

## 223. Über die Biosynthese des $\beta$ -Carotins bei *Mucor hiemalis* Wehmer. Die Beteiligung der Essigsäure am Aufbau der Carotinmolekel, insbesondere in den Jonongruppierungen, untersucht mit Hilfe von $^{14}\text{C}$ -markierter Essigsäure.

II. Mitteilung<sup>1)</sup>

von E. C. Grob und R. Büttler.

(27. VIII. 54.)

### Einleitung.

In einer früheren Arbeit<sup>2)</sup> hatten wir gezeigt, dass *Phycomyces*, der auf einem Nährmilieu mit Lactat als Kohlenstoffquelle kein Carotin bilden kann, durch Zugabe von Na-Acetat eine starke Carotinbildung aufweist. Die gleichen Verhältnisse fanden wir auch beim Schimmelpilz *Mucor hiemalis*. Es ist uns sodann gelungen die beiden Mikroorganismen auf einer Nährlösung mit Na-Acetat als einziger Kohlenstoffquelle zu züchten<sup>3)</sup>. Überraschenderweise wiesen diese Kulturen einen sehr hohen Carotingehalt auf. Dieser übersteigt den Gehalt normaler Kulturen, die auf einem Glucose-Asparagin-Milieu gewachsen sind, um mehr als das Doppelte. Der nächstliegende Schluss, der aus diesen Tatsachen gezogen werden kann, ist wohl, dass die C-Atome der Essigsäure in das Kohlenstoffgerüst des gebildeten  $\beta$ -Carotins eintreten. Den Beweis hierfür suchten wir mit Hilfe von markierter Essigsäure ( $\text{CH}_3 \cdot ^{14}\text{COONa}$  und  $^{14}\text{CH}_3 \cdot \text{COONa}$ ) zu erbringen<sup>4)</sup>. Damals hatte sich ergeben, und zwar übereinstimmend bei *Phycomyces* und *Mucor*, dass rund 70% des Kohlenstoffbestandes des  $\beta$ -Carotins aus der Essigsäure stammen<sup>5)</sup>. Interessanterweise lieferte  $\beta$ -Carotin aus Pilzkulturen, welche auf dem Lactat-Acetat-Milieu oder auf dem Acetat-Milieu gewachsen sind, den gleichen Wert von 70%. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den herrschenden Versuchsbedingungen der Kohlenstoff des Lactates offenbar nicht in das  $\beta$ -Carotin eintritt. Dass wir bei Carotin aus den auf Acetat-Milieu gewachsenen Kulturen noch ein Kohlenstoff-Defizit von rund 30% haben, deutet auf eine mögliche Beteiligung der Luft-Kohlensäure an der Biosynthese des  $\beta$ -Carotins. Der direkte Beweis hierfür ist allerdings noch nicht erbracht.

Diese hier beschriebenen Versuche sagen selbstverständlich nichts aus über die Art und Weise wie die C-Atome der Essigsäure in die  $\beta$ -Carotinmolekel eingebaut werden. Gewisse Einblicke in diesen Aufbaumechanismus können wir erhalten, sofern es gelingt, die Positionen, welche die  $\text{CH}_3$ - bzw. die  $\text{COOH}$ -Gruppen der Essigsäure in der Carotinmolekel einnehmen, zu bestimmen. Dieses Ziel suchen wir zu erreichen, indem wir das radioaktive  $\beta$ -Carotin, welches von *Mucor hiemalis* aus  $\text{CH}_3$ - bzw.  $\text{COOH}$ -markierter Essigsäure synthetisiert worden ist, derart abbauen, dass die einander entsprechenden C-Atome des Carotins isoliert und ihre Radioaktivitäten bestimmt werden können. Auf Grund der Radioaktivität der C-Atome lassen sich Rückschlüsse auf ihre Herkunft ziehen.

Vor kurzem haben wir berichtet<sup>1)</sup>, dass die seitenständigen Methylgruppen der die Jononringe verbindenden Kohlenstoffkette des von *Mucor hiemalis* gebildeten  $\beta$ -Carotins nur von der Methylgruppe, die sie tragenden C-Atome hingegen ausschliesslich

<sup>1)</sup> 1. Mitt. *E. C. Grob & R. Büttler*, Exper. **10**, 250 (1954).

