

Über die Biosynthese der Carotinoide bei einigen Mikroorganismen*

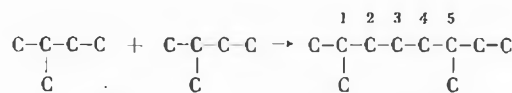
Von PD Dr. E. C. GROB

Botanisches Institut der Universität Bern

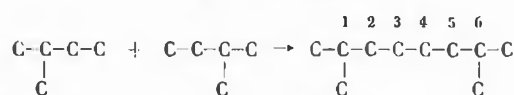
Einleitung

Die Carotinoide, die als gelbe bis rote Pigmente in der Natur außerordentlich stark verbreitet sind, befinden sich sozusagen in allen Lebewesen. Diese Pigmente werden vornehmlich von den Pflanzen gebildet, wobei sich diese Fähigkeit über das ganze Pflanzensystem erstreckt. Nach einer Schätzung von L. ZECHMEISTER beträgt die jährliche Produktion an Carotinoiden im Pflanzenreich rund 100 Millionen Tonnen. Eine sehr ausführliche Aufzählung der carotinoidführenden Pflanzen und Tiere, mit den entsprechenden Angaben über Originalliteratur, befindet sich in der kürzlich erschienenen Monographie von P. KARRER und E. JUCKER¹.

Alle Carotinoide weisen dasselbe Bauprinzip auf. Ihr Aufbau erfolgt nach der Isoprenregel, und damit stehen diese Pigmente in enger Beziehung mit den Terpenen, Kautschuk, Cholesterin usw. Die Anordnung der Isoprenreste im Carotin ist mit einer einzigen Ausnahme regulär (siehe Schema unten), die seitenständigen Methylgruppen befinden sich also in 1,5-Stellung zueinander. Charakteristisch für die Carotinoide ist die Umstellung in der Mitte des Moleküls; an dieser Stelle sind die beiden Isoprenreste nach dem Schema b zusammengelagert, so daß hier die Methylgruppen 1,6ständig sind.



a) reguläre Anordnung der Isoprenreste
(head to tail)

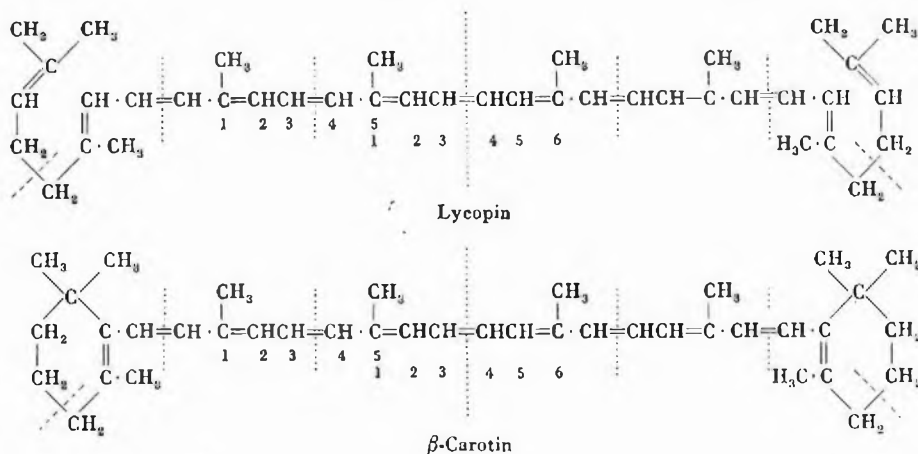
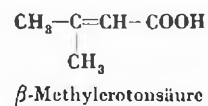


b) irreguläre Anordnung der Isoprenreste
(tail to tail)

KARRER² drückte die Vermutung aus, daß diese Umstellung die Folge einer spiegelbildlichen Kondensation zweier C₂₀-Verbindungen mit carotinoidähnlichem Aufbau sein könnte. Als C₂₀-Verbindung mit gleichem C-Skelett wie die Carotinoide ist der Phytolaldehyd bekannt, der in der Natur als Alkohol (Phytol) sehr weit verbreitet ist. In der Tat gelang es KARRER², *in vitro* aus zwei Molen Phytolaldehyd durch Kondensation die erwartete C₄₀-Verbindung zu gewinnen.

Wie erwähnt, setzen sich die Carotinoide aus Isoprenresten zusammen. Als Grundbausteine für die Biosynthese dieser Pigmente mögen deshalb C₅-Verbindungen mit Isoprenstruktur in Frage kommen. Ein solcher Baustein, der möglicherweise als Vorstufe Verwendung finden könnte und der in der Natur mehrfach beobachtet wurde, ist die β -Methylcrotonaldehyd.

Wie erwähnt, setzen sich die Carotinoide aus Isoprenresten zusammen. Als Grundbausteine für die Biosynthese dieser Pigmente mögen deshalb C₅-Verbindungen mit Isoprenstruktur in Frage kommen. Ein solcher Baustein, der möglicherweise als Vorstufe Verwendung finden könnte und der in der Natur mehrfach beobachtet wurde, ist die β -Methylcrotonaldehyd.



Die direkte Beteiligung dieser Säure am Aufbau der Carotinoide konnte bis heute experimentell noch nicht nachgewiesen werden.

* Vortrag, gehalten in der Bernischen Chemischen Gesellschaft am 22. Dezember 1955.

¹ P. KARRER und E. JUCKER, *Die Carotinoide*, Verlag Birkhäuser, Basel 1948.

