

Die Bildung höherer Alkohole bei Aminosäuremangelmутanten von *Saccharomyces cerevisiae*

II. Der Einfluß von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin

D. Vollbrecht*

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Eingegangen am 15. Januar 1974

The Formation of Higher Alcohols by Amino Acid Auxotrophic Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*

II. The Influence of Threonine, Isoleucine, Valine and Leucine

Abstract. 1. The influence of varying amounts of amino acids on the uptake of threonine, isoleucine, valine and leucine and their degradation to higher alcohols was investigated using a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*, mating type a, genetic markers ade2, hom2, thr4, ilv2, leu1.

2. The cell mass is increased by increasing concentrations of threonine, isoleucine, valine and leucine, the latter two resulting in a higher dry weight. The amino acids are completely utilised at low concentrations. At higher contents up to 20% of the amino acids remain in the medium. The uptake of threonine, isoleucine, valine and leucine depends on the relative amounts of the concentrations of these amino acids in the medium. A greater amount of an amino acid is taken up if its concentration is comparatively higher than those of the other amino acids. There is a competition between the amino acids for the uptake into the cells.

Higher amounts of intracellular isoleucine and leucine are converted to 2- and 3-methylbutanol when compared with the degradation of valine and threonine to isobutanol and *n*-propanol-1, isoleucine and leucine up to 90%, valine up to 24% and threonine up to 20%. There is a competition between the four amino acids for their degradation to the corresponding higher alcohols. This behaviour confirms the earlier assumption of a degradation of the four amino acids by unspecific enzymes.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae* — Higher Alcohols — Threonine — Isoleucine — Valine — Leucine — Amino Acids.

Zusammenfassung. 1. Die Aufnahme, der Abbau von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin zu höheren Alkoholen, die Steuerung der hieran beteiligten Vorgänge und der Aminosäurestoffwechsel in Abhängigkeit vom Aminosäureangebot wurde bei einer Mutante von *Saccharomyces cerevisiae*, genetische Marker a, ade2, hom2, thr4, ilv2, leu1 untersucht.

2. Durch ein steigendes Angebot der vier Aminosäuren wird die Zellmasse in der Regel vermehrt. Dabei führen Valin und Leucin zu einem höheren Zellertrag als

* Herrn Prof. Dr. F. Radler danke ich herzlich für das Thema, die großzügige Unterstützung und die anregenden Diskussionen.

Threonin oder Isoleucin. Bei geringen Gesamtaminosäurekonzentrationen werden die vier Aminosäuren fast vollständig aufgenommen. Bei höheren Gesamtaminosäurekonzentrationen bleiben bis 20% im Medium zurück. Die Aufnahme der vier Aminosäuren wird von dem Mengenverhältnis zueinander beeinflusst. Eine Aminosäure wird um so stärker aufgenommen, je mehr das Mengenverhältnis zu ihren Gunsten verschoben ist. Die Aminosäuren konkurrieren miteinander um die Aufnahme in die Zellen.

3. Die aufgenommenen Aminosäuren werden in unterschiedlichem Ausmaß zu den entsprechenden höheren Alkoholen abgebaut, Isoleucin und Leucin bis zu 90%, Valin zu maximal 24% und Threonin zu 20%. Die vier Aminosäuren konkurrieren um den Abbau zu den entsprechenden höheren Alkoholen. Dieser Befund steht mit der Annahme von Enzymen in Einklang, die unspezifisch den Abbau der vier Aminosäuren zu höheren Alkoholen katalysieren.

Bei der Untersuchung des Aminosäurestoffwechsels der Hefen ist die Bildung höherer Alkohole aus Methionin (Bärwald u. Kliem, 1971), Threonin, Isoleucin, Valin, Leucin, Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Histidin von theoretischer und praktischer Bedeutung. Zusammenfassende Darstellungen hierüber veröffentlichten Webb u. Ingraham (1963), Ingraham (1965) sowie Moutounet (1969). In einer früheren Arbeit (Vollbrecht u. Radler, 1973b) wurde der Abbau von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin zu den entsprechenden höheren Alkoholen in Wachstumsversuchen mit einer Aminosäuremangelmutterante von *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß die Bildung höherer Alkohole aus den entsprechenden Aminosäuren auf die exponentielle Phase begrenzt ist.

In dieser Veröffentlichung werden innerhalb des Stoffwechsels von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin die Vorgänge, die zur Entstehung der höheren Alkohole führen, und die Regulation der Permeabilität untersucht. Hierfür wird eine Mutante verwendet, bei der die Threonin-, Isoleucin-, Valin- und Leucinsynthese blockiert ist, so daß das Versuchssystem auf die Aufnahme dieser Aminosäuren und deren Abbau zu höheren Alkoholen begrenzt ist. Es wird erwartet, daß nach verschieden hohem Zusatz von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin anhand der aufgenommenen Mengen Aussagen möglich sein werden, ob und in welchem Ausmaß die verschiedenen Aminosäuren um den Transport in die Zellen konkurrieren. Aus dem Mengenverhältnis der gebildeten höheren Alkohole zu den aufgenommenen Aminosäuren läßt sich ein Hinweis darauf ableiten, ob an der Umwandlung der vier Aminosäuren zu höheren Alkoholen jeweils die gleichen Enzyme beteiligt sind.

