

**12. Kazuaki Iizuka,*¹ Michihiro Yamada,*² Junnosuke Suzuki,*¹
Isawo Seki,*² Ko Aida,*¹ Shigenobu Okuda,*¹ Toshinobu Asai*¹
und Kyosuke Tsuda*¹: Untersuchungen auf dem Gebiet der mikro-
biologischen Umsetzung. XVI.¹⁾ Umwandlung von Alkaloiden
in der Morphin-Reihe durch *Trametes sanguinea*. (1).**

(Institut für angewandte Mikrobiologie der Universität Tokyo*¹
und Takamine Forschungslaboratorium, Sankyo A. G.*²)

Während in den letzten Jahren die mikrobiologische Umwandlung von Steroiden eingehend bearbeitet worden ist, ist das Verhalten der Alkaloide gegenüber den Enzym-systemen der Mikroorganismen mit Ausnahme von Nikotin²⁾ und Yohimbealkaloid³⁾ bisher noch nicht untersucht worden.

Im folgenden berichten wir über die mikrobiologische Umsetzung von Morphin-alkaloiden mit *Trametes sanguinea* (*Polystictus sanguineus*).⁴⁾ Die mikrobiologischen Um-setzungen wurden unter aeroben Konditionen in Schüttelkulturen bei 30° durchgeführt. Dabei bewährte sich die Papierchromatographie nach der Methode von Levine⁵⁾ bzw. von Büchi⁶⁾ zur Verfolgung des Reaktionsverlaufes. Wenn die Vorversuche befriedigend waren, wurden die Reaktionen mit größeren Substratmengen wiederholt, um die präparative Isolierung der gebildeten Produkte zu ermöglichen.

Thebain (I) wurde zuerst zur Umsetzungsreaktion gebracht. Wenn eine Nährlösung von Koji-Extrakt mit Corn-steep Liquor (0.3%) (Nährlösung Nr. 1) verwendet wurde, so wurden nach achttägiger Kultur zwei krist. Stoffe erhalten. Das erste Produkt von Schmp. 271~272° wurde mit einer Ausbeute von ca. 40% gewonnen und erwies sich nach allen Daten identisch mit 14 β -Hydroxycodeinon (II).^{7,8)} Das zweite Produkt vom Schmp. 157~157.5° wurde bei einigen analogen Verfahren immer in geringer Menge erhalten und mit dem aus (II) durch Natriumborhydrid-Reduktion gewonnenen 14 β -Hydr-oxycodein (III)^{7,9)} identifiziert. Wenn anstatt der obengenannten Nährlösung eine wä-ssrige Lösung von 1% Glucose, 0.2% Pepton, 0.1% Rindfleisch-Extrakt, 0.1% Hefe-Extrakt und 0.3% Corn-steep Liquor (Nährlösung Nr. 2) zur Kultur gebracht wurde, so ließen sich auch (II) und (III) als Reaktionsprodukt nachweisen. Dabei aber kehrte sich das Mengen-verhältnis der beiden Produkte um, und das (III) war diesmal das Hauptprodukt, mit einer Ausbeute von ca. 55%.

*¹ Yayoicho, Bunkyo-ku, Tokyo (飯塚和明, 鈴木準之助, 相田 浩, 奥田重信, 朝井勇宣, 津田恭介).

*² 1-888, Nishi-shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo (山田道弘, 関 功).

1) XV Mitt. Y. Sato, A. Naito, M. Kato, H. Iizuka, K. Tsuda: Dieses Bulletin, **9**, 932 (1961).

2) E. Wada, K. Yamasaki: J. Am. Chem. Soc., **76**, 155 (1954); E. Wada: Arch. Biochem. Biophys., **72**, 145 (1957); T. Tabuchi: J. Agr. Chem. Soc. Japan, **29**, 219, 222 (1955); W.G. Frankenburg, A.M. Gottscho, A.A. Vaitekunas, R.M. Zacharius: J. Am. Chem. Soc., **77**, 5730 (1955); L.I. Hochstein, S.C. Rittenberg: J. Biol. Chem., **234**, 157 (1959).

3) W.O. Godtfredsen, G. Korsby, H. Lork, S. Vangedal: Experientia, **14**, 88 (1958); S.C. Pan, F. L. Weisenborn: J. Am. Chem. Soc., **80**, 4749 (1958); Y. H. Loo, M. Reidenberg: Arch. Biochem. Biophys., **79**, 257 (1959).

4) Was die mikrobiologische Umwandlung der organischen Verbindung durch diese Pilze betrifft, so ist über Phenol-Oxydase-Wirkung (K. Law: Ann. Botany (London), **19**, 561 (1955)), sowie auch über die Umwandlung von Benzoesäure (K. Minami, T. Fukuzumi: J. Japan Forestry Soc., **38**, 225 (1956)) bereits berichtet worden.

