

ZUR BIOGENESE DES SECHSRINGES DER HOPFENBITTERSTOFFE*

FRIEDRICH DRAWERT und JOHANNES BEIER

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

(Received 27 March 1976)

Key Word Index—*Humulus lupulus*, hop bitter compounds; biosynthesis.

Abstract—The metabolisms of glucose, fructose, shikimate, phenylalanine, tyrosine and myoinositol in *Humulus lupulus* (hop) were studied. The results of these investigations lend support to the hypothesis, that the formation of the six membered ring of the hop bitter compounds proceeds via polyketides but not via shikimate.

EINLEITUNG

Mit den Arbeiten von Davies [1] und Katagiri [2] über die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren aus Kohlenhydraten bei Pilzen und Bakterien ist die Rolle der Shikimisäure als obligatorisches Zwischenprodukt dieser Biosynthese bewiesen worden; der selbe Weg konnte auch in höheren Pflanzen [3] nachgewiesen werden. In der Folge stellte sich heraus, daß Shikimisäure nicht nur für diese Aminosäuren als Vorstufe dient, sondern für eine ganze Reihe von aromatischen Verbindungen [4–6], so daß der Shikimisäureweg als einer der wichtigsten Wege zur Biosynthese aromatischer Substanzen erkannt wurde.

Eine andere Möglichkeit [7] diskutiert wurde, nimmt als Zwischenstufe der Biosynthese von phenolischen Verbindungen aus Kohlenhydraten den myo-Inositol an. Die Biogenese von Phloroglucin- bzw. Orcin-Strukturen erfolgt über Polyketide, die zu den genannten Strukturtypen cyclisieren [8,9]. Aufgrund von Einbauversuchen mit radioaktiv markierter Essigsäure wurde vorgeschlagen, daß die Biogenese der Hopfenbitterstoffe über Polyketide erfolgt [10,11], die durch Kondensation der die Acylseitenkette bildenden Carbonsäure mit Acetat-einheiten gebildet werden [12]. Um diesen Biosyntheseweg weiter abzusichern, untersuchten wir, ob die Bildung des Sechsringes der Hopfenbitterstoffe über den Shikimisäureweg möglich ist.

ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Fragestellung applizierten wir Hopfenfrieben die in Tabelle 1 aufgeführten radioaktiv markierten Verbindungen.

Applikation, Extraktion, Vortrennung, Derivatisierung und reaktions-radio-gaschromatographische Analyse in einem Allglassystem sind bereits beschrieben worden [13]. Der Einbau der in Tabelle 1 genannten radioaktiv markierten Verbindungen in Hopfeninhaltsstoffe wurde anhand der Methanol-Extrakte [13] bestimmt, die Ergebnisse werden in den Tabellen 2–4 mitgeteilt. Die

* 6. Mitteilung in der Serie "Über die Biosynthese der Hopfenbitterstoffe". 5. Mitteilung Drawert, F. und Beier, J. (1976) *Phytochemistry* 15,

Tabelle 1. Applizierte radioaktiv markierte Verbindungen

Versuch†	Substanz	Spezifische Aktivität (µCi/mMol)	Aufgenommene Aktivität (µCi)
1	U- ¹⁴ C-D-Glucose	120–150	100
2	U- ¹⁴ C-D-Glucose	2,9	122
3	U- ¹⁴ C-D-Glucose	2,9	116
4	U- ¹⁴ C-D-Fructose	2,9	164
5	U- ¹⁴ C-D-Fructose	2,9	53
6	G- ¹⁴ C-Shikimisäure	1,86	50
7	U- ¹⁴ C-L-3-Phenylalanin	10	244
8	U- ¹⁴ C-L-Tyrosin*	150–180	100
9	2- ³ H-myo-Inositol	2840	897

* Pflanze war ca. 2 Stunden nach Versuchsbeginn verwelkt.

† Versuchsdauer 8 hr.

Tabelle 2. Einbau von U-¹⁴C-D-Glucose in Hopfeninhaltsstoffe (Methanol-Extrakt)

Verbindung	Einbau (%) Versuch		
	1	2	3
*	<0,5	—	—
*	<0,5	<0,5	—
*	<0,5	—	—
D-Fructose	4,7	3,0	0,9
*	1,9	1,2	<0,5
α-D-Glucose	5,0	5,9	1,4
*	1,6	—	—
β-D-Glucose	6,7	8,8	2,2
*	<0,5	—	—
*	<0,5	—	—
Saccharose	66,1	67,6	32,8
*	<0,5	<0,5	<0,5

—: Nicht nachweisbar; *: nicht identifiziert.

Tabelle 3. Einbau von U-¹⁴C-D-Fructose in Hopfeninhaltsstoffe (Methanol-Extrakt)

Verbindung	Einbau (%) Versuch	
	4	5
*	<0,5	—
D-Fructose	7,7	2,9
*	2,9	<0,5
α-D-Glucose	2,8	<0,5
β-D-Glucose	2,1	<0,5
Saccharose	51,3	25,0

—: Nicht nachweisbar; *: nicht identifiziert.

