

Mikrobieller Abbau von Papaverin

Klaus HAASE-ASCHOFF und Franz LINGENS

Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim

(Der Schriftleitung zugegangen am 4. November 1978)

Zusammenfassung: Aus Erde wurde ein Bakterium isoliert, das mit Papaverin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wächst. Durch morphologische und physiologische Untersuchungen konnte der Organismus als ein *Nocardia*-Stamm identifiziert werden. Dieser scheidet beim Wachstum auf Papaverin Metaboliten ins Medium ab. Mit Hilfe der Metaboliten 1–9 wurde ein Abbauschema aufgestellt.

1 = 1-(3,4-Dimethoxybenzyl)-3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-3,4-isochinolindiol; 2 = 1-(3,4-Dimethoxybenzyl)-6,7-dimethoxy-3,4-isochinolindiol; 3 = 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(2-Hydroxyethyl)-4,5-dimethoxyphenyl]ethanon; 4 = 2-(2-Hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)ethanol; 5 = (3,4-Dimethoxyphenyl)essigsäure; 6 = (2-Hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)essigsäure; 7 = (4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)essigsäure; 8 = 3,4-Dimethoxybenzaldehyd und 9 = 2-[2-(Hydroxymethyl)-4,5-dimethoxyphenyl]ethanol.

Microbial Degradation of Papaverine

Summary: A bacterium growing on papaverine as sole carbon and nitrogen source was isolated by incubation of soil with papaverine. The bacterium could be identified as a *Nocardia* strain by morphological and physiological tests. When growing on papaverine, this strain excretes metabolites into the medium. Based on the structure of the metabolites 1–9 a degradation pathway is proposed.

1 = 1-(3,4-Dimethoxybenzyl)-3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-3,4-isoquinolinediol; 2 = 1-(3,4-dimethoxybenzyl)-6,7-dimethoxy-3,4-isoquinolinediol; 3 = 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-[2-(2-Hydroxyethyl)-4,5-dimethoxyphenyl]ethanone; 4 = 2-hydroxy-4,5-dimethoxybenzeneethanol; 5 = 3,4-dimethoxybenzeneacetic acid; 6 = 2-hydroxy-4,5-dimethoxybenzeneacetic acid; 7 = 4-hydroxy-3-methoxybenzeneacetic acid; 8 = 3,4-dimethoxybenzaldehyde; 9 = 2-(hydroxymethyl)-4,5-dimethoxybenzeneethanol.

Key words: Microbial degradation, papaverine, alkaloids.

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über den mikrobiellen Abbau komplizierter Naturstoffe haben wir den Abbau des Papaverins unter-

sucht. Bisher wurde noch kein Mikroorganismus beschrieben, der unter Verwendung des cyclischen Systems des Papaverins als Kohlenstoff- und Stick-

stoffquelle zu wachsen vermag. Aus dem Medium eines auf Papaverin wachsenden *Nocardia*-Stammes konnten Zwischenprodukte des Abbaus isoliert werden. Darüber wird im folgenden berichtet.

Material und Methoden

Chemikalien

Von Merck, Darmstadt, wurden folgende Chemikalien bezogen: Eupaverin „neu“ [1-Benzyl-3-ethyl-6,7-dimethoxyisochinolin], Eupaverin „alt“ [3-Methyl-6,7-methylenedioxy-1-(3,4-methylenedioxybenzyl)isochinolin], Neupaverin [3-Methyl-6,7-methylenedioxy-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)isochinolin], 3,4-Dimethoxybenzoesäure (Veratrum säure), Thionylchlorid, Lithiumalanat, Natriumdodecylhydrogensulfat (p.A.), Benzylchlorid, Benzoylchlorid, die anorganischen Salze, Salzsäure, Essigsäure (p.A.), Kieselgel 60 (0.2–0.5 mm und 40–63 μ m), Kieselgel nach Stahl, Kieselgel HF und PF, silanisiertes Kieselgel 60 HF, LiChrosorb Si 60 (10 μ m), LiChrosorb RP-2 (10 μ m), LiChrosorb RP-8 (10 μ m), HPTLC-Platten F₂₅₄ (5.5 cm), Cyclohexanol, Tetrabromethan, Bortrifluorid-Methanol, Folin-Ciocalteu-Reagens, Petrolether (Sdp. 40–60 °C). Von Macherey, Nagel & Co., Düren: Polyamid DC-6-Ac und PC-6-Ac, Cellulose MN 300, Nucleosil C₈ (5 μ m). Von Pharmacia, Uppsala: Sephadex G-10 und LH-20. Von Serva, Heidelberg: Servachrom XAD 30–1000 μ m, Papaveraldin [6,7-Dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)isochinolin]. Von Ega-Chemie, Steinheim: 3,4-Dimethoxybenzylalkohol. Von Riedel de Haen, Seelze: Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Diisopropylether. Von Fluka, Buchs: 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (Veratrumaldehyd), 3,4-Dimethoxyphenyllessigsäure (Homoveratrum säure), 3,4-Dimethoxyphenylacetaldehyd (Homoveratrumaldehyd), 4-Hydroxy-3-methoxyphenyllessigsäure (Homovanillinsäure), Natriumhydrid. Von Knoll AG, Ludwigshafen: Papaverin-HCl, [6,7-Dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)isochinolinhydrochlorid], Ethaverin-HCl [= Barbonin-HCl, 6,7-Diethoxy-1-(3,4-diethoxybenzyl)isochinolinhydrochlorid], Tetrahydropapaverin-HCl [1,2,3,4-Tetrahydro-6,7-dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)isochinolin], Isochinolin.

Geräte

UV-Spektren wurden mit einem DMR-21-Gerät der Firma Zeiss aufgenommen, IR-Spektren mit einem IR-Spektrometer mit Mikroeinrichtung der Firma Leitz und Massenspektren mit dem Gerät MAT 311 der Firma Varian. Zur Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie wurde eine Apparatur der Firma Knauer, Berlin, verwendet. Schmelzpunkte wurden mit dem Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt.

Für die Gewinnung größerer Zellmengen dienten 10-l-Fermentoren der Zentralwerkstatt der Universität Hohenheim und ein 100-l-Fermentor von Marubishi, Tokio. Zum Ernten der Bakterien wurde eine Westfalia-Durchlaufzentrifuge eingesetzt. Schüttelmaschinen stammen von Braun, Melsungen, Kühlzentrifugen von Beckman. Zum Ultraschallaufschluß wurde ein Branson-Sonifier verwendet, zur Fraktionierung bei der Säulenchromatographie ein Ultrarac mit Uvicord I von der Firma LKB.

Kulturmedien und Salzlösungen

Komplettmedium 1: 10 g Nutrient Broth, 5 g Yeast Extrakt (Difco), 5 g NaCl, 1 l deionisiertes Wasser, pH 7.

Komplettmedium 2: 10 g Pepton aus Fleisch (Oxoid), 10 g Hefeextrakt (Oxoid), 20 g Glucose, 1 l deionisiertes Wasser, pH 7.

Mineralsalzmedium: 0.3 g KH₂PO₄, 0.7 g K₂HPO₄, 1 g (NH₄)₂SO₄, 0.1 g NaCl, 0.2 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0.02 g CaCl₂ · 2 H₂O, 1 ml Spurensalzlösung, 1 l deionis. Wasser.

