

218. Über den Einfluss von β -Jonon auf die Bildung von β -Carotin durch *Phycomyces blakesleeanus*

von B. G. Engel, J. Würsch und M. Zimmermann.

(3. X. 53.)

In unserem Laboratorium ist in den letzten Jahren eine Anzahl von neutralen Verbindungen mit 13 Kohlenstoffatomen aus dem Harn trächtiger Stuten isoliert worden¹). Strukturell leiten sich diese C₁₃-Verbindungen von den Jononen ab²), welche selbst in der Natur nur selten und in kleinen Mengen gefunden worden sind³). Da hingegen Naturstoffe, welche das Jonon-Gerüst enthalten, wie z. B. die Carotinoide, weit verbreitet sind, wurde die Ansicht ausgesprochen⁴), dass die aus dem Stutenharn isolierten Jonon-Derivate durch biologischen Abbau aus den Carotinoiden entstehen könnten, ähnlich wie die Harn-Steroide aus den Sterinen⁵).

Wir beabsichtigen, die Richtigkeit dieser Annahme durch Fütterungsversuche mit markierten Carotinoiden experimentell zu prüfen und zu diesem Zweck haben wir uns zunächst mit dem Problem der Synthese von markiertem β -Carotin befasst.

In diesem Zusammenhang war eine Mitteilung von G. Mackinney, T. Nakayama, C. D. Buss & C. O. Chichester⁶) von besonderem Interesse. Die Autoren fanden, dass Zugaben von β -Jonon (5 mm³/20 cm³ Nährlösung) eine etwa 25fache Erhöhung der β -Carotin-Produktion durch den Pilz *Phycomyces blakesleeanus* (von 4,9 μ g auf 134 μ g pro Kultur) bewirken. Ebenso wichtig schien uns die Tatsache, dass dieser Effekt sehr strukturspezifisch ist. Verbindungen wie α -Jonon, Pseudojonon, Citral, welche von Mackinney und Mitarb. auf ihren Einfluss auf die α -Carotin- bzw. Lycopin-Produktion durch *P. blakesleeanus* untersucht wurden, sind praktisch ohne Wirkung auf die β -Carotin-Produktion des Pilzes.

¹) V. Prelog & J. Führer, Helv. **28**, 583 (1945); V. Prelog, J. Führer, R. Hagenbach & R. Schneider, Helv. **31**, 1799 (1948).

²) V. Prelog, J. Führer, R. Hagenbach & M. Frick, Helv. **30**, 113 (1947); V. Prelog, J. Führer, R. Hagenbach & R. Schneider, Helv. **31**, 1799 (1948); V. Prelog & R. Schneider, Helv. **32**, 1632 (1949); V. Prelog & B. Vaterlaus, Helv. **32**, 2082 (1949); **33**, 1725 (1950); V. Prelog & M. Osgan, Helv. **35**, 981, 986 (1952).

³) Vgl. Y.-R. Naves & G. R. Parry, Helv. **30**, 419 (1947); Y.-R. Naves, Helv. **30**, 956 (1947); **32**, 1064 (1949); Mfg. Chemist **20**, 318 (1949) [Chem. Abstr. **44**, 581 (1950)]; M. B. Antia & R. Kaushal, Current Sci. (India) **19**, 284 (1950) [Chem. Abstr. **45**, 6350 (1951)].

⁴) V. Prelog, J. Führer, R. Hagenbach & R. Schneider, Helv. **31**, 1804 (1948).

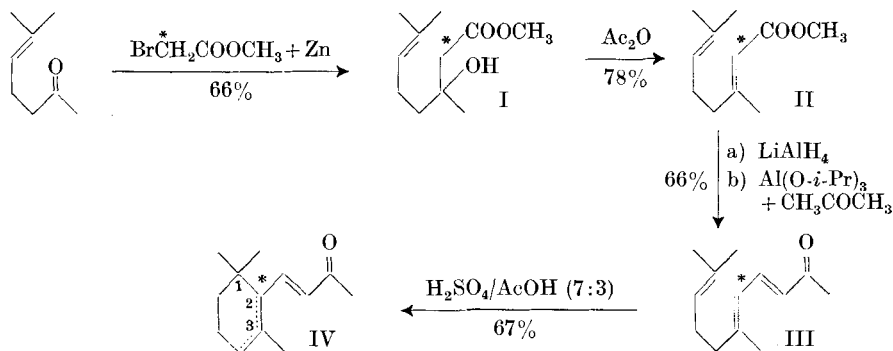
⁵) Vgl. K. Bloch, J. Biol. Chem. **157**, 661 (1945).

