

EINBAU VON [^{14}C]-ESSIGSÄURE IN HOPFENBITTERSTOFFE*

FRIEDRICH DRAWERT und JOHANNES BEIER

Institut für Chemisch-technische Analyse und chemische Lebensmitteltechnologie der
Technischen Universität München, D-8050 Freising-Weihenstephan, Germany

(Received 30 March 1974)

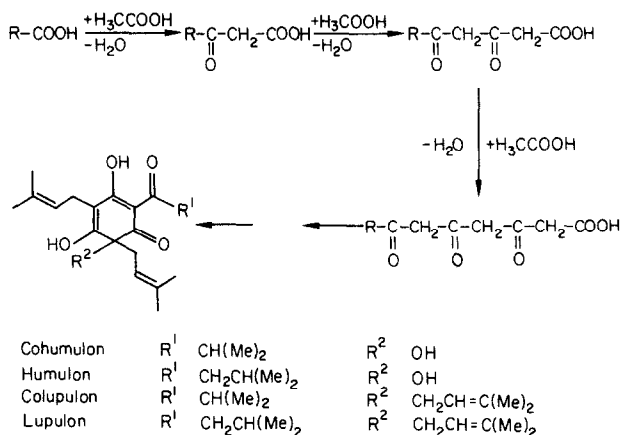
Key Word Index—*Humulus lupulus*, Cannabidaceae, hop bitter compounds, biosynthesis; humulone, lupulone

Abstract—Labeled acetic acids are incorporated by hops into desoxycohumulone, desoxyhumulone, humulone, colupulone and lupulone. The incorporation of acetic acid is considered in relation to the mixed isoprenoid-polyketide origin of these bitter principles.

Zusammenfassung—Radioaktiv markierte Essigsäuren werden von der Hopfenpflanze (*Humulus lupulus*) in Desoxycohumulon, Desoxyhumulon, Humulon, Colupulon und Lupulon eingebaut. Der Einbau der Essigsäuren wird in Zusammenhang mit der Terpen- und Polyketid-Biosynthese gebracht.

EINLEITUNG

WIE IN einer vorausgehenden Arbeit¹ gezeigt wird, werden der Hopfenpflanze angebotene Isobuttersäure bzw. Isovaleriansäure in die Co-Verbindungen (Desoxycohumulon, Cohumulon, Colupulon) bzw. Stammverbindungen (Desoxyhumulon, Humulon, Lupulon) der Hopfenbitterstoffe eingebaut. Dadurch wird die Hypothese gestützt, daß die Biosynthese der Hopfenbitterstoffe über eine Kondensation der die Acylseitenkette bildenden Carbonsäure mit Acetateinheiten verläuft. Dabei lassen sich die ersten Schritte der Biosynthese schematisch folgendermaßen darstellen (Abb. 1).



SCHEMA. 1 SCHEMA FÜR DIE ERSTEN SCHRITTE DER BIOSYNTHESE DER HOPFENBITTERSTOFFE

* IV Mitteilung in der Serie "Über die Biosynthese der Hopfenbitterstoffe III Mitteilung DRAWERT, F und BEIER, J. *Phytochem* im Druck. Auszug aus der Dissertation von J. Beier, T. U. München 1973.

¹ DRAWERT, F. und BEIER, J., *Phytochemistry* im Druck.

TABELLE 1 EINBAU VON $[^{14}\text{C}]$ -ESSIGSAURE IN HOPFENINHALTSSTOFFE REAKTIONS-RADIO-GASCHROMATOGRAPHIE DES METHANOL-EXTRAKTS

No	Verbindung	1- $[^{14}\text{C}]$ -	Einbau (%) 2- $[^{14}\text{C}]$ -	U- $[^{14}\text{C}]$ -
1	Essigsäure	1,9	0,5	1,3
2	Propionsäure	<0,5	<0,5	<0,5
3	Isobutyrylessigsäure	<0,5		—
4	*	0,7	<0,5	—
5	*	1,6	1,5	<0,5
6	*	<0,5		<0,5
7	Tetradecansäure	<0,5	<0,5	<0,5
8	Hexadecansäure	1,5	1,6	1,4
9	Octadecansäure	4,7	4,9	4,0
10	Eicosansäure	1,3	2,5	1,4
11	*	<0,5	<0,5	
12	Saccharose†	6,6	2,2	4,3
13	Squalen†			
14	*	<0,5	<0,5	—
15	Sitosterin	<0,5	<0,5	—
16	*	<0,5	<0,5	—
17	*	<0,5		