Material und Methoden

Organismen. Der Hefestamm war eine Mutante von *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm a1327 A/78-4, Paarungstyp a, genetische Marker *ade2*, *hom2*, *thr4*, *ilv2*, *leu1* (Vollbrecht u. Radler, 1973b).

Medien. Für die Fermentationen wurde ein verändertes, vollsynthetisches Medium (CM1) nach Wickerham (1946) verwendet, das Methionin (670 μM), Isoleucin (460 μM), Leucin (460 μM), Threonin (500 μM), Valin (510 μM), Tyrosin (280 μM), Lysin (270 μM), Tryptophan (50 μM), Arginin (48 μM), Histidin (65 μM) und Phenylalanin (60 μM) enthielt. Das CRM-Medium enthielt als einzige Aminosäuren Methionin, Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin. Die Glucosekonzentration betrug 160 g/l. Die Gesamtaminosäurekonzentration außer der jeweils getesteten Aminosäure wurde wie 1:2:4:6 (CM1, CM2, CM4, CM6 bzw. CRM1, CRM2, CRM4, CRM6) variiert. Zur Untersuchung der Einflüsse einzelner Aminosäuren wurde bei unveränderter Konzentration der übrigen Aminosäuren jeweils die Menge von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin wie 1:2:4:6 verändert.

Fermentationen. Die Fermentationen wurden in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 200 ml Medium auf der Schüttelmaschine bei 27°C durchgeführt. Das Inokulum betrug 10^9 Zellen. Die Kolben wurden mit eingeschliffenen Gäraufsätzen verschlossen. Nach dem Beimpfen wurde die Luft nicht entfernt. Der Gärverlauf wurde anhand der CO_2 -Produktion gegen eine unbeimpfte Kontrolle verfolgt. Gegen Ende der Fermentation wurde zentrifugiert, der Überstand zur Bestimmung der höheren Alkohole und Aminosäuren bei -20°C aufbewahrt.

Bestimmungen. Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden die Zellen bei nachlassender Gärung zentrifugiert, in Wasser aufgenommen, durch Sartorius-Membranfilter SM 113 03, Porengröße 1,2 μm , filtriert und zweimal mit Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Die höheren Alkohole wurden gaschromatographisch (Vollbrecht u. Radler, 1973a), die Aminosäuren auf Ionenaustauschersäulen (Vollbrecht u. Radler, 1973b) getrennt und quantitativ bestimmt. Die gesamten α -Ketosäuren wurden als *p*-Nitrophenylhydrazone colorimetrisch bei 420 nm (Friedman, 1957), α -Ketoglutarat nach Reduktion anhand der Abnahme der Extinktion von NADH_2 bei 340 nm (Strecker, 1955; Bergmeyer u. Bernt, 1970), Pyruvat nach Decarboxylierung zu Glycolaldehyd und Reduktion zu Äthylenglycol anhand der Abnahme von NADH_2 bei 340 nm (Goedde u. Langenbeck, 1970; in Anlehnung an die Biochemica-Informationen von Boehringer-Mannheim) bestimmt.

Ergebnisse

Die gegenseitige Beeinflussung von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin bei der Aufnahme

Zur Klärung der Frage, ob und in welchem Ausmaß Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin um den Transport in die Hefezellen konkurrieren, wurden die Konzentrationen der vier Aminosäuren im Medium gegeneinander variiert. Wenn die Gärung zum Stillstand kam, wurde zentrifugiert und die Konzentrationen der vier Aminosäuren in der überstehenden Nährlösung bestimmt. Die Aufnahme der Aminosäuren wurde anhand der Differenz zwischen Ausgangskonzentration und der Konzentration gegen Ende der Gärung ermittelt.

Die Aufnahme von Threonin ist von der Konzentration im Medium und dem Gehalt der übrigen Aminosäuren abhängig. Threonin wird mit steigenden Konzentrationen im Medium zu maximal 99% aufgenommen (Tab.1). Steigende Konzentrationen der übrigen Aminosäuren hemmen

Tabelle 1. Die gegenseitige Beeinflussung von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin bei der Aufnahme durch *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm a1327A/78-4

Beeinflußt durch	Aufgenommene Aminosäuren in Prozent des Zusatzes			
	Threonin (3000 μ M)	Isoleucin (2760 μ M)	Valin (3060 μ M)	Leucin (2760 μ M)
CRM 1—CRM 6	99—76	98—83	97—81	100—92
CM 1—CM 6	70—45	n.b.	n.b.	n.b.
Threonin (500—3000 μ M)	—	58—88	69—81	77—92
Isoleucin (460—2760 μ M)	97—76	—	99—81	100—92
Valin (510—3060 μ M)	83—75	99—83	—	96—90
Leucin (460—2760 μ M)	83—75	95—83	90—81	—

Diese Tabelle gibt den Einfluß steigender Threonin-, Isoleucin-, Valin-, Leucin- und Gesamtaminosäurekonzentrationen (von CRM 1—CRM 6 bzw. CM 1—CM 6 — senkrechte Spalte) auf die Aufnahme der vier Aminosäuren wieder. Die Konzentration von Threonin (waagerechte Spalte) betrug 3000, die von Isoleucin 2760, von Valin 3060 und von Leucin 2760 μ M. Die Aufnahme der Aminosäuren wurde anhand der Differenz zwischen Einsatz und den im Medium gefundenen Restmengen errechnet. Aus dem Verhältnis von Aufnahme zu Einsatz wurde das Ausmaß der Aufnahme ermittelt, das in Prozenten angegeben ist. n.b. = nicht bestimmt.

