

KATABOLISMUS VON 4',6-DIHYDROXYAURON IN PFLANZLICHEN ZELLSUSPENSIONSKULTUREN

WOLFGANG BARZ, FRIEDRIKE MOHR und ERNST TEUFEL

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Universität, 44 Münster, Westf., Germany

(Eingegangen 23. Januar 1974)

Key Word Index—*Leguminosae*; *Umbelliferae*; plant cell suspension cultures; aurone catabolism *p*-hydroxybenzoic acid.

Abstract—Cell suspension cultures of *Glycine max*, *Phaseolus aureus*, *Cicer arietinum* and *Petroselinum hortense* were shown to catabolize (α - ^{14}C)-4',6-dihydroxyaurone as measured by $^{14}\text{CO}_2$ production and isolation of (^{14}C)-*p*-hydroxybenzoic acid. Aurone catabolism in plants is thus comparable with the degradation of chalcones, flavanones and flavonols because in all cases the B-ring is liberated as a substituted benzoic acid.

Zusammenfassung—Zellsuspensionskulturen von *Glycine max*, *Phaseolus aureus*, *Cicer arietinum* und *Petroselinum hortense* katabolisieren (α - ^{14}C)-4',6-Dihydroxyauron unter Bildung von $^{14}\text{CO}_2$, als Metabolit wurde (^{14}C)-*p*-Hydroxybenzoesäure isoliert. Der Abbau von Auronen in Pflanzen ist vergleichbar dem von Chalkonen, Flavanonen und Flavonolen, da in allen Fällen der B-Ring als substituierte Benzoesäure freigesetzt wird.

EINLEITUNG

FÜR UNTERSUCHUNGEN über den Katabolismus von Flavonoiden¹⁻³ und Isoflavonoiden^{4,5} wie auch anderen aromatischen Pflanzeninhaltsstoffen⁶⁻⁹ haben sich pflanzliche Zellsuspensionskulturen als besonders geeignete Untersuchungsobjekte erwiesen. Chalkone, Flavanone und Flavonole können dabei vollständig bis zu CO_2 abgebaut werden, wobei aus den B-Ringen entsprechend substituierte Benzoesäuren als Katabolite intermediär auftreten.

Da auch andere Flavonoidklassen als metabolisch aktive Stoffwechselprodukte betrachtet werden müssen¹⁰ haben wir aus der Klasse der Aurone das 4',6-Dihydroxyauron (Hispidol,¹¹ I in Structure 1) auf seinen Abbau in Zellsuspensionskulturen der Sojabohne, Mungbohne, Kichererbse und Petersilie untersucht. Durch ^{14}C -Markierung in der α -Position des Aurons könnte ein evtl. Abbau zu *p*-Hydroxybenzoesäure leicht nachgewiesen werden.

¹ BARZ, W. (1972) *Physiol. Chem.* **353**, 137.

² HÖSEL, W., SHAW, P. D. und BARZ, W. (1972) *Z. Naturforsch.* **27b**, 946.

³ JANISTYN, B., BARZ, W. und POHL, R. (1971) *Z. Naturforsch.* **26b**, 973.

⁴ BERLIN, J. und BARZ, W. (1971) *Planta (Berl.)* **98**, 300.

⁵ BERLIN, J., KISS, P., MÜLLER-ENOCH, D., GIERSE, D., BARZ, W. und JANISTYN, B. *Z. Naturforsch.*, zur Publikation eingereicht.

⁶ HARMS, H., HAIDER, K., BERLIN, J., KISS, P. und BARZ, W. (1972) *Planta (Berl.)* **105**, 342.

⁷ BERLIN, J., BARZ, W., HARMS, H. und HAIDER, K. (1971) *FEBS. Letters* **16**, 141.

⁸ ELLIS, B. E. (1971) *FEBS. Letters* **18**, 228.

⁹ ELLIS, B. E. (1973) *Planta (Berl.)* **111**, 113.

