

Isolierung von 7-Chlorindol-3-acetamid aus *Pseudomonas aureofaciens* ATCC 15926

Isolation of 7-Chloroindole-3-acetamide from *Pseudomonas aureofaciens* ATCC 15926

Olga Salcher, Karl-Heinz van Pée und Franz Lingens

Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, D-7000 Stuttgart 70

Z. Naturforsch. **35 c**, 340–341 (1980); eingegangen am 17. Dezember 1979

Pseudomonas aureofaciens, Pseudomonadaceae, 7-Chloroindole-3-acetamide, Chloroindoles, Tryptophan Metabolism

7-Chloroindole-3-acetamide and indole-3-acetamide were enzymatically formed from crude extracts of *Pseudomonas aureofaciens* supplemented with 7-chloro-L-tryptophan or L-tryptophan. The metabolites were identified by UV-, IR-, GC-MS-spectra.

Das Bakterium *Pseudomonas aureofaciens* ATCC 15926 metabolisiert Tryptophan zu Phenylpyrrol-Derivaten [1], Indoleessigsäure [2] und 7-Chlorindoleessigsäure [3]. Als direkter Vorläufer der Biosynthese dieser Chlorindolverbindung wird 7-Chlortryptophan postuliert. Nur aus pflanzlichem Material wurden bislang 4-Chlorindoleessigsäure und deren Methylester, [4–6], jedoch keine 7-Chlorindol-Derivate isoliert.

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und Charakterisierung von 7-Chlorindol-3-acetamid beschrieben, das enzymatisch aus 7-Chlor-L-tryptophan gebildet wird. 7-Chlor-DL-tryptophan wurde synthetisiert und in die optischen Antipoden gespalten [7].

Aus in Glycerin-Minimalmedium gezüchteten Zellen von *P. aureofaciens* wurde ein Protein-Rohextrakt hergestellt [8] und einem Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 80 ml) zugesetzt. Ansatz 1: 16 ml Rohextrakt (20 mg/ml Protein), 16 ml 6 mM 7-Chlor-L-tryptophan, 16 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer, pH 7,2 und 32 ml H₂O. Bei einem parallel durchgeführten Versuchsansatz (Ansatz 2) wurde 7-Chlor-L-tryptophan durch L-Tryptophan ersetzt. Nach 24 h bei 25 °C wurde Ansatz 1 mit insgesamt 160 ml Essig-

ester/MeOH (4:1) extrahiert und wie bereits beschrieben chromatographiert [3]. Fraktionen mit $R_f = 0,78$ in der DC (Kieselgel HF₂₅₄ 60, Laufmittel: Essigester/Isopropanol/H₂O (65:24:11)) und blauer Farbreaktion mit van Urk's Reagenz [9] wurden im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Durch Umkristallisation des Rückstands aus MeOH/H₂O/Acetonitril (50:90:5) wurde eine Verbindung (Metabolit 1) mit Schmelzpunkt 175–176 °C erhalten.

Das UV-Spektrum (in MeOH, MeOH/0,1 N NaOH bzw. MeOH/0,1 N HCl) besitzt Maxima bei $\lambda_{\max} = 293$ nm, 283 nm, 273 nm und 220 nm. Zusammen mit der NH-Valenzschwingung bei 3450 cm⁻¹ aus dem IR-Spektrum (in KBr) deutet dies auf eine Indolverbindung hin.

Das Molekülion nach GC-MS (Kapillarsäule SE 30, 25 m; 80 eV; 240 °C) erscheint als Dublett bei m/e 208/210 (23%/7%). Die ist charakteristisch für eine monochlorsubstituierte Verbindung, die eine gerade Zahl von N-Atomen enthält. Das Dublett bei m/e 164 (100%) /166 (33%) entsteht durch eine Abspaltung des resonanzstabilisierten Ions m/e 44, (CONH₂⁺), die für primäre Amide typisch ist und schließt eine Chlorsubstitution der Seitenkette aus. Weitere Fragmente sind: m/e 129 (7%, M-CONH₂⁺, Cl), m/e 128 (19%, M-CONH₂⁺, HCl), m/e 102 (8%, M-CONH₂⁺, Cl, HCN), m/e 101 (18%, M-CONH₂⁺, HCl, HCN), m/e 75 (18%, M-CONH₂⁺, HCl, HCN, C₂H₂⁺).

Aufgrund der spektralen Daten kann Metabolit 1 die Struktur des 7-Chlorindol-3-acetamids zugeordnet werden. Aus Versuchsansatz 2 mit L-Tryptophan als Ausgangsverbindung wurde Metabolit 2 auf gleiche Weise isoliert. Nach den Ergebnissen aus UV, IR und GC-MS sowie Vergleich mit authentischer Vergleichssubstanz (Sigma) wurde die Verbindung als Indol-3-acetamid identifiziert.

Bei Einsatz von D-Tryptophan oder 7-Chlor-D-tryptophan wurden aus den Reaktionsgemischen weder Indol-3-acetamid noch 7-Chlorindol-3-acetamid isoliert. Indolacetamid ist ein Zwischenprodukt der Biosynthese von Indoleessigsäure bei dem Bakterium *Pseudomonas syringae* (*P. savastanoi*) [10]. Für *P. aureofaciens* ist dies – auch für 7-Chlorindoleessigsäure – durch weitere enzymatische Versuche zu klären.

Sonderdruckanforderungen an Professor F. Lingens.

0341-0382/80/0300-0340 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Danksagung

Dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit, Susanne Weiß

für die sorgfältige technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche sowie Dr. Dietrich Spitzner und Gerhard Schwinger für die Messung der GC-Spektren.

- [1] M. Gormann u. D. H. Lively, *Antibiotics* **2**, (Hrsg. D. Gottlieb u. P. D. Shaw), S. 433, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.
- [2] O. Salcher u. F. Lingens, (*J. Gen. Microbiol.*, eingereicht).
- [3] O. Salcher u. F. Lingens, *Tetrahedron Letters* **34**, 3101 (1978).
- [4] J.-C. Gandar u. C. Nitsch, *C. R. Acad. Sci. Sér. D, (Paris)* **265**, 1795 (1967).
- [5] S. Marumo, H. Abe, H. Hattori u. K. Munakata, *Agr. Biol. Chem.* **32**, 117 (1968).
- [6] K. C. Engvild, H. Egsgaard u. E. Larsen, *Physiol. Plant.* **42**, 365 (1978).
- [7] K.-H. van Pée, O. Salcher u. F. Lingens, Veröffentlichung in Vorbereitung.
- [8] E. Blumenstock, O. Salcher u. F. Lingens, *J. Gen. Microbiol.* (in press).
- [9] E. Stahl u. H. Kaldewey, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **323**, 182 (1961).
- [10] T. Kosuge, M. G. Heskestad u. E. E. Wilson, *J. Biol. Chem.* **241**, 3738 (1966).