die Aufnahme. Während in CRM 1 bei 3000 μ M Threonin 99% aufgenommen werden, sind dies in CRM 4 noch 90% und in CRM 6 76% des Einsatzes. Ein noch geringerer Prozentsatz an zugesetztem Threonin wird in CM aufgenommen, das außer den vier untersuchten sieben weitere Aminosäuren enthielt, in CM 1 70%, in CM 4 61% und in CM 6 noch 45%. Die Aufnahme von Isoleucin, Valin und Leucin wird in CM 1 und CRM 1 durch Threoninzusatz nicht wesentlich beeinflusst, in CM 4 und CRM 4 bzw. CM 6 und CRM 6 hingegen gefördert. Threonin konkurriert hiernach offenbar nicht mit den übrigen Aminosäuren um die Aufnahme.

Isoleucin wird in CRM bei 460 μ M vollständig aufgenommen. Bei 1840 und 2760 μ M bleiben Reste im Medium zurück, die mit steigender Konzentration der übrigen Aminosäuren (CRM 1 bis CRM 6) zunehmen. Steigt die Isoleucinkonzentration von 460 auf 2760 μ M, wird die Aufnahme der drei übrigen Aminosäuren gehemmt. Als Beispiel seien die Verhältnisse in CRM 6 herangezogen (Tab. 1): Threonin wird zwischen 97 und 76%, Valin zwischen 99 und 81% und Leucin zwischen 100 und 92% der eingesetzten Konzentration aufgenommen. Andererseits hemmen steigende Konzentrationen von Valin und Leucin die Aufnahme von

Isoleucin. So wird Isoleucin bei einer Konzentration von 2760 μM in CRM1 zu 98%, in CRM4 zu 97% und in CRM6 zu 83% aufgenommen.

Anders als bei Threonin besteht hier eine Konkurrenz um die Aufnahme zwischen Isoleucin sowie Valin und Leucin.

Valin wird in CRM1 bei Konzentrationen zwischen 510 und 3060 μM mit 97% fast vollständig aufgenommen (Tab. 1). Bei höheren Gesamtaminosäurekonzentrationen (CRM4 und CRM6) ist die Aufnahme weniger vollständig, bei 3060 μM Valin in CRM4 mit 88% und in CRM6 81% der eingesetzten Konzentration. Zunehmende Konzentrationen der übrigen Aminosäuren (CRM1 bis CRM6) hemmen also die Aufnahme von Valin. Steigt andererseits die Valinkonzentration im Medium von 510 auf 3060 μM , wird die Aufnahme von Threonin, Isoleucin und Leucin gehemmt. Dies wird besonders deutlich in CRM4 und CRM6. In CRM6 z.B. wird die Aufnahme von Threonin von 83 auf 75%, Isoleucin von 99 auf 83% und die von Leucin von 96 auf 90% der eingesetzten Konzentration erniedrigt. Die im vorangegangenen Abschnitt dargestellte Konkurrenz von Isoleucin, Valin und Leucin um die Aufnahme wird durch diese Ergebnisse bestätigt.

Leucin wird bei Konzentrationen bis 2760 μM in CRM1 vollständig, in CRM4 zu 98% und in CRM6 zu 92% aufgenommen. Die Aufnahme dieser Aminosäure wird also durch steigende Konzentrationen der anderen (CRM1 bis CRM6) gehemmt und umgekehrt. Steigt die Konzentration an Leucin auf 3060 μM , wird die Aufnahme der drei anderen Aminosäuren besonders in CRM4 und CRM6 verringert, in CRM6 z.B. die von Threonin von 83 auf 75%, Isoleucin von 95 auf 83% und Valin von 90 auf 81% der eingesetzten Konzentration (Tab. 1).

Während Isoleucin, Valin und Leucin sich gegenseitig und gemeinsam Threonin bei der Aufnahme hemmen, wird die Aufnahme der drei Aminosäuren durch Threonin nicht beeinträchtigt. Hinsichtlich der Konkurrenz bei der Aufnahme nimmt Threonin demnach unter den vier Aminosäuren eine Sonderstellung ein. Die Aufnahme einer der übrigen Aminosäuren ist von dem Anteil an der Gesamtaminosäurekonzentration abhängig und dabei um so größer, je mehr sich dieser Anteil zu ihren Gunsten verschiebt.

Der Einfluß von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin auf die Zellmasse, die Ausscheidung von α -Keto- und Aminosäuren

Der Einfluß verschiedener Threonin-, Isoleucin-, Valin- und Leucin-konzentrationen auf die gebildete Zellmasse der verwendeten Mutante wurde untersucht, um den Wert dieser Aminosäuren als Nährstoffe und den in den Hefen aufgenommenen Anteil zu bestimmen. Die Zellausbeute wurde durch steigende Konzentrationen der vier Aminosäuren in