5) J. Levine, H. Fischbach: J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., **44**, 543 (1955).

6) J. Büchi, R. Huber, H. Schumacher: Bull. on Narcot., 1960 (April-June), 25.

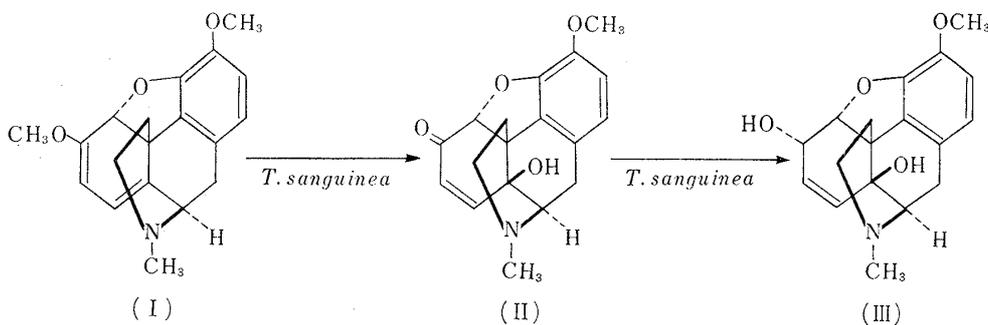
7) R. H. F. Manske, H. L. Holmes: "The Alkaloids," **II**, 91 (1952), Academic Press Inc., New York.

8) Fel'Dman, Lyutenberg: J. Appl. Chem. (USSR), **18**, 715 (1945).

9) A. C. Currie, J. Gillon, G. T. Newbold, F. S. Spring: J. Chem. Soc., **1960**, 773.

Wir haben daher den Reaktionsverlauf nochmals papierchromatographisch verfolgt. Bei Nährlösung Nr. 1 wurde der Anfangs-pH-Wert, d. h. 4.8, mit dem Verlauf der Fermentation immer kleiner, und zum Schluß war der pH-Wert 3.2. Dabei ließ sich Thebain etwas schneller ins 14 β -Hydroxycodeinon (II) (Rf 0.7*³) umwandeln, wohingegen das Hervorkommen des 14 β -Hydroxycodeins (III) (Rf 0.3*³) sehr langsam war. Damit wurde das (II) hauptsächlich in der Nährlösung Nr. 1 akkumuliert. Bei der Umsetzung in Nährlösung Nr. 2 veränderte sich der Anfangs-pH-Wert (5.4) mit dem Verlauf der Fermentation bis zu 8.0. Thebain verwandelte sich dabei sehr schnell in das (III), und nur die Spur von (II) wurde während des Reaktionsverlaufs akkumuliert. In Nährlösung Nr. 2 verwandelte sich auch das (II) schnell ins (III); dagegen blieb das (III) in den beiden Nährlösungen ganz intakt.

Daraus folgt, daß das Thebain durch die Kultur von *Trametes sanguinea* über 14 β -Hydroxycodeinon zum 14 β -Hydroxycodein geführt wird.



Schema 1.

Experimentelles*⁴

Vorläufiger Versuch—Etwa 510 Stämme der zum *Schizomycetes* bzw. dem *Phycomycetes* bzw. dem *Ascomycetes* bzw. dem *Basidiomycetes* bzw. dem *Fungi Imperfecti* gehörigen Mikroorganismen wurden der Vorprüfung unterworfen: Die Sporenaufschwemmung wurde in 10 ccm der entsprechenden Nährlösung bei 30° gezüchtet. Dann wurden 5 mg Thebain hinzugegeben und die Mischung unter Schütteln 7~10 Tage bei 30° fermentiert. Diese Gärungsflüssigkeit wurde mit 5-proz. NH₄OH schwach alkalisch (pH 9.0~9.5) gemacht, mit 20 ccm CHCl₃ versetzt und die Myzelien mit einer Homogenisierungsapparatur zerbrochen. Durch Zentrifugieren wurde die CHCl₃-Schicht von der Gärungsflüssigkeit abgetrennt und die hierbei erhaltene CHCl₃-Lösung nach Trocknen mit Na₂SO₄ im Vakuum eingedampft. Dieser Rückstand ließ sich zur papierchromatographischen Untersuchung bringen, wobei die in Tabelle I erwähnten 20 Stämme (*Basidiomycetes*, *Fungi Imperfecti*) die Flecke der Umsetzungsprodukte gaben. Dazu wurde das Verfahren nach Levine⁵ bzw. nach Büchi⁶ verwendet; aber die hierbei erhaltene Produkte ließen sich durch das letztere besser trennen. Die obenerwähnten wirksamen Stämme gaben nach dem Levine-Verfahren für das Umsetzungsprodukt nur einen Fleck an Rf 0.2~0.25, aber nach dem Büchi-Verfahren einen Fleck an 0.3 bzw. 0.7 oder zwei Flecke an 0.3 und 0.7 (Siehe Tabelle I). Mit Hilfe der Papierchromatographie wurde bewiesen, daß Thebain durch die Kulturen der in Tabelle I erwähnten Mikroorganismen mindestens zwei Produkte ergab.