Bis vor wenigen Jahren existierten nur wenige experimentelle Angaben über den Verlauf der Biosynthese

² P. KARRER, A. HELFENSTEIN, H. WEHRLI und A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta* 13 (1930) 1084.

dieser wichtigen Stoffklasse. Eine erfolgreiche Bearbeitung dieser Probleme schien erst möglich, nachdem die chemische Erforschung dieser Verbindungen genügend weit gediehen war. Diese Voraussetzung ist heute erfüllt. So sind denn in den letzten Jahren recht viele Arbeiten erschienen, die sich mit der Biochemie und speziell auch mit der Biosynthese der Carotinoide beschäftigen. Es ist nicht der Zweck dieser Arbeit, alle diesbezüglichen Veröffentlichungen zu diskutieren. Es sei auf die kürzlich erschienenen Zusammenfassungen von L.F.HAXO³ und T.W.GOODWIN⁴ verwiesen. In erster Linie seien im folgenden unsere eigenen Gedankengänge und experimentellen Arbeiten darzustellen, soweit sie die biochemischen Gesichtspunkte betreffen.

Die zur Untersuchung der Carotinbiosynthese verwendeten Organismen

Als besonders geeignet für unsere Untersuchungen über die Biosynthese der Carotinoide erachteten wir zwei Schimmelpilze, *Phycomyces blakesleeanus* und vor allem *Mucor hiemalis* WERMER C.B.S. (Stamm +). SCHOPFER⁵ beobachtete 1935 im *Phycomyces* die Bildung reichlicher Carotinmengen. SCHOPFER und JUNG^{5a} wiesen mit biologischen Methoden nach, daß es sich dabei hauptsächlich um β -Carotin handelt. KARRER und KRAUSE-VOITH⁶ bestätigten die Anwesenheit des β -Carotins als Hauptcarotin im *Phycomyces* und fanden daneben in bedeutend kleineren Mengen α -Carotin. Auch im *Mucor hiemalis* herrscht das β -Carotin vor, daneben stellten wir wenig Lycopin und γ -Carotin und in älteren Kulturen Mutatochrom fest⁷. Die relativ einfache Zusammensetzung der Carotinoide in diesen Organismen bietet für unsere Zwecke große Vorteile. Einen weiteren Vorteil dieser Schimmelpilze erblicken wir in ihrer leichten Kultivierbarkeit und in ihrer Anspruchslosigkeit in bezug auf die Nährstoffbedürfnisse. Sie lassen sich gut auf synthetischen Nährlösungen recht einfacher Zusammensetzung züchten*.

Tab. 1. Die Zusammensetzung der Nährlösungen für *Phycomyces* und *Mucor hiemalis*

	Nährlösung 1	Nährlösung 2	Nährlösung 3
C-Quelle . .	Glucose	Mg-Lactat	Na-Acetat
N-Quelle . .	Asparagin	NH ₄ -Lactat	(NH ₄) ₂ SO ₄
Mineralstoffquelle . . .	KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄
Vitamine . .	MgSO ₄	MgSO ₄	MgSO ₄
	Aneurin	Aneurin	Aneurin

* Zurzeit werden im Botanischen Institut weitere Untersuchungen über die Sexualität dieser Mikroorganismen im Zusammenhang mit dem Vitamingleichgewicht durchgeführt.

³ L.F.HAXO, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 12 (1955) 169.

⁴ T.W.GOODWIN, *Annu. Rev. Biochem.* 24 (1955) 497.

⁵ W.H.SCHOPFER, *C.R.Soc.Biol.* 118 (1935) 3.

^{5a} W.H.SCHOPFER und A.JUNG, *C.R.Soc.Biol.* 120 (1935) 1093.

⁶ P.KARRER und E.KRAUSE-VOITH, *Helv. Chim. Acta* 31 (1947) 802.

⁷ E.C.GROB, *Chimia* 7 (1953) 90.

Der Zusatz von Aneurin ist indessen nur für *Phycomyces* notwendig, da *Mucor hiemalis* dieses Vitamin selbst synthetisiert. Normalerweise wird die Nährlösung 1 verwendet. Die auf Nährlösung 2 gewachsenen Kulturen zeichnen sich durch eine Hemmung der Biosynthese der Carotinoide aus^{8,8a}, während die Nährlösung 3 wiederum eine beträchtliche Carotinbildung erlaubt⁹. Die Züchtung der Mikroorganismen erfolgt durchwegs in Erlenmeyerkolben zu 150 cm³, wobei je Kultur 25 cm³ Nährlösung zugesetzt werden. Während der ganzen Entwicklungsdauer wird die Temperatur auf 20° gehalten. Normalerweise beträgt die ganze Entwicklungsdauer 14 Tage.

Die ersten orientierenden Versuche

Eine erste Orientierung über die Verbindungen, die sich an der Biosynthese der Carotinoide beteiligen können, wurde mit der Nährlösung 2 erzielt. Da die erwähnten Organismen auf dieser Nährlösung höchstens Spuren von Carotinoiden bilden, lassen sich Substanzen, die irgendwie am Aufbau der Carotinoide beteiligt sind, durch Zusatz zur genannten Nährlösung leicht feststellen. Durch diese Versuche konnten wir eine größere Zahl organischer Verbindungen feststellen, die zur Carotinbildung befähigt sind^{8a}. Wie die untenstehende Tab. 2 zeigt, finden sich solch aktive Verbindungen unter den Kohlenhydraten und den organischen Säuren.

Tab. 2. Die carotinogene Wirkung organischer Verbindungen

Organische Verbindung	Carotinbildung	Organische Verbindung	Carotinbildung
1. Kohlenhydrate		2. Organische Säuren	
a) Pentosen:		Fettsäuren (Na-Salz):	
D (-)-Ribose . .	-	Essigsäure . .	+
D (-)-Arabinose	-	Propionsäure . .	-
D (+)-Xylose . .	+	Buttersäure . .	+
		Stearinsäure . .	?
		Palmitinsäure . .	+
b) Hexosen:		Dicarbonsäuren (Na-Salz):	
D (+)-Mannose	-	Oxalsäure . .	-
Glucose . . .	+	Malonsäure . .	-
D (+)-Galactose	+	Adipinsäure . .	-
D (-)-Fructose	+	Oxydicarbonsäure:	
L (-)-Sorbose . .	-	Weinsäure . .	+
c) Disaccharide:		Tricarbonsäure:	
Maltose . . .	+	Citronensäure	+
Saccharose . .	+	Ketosäuren:	
Lactose . . .	-	Brenztraubensäure	+
		Acetessigester . .	+

⁸ W.H.SCHOPFER, unveröffentlicht (1935).