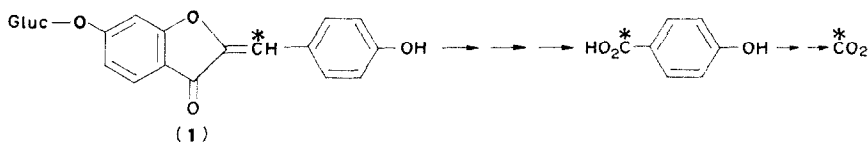
¹⁰ BARZ, W. und HÖSEL, W. (1974) In *The Flavonoids* (MABRY, T. J. und HARBORNE, J. B., eds.), Chapman & Hall, Druck.

¹¹ WONG, E. (1966) *Phytochemistry* **5**, 463.

ERGEBNISSE

(α - ^{14}C)-4',6-Dihydroxyauron-6- β -D-glucosid (Hispidol-6-glucosid) (spez. Aktivität 1 mC/mMol) wurde durch alkalische Ferricyanid-Oxidation¹¹ aus (β - ^{14}C)-2',4,4',-Trihydroxychalkon-4'- β -D-glucosid¹² synthetisiert und durch mehrfache Papierchromatographie mit den Laufmittelsystemen 1 und 2 gereinigt.

Den Zellkulturen von Sojabohne, Mungbohne, Kichererbse und Petersilie wurden in mehreren Parallelansätzen jeweils einen Tag vor Beginn der stationären Wachstumskurve 1,12 μCi Hispidol-6-glucosid unter sterilen Bedingungen appliziert. Das von den Zellkulturen über insgesamt 72 bzw. 164 Stunden gebildete CO_2 enthielt im Durchschnitt bei der Sojabohnenkultur 1,2–1,6%, bei der Mungbohnenkultur 1% und bei den Zellkulturen der Kichererbse und der Petersilie 0,6% bzw. 0,8% der jeweils applizierten Gesamtradioaktivität. Die maximale Rate der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion lag dabei zwischen der 12 und 24. Stunde nach Versuchsbeginn. Durch Fraktionierung der Nährlösungen und der äthanolischen Zellextrakte nach unserem Standardverfahren¹³ ließ sich zeigen, daß der Abbau des applizierten Aurons um ein vielfaches den durch die $^{14}\text{CO}_2$ -Werte angedeuteten Prozentsatz übersteigt. In der Fraktion der wasserlöslichen, nicht phenolischen Metabolite befanden sich durchschnittlich *ca* 8–15% der Radioaktivität, während in der Sojabohnenkultur diese Fraktion mehr als 30% der Gesamtradioaktivität enthielt. Andererseits ist in der Sojabohnenkultur mit *ca* 20% der Radioaktivität einbau in äthanolische, polymere Strukturen^{4,5} der Zellen im Vergleich zu den anderen Zellkulturen (bis zu 45%) am niedrigsten. Durch dünnenschichtchromatographische Analyse der Phenol und Phenolglykosidfraktion aus den vier Zellkulturen in den Laufmitteln 2, 3, 4 und 5 ergab sich, daß das Hispidol-6-glucosid, bzw. das Aglykon vollständig metabolisiert worden war. Der Hauptkatabolit in der Fraktion der als Phenolglykoside ursprünglich vorgelegenen Produkte cochromatographierte mit *p*-Hydroxybenzoesäure. Durch Verdünnungsanalyse (nach Trägerzusatz Papierchromatographie in den Laufmitteln 2, 5, 6, 2, Sublimation im liegenden Rohr, Kieselgel-Dünnenschichtchromatographie als Acetylderivat in Laufmittel 7 und nach alkalischer Hydrolyse erneute Papierchromatographie in Laufmittel 2) wurde der eindeutige Nachweis erbracht, daß in allen vier Zellsuspensionskulturen das Hispidol zu, bzw. über *p*-Hydroxybenzoesäure abgebaut wird (Abb. 1). Zwischen 0,08 und 0,4% der applizierten Gesamtradioaktivität konnte als *p*-Hydroxybenzoesäure isoliert werden.



REAKTIONSSCHEMA DES ABBAUS VON 4',6-DIHYDROXYAURON-6- β -D-GLUCOSID ÜBER *p*-HYDROXYBENZOE-SÄURE DURCH PFLANZLICHE ZELLSUSPENSIONSKULTUREN
(* = ^{14}C -Markierung der α -Position des Aurons).

