ⁻⁵	1 · 10 ⁻⁴	2 · 10 ⁻⁴	5 · 10 ⁻⁴ M
a) Glucose	8 Tage	17,2	16,3	18,7	18,7	10,3 mg T.G.
	14 Tage	21,9	19,2	18,1	18,8	9,6 mg T.G.
b) Na-Acetat	8 Tage	23,5	26,2	21,0	22,8	23,3 mg T.G.
	14 Tage	35,2	37,1	36,8	36,2	37,1 mg T.G.

Die Wirkung von Brenztraubensäure auf die durch NaF gehemmten Kulturen von *Mucor hiemalis*.

Wenn unsere Annahme, dass die Brenztraubensäure die Vorstufe der für die Biosynthese benötigten Essigsäure bzw. Acetyl-Coenzym A sei, zutrifft, so muss in den NaF-gehemmten Kulturen die Carotinbildung wieder einsetzen, sobald die fehlende Brenztraubensäure ersetzt wird, z. B. durch Zugabe in die Nährlösung. Aus der Tab. 4 ist ersichtlich, in welchem Masse die der Nährlösung zugesetzte Brenztraubensäure die Carotinbildung zu fördern vermag. Schon nach

4 Tagen stellen wir in den mit Brenztraubensäure versehenen Kulturen, die mit NaF gehemmt waren, die 6fache Menge des β -Carotins fest, das in der gleichen Zeit von den gehemmten Kulturen ohne Brenztraubensäure gebildet worden ist. Am 6. Tag übersteigt der Carotingehalt der gehemmten Kulturen mit Brenztraubensäurezusatz sogar den Gehalt der ungehemmten Kontroll-Kulturen. In der graphischen Darstellung von Fig. 1 sind alle aufgetragenen Carotinwerte in Prozenten der entsprechenden Werte der ungehemmten Kontroll-Kulturen (= 100 %) ausgedrückt.

Tabelle 4.

	Zeit	Kontrollen ohne NaF	Kontrollen + $5 \cdot 10^{-3}$ NaF	Kulturen + $5 \cdot 10^{-3}$ M NaF/Kultur		
				+ 0,1%	+ 0,5%	+ 1,0% Na-Pyruvat
Carotin T.G.	4 T.	112,8 8,9	14,99 7,4	92,7 7,8	88,3 9,7	55,9 γ /g T.G. 7,2 mg/Kultur
Carotin T.G.	6 T.	148,5 12,4	21,7 13,0	128,4 12,6	154,7 16,2	136,4 γ /g T.G. 14,4 mg/Kultur
Carotin T.G.	8 T.	171,3 14,1	16,8 16,3	136,3 15,7	171,3 18,4	170,4 γ /g T.G. 17,4 mg/Kultur
Carotin T.G.	10 T.	150,5 17,2	13,5 17,4	139,0 15,1	191,3 22,6	190,1 γ /g T.G. 20,0 mg/Kultur
Carotin T.G.	12 T.	123,3 16,2	11,8 19,5	159,9 15,7	198,5 17,0	210,0 γ /g T.G. 15,4 mg/Kultur
Carotin T.G.	14 T.	98,9 20,6	7,3 19,7	145,5 18,1	210,9 24,5	234,5 γ /g T.G. 24,5 mg/Kultur

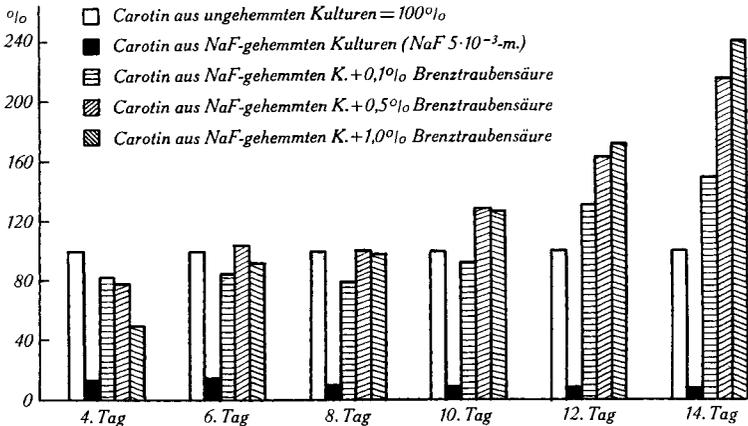


Fig. 1.

Einfluss der Brenztraubensäure auf die Carotinbildung.

Im weiteren haben wir festzustellen versucht, nach welcher Zeitdauer sich die Wirkung der Brenztraubensäure bemerkbar macht. Zu diesem Zwecke haben wir die gehemmten Kulturen sich 5 Tage ohne Brenztraubensäure-Zusatz entwickeln lassen; am 5. Tage sind dann je Kultur 1% Brenztraubensäure (als Na-Pyruvat) zugesetzt worden. In den Kulturen wurde nach bestimmten Zeiten (erstmal 4 Std.) nach dem Brenztraubensäurezusatz das im Pilzkörper gebildete Carotin quantitativ bestimmt. Die Mittelwerte aus 4 Versuchsreihen sind in Tab. 5a zusammengestellt. Analoge Versuche sind auch mit Essigsäure durchgeführt worden (Tab. 5b). Beim Versuch mit Brenztraubensäure beobachten wir schon nach 8 Std. eine deutliche Wirkung der Brenztraubensäure; ähnlich sind die Verhältnisse auch beim Versuch mit Essigsäure.

