

## AMINOSÄUREN ALS VORSTUFE DER ACYLSEITENKETTE DER HOPFENBITTERSTOFFE\*

FRIEDRICH DRAWERT und JOHANNES BEIER

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

(Received 10 April 1976)

Key Word Index—*Humulus lupulus*; hop bitter compounds; biosynthesis; acyl residue; amino acids.

**Abstract**—In *Humulus lupulus*, leucine undergoes transamination, and incorporation into desoxyhumulone and lupulone. We therefore propose that leucine is the precursor for the isovaleryl residue of the hop bitter compounds; the same appears to be true for valine and isoleucine as precursors for the isobutyryl and 2-methyl butyryl residues.

### EINLEITUNG

Untersuchungen über das Verhalten von Aminosäuren während der Entwicklung und Reifung der Hopfendolde zeigten, daß einige Aminosäuren einer bestimmten Dynamik unterliegen [1]. So nehmen die freien Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin ca 13 Tage nach der Blüte des Hopfens ab. Der Abfall der Aminosäuren fällt in die Stoffwechselphase, in der die Dolde erstmals Bitterstoffe synthetisiert. Strukturell leiten sich von den obengenannten Aminosäuren die Isobutyryl-(Co-), Isovaleryl- und 2-Methyl-butyryl (Ad-)Komponenten von Desoxyhumulonen, Humulonen und Lupulonen ab. Mori [1] zog daraus den Schluß, daß die Transaminierungsprodukte der drei Aminosäuren als Acylseitenkette der genannten Bitterstoffe auftreten.

Daraufhin untersuchte Mori [2] den Einbau von G-<sup>14</sup>C-L-Leucin in die Gesamtharz-, Weichharz- und  $\alpha$ -Säure-Fraktion des Hopfens mittels der Wöllmer-Analyse [3]. In der in den drei Fraktionen nachgewiesenen Aktivität sah der Autor eine Stütze für die oben skizzierte Hypothese. Uns erschien diese Argumentation nicht schlüssig, da bei der genannten Untersuchung keine Auf trennung in chemisch einheitliche Verbindungen sondern allenfalls in Bitterstoffgruppen erfolgte.

Aus diesem Grund untersuchten wir den Metabolismus von radioaktiv markiertem Valin, Leucin und Isoleucin in Hopfen.

### ERGEBNISSE

Die in Tabelle 1 angeführten <sup>14</sup>C-markierten aliphatischen Aminosäuren sind Hopfentrieben appliziert worden.

Die Ergebnisse der Einbauversuche mit Valin, Leucin und Isoleucin, die anhand des Methanolextraktes ermittelt wurden, sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die Analyse des Pentan-Extraktes, den wir aus einem Hopfentrieb herstellten, dem <sup>14</sup>C-Leucin appliziert worden

war, ergibt, daß L-Leucin in die Bitterstoffe Desoxyhumulon und Lupulon eingebaut wird (Tab. 3). In derselben Tabelle ist auch der Einbau von Isoleucin, wie er sich nach der Pentanextraktion darstellt, angegeben.

Tabelle 1. Applizierte radioaktiv markierte aliphatische Aminosäuren

Substanz†	Spezifische Aktivität ( $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$ )	Aufgenommene Aktivität ( $\mu\text{Ci}$ )
U- <sup>14</sup> C-L-Valin*	10	247
U- <sup>14</sup> C-L-Leucin	10,0	241
U- <sup>14</sup> C-L-Isoleucin	10,0	250

\* Beim Einbauversuch mit U-<sup>14</sup>C-L-Valin war der Trieb nach ca dreistündiger Versuchsdauer verwelkt.

† Versuchsdauer 8 hr.

Tabelle 2. Einbau von <sup>14</sup>C-Valin, <sup>14</sup>C-Leucin und <sup>14</sup>C-Isoleucin in Hopfeninhaltsstoffe (Methanol-Extrakt)

Verbindung	Val	Leu	Ileu
Essigsäure	<0,5	2,6	1,1
*	<0,5	<0,5	<0,5
Propionsäure	—	—	<0,5
2-Methylbuttersäure	—	—	<0,5
Isovaleriansäure	—	<0,5	—
Acetessigsäure	—	6,6	—
*	—	—	16,3
L-Leucin	—	<0,5	—
Isoleucin	—	—	<0,5
*	<0,5	<0,5	—
2-Keto-isocapronsäure	—	14,0	—
2-Keto-3-methyl-	—	—	13,9
valeriansäure	—	<0,5	<0,5
*	—	5,6	—
D-Fructose	—	<0,5	—
$\alpha$ -D-Glucose	—	<0,5	—
$\beta$ -D-Glucose	—	<0,5	—
Saccharose	<0,5	<0,5	<0,5

— Nicht nachweisbar. \* Nicht identifiziert.