* Nicht identifiziert

† Die Aktivitäts-Peaks sind schlecht aufgelöst, im Pentan-Extrakt ist aber nur noch der Peak von Squalen vorhanden

— Nicht nachweisbar

Nachfolgend wird gezeigt, daß radioaktiv markierte Essigsäuren im Sinne dieses Schemas in Hopfenbitterstoffe eingebaut werden

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Einbauversuche mit 1- $[^{14}\text{C}]$ -, 2- $[^{14}\text{C}]$ - und U- $[^{14}\text{C}]$ -Essigsäure sind tabellarisch wiedergegeben (Methanol-Extrakt; Tab. 1) Es zeigt sich, daß Essigsäure in eine Reihe von Fettsäuren eingebaut wird Tetradecan-, Hexadecan-, Octadecan- und

TABELLE 2 EINBAU VON $[^{14}\text{C}]$ -ESSIGSAURE IN HOPFENINHALTSSTOFFE REAKTIONS-RADIO-GASCHROMATOGRAPHIE DES PENTAN-EXTRAKTS

No	Verbindung	1- $[^{14}\text{C}]$ -	Einbau (%) 2- $[^{14}\text{C}]$ -	U- $[^{14}\text{C}]$ -
1	Hexadecansäure	0,9	1,0	0,6
2	Octadecansäure	1,4	1,8	1,5
3	Desoxycohumulon	<0,5	<0,5	<0,5
4	Desoxyhumulon	<0,5	<0,5	<0,5
5	Eicosansäure	0,5	<0,5	<0,5
6	Humulon	<0,5	<0,5	—
7	*	<0,5		—
8	Colupulon	<0,5	<0,5	<0,5
9	Lupulon	<0,5	<0,5	<0,5
10	*	<0,5		—
11	Squalen	0,5	0,6	<0,5
12	*	<0,5	<0,5	
13	*	<0,5		
14	*	<0,5	<0,5	<0,5
15	Sitosterin	<0,5	<0,5	<0,5

* Nicht identifiziert

— Nicht nachweisbar

Eicosansäure. Neben Aktivitäten in der eingesetzten Essigsäure finden wir auch die Propionsäure markiert. In der Terpen- bzw. Steroid-Fraktion ist Essigsäure in Squalen bzw. Sitosterin incorporiert worden. Ein Teil der eingesetzten Aktivität befindet sich in Saccharose und in einem Fall ergibt sich, daß Essigsäure in Isobutyrylessigsäure eingebaut wurde.

Die Pentanextrakte dieser Versuchsreihen (Tab. 2) beweisen neben dem Einbau von Essigsäure in Hexadecan-, Octadecan-, Eicosansäure, Squalen und β -Sitosterin, daß Essigsäure als Precursor für Desoxycohumulon, Desoxyhumulon, Humulon, Colupulon und Lupulon dient.

DISKUSSION

Radioaktiv markiertes Cohumulon läßt sich bei diesen Versuchen nicht nachweisen, da trotz des zur Reaktions-Radio-Gaschromatographie verwendeten Allglassystems² bereits ein Teil dieser Verbindung verharzt und sich so dem Nachweis entzieht.³ Humulon ist dagegen als radioaktiver Peak nachweisbar, da die untersuchte Hopfensorte weit mehr Humulon als Cohumulon enthält.⁴