Als C-Quelle wurde dem Mineralsalzmedium wahlweise 0.5–2 g Glucose oder 0.1–1 g Papaverin-HCl pro Liter zugesetzt. Der pH-Wert wurde auf 6.5 eingestellt. Zur Herstellung von Festnährböden wurden die Medien erhitzt und 15 g kalt angerührter Agar pro Liter unter Rühren zugesetzt.

Alle Medien wurden 15–20 min bei 121 °C sterilisiert.

Spurensalzlösung: 500 mg H₃BO₃, 400 mg MnSO₄ · 7 H₂O, 400 mg ZnSO₄ · 7 H₂O, 200 mg (NH₄)₂MoO₄, 200 mg FeCl₃ · 6 H₂O, 100 mg KI, 40 mg CuSO₄ · 5 H₂O, 1 l deionis. Wasser.

Saline: 5 g NaCl, 0.12 g MgSO₄ · 7 H₂O, 1 l deionis. Wasser.

Isolierung des Papaverin-abbauenden Bakteriums

Ein Blumentopf war einige Jahre zuvor mit Hohenheimer Erde gefüllt und mit etwa 0.05 % Papaverin durchmischt worden. Dieser Topf wurde bei 30 °C im Brutraum aufbewahrt und wöchentlich ein- bis zweimal durchfeuchtet. Eine Eßlöffel-große Probenmenge wurde entnommen und 3 Wochen in flüssigem Papaverin-Minimalmedium bei 30 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Übertragen in gleiche Medien wurde das Papaverin zunehmend schneller abgebaut. Schließlich wurde eine verdünnte Bakterien-suspension auf Papaverin-Mineralsalzagar ausgestrichen, so daß nach dreitägigem Inkubieren bei 30 °C einzelne Kolonien rein isoliert werden konnten. Das Bakterium wächst mit Papaverin als einziger C- und N-Quelle.

Morphologie des Bakteriums

Das Bakterium ändert seine Morphologie mit dem Wachstum auf unterschiedlichen Medien.

Auf Papaverin-Mineralsalzmedien wachsen die Bakterien in einer Woche zu rötlich-weißen, undurchsichtigen,

glattrandigen, runden und konvex geformten Kolonien mit 2–3 mm Durchmesser aus. Die Papaverinkristalle verschwinden; teilweise bilden sich neue, drusenartige Kristalle aus. In Flüssigmedien wird ein dunkelroter Farbstoff gebildet. Die Zellen der logarithmischen Phase sind rund bis länglich mit einem Durchmesser von etwa 0.8 bis 1.0 μm und einer Länge bis zu 3 μm . Die Zellen liegen zum größten Teil zusammen. Verzweigungen konnten nicht beobachtet werden.

In Glucose-Mineralsalzmedien zeigen die Zellen der logarithmischen Phase zahlreiche Verzweigungen, die die Einzeller in klumpenartigen Haufen zusammenhalten. Der Durchmesser der Bakterien beträgt etwa 1.0 bis 1.2 μm , die größte Ausdehnung in der Längsachse ca. 8–10 μm . Im Inneren lassen sich schwache Strukturen erkennen.

Auf Komplettmedien wachsen die Bakterien in zwei Tagen zu cremefarbenen bis hellgelben Kolonien mit 2–3 mm Durchmesser heran. Sie sind rund, konvex, glattrandig, undurchsichtig mit glänzender Oberfläche, die schmierig erscheint. Nach längerer Inkubation wachsen die Kolonien bis zu 15 mm Durchmesser heran und erscheinen dann kegelförmig geschichtet, im Zentrum dunkelgelb bis orange. Beim Abimpfen mit der Öse stellt man ein fädiges Abziehen von der Oberfläche fest.

Die mikroskopische Betrachtung zeigt, daß die Zellen der logarithmischen Phase leicht gekrümmt, manchmal unregelmäßig verdickt sind und Ansätze zur Verzweigung aufweisen. Echte Verzweigungen wurden jedoch nie beobachtet. Häufig liegen je zwei Zellen etwas gewinkelt zusammen. Der Durchmesser beträgt 0.8–1.0 μm , die Länge erreicht 2–4 μm .

Die Bakterien vermehren sich auch noch bei 2 °C. Nach zweijährigem Transfer des Stammes von einem Komplettmedium auf's andere (monatlich), hatte sich die Morphologie deutlich geändert, und das Bakterium war nicht mehr in der Lage, Papaverin abzubauen.

Physiologische Charakterisierung des Bakteriums

Das Temperaturoptimum liegt bei 25–30 °C.

Positiv verliefen die Tests auf Gramfärbung, Katalase, Urease und Cytochrom-c-Oxidase, *negativ* der auf Säurefestigkeit (Ziehl-Neelsen); Bildung von Kapseln, Sporen oder Geißeln war nicht nachweisbar. Die Bakterien wuchsen weder auf Anaerobier-Agar nach Brewer^[1], noch auf überschichtetem Hochschichtagar nach Hugh und Leifson^[2] oder auf überschichtetem Komplettmedium 1.

Kochsalz-Konzentrationen von 0–5% vertrugen die Bakterien gut, bei 7% war das Wachstum nur noch schwach.

Antibiotika: Nach eintägiger Einwirkung wurde Hemmung beobachtet mit Penicillin (5 und 1.5 int. Einh.) und mit Cloxacillin (5 μg). Keine Hemmung war festzustellen mit Chloramphenicol (10 μg), Erythromycin (10 μg), Sulphafurazol (100 μg), Ampicillin (2 μg),

Streptomycin (10 μg) und Tetracyclin (10 μg) (alle Mengenangaben pro Multodisk-Plättchen, Oxoid). Das Bakterium bildet weder Indol noch H₂S, der Methylrot-Test war negativ, es wird auch nicht von Lysozym angegriffen.

Stärke, Gelatine und Casein werden abgebaut, nicht dagegen Chitin, Pektin und Dextrin.

Zellzüchtung

Die Bakterien wurden immer bei 30 °C gezüchtet. Die Flüssigkulturen wurden bis 3 l in Erlenmeyerkolben angesetzt, die maximal bis zur Hälfte ihres Nennvolumens gefüllt und zur besseren Belüftung auf Schüttelmaschinen gesetzt wurden. Die 10-l-Kulturen wurden bei Umdrehungszahlen von 150–200 min⁻¹ mit 10–50 l x min⁻¹ belüftet. Die 100-l-Kulturen wurden bei Umdrehungszahlen von 100–200 min⁻¹ gerührt und mit 100–300 l x min⁻¹ Sterilluft begast.

Wenn Komplettmedien oder Glucose-Minimalmedien beimpft wurden, betrug das Volumen des Inokulums ein hundertstel des Züchtungsvolumens. Sollten jedoch Zellen auf Papaverin-Minimalmedien gezüchtet werden, wurde stets mit einem Zehntel des Züchtungsvolumens angeimpft. Das Inokulum enthielt immer Bakterien der logarithmischen Phase.

Zur Ernte wurden die Kulturen bis zu 10 l Volumen mit einer Kühlzentrifuge in JA-10-Behern bei Umdrehungszahlen von 6000 min⁻¹ abzentrifugiert, die 100-l-Kulturen mit der Westfalia Durchlaufzentrifuge KT 4.