<sup>2)</sup> *W. H. Schopfer & E. C. Grob*, Exper. **6**, 419 (1950).

<sup>3)</sup> *W. H. Schopfer & E. C. Grob*, Exper. **8**, 140 (1952).

<sup>4)</sup> *E. C. Grob, G. G. Poretti, A. v. Murak & W. H. Schopfer*, Exper. **7**, 218 (1951).

<sup>5)</sup> *E. C. Grob, W. H. Schopfer & G. G. Poretti*, Int. Z. Vit.-Forschg. **23**, 484 (1952).



$\beta$ -Carotin, welches in Gegenwart von methylmarkierter Essigsäure gebildet worden ist, liefert beim Abbau eine Essigsäure, deren gesamte Radioaktivität in den Methylgruppen lokalisiert ist. Andererseits findet sich die gesamte Radioaktivität in den Carboxylgruppen der Essigsäure von  $\beta$ -Carotin, das aus carboxylmarkierter Essigsäure entstanden ist. Die sich daraus ergebende Verteilung der Methyl- und der Carboxyl-Gruppen der dem Mikroorganismus zur Verfügung gestellten Essigsäure in der  $\beta$ -Carotinmolekel entspricht demnach dem vorstehenden Schema.

An dieser Verteilung ist besonders auffallend, dass alle bis jetzt untersuchten seitenständigen Methyl-Gruppen des  $\beta$ -Carotins aus den Methylgruppen, und ihre benachbarten C-Atome aus den Carboxylgruppen der zugefügten Essigsäure stammen. Dies scheint uns ein Hinweis dafür zu sein, dass der *Mucor hiemalis* zum Aufbau des  $\beta$ -Carotins, wenigstens für die bis heute mit Sicherheit bestimmten C-Atome, die ihm zur Verfügung stehende Essigsäure direkt verwendet. Für eine direkte Beteiligung der Essigsäure an der Biosynthese des  $\beta$ -Carotins spricht im weitern noch die Tatsache, dass die spezifischen Aktivitäten der Essigsäure aus dem Permanganat- und dem Chromsäureabbau gleichbleiben, was auf eine gleichmässige Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen C-Atome schliessen lässt. Diese Frage soll in einem späteren Zeitpunkt in einer gesonderten Arbeit diskutiert werden.

### Experimenteller Teil.

1. Kulturbedingungen: *Mucor hiemalis* *Wehmer* CBS Stamm+ wird auf einer Nährlösung folgender Zusammensetzung gezüchtet: 10 g Na-Acetat; 1,07 g Ammoniumsulfat; 1,5 g prim. Kaliumphosphat und 0,5 g Magnesiumsulfat pro Liter. Angesetzt wurden jeweils 1000 Einzelkulturen à 25 cm<sup>3</sup> Nährlösung; insgesamt erhalten diese Kulturen  $\frac{1}{10}$  mC radioaktives Na-Acetat. Nach 14 Tagen Kulturdauer wurden sie geerntet und die Pilzmycelien bei 40° getrocknet.

2. Isolierung des  $\beta$ -Carotins aus dem Pilzkörper: Das trockene, feingemahlene Mycelium wurde mit Petroläther erschöpfend extrahiert und die vereinigten Petrolätherauszüge im Vakuum eingeengt. Zur Verseifung wurde der Extrakt mit 12-proz. methanolischer KOH 12 Std. unter Stickstoff geschüttelt. Nach Trennung der Phasen und Nachextraktion der Methanolphase mit Petroläther wurden die vereinigten Petrolätherauszüge zuerst mit 80-proz. Äthanol, dann mit viel Wasser gewaschen. Die über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknete Petrolätherlösung wurde im Vakuum stark eingeengt und zur Vergrösserung der Ausbeute an radioaktivem  $\beta$ -Carotin, je nach der Radioaktivität, mit einer warm gesättigten Petrolätherlösung von Gesamt-Carotin (*Roche*) versetzt. Aus dieser Lösung wurde das Rohcarotin durch Methanolzusätze und stufenweises Einengen der Mutterlaugen gewonnen. Zur Isolierung des  $\beta$ -Carotins wurde das Rohprodukt aus Petroläther an einer Ca(OH)<sub>2</sub>-Säule chromatographiert, mit Petroläther entwickelt, mit Aceton eluiert und die  $\beta$ -Carotinfraction in wenig Petroläther überführt. Aus dieser Lösung wurde das reine  $\beta$ -Carotin durch Methanol auskristallisiert.