Mit Rücksicht auf den Zustand des Zellenwachstums sowie den Umwandlungsverlauf wählten wir *Trametes sanguinea* zur Massenkultivierung.

Umsetzung von Thebain mit *Trametes sanguinea* und Charakterisierung der erhaltenen Umwandlungsprodukte—1) In der Nährlösung Nr. 1. Die Sporenaufschwemmung wurde in 100 ccm Nährlösung Nr. 1 (Koji-Extrakt mit 0.3-proz. Corn-steep Liq.) geimpft und 48 Std. bei 30° gezüchtet. Diese Züchtungsflüssigkeit wurde 1 L der gleichen Nährlösung zugegeben, 20 Std. bei 30° geschüttelt, mit 1500 mg Thebain versetzt und weiter 8 Tage bei gleicher Temperatur fermentiert. Durch Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit von den Myzelien abgetrennt, mit 5-proz. NH₄OH schwach alkalisch (pH 9.0~9.5) gemacht und mit CHCl₃ daraus extrahiert. Andererseits ließen sich die Myzelien

*³ Der Rf-Wert wurde nach der Methode von Büchi⁶ bestimmt.

*⁴ Die Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert.

TABELLE I. Zusammenstellung der zwanzig Stämme, welche Thebain umzuwandeln vermag: Das Zellenwachstum der einzelnen Stämme und der Fleck des Umwandlungsprodukts werden ebenfalls gezeigt

Stämme	Zellenwachstum ^{a)}	Rf ^{b)}	
		0.7	0.3
<i>(Basidiomycetes)</i>			
<i>Trametes albida</i>	++	+	—
<i>T. gibbosa</i>	+++	—	+
<i>T. kusanoana</i>	+++	++	—
<i>T. sanguinea</i>	+++	++	+
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	+	+	—
<i>Coriolus versicolor</i>	+++	—	+
<i>C. versicolor (var. nigricans)</i>	++	+	—
<i>Polystictus hirsutus</i>	++	—	++
<i>Polodisculus pendulus</i>	+++	—	+
<i>Fomitopsis officinalis</i>	+	+	—
<i>Coniophora puteana</i>	+++	+	—
<i>Lampteromyces japonicus</i>	++	+	—
<i>Pleurotus ostreatus</i>	++	++	++
<i>Psalliota campestris</i>	+++	+	+
<i>Favolus aricularius</i>	++	+	++
<i>Polyporus palustris</i>	+++	+	+
<i>Ganoderma lucidium</i>	++	++	—
<i>(Fungi Imperfecti)</i>			
<i>Monosporium apiospermum</i>	++		+ ^{c)}
<i>Phomopsis citri</i>	++		+ ^{c)}
<i>Spicaria viridans</i>	++	+	—

a) Zusammensetzung der Nährlösung: Koji-Extrakt + 0.3% Corn-steep Liquor.

b) Nach Büchi: Papier: Toyo-Roshi Nr. 51 A (mit der Kolthoff-Pufferlösung von pH 7.0 gewaschen); Fließmittel: H₂O-gesättigt. Toluol + Isobutanol (1:1); Farbreaktion mit Zaffaroni- bzw. Dragendorff-Reagens; aufsteigende Methode; Laufzeit 25 cm in 6 Std.; Nach dieser Methode gibt das Thebain den Fleck von Rf 0.9.

c) Nach Levine: Papier: Toyo-Roshi Nr. 51 (mit der McIlvaine-Pufferlösung von pH 3.5 gewaschen); Fließmittel: McIlvaine-Pufferlösung gesättigt. Butanol; Farbreaktion mit Zaffaroni-Reagens; aufsteigende Methode; Laufzeit 10 cm in 1.5 Std.; Nach dieser Methode gibt das Thebain den Fleck von Rf 0.5. Alle Präparate, die sich bei der Umsetzung von Thebain mit den in dieser Tabelle erwähnten Mikroorganismen gewinnen lassen, geben den Fleck von 0.2~0.25.

