

MIKROBIELLE UMWANDLUNG VON GIBBERELLINEN— ENTACETYLIERUNG VON O(3,13)-DIACETYLGIBBERELL- LINSÄURE*

G. SCHNEIDER, G. SEMBDNER, I. FOCKE und K. SCHREIBER

Institut für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Halle(Saale),
DDR und Institut für Getreideforschung der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu
Berlin, Bernburg-Hadmarsleben, DDR

(Eingegangen 12. März 1971)

Zusammenfassung—Der Pilz *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L. K. Jones) Boerema spaltet die O(3)-Acetyl-Bindung von Gibberellinsäureacetaten, ohne gleichzeitig vorhandene O(13)-Acetyl-, 19,10-Lacton- bzw. Methylester-Gruppierungen anzugreifen. Inkubation von O(3,13)-Diacetylgibberellinsäure (VII) ergab durch mikrobielle Entacetylierung die bisher unzugängliche O(13)-Acetylgibberellinsäure (V).

Abstract—The fungus *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L. K. Jones) Boerema has been shown to split off the O(3)-acetyl group of gibberellic acid acetates without affecting O(13)-acetyl 19,10-lactone, and methyl ester groups. Fungal deacetylation of O(3,13)-diacetylgibberellic acid (VII) yielded O(13)-acetylgibberellic acid (V), which has not previously been prepared.

IM RAHMEN unserer Untersuchungen über Umwandlung bzw. Abbau von Gibberellinen durch Mikroorganismen überprüften wir zahlreiche Pilzstämme und Bakterienkulturen auf ihre Fähigkeit, Gibberellinsäure (I) (GA_3) und bestimmte Gibberellinsäurederivate zu metabolisieren. Bei Screening-Untersuchungen² mit Pilzen, die von Pflanzen bzw. aus Pflanzennähe isoliert worden waren, fanden wir unter ca. 50 geprüften Stämmen mehrere Isolate, die zugesetzte O(3,13)-Diacetylgibberellinsäure (VII) in eine polarere Verbindung umwandeln. Die eingehende Untersuchung dieser Transformation erfolgte mit Kulturen des Pilzes *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L. K. Jones) Boerema, der unter den angewendeten Bedingungen (s. Experimenteller Teil) in 3 Tagen ca. 50% der applizierten Menge von VII (4 mg/100 ml) umsetzte. Nach einer für Gibberelline üblichen Aufarbeitung der flüssigen Kulturmedien (insgesamt 800 ml) und anschließender Chromatographie der Extrakte erhielten wir Kristalle (Fp. 124–125°) einer Substanz, bei der es sich nach den durchgeführten Untersuchungen um die bisher unbekannte O(13)-Acetylgibberellinsäure ($3\beta, 10\text{-Dihydroxy-}13\text{-acetoxy-}20\text{-norgibberella-}1,16\text{-dien-}7,19\text{-disäure-}19,10\text{-lacton, V}$) handelt.³

Die dünnenschichtchromatographische Charakterisierung von V erfolgte unter Verwendung der in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Entwicklungsgemische und Vergleichssubstanzen. Bei der Dünnschichtelektrophorese⁴ erwies sich V als Monocarbonsäure ($\bar{U}_F = 0,52 \mu \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm} \cdot \text{Volt}^{-1}$).

* Gibberelline—XIX. XVIII. Mitteilung 1. c.¹

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. Kurt Mothes aus Anlaß seines 70. Geburtstages gewidmet.

¹ G. ADAM, *Tetrahedron Letters* 1357 (1971).

² I. FOCKE, G. SEMBDNER, G. SCHNEIDER und K. SCHREIBER, Veröffentlichung in Vorbereitung.

³ Zur Nomenklatur vgl. E. HOHNE, G. SCHNEIDER und K. SCHREIBER, *J. Prakt. Chemie*, **312**, 816 (1971) sowie J. W. ROWE, *The Common and Systematic Nomenclature of Cyclic Diterpenes*, Forest Products Laboratory, 1. Forest Service U.S. Department of Agriculture, Madison, Wisconsin **53**, 705 (1968).

⁴ G. SCHNEIDER, G. SEMBDNER und K. SCHREIBER, *J. Chromatog.* **19**, 558 (1965).