3. Oxydative Chromsäurespaltung des markierten  $\beta$ -Carotins: Das reine markierte  $\beta$ -Carotin (ca. 50 mg) wurde mit den entsprechenden Mengen Chromtrioxyd, Kaliumdichromat, konz. Phosphorsäure und dest. Wasser (für 50 mg  $\beta$ -Carotin: 2,60 mg

$\text{CrO}_3$ , 0,65 mg  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 6,45  $\text{cm}^3$  dest. Wasser, 4,30  $\text{cm}^3$  konz.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )  $3\frac{1}{2}$  Std. auf dem siedenden Wasserbad behandelt. Die gebildete Essigsäure wurde durch wiederholte Destillation und Wasserzugaben möglichst vollständig hinübergetrieben. Durch Titration des Destillates mit 0,1-n.  $\text{NaOH}$  wurden 70–80% Acetat gefunden; das nach dem Eindampfen erhaltene Rohprodukt lieferte damit übereinstimmende Ausbeutezahlen. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation gereinigt und je nach Aktivität mit reinstem Natriumacetat (*Merck*) verdünnt.

4. Spaltung des markierten Acetats aus dem  $\beta$ -Carotin durch die *Schmidt'sche* Reaktion: Das reine markierte Acetat (ca. 40 mg) wurde mit den entsprechenden Mengen Natriumazid und konz. Schwefelsäure (für 40 mg Acetat: 42 mg  $\text{NaN}_3$ , 0,9  $\text{cm}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ca.  $\frac{3}{4}$  Std. bei 60–65° behandelt. Das gebildete  $\text{CO}_2$  wurde in Barytwasser als  $\text{BaCO}_3$  aufgefangen, das Methylamin nach dem Zusatz von Alkali aus der Reaktionslösung überdestilliert und in konz.  $\text{HCl}$  als Hydrochlorid erhalten. Es wurden so (nach Abzug des durch den Carbonatgehalt des Natriumazides verursachten Blindwertes) 15–35%  $\text{BaCO}_3$  und 20–45% Methylamin, $\text{HCl}$  erhalten.

5. Messung der Radioaktivitäten: Für die Messung der Radioaktivitäten unserer Präparate verwendeten wir ein Tracerlab-*Geiger-Müller-Zählrohr* mit dünnem Glimmerfenster (1,8  $\text{mg}/\text{cm}^2$ ), welches mit einem Impulsuntersetzer ELA 3 (*Landis & Gyr*, Zug) kombiniert ist. Zur Messung wurden die Präparate in sehr dünner Schicht gleichmässig auf eine polierte Messingunterlage aufpräpariert.

Aus den experimentell bestimmten Impulszahlen ( $Z$ ) lässt sich die absolute Anzahl Impulse ( $A$ ) nach der Formel  $A = Z/f_B \cdot f_{AB} \cdot f_{Sa} \cdot \Omega$  berechnen.

$f_B$  ist ein Faktor für das „Backscattering“. Dieser Faktor ist für Messung experimentell bestimmt worden mit Hilfe einer  $^{14}\text{C}$ -Quelle, welche sich auf einer Zaponlackhaut befindet. Wir haben den Wert  $1,145 \pm 0,02$  gefunden<sup>1)</sup>.

$f_{AB}$  ist der Faktor für die Absorption der Strahlen in der Luft und im Glimmerfenster.

$f_{Sa}$  ist der Faktor für die Selbstabsorption des Präparates. Dieser wurde durch Vergleich mit dem entsprechenden Koeffizienten für  $\text{BaCO}_3$  bestimmt.

$\Omega$ : Die Messgeometrie haben wir nach der Formel  $\Omega = \frac{1}{2}(1 - \cos \alpha)$  berechnet, wobei  $\cos \alpha = h/\sqrt{r_1^2 + h^2}$ .

$h$  = Abstand zwischen Fenster und Präparat;  $r_1$  = Durchmesser des Zählrohrfensters.

Messwerte des aus dem Chromsäureabbau gewonnenen Methylamin,  $\text{HCl}$  und Bariumcarbonat.