Ruhende und immobilisierte Zellen

Zur Akkumulation der Metaboliten im Medium wurden verschiedene Methoden erprobt. Einerseits wurde auf Komplettmedium 2 oder auf Glucose-Mineralsalzmedium eine große Zellmasse angezüchtet, gegen Ende der logarithmischen Phase abzentrifugiert, mit Saline gewaschen und auf Papaverin-Mineralsalzmedium reinkubiert. Andererseits wurden im Glucose-Minimalmedium die Bakterien mit knapp bemessener Zuckermenge angezüchtet und kurz vor Ende der logarithmischen Phase 0.5–1 g Papaverin · HCl mit der Natriumcarbonatmenge versetzt, die den pH-Wert konstant hält. Da sich bei pH 6–7 nur geringe Mengen Papaverin in Wasser lösen, wurde zum Teil eine konzentrierte Substratlösung in *N,N*-Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid zugesetzt.

Schließlich wurden die Papaverin-abbauenden Bakterien nach der Vorschrift von Chibata et al.^[3] in Polyacrylamidgel eingeschlossen und zur Akkumulation der Metaboliten mit Papaverin-Minimalmedium in Schüttelkulturen reinkubiert.

Zellaufschluß

Die zentrifugierte und mit Saline gewaschene Bakterienmasse wurde in der gleichen Gewichtsmenge Kaliumphos-

phat- oder Tris-Puffer (0.02M, pH 6.8–7) suspendiert und 3- bis 10mal 30 s in einem auf 0 °C gekühlten Metallbecher mit unterschiedlichen Ultraschalleistungen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden 30 min in der Kühlzentrifuge bei Umdrehungszahlen von 20000 min⁻¹ entsprechend einer Beschleunigung von 400000 m × s⁻² abzentrifugiert. Überstand und Niederschlag wurden getrennt untersucht.

Sprühreagenzien

Dragendorffs Reagens: a) 1 g basisches Bismutnitrat wird in 10 ml Eisessig gelöst und mit Wasser auf 50 ml verdünnt. b) 20 g Kaliumiodid werden in 50 ml Wasser gelöst. Die Lösungen a und b werden im Verhältnis 1 : 1 gemischt.

Folin-Ciocalteu-Reagens: 10 ml der fertig bezogenen Mischung (Merck) werden mit 50 ml Wasser verdünnt (l.c.^[4], S. 832, Reagens Nr. 108).

Paulys Reagens s. l.c.^[4], S. 851, Reagens Nr. 230).

Dinitrophenylhydrazinlösung: 5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin p.A. werden in 60 ml konz. Phosphorsäure unter Erwärmen gelöst und mit Ethanol im Verhältnis 1 : 20 verdünnt.

Dünnschichtchromatographie

Zur Trennung der Metaboliten wurden zahlreiche dünn-schichtchromatographische Methoden erprobt. Es wurden Platten der Größe 20 × 20 cm mit Cellulose, Polyamid und silanisiertem Kieselgel in einer Schichtdicke von 0.2–0.5 mm gestrichen. Als Fließmittel für diese Schichten wurden verschiedene Gemische von Methanol oder Acetonitril mit Wasser unter Zusatz unterschiedlicher Mengen Aceton, Methylthylketon und Eisessig verwendet. Außerdem wurden Platten mit Kieselgel G und Kieselgel H gestrichen, die in Benzol, Toluol und Chloroform mit Methanolzusätzen als polarer Komponente entwickelt wurden.

Für die präparative Trennung der Metaboliten wurden Kieselgel-PF-Schichten bis zu 2 mm dick angefertigt, die in Chloroform gelöste Probe mit einer 1-ml-Pipette strichförmig aufgetragen, nach der Trennung von der Platte abgekratzt und auf einer Glasfritte mit Chloroform aus dem Sorptionsmittel wieder ausgewaschen.

Als beste Dünnschichttechnik erwies sich die Trennung auf HPTLC-Schichten der Größe 5 × 5 cm^[5]: Circa 5 µg Probematerial werden auf einer Spatelspitze in 1–2 µl Chloroform gelöst und mit einer haarfein ausgezogenen Pasteurpipette auf die Kieselgelschicht dosiert (10–100 nl). Die Fleckengröße darf keinesfalls 1 mm Durchmesser überschreiten. Man entwickelt das Chromatogramm im 250-ml-Becherglas während 4–8 min über eine Laufstrecke von 35–45 mm. Die Platten werden unter UV-Licht betrachtet und dann mit Sprühreagenzien angefärbt.

Aufarbeitung des Kulturfiltrates

In den meisten Fällen wurde das Filtrat im Rundverdampfer bei Badtemperaturen von 45 °C im Vak. im Verhältnis 1 : 30 bis 1 : 50 konzentriert und dann mit Chloroform oder Methylenchlorid unter Zusatz von wenig 2-Propanol extrahiert. Zur Phasentrennung mußte das Gemisch manchmal in Glasbechern zentrifugiert werden. Die abgetrennte organische Phase wurde schließlich auf ca. 10 ml eingeeengt und mit 300 ml Chloroform + 0.5% Methanol über eine kurze Kieselgelsäule (2.5 × 15 cm) vorgereinigt. Dabei wurden zunächst die unpolaren Metaboliten eluiert, die durch Umkristallisation aus wenig Methanol in eine leichtlösliche Frakt. I und eine schwerlösliche Frakt. II aufgetrennt wurden (Abb. 1). Zur Elution der polaren Metaboliten wurde mit 200 ml Chloroform + 5% Methanol + 0.1% Eisessig nachgespült (Frakt. III).

Zur Isolierung empfindlicher Metaboliten wurde das Kulturfiltrat ohne vorherige Konzentrierung dreimal mit einer Chloroformmenge, die einem Zehntel des Gesamtvolumens entspricht, extrahiert. Die vereinigten Auszüge wurden dann bei Temperaturen unter 20 °C im Vakuum eingeeengt und, wie oben beschrieben, weiter aufgearbeitet. In Einzelfällen gelang es auch, die Metaboliten aus der wässrigen Lösung heraus auf einem Polystyrolgel (Servachrom XAD) zu fixieren und nach dem Auswaschen der Salze mit Methanol zu eluieren. Die übliche Methode, den größten Teil der Salze in der konzentrierten Kulturbrühe mit Alkohol zu fällen und den Alkohol-extrakt durch Gelchromatographie zu reinigen, erwies sich als sehr unzweckmäßig.

Klassische Säulenchromatographie

Die Trennung der Metaboliten wurde mit den hier aufgezählten Säulentypen und den angegebenen Lösungsmitteln ausgeführt:

Sephadex G-10, 5 × 100 cm, Methanol/Wasser 1 : 1, kon-kaver Gradient mit Methanol/2-Propanol/Wasser 2 : 2 : 1.

Sephadex LH-20, 3 × 200 cm, Methanol/Wasser 1 : 1 bis 7 : 3.

Polyamid SC-6-Ac. 2.5 × 200 cm, Methanol/Wasser 1 : 1 bis 7 : 3, z.T. chloroformgesättigt.

Die Sephadex- und Polyamidmaterialien wurden in Methanol/Wasser 1 : 1 suspendiert, im Vak. unter Rühren entlüftet und vorsichtig in die Säule eingeschlämmt. Dieses Verfahren ergibt bei Kieselgelmaterialeien einer Korngröße < 100 µm keine Säulenpackung optimaler Trennleistung. Daher wurden diese Säulen, wie bei Kirkland beschrieben^[6], trocken gefüllt, indem das Kieselgel langsam in das Trennrohr eingerüttelt wurde. Danach wurde die Säule am Eingang verschlossen, durch den Ausgang evakuiert und dann durch das Einleitungsrohr langsam mit Chloroform gefüllt. Die Säule wird bis zur völligen Freiheit von Luftblasen mit Lösungsmittel äquilibriert.