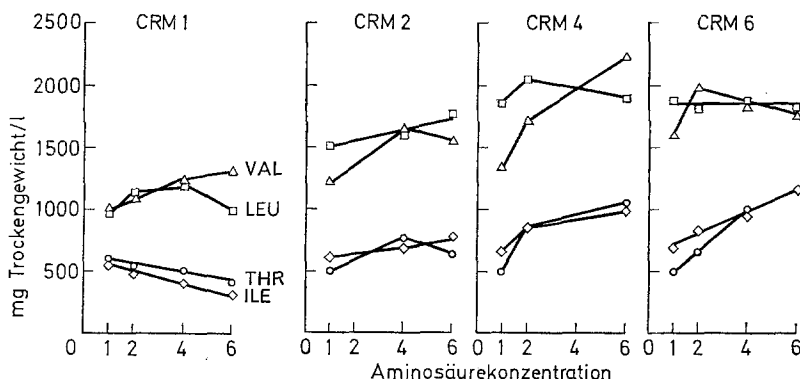


Abb. 1. Der Einfluß steigender Konzentrationen an Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin in CRM1, CRM2, CRM4 und CRM6 auf den Zellertrag von *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm a1327 A/78-4. Die Konzentrationen der vier Aminosäuren sind auf der Abszisse aufgetragen, das Trockengewicht auf der Ordinate. Die Konzentration jeweils einer Aminosäure wurde bei gleichbleibenden Konzentrationen der übrigen drei Aminosäuren (z. B. in CRM1) wie 1:2:4:6 variiert: Threonin zwischen 500, 1000, 2000 und 3000 μ M, Isoleucin und Leucin 460, 920, 1840 und 2760, Valin 510, 1020, 2040 und 3060 μ M. Die mit ILE, THR, LEU und VAL bezeichneten Kurven lassen erkennen, wie sich der Zellertrag mit steigender Konzentration der vier Aminosäuren verändert

der Regel gefördert. Der Zusatz von Valin und Leucin führte zu einer höheren Zellmasse als der von Threonin oder Isoleucin (Abb. 1). Lediglich bei geringen Gesamtamino­säurekonzentrationen verringerten zunehmende Threonin- und Isoleucinmengen die Zellausbeute.

Anhand der Trockengewichte wurden nach Hoppe (1971) die in den Zellen befindlichen Konzentrationen an Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin errechnet. Hierbei wurde von der durch Bergner u. Haller (1969) sowie Jones *et al.* (1969) bestätigten Voraussetzung ausgegangen, daß sich der Gehalt der Hefezellen an Aminosäuren vor und gegen Ende der Gärung nur geringfügig unterscheidet. Die errechnete Konzentration der vier Aminosäuren in den Zellen ließ vermuten, daß das aufgenommene Isoleucin und Leucin vollständig in die Zellen eingebaut wurde, soweit nicht Teile davon, die nicht in das Trockengewicht eingehen, zu höheren Alkoholen abgebaut und ausgeschieden worden waren. Von den aufgenommenen beiden anderen Aminosäuren hingegen wurde nur ein Teil eingebaut, 5–33% von Threonin und 15–95% an Valin, ein anderer Teil, maximal 20% an aufgenommenem Threonin und 24% an Valin, wurde zu *n*-Propanol-1 bzw. Isobutanol abgebaut. Der Rest scheint anders verwertet worden zu sein.

Tabelle 2. Der Einfluß steigender Gesamtaminosäurekonzentrationen auf die Ausscheidung von α -Ketosäuren bei *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm a1327A/78-4

Substanz	CM1	CM2	CM4	CM6
Pyruvat	380	480	570	650
α -Ketoglutarat	220	200	160	140
Summe ⁺	600	680	730	790
Gesamtketosäuren	600	620	760	800

Die Ausscheidung der genannten Substanzen wurde gegen Ende der Fermentationen in CM1—CM6 ermittelt. Die Summe⁺ wurde durch Addition der Konzentrationen von Pyruvat und α -Ketoglutarat errechnet. Alle Konzentrationsangaben in μ M.

Einige α -Ketosäuren sind als Zwischenprodukte des Abbaus der Aminosäuren zu höheren Alkoholen interessant. Steigende Gesamtaminosäurekonzentrationen fördern die Ausscheidung von Pyruvat und verringern die von α -Ketoglutarat. Die Summe der Konzentrationen von Pyruvat und α -Ketoglutarat entspricht den Werten, die bei der Bestimmung der Gesamtketosäuren erhalten wurden. Hiernach ist anzunehmen, daß die durch Transaminierung aus Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin entstandenen α -Ketosäuren nicht in nennenswerten Mengen ausgeschieden wurden (Tab.2).

Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin, die in CM und CRM vorhanden waren, komplementierten nicht nur die Defekte der verwendeten Mutante, sondern sie wurden z. T. in erheblichem Ausmaß (90%) zu höheren Alkoholen abgebaut (s.u.). Bei begrenztem Angebot an Stickstoffquellen wurden die dabei freiwerdenden Aminogruppen zur Synthese anderer Aminosäuren verwendet (Jones *et al.*, 1969). Im folgenden wird eine Übersicht über den Einfluß steigender Konzentrationen an Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin auf Ausscheidung und Verbrauch saurer, neutraler und basischer Aminosäuren gegeben. Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure, Prolin, Glycin und Alanin waren weder dem vollständigen (CM) noch dem vereinfachten Medium (CRM) zugesetzt worden. Sie wurden von den Hefen selbst synthetisiert. Tyrosin, Phenylalanin, Lysin, Histidin und Arginin waren in CM vorhanden, fehlten jedoch in CRM.

