

Die gewonnenen Extrakte wurden, in Methanol gelöst, 2 cm vom unteren Plattenrand entfernt bandförmig auf Kieselgel-Dickschichtplatten aufgetragen (Kieselgel HF₂₅₄-Merck) und mit dem Laufgemisch Chloroform/Äthanol/Ameisensäure (85 : 14,5 : 0,5) entwickelt. Die Kieselgelzonen, die die Substanzen X und Y enthielten, wurden getrennt abgekratzt, mit Methanol extrahiert und das Methanol am Rotationsverdampfer unter Stickstoffatmosphäre abdestilliert. Die auf diese Weise vorgereinigten Substanzen wurden nochmals an einer Polyamidsäule (Ultramid Pulver K 228; BM 2) mit H₂O als Elutionsmittel chromatographiert. Das H₂O wurde durch Gefriertrocknung entfernt.

Herrn Dr. Cäsar danken wir für die Aufnahme und Interpretation der Massen- und NMR-Spektren. — Der Deutschen Forschungsgemeinschaft haben wir für eine freundlich gewährte Sachbeihilfe zu danken.

Anschrift: Prof. Dr. H. Rochelmeyer, 65 Mainz, Saarstraße 21.

[Ph 497]

E. Mutschler, H. Rochelmeyer und D. Wölffling

Über die mikrobiologische Umwandlung N-haltiger Substrate

4. Mitt.: Über die mikrobiologische Umwandlung von 5-Hydroxyindol durch *Claviceps purpurea*, *Cordyceps militaris* und *Aspergillus oryzae*

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

(Eingegangen am 4. Oktober 1967)

Aus 5-Hydroxyindol wird durch den *Claviceps purpurea*-Stamm 47 A 5-Hydroxytryptophan und ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan, durch *Cordyceps militaris* ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan und ω -N-Acetyl-serotonin, durch *Aspergillus oryzae* nur ω -N-Acetyl-serotonin in der Schüttelkultur gebildet.

5-Hydroxyindole, added to submerged cultures, is converted into 5-hydroxytryptophan and ω -N-acetyl-5-hydroxytryptophan by *Claviceps purpurea* strain 47 A; into ω -N-acetyl-5-hydroxytryptophan and ω -N-acetyl-serotonin by *Cordyceps militaris*; and only into ω -N-acetyl-serotonin by *Aspergillus oryzae*.

Bei der Prüfung der Substratspezifität der Tryptophansynthese von *Claviceps purpurea* hatte Eich¹⁾ in unserem Arbeitskreis die Bildung von 5-Hydroxytryptophan aus 5-Hydroxyindol festgestellt und verschiedentlich ein zweites Umwandlungsprodukt des 5-Hydroxyindols gefunden, das bei der DC in verschiedenen Laufmitteln einen höheren Rf-Wert als 5-Hydroxytryptophan aufwies. Auch von *Aspergillus oryzae* wird aus 5-Hydroxyindol ein definiertes Umwandlungsprodukt gebildet. Durch den Pilz *Cordyceps militaris* entsteht, wie wir vorstehend berichteten²⁾, aus

¹⁾ E. Eich, Dissertation Mainz 1966.

²⁾ E. Mutschler, H. Rochelmeyer und D. Wölffling, Arch. Pharmaz. 301, 287 (1968).

5-Hydroxyindol ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan und ω -N-Acetylserotonin. Wir führten nunmehr eine vergleichende Untersuchung der 5-Hydroxyindolumwandlung mit den drei Pilzstämmen durch. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

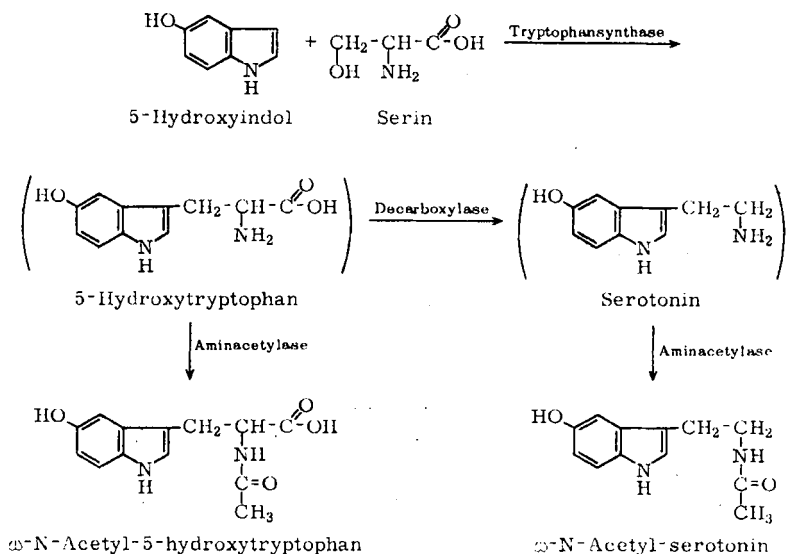
Umwandlungsprodukte von 5-Hydroxyindol durch *Claviceps purpurea*,
Cordyceps militaris und *Aspergillus oryzae*

Umwandlungsprodukt	<i>Claviceps purpurea</i> Stamm 47 A	<i>Cordyceps militaris</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
5-Hydroxytryptophan	+	—	—
ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan	+	+	—
Serotonin	—	—	—
ω -N-Acetylserotonin	—	+	+

+ in der Kulturflüssigkeit nachweisbar

— nicht nachweisbar

Die mikrobiologische Synthese verläuft dabei über folgende Stufen:



Das unterschiedliche Verhalten der Mikroorganismen ist folgendermaßen zu erklären: Der *Claviceps purpurea*-Stamm 47 A verfügt über eine hohe Tryptophan-synthase-Aktivität und über eine geringere Aminacetylase-Aktivität. Daher ist 5-Hydroxytryptophan gut neben ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan nachweisbar.