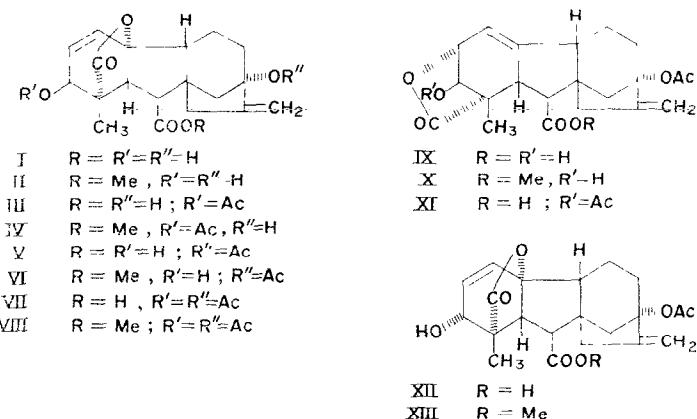


TABELLE 1 DUNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG VON O(13)-ACETYL-GIBBERELLINSAURE (V)

	R_f -Werte*	A	D	E	F
Gibberellinsaure (I)	0,09	0,09	0,14	0,02	
Gibberellinsäuremethylester (II)	0,33	0,14	0,31	0,07	
O(3)-Acetylgibberellinsäure(III)	0,43	0,27	0,52	0,10	
O(13)-Acetylgibberellinsäure-19,2-lacton (IX)	0,39	0,26	0,30	0,05	
O(13)-Acetylgibberellinsäure (V)	0,34	0,24	0,40	0,05	
O(3)-Acetylgibberellinsäuremethylester (IV)	0,80	0,35	0,84	0,29	
O(13)-Acetylgibberellinsäuremethylester-19,2-lacton (X)	0,63	0,35	0,46	0,10	
O(13)-Acetylgibberellinsäuremethylester (VI)	0,73	0,33	0,68	0,21	

* TLC an Kieselgel G (MERCK) mit den Entwicklungsgemischen A, $CHCl_3$ -EtOAc-HOAc (16:4:1); B, $CHCl_3$ -EtOAc-HOAc (95:5:2); C, $CHCl_3$ -EtOAc-HOAc (98:2:1); D, $(iso-Pr)_2O$ -HOAc (49:1); E, Benzol-HOAc (4:1); F, Benzol-HOAc (9:1). Laufstrecke: 15 cm.

Die Verbindung zeigt im IR-Spektrum (Chloroform) Banden für Säure-carbonyl (1720 cm^{-1}), O-Acetyl (1745 cm^{-1}) und γ -Lacton-carbonyl (1782 cm^{-1}). Die exocyclische Methylengruppe läßt sich durch Banden bei 1665 und 895 cm^{-1} erkennen. Die Absorption bei 3625 cm^{-1} weist auf eine freie sekundäre OH-Gruppe, die durch rasche Acetylierbarkeit der Substanz bestätigt wurde. Dünnschichtchromatographisch ist das dabei entstehende Acetat mit O(3,13)-Diacetylgibberellinsäure (VII) identisch. Nach dem Massenspektrum ($M^+ = 388 m/e$) kommt Verbindung V die Summenformel $C_{21}H_{24}O_7$ zu, womit die Möglichkeit einer zusätzlichen Hydroxylierung von VII durch den Pilz ausgeschlossen werden konnte.

Diese Befunde legen die Annahme nahe, daß in der Pilzkultur eine Entacetylierung der 3-Acetoxy-Gruppe stattgefunden haben muß. Jedoch blieb zu prüfen, ob gleichzeitig eine Umlagerung der Lactongruppierung bzw. Epimerisierung an C-3 erfolgt ist. Von den danach möglichen 3 Strukturen V, IX und XII konnte das 19,2-Lacton IX auf chemisch präparativem Wege durch partielle Entacetylierung von VII nach einer Methode von Kuhn⁵

⁵ M. KUHN und A.v. WARTBURG, *Helv. Chim. Acta* **51**, 163 (1968).

TABELLE 2. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG VON O(13)-ACETYL-3-KETO-GIBBERELLINSÄUREMETHYLESTER (XV)

Verbindung	<i>R</i> _f -Werte*			
	B	C	D†	F
Gibberellinsäure (I)	0,02	0	0,04	0,02
O(3)-Acetylgibberellinsäure (III)	0,08	0,04	0,11	0,09
O(3,13)-Diacetylgibberellinsäure (VII)	0,32	0,16	0,34	0,28
O(3,13)-Diacetylgibberellinsäure-19,2-lacton (XI)	0,32	0,15	0,33	0,24
O(13)-Acetylgibberellinsäure (V)	0,04	0,02	0,09	0,06
O(13)-Acetylgibberellinsäuremethylester (VI)	0,25	0,16	0,23	0,17
O(13)-Acetyl-3-keto-gibberellinsäuremethylester (XV) (aus O(13)-Acetylgibberellinsäure, V)	0,39	0,29	0,44	0,49
O(13)-Acetyl-3-keto-gibberellinsäuremethylester (XV) (aus Gibberellinsäure, I)	0,39	0,29	0,44	0,49

* TLC an Kieselgel PF₂₅₄ (MERCK) Laufstrecke: 15 cm, Entwicklungsgemische vgl. Tabelle 1.