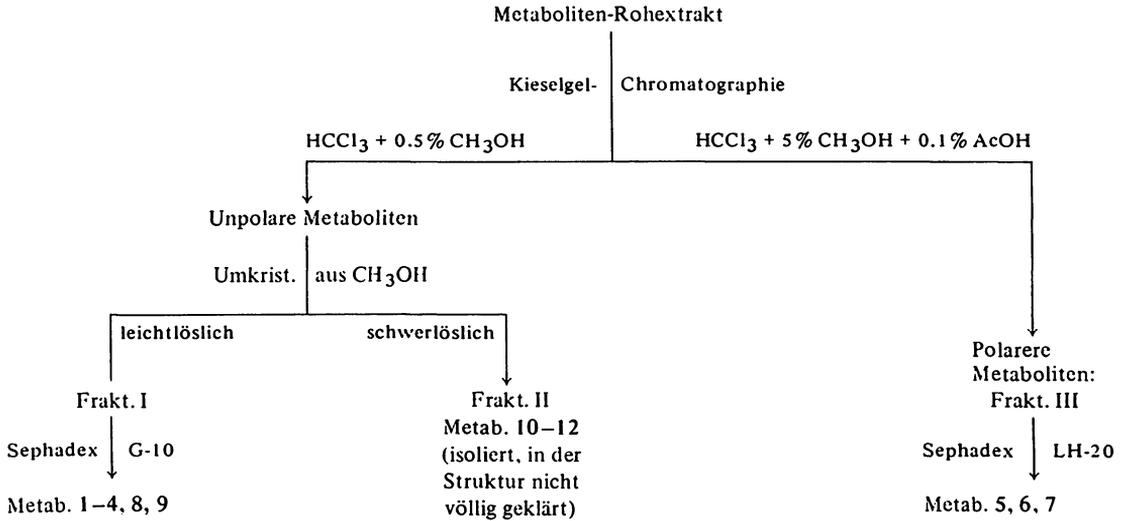


Abb. 1. Schema zur Aufarbeitung des Kulturfiltrates.

Chromatographie unter Druck: „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC)

a) Präparative HPLC

Folgende Säulentypen fanden Verwendung:

LiChroprep RP-8 40–63 μm (Fertigsäule Merck, Größe B 24 x 300 mm, Glas)

LiChrosorb RP-8, 10 μm , 8 x 250 mm

LiChrosorb RP-2, 10 μm , 8 x 250 mm

LiChrosorb Si 60, 10 μm , 8 x 250 mm

LiChroprep Si 60, 15–25 μm , 8 x 500 mm

Aufgabenmenge und Elutionsgeschwindigkeit wurden entsprechend der benötigten chromatographischen Auflösung gewählt. Das Einspritzvolumen lag zwischen 0.2 und 2 ml. Die nicht modifizierten Kieselgele wurden in einer Mischung aus Tetrabrommethan/Dioxan/Tetrachlorkohlenstoff 40:30:30 suspendiert und durch Ultraschall gleichmäßig dispergiert^[7]. Diese Suspension wurde in die Knauersche Füllvorrichtung gegossen und mit Diisopropylether als Druckflüssigkeit mit höchstmöglicher Geschwindigkeit in die Säule gepumpt. Nach dem Füllen wurde die Packung noch 1/2 h verdichtet, bevor der Füllkopf abgenommen und der Strömungsverteiler aufgesetzt wurde. Die modifizierten Kieselgele wurden in gleicher Weise in Toluol/Cyclohexanol 20:30 mit 2-Propanol als Druckflüssigkeit in die Säule gepackt.

b) Analytische HPLC

Folgende Säulentypen fanden Verwendung (jeweils 4.6 x 250 mm)

LiChrosorb RP-8, 10 μm

LiChrosorb Si 60, 10 μm

LiChrosorb Si 60, 100 μm

Nucleosil 5 C₈ 5 μm .

Die ersten drei Säulen waren in der Grundausstattung zum Gerät enthalten und wurden für die Optimierung von Trennungen benutzt. Die letztgenannte Säule wurde als Hochleistungssäule konzipiert und, wie beschrieben, selbst gefüllt. Abweichend von der oben beschriebenen Vorschrift wurde Methanol (statt Diisopropylether) als Druckflüssigkeit verwendet und der jeweils gepackte Teil der Säule in ein 70 °C warmes Wasserbad geschoben, um die Füllgeschwindigkeit zu erhöhen. Damit bei der Probeaufgabe kein zusätzliches Totvolumen vor dem Säuleneingang eine Bandenverbreiterung hervorruft, wurde die in den Säulenkopf eingelötete Stahlkapillare ohne Kuppelungsstück direkt an das Schleifenventil gekoppelt. Das Schleifenvolumen betrug in allen Fällen 20 μl .

Ergebnisse

Aus Papaverin-haltiger Gartenerde wurde ein Bakterium isoliert, das auf Papaverin als einziger C- und N-Quelle zu wachsen vermag. Nach den im Versuchsteil beschriebenen Kriterien ist es in die Familie der *Nocardiaceae* einzuordnen, die wegen ihrer unterschiedlichen Mycelbildung in drei Gruppen^[8] eingeteilt werden. Da das Bakterium auf Kompletmediennur in der logarithmischen Phase eine angedeutete Verzweigung zeigt, muß

es der Gruppe III zugeteilt werden, in der es durch seine physiologischen Eigenschaften dem Stamm *Nocardia atlantica* am nächsten kommt.

Wachstumskurven und Abbauverhalten

Abb. 2 zeigt einige typische Wachstumskurven des *Nocardia*-Stammes in Glucosemedien unterschiedlicher Zuckerkonzentration. Abb. 3 zeigt den typischen Wachstumsverlauf in Papaverin-Minimalmedien; gleichzeitig ist die Abnahme der Papaverinkonzentration und der Konzentrationsverlauf einiger Metaboliten wiedergegeben.

Die quantitativen Mengenverhältnisse der Metaboliten veränderten sich im Laufe der Zeit von Kultur zu Kultur stark, obwohl stets darauf geachtet wurde, die Bedingungen gleich zu halten. Umgekehrt wurde auch vergebens versucht, durch Fortlassen oder übermäßiges Zufügen bestimmter Mineralstoffe zum Medium, einen Effekt auf die Quantität einiger Metaboliten zu erzielen.

Metabolit 1: 1-(3,4-Dimethoxybenzyl)-3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-3,4-isochinolindiol

Dieser Metabolit wird in der frühen logarithmischen Phase (ca. 42 h) im Kulturmedium akkumuliert und verschwindet dann wieder. Mit ruhenden Zellen wird unabhängig von der eingesetzten Zellmenge das Konzentrationsmaximum schon nach 3–5 h erreicht, so daß man schnell die Bakterien abzentrifugieren muß, um eine kleine Menge dieses Stoffes isolieren zu können. Wenn dann unter schonenden Bedingungen aufgearbeitet wird, findet sich der Metabolit in Fraktion I der Vorreinigung und kann durch Chromatographie

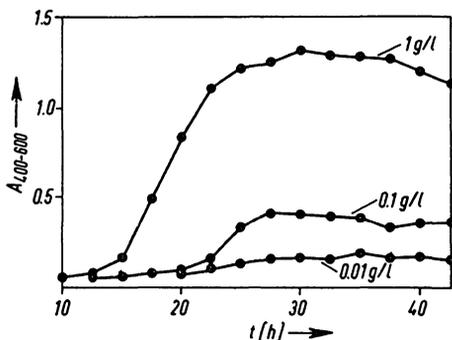


Abb. 2. Wachstum in Minimalmedium bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen.