Tabelle 4. Einbau von G-¹⁴C-Shikimisäure, U-¹⁴C-L-3-Phenylalanin und U-¹⁴C-L-Tyrosin in Hopfeninhaltsstoffe (Methanol-Extrakt)

Verbindung	Einbau (%)		
	6	Versuch 7	8
*	—	2,0	—
Essigsäure	—	1,3	—
L-3-Phenylalanin†	—	16,6	—
L-3-Phenylalanin‡	—	8,4	—
Shikimisäure	70,3	—	—
*	—	4,8	—
*	—	—	<0,5
*	—	—	<0,5
Saccharose	1,4	—	—

—: Nicht nachweisbar; *: nicht identifiziert; †: O-TMS-Derivat von L-3-Phenylalanin; ‡: N,O-Bis-(TMS)-Derivat von L-3-Phenylalanin.

Pentan-Extrakte dieser Versuche ergeben Radiogramme, die nur sehr geringe Radioaktivität aufweisen.

Bei der Applikation von 2-³H-myo-Inosit zeigt sich, daß diese Verbindung fast keine Veränderung durch die pflanzlichen Enzymsysteme erfährt, d.h. die Hauptmenge der angebotenen Aktivität wird in myo-Inosit wiedergefunden. Sonst befindet sich nur noch ein Peak auf dem Radiogramm, dessen V_R^{rel} -Wert größer als der von Saccharose ist und der einen Einbau unter 0,5% besitzt.

DISKUSSION

Wie aus den Tabellen 2–4 hervorgeht, werden weder Glucose und Fructose noch Shikimisäure und Phenylalanin in Hopfenbitterstoffe eingebaut. Dies bedeutet, daß die Shikimisäure keine entscheidende Rolle als Precursor für die Biogenese des Sechsrings der Hopfenbitterstoffe spielen kann. Da myo-Inosit von der Hopfenpflanze kaum metabolisiert wird—ein Einbau als Gerüst des Sechsrings der Bitterstoffe wäre nicht nachweisbar, da es sich bei dem applizierten myo-Inosit um die 2-³H-Verbindung handelt—nehmen wir an, daß auch diese Verbindung nicht als Vorstufe in Frage kommt. Darin sehen wir eine weitere Stütze für die Annahme, daß die Biogenese des Kernes bei Humulonen und Lupulonen auf dem eingangs erwähnten dritten Weg über Polyketide erfolgt.

EXPERIMENTELLES

Methodik und Messung der Radioaktivität sind bereits beschrieben worden [13]. Bei den Versuchen mit Glucose und Fructose konnte zur Identifizierung der gaschromatogra-

Tabelle 5. Trennsäulen für die Kopplung GC-MS

Trennsäulen	TS 1		TS 2
	SE-30	Dünnschicht-Kapillare (SCOT)*	DC-550
Stationäre Phase	Dünnschicht-Kapillare*	Dünnschicht-Kapillare (SCOT)*	DC-550
Typ	100	15	—
Länge (m)	100	15	—
Innendurchmesser (mm)	0,25	—	—
Durchfluß ml He/min	1	3	—
Anfangstemperatur (°)	80	60	—
Endtemperatur (°)	250	140	—
Temperatur-Programm (°/min)	4	4	—

* Hersteller: Fa. Perkin-Elmer, Überlingen.

phischen Peaks die Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometer benutzt werden. Gerät: Varian-MAT CH 7 (Fa. Varian-MAT, Bremen). Das Massenspektrometer war über einen einstufigen Heliumseparator nach Watson und Bieman mit einem Gaschromatographen Varian Aerograph Modell 1201 gekoppelt. Die Temperatur des Helium-Separators und der Verbindungsstücke betrug 250°. Der Einspritzblock hatte ebenfalls eine Temperatur von 250°. Die getrennten Komponenten wurden durch den Totalionenstrom registriert (abgenommen von den Backen des Eintrittspaltes vor Trennstrecke am Analysatorteil des Massenspektrometers). Massendurchlauf: Masse 20-600 in 5-6 sec. Ionisierungsenergie: 70 ev. Auflösungsvermögen: 1500 (Tal) Die Massenspektren wurden mit einem Oscilloport der Fa. Siemens, Karlsruhe, aufgenommen. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der Massenspektren von Proben und Testsubstanzen. Für die Kopplung wurden die Trennsäulen TS 1 und TS 2 verwendet (vgl. Tab 5).

LITERATUR

1. Davies, B. D. (1955) *Adv. Enzymol.* **16**, 247.
2. Katagiri, M. (1953) *J. Biochem.* **40**, 629.
3. Mitsuhashi, S. und Davies, B. D. (1954) *Biochem. Biophys. Acta*, **15**, 54.
4. Weygand, F. und Wendt, H. (1959) *Z. Naturforsch.* **14b**, 42.
5. Underhill, E. W., Watkin, J. E. und Neish, A. C. (1957) *Can. J. Biochem. Physiol.* **35**, 219.
6. Eberhardt, G. und Schubert, W. J. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2835.
7. Birch, A. J., Donovan, F. W. und Moewus, F. (1953) *Nature (London)* **172**, 902.
8. Birch, A. J. und Donovan, F. W. (1953) *Australian J. Chem.* **6**, 360.
9. Birch, A. J., Massy-Westropp, R. A. und Moye, C. J. (1955) *Australian J. Chem.* **8**, 539.
10. Wright, D. und Howard, G. A. (1961) *J. Inst. Brew.* **67**, 236.
11. Drawert, F. und Beier, J. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2749.
12. Drawert, F. und Beier, J. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2149.
13. Drawert, F. und Beier, J. (1974) *Chromatographia* **7**, 273.