In allen untersuchten Medien (CRM1-CRM6 und CM1-CM6) wurden von den Hefen Aminosäuren ausgeschieden, vor allem Alanin (50—780 μ M), Glutaminsäure (30—530 μ M), Glycin (10—400 μ M), Prolin (20—220 μ M) und Serin (10—110 μ M). Ornithin (10—60 μ M), 4-Aminobuttersäure (10—40 μ M), Asparaginsäure (3—30 μ M), Phenylalanin (Spuren—30 μ M) und Tyrosin (0—10 μ M) wurden in geringen Mengen gefunden. Die

Ausscheidung dieser Aminosäuren war der Konzentration der gesamten Aminosäuren und der von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin direkt, die Ausscheidung von Histidin ($30-0\ \mu\text{M}$) und Arginin ($280-50\ \mu\text{M}$) war der Zunahme der vier Aminosäuren umgekehrt proportional. Die in CM gegen Ende der Fermentationen gefundenen Argininmengen überstiegen die eingesetzten Beträge deutlich. Hieraus folgt, daß die Synthese dieser Aminosäure auch bei Zusatz zum Medium abläuft. Hinsichtlich des Ausmaßes der Ausscheidung der Aminosäuren wurde keine unterschiedliche Beeinflussung durch Threonin, Isoleucin, Valin oder Leucin festgestellt. Methionin, das den Medien zugesetzt worden war, wurde bis auf Spuren aufgenommen.

Die Bildung höherer Alkohole aus Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin in Abhängigkeit von der Konzentration der vier Aminosäuren im Medium

Threonin wird in CRM1 bei nahezu vollständiger Aufnahme zu maximal 20% zu *n*-Propanol-1 abgebaut (Tab.3). Die Bildung von *n*-Propanol-1 ist der Threoninkonzentration in den Zellen proportional. Bei steigenden Gesamtaminosäurekonzentrationen (CRM2 bis CRM6) verringert sich der Abbau auf 6% der aufgenommenen Aminosäure. Vergleichbare Ergebnisse wurden in CM1 bis CM6 erhalten. Nimmt die Threoninkonzentration in den Zellen von 430 auf 2370 μM zu, steigt also der Anteil dieser Aminosäure an der Gesamtaminosäurekonzentration, vergrößert sich der Prozentsatz, der zu *n*-Propanol-1 abgebaut wird, von 5 auf 7%. Der Prozentsatz der drei übrigen Aminosäuren, der bei steigenden Threoninkonzentrationen in höhere Alkohole umgewandelt wird, nimmt bei den verschiedenen Gesamtaminosäurekonzentrationen (CRM1, CRM2, CRM4, CRM6) im allgemeinen zu. In CRM6 z. B. wird das Ausmaß der Umwandlung von Isoleucin zu 2-Methylbutanol-1 nicht signifikant beeinflusst, wohl aber das von Valin zu Isobutanol (8–12%) und das von Leucin zu 3-Methylbutanol-1 (77–94%).

Steigt die intracelluläre Konzentration an Isoleucin in CRM6 von 450 auf 2300 μM (Tab.3), werden 52–88% dieser Aminosäure zu 2-Methylbutanol-1 abgebaut. Der Abbau zu 2-Methylbutanol-1 ist also der Isoleucinkonzentration in den Zellen proportional und nimmt mit steigendem Anteil von Isoleucin an der Gesamtaminosäurekonzentration zu. Durch steigende Gesamtaminosäurekonzentrationen (CRM1 bis CRM6) wird der Isoleucinabbau bei einem Einsatz dieser Aminosäure von 2760 μM geringfügig negativ beeinflusst, wohl deswegen, weil sich das Verhältnis zwischen Isoleucin und den übrigen Aminosäuren, zuungunsten von Isoleucin verändert. Durch zunehmende intracelluläre Isoleucinkonzentrationen, bei steigendem Anteil von Isoleucin an der Gesamtaminosäurekonzentration, wird die Umwandlung der drei übrigen

Tabelle 3. Die gegenseitige Beeinflussung von in die Zellen aufgenommenem Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin beim Abbau zu *n*-Propanol-1, 2-Methylbutanol-1, Isobutanol und 3-Methylbutanol-1 durch *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm a1327 A/78-4

Beeinflußt durch	Threonin	Isoleucin	Valin	Leucin
CRM1—CRM6	20— 6	90—88	42—12	90—78
CM1—CM6	16— 7	n.b.	n.b.	n.b.
Threonin				
(430—2270 μ M)	5— 7	86	8—12	77—94
Isoleucin				
(460—2300 μ M)	20— 6	52—88	24—12	85—76
Valin				
(480—2500 μ M)	7—55	91—77	8—12	91—78
Leucin				
(450—2540 μ M)	15— 5	95—76	17—11	70—80

In dieser Tabelle ist der Einfluß steigender Threonin-, Isoleucin-, Valin- und Leucinkonzentrationen in der Zelle sowie steigender Gesamtaminosäurekonzentrationen, CM1—CM6 und CRM1—CRM6 (senkrechte Randspalte) auf den Abbau der vier in den Zellen befindlichen Aminosäuren zu höheren Alkoholen (waagerechte Spalte) dargestellt. Der Einfluß von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin wurde in CRM6 ermittelt. Der Abbau der vier Aminosäuren zu höheren Alkoholen ist als Prozentsatz der aufgenommenen Konzentrationen angegeben. n.b. = nicht bestimmt.

Aminosäuren zu höheren Alkoholen beeinträchtigt. So nimmt in CRM6 *n*-Propanol-1 von 20 auf 6% an in die Zellen aufgenommenem Threonin ab, Isobutanol von 24 auf 12% an Valin und 3-Methylbutanol-1 von 85 auf 76% an aufgenommenem Leucin.