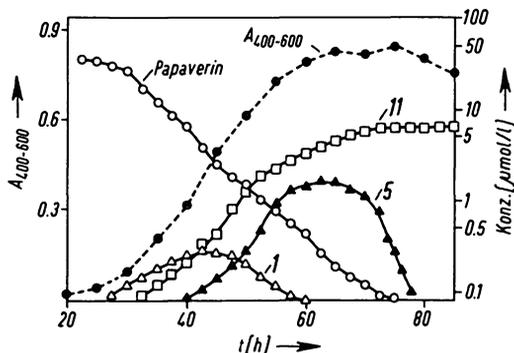


Abb. 3. Wachstum und Abbauverhalten im Papaverin-Minimalmedium.

●—● Optische Zelldichte. ○—○ Papaverinkonzentration. △—△ Konzentration des Metaboliten 1. ▲—▲ Konzentration des Metaboliten 5. □—□ Konzentration des Metaboliten 11.

Die Wachstumskurve wurde nach dem Ansäuern der entnommenen Nährlösung mit zwei Tropfen konzentrierter Salzsäure ausgemessen, weil Papaverin bei pH 6–7 in Wasser schwerlöslich ist. Die Papaverin- und Metabolitenkonzentrationen wurden nach der flüssigchromatographischen Trennung durch Auswerten der Peakfläche ermittelt. Dazu wurden die entnommenen Proben angesäuert, zentrifugiert und dann direkt in den Chromatograph injiziert. Bedingungen: 20 µl Probeschleife; UV-Empfindlichkeit: $\Delta A = 1/40$ bis $1/160$ für volle Skalenspreizung; Fluß: 1 ml/min; Druck: 25 MPa; Säule: Nucleosil 5 C₈, 250 mm lang; Eluent: Methanol/Acetonitril/Wasser/Eisessig 40 : 10 : 50 : 0.1.

an einer LiChroprep-RP-8-Säule von anderen Substanzen abgetrennt werden. Eine gute Nachreinigung wird mit einem linearen Gradienten aus Chloroform und Chloroform/Methanol an einer HPLC-Kieselgel-Säule erzielt. Die Verbindung kristallisiert dann aus Chloroform/Diisopropylether in gelblichen Nadeln. Das UV-Spektrum ist gegenüber dem des Papaverins bathochrom verschoben. Das Massenspektrum zeigt eine Molekülmasse, die um 34 Einheiten ($2 \times OH$) höher als die des Papaverins liegt: $m/e = 373$. Auffällig ist der Verlust von 2 H: $m/e = 371$. Eine Wasserabspaltung ist ebenfalls bemerkbar: $m/e = 355$. Dieses Verhalten spricht für eine vicinale Diolgruppe. Das Molekül spaltet hauptsächlich in drei Fragmente: $m/e = 178, 195$ und 151 . Der letztgenannte Massenpeak ist typisch für das 3,4-Dimethoxybenzyl-Ion. Die Struktur der anderen Ionen kann nur vermutet werden.

Die Verbindung zersetzt sich in Lösung langsam, unabhängig von der Gegenwart von Sauerstoff. Auf der Dünnschichtplatte reagiert sie mit Benzidin-Periodat- und mit Folin-Reagens.

Schmp. 154 °C (Zers.)

UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\lg\epsilon) = 281 (4.2), 329 \text{ nm} (4.1)$.

IR (KBr): 3300 (OH), 1640 (C=C), 1510 cm^{-1} .

MS (70 eV): $m/e = 373 (34\%, M^{\oplus}), 371 (14\%, M - 2 \text{ H}), 355 (4\%, M - \text{H}_2\text{O})$.

$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ Ber. 373.1525 Gef. 373.1536 (massenspektrometr.)

Als Begleitsubstanz des Metaboliten 1 konnte hin und wieder eine sehr geringe Menge einer isomeren Verbindung isoliert werden, die ihr im UV- und MS-Spektrum völlig gleicht und sich nur im IR-Spektrum geringfügig unterscheidet. Dieses Isomere läßt sich an Kieselgelsäulen abtrennen.

Metabolit 2: 1-(3,4-Dimethoxybenzyl)-6,7-dimethoxy-3,4-isochinolinolindiol

Dieser Metabolit wurde aus Kulturen der späten logarithmischen Phase isoliert. Er fällt in Fraktion I der Vorreinigung an und wird entweder durch Gelfiltration über Sephadex G-10 oder durch Chromatographie an LiChroprep RP-8 abgetrennt. Die Nachreinigung wurde an HPLC-Kieselgelsäulen mit einem Gradienten aus Chloroform und Chloroform/Methanol durchgeführt. Die Verbindung kristallisiert aus Chloroform/Diisopropylether in weißen Nadeln. Das UV-Spektrum zeigt mehrere Maxima, das IR-Spektrum läßt auf Hydroxylgruppe schließen. Das Massenspektrum ähnelt dem des Metaboliten 1. Der Molekülpeak hat die Masse 371, die Fragmente $m/e = 193, 178$ und 151 lassen sich in ein Zerfallsschema einordnen. Auf der Dünnschichtplatte reagiert die Verbindung mit Folin- und Pauly-Reagens.

Schmp. 163 °C.

UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\lg\epsilon) = 268 (3.9), 278 (3.9), 306 \text{ nm} (4.0)$.

IR (KBr): 3300 (OH), 1660 (C=C), 1520 cm^{-1} .

MS (70 eV): $m/e = 371 (52\%, M^{\oplus}), 355 (4\%, M - \text{O})$.

$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_6$ Ber. 371.1368 Gef. 371.1319 (massenspektrometr.)

Metabolit 3: 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(2-hydroxyethyl)-4,5-dimethoxyphenyl]-ethanon

Aus Kulturen der späten logarithmischen Phase wurde dieser Metabolit mehrfach isoliert. Er fin-

det sich in Fraktion I der Vorreinigung und läßt sich nach Chromatographie an einer Sephadex-G-10-Säule gut an einer Kieselgelsäule reinigen, indem man mit wassergesättigtem Chloroform eluiert. Die Verbindung kristallisiert aus Methanol/Wasser in gelblichen Prismen. Das IR-Spektrum läßt eine Hydroxylgruppe und eine Carbonylfunktion vermuten. Das Massenspektrum beweist die Molekülmasse 360. Die hochauflösende Massenspektrometrie beweist die Formel $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$. Die hauptsächlich auftretenden Fragmente $m/e = 209, 181$ und 151 lassen sich durch Fragmentierungen am Carbonyl-C gut erklären.

In Chloroform löst sich die Verbindung mit gelber Farbe, die durch Zugabe von Methanol sofort verschwindet. Dieses Verhalten könnte durch die Enol-Form des Metaboliten hervorgerufen werden. Auf der Dünnschichtplatte läßt sich die Verbindung mit Dinitrophenylhydrazin und Pauly-Reagens sichtbar machen.