⁶) Am. Soc. **74**, 3456 (1952).

Zusammen mit Frau *Yolande Kern-Morf*, Fräulein *Brigitte Felzmann* und Dr. *L. Ettliger* (Institut für spezielle Botanik der ETH., Leitung Prof. Dr. *E. Gäumann*)¹⁾ haben wir die Versuche *Mackinney's* wiederholt und seine Resultate im wesentlichen bestätigt, wobei im Mittel eine 5fache Erhöhung der Carotin-Produktion beobachtet wurde.

Diese Resultate würden sich am einfachsten durch die Annahme erklären lassen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen *P. blakesleeanus* das β -Jonon als Vorstufe in der Biosynthese von β -Carotin verwendet. Wenn diese Annahme richtig wäre, so würde man über eine einfache biochemische Herstellungsmethode von markiertem β -Carotin, ausgehend aus markiertem β -Jonon, verfügen. Der Versuch wurde deshalb mit markiertem β -Jonon wiederholt.

Wir verwendeten dazu ein Jonon-[2-¹⁴C], das wir aus käuflicher Bromessigsäure-[2-¹⁴C] nach dem folgenden Schema²⁾ herstellten:



Das erhaltene Jonon war ein Gemisch von α - und β -Jonon, mit einem β -Jonon-Gehalt von ca. 80%. Die spezifische Aktivität des Präparates betrug rund 44 000 ipm/mg.

Bei der Ausführung des Versuches mit *P. blakesleeanus* unter Zugabe des hergestellten markierten Jonons erhielten wir eine 3fache Erhöhung der β -Carotin-Produktion gegenüber den Kontrollen (von 11,1 μ g auf 35,6 μ g β -Carotin pro Kultur). Das nach chromatographischer Reinigung, Verdünnung mit kristallisiertem β -Carotin und Umkristallisation erhaltene Präparat zeigte keine Aktivität.

Wäre das erhaltene β -Carotin zu 100% mit dem verwendeten radioaktiven Jonon (44 000 ipm/mg) markiert, so hätte es eine Aktivität von rund 31 000 ipm/mg. Unter Berücksichtigung der erzielten Isolierungsausbeuten, der Zählgenauigkeit und der empirischen „infinite thickness“-Faktoren kann man ausrechnen, dass die untere messbare Grenze in unserem Versuch ca. 2% dieser theoretischen Höchstaktivität von β -Carotin beträgt.

Man kann also den Schluss ziehen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen *P. blakesleeanus*, wenn überhaupt, Jonon-[2-¹⁴C]

¹⁾ Unseren Kollegen vom Institut für spezielle Botanik möchten wir auch an dieser Stelle für ihre wertvolle Hilfe bestens danken.

²⁾ Die mit ¹⁴C markierten Stellen sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die Zahlen bei den einzelnen Stufen geben die Ausbeute an.

nur zu weniger als 2% der theoretisch höchstmöglichen Konzentration in das β -Carotin einbaut¹⁾.

Zum Schluss sei noch darauf hingewiesen, dass das β -Iron²⁾ eine gleiche Erhöhung der Carotin-Produktion durch *P. blakesleeanus* bewirkt wie das β -Jonon. Hingegen bleiben Zugaben von 2,7-Dimethyl-octatrien-(2,4,6)-dial-(1,8)³⁾ ohne Einfluss auf die Bildung von β -Carotin.

Wir sind zurzeit damit beschäftigt, den Effekt der β -Jonon- und β -Iron-Zugaben auf die β -Carotin-Produktion durch *P. blakesleeanus* weiter zu untersuchen, und möchten eine Diskussion der mitgeteilten Ergebnisse auf einen späteren Zeitpunkt verschieben.

Der *Rockefeller Foundation* in New York danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil.