Tabelle 5.

Zeit nach Zusatz von Na-Pyruvat bzw. Na-Acetat	a) Versuch mit Brenztraubensäure		b) Versuch mit Essigsäure	
	Kontr. gehemmt	+ 1% Na-Pyr.	Kontr. gehemmt	+ 1% Acetat
4 Std.	29,8 γ 100%	30,3 γ 100%	32,14 γ 106%	29,0 γ 91%
8 Std.	27,5 γ 100%	33,2 γ 120%	31,3 γ 100%	35,4 γ 115%
14 Std.	22,7 γ 100%	32,0 γ 141%	31,4 γ 100%	29,7 γ 95%
18 Std.	31,9 γ 100%	34,7 γ 108%	33,1 γ 100%	35,4 γ 107%
24 Std.	27,2 γ 100%	41,2 γ 152%	29,0 γ 100%	37,0 γ 128%
38 Std.	32,2 γ 100%	39,6 γ 123%	22,8 γ 100%	37,0 γ 165%
42 Std.	28,5 γ 100%	40,0 γ 140%	22,8 γ 100%	36,0 γ 158%

Die hier mitgeteilten Versuche zeigen, dass bei der Verwendung von Glucose als C-Quelle die Carotinbildung bei *Mucor hiemalis* nur dann möglich ist, wenn Brenztraubensäure gebildet wird. Ist die Brenztraubensäurebildung gehemmt, so hat dies eine Hemmung der Carotinbildung zur Folge. Bei Zusatz der fehlenden Brenztraubensäure kommt die Carotinbildung erneut in Gang. Die Brenztraubensäure kann dabei durch Essigsäure vollständig ersetzt werden. Wir schliessen aus diesen Ergebnissen, dass die Brenztraubensäure wohl als Vorstufe der Carotinoide anzusprechen ist und aller Wahrscheinlichkeit nach in Acetyl-Coenzym A umgewandelt wird.

Experimenteller Teil.

1. Kulturbedingungen für *Mucor hiemalis*: Der Pilz wird in *Erlenmeyer*-Kolben zu 150 cm³ auf je 25 cm³ Nährlösung bei 20° gezüchtet. Nährlösung 1% Glucose, 0,107% Ammoniumsulfat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,15% sek. Kaliumphosphat.

2. Die Bestimmung der Brenztraubensäure im Pilzmycel: Der getrocknete Pilzkörper wird in der 20fachen Menge 80-proz. siedendem Alkohol mit wenig Quarzsand fein zerrieben. Nach dem Zerreiben wird das Sieden noch 3 Min. fortgesetzt. Nach Filtration des Gemisches wird der Alkohol im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in 10 cm³ Wasser aufgenommen und mit 5 cm³ 2,4-Dinitrophenylhydrazin (gesättigte Lösung in 2-n. HCl) versetzt. Nach 30 Min. Reaktion bei Zimmertemperatur und im Dunkeln wird das gebildete Hydrazon zweimal mit je 2 cm³ Essigester extrahiert; hernach wird die Essigesterlösung auf 5 cm³ ergänzt. Ein aliquoter Teil dieser Lösung wird auf *Whatman*-Papier Nr. 1 aufgetragen und mit an 4-proz. Ammoniaklösung gesättigtem n-Butanol 14 Std. bei 20° aufsteigend chromatographiert. Die dem 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Brenztraubensäure entsprechenden gelben Flecken werden nach dem Trocknen ausgeschnitten und in feine Schnitzel zerteilt, welche zweimal mit je 2 cm³ 0,2-m. NaHCO₃-Lösung extrahiert werden; letztere Lösung wird auf genau 5 cm³ gebracht. Aus ihrer bei 380 m μ abgelesenen Extinktion wird die absolute Menge Brenztraubensäure mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt. Zur Aufnahme der Eichkurve werden eingewogene Mengen reinsten Na-Pyruvates in der beschriebenen Weise in 2,4-Dinitrophenylhydrazon überführt; an den resultierenden Lösungen sind dann ebenfalls die Extinktionen bestimmt worden.

3. Carotinbestimmung: In der durch erschöpfende Extraktion des Pilzmycels mit Petroläther erhaltenen Lösung ist das Gesamt-Carotin als β -Carotin im *Beckman*-Spektrophotometer bei 482 m μ bestimmt worden.

Dem *Schweiz. Nationalfonds* danken wir für die Unterstützung dieser Arbeiten.

Zusammenfassung.

Es wird die Rolle der Brenztraubensäure bei der Biosynthese der Carotinoide bei *Mucor hiemalis* *Wehmer* abgeklärt. Bei einer Hemmung der Brenztraubensäurebildung aus Glucose (C-Quelle des Pilzes) durch NaF wird auch die Carotinbildung stark gehemmt; durch Zusatz von Brenztraubensäure zu den Kulturen kann der Ausfall an aus Glucose entstehender Brenztraubensäure wettgemacht werden. Die Brenztraubensäure kann auch durch Essigsäure ersetzt werden, woraus geschlossen werden kann, dass eine Umwandlung Brenztraubensäure-Essigsäure stattfindet.

Botanisches Institut der Universität Bern.