Schmp. 193 °C (Zers.)

UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\lg\epsilon) = 233 (4.3), 275 (4.2), 358 \text{ nm} (3.9)$.

IR (KBr): 3300 (OH), 1700 (C=C), 1680, 1620 (C=C), 1500 cm^{-1} .

MS (70 eV): $m/e = 360 (67\%, M^{\oplus}), 342 (25\%, M - \text{H}_2\text{O}), 332 (28\%, M - \text{CO})$.

$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$ Ber. 360.1572 Gef. 360.1569 (massenspektrometr.)

Metabolit 4: 2-(2-Hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)-ethanol

Dieser Metabolit befindet sich in Fraktion I der Vorreinigung und wird am besten durch Gelfiltration über Sephadex G-10 angereichert. Die entsprechende Fraktion der Sephadex-Säule wird entweder durch präparative Dünnschichtchromatographie mit Toluol/Methanol als Fließmittel oder durch Chromatographie an einer HPLC-RP-8-Säule mit Methanol/Essigsäure nachgereinigt. Die Verbindung kristallisiert langsam aus Chloroform in durchsichtigen, prismatischen Kristallen. Das UV-Spektrum zeigt eine bathochrome Verschiebung durch Alkali, das IR-Spektrum Hydroxylgruppen und keine Carbonylfunktion. Diese Befunde belegen ein phenolisches Proton. Im Massenspektrum erscheint der Molekülpeak bei $m/e = 198$. Nach Methylierung mit Diazomethan ist die Masse um 14, nach Methylierung mit $\text{BF}_3/\text{Methanol}$ um 28 erhöht; das beweist die Anwe-

senheit einer zweiten, alkoholischen OH-Gruppe. Das Protonenresonanzspektrum weist 2 aromatische, 6 Methoxyl- und je 2 koppelnde Seitenkettenprotonen aus.

Schmp. 103 °C

UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\lg\epsilon) = 289 \text{ nm}$ (3.6).

IR (KBr): 3450 (OH), 1610 (C=C), 1530 cm^{-1} .

MS (70 eV): $m/e = 198$ (82%, M^{\oplus}), 183 (7%, $M - \text{CH}_3$), 180 (9%, $M - \text{H}_2\text{O}$), 167 (100%, $M - \text{OCH}_3$ bzw. $M - \text{CH}_2\text{OH}$).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 2.91$ (t, $J = 5 \text{ Hz}$; 2 H, $\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH}$), 3.90 (6 H, OCH_3), 4.04 (t, $J = 5 \text{ Hz}$; 2 H, $\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH}$), 6.55 und 5.59 (2 H, Aromat). $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$ Ber. 198.0892 Gef. 198.0847 (massenspektrometr.)

Metabolit 5: (3,4-Dimethoxyphenyl)essigsäure (Homoveratrumsäure)

Dieser Metabolit wurde in Fraktion III der Vorreinigung gefunden und mit Methanol/Wasser über Sephadex LH-20 chromatographiert. Nach Anfertigung eines Massenspektrums wurde die Verbindung mit Homoveratrumsäure verglichen.

Schmp. 97 °C; Misch.-Schmp. 97 °C.

IR: Identisch mit der Vergleichsverbindung.

Metabolit 6: (2-Hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)essigsäure

Dieser Metabolit befindet sich in Fraktion III der Vorreinigung und kann durch Chromatographie über Sephadex LH-20 abgetrennt werden. An einer HPLC-RP-8-Säule wird die Verbindung von ihrem Methylester getrennt und dann aus heißem Wasser umkristallisiert. Das UV-Spektrum zeigt eine bathochrome Verschiebung durch Alkali, das IR-Spektrum eine Carbonylfunktion. Das Massenspektrum ist für ein Derivat der Phenyl-essigsäure typisch. Mit Hilfe des Protonenresonanzspektrums wurde die Struktur 6 ermittelt. Die hochauflösende Massenspektrometrie bestätigt die Summenformel. Durch Reduktion der Säuregruppe mit LiAlH_4 wird Verb. 6 in den beschriebenen Metaboliten 4 überführt. Die Methylierung mit Diazomethan bringt einen Massen-zuwachs von 28 Einheiten.

Schmp. 138 °C (über P_2O_5 getrocknet)

UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\lg\epsilon) = 289 \text{ nm}$ (3.7)

IR (KBr): 3300 (OH), 1700 (C=O), 1620 (C=C), 1530 cm^{-1} .

MS (70 eV): $m/e = 212$ (91%, M^{\oplus}), 194 (76%, $M - \text{H}_2\text{O}$), 166 (100%, $M - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}$)
 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 3.52$ (2 H, CH_2), 3.74 und 3.77 (6 H, OCH_3), 6.47 und 6.76 (2 H, Aromat). $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$ Ber. 212.0684 Gef. 212.0656 (massenspektrometr.)

Metabolit 7: (4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)essigsäure (Homovanillinsäure)

Dieser Metabolit wurde aus Fraktion III der Vorreinigung durch Chromatographie an Sephadex LH-20 angereichert und dann aus warmem Chloroform umkristallisiert. Nach Anfertigung eines Massenspektrums wurde die Verbindung mit Homovanillinsäure verglichen.

Schmp. 145 °C; Misch.-Schmp. 145 °C.

IR: Identisch mit der Vergleichsverbindung.

Metabolit 8: 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (Veratrumaldehyd)

Dieser Metabolit wurde aus Fraktion I der Vorreinigung durch Chromatographie an Sephadex G-10 abgetrennt und über eine Kieselsäule mit Chloroform/Diisopropylether gereinigt. Die so gewonnene gelbe Flüssigkeit wurde bei 45 °C und 6.6 Pa Druck in einer Mikro-Kugelrohrdestille langsam destilliert. Nach dem Erkalten kristallisiert die farblose Flüssigkeit in feinen Nadeln, die angenehm nach Vanille riechen.

Schmp. 44 °C; Misch.-Schmp. 44 °C.

IR: Identisch mit der Vergleichsverbindung.

Metabolit 9: 2-[2-(Hydroxymethyl)-4,5-dimethoxyphenyl]ethanol

Aus Fraktion I der Vorreinigung wurde dieser Metabolit durch Chromatographie an Sephadex G-10 und durch weitere Reinigung über eine HPLC-RP-8-Säule mit Methanol/Wasser isoliert. Er kristallisiert aus Chloroform/Diisopropylether als feines weißes Pulver. Das UV- und IR-Spektrum ist dem des Metaboliten 4 ähnlich. Im IR-Spektrum erkennt man Hydroxylgruppen und das Substitutionsmuster des Aromaten. Das Elektronenstoß-Massenspektrum zeigt einen hohen Peak bei $m/e = 194$ und einen verschwindend kleinen bei $m/e = 212$. Das Felddesorptions-Massenspektrum bringt den eigentlichen Molekülpeak deutlich heraus und belegt damit die sterisch begünstigte Dehydratisierung des Moleküls in der Ionenquelle.

Die Hochauflösung wurde von dem Peak $m/e = 194$ angefertigt.

Schmp. 72 °C.

UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\lg\epsilon) = 290 \text{ nm}$ (3.5).

IR (KBr): 3300 (OH), 1630 (C=C), 1560 cm^{-1} .

MS (70 eV): $m/e = 212$ (1%, M^{\oplus}), 194 (100%,

$M - \text{H}_2\text{O}$), 166 (96%, $M - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}$).

MS (FD-Spektrum): $m/e = 212$ (100%, M^{\oplus}), 194

(30%, $M - \text{H}_2\text{O}$).

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$ Ber. 194. 0942 Gef. 194.0959 (massenspektrometr.)

Diskussion

Aus Hohenheimer Gartenerde wurde ein Papaverin-abbauendes Bakterium isoliert, das mit Papaverin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu wachsen vermag. Es wurde als *Nocardia*-Spezies bestimmt. Beim Wachstum mit Papaverin lassen sich im Kulturmedium neue Verbindungen

nachweisen, die mutmaßliche Zwischenprodukte des Abbaus darstellen. Um den Abbauweg aufzuklären, wurde das Kulturmedium eingengt, extrahiert und mit chromatographischen Methoden auf Metabolite untersucht (vgl. Abb. 1). Unter einer Vielzahl von Abbauprodukten wurden aus den Fraktionen I und III insgesamt 9 Verbindungen isoliert, die zwanglos in ein Abbauschema eingeordnet werden konnten (Abb. 4). Weitere strukturell noch nicht völlig geklärte Metaboliten fielen in Frakt. II an.

Vermutlich wird im ersten Schritt aus Papaverin durch eine Dioxygenase Metabolit 1 gebildet. Durch eine rearomatisierende Dehydrierung könnte daraus der Metabolit 2 entstehen.

Metabolit 1 ist sehr labil und in nur geringen Mengen aus dem Medium zu isolieren, so daß er nicht zu Abbauersuchen verwendet werden konnte. Daher kann man lediglich vermuten, daß er in

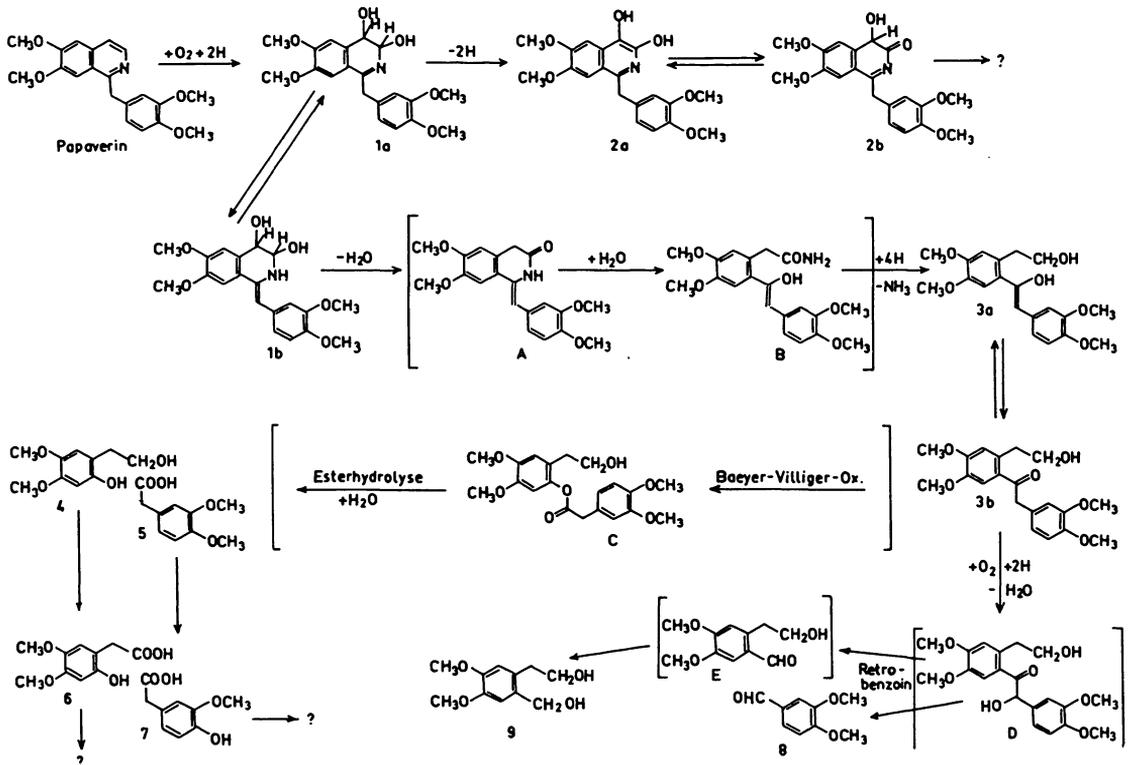


Abb. 4. Schema zum mikrobiellen Abbau des Papaverins.

folgenden Schritten in Metabolit 3 übergeht: Durch enzymatische Dehydratisierung entsteht das Lactam A, das nach Hydrolyse das Carboxamid B bildet; B reagiert in einer reduktiven Desaminierung zu Metabolit 3.

Auch dieser Metabolit war nur in kleinen Mengen zu fassen, so daß mit Rücksicht auf die Strukturaufklärung keine Abbauprobe durchgeföhrt wurden. Ersatzweise wurde Desoxybenzoin als Kohlenstoffquelle getestet: Selbst mit vorgezöchteten Zellen konnte kein Metabolismus festgestellt werden. Möglicherweise ist für dieses negative Ergebnis die fehlende Substitution am Aromaten verantwortlich, die über die strukturellen Einzelheiten hinaus die Elektronendichte durch den +M-Effekt im Ring beeinflusst.

Nach Kenntnis der Metaboliten 4 und 5 sowie 8 und 9 sollte man erwarten, daß Verbindung 3 auf zwei verschiedenen Reaktionswegen gespalten wird:

1) Es liegt nahe, eine Baeyer-Villiger-Oxidation^[9] von 3 durch eine Monooxygenase zu vermuten, die zum Homoveratrumsäureester C führt; die Esterhydrolyse ergäbe dann die Metaboliten 4 und 5. Eine solche Reaktionsfolge wurde schon häufiger beim mikrobiellen Abbau verschiedener Substrate gefunden. Kürzlich wurde über die Enzymatik des Acetophenonabbaus durch *Nocardia* und *Arthrobacter* berichtet^[10]; die Enzyme der Baeyer-Villiger-Oxidation konnten in beiden Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Eine andere, etwas kompliziertere Reaktionsfolge würde zu denselben Endprodukten föhren (Abb. 5): Der erste Schritt würde durch eine Dioxygenase kontrolliert, die

eine Oxidation des Metaboliten 3 zur Dihydroxycyclohexadien-Verbindung F katalysiert; F lagert sich spontan zur Verbindung G um, indem das Carbonyl-C an die benachbarte Hydroxylgruppe wandert. Daraus würde nach Dehydratisierung ebenfalls der Homoveratrumsäureester C entstehen, der zu den Metaboliten 4 und 5 verseift werden könnte.

2) Der zweite Reaktionsweg soll die Entstehung der Metaboliten 8 und 9 erklären: Hier ist es möglich, daß Verbindung 3 durch eine Monooxygenase in das entsprechende Benzoin D umgewandelt wird, das durch eine Retrobenzoinreaktion in die Aldehyde 8 und E gespalten würde; E könnte zum Metaboliten 9 reduziert werden.

Ein anderer Reaktionsweg begäñne wieder mit der Baeyer-Villiger-Oxidation des Ketons 3, das jetzt nicht wie unter 1) beschrieben zum Homoveratrumsäureester C, sondern zum Benzoesäureester H oxidiert würde (Abb. 6). Diese Möglichkeit wird durch die Annahme

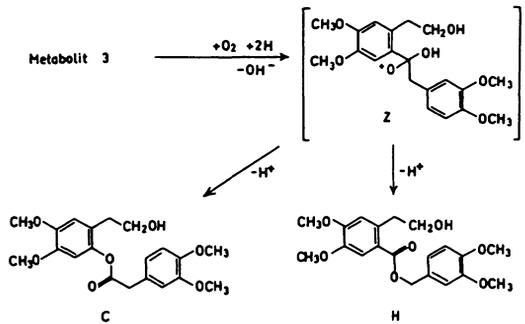


Abb. 6. Möglichkeit des Abbaus von Metabolit 3.

des Zwischenprodukts Z erklärt, das sich durch eine anionotrope Wanderung des Phenylrestes oder des Benzylrestes zur Verbindung C oder H umlagert. Betrachtet man die Stabilisierung der Carbanionen durch mesomere und induktive Effekte, so kann man erwarten, daß bevorzugt der Ester C gebildet wird. Wie man von der Spaltung der Arylalkylketone unter den Reaktionsbedingungen der Baeyer-Villiger-Oxidation weiß, entsteht tatsächlich aus etwa einem Viertel des Reaktionsansatzes der Benzoesäureester (analog dem Produkt H). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei mangelnder Enzymspezifität neben dem Ester C auch der Benzoesäureester H gebildet wird, der nach Hydrolyse und Oxidation bzw. Reduktion der Spaltprodukte die Metaboliten 8 und 9 liefert.

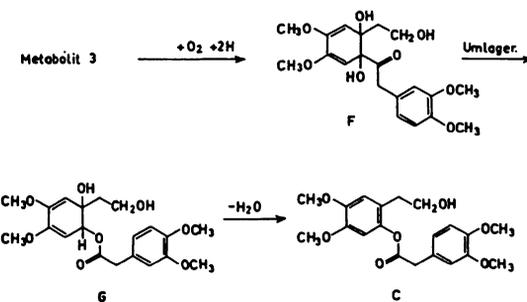


Abb. 5. Möglichkeit des Abbaus von dem Metaboliten 3.

Verbindung 9 tritt in nur sehr geringen Mengen im Kulturmedium auf und konnte daher nicht weiter untersucht werden. Es wurde aber festgestellt, daß die Metaboliten 4–7 gute Substrate für das Wachstum der Bakterien sind. Metabolit 8 wird dagegen als alleinige Kohlenstoffquelle nur langsam verwertet, im Cometabolismus aber gut abgebaut. Diese Befunde sprechen dafür, daß die Kohlenstoff-verwertenden Stoffwechselwege des Papaverinabbaus über diese Zwischenprodukte führen.

Zur weiteren Charakterisierung des Bakteriums wurde das Wachstum auf vielen aromatischen Kohlenstoffquellen untersucht (s. Tabelle). Phenyllessigsäure, 3-Phenylpropionsäure und Derivate dieser Verbindungen (Ausnahme Mandelsäure) werden verwertet. 4-Phenylbuttersäure und Benzoesäure werden nicht genutzt. *p*-Hydroxylierte oder *p*-methoxylierte Benzoesäureanaloge sind

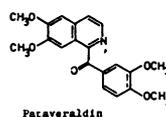
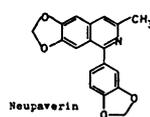
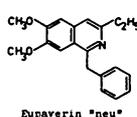
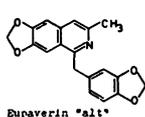
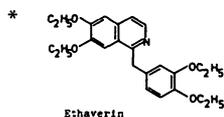
verwertbar. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß der Papaverinabbauer an seinem natürlichen Standort Phenylpropan-Verbindungen aus dem Ligninabbau als Substrate nutzt.

Zur weiteren Untersuchung des Papaverinabbaus wurden immobilisierte Zellen und im Abbaueweg genetisch blockierte Mutanten eingesetzt. Mit diesen Methoden wurden bisher noch keine neuen Erkenntnisse gewonnen. Erste Versuche mit Enzymrohextrakten sprechen für eine membran-gebundene Katalyse der ersten Reaktionsschritte.

Eine mikrobielle Veränderung von Papaverin durch verschiedene Organismen wurde schon von Rosazza et al.^[11] beschrieben. Er fand eine Demethylierung der Methoxyl-Gruppen. Ein weitergehender Abbau, insbesondere eine Aufspaltung des Isochinolin-Rings, wurde bisher noch nicht beschrieben.

Tabelle. Wachstum auf aromatischen C-Quellen

Substrat	Wachstum	Substrat	Wachstum	Substrat	Wachstum
Papaverin	+	3,4-Dihydroxybenzoesäure	+	Phenol	–
Tetrahydropapaverin	–	3,5-Dihydroxybenzoesäure	–	Brenzkatechin	–
Ethaverin*	–	4-Nitrobenzoesäure	–	Resorcin	–
Eupaverin „alt“*	–	4-Aminobenzoessäure	–	Hydrochinon	–
Eupaverin „neu“*	–	4-Chlorbenzoesäure	–	4-Hydroxybenzaldehyd	(+)
Neupaverin*	–	4-Hydroxybenzoesäure-methylester	–	4-Methoxybenzaldehyd	(+)
Papaveraldin*	–	4-Methoxybenzoesäure	–	Vanillin	(+)
Isochinolin	–	4-Methoxybenzoesäure	+	Veratrumaldehyd	
6,7-Dimethoxy-1-methylisochinolin	–	Gallussäure	–	(Metab. 8)	(+)
1-Benzylisochinolin	–	DL-Mandelsäure	–	Homoveratrumaldehyd	(+)
1-(3,4-Dimethoxybenzyl)isochinolin	–	Zimtsäure	+	Acetophenon	–
Benzoessäure	–	Cumarin	–	Benzophenon	–
4-Hydroxybenzoesäure	+	Vanillinsäure	+	8-Chinolinol	–
2-Hydroxybenzoesäure	–	Homovanillinsäure	–	Guajakol	–
1,3-Naphthalindiol	–	(Metab. 7)	+	Veratrol	–
2,3-Dihydroxybenzoesäure	–	Homoveratrumensäure	–	Metabolit 4	+
2,4-Dihydroxybenzoesäure	–	(Metab. 5)	+	Metabolit 6	+
2,5-Dihydroxybenzoesäure	–	Phenyllessigsäure	+	Phenylalanin	+
2,6-Dihydroxybenzoesäure	–	3-Phenylbrenztraubensäure	+	Tyrosin	+
		3-Phenylpropionsäure	+	Tryptophan	+
		4-Phenylbuttersäure	–	Glutaminsäure	+



Wir danken Herrn Professor *Dr. Günter Opitz*, Heidelberg, für eine gründliche und ergiebige Diskussion dieser Arbeit. Dem *Verband der Chemischen Industrie* danken wir für Unterstützung dieser Arbeit und insbesondere für ein Stipendium für K. Haase-Aschoff. Der *Firma Knoll AG*, Ludwigshafen, danken wir für die Überlassung einer größeren Menge an Papaverin. Herrn *Dr. P. Fischer*, Universität Stuttgart, danken wir für Messung von NMR-