In den Zellen befindliches Valin wird zu maximal 24%, proportional der Valinkonzentration zu Isobutanol abgebaut. Steigt bei 3010 μ M Valin im Medium die Gesamtaminosäurekonzentration von CRM1 auf CRM6, wird der Abbau bis auf 12% an intracellulärem Valin gehemmt, offenbar bedingt durch eine Verschiebung des Anteils an der Gesamtaminosäurekonzentration zuungunsten von Valin (Tab. 3). Intracelluläre Valinkonzentrationen von 480—2500 μ M hemmen in CRM6 den Abbau von aufgenommenem Threonin (7—5%), Isoleucin (91—78%) und Leucin (91—78%), während der Anteil an Valin, der zu Isobutanol umgewandelt wird, von 8 auf 12% ansteigt. Dieser Anstieg ist möglicherweise durch den vergrößerten Anteil von Valin an der Gesamtaminokonzentration bedingt.

Das bei einer eingesetzten Konzentration von 2760 μ M in die Zellen gelangte Leucin wird zu maximal 90% zu 3-Methylbutanol-1 abgebaut

(Tab.3). Steigende Gesamtaminosäurekonzentrationen (CRM1 bis CRM6) verringern den Abbau auf 78%. Diese Hemmung scheint, wie bei Isoleucin und Valin, durch eine Verschiebung des Anteils an der intracellulären Gesamtaminosäurekonzentration zugunsten von Leucin bedingt zu sein. Nimmt andererseits in CRM6 die Leucinkonzentration in den Zellen von 450 auf 2450 μM zu, erhöht sich also der Anteil dieser Aminosäure an der Gesamtaminosäurekonzentration, steigt proportional der zu 3-Methylbutanol-1 abgebaute Prozentsatz von 70 auf 80%. Gleichzeitig wird der Abbau von Threonin (15—5%), Isoleucin (95—76%) und Valin (17—11%) gehemmt.

Diskussion

Durch Zusatz von Valin und Leucin wurde das Wachstum des Stammes a1327A/78-4 stärker gefördert als mit Threonin oder Isoleucin. Gleichartige Beobachtungen machten Ribéreau-Gayon u. Peynaud (1966). Offenbar besitzen die vier Aminosäuren unterschiedlichen Wert für die Ernährung der Hefen. Der Gesamtaminosäuregehalt war suboptimal, so daß die Mutante die Aminosäuren nicht nur zur Komplementation der Defekte, sondern auch als Stickstoffquellen benötigte. Wie sich anhand der über die Trockengewichte nach Hoppe (1971) berechneten Aminosäuregehalte zeigen ließ, werden Isoleucin und Leucin nahezu vollständig in die Hefezellen aufgenommen und dort „intakt assimiliert“, d.h. direkt zur Proteinsynthese verwendet, soweit sie nicht zu 2- und 3-Methylbutanol-1 umgewandelt werden, während die „intakte Assimilation“ bei Valin und Threonin eine geringere Rolle spielt. Die aufgenommenen Aminosäuren werden z. T. unmittelbar in Proteine eingebaut, z. T. dienen ihre Abbauprodukte nach Decarboxylierung als H-Akzeptoren zur Regeneration von NAD(P)H_2 , wobei die Aminogruppen für die Synthese anderer Aminosäuren verwendet werden (Jones *et al.*, 1969), oder sie werden, wie anscheinend Valin und Threonin, in erheblichem Ausmaß auf andere Weise abgebaut. Die „intakte Assimilation“ ist somit eine von mehreren Möglichkeiten der Verwendung aufgenommener Aminosäuren, keinesfalls aber, wie Thorne (1949) annahm, die bedeutendste (Jones *et al.*, 1965; Jones u. Pierce, 1964, 1969; Palmqvist u. Äyräpää, 1969).

Bei allen Versuchen wurden Aminosäuren ausgeschieden. Hierbei überwog Alanin, gefolgt von Glutaminsäure, Prolin, Arginin, Lysin und Glycin. Serin, Asparaginsäure, Ornithin und 4-Aminobuttersäure gelangten in vergleichsweise unbedeutenden Mengen in das Medium. Dies stimmt, abgesehen von Alanin, mit den Ergebnissen von Ribéreau-Gayon u. Peynaud (1966) überein, die, wie auch Lafon-Lafourcade *et al.* (1962), qualitative und quantitative Veränderungen in Abhängigkeit

von Art und Zusammensetzung der Stickstoffquelle beobachteten. Die Ausscheidung setzte in meßbaren Mengen während der exponentiellen Phase ein und dauerte während der stationären Phase an (Vollbrecht u. Radler, 1973b). Dies stimmt mit den Befunden von Jones *et al.* (1965) sowie Bergner u. Haller (1969) überein. Der Exkretion der Aminosäuren scheint kein aktiver Transport zugrunde zu liegen, sondern Diffusion (Dupuy *et al.*, 1967). Die überwiegende Ausscheidung von Alanin wurde von den genannten Autoren nicht beobachtet. Sie fanden vielmehr, daß nur relativ geringe Mengen dieser Aminosäure in das Medium gelangen. Eventuell ist dieses Phänomen eine Besonderheit der verwendeten Mutante.