mit verd. NH₄OH suspendieren, mit einer Homogenisierungsapparatur behandeln und mit CHCl₃ extrahieren. Beide CHCl₃-Extrakte wurden zusammengebracht, mit Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft, wobei sich 1490 mg eines öligen Rückstands ergaben. Dieser Rückstand wurde in 20 ccm 2-proz. HCl gelöst und diese Lösung mit je 20 ccm CHCl₃ dreimal geschüttelt, um die neutrale Substanz zu beseitigen. Die wässrige Lösung wurde mit NH₄OH schwach alkalisch (pH 9.0~9.5) gemacht und mit je 50 ccm CHCl₃ dreimal extrahiert. Die übliche Aufarbeitung ergab 976 mg einer basischen Substanz, welche durch Behandlung mit 30 ccm Benzol die krist. Substanz vom Schmp. 261~263° lieferte. Ausbeute, 496 mg. Beim Umkristallisieren aus EtOH ergaben sich würfelförmige Krist. vom Schmp. 271~272°. C₁₈H₁₉O₄N—Ber.: C, 69.01; H, 6.07; N, 4.47. Gef.: C, 69.01; H, 6.02; N, 4.53. [α]_D²⁵ -232° (c=1.0 in CHCl₃). IR (in Nujol) cm⁻¹: 3380 (14-OH); 1690 (α,β-ungesät.-Keton). Nach Bruttoformel C₁₈H₁₉O₄N, Schmp., Mischprobe, spez. Drehung, Papierchromatogramm (Rf 0.7 nach Büchi-Methode) und Infrarot-Spektrum erwies sich dieser Stoff als identisch mit 14β-Hydroxycodeinon.^{7,8)}

Die von den Krist. abgetrennte Benzol-Mutterlauge wurde an 20 g Silikagel chromatographiert. Dabei ließ sich zuerst mit 500 ccm Benzol eine ölige Substanz (127 mg) und dann mit 700 ccm Benzol eine krist. Substanz (97 mg) eluieren. Die letztere war 14β-Hydroxycodeinon. Durch Eluieren mit 600 ccm Benzol-Me₂CO (95:5) wurde eine Substanz vom Schmp. 151~153° (153 mg) erhalten. Sie zeigte nach Umkristallisieren aus Benzol-Petr. äther den Schmp. 157~157.5°. C₁₈H₂₁O₄N—Ber.: C, 68.55; H, 6.71; N, 4.44. Gef.: C, 68.20; H, 6.67; N, 4.61. [α]_D²⁰ -127.7° (c=1.3 in CHCl₃). IR (in

Nujol) cm^{-1} : 3400 (14-OH), 3570 (6-OH). Diese Substanz war mit dem 14 β -Hydroxycodein^{7,9)} identisch. Der Identitätsbeweis stützte sich auf Schmp., Mischprobe, spez. Drehung, Bruttoformel, Infrarot-Spektrum und Papierchromatogramm (Rf 0.3 nach Büchi-Methode).

2) In der-Nährlösung Nr. 2. Eine wässrige Lösung von Glucose (1%), Pepton (0.2%), Rindfleisch-Extrakt (0.1%), Hefe-Extrakt (0.1%) und Corn-steep Liquor (0.3%) wurde für die Nährlösung verwendet; 1500 mg Thebain wurden auf gleiche Weise mit *T. sanguinea* umgesetzt. Das hierbei erhaltene ölige Produkt wurde an 7 g Silikagel chromatographiert, wobei sich zuerst mit 50 ccm Benzol ein Gemisch von Thebain, 14 β -Hydroxycodeinon und 14 β -Hydroxycodein eluieren (43.7 mg) ließ. Dann wurden mit 700 ccm Benzol Krist. vom Schmp. 155~156.5° eluiert; (803 mg); sie zeigten nach Umkristallisieren aus Benzol-Petr. äther den Schmp. 157~157.5° und waren mit 14 β -Hydroxycodein identisch.

Wir danken den Herren Dr. K. Minami und Dr. T. Fukuzumi (Institut für Forstkunde, Univ. Tokio) bestens für die Überlassung der holzzerstörenden Pilze, sowie für ihre große Hilfe und zahlreichen Ratschläge bei der Züchtung der Pilze. Ferner möchten wir dem Gärungsinstitut (Chibaken) sowie dem Stammsammlungslabor dieses Instituts für die Überlassung der Mikroorganismen unseren besten Dank aussprechen. Die Elementaranalysen und Infrarot-Aufnahmen wurden in unseren Speziallaboratorien von Fräulein H. Yamanouchi, Fr. K. Hayashi und Fr. N. Kurosawa ausgeführt.

Zusammenfassung

Trametes sanguinea (Basidiomycetes) vermochte Thebain (I) über 14 β -Hydroxycodeinon (II) in 14 β -Hydroxycodein (III) umzuwandeln.

(Eingegangen am 21. August, 1961)