† Abweichende *R*_f-Werte gegenüber Tabelle 1 beruhen auf unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Sorptionsmittel und Di-iso-propyläther-Chargen.

gewonnen werden. Die Konstitution von IX wurde durch IR- und Massenspektrum sowie durch das NMR-Spektrum des Methylesters X bewiesen. Die 1(10)-Stellung der Doppelbindung läßt sich aus dem Quintett für das 1-H bei $\delta = 5,79$ ppm mit den Kopplungskonstanten $J_{1-2} = 5,0$ Hz, $J_{1-9} = 2,5$ Hz und $J_{1-5} = 2,5$ Hz ableiten. Dem Signal bei 4,25 ppm kann das äquatoriale Proton an C-3 zugeordnet werden.⁶

Ein Vergleich der IR- und Massenspektren sowie der *R*_f-Werte (vgl. Tabelle 1) zeigt jedoch, daß IX und die isolierte Verbindung V nicht identisch sind. Als ein weiteres Kriterium wurde die Oxydierbarkeit der freien sekundären OH-Gruppe nach Mancera *et al.*⁷ untersucht. Unter diesen Bedingungen sind X und XIII nicht oxydierbar.⁸ Der Methylester der isolierten Substanz dagegen läßt sich in Übereinstimmung mit Formel VI zum α,β -ungesättigten Ketoester XV^{9,10} umsetzen, der anhand des UV-Spektrums und durch dünn schichtchromatographischen Vergleich mit authentischem XV (vgl. Abb. 1, Tabelle 2) identifiziert wurde.

Bei der beschriebenen mikrobiellen Transformation von O(3,13)-Diacetylgibberellinsäure (VII) handelt es sich somit um eine partielle Entacetylierung zur O(13)-Acetylgibberellinsäure (V). Diese Reaktion findet in gleicher Weise statt, wenn der Pilzkultur statt VII die O(3)-Acetylgibberellinsäure (III) bzw. deren Methylester (IV) oder O(3,13)-Diacetylgibberellinsäuremethylester (VIII) zugesetzt werden (Abb. 2). Da unter den angegebenen Kulturbedingungen weder die empfindliche 19,10-Lactongruppierung noch andere Esterbindungen angegriffen werden, ist anzunehmen, daß der Pilz für die Entacetylierung an C-3 ein Enzym relativ hoher Spezifität besitzt. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang das

⁶ J. R. HANSON, *J. Chem. Soc.* 5036 (1965).

⁷ O. MANCERA, G. ROSENKRANZ und F. SONDEIMER, *J. Chem. Soc.* 2189 (1953).

⁸ I. A. GURVIČ, N. S. KOBRINA und V. F. KUČEROV, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Chim.* 1805 (1969).

⁹ I. A. GURVIČ, I. M. MILSTEIN und V. F. KUČEROV, *Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Chim.* 184 (1966).

¹⁰ B. E. CROSS, *J. Chem. Soc.* 3022 (1960).

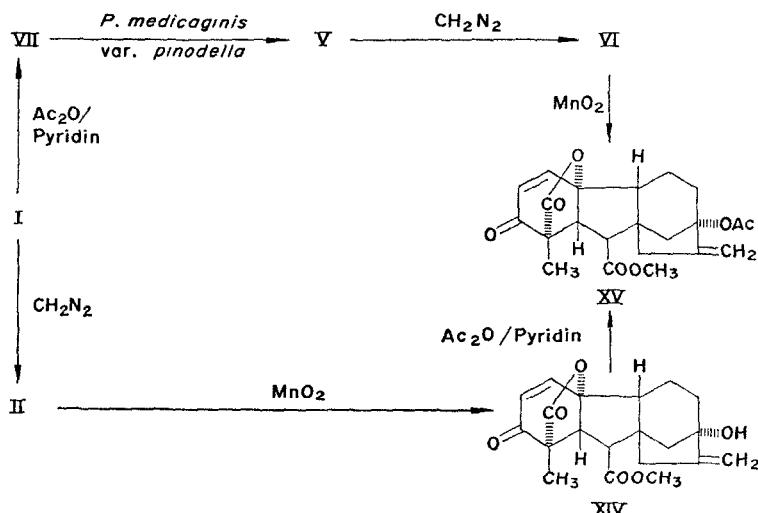


ABB. 1. IDENTIFIZIERUNG VON V DURCH ÜBERFÜHRUNG IN DEN BEKANNTEN 3-KETOESTER XV.