A. Synthese von Jonon-[2-¹⁴C].

Bromessigsäure-[2-¹⁴C]-methylester. 91 mg Bromessigsäure-[2-¹⁴C]⁴⁾ (1,01 mc) wurden in 15 cm³ absolutem Äther gelöst und mit 10 cm³ einer Lösung von Diazomethan in Äther versetzt. Nach 2 Std. wurde der Äther über eine kurze Kolonne abdestilliert. Anschließend wurden 5 cm³ abs. Benzol zugefügt und ebenfalls über die Kolonne abdestilliert. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung in demselben Gefäß weiter umgesetzt.

3,7-Dimethyl-3-oxy-octen-(6)-säure-[2-¹⁴C]-methylester (I)⁵⁾. Der erhaltene markierte Bromessigsäure-methylester wurde mit 4,0 g gewöhnlichem Bromessigsäure-methylester verdünnt und mit 4,1 g frisch destilliertem 2-Methyl-hepten-(2)-on-(6), 2,3 g mit Jod aktivierten Zinkspänen und 8 cm³ abs. Benzol versetzt. Die Reaktion setzte beim Erwärmen des Reaktionsgemisches ein und wurde durch halbstündiges Kochen zu Ende geführt. Nun wurde auf Eis gegossen, in Äther aufgenommen, mit verd. Schwefelsäure, Natriumcarbonat und Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Der nach dem Abdestillieren der Lösungsmittel erhaltene Rückstand lieferte bei der Vakuumdestillation (*Hickman*-Kolben) 3,3 g des Oxyesters I, Sdp.₁₂ 119–120°⁶⁾.

Der Vorlauf der Vakuumdestillation wurde nach Zusatz von 1,0 g gewöhnlichem Bromessigsäure-methylester mit 1,5 g 2-Methyl-hepten-(2)-on-(6) und 1,3 g Zinkspänen, in 5 cm³ abs. Benzol erneut zur Reaktion gebracht. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man weitere 1,1 g Oxyester I, Sdp.₁₀ 115°. Gesamtausbeute 4,4 g Oxyester I aus 5,1 g Bromessigsäure-methylester (66% d. Th.). Reste des markierten Oxyesters wurden aus den Destillationsrückständen nach Zugabe von 0,8 g nicht markiertem Oxyester überdestilliert. Gesamtgewicht des Oxyesters I 5,2 g.

Geraniumsäure-[2-¹⁴C]-methylester (II)⁷⁾. Die erhaltenen 5,2 g Oxyester wurden mit 15 cm³ frisch destilliertem Essigsäureanhydrid am Rückfluss 8 Std. gekocht.

¹⁾ In einer zweiten Arbeit berichten *G. Mackinney, T. Nakayama, C. O. Chichester & C. D. Buss*, *Am. Soc.* **75**, 236 (1953), Fussnote 6, dass ein an der Carbonylgruppe markiertes β -Jonon zu inaktivem β -Carotin führte. In der Arbeit werden keine quantitativen Angaben gemacht.

²⁾ Wir danken Herrn Dr. *C. F. Seidel* für die Überlassung eines β -Iron-Präparates.

³⁾ Der C₁₀-Dialdehyd wurde uns freundlicherweise von Dr. *B. C. L. Weedon* zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm auch an dieser Stelle bestens danken.

⁴⁾ Bezogen von *The Radiochemical Centre*, Amersham, Bucks., Grossbritannien.

⁵⁾ Vgl. *L. Ruzicka & H. Schinz*, *Helv.* **23**, 965 (1940).

⁶⁾ Das nicht markierte Vergleichspräparat hatte einen Sdp.₁₀ von 120–122°.

⁷⁾ Vgl. *Ch. A. Vodoz & H. Schinz*, *Helv.* **33**, 1318 (1950).

Nach Entfernung des grössten Teiles des Essigsäureanhydrids durch Erwärmen im Vakuum auf dem Wasserbad wurde das rohe Acetylierungsprodukt durch langsames Eintropfen in einen auf 320–330° erhitzten Kolben pyrolysiert. Die Pyrolysenprodukte destillierten dabei durch eine 9 cm lange *Vigreux*-Kolonnen und wurden, nach der Entfernung der Essigsäure, im Vakuum redestilliert (*Hickman*-Kolben). Ausbeute 3,7 g Geraniumsäure-[2-¹⁴C]-methylester (78% d. Th.) vom Sdp.₁₀ 98–104°¹⁾.