Bei dem Stamm a1327A/78-4 waren die Synthesewege von Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin durch verschiedene Defekte blockiert. Die Mutante benötigte dementsprechend diese Aminosäuren zum Wachstum. Da die Biosynthese der vier Aminosäuren unterbrochen war, spielten Fragen der Endprodukthemmung oder Repression keine Rolle. Das gesamte System war auf die Aufnahme der Aminosäuren und ihren Abbau zu den höheren Alkoholen begrenzt. Die Arbeit mit diesem Stamm ermöglichte Aussagen über die Permeabilität der vier Aminosäuren und die an deren Abbau zu höheren Alkoholen beteiligten Vorgänge. Die Aufnahme einzelner Aminosäuren wurde durch das Angebot der übrigen beeinflußt. Durch zunehmende Konzentrationen einzelner Aminosäuren wurde die Aufnahme der übrigen Aminosäuren gehemmt. Umgekehrt wurde die Absorption einzelner Aminosäuren um so unvollständiger, je größer das Angebot der übrigen Aminosäuren war. Die Aufnahme einer Aminosäure ist damit um so größer, je mehr sich das Mengenverhältnis zu ihren Gunsten verschiebt. Diese Befunde lassen sich der Funktion eines Permeasesystems zuschreiben (Surdin *et al.*, 1964, 1965; Grenson *et al.*, 1970), das unspezifisch den Transport aller angebotenen Aminosäuren bewirkt, wobei die einzelnen Komponenten um die Substratbindungsstellen konkurrieren. Threonin scheint bei der Aufnahme etwas anderen Gesetzmäßigkeiten zu unterliegen. Vielleicht wirken geringe Threoningaben bei hohen Gesamtaminosäuregehalten deswegen fördernd auf Absorption und Verwertung der übrigen Aminosäuren, weil hier Threonin als begrenzender Faktor wirksam ist. Die innerhalb einer Zeiteinheit absorbierten Aminosäuremengen sind um so größer, je größer das Angebot der Aminosäuren im Medium ist. Ein höheres Angebot führt zu gesteigerter Aufnahme durch die Hefen bei gleichzeitig gedrosselter Neusynthese (Jones u. Pierce, 1969; Äyräpää, 1965, 1967, 1970, 1971). Dennoch ist während der Absorption der Aminosäuren aus dem Medium die Neusynthese erheblich (Jones *et al.*, 1969), wie die während den Fermentationen in CM über die Ausgangswerte steigende Zunahme von Arginin zeigt.

Aussagen hinsichtlich der Aktivität der an dem Abbau der Aminosäuren zu den entsprechenden höheren Alkoholen beteiligten Enzyme lassen sich anhand des Verhältnisses der aufgenommenen Aminosäuren zu den höheren Alkoholen treffen. Eine von vielen Autoren beobachtete Erscheinung ist die unterschiedliche Produktion von *n*-Propanol-1 Isobutanol, 2- und 3-Methylbutanol-1. Dies zeigte sich auch in früheren Versuchen (Vollbrecht u. Radler, 1973b) und kehrte in den hier dargestellten Ergebnissen wieder: Isobutanol und *n*-Propanol-1 wurden, bei gleichem Angebot der entsprechenden Aminosäuren, in weitaus geringeren Mengen produziert und ausgeschieden als 2- und 3-Methylbutanol-1. Anscheinend sind die an dem Abbau der in die Hefen aufgenommenen Aminosäuren zu den höheren Alkoholen beteiligten Enzyme in unterschiedlichem Maße wirksam. Geht man davon aus, daß der Abbau der vier Aminosäuren zu den entsprechenden höheren Alkoholen durch die gleichen substratunspezifischen Enzyme katalysiert wird, läßt sich die unterschiedliche Produktion durch verschiedene Substrataffinität erklären. Steigende Angebote einzelner Aminosäuren würden nach Maßgabe der jeweiligen Affinität zur zunehmenden Beladung der Enzyme führen und damit zu einer Verringerung der Anlagerung der übrigen Substrate. Ein steigendes Leucinangebot z. B. müßte einerseits zur Steigerung der Produktion von 3-Methylbutanol-1 führen, andererseits den Abbau der übrigen Aminosäuren zu höheren Alkoholen hemmen. Die Ergebnisse zeigen, daß tatsächlich diese Beziehung besteht. Kunkee *et al.* (1966) sowie Watson u. Hough (1969) untersuchten die Aktivitäten der an der Synthese der höheren Alkohole beteiligten Decarboxylase und Alkoholdehydrogenase unter verschiedenen Bedingungen. Es gelang ihnen nicht zu entscheiden, ob die unter veränderten Bedingungen beobachteten Enzyme identisch waren oder nicht. Die Untersuchungen mit dem Stamm a1327A/78-4 weisen darauf hin, daß die gleichen Enzyme unspezifisch an der Synthese von *n*-Propanol-1, Isobutanol, 2- und 3-Methylbutanol-1 beteiligt sind.

