

Die Umsetzung von L-Äpfelsäure durch *Saccharomyces cerevisiae* bei der Gärung

Im Vergleich zum Stoffwechsel der Kohlenhydrate ist der anaerobe Abbau von Karbonsäuren durch Hefen noch wenig untersucht. Bei der Weinbereitung sind Veränderungen der Karbonsäuren durch Hefe von Interesse. Die wichtigste Säure im Traubenmost ist L-Äpfelsäure, von der lange bekannt ist, dass sich ihr Gehalt während der Gärung vermindert, wie unter anderem RIBEREAU-GAYON und PEYNAUD¹ und RANKINE² anführen. Im Gegensatz zu *Schizosaccharomyces*-Arten, die L-Äpfelsäure quantitativ abbauen³, wird von *Saccharomyces* selten mehr als 40% der vorhandenen Äpfelsäure metabolisiert. Bei *Schizosaccharomyces* kommt eine decarboxylierende Malatdehydrogenase vor⁴, die Äpfelsäure zu Brenztraubensäure und CO₂ oxydiert. Dieses Enzym ist bisher in *Saccharomyces* nicht nachgewiesen worden^{5, 6}.

Eingehende Untersuchungen an über 200 Wildstämmen von *Saccharomyces cerevisiae* und verwandten Arten ergaben, dass alle Stämme Äpfelsäure unter anaeroben Bedingungen umsetzen können. Die abgebaute Säuremenge ist unabhängig von der Vorkultur der Hefe und variiert sehr bei verschiedenen Stämmen. Aus Äpfelsäure, die während und nach der Gärung abgebaut wird, entstehen Äthanol und Kohlendioxyd. Dies konnte in Bilanzversuchen nachgewiesen werden; es gelang, Äpfelsäure mit ruhenden Hefezellen in zuckerfreier Pufferlösung umzusetzen. Unter diesen Bedingungen wird die Analyse der Metaboliten des Äpfelsäureabbaus nicht durch die Produkte der alkoholischen Gärung erschwert. Die Bilanz konnte ausserdem durch Verwendung von U-¹⁴C-markierter Äpfelsäure bestätigt werden. Bei einem Abbau von etwa 30% der Äpfelsäure wurde im Verhältnis von 1:1 die Aktivität im Kohlendioxyd, das in Alkali absorbiert worden war, und im Destillat gefunden. Ein signifikanter Einbau des Kohlenstoffs der Äpfelsäure in die Hefezellmasse erfolgte nicht. Die Fähigkeit der *Saccharomyces*-Zellen zur Bildung von CO₂ aus Äpfelsäure ist unabhängig von deren Wachstum bei Gegenwart von Äpfelsäure. Das Enzymsystem ist somit nicht induzierbar. Voraussetzung für die Bildung von Äthanol und CO₂ aus Äpfelsäure ist eine Wasserstoffionen-Konzentration des Mediums von pH 3. Im Bereich von pH 5 erfolgt nur ein sehr geringer Säureumsatz. Mit der empfindlichen Isotopenmethode können dann in geringer Menge verschiedene markierte Produkte gefunden werden⁷. Da bei *Saccharomyces* die decarboxylierende Malatdehydrogenase bisher nicht gefunden wurde, wird Äpfelsäure wahrscheinlich trotz der ungünstigen Lage des Reaktionsgleichgewichts zunächst von Malatdehydrogenase zu

Oxalessigsäure oxydiert, die dann möglicherweise spontan in Brenztraubensäure übergeht. Die von DUNTZE et al.⁸ beobachtete Inaktivierung von Malatdehydrogenase durch Glukose hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Umsetzung von Äpfelsäure, die bereits während der Gärung bei Gegenwart von Zucker erfolgen kann. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der NAD-abhängigen Malatdehydrogenase von Hefezellen und deren Fähigkeit zum Äpfelsäureabbau konnte nicht gefunden werden.

Mit zellfreien Extrakten konnte bei Gegenwart von NAD und Mangan Äpfelsäure zu Äthanol und Kohlendioxyd umgesetzt werden; die Endprodukte des Abbaus standen – wie bei den Versuchen mit intakten Zellen – im molaren Verhältnis von 1:2. Das Optimum für diese Reaktion liegt bei pH 7,0 also bei einem wesentlich höheren pH-Wert als für intakte Zellen. Leider ist die Aktivität der zellfreien Extrakte zur CO₂-Bildung aus Äpfelsäure gering und ausserdem wenig stabil, so dass eine wesentliche Reinigung des Enzymsystems nicht möglich war.