Der Einbau von [^{14}C]-Essigsäure in Desoxycohumulon, Desoxyhumulon, Humulon, Colupulon und Lupulon kann entweder in den Kern oder in die terpenoide Seitenkette oder in beide erfolgen. Da diese beiden Strukturmerkmale allen Bitterstoffen gemein sind (Abb. 1), war ein spezifischer Einbau von Essigsäure, der zwischen den beiden Einbaumöglichkeiten unterscheidet, nicht zu erwarten. Der Einbau von Essigsäure in die 3-Methylbuten-2-yl-(3,3-Dimethylallyl-, Prenyl-)Gruppe der Bitterstoffe sollte auf dem für die Biosynthese der Terpene obligatorischen Weg erfolgen, der ausgehend von Essigsäure über Acetessigsäure, 3-Hydroxy-3-methyl-glutarsäure, Mevalonsäure, Isopentenylpyrophosphat und 3,3-Dimethylallylpyrophosphat^{5,6} verläuft. Daß dieser Terpenbiosyntheseweg in *Humulus lupulus* funktioniert, nehmen wir aufgrund des Einbaues von [^{14}C]-Essigsäure in das Triterpen Squalen und das Phytosterin Sitosterin an. Wie wir anhand von Einbauversuchen mit [^{14}C]-Mevalonsäurelacton zeigen werden,⁷ ist die genannte Verbindung ein besserer Precursor für die Terpenbiosynthese (etwa 10 mal höherer Einbau z. B. in Squalen) als Essigsäure, so daß wir daraus schließen, daß der Einbau von aus [^{14}C]-Essigsäure stammender Aktivität in Hopfenbitterstoffe nicht allein von der Prenyl-seitenkette herrühren kann. Die Incorporation von Essigsäure in den Sechsring der Hopfenbitterstoffe kann über Polyketide, wie sie in Abb. 1 dargestellt sind, erfolgen. Die Idee, daß phenolische Substanzen durch Kondensation von Essigsäuremolekülen und anschließende Cyclisierung des intermediär anzunehmenden Polyketids entstehen können, wurde bereits um die Jahrhundertwende von Collie aufgrund von präparativen Arbeiten geäußert^{8,9} und von Birch und Donovan¹⁰ anhand einer Vielzahl von Verbindungen spezifiziert und hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Entstehung von Phloroglucin- bzw. Orcin-Strukturen aus Polyketiden durch Claisen- bzw. Aldol-Kondensation diskutiert. Den ersten experimentellen Beweis für die Richtigkeit der Polyketid-Hypothese lieferten ebenfalls Birch und

² DRAWERT, F und BEIER, J (1974) *Chromatographia* **7**, 273

³ SHANNON, P V R, LLOYD, R O V und CAHILL, D M (1969) *J Inst Brewing* **75**, 376

⁴ HOWARD, G A und TATCHELL, A R (1957) *J Inst Brewing* **63**, 138

⁵ WRIGHT, L D (1961) *Ann Rev Biochem* **30**, 525

⁶ CLAYTON, R B (1965) *Quart Rev* **19**, 168

⁷ DRAWERT, F und BEIER, J im Druck

⁸ COLLIE, J N (1893) *J Chem Soc* **63**, 329

⁹ COLLIE, J N (1907) *J Chem Soc* **91**, 1806

¹⁰ BIRCH, A J und DONOVAN, F W (1953) *Aust J Chem* **6**, 360

Mitarbeiter.¹¹ Sie konnten mit 1-[¹⁴C]-Acetat zeigen, daß die von *Penicillium griseofulvum*-Kulturen gebildete 2-Hydroxy-6-methyl-benzoesäure (6-Methyl-salicylsäure) durch Kopf-Schwanz-Kondensation von 4 Acetat-Einheiten. Reduktion der Carbonyl-Funktion am C-Atom 5 und Cyclisierung zwischen C-2 und C-7 entstanden war.