^{8a} W.H.SCHOPFER und E.C.GROB, *Experientia* 6 (1950) 419.

⁹ W.H.SCHOPFER und E.C.GROB, *Experientia* 8 (1952) 140.

Wir haben sodann unser Augenmerk hauptsächlich auf die Essigsäure gelenkt. Diese Säure interessierte vor allem deshalb, weil sie als Vorstufe einer Reihe von Naturstoffen erkannt wurde, die nach dem Isoprenprinzip aufgebaut sind. Es sei hier nur an die Rolle der Essigsäure bei der Biosynthese des Cholesterins¹⁰ und des Kautschuks¹¹ erinnert.

Für eine eingehendere Untersuchung ist die Essigsäure recht geeignet, da sich die Glucose, ohne allzu große Beeinträchtigung des Pilzwachstums, in der Nährlösung durch Na-Acetat ersetzen läßt⁹.

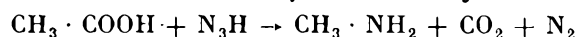
Die Rolle der Essigsäure in der Biosynthese der Carotinoide

Wie dargelegt, bewirkt eine Zugabe von Na-Acetat zur Nährlösung 2 eine starke Carotinbildung. Den Eintritt der Essigsäure-C-Atome in das Carotinmolekül haben wir mit Hilfe von ¹⁴C-markierter Essigsäure verfolgen können. Aus einer größeren Zahl von Versuchen mit methyl- und carboxylmarkierter Essigsäure hat sich ergeben, daß der Methyl- und der Carboxyl-Kohlenstoff zu gleichen Anteilen eingebaut wird und daß insgesamt ungefähr 70% des Kohlenstoffbestandes des β -Carotins dieser Säure entstammen¹². Die restlichen 30% Kohlenstoff, so vermuteten wir zunächst, würden vom Lactat aufgebracht. Doch erwies sich diese Vermutung als unrichtig, da die experimentelle Prüfung mit der Nährlösung 3, welche als einzige Kohlenstoffverbindung Na-Acetat enthält, ebenfalls nur 70% ergab¹³. Da außer dem CO₂ der Luft keine andere Kohlenstoffquelle in Frage kommen kann, ist anzunehmen, daß die restlichen 30% des Kohlenstoffbestandes durch die Kohlenensäure geliefert werden. Der direkte Beweis dieser Annahme steht jedoch noch aus.

Die hier kurz zusammengefaßten experimentellen Ergebnisse sagen aus, daß die C-Atome der Essigsäure in starkem Maße an der Biosynthese der Carotinoide beteiligt sind. Die Frage aber, ob die Essigsäure als eine obligatorische Zwischenstufe der Carotinsynthese im lebenden Organismus auftritt und wie ihr Einbau in das

Carotinmolekül erfolgt, findet damit noch keine Antwort. Gelingt es, festzustellen, an welchen Stellen im Carotinmolekül die beiden C-Atome der Essigsäure eingebaut werden, so dürften sich gewisse Anhaltspunkte über den Verlauf dieses Aufbauprozesses ergeben. Experimentell lassen sich die Positionen, welche die C-Atome der Essigsäure im β -Carotinmolekül einnehmen, feststellen, indem das von *Mucor hiemalis* gebildete, radioaktive β -Carotin so abgebaut wird, daß die C-Atome aus einer bestimmten Stelle des β -Carotins gefaßt werden können. Die Bestimmung der Radioaktivität dieser «isolierten» C-Atome zeigt uns ihre Herkunft aus der Essigsäure an.

Beim oxydativen Abbau des β -Carotins mit KMnO₄ werden 4 Mol Essigsäure erhalten, die aus der Gruppierung $\begin{matrix} =\text{CH}-\text{C}= \\ | \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ der aliphatischen Seitenkette des β -Carotins abgespalten werden¹⁴. Die seitenständigen Methylgruppen dieser Kette erscheinen auch in der gewonnenen Essigsäure als Methylgruppen. Die Carboxylgruppen der erhaltenen Essigsäure werden von den C-Atomen geliefert, die den seitenständigen Methylgruppen benachbart sind. Durch Decarboxylierung der aus β -Carotin abgespaltenen Essigsäure nach der SCHMIDT'schen Reaktion¹⁵ erhalten wir zwei Verbindungen mit je 1 C-Atom, nämlich Methylamin und CO₂.



Auf diese Weise erhält man nach einer übersichtlichen Reaktion zwei Verbindungen mit je einem C-Atom. Zur

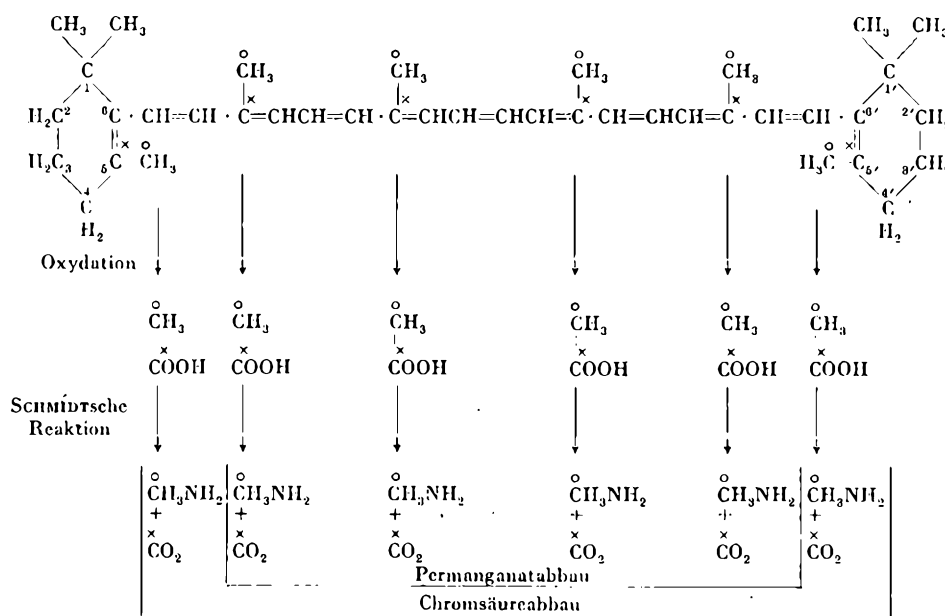


Abb. 1. o stammt aus der CH₃-Gruppe der Essigsäure
x stammt aus der COOH-Gruppe der Essigsäure

¹⁰ R. G. LANDON und K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* 200 (1952) 129, 135.