Summary. Yeasts of the genus *Saccharomyces* are able to decompose L-malic acid partially, during and after fermentation, whereby ethanol and carbon dioxide are the end products. The decarboxylation of malic acid by yeast can be achieved with resting cells and cell free extracts.

F. RADLER und E. FÜCK

*Institut für Mikrobiologie und Weinforschung,
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
D-65 Mainz (Deutschland), 31. März 1970.*

¹ J. RIBEREAU-GAYON und E. PEYNAUD, *Traité d'œnologie* (Béranger, Paris-Liège 1964), Vol. 1, p. 432.

² B. C. RANKINE, *J. Sci. Fd. Agric.* 17, 312 (1966).

³ E. PEYNAUD und S. LAFON-LAFOURCADE, *C. r. Acad. Sci., Paris* 258, 5542 (1964).

⁴ A. TEMPERLI, U. KÜNSCH, K. MAYER und J. BUSCH, *Biochem. biophys. Acta* 110, 630 (1965).

⁵ W. DUNTZE, W. ATZPODIEN und H. HOLZER, *Arch. Mikrobiol.* 58, 296 (1967).

⁶ J. J. CAZZULO, L. M. CLAISSE und A. O. M. STOPPANI, *J. Bact.* 96, 623 (1968).

⁷ K. MAYER, J. BUSCH und G. PAUSE, *Z. Lebensmitteluntersuch. u. -Forsch.* 125, 375 (1964). – A. RAPP, Dissertation Mainz 1965.

⁸ W. DUNTZE, D. NEUMANN und H. HOLZER, *Europ. J. Biochem.* 3, 326 (1968).

Effect of Fatty Acids on the Contraction of Guinea-Pig Ileum in vitro

Prostaglandins are fatty acids known to stimulate contractions of intestinal smooth muscle. For this reason, investigations have been made to establish whether other fatty acids have the same effect, particularly because of the fact that prostaglandins are biosynthesized from essential fatty acids^{1, 2}.

Materials and methods. The fatty acids were stored as 1% solutions in 1,2-propanediol. These solutions were diluted with saline (0.9% NaCl) before use. Guinea-pig ileum sections of about 4 cm were tested in a Magnus apparatus at 37°C. Contractions were recorded by means

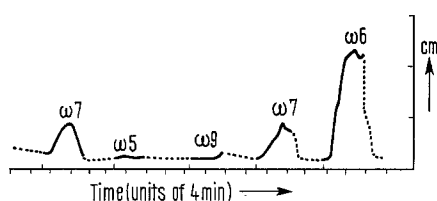
of a kymograph on smoked paper (recordings enlarged $\times 7$). The organ bath contained 10 ml Tyrode solution and was aerated with carbogen (95% O₂ + 5% CO₂). No atropine was added. The mean dose of the fatty acids

¹ D. A. VAN DORP, R. K. BEERTHUIS, D. H. NUGTEREN und H. VONKEMAN, *Biochim. biophys. Acta* 90, 204 (1964).

² S. BERGSTRÖM, H. DANIELSSON und B. SAMUELSSON, *Biochim. biophys. Acta* 90, 207 (1964).

which produced about 5% contraction (relative to a maximum contraction by histamine) was taken as the minimum effective dose ($\mu\text{g/ml}$ Tyrode solution).

Results and discussion. The fatty acids investigated and the results obtained are given in the Table. For all active fatty acids, steady contraction levels were observed within the duration of the test (5 min). It appeared that these fatty acids all have two or more double bonds although not all poly-unsaturated fatty acids were active. No correlation between activity and number of double bonds could therefore be established.



Recordings of contractions of an ileum section on addition of 4 eicosatrienoic acids ($\omega 5$, $\omega 6$, $\omega 7$, $\omega 9$) in a concentration of $100 \mu\text{g}$ fatty acid/ml Tyrode solution. Dotted lines indicate washings.

Estimated minimal doses of various fatty acids effecting contraction of isolated guinea-pig ileum

Fatty acids	Formula (double bonds, terminally numbered)	Minimum effective dose ($\mu\text{g/ml}$)
Caproic	C 6	—
Lauric	C 12	—
Palmitic	C 16	—
Stearic	C 18	—
Palmitoleic	C 16: 7/9 (mixture)	—
Vaccenic	C 18: 7 (<i>cis</i>)	—
Oleic	C 18: 9 (<i>cis</i>)	—
Elaidic	C 18: 9 (<i>trans</i>)	—
Petroselinic	C 18: 12 (<i>cis</i>)	—
Erucic	C 22: 9 (<i>cis</i>)	—
Linoleic	C 18: 6, 9	50
Linolenic	C 18: 3, 6, 9	50
γ -Linolenic	C 18: 6, 9, 12	50
Eicosatrienoic	C 20: 5, 8, 11 (C 20: 3 $\omega 5$)	—
Dihomo- γ -linolenic	C 20: 6, 9, 12 (C 20: 3 $\omega 6$)	5
Eicosatrienoic	C 20: 7, 10, 13 (C 20: 3 $\omega 7$)	50
Eicosatrienoic	C 20: 9, 12, 15 (C 20: 3 $\omega 9$)	*
Arachidonic	C 20: 6, 9, 12, 15 (C 20: 4 $\omega 6$)	0.05
Eicosapentaenoic	C 20: 3, 6, 9, 12, 15	50
Prostaglandin E_1		0.0005
Histamine		0.0005

* Possibly some very slight activity. —, No activity at a dose of $100 \mu\text{g/ml}$.

Only those fatty acids which can be converted directly or indirectly into prostaglandins, appeared to possess a certain activity. The most active fatty acids, dihomog-linolenic acid and arachidonic acid, are known to be the direct precursors of prostaglandin E_1 and E_2 respectively^{1,2}; eicosapentaenoic acid (C 20 t3, 6, 9, 12, 15) was shown³ to be converted into prostaglandin E_3 . Linoleic acid can be converted into arachidonic acid via γ -linolenic acid and dihomog-linolenic acid⁴⁻⁹. The activity of linoleic acid and γ -linolenic acid with regard to the isolated ileum might therefore depend upon their conversion into dihomog-linolenic acid or arachidonic acid, which themselves could be converted into prostaglandins, actually causing the contraction of the ileum. The slight activity of linolenic acid might be explained by its conversion into eicosapentaenoic acid⁴.

The activities of the individual fatty acids were compared on one ileum section (see Figure). The $\omega 6$ and $\omega 7$ fatty acids are known to be converted into prostaglandins, whereas the $\omega 5$ and $\omega 9$ fatty acids are not¹⁰.

The high activity of arachidonic acid^{11,12} (not shown in the Figure) might be caused by the presence of PGE_2 formed by autooxidation in vitro. The existence of such a non-enzymatic conversion has been found by NUGTEREN et al.¹³. In this respect, however, the activity of eicosapentaenoic acid is remarkably low.

Summarizing, the results obtained do not support the opinion that the stimulating effect of fatty acids on ileum contraction in vitro depends upon their contamination with unspecific autooxidation products¹⁴. This opinion is not in agreement with the required specific position of the double bonds. It seems likely that the activity of the fatty acids depends upon their conversion into prostaglandins. This conversion may be enzymatic — at least in part — as for instance with linoleic and γ -linolenic acid and/or be caused by autooxidation in vitro.

Zusammenfassung. Untersuchung der Wirkung von essentiellen Fettsäuren auf die Kontraktion des isolierten Meerschwein-Ileums ergab, dass besonders die direkten Vorläufer von Prostaglandin E_1 und E_2 , nämlich Dihomog-Linolensäure und Arachidonsäure, aktiv sind.

F. C. JAGER¹⁵

Unilever Research Laboratories, Vlaardingen/Duiven
(The Netherlands), 5 November 1969.

³ S. BERGSTRÖM, H. DANIELSSON, D. KLENBERG and B. SAMUELSSON, *J. biol. Chem.* 239, PC 4006 (1964).

⁴ J. F. MEAD, *Am. J. clin. Nutr.* 8, 55 (1960).

⁵ D. H. NUGTEREN, *Biochim. biophys. Acta* 60, 656 (1962).

⁶ D. H. NUGTEREN, *Biochim. J.* 89, 28p (1963).

⁷ D. R. HOWTON and J. F. MEAD, *J. biol. Chem.* 235, 3386 (1960).

⁸ W. STOFFEL, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 6, 270 (1961).

⁹ H. J. THOMASSON, *Nature* 194, 973 (1962).

¹⁰ C. B. STRUIJK, R. K. BEERTHUIS, H. J. J. PABON and D. A. VAN DORP, *Rec. Trav. Chim.* 85, 1233 (1966).

¹¹ R. JAKES, *Helv. physiol. Acta* 17, 255 (1959).

¹² S. ICHIKAWA and J. YAMADA, *Am. J. Physiol.* 203, 681, 685 (1962).

¹³ D. H. NUGTEREN, H. VONKEMAN and D. A. VAN DORP, *Rev. Trav. Chim.* 86, 1237 (1967).

¹⁴ T. DAKHIL and W. VOGT, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 243, 174 (1962).

¹⁵ Author's address: Olivier van Noortlaan 120, Vlaardingen (The Netherlands).