Was die Bedeutung der Essigsäure als Baustein des Sechsringes der Hopfenbitterstoffe betrifft, so kann uns das Auffinden der Isobutyrylessigsäure als Hinweis dienen. Wie wir zeigen konnten wird in Isobutyrylessigsäure neben [¹⁴C]-Essigsäure (Tab. 1) auch [¹⁴C]-Isobuttersäure¹ eingebaut, woraus wir schließen, daß diese β -Ketosaure durch Kondensation von Isobuttersäure mit Essigsäure entsteht (Abb. 1). Auf dem weiteren Biosyntheseweg sollten dann aus dieser Verbindung Desoxycohumulon, Cohumulon und Colupulon entstehen. Den Einbau von Isobuttersäure in die genannten Verbindungen haben wir bereits beschrieben, die Incorporation von Essigsäure in Desoxycohumulon und Colupulon ist in Tab. 2 angegeben. Ferner nehmen wir an, daß Desoxyhumulon, Humulon und Lupulon analog gebildet werden, was aufgrund des Einbaus von Essigsäure und Isovaleriansäure in diese Verbindungen nahelegt; der Nachweis einer Isovalerylessigsäure ist uns allerdings nicht gelungen. Daß diese Annahme zutrifft, ist durch eine Untersuchung von Wright und Howard¹² abgesichert worden. Sie studierten den Einbau von 1-[¹⁴C]-Acetat in Humulon und stellten fest, daß der Ring des Humulons *ca.* 62%, jede Prenylgruppe *ca.* 16% und der Isovalerylrest *ca.* 6% des incorporierten [¹⁴C]-enthält. Im übrigen ist dieses Ergebnis im Einklang mit unserem Vorschlag, daß Essigsäure auch in die Prenylgruppen der Hopfenbitterstoffe eingebaut wird.

TABELLE 3 RADIOAKTIV MARKIERTE ESSIGSÄUREN

Substanz	Spezifische Aktivität (μ Ci/mmol)	Zugef. Akt (μ Ci)	Aufg. Akt (μ Ci)	Versuchsdauer (Std.)	Datum
1-[¹⁴ C]-HOAc	62	250	250	8	27.8.72
2-[¹⁴ C]-HOAc	56	250	250	8	27.8.72
11-[¹⁴ C]-HOAc	57	250	250	8	31.8.72

Eine weitere Stütze für die Rolle der Essigsäure als Baustein des Sechsringes der Bitterstoffe sehen wir darin, wie noch ausführlich mitgeteilt werden wird, daß die Bildung des Kernes auf keinem anderen möglichen Biosyntheseweg erfolgt, insbesondere nicht auf dem Shikimisäureweg. Neben dem Nachweis der Isobutyrylessigsäure spricht noch ein Grund dafür, daß die ersten Schritte der Biosynthese der Hopfenbitterstoffe nach dem in Abb. 1 skizzierten Schema ablaufen. Möglicherweise konnten nacheinander 3 Moleküle Essigsäure untereinander reagieren, die nach der Cyclisierung zu Phloroglucin zur Isovaleryl- bzw. Isobutyryl-Verbindung acyliert werden. In diesem Fall hätten wir radioaktiv markiertes Phloroglucin nachweisen müssen, da wir diese Verbindung aber nicht finden konnten, spricht dies für die in Abb. 1 angeführte Reaktionsfolge. Eine weitere Stütze der vorgeschlagenen Reaktionsfolge ergibt sich aus Untersuchungen von Watkin und Neish,¹³ wonach [¹⁴C]-Phloroglucin nicht als Precursor für Quercetin dient und demzufolge keiner Acylierung unterliegt.

¹¹ BIRCH, A. J., MASSY-WILSTROPP, R. A. und MOYE, C. I. (1955) *Aust. J. Chem.* **8**, 539.

¹² WRIGHT, D. und HOWARD, G. A. (1961) *J. Inst. Brewing* **67**, 236.

¹³ NEISH, A. C. (1964) in: *Biochemistry of Phenolic Compounds* (HARRISON, I. B. ed.), p. 341. Academic Press, London, 341.

EXPERIMENTELLES

Die Applikation der in Tab. 3 aufgeführten [^{14}C]-markierten Essigsäuren in Form der wässrigen Lösung ihrer Natriumsalze erfolgte über die Schnittfläche von doldentragenden Hopfentrieben. Nach Exposition stellte man einen Methanolextrakt her, aus dem die Hopfenwachse entfernt wurden. Ein Teil des zur Trockene eingedampften Methanolextraktes wurde mit Dimethylformamid/Hexamethyldisilazan in die für die Reaktions-Radio-Gaschromatographie geeigneten Trimethylsilyl-derivate übergeführt. Nachdem aus einem anderen Teil des zur Trockene eingedampften Methanolextraktes ein Pentanextrakt hergestellt worden war, trocknete und trimethylsilylierte man diesen ebenfalls. Die hier nur skizzierte Methodik ist von uns bereits ausführlich beschrieben worden.²