¹¹ J. BONNER und B. ARREGUIN, *Arch. Biochem.* 21 (1949) 109.

¹² E. C. GROB, G. G. PORETTI, A. VON MURALT und W. H. SCHOPFER, *Experientia* 7 (1951) 218; E. C. GROB, W. H. SCHOPFER und G. G. PORETTI, *Int. Z. Vitaminforsch.* 23 (1952) 484.

¹³ E. C. GROB und W. H. SCHOPFER, II^e Congrès international de Biochimie, Paris 1952; *Résumé des Communications*, S. 212.

¹⁴ P. KARRER und A. HELFENSTEIN, *Helv. Chim. Acta* 12 (1929) 1142.

¹⁵ C. SCHUERCH und E. HUNTRESS *J. Amer. Chem. Soc.* 71 (1949) 2233.

Bestimmung ihrer Radioaktivität wurde das Methylamin in das Hydrochlorid und das CO_2 in BaCO_3 übergeführt. Die Bestimmung der Radioaktivität hat eindeutig ergeben¹⁶, daß die scitenständigen Methylgruppen der aliphatischen Kette des β -Carotins aus den Methylgruppen der Essigsäure stammen, währenddem ihre benachbarten C-Atome der Kette von den Carboxylgruppen der Essigsäure geliefert werden (siehe Abb. 1).

Wird an Stelle von KMnO_4 als Oxydationsmittel CrO_3 verwendet, so können aus dem β -Carotin 6 Mole Essigsäure abgespalten werden. 4 Mole entstammen wiederum der aliphatischen Kette, die restlichen 2 Mole hingegen sind aus den β -Jononringen herausgespalten worden. Es betrifft dies die C-Atome 5 und 5' nebst den mit ihnen verknüpften Methylgruppen¹⁷. Die in Stellung 5 bzw. 5' sich befindenden Methylgruppen lassen sich wiederum auf die Methylgruppen der ursprünglichen Essigsäure zurückführen. Die entsprechenden C-Atome der β -Jononringe selbst hingegen werden von den Carboxylgruppen der zugesetzten Essigsäure gebildet (siehe Abb. 1)¹⁸.

Um weitere C-Atome der aliphatischen Kette zu erfassen, wurden aus dem β -Carotin geeignete Bruchstücke gewonnen, deren Herkunft aus dem ursprünglichen Molekül genau bekannt sind und die in übersichtlicher Reaktion in C_1 -Verbindungen übergeführt werden. Geeignete Spaltstücke des β -Carotins schienen uns Retinin und β -Jonylidenacetaldehyd zu sein, deren Konstitution aus Abb. 3 ersichtlich ist. Eine Methode zur Gewinnung dieser Spaltstücke haben WENDLER, TISHLER und ROSENBLUM¹⁹ angegeben. Retinin und β -Jonylidenacetaldehyd bilden sich, nebst anderen Produkten, bei der oxydativen Spaltung des β -Carotins mit H_2O_2 und OsO_4 als Katalysator. Die aus dem Reaktionsgemisch extrahierten Oxydationsprodukte lassen sich chromatographisch trennen. Nach einem etwas abgeänderten Verfahren²⁰ gelang es uns, die in Abb. 2 angegebenen Produkte zu fassen.

Die Substanz X konnte nach einer bestimmten Vorbehandlung des zur Chromatographie verwendeten Alu-

¹⁶ E. C. GROB und R. BÜTLER, *Experientia* 10 (1954) 250.

¹⁷ P. KARREER, A. HELFENSTEIN, H. WEHRLI und A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta* 13 (1930) 1084.

¹⁸ E. C. GROB und R. BÜTLER, *Helv. Chim. Acta* 37 (1954) 1908.

¹⁹ N. L. WENDLER, C. ROSENBLUM und M. TISHLER, *J. Amer. Chem. Soc.* 72 (1950) 234.

²⁰ E. C. GROB und R. BÜTLER, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 737; *Chimia* 9 (1955) 115.

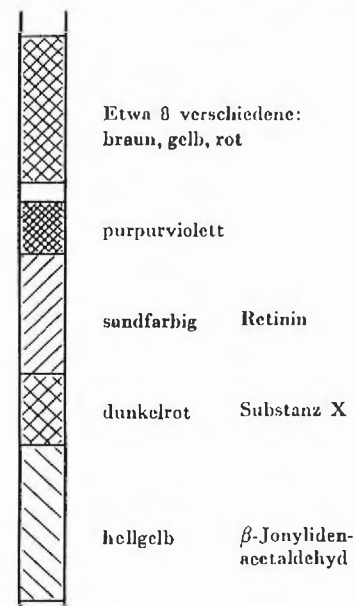


Abb. 2. Chromatogramm der Oxydationsprodukte von β -Carotin mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OsO}_4$ an Al_2O_3 , entwickelt mit 30% Benzol/70% Petroläther

miniumoxyds aus der Retininfraction abgetrennt werden. Kürzlich haben wir diese Substanz als Apo-10'- β -Carotinal identifizieren können²¹.