Zu Spülzwecken wurde das Produkt mit 3,0 g nicht markiertem Geraniumsäuremethylester verdünnt, Gesamtgewicht 6,7 g.

2, 6-Dimethyl-undecadien - (6, 8)-on-(10) - [7-¹⁴C] (Pseudojonon) (III)²⁾, 6,7 g markierter Geraniumsäure-methylester wurden in 15 cm³ abs. Äther zu 1,1 g Lithiumaluminiumhydrid (etwa 50% Überschuss) in 50 cm³ abs. Äther bei Zimmertemperatur getropft und unter Rühren 45 Min. am Rückfluss gekocht. Das nach der üblichen Aufarbeitung des Reaktionsgemisches und Abdestillieren des Äthers erhaltene rohe Geraniol-[2-¹⁴C] wurde direkt weiter verarbeitet. Zu diesem Zwecke wurde es mit 220 cm³ abs. Benzol versetzt, wovon man ca. 30 cm³ abdestillierte. Nach Zugabe von 80 cm³ abs. Aceton und 12,0 g Aluminiumisopropylat wurde das Gemisch unter Luft- und Wasserausschluss 41 Std. am Rückfluss gekocht. Die Lösungsmittel entfernte man über eine Kolonne, worauf der Rückstand wie üblich aufgearbeitet wurde. Nach 1,53 g Vorlauf gingen 3,68 g Pseudojonon bei 66–81°/0,01 mm (*Hickman*-Kolben)³⁾ als Hauptfraktion über.

Den Vorlauf behandelte man erneut mit Aceton und Aluminiumisopropylat in Benzol. Durch Destillation erhielt man weitere 1,03 g Pseudojonon, Sdp._{0,07} 72–85°, so dass die Gesamtausbeute 4,71 g betrug (66% d. Th. bezogen auf den eingesetzten Geraniumsäuremethylester). Um die letzten Reste des aktiven Pseudojonons zu gewinnen, wurden die Rückstände mit 1,5 g, bzw. 0,7 g nicht markiertem Pseudojonon versetzt und destilliert, Gesamtgewicht des Pseudojonons 6,91 g.

Jonon-[2-¹⁴C] (IV⁴⁾), 6,91 g Pseudojonon wurden in zwei Ansätzen mit einem Gemisch von konz. Schwefelsäure und Eisessig (7:3 Gewichtsteile) bei Zimmertemperatur cyclisiert. Das nach der üblichen Aufarbeitung erhaltene Produkt wurde im Hochvakuum destilliert (*Hickman*-Kolben), Sdp._{0,04} 66–69°⁵⁾. Ausbeute 4,59 g (66,5% d. Th.). Zum Spülen wurden 1,7 g nicht markiertes Jonon zugegeben. Gesamtgewicht des Jonons-[2-¹⁴C] 6,29 g.

Die Gesamtausbeute der Synthese betrug rund 23% d. Th. bezogen auf die eingesetzte Bromessigsäure.

Zur Radioaktivitätsbestimmung wurde eine kleine Probe des erhaltenen Jonons-[2-¹⁴C] mit nicht markiertem Jonon verdünnt und nach *Van Slyke-Folch*⁶⁾ nass verbrannt. Die Radioaktivität des Bariumcarbonates bestimmte man in einem fensterlosen *Tracerlab* „Flow Counter“; Aktivität 330 ipm/mg BaCO₃ (Mittelwert aus 3 Verbrennungen; s = 33)⁷⁾, entsprechend 44 100 ipm/mg Jonon-[2-¹⁴C].

1) Das nicht markierte Vergleichspräparat hatte einen Sdp.₁₁ von 100–102°.