\*7. Mitteilung in der Serie "Über die Biosynthese der Hopfenbitterstoffe. 6. Mitteilung Drawert, F. und Beier, J. (1976), *Phytochemistry* 15, 1691.

Tabelle 3. Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin und  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in Hopfeninhaltsstoffe (Pentan-Extrakt)

Verbindung	Einbau %	
	Leu	Ileu
Essigsäure	<0,5	<0,5
*	<0,5	—
*	<0,5	—
2-Methylbuttersäure	—	<0,5
*	—	<0,5
2-Keto-isocapronsäure	<0,5	—
2-Keto-3-methylvaleriansäure	—	<0,5
*	<0,5	<0,5
Desoxyhumulon	<0,5	—
Lupulon	<0,5	—

\* Nicht identifiziert. — Nicht nachweisbar.

Mit  $\text{U}^{14}\text{C}$ -L-Valin erhielten wir keine auswertbaren Radiogramme, da die Pflanze nach dreistündiger Applikation der radioaktiv markierten Verbindung verwelkt war und demzufolge eine zu kurze Zeit zur Metabolisierung des Valins zur Verfügung stand.

#### DISKUSSION

Appliziert man Hopfentreiben  $\text{U}^{14}\text{C}$ -L-Leucin, so findet man neben anderen Metaboliten radioaktiv markierte Isovaleriansäure. Als erster Schritt dieses Abbaues ist eine Transaminierung von Leucin zur entsprechenden 2-Ketoisocapronsäure anzunehmen. Analog 2-Ketoglutarat oder Pyruvat wird 2-Ketoisocapronat oxidativ decarboxyliert, wobei der aktivierte Isovaleraldehyd wahrscheinlich als Zwischenprodukt auftritt. Durch Übertragung des aktivierten Isovaleraldehyds auf Liponsäure und schließlich auf Coenzym A gelangt man zu 3-Methylbutyryl-CoA, aus dem Isovaleriansäure entsteht. Wie wir bereits gezeigt haben, dient Isovaleriansäure als Vorstufe der Acylseitenkette der Bitterstoff-Stammverbindungen [4]. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich wird aus L-Leucin stammende Radioaktivität spezifisch in Desoxyhumulon und Lupulon eingebaut. Aus diesen Gründen schlagen wir vor, daß die Isovalerylseitenkette

der Hopfenbitterstoffe aus L-Leucin über Isovaleriat gebildet wird.

Analog zu Leucin nehmen wir an, daß auch Valin bzw. Isoleucin als Vorstufen für die Acylreste der Co- bzw. Ad-Verbindungen der Hopfenbitterstoffe dienen. Im Fall von Valin konnten wir zeigen, daß Isobuttersäure als Precursor der Co-Verbindungen der Bitterstoffe fungiert [4]. Es gelang zwar nicht, den Einbau von Isoleucin in die Ad-Komponenten der Bitterstoffe nachzuweisen (der Einbau liegt vermutlich unterhalb der Nachwiesgrenze unserer Meßanordnung); in der Hopfenpflanze entsteht jedoch 2-Methylbuttersäure aus Isoleucin (vgl. Tabelle 2). Der Befund, daß  $^{14}\text{C}$ -markierte Glucose von uns nachgewiesen wurde, kann dadurch erklärt werden, daß das beim Leucinabbau entstehende  $^{14}\text{CO}_2$  zur Reassimilation verwendet wird oder daß aus  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA im Krebs- bzw. Glyoxylsäure-Cyclus Malat und Oxalacetat gebildet werden, aus denen über Phosphoenolpyruvat und Gluconeogenese Kohlenhydrate entstehen können. Während nach Moyse [5] und Bradbeer und Ranson [6] der Photosyntheseweg der eigentliche Mechanismus der Kohlenhydratbildung sein soll, wurde bei reifenden Weinbeeren nachgewiesen [7], daß nur 1–3% der Kohlenhydrate durch Reassimilation gebildet werden.

#### EXPERIMENTELLES

Applikation, Extraktion, Vortrennung, Derivatisierung und Reaktions-Radio-Gaschromatographie, vgl. (8).

#### LITERATUR

1. Mori, Y. (1960/61) *Bull. Brew. Sci.* **6**, 17.
2. Mori, Y. (1960/61) *Bull. Brew. Sci.* **6**, 28.
3. Wöllmer, W. (1930) *Wschr. Brauerei* **47**, 521.
4. Drawert, F. und Beier, J. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2149.
5. Moyse, A. (1965) *La Synthèse, la Dégradation et l'Utilisation des Acides Organiques*. Masson, Paris.
6. Bradbeer, J. W. und Ranson, S. L. (1963) *Proc. Roy. Soc. (London)* **B157**, 279–285.
7. Steffan, H. Untersuchungen über Veränderungen von Inhaltsstoffen in reifenden Beeren der Rebe mit  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen, Diss. Univ. Karlsruhe, 1968.
8. Drawert, F. und Beier, J. (1974) *Chromatographia* **7**, 273.