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, haben Retinin und β -Jonylidenacetaldehyd eine dem Citral analoge Endkonfiguration. Dem französischen Chemiker VERLEY²² war es gelungen, durch Hydrolyse mit einer wässrigen K_2CO_3 -Lösung die beiden endständigen C-Atome des

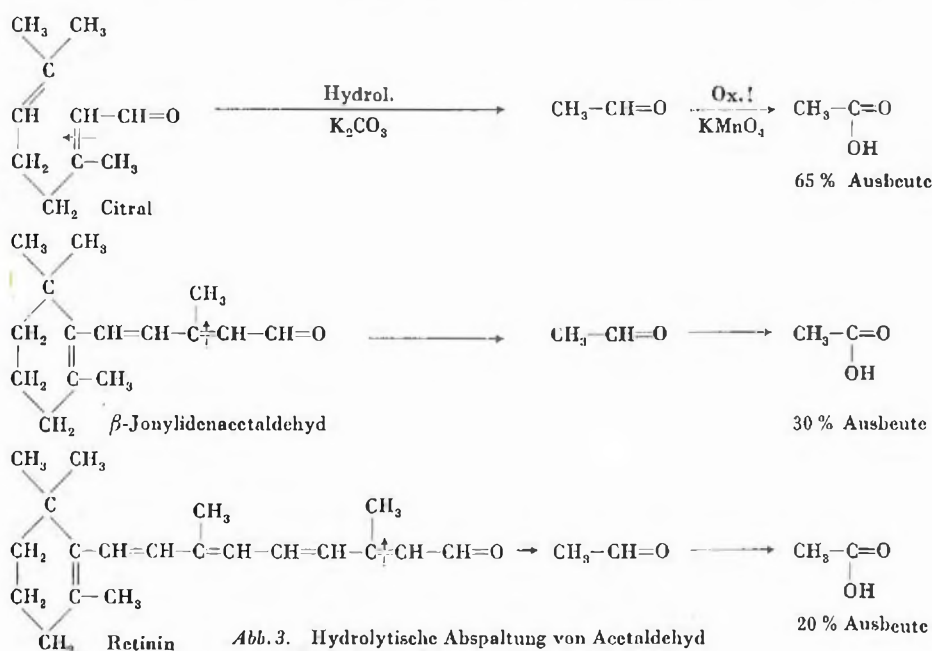


Abb. 3. Hydrolytische Abspaltung von Acetaldehyd aus Citral, β -Jonylidenacetaldehyd und Retinin

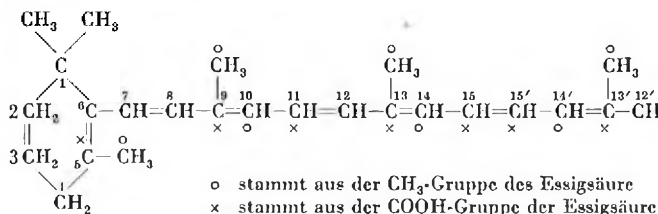
Citrals als Acetaldehyd abzuspalten. Wir suchten diese Reaktion auch auf Retinin und β -Jonylidenacetaldehyd

²¹ E. C. GROB und R. BÜTLER, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 1657.

²² A. M. VERLEY, *Bull. Soc. Chim. France* (3) 17 (1897) 175.

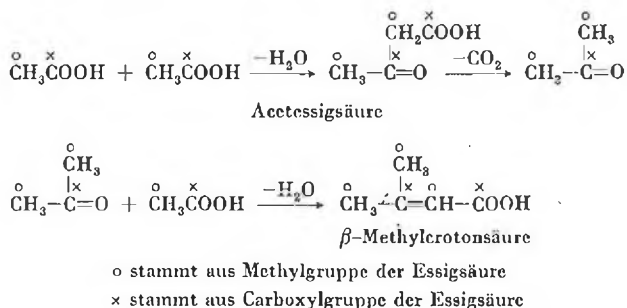
zu übertragen, was tatsächlich, wenn auch mit etwas schlechterer Ausbeute, gelang. Der gebildete Acetaldehyd wurde in KMnO_4 -Lösung eingeleitet. Durch Destillation konnte die gebildete Essigsäure gewonnen werden²⁰. Die bei dieser Reaktion anfallende Essigsäure läßt sich wiederum nach der SCHMIDT'schen Reaktion decarboxylieren. Die Reaktionsprodukte Methylamin und BaCO_3 dienen zur Bestimmung der Radioaktivität.

Damit kann die Herkunft der C-Atome 14,15 bzw. 14',15' und 10,11 bzw. 10',11' des β -Carotins aus den C-Atomen der dem Pilz verfütterten Essigsäure bestimmt werden. Nach den bis heute durchgeführten Versuchen verteilen sich die Methyl- und die Carboxyl-C-Atome der Essigsäure im β -Carotin folgendermaßen²³:



Wir stellen fest, daß die C-Atome der Methyl- und der Carboxylgruppe der Essigsäure im β -Carotinmolekül durchwegs nebeneinander vorliegen. Die Essigsäure scheint sich somit als ganzes Molekül am Aufbau zu beteiligen. Damit stellt sich jetzt die Frage, über welche Stufen der Aufbau zum Carotinmolekül erfolgt.

Nach einer älteren Hypothese wird die β -Methylcrotonsäure als Vorstufe zu Naturstoffen, die nach dem Isoprenprinzip aufgebaut sind, angenommen. In der Tat ist die Methylcrotonsäure schon mehrfach in der Natur aufgefunden worden. Nach einer Vorstellung von H. VON EULER soll die Bildung der β -Methylcrotonsäure nach folgendem Schema verlaufen²⁴:



Würde man von ^{14}C -markierter Essigsäure ausgehen, so müßte nach dem oben angegebenen Schema eine β -Methylcrotonsäure entstehen, deren C-Bestand aus 3 Methylgruppen und 2 Carboxylgruppen der angewendeten Essigsäure gebildet wäre. Vergleicht man die Verteilung der Methyl- und Carboxylgruppen der Essigsäure in der hypothetischen β -Methylcrotonsäure mit

der im β -Carotin experimentell gefundenen, so findet sich eine analoge Anordnung der C-Atome in den Isoprenresten des β -Carotins. Damit gewinnt die Annahme der β -Methylcrotonsäure als Vorstufe der Carotinoide erneut an Wahrscheinlichkeit.

Im folgenden sei noch dargelegt, inwieweit diese Anschauung sich experimentell weiter stützen läßt.

Die β -Methylcrotonsäure als mögliche Zwischenstufe bei der Carotinbildung

In einer Reihe von Versuchen mit verschiedenen Stämmen von *Phycomyces* konnten wir eine sehr deutliche Beziehung zwischen der Fettbildung einerseits und der

Carotin- und Sterinbildung andererseits beobachten²⁵. Das Ergebnis eines Stammes von *Phycomyces* mag in Abh. 4 wiedergegeben sein. Aus dieser graphischen Darstellung ist ersichtlich,

daß die Kurve, welche die Bildung der Fette veranschaulicht, genau entgegengesetzt derjenigen der Carotin- und Sterinbildung verläuft. Dort wo sich ein Maximum der Fettbildung einstellt, beobachtet man ein Minimum in der Carotin- und Sterinbildung, und umgekehrt.

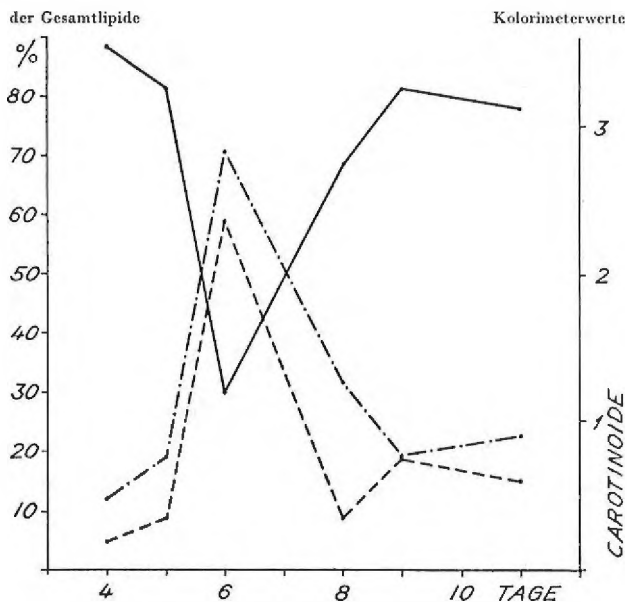


Abb. 4. Bildung von Fetten (—), Sterinen (---) und Carotinoiden (-·-) durch *Phycomyces blak*.

Über die Aufbau- und Abbaureaktionen der Fettsäuren in den lebenden Organismen ist man heute dank den Arbeiten von LIPMAN, LYNNEN und anderen²⁶ recht

²³ E. C. GROB und R. BÜTLER, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 1313.

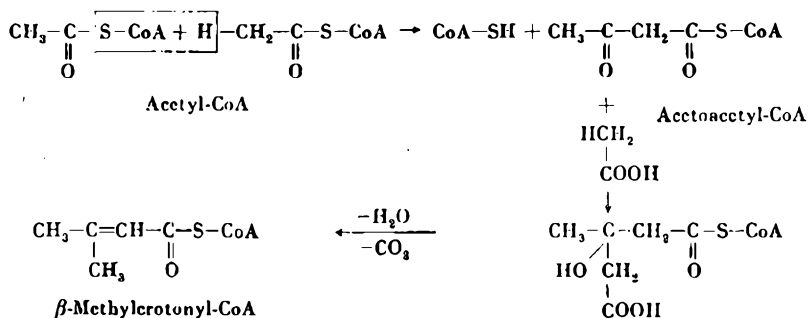
²⁴ H. VON EULER und KLUSMANN, *Svensk. Kem. Tidkr.* 44 (1932) 198.

²⁵ E. C. GROB, M. BEIN und W. H. SCHOPFER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33 (1951) 1236.

²⁶ F. LYNNEN und S. OCHOA, *Biochim. Biophys. Acta* 12 (1953) 299.

gut informiert. Das Wesentliche über die Vorgänge des Fettsäurestoffwechsels mag aus dem vereinfachten wiedergegebenen Fettsäurezyklus von LYNEN in Abb. 6 hervorgehen. Ausgangspunkt der Fettsäurebildung ist die Essigsäure, die in aktiver Form als Acetyl-Coenzym A in Reaktion tritt. Ein Molekül Acetyl-Coenzym A kondensiert mit einem zweiten zu Acetoacetyl-Coenzym A unter Freisetzung eines Coenzym-A-Moleküls.

Nach dem vorhin erwähnten Schema der Entstehung von β -Methylcrotonsäure soll als erster Reaktionsschritt ebenfalls eine Kondensation von 2 Essigsäuremolekülen zu Acetessigsäure stattfinden. Der nächste Schritt mag nach den heutigen Auffassungen etwas anders verlaufen. EULER hatte eine Decarboxylierung der entstandenen Acetessigsäure angenommen, wobei das bei dieser Reaktion entstandene Aceton durch Anlagerung eines weiteren Essigsäuremoleküls zur β -Methylcrotonsäure führt. Wir glauben vielmehr, daß Acetoacetyl-Coenzym A mit einem weiteren Acetyl-Coenzym A reagiert und das intermediär entstandene Anlagerungsprodukt sich unter Abspaltung von Wasser und CO_2 in β -Methylcrotonsäure umwandelt²⁷.



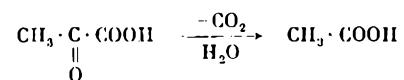
Nach dem Obengesagten zu schließen, muß dem Coenzym A auch bei der Carotinbildung eine wesentliche Rolle zukommen. Diese Annahme wird durch die Tatsache bekräftigt, daß die essentiellen Bestandteile des Coenzym A, wie die Pantothenensäure, das Pantethin und das phosphorylierte Pantethin, bei *Mucor hiemalis* eine deutliche Förderung der Carotinbildung zur Folge haben²⁸.