2) Für die Reduktion des Geraniumsäureesters zum Geraniol, vgl. die Darstellung von 6-Methylgeraniol aus 6-Methylgeraniumsäureäthylester, *H. Favre & H. Schinz*, *Helv.* **35**, 1632 (1952); für die Oxydation und gleichzeitige Kondensation des Geraniols zu Pseudojonon, vgl. die analoge Reaktion, ausgehend von 6-Methylgeraniol, *H. Schinz, L. Ruzicka, C. F. Seidel & Ch. Tavel*, *Helv.* **30**, 1813 (1947).

3) Das nicht markierte Vergleichspräparat siedete bei 84° und 0,02 mm Druck.

4) Vgl. *E. Earl Royals*, *Ind. Eng. Chem.* **38**, 546 (1946).

5) Das nicht markierte Vergleichspräparat siedete bei 67–68°/0,05 mm.

6) *D. D. Van Slyke & J. Folch*, *J. Biol. Chem.* **136**, 509 (1940); *D. D. Van Slyke, J. Plazin & J. R. Weisiger*, *J. Biol. Chem.* **191**, 299 (1951).

7) $s = \sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 / (n - 1)}$ (x = Einzelwerte, \bar{x} = Mittelwert; n = Anzahl Messungen).

B. Biologische Versuche.

Stamm: *Phycomyces blakesleeanus* (—), ETH. No. 1957.

Nährlösung: 3 g *Difco* Hefe-Extrakt, 25 g Glucose, 6 mg Vitamin B₁ pro Liter¹⁾.

Impfung: Mit 3–4 Wochen alten Sporen, erhalten durch Züchtung des Pilzes auf Malz-Schrägar bei Zimmertemperatur und Tageslicht. Sporen aus einem Reagenzglas in 10,5 cm³ sterilem dest. Wasser ½ Std. quellen gelassen, dann mit je 1 cm³ Sporensuspension (ca. 600 000 – 800 000 Sporen) pro Kultur geimpft.

Kulturbedingungen: Auf Filterpapierscheiben (*Schleicher & Schuell* No. 576) in *Petri*-Schalen²⁾, mit 15 cm³ Nährlösung, bei 24–26°, unter künstlicher Belichtung während 36–40 Stunden, d. h. bis zur Zugabe des Jonons, Irons bzw. C₁₀-Dialdehyds. Darauf weitere 24 Std. im Dunkel bei 25°.

Art der Zugabe: Das nicht markierte β -Jonon und das β -Iron wurden in Nährlösung suspendiert und den Kulturen zugegeben (5 mm³/5 cm³ Nährlösung/Kultur). Das 2,7-Dimethyl-octatrien-(2,4,6)-dial-(1,8) (C₁₀-Dialdehyd) wurde in alkoholischer Lösung³⁾ den Kulturen zugegeben (4 mg/0,3 cm³ Alkohol/Kultur).

Extraktion: Die Filterpapierscheiben wurden abgesaugt, mit Methanol gewaschen und mit peroxydfreiem Äther einzeln extrahiert. Die ätherischen Lösungen wurden filtriert und im Vakuum eingedampft. Man bestimmte den β -Carotin-Gehalt des Rückstandes spektrophotometrisch in Hexanlösung durch Messung der optischen Dichte bei 450 m μ ⁴⁾ im *Beckman*-Spektrophotometer Mod. B. Die Resultate sind in den Tab. 1 und 2 zusammengestellt:

n = Anzahl Platten; \bar{x} = μg β -Carotin/Platte (Durchschnitt); $s = \sqrt{\sum(x - \bar{x})^2/(n - 1)}$.

Tabelle 1.

Kontrollversuche								
n	5	5	3	3	6	4	10	10
\bar{x}	12,9	9,1	9,4	7,4	16,3	18,4	14,3	14,7
s	0,8	1,0	2,2	1,0	1,2	0,8	1,2	1,5
β -Jonon					β -Iron			
n	5	5	3	3	6	4	10	10
\bar{x}	39,8	95,5	68,0	32,9	50,2	62,7	75,0	38,6
s	6,0	12,4	9,8	16,7	7,7	20,9	6,7	8,9

Versuch mit Jonon-[2-¹⁴C]. Bei diesem Versuch blieben die Kulturbedingungen unverändert, nur wurden die 20 Platten (3 Kontrollplatten, 3 Platten mit gewöhnlichem β -Jonon, 14 Platten mit Jonon-[2-¹⁴C]) nach Zugabe des Jonons (4,7 mg in 0,3 cm³ Alkohol/Kultur), statt in einem Thermostaten, in einem Exsikkator unter Luftdurchleitung im Dunkel bei 25° gezüchtet. Die austretende Luft wurde durch eine Kühlvorlage (–60°), durch carbonatfreie Natronlauge und schliesslich durch konz. Natronlauge durchgeleitet. Der Inhalt der drei Vorlagen erwies sich bei der Prüfung auf Radioaktivität als inaktiv.