	$\beta$ -Carotin aus $\text{CH}_3$ -markierter Essigsäure	$\beta$ -Carotin aus $\text{COOH}$ -markierter Essigsäure
Ausgangs- $\beta$ -Carotin . . . .	$A = 154$ ipm/mg	$A = 500$ ipm/mg
Methylamin, $\text{HCl}$ . . . .	$A = 24,4$ ipm/mg	$Z = 0,9 \pm 1,27$ ipm/mg
Bariumcarbonat . . . . .	$Z = 0,3 \pm 1,52$ ipm/mg	$A = 55$ ipm/mg

$A$  = Anzahl absoluter Impulse.

$Z$  = Anzahl gemessener Impulse.

ipm = Anzahl Impulse pro Minute.

Diese Arbeit ist mit der Unterstützung der *Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* ausgeführt worden, der wir unseren besten Dank aussprechen.

<sup>1)</sup> *E. C. Grob, W. H. Schopfer & G. G. Poretti, Int. Z. Vit.-Forschg.* **23**, 484 (1952).

## SUMMARY.

The cleavage of radioactive  $\beta$ -carotene, synthesized by the fungus *Mucor hiemalis* *Wehmer* from labeled sodium acetate ( $^{14}\text{CH}_3 \cdot \text{COONa}$  and  $\text{CH}_3 \cdot ^{14}\text{COONa}$ ) with chromic acid leads to acetic acid. This acetic acid was decarboxylated by the *Schmidt* reaction. The radioactivity of methylamine and carbone dioxide ( $\text{BaCO}_3$ ) obtained from the *Schmidt* reaction has been examined. These experiments indicate that (1) the methyl-groups of the labeled acetic acid form the methylgroups of the chain between the two  $\beta$ -jonone rings of the  $\beta$ -carotene and the methyl-groups in the position 5 and 5' of the  $\beta$ -jonone rings; (2) the carboxylic groups of the acetic acid on the other hand form the neighbouring C-atoms of the methyl-groups in the chain and the  $\beta$ -jonone rings.

Botanisches Institut der Universität Bern.

## 224. Über das Alkaloid Serpentinin aus *Rauwolfia serpentina* *Benth.*

Mitt. XII über Rauwolfiaalkaloide

von E. Schlittler, H. U. Huber<sup>1)</sup>, F. E. Bader und H. Zahnd<sup>2)</sup>.

(17. IX. 54.)<sup>3)</sup>

Die Alkaloide von *Rauwolfia serpentina* können auf Grund ihrer verschiedenen Basizität in schwache, mittelstarke und starke Indolbasen eingeteilt werden<sup>4)</sup>. Zu den schwachen Basen gehören Reserpin, Reserpinin, Yohimbin usw. Der wichtigste Vertreter der mittelstarken Basen ist das Ajmalin, und zu den starken Basen zählen wir Serpentin und Serpentinin.

Unsere ersten Arbeiten auf dem Gebiet der Rauwolfiaalkaloide befassten sich mit der Konstitutionsermittlung des Serpentin<sup>5)</sup>. Es wurde damals gezeigt, dass es sich bei diesem Alkaloid um eine quaternäre Indolbase vom Anhydroniumtyp handelt<sup>6)</sup>. Derartige Anhydroniumbasen bereiten grosse Analysenschwierigkeiten, denn sie enthalten stets wechselnde Mengen Kristalllösungsmittel, und selbst

<sup>1)</sup> Auszug aus der Dissertation *H. U. Huber*, Universität Basel, 1954.

<sup>2)</sup> On sabbatical leave from Brooklyn College, New York (N. J.).

<sup>3)</sup> Datum des Eingangs von Zusätzen betreffend die IR.- und UV.-Spektren sowie Smp. und Drehung des Serpentinins; Einlaufdatum des ursprünglichen Manuskriptes: 3. VI. 54.

<sup>4)</sup> *E. Schlittler, J. A. Schneider & A. Plummer*, *Angew. Ch.* **66**, 386 (1954).

<sup>5)</sup> *E. Schlittler & H. Schwarz*, *Helv.* **33**, 1463 (1950); *H. Schwarz & E. Schlittler*, *ibid.* **34**, 629 (1951); *F. E. Bader & H. Schwarz*, *ibid.* **35**, 1594 (1952).

<sup>6)</sup> *J. W. Armit & R. Robinson*, *Soc.* **127**, 1604 (1925).