Die Glucose als Ausgangsmaterial für die Carotinbildung

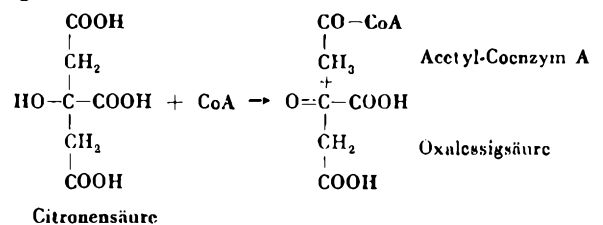
Bis dahin ist vor allem von der Rolle der Essigsäure bei der Biosynthese der Carotinoide gesprochen worden. Die Essigsäure ist aber nicht die normale Kohlenstoffquelle der Schimmelpilze. Für die Züchtung auf synthetischen Nährlösungen verwendet man im allgemeinen Glucose. Das Wachstum von *Mucor hiemalis* und von *Phycomyces* auf einer Glucose enthaltenden Nährlösung ist entsprechend besser als auf Acetat. Wie ausgeführt wurde, ist die Carotinbildung der verwendeten Organismen

auf der Glucosenährlösung recht beträchtlich, wenn sie auch nicht an die Carotinproduktion auf Acetatnährlösung heranreicht.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob bei der Verwertung der Glucose die Carotinbildung nicht über die Essigsäurestufe führt. Beim Kohlenhydratabbau in lebenden Organismen entsteht als Zwischenprodukt stets Brenztraubensäure, welche bekanntlich im Kohlenhydratstoffwechsel eine Schlüsselstellung einnimmt. Eine Umwandlung der beim Kohlenhydratabbau des *Mucor hiemalis* entstandenen Brenztraubensäure in Essigsäure bzw. Acetyl-Coenzym A ist wohl möglich. Die Entstehung von Essigsäure aus Brenztraubensäure ist in lebenden Organismen mehrfach nachgewiesen worden. Für die Bildung der Essigsäure aus Brenztraubensäure stehen verschiedene Reaktionswege offen. So führt die oxydative Decarboxylierung der Brenztraubensäure direkt zur Essigsäure.



Die Bildung der Essigsäure kann aber auch auf dem Umwege über den KRENSSchen Citronensäurezyklus erfolgen. Nach dem in Abb. 6 dargestellten vereinfachten KRENSSchen Zyklus wird durch Carboxylierung der Brenztraubensäure je nach den vorherrschenden Bedingungen Oxallessigsäure oder Äpfelsäure gebildet. Die letztgenannten Säuren führen über eine Reihe von Teilreaktionen, deren wichtigste nur im dargestellten Schema festgehalten wurden, zur Citronensäure. Nach neueren Untersuchungen von STERN, SHAPIRO, STADTMAN und OCHOA²⁹ kann die Citronensäure in Gegenwart von Coenzym A Acetyl-Coenzym A abspalten, wobei der verbleibende Rest, die Oxallessigsäure, erneut in den Zyklus eingreift.



Die Brenztraubensäure als Vorstufe der Essigsäure ist demnach durchaus möglich. Für uns gilt es zunächst abzuklären, ob eine solche Umwandlung von Brenztraubensäure in Essigsäure in unserem Organismus (*Mucor hiemalis*) tatsächlich erfolgt. Kann eine solche Umwandlung nachgewiesen werden, wird die nächste Aufgabe sein, den Reaktionsweg aufzuspiiren.

²⁷ E. C. GROB und R. BÜTLER, *Experientia* 11 (1955) 259.

²⁸ E. C. GROB, V. GRUNDBACHER und W. H. SCHOPFER, *Experientia* 10 (1954) 378.

²⁹ J. R. STERN, B. SHAPIRO, E. R. STADTMAN und S. OCHOA, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 703.

Kultiviert man den *Mucor hiemalis* auf einer Nährlösung mit Glucose, der noch NaF zugesetzt wird, so läßt sich eine außerordentlich starke Hemmung der Carotinbildung beobachten. Wie Tab. 3 zeigt, genügt eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ Mol, um eine ausgeprägte Hemmung zu erzielen. Daß die normale Entwicklung des Organismus unter dem Einfluß von NaF nicht leidet,

Tab. 3

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

Tab. 4

Nährlösung	Kulturdauer	Kontrolle	NaF-Zusatz pro 25 cm ³ Nährlösung			
			$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$ 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.
h) 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.

ersieht man aus den in Tab. 4 angegebenen Trockengewichten pro Kultur. Die NaF-Kulturen weichen in ihren Trockengewichten nicht von den Kontrollen ab.

Ersetzt man die Glucose durch Na-Acetat, so übt in diesem Falle NaF keinerlei Hemmwirkung aus (siehe Tab. 3h). Bekanntlich hemmt NaF die Umwandlung der Glucose in Brenztraubensäure außerordentlich stark, indem das Enzym Enolase, das die Umwandlung der 2-Phosphoglycerinsäure in Phosphoenolbrenztraubensäure besorgt, inaktiviert wird. Der

³⁰ E. C. GRON, R. BÜTLER und V. GRUNDBACHER, *Helv. Chim. Acta* 39 (1956) 168.

Tab. 5

	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

Ausfall an Brenztraubensäure durch NaF-Hemmung zieht demnach auch einen Ausfall an Acetylcoenzym A nach sich, so daß schließlich auch die Carotinproduktion herabgesetzt wird³⁰. Experimentell ließ sich in den mit NaF gehemmten Kulturen tatsächlich ein beträchtlicher Ausfall an Brenztraubensäure nachweisen (Tab. 5).

In den gehemmten Kulturen kann die Carotinbildung durch Zusatz von Brenztraubensäure zur Nährlösung wieder vollständig hergestellt werden. Aus den Werten der Tab. 6 und Abb. 5 ist die stark enthemmende Wirkung der Brenztraubensäure ersichtlich. In fortgeschrit-

Tab. 6

	Zeit	Kontrollen ohne NaF	Kontrollen + $5 \cdot 10^{-3}$ M 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

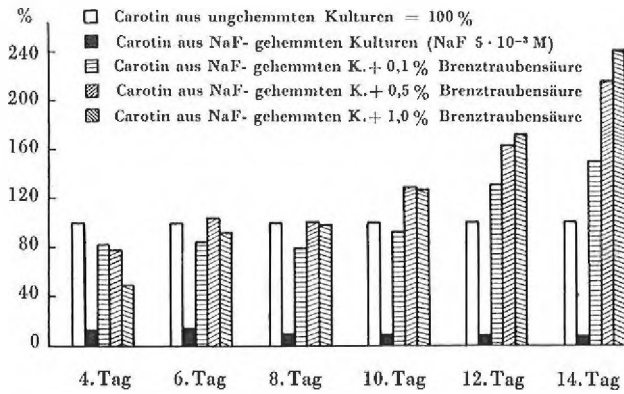


Abb. 5. Einfluß der Brenztraubensäure auf die Carotinbildung

tenen Kulturen ist die Carotinproduktion der Kontrollkulturen (Glucose-Nährlösung) sogar bedeutend größer.

Aus diesen hier mitgeteilten Versuchen läßt sich schließen, 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 auch eine Hemmung der Carotinbildung zur Folge. Wird die fehlende Brenztraubensäure ersetzt, so kommt die Carotinbildung erneut in Gang. Die Brenztraubensäure kann aber durch Essigsäure gleichwertig ersetzt werden. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die Brenztraubensäure wohl als Vorstufe der Carotinoide anzusprechen ist und aller Wahrscheinlichkeit nach in Acetyl-Coenzym A umgewandelt wird.

Welcher Weg beschritten wird, um die Brenztraubensäure in Essigsäure bzw. Acetyl-Coenzym A umzuwandeln, läßt sich heute noch nicht mit Sicherheit sagen. Wir haben gewisse Anhaltspunkte, die zur Annahme berechtigen, daß das Acetyl-Coenzym A wenigstens zum Teil aus der Citronensäure des KREBS-Zyklus gebildet wird. Im übrigen haben wir die carotinogene Wirkung der Citronensäure selbst^{9b} schon früher beobachtet. Zurzeit sind wir damit beschäftigt, diese Frage experimentell abzuklären.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Essigsäure, wohl in aktiver Form als Acetyl-Coenzym A, eine obligatorische Vorstufe der Carotinbildung ist. Geht die Carotinbildung von den Kohlenhydraten aus (z. B. Glucose), so wird, wie gezeigt wurde, die intermediär auftretende Brenztraubensäure in Acetyl-Coenzym A umgewandelt. Auf welchem Wege diese Umwandlung erfolgt, kann noch nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Sehr wahrscheinlich wird ein Teil der Brenztraubensäure in Citronensäure übergeführt, wobei letztere durch Mitwirkung von Coenzym A Acetyl-Coenzym A abspaltet.

Somit erscheint das Acetyl-Coenzym A als Ausgangspunkt der Carotinsynthese in lebenden Organismen. Gewichtige Gründe sprechen für die Bildung von β -Methylcrotonsäure aus Acetyl-Coenzym A als weitere Vorstufe. Die hier vorgebrachten Anschauungen über die Bildung der Carotinoide sind in der Abb. 6 schematisch zusammengefaßt.

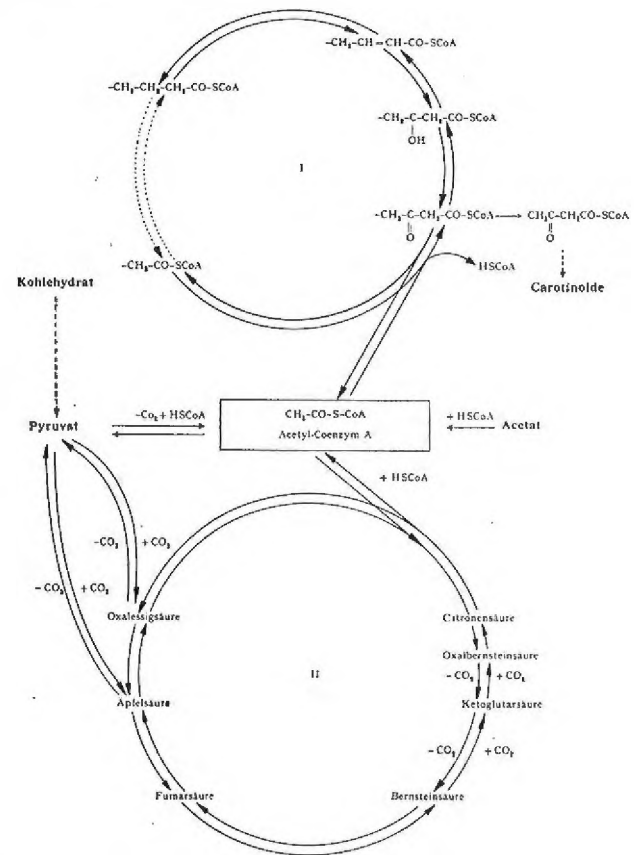


Abb. 6. Die Biosynthese der Carotinoide. Hypothetisches Schema. I: Fettsäurezyklus vereinfacht; II: Citronensäurezyklus nach KREBS vereinfacht

Wohl ist man noch weit davon entfernt, den ganzen Reaktionsmechanismus der Carotinbildung zu beschreiben. Diese Ausführungen mögen aber doch gezeigt haben, daß jetzt eine klare Ausgangslage geschaffen ist, die hoffentlich bald einmal näheren Einblick in den Aufbaumechanismus dieser so wichtigen Naturstoffe erlauben wird.

Diese Arbeiten wurden im Rahmen einer Arbeitsgemeinschaft im Botanischen Institut der Universität Bern durchgeführt und sind durch die «Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz» in den Jahren 1949–1954 unterstützt worden. Dieser Stiftung sprechen wir den besten Dank aus. Weitere Zuwendungen verdanken wir dem «Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung».