

241. Naturstoffe aus Mikroorganismen

9. Mitteilung [1]

Über die Biogenese von Proferrosamin A¹⁾

von André Marcel Helbling und Max Viscontini

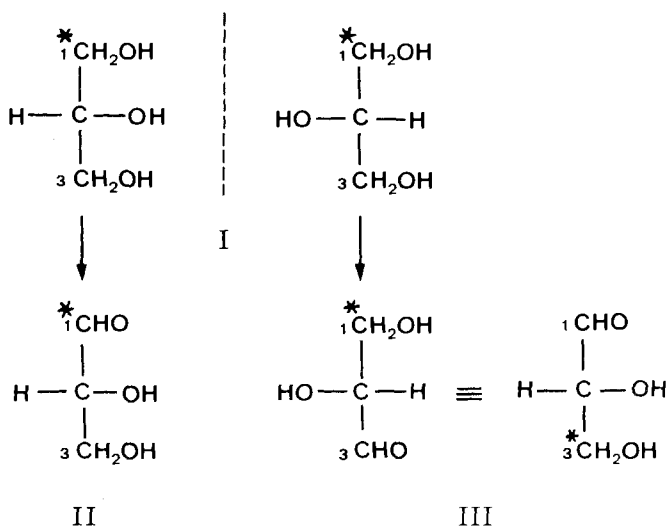
Organisch-chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(28. VI. 76)

Preliminary results on the biogenesis of the proferrosamine A. - *Summary.* *Pseudomonas roseus fluorescens* has been grown in a *Lasseur*-broth with 1-[¹⁴C]-glycerol and L-asparagine as sources of carbon and nitrogen. The total percentage of incorporation of the isotopic carbon atom in the proferrosamine A attained 0,03%. The first results on the localization of ¹⁴C show that the pyrrolinocarboxylic acid moiety is built with the carbon atoms of glycerol while the pyridine skeleton seems to be formed mainly from L-asparagine.

Enge Beziehungen bestehen zwischen der Bildung des Tryptophans und des Proferrosamins A (IV) während des Wachstums von *Pseudomonas roseus fluorescens* in einer Fe²⁺-freien Nährlösung nach *Lasseur* [2]. Um diese Beziehungen besser verstehen zu können, haben wir die Biogenese des Propigmentes IV in dieser Nährlösung, in welcher Glycerin und L-Asparagin für die wachsenden Bakterien die einzigen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sind [1] [3], untersucht.

Einen ersten Eindruck in die Biogenese gibt die vorliegende Arbeit über den Einbau von 1-[¹⁴C]-Glycerin (I). Nach dem *Pseudomonas*-Wachstum im Fermenter haben wir die Verteilung des ¹⁴C-Atoms im gebildeten Proferrosamin A durch partiellen Abbau bestimmt. Zur Interpretation der Ergebnisse wird angenommen, dass

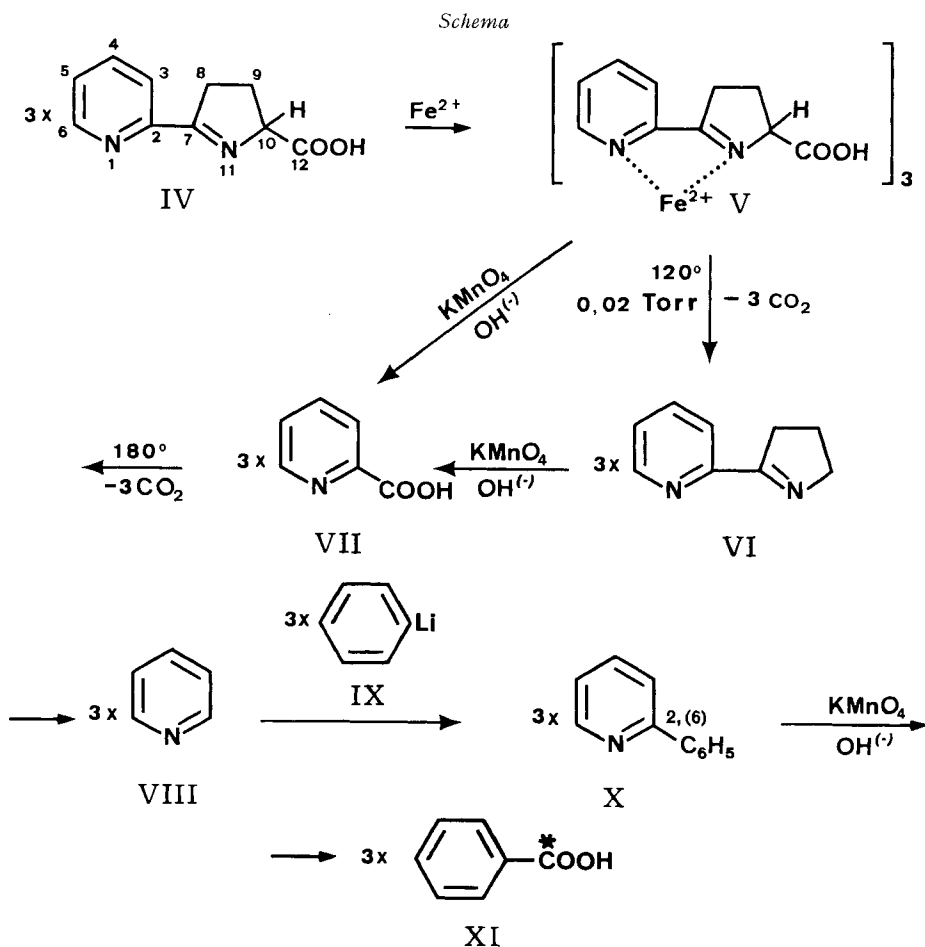


¹⁾ Teil der Dissertation von A. M. Helbling, Universität Zürich, 1975.

der Glycerin-Stoffwechsel mit einer enzymatischen Oxydation zum Glycerinaldehyd (II) beginnt. Da jedoch Glycerin eine prochirale Molekel ist, entstehen bei der Oxydation äquimolare Mengen von 1-[^{14}C]- und 3-[^{14}C]-D-Glycerinaldehyd (II und III)²⁾. Dies bedeutet, dass die ^{14}C -Einbauversuche so gedeutet werden müssen, wie wenn 1,3-[^{14}C]-D-Glycerinaldehyd als Vorläufer verwendet worden wäre.

Um die radioaktive Verschmierung möglichst niedrig zu halten, werden zur Herstellung der Nährlösung (1225 ml) zunächst 27 ml nichtradioaktives Glycerin (87%) eingesetzt [1]. Erst nach 93 Stunden Wachstum in dieser Lösung werden 3 ml 1-[^{14}C]-Glycerin (siehe exper. Teil) in 25 ml Nährlösung steril in den Fermenter eingespritzt. 7 Stunden später wird das Wachstum abgebrochen, das Ferrorosamin A (V) isoliert [1] und mit Radiochromatographie auf Reinheit geprüft. Die Einbaurrate, bezogen auf die totale Glycerin-Aktivität, beträgt *ca.* 0,03%.

Zur Bestimmung der ^{14}C -Verteilung wird das Ferrorosamin A (V) dem im *Schema* dargestellten Abbau unterworfen. Dazu werden mit synthetischem Material [4] ver-

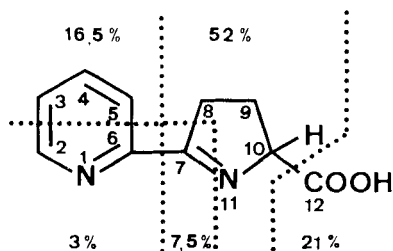


²⁾ Die Formeln I, II und III sind in der konventionellen Stereoprojektion gezeichnet.

dünnte Proben von radioaktivem V zunächst zu Apoferrerosamin (VI) decarboxyliert [5]. Da die Fragmentierung im Hochvakuum durchgeführt werden muss, kann das CO_2 [C(12) von IV oder V] nicht auf die übliche Art durch Einleiten in eine NaOH- oder $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung als Carbonat isoliert werden. Wir haben deshalb eine spezielle Apparatur entwickelt, in der die beiden Reaktionsprodukte getrennt werden, das CO_2 gereinigt und schliesslich als BaCO_3 unter Luftausschluss ausgefällt (siehe exper. Teil). Um eine Aktivitätsverschmierung durch die Gegenwart von Katalysatoren wie Metallkationen während der unter sehr energiereichen Bedingungen durchgeführten Decarboxylierung [5] zu vermeiden, wird auf den Einsatz eines Katalysators verzichtet. Ausserdem werden die Produkte Apoferrerosamin und CO_2 durch Destillation laufend aus dem Reaktionsgefäss entfernt.

Sowohl das Ferrerosamin A als auch das Apoferrerosamin werden oxydativ zur Picolinsäure (VII) abgebaut, so dass sich die Radioaktivität an C(8), C(9) und C(10) (von IV) aus den experimentell ermittelten Aktivitäten an C(12) und in der Picolinsäure berechnen lässt. Die Picolinsäure wird auf ähnliche Art wie V zu Pyridin (VIII) decarboxyliert [6] und die Aktivität an C(7) von VII sowie im Pyridin gemessen. VIII wird daraufhin einem weiteren Abbau unterworfen: durch 2- bzw. 6-Phenylie- rung (\rightarrow X) und anschliessende Oxydation mit KMnO_4 kann nämlich C(2) bzw. C(6) (von IV) als Benzoesäure (XI) isoliert und die Aktivität bestimmt werden [7].

Aufgrund der Abbauergebnisse ist die Radioaktivität im Proferrerosamin A so verteilt, wie in Formel XII dargestellt.



XII

Entgegen unserer ersten Hypothese [1] (vgl. auch [8]) ist das Glycerin also nicht hauptsächlich an der Biogenese der Picolinsäure, sondern an jener der Pyrrolin-carbonsäure beteiligt³⁾. Wir setzen unsere Forschungen fort, um die Aktivität an den einzelnen C-Atomen im Pyrrolin-Ring und die Beteiligung von L-Asparagin an der Biogenese des Picolin-Teils der Molekel festzustellen.

Wir danken Herrn Dr. *W.-D. Woggon* für seine guten Ratschläge bei den Arbeiten mit radioaktiven Substanzen, Herrn *H. Frohofer* für die Durchführung der zahlreichen Radioaktivitätsmessungen und Herrn *B. Thüler* und Fr. *J. Ulrich* für die sorgfältig ausgeführten Glasarbeiten. Das *Pseudomonas roseus fluorescens* wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. *J. C. Marchal*, Universität Nancy, Frankreich, zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm besonders danken.

³⁾ Schon in einem analog durchgeführten Vorversuch (jedoch 108 Stunden Verweildauer des radioaktiven Vorläufers) haben wir bei einer Einbau-Rate von 2,95% rund 70% der ^{14}C -Aktivität im Pyrrolin-carbonsäureteil vorgefunden.

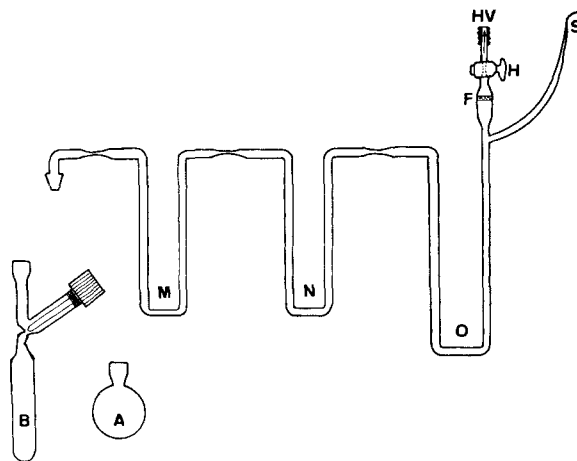
Experimenteller Teil

Allgemeines. Messungen der Radioaktivität werden mit einem Flüssigkeitsscintillationszähler Modell Tricarb 3320 (*Packard Instruments Co.*) durchgeführt. Für die Bestimmungen werden 1–2 mg Substanz in 5 ml Äthanol und 10 ml Scintillationslösung, bestehend aus 4 g 2,5-Diphenyloxazol und 100 mg 2,2'-(*p*-Phenyl)bis(4-methyl-5-phenyloxazol)⁴⁾ in 1000 ml Toluol, gelöst. Die Radioaktivitätsmessungen von [¹⁴C]-Bariumcarbonat erfolgen nach der Methode von *Frohofer* [9]. Für Radiodünnschichtscanning wird ein DC-Scanner *Packard* Modell 7200 mit 2 π -*Geiger-Müller*-Durchflusszählrohr benützt; Trägergas 98,7% Helium und 1,3% Isobutylalkohol.

Radioaktive Fermentkultur. Die Kultur wird wie in [1] beschrieben mit 27 ml Glycerin (87%) statt 30 g Glycerin (87%) durchgeführt. Nach 93 Std. Wachstum werden 3 ml verdünntes 1-[¹⁴C]-Glycyrin (*CEA*, Frankreich, 0,57 mCi/mmol), gemessene Totalaktivität $9,25356 \cdot 10^8$ dpm, in 25 ml Nährlösung steril eingespritzt und das Wachstum 7 Std. später abgebrochen. Für die Isolierung des markierten Ferrorosamins A wird genau nach den Vorschriften von [1] vorgegangen. Ausbeute 90,7 mg, Totalaktivität $2,74753 \cdot 10^5$ dpm, Einbaurrate 0,03%.

Abbau des radioaktiven Ferrorosamins A. Alle Reaktionen werden mit stark verdünnten radioaktiven Proben mindestens 3mal durchgeführt und die gebildeten Produkte bis zur konstanten Radioaktivität gereinigt. Für die BaCO₃-Fällung wird eine nach *Britt* [10] hergestellte und unter Stickstoff aufbewahrte Ba(OH)₂-Lösung verwendet: 1 l gesättigte Ba(OH)₂- und 200 ml 10,75proz. BaCl₂ · 2 H₂O-Lösung.

Decarboxylierung zum Apoferrorosamin (VI). Für die Decarboxylierung benützt man die in der Figur abgebildete Apparatur.



Der Kolben A wird mit 100 mg Ferrorosamin A gefüllt. Ein Büschel Glaswolle über dem Ausgang verhindert das Mitreissen von Edukt während der Decarboxylierung. Die Apparatur wird ans HV. (0,02 Torr) angeschlossen, das U-Rohr M in Trockeneis (–60°) und das Rohr N in flüssige Luft eingetaucht. A wird auf 130° (Ölbad) erhitzt, wobei ausgefrorenes CO₂ ab ca. 110° in N und weisses, kristallines Apoferrorosamin ab ca. 125° in M sichtbar wird. Nach 1 Std. werden die beiden Produkte durch Schliessen der Abschmelzstellen A/M und M/N voneinander getrennt. Ausbeute von Apoferrorosamin: 13 mg (15%).

Isolierung von CO₂ als Bariumcarbonat. Zur Reinigung des in N gefrorenen CO₂ wird der Hahn H geschlossen, das U-Rohr O in flüssige Luft und N in Trockeneis/Aceton getaucht. CO₂ destilliert langsam in O über, dann wird die Verbindungsstelle N/O zugeschmolzen. Zum Ausfällen des Bariumcarbonates wird die Hälfte des U-Rohres O in flüssige Luft getaucht, wo sich das CO₂

4) = 1,4-Bis(4-methyl-5-phenyloxazol-2-yl)benzol.

kondensiert. Durch Anbrechen der Spitze S in der Ba(OH)₂-Lösung wird diese Flüssigkeit in das Rohr eingezogen. Die Spitze S wird danach zugeschmolzen, das eingefrorene CO₂ langsam freigesetzt, das ausgefallene Bariumcarbonat nach 2 Std. über die Fritte F filtriert, in ein Zentrifugenglas gebracht, 5mal mit kochendem Wasser aufgeschlämmt und zentrifugiert, mit Methanol und Äther gewaschen und dann getrocknet (20 Std., 80–100°/0,02 Torr): 20–30 mg Bariumcarbonat pro Einsatz.

Oxydation von V zur Picolinsäure (VII). 88,4 mg (0,122 mmol) Ferrorosamin A (V) werden in 20 ml 0,1N NaOH gelöst und bei 75° portionenweise mit pulverisiertem KMnO₄ versetzt, bis die Lösung 30 Min. lang violett bleibt. Das überschüssige Permanganat wird mit wenig Methanol reduziert, das MnO₂ abzentrifugiert, die Lösung ausgeäthert, die wässrige Phase i. V. auf 5 ml eingengt, mit 3N HCl auf pH 2,80 gebracht und während drei Tagen kontinuierlich mit Äther extrahiert. Die getrocknete Äther-Phase wird eingedampft und die erhaltene Picolinsäure bei 130°/760 Torr sublimiert: 31 mg (70%).

Tabelle

Substanzen	Ansatz Nr.	Eingesetzte Akt. (dpm/mmol)	Isolierte Akt. (dpm/mmol)	% -Gehalt bezogen	
				auf V	auf VII
1- ¹⁴ C-Glycerin		2,109 · 10 ⁷			
↓					
Ferrorosamin A (V)			ca. 2,12 · 10 ⁶		
	1	134 539			
1/3 Ferrorosamin A (V)	2	105 220			
↓	3	101 900			
↓	1		27 819	20,7	
↓ CO ₂	2		24 044	22,8	
↓	3		20 100	19,7	
↓	1		105 704	78,6	
Apoferrorosamin (VI)	2		80 862	76,8	
↓	3		80 592	79,1	
↓	1		37 275	27,7	
Picolinsäure (VII)	2		29 181	27,7	
↓	3		25 483	25,1	
	4	3 575			
Picolinsäure (VII)	5	3 852			
↓	6	4 817			
↓	4		1 026		28,7
↓ CO ₂	5		1 144	7,5	29,7
↓	6		1 322		27,4
↓	4		2 595		72,6
Pyridin-Pikrat	5		2 774	16,5	72,0
↓	6		3 575		74,2
↓	5		330	3,0	8,6
Benzoessäure	6		391		8,1

Die Oxydation von Apoferrerosamin (VI) zu VII wird analog durchgeführt.

Picolinsäure-Decarboxylierung zum Pyridin (VIII). In der weiter oben beschriebenen Apparatur wird der Kolben A durch ein spezielles Bombenrohr B von ca. 12 ml Inhalt ersetzt. Unterhalb des Schliffaufsatzes von B ist seitlich ein Ventilhahn (Bistabil 2,5 mm, R. Brand, Wertheim, BRD) angebracht, mit welchem B vom übrigen System abgeschlossen werden kann.

98,5 mg (0,8 mmol) reine Picolinsäure (VII) werden im Bombenrohr evakuiert (0,02 Torr) und nach Schliessen des Ventilhahnes in den auf 125° geheizten Ofen (Büchi GKR-50, Flawil, Schweiz) gebracht. Ab 180° ist die CO₂-Entwicklung deutlich sichtbar. Sie hört nach ca. 50 Min. auf. Das Bombenrohr wird auf –178° abgekühlt und bei immer noch geschlossenem Ventilhahn an die U-Rohre angeschlossen. Die U-Rohre werden evakuiert (0,02 Torr), M auf –60° (Aceton, Trockeneis) und N auf –178° (flüssige Luft) abgekühlt. Nach dem Öffnen des Ventilhahnes zum Bombenrohr B wird die Kühlung von B langsam entfernt, wodurch das CO₂ destilliert und sich in N kondensiert. Hat B RT. erreicht, destilliert das gebildete Pyridin ins Rohr M über, und nach 20 Min. können die Abschmelzstellen B/M und M/N geschlossen werden. CO₂ wird wie oben beschrieben gereinigt und als BaCO₃ isoliert.

10% des in M kondensierten Pyridins werden mit einer halbgesättigten äthanolischen Pikrinsäure-Lösung versetzt, das ausgefallene Pyridin-Pikrat 1mal aus Wasser, dann aus Essigester umkristallisiert (Smp. 158–160°) und getrocknet: 13,6 mg (55%).

Im Bombenrohr B bleibt ein Rückstand zurück, der in Methanol aufgenommen und sublimiert wird. Die so zurückgewonnene Picolinsäure kann für den weiteren Abbau verwendet werden.

Abbau von Pyridin über 2(6)-Phenylpyridin zur Benzoesäure. Phenyllithium (IX) wird nach [11] hergestellt und die Oxydation des 2- bzw. 6-Phenylpyridins (X) zur Benzoesäure (XI) nach Vorschrift [7] durchgeführt. Ausbeute 30%.

Radioaktive Messungen. Die Ergebnisse der verschiedenen Aktivitäts-Messungen sind in der Tabelle zusammengefasst.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 8. Mitt.: A. M. Helbling & M. Viscontini, *Helv.* 59, 2278 (1976).
- [2] M. Pouteau-Thouvenot, M. Choussy, M. Barbier & M. Viscontini, *Helv.* 52, 2392 (1969).
- [3] J. C. Marchal, *Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy*, 10,90 (1937); M. Pouteau-Thouvenot, M. Choussy, A. Gaudemer & M. Barbier, *Bull. Soc. chim. biol.* 52, 51 (1970).
- [4] A. M. Helbling & M. Viscontini, *Helv.* 59, 938 (1976).
- [5] M. Pouteau-Thouvenot, A. Gaudemer & M. Barbier, *Bull. Soc. chim. biol.* 47, 2085 (1965).
- [6] J. A. Zoltewicz, C. L. Smith & J. D. Meyer, *Tetrahedron* 24, 2269 (1968).
- [7] D. Gross, A. Feige, R. Stecher, A. Zureck & H. R. Schütte, *Z. Naturforsch.* 20b, 1116 (1965).
- [8] D. Gross in «Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe», Bd. 28, S. 145, Springer-Verlag, Wien, New York 1970.
- [9] H. Frohofer, *Z. analyt. Chem.* 253, 97 (1971).
- [10] J. J. Brill, Dissertation ETH-Z, Zürich 1959.
- [11] J. C. W. Evans & C. F. H. Allen, *Org. Synth. Coll. Vol. II*, 517 (1943).