DISKUSSION

Das in Structure 1 dargestellte Abbauschema für Aurone entspricht dem früher für Chalkone,^{3,5} Flavanone⁵ und Flavonole² in Pflanzen gemachten Beobachtungen, wonach

¹² GRIEBACH, H. und PATSCHKE, L. (1972) *Chem. Ber.* **95**, 2098.

¹³ BARZ, W., ADAMEK, CH. und BERLIN, J. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1735.

die B-Ringe zu entsprechend substituierten Benzoesäuren umgewandelt werden. Dies entspricht auch einem weitverbreiteten mikrobiologischen Abbauweg für einige Flavonoidklassen.¹⁰ Für die aus dem B-Ring der Flavonoide in Pflanzen entstehenden Benzoesäuren (z.B. *p*-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure) bestätigen die vorliegenden Messungen und unsere früheren Ergebnisse^{6,7} einen weiterführenden Abbau, so daß sie als Zwischenprodukte des Abbaus angesehen werden dürfen. Hispidol ist als Inhaltsstoff der Sojabohne bekannt,¹¹ so daß der in der Sojabohnenkultur im Vergleich zu den anderen Kulturen beobachtete deutlich erhöhte Katabolismus nicht unerwartet ist. Obwohl die anderen Pflanzen kein Hispidol enthalten, ist auf Grund der engen Verwandtschaft zwischen Auronen und Chalkonen, die ja in den anderen Kulturen einem Abbau unterliegen,⁵ ein Auronabbau in allen Zellsuspensionskulturen nicht überraschend. Für die Abspaltung der Glukoseeinheit des Hispidol-6- β -D-glucosids enthalten die untersuchten Zellkulturen für Phenolglucoside spezifische β -Glykosidasen.¹⁴

Da Phloroglucin- und Resorcinstrukturen im A-Ring von Flavanonen und Chalkonen einem vollständigen Abbau unterliegen,⁵ sollte auch für das Hispidol eine Spaltung des A-Ringes erwartet werden. Untersuchungen dieser Art und entsprechende enzymatische Arbeiten über den Auronabbau werden derzeit ausgeführt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Synthese von (α -¹⁴C)-Hispidol-6-glucosid. 7,3 mg (β -¹⁴C)-2',4,4'-Trihydroxychalkon-4'- β -D-glucosid¹² wurde in verdünnter Natronlauge mit Kalium-Hexacyanoferrat-III entsprechend den Angaben von Wong¹¹ oxidiert und aufgearbeitet. Die papierchromatographische Reinigung erfolgte in den Laufmitteln 1 und 2 bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität (1 mCi/mMol). Ausbeute 3,6 mg, entsprechend 50% d.Th.

Zellsuspensionskulturen. Die Anzucht von und die Versuchsausführung mit den pflanzlichen Zellsuspensionskulturen erfolgte nach früheren Angaben.^{2,4} Die Prüfung der Zellkulturen auf Abwesenheit von Mikroorganismen vor und nach den Versuchen erfolgte nach früheren Angaben.⁷ Die Aufarbeitung der Zellkulturen und der Nährmedien ist bereits beschrieben worden.^{2,4} Die Radioaktivitätsmessung löslicher und unlöslicher Produkte erfolgte nach früheren Angaben.¹³

p-Hydroxybenzoesäure. Quantitative Bestimmungen erfolgten in Methanol mit einem Pye-Unicam SP 8000 Spektralphotometer bei 253 nm ($\log \epsilon = 4,164$).

Chromatographiesysteme. Für die Papier- und Dünnschichtchromatographie wurden folgende Laufmittel (Angaben in Volumenteilen) verwendet: 1. Essigester/Ameisensäure/*i*-Propanol/Wasser = 60/12/10/18. 2. 30%ige Essigsäure. 3. Benzol/Eisessig/Wasser = 125/72/3. 4. Chloroform/Eisessig/Wasser = 50/45/5. 5. Toluol/Ameisensäureäthylester/Ameisensäure = 5/4/1. 6. Benzol/Eisessig/Methanol/wasser = 120/72/5/1. 7. Chloroform/Eisessig = 90/10.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie.

¹⁴ HÖSEL, W. und BARZ, W. unveröffentlicht.