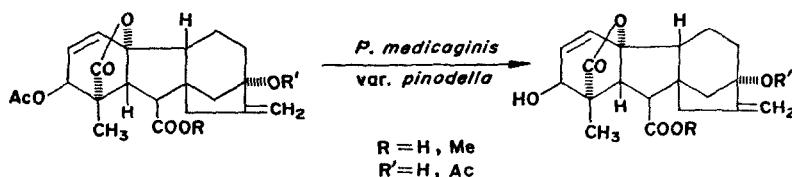


ABB. 2. SCHEMA DER ENTACETYLIERUNG VON GIBBERELLINSÄUREACETATEN DURCH *Phoma medicaginis* VAR. *pinodella*.

natürliche Vorkommen von O(3)-Acetylgibberellinsäure (III) in *Fusarium moniliforme* Sheld.¹¹

O(13)-Acetylgibberellinsäure, die chemisch präparativ bisher nicht zugänglich war, stellt das erste durch einen Pilz ohne eigene Gibberellin-Biosynthesefähigkeit gebildete Gibberellinderivat dar. Mikrobielle Transformationen werden auch auf dem Gibberellingegebiet an Bedeutung gewinnen, sobald geeignete Stämme aufgefunden werden. Ein Gibberellinabbau durch Bodenmikroorganismen wird nach einer Mitteilung von Brian *et al.*¹² allgemein angenommen, ist jedoch bisher nur für *Pseudomonas fluorescens* und *Xanthomonas* sp. nachgewiesen¹³ und bedarf weiterer spezieller Untersuchungen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach Boetius bestimmt und sind korrigiert. Das NMR-Spektrum wurde in CDCl_3 mit Tetramethylsilan als innerem Standard aufgenommen.

Für die TLC wurden Kieselgel-G- bzw. Kieselgel-PF₂₅₄-Schichten (MERCK) von 0,5 mm für analytische bzw. 1,0 mm Dicke für präparative Zwecke mit einem Streichgerät hergestellt, luftgetrocknet und 30 min. bei 110° aktiviert. Zur allgemeinen Methodik vgl. ¹⁴.

¹¹ K. SCHREIBER, G. SCHNEIDER, G. SEMBDNER und I. FOCKE, *Phytochem.*, **5**, 1221 (1966).

¹² P. W. BRIAN, G. W. ELSON, H. G. HEMMING und M. RADLEY, *J. Sci. Food Agric.* **5**, 602 (1954).

¹³ J. RIVIÈRE, P. LABOUREUR und M. SECHET, *Ann. Physiol. Vég.* **8**, 209 (1966).

¹⁴ G. SEMBDNER und K. SCHREIBER, *Phytochem.* 4, 49 (1965).

Kulturbedingungen und Isolierung von O(13)-Acetyl-gibberellinsäure (3 β ,10-Dihydroxy-13-acetoxy-20-norgibberella-1,16-dien-7,19-disäure-19,10-lacton V).

Die Kultivierung von *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L. K. Jones) Boerema erfolgte als submerse Schüttelkultur in einem Medium aus 0,2% Casamino Acids (Difco), 0,5% Yeast Extract (Difco), 2,0% Pepton (Difco) und 5,0% Glucose. Insgesamt wurden 8 Kulturgefäße mit je 100 ml Medium angesetzt. Zur Impfung des Mediums verwendete man eine Pyknidiosporensuspension des Pilzes (1,5 ml/100 ml Medium). Nach 3-tägiger Vorkultur des Pilzes bei etwa 25°C und diffusem Tageslicht wurde O(3,13)-Diacetyl-gibberellinsäure (VII) zugesetzt (4 mg/100 ml Medium) und weitere 3 Tage inkubiert.