Diese Arbeit wurde durch eine Beihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Literatur

- Äyräpää, T.: The formation of phenethyl alcohol from ^{14}C -labelled phenylalanine. *J. Inst. Brew.* **71**, 341—347 (1965)
- Äyräpää, T.: Formation of higher alcohols from ^{14}C -labelled valine and leucine. *J. Inst. Brew.* **73**, 17—30 (1967)
- Äyräpää, T.: Der Einfluß der Temperatur auf die Bildung höherer Alkohole durch Kulturhefen. *Brauwiss.* **23**, 48—55 (1970)
- Äyräpää, T.: Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. *J. Inst. Brew.* **77**, 266—276 (1971)
- Bärwald, G., Kliem, D.: Ein Beitrag zum Methioninstoffwechsel der Hefe (*S. cerevisiae*). *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1**, 27—32 (1971)

- Bergmeyer, H. U., Bernt, E.: α -Ketoglutarat. UV-Spektrophotometrische Bestimmung. In: Methoden der Enzymatischen Analyse, H. U. Bergmeyer, Ed., Vol. II, pp. 1536—1539. Weinheim (Bergstr.): Verlag Chemie 1970
- Bergner, K. G., Haller, H. E.: Das Verhalten der freien Aminosäuren von Weißwein im Verlauf der Gärung bei Ausbau, Lagerung und Umgärung. Mitt. Rebe und Wein, Klosterneuburg **19**, 264—288 (1969)
- Dupuy, P., Morfaux, J.-N., Usciati, M.: Métabolisme azoté des levures en oenologie. Ferm. Vinific. 2^e Symp. Int. d'Oenol. Bordeaux-Cognac, pp. 107—123 (1967)
- Friedemann, T. E.: Determination of α -keto acids. In: Methods in enzymology, S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Eds., Vol. III, pp. 414—418. London-New York: Academic Press 1957
- Goedde, H. W., Langenbeck, U.: Glykolaldehyd. In: Methoden der Enzymatischen Analyse, H. U. Bergmeyer, Ed., Vol. II, pp. 1472—1474. Weinheim (Bergstr.): Verlag Chemie 1970
- Grenson, M., Hou, C., Crabeel, M.: Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a general amino acid permease. J. Bact. **103**, 770—777 (1970)
- Hoppe, W.: Aminosäureanalysen in biologischem Material. 1. Mitt. Einfluß von Hydrolysenbindungen sowie von Kohlenhydraten und Purinbasen. Z. Lebensmittelunters. **147**, 14—20 (1971)
- Ingraham, J. L.: Fusel oil formation by yeasts. Techn. Quart. M.B.A.A. **2**, 85—87 (1965)
- Jones, M., Pierce, J. S.: Absorption of amino acids from wort by yeasts. J. Inst. Brew. **70**, 307—315 (1964)
- Jones, M., Power, D. M., Pierce, J. S.: The absorption of α -amino acids by culture yeasts. Europ. Brew. Conv. Proc. 10th Congr. Stockholm, pp. 182—194 (1965)
- Jones, M., Pragnell, M. J., Pierce, J. S.: Absorption of amino acids by yeasts from a semi-defined medium simulating wort. J. Inst. Brew. **75**, 520—536 (1969)
- Jones, M., Pierce, J. S.: Nitrogen requirements in wort—practical applications. Europ. Brew. Conv. Proc. 12th Congr. Interlaken, pp. 151—160 (1969)
- Kunkee, R. E., Guymon, J. F., Crowell, E. A.: Formation of *n*-propyl alcohol by cell-free extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Inst. Brew. **72**, 530—536 (1966)
- Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E.: Constitution des protides des levures en fonction de leur alimentation azotée. C. R. Acad. Sci. (Paris) **254**, 1688—1690 (1962)
- Moutounet, M.: Biosynthèse des alcools supérieurs des boissons fermentées. Ann. Technol. agric. **18**, 249—261 (1969)
- Palmqvist, U., Åyräpää, T.: Uptake of amino acids in bottom fermentations. J. Inst. Brew. **75**, 181—190 (1969)
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E.: Alimentation des levures et produits de leur métabolisme. Ann. Nutr. Aliment. **20**, 1—23 (1966)
- Strecker, H. J.: L-Glutamic dehydrogenase from liver. In: Methods in enzymology, S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Eds., Vol. II, pp. 220—225. London-New York: Academic Press 1955
- Surdin, Y., Sly, W., Sire, J., Bordes, A. M., de Robichon-Szulmajster, H.: Système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*: propriétés et contrôle génétique. C. R. Acad. Sci. (Paris) **258**, 5046 (1964)
- Surdin, Y., Sly, W., Sire, J., Bordes, A. M., de Robichon-Szulmajster, H.: Propriétés et contrôle génétique du système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **107**, 546 (1965)
- Thorne, R. S. W.: Nitrogen metabolism of yeast. A consideration of the mode of assimilation of amino acids. J. Inst. Brew. **55**, 201—222 (1949)

- Vollbrecht, D., Radler, F.: Zur raschen gaschromatographischen Bestimmung höherer Alkohole. Mitt. Rebe und Wein, Klosterneuburg **23**, 179—184 (1973a)
- Vollbrecht, D., Radler, F.: Die Bildung höherer Alkohole bei Aminosäuremangelmutanten von *Saccharomyces cerevisiae*. I. Der Abbau von Aminosäuren zu höheren Alkoholen. Arch. Mikrobiol. **94**, 351—358 (1973b)
- Watson, T. G., Hough, J. S.: Conversion of α -keto-isocaproic acid to isoamyl alcohol by yeast pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase. J. Inst. Brew. **75**, 359—363 (1969)
- Webb, A.-D., Ingraham, J. L.: Fusel oil. Advanc. appl. Microbiol. **5**, 317—354 (1963)
- Wickerham, L. J.: A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. J. Bact. **52**, 293 (1946)

Dr. D. Vollbrecht
Institut für Mikrobiologie
der Universität
D-3400 Göttingen
Grisebachstr. 8
Bundesrepublik Deutschland