Die Decarboxylase-Aktivität ist, wenn überhaupt vorhanden, so gering, daß kein Serotonin und Acetylserotonin gefunden werden.

Cordyceps militaris weist dagegen eine hohe Aminacetylase-Aktivität auf. Dadurch wird das intermediär entstandene 5-Hydroxytryptophan durch Acetyl-Coenzym A sofort acetyliert, und es entsteht ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan. Der Pilz besitzt ferner eine Aminosäuredecarboxylase, die 5-Hydroxytryptophan decarboxyliert. Das so entstandene Serotonin wird sofort acetyliert. Daß die Decarboxylierung nicht nach der Acetylierung der Aminogruppe eintritt, konnte durch Zugabe von ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan zu den Kulturen gezeigt werden. Es erfolgte keine Decarboxylierung zu ω -N-Acetylserotonin. Für diesen Reaktionsverlauf spricht auch die Umwandlung von zugesetztem, nicht acetyliertem 5-Hydroxytryptophan. Während bei Zugabe von 5-Hydroxyindol das Verhältnis von ω -N-Acetylserotonin zu ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan 1 : 5 betrug, bildeten sich die beiden Verbindungen bei Zugabe von 5-Hydroxytryptophan im Verhältnis 3 : 2. Das besagt: Wird dem Mikroorganismus mit einem Mal viel 5-Hydroxytryptophan angeboten, reicht die Aminacetylase-Aktivität nicht aus, um die gesamte Substratmenge schnell genug zu acetylieren. Es wird deshalb ein größerer Teil der Substanz zunächst decarboxyliert und erst anschließend acetyliert.

In Kulturen von *Aspergillus oryzae* konnte nach Zugabe von 5-Hydroxyindol nur noch ω -N-Acetylserotonin nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, daß bei diesem Pilz die Tryptophansynthase-Aktivität gering ist und deshalb nur langsam 5-Hydroxytryptophan gebildet wird. Die Decarboxylase- und Aminacetylase-Aktivität muß aber so groß sein, daß alles entstandene 5-Hydroxytryptophan sofort decarboxyliert und später acetyliert wird. Es ist daher kein 5-Hydroxytryptophan, ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan und Serotonin nachweisbar.

Beschreibung der Versuche

Kulturtechnik

300 ml Weithalslerlenmeyerkolben wurden mit 100 ml Nährlösung nach *Stoll* und Mitarb.³⁾ gefüllt und 30' bei 110° und 0,5 atü sterilisiert. Die Beimpfung erfolgte von Schrägagar-kulturen. Die beimpften Kolben wurden auf einer Exzentermaschine mit 145 Umdr./Min. geschüttelt. Nach reichlicher Mycelbildung wurden 10 mg/Kolben 5-Hydroxyindol bzw. 5-Hydroxytryptophan steril zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 3—5 Tage.

Nachweis der Umwandlungsprodukte

Das Kulturfiltrat wurde mehrmals mit n-Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten, mit Natriumsulfat getrockneten Butanolphasen wurden am Rotationsverdampfer unter Stickstoffbegasung abdestilliert und die gewonnenen Extrakte, in Methanol gelöst, auf Dünnschichtplatten (Kieselgel PF₂₅₄, „Merck“) chromatographiert.

³⁾ A. *Stoll*, A. *Brack*, H. *Kobel*, A. *Hofmann* und R. *Brunner*, *Helv. chim. Acta* 37, 1815 (1954).

Substanzen	Rf-Wert mit Laufmittel Nr.			
	1	2	3	4
Indol	1,0	1,0	0,97	0,85
5-Hydroxyindol	0,96	0,91	0,73	0,77
Tryptophan	0,40	0,11	0,06	0,59
5-Hydroxytryptophan	0,38	0,00	0,00	0,00
ω -N-Acetyl-serotonin	0,90	0,56	0,40	0,50
ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan	0,37	0,27	0,19	0,40

Fließmittelgemische

Nr. 1: Methylacetat, Isopropanol, Ammoniakflüssigkeit (25proz.) (45 : 35 : 20) ⁴⁾.

Nr. 2: Chloroform, Äthanol, Eisessig (75 : 20 : 5).

Nr. 3: Chloroform, Äthanol, Ameisensäure (85 : 15 : 0,5).

Nr. 4: Aceton, Benzol (70 : 30).

Die entwickelten DC wurden unter der UV-Lampe bei 254 und 350 nm betrachtet. Dann wurden die Platten mit Echtblausalz B-Reagens und anschließend mit van Urk'-Reagens besprüht.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine freundlich gewährte Sachbeihilfe.

⁴⁾ E. Stahl und H. Kaldeweg, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 323, 182 (1961).

Anschrift: Prof. Dr. H. Rochelmeyer, 65 Mainz, Saarstraße 21.

[Ph 502]

P. H. List und P. Luft

Gyromitrin, das Gift der Frühjahrsorchel

16. Mitt. über Pilzinhaltsstoffe*)

Aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Marburg/Lahn

(Eingegangen am 4. Oktober 1967)

Das Gift der Frühjahrsorchel wurde als N-Methyl-N-formylhydrazon des Acetaldehyds aufgeklärt und synthetisiert.

The poison of *Gyromitra esculenta* („Frühjahrsorchel“) has been recognized as N-Methyl-N-formylhydrazone of acetaldehyde and synthesized.

Die Frühjahrsorchel, *Gyromitra esculenta* FRIES ex PERSON, gehört zur Familie der Helvellaceae innerhalb der Ascomycetenordnung der Pezizales. Früher

*) 15. Mitt.: P. H. List und B. Freund, Naturwissenschaften im Druck.