Danach wurde das filtrierte Kulturmedium bei pH 2-8 mit Essigester extrahiert und der Rohextrakt (700 mg) an 50 g Kieselgel (Woelm) chromatographiert (Gradientenelution mit CHCl₃-Essigester = 50:0; 45:5 ml usw.). Die Fraktionen der Mischungsverhältnisse 45:5 bis 35:15 enthielten unverändertes VII, die von 25:25 bis 15:35 das Umwandlungsprodukt V (54 mg). Nochmalige Säulenchromatographie dieser Rohfraktion an 5 g Kieselgel (Woelm) und nachfolgende präparative TLC an Kieselgel PF₂₅₄ (MERCK) mit Gemisch A (vgl. Tab. 1) ergab nach Elution der Zone von *R*_f 0,30-0,40 5,2 mg von O(13)-Acetyl-gibberellinsäure (V). Die als Nadeln (EtOH/H₂O) kristallisierende Verbindung zeigt einen Schmp. von 124-125° (Z.), $[\alpha]_D^{20} + 125,0^\circ$ (c = 0,13, EtOH) IR (in CHCl₃): 3625 (OH), 1782 (γ -Lacton-carbonyl), 1745 (O-Acetyl), 1720 (Säure-carbonyl), 1665, 895 cm⁻¹ (=CH₂).

Massenspektrum. C₂₁H₂₄O₇ (388,4): 388(M⁺), 370 (M-18), 328(M-60), 310 (328-18), 284 (328-44), 266 (284-18), 239, 221, 195 m/e.

Entacytylierung von O(3)-Acetyl-gibberellinsäure (III), O(3)-Acetyl-gibberellinsäuremethylester (IV) sowie von O(3,13)-Diacetyl-gibberellinsäuremethylester (VIII).

Nach 3-tägiger Inkubation von *P. medicaginis* var. *pinodella* mit O(3)-Acetyl-gibberellinsäure (III; 2 mg/50 ml Medium) wurde Gibberellinsäure (I) dünnsschichtchromatographisch nachgewiesen und identifiziert (Tabelle 1).

Unter gleichen Bedingungen wurde O(3)-Acetyl-gibberellinsäuremethylester (IV) zu Gibberellinsäuremethylester (II) umgewandelt (dünnsschicht-chromatographischen Identifizierung vgl. Tabelle 1).

Nach Zusatz von O(3,13)-Diacetyl-gibberellinsäuremethylester (VIII) zu *P. medicaginis* var. *pinodella* erhielten wir O(3)-Acetyl-gibberellinsäuremethylester (VI), der mit dem durch Veresterung von V (s.u.) erhaltenen VI dünnsschichtchromatographisch übereinstimmte (Tabellen 1 und 2).

Acetylierung von O(13)-Acetyl-gibberellinsäure (V)

0,2 mg V wurden bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß mit 0,2 ml Acetanhydrid in 0,2 ml Pyridin versetzt. Nach 20 min. war die Acetylierung beendet. Die entstandene Verbindung ist dünnsschichtchromatographisch identisch (Tabelle 2) mit O(3,13)-Diacetyl-gibberellinsäure (10-Hydroxy-3 β ,13-diacetoxy-20-norgibberella-1,16-dien-7,19-disäure-19,10-lacton, VII).^{8,10}

O(13)-Acetyl-gibberellinsäuremethylester (3 β ,10-Dihydroxy-13-acetoxy-20-norgibberella-1,16-dien-7-säuremethylester-19-säure-19,10-lacton, VI).

0,7 mg V wurden in Methanol mit äther. CH₂N₂ verestert. Zur dünnsschicht-chromatographischen Charakterisierung von VI vgl. Tabelle 1.

Oxydation des O(13)-Acetyl-gibberellinsäuremethylesters (VI)

0,5 mg VI wurden in 3 ml CHCl₃ mit 50 mg MnO₂⁷ 48 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließende Reinigung durch präparative TLC (Laufmittel B) ergab den erwarteten 3-Ketoester XV (10-Hydroxy-13-acetoxy-3-keto-20-norgibberella-1,16-dien-7-säuremethylester-19-säure-19,10-lacton, XV). UV-Spektrum und *R*_f-Werte stimmen mit jenen von authentischem XV überein⁹ (vgl. Schema 1, Tabelle 2).

Entacytylierung von O(3,13)-Diacetyl-gibberellinsäure (VII)

600 mg O(3,13)-Diacetyl-gibberellinsäure (VII) wurden in 150 ml absolutem Methanol mit 1,5 g ZnCl₂ 4 Std. unter Rückfluß erhitzt. Der zur Trockne eingedampfte Rückstand wurde mit 50 ml H₂O aufgenommen und bei pH 2,5 mit Essigester extrahiert. Der Essigesterextrakt (520 mg) wurde an 60 g Kieselgel (Woelm) chromatographiert (Gradientenelution mit CHCl₃-Essigester (V/V) = 200:0; 180:20 ml usw.) und lieferte 150 mg unverändertes Diacetat VII (Frakt. 180:20) und 165 mg IX (2 α , 3 β -Dihydroxy-13-acetoxy-20-norgibberella-1(10), 16-dien-7,19-disäure-19,2-lacton) (30% d.Th., Frakt. 160:40 bis 100:100). Kristallisation aus Essigester/Petroläther ergab Prismen vom Schmp. 224-225° (Z.), $[\alpha]_D^{20} + 85,0^\circ$ (c = 0,365, EtOH).

IR (Nujol). 3250 br., 1755 (γ -Lacton-carbonyl), 1726 (Ester-carbonyl), 1710 (Säure-carbonyl), 1665, 890 (=CH₂), 1240 cm⁻¹ (Acetat).

IR (in CHCl₃). 3600 (Hydroxyl), 1778 (γ -Lacton-carbonyl), 1738 (Ester-carbonyl), 1710 (Säure-carbonyl), 1670, 895 cm⁻¹ (=CH₂).

Massenspektrum. $C_{21}H_{24}O_7$ (388,4): 388 (M^+), 370 (M-18), 328 (M-60), 310 (328-18), 284 (328-44), 266 (284-18), 238, 221, 209, 195 m/e . R_f -Werte vgl. Tabelle 1.

O(13)-Acetyl-gibberellinsäuremethylester-19,2-lacton (X)

20 mg IX wurden in Methanol mit äther. CH_2N_2 verestert. Nach Abdampfen der Lösungsmittel erhielten wir X ($2\alpha,3\beta$ -Dihydroxy-13-acetoxy-20-norgibberella-1(10),16-dien-7-säuremethylester-19,2-lacton). Schmp. 224-225°, $[\alpha]_D^{10} + 72,0^\circ$ ($c = 0,35$ EtOH).

IR (in $CHCl_3$). 3630 (---OH), 1778 (γ -Lacton-carbonyl), 1730-1740 (2 Ester-carbonyle), 1670 cm^{-1} ($=CH_2$).

NMR (in $CDCl_3$). 1,19 (s, 18-H₃), 1,97 (s, OAc), 2,65 bzw. 2,80 (dt, $J_{9-1} = 3,0$ Hz, $J_{9-11\alpha} = 3,0$ Hz, 9-H), 2,58 (d, $J_{6-5} = 6,0$ Hz, 6-H), 3,27 (q, $J_{5-1} = 2,5$ Hz, $J_{5-6} = 6,0$ Hz, 5-H), 3,72 (s, OCH_3), 4,25 (br., 3-H), 4,73 (t, $J_{2-1} = 5,0$ Hz, $J_{2-3} = 5,0$ Hz, 2-H), 4,95 (m, $=CH_2$) 5,79 ppm (quintett, $J_{1-2} = 5,0$ Hz, $J_{1-9} = 2,5$ Hz, $J_{1-5} = 2,5$ Hz, 1-H).

Versuch zur Oxydation von O(13)-Acetyl-gibberellinsäuremethylester-19,2-lacton (X) mit Mangandioxid.

40 mg X wurden in $CHCl_3$ (3 ml) mit 50 mg MnO_2 bei Raumtemp. 72 Stdn. geschüttelt. Die eingesetzte Substanz blieb unverändert.

Acetylierung von O(13)-Acetyl-gibberellinsäure-19,2-lacton (IX)

4 mg IX wurden mit Ac_2O /Pyrindin bei Raumtemp. acetyliert. Nach 40 min. war die Umsetzung zu 2 α -Hydroxy- $3\beta,13$ -diacetoxy-20-norgibberella-1(10),16-dien-7,19-disäure-19,2-lacton (XI) beendet. Charakterisierung durch TLC vgl. Tabelle 2.

Anerkennung—Herrn Professur Dr. H. Budzikiewicz, Köln, danken wir für die Aufnahme der Massenspektren und Herrn Prof. Dr. F. Bohlmann, Berlin, für das NMR-Spektrum. Für technische Mitarbeit sind wir Frau J. Kilian und Fräulein A. Dettmann zu Dank verpflichtet.