¹⁾ *G. Mackinney, T. Nakayama, C. D. Buss & C. O. Chichester, Am. Soc. 74, 3456 (1952).*

²⁾ Vgl. *T. W. Goodwin & W. Lijinsky, Biochem. J. 50, 268 (1951).*

³⁾ Zugabe von 0,3 cm³ Alkohol pro Kultur beeinflusst die β -Carotin-Produktion nicht, wie aus den Resultaten ersichtlich ist (vgl. Tabelle 2).

⁴⁾ $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 258,9$ für β -Carotin in Hexan. Vgl. *L. Zechmeister & A. Poljář, Am. Soc. 65, 1527 (1943).*

Tabelle 2.

I = Kontrollversuche; II = Alkohol; III = β -Jonon in Alkohol;
IV = C₁₀-Dialdehyd in Alkohol.

	I	II	III	IV
n	3	3	3	3
\bar{x}	13,5	12,5	72,4	12,4
s	0,9	0,6	6,8	1,3

Die Filterpapierscheiben wurden abgesaugt, mit Methanol gewaschen und gemeinsam mit peroxydfreiem Äther extrahiert. Nach der Filtration dampfte man die ätherischen Lösungen im Vakuum ein und bestimmte den Carotin-Gehalt des Rückstandes spektrophotometrisch bei 450 m μ in Hexan. Man erhielt folgende Resultate: Kontrollversuche (3 Platten): 11,1 μ g β -Carotin/Platte; nicht markiertes β -Jonon (3 Platten): 33,8 μ g β -Carotin/Platte; Jonon-[2-¹⁴C] (14 Platten): 35,6 μ g β -Carotin/Platte.

Die Hexan-Lösung aus den 14 Kulturen mit markiertem Jonon wurde zweimal an 10 g Aluminiumoxyd, Akt. II–III (Säule 1,2 \times 8 cm) chromatographiert. Das erhaltene Carotin-Eluat, das 350 μ g β -Carotin enthielt, wurde mit 2,5 mg kristallisiertem β -Carotin¹⁾ verdünnt und einmal aus Äther-Alkohol umkristallisiert. Man erhielt 1,5 mg kristallisiertes β -Carotin. Die Hälfte dieses Präparates wurde auf einem Aluminium-Schälchen von 2,1 cm Durchmesser in einem fensterlosen *Tracerlab* „Flow Counter“ auf Radioaktivität geprüft. Die Messung ergab 23 ipm. für das β -Carotin-Präparat, bei einem „Background“ von 23 ipm. Das erhaltene β -Carotin zeigte also keine Radioaktivität.

Zusammenfassung.

Zugabe von β -Jonon (5 mm³/20 cm³) zu 36 Stunden alten Kulturen von *Phycomyces blakesleeanus* bewirkt eine etwa fünffache Erhöhung der Carotin-Produktion²⁾.

β -Iron hat einen ähnlichen Einfluss auf die Carotin-Produktion durch *P. blakesleeanus* wie β -Jonon; 2,7-Dimethyl-octatrien-(2,4,6)-dial-(1,8) ist hingegen ohne Wirkung.

Durch Verwendung von Jonon-[2-¹⁴C] konnte gezeigt werden, dass das Jonon, trotz seiner erhöhenden Wirkung auf die Carotin-Produktion, in die Carotin-Molekel nicht eingebaut wird.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

¹⁾ β -Carotin *Hoffmann-La Roche*, Smp. 168–172°, zweimal aus Äther-Alkohol umkristallisiert.

²⁾ Vgl. *G. Mackinney, T. Nakayama, C. D. Buss & C. O. Chichester*, Am. Soc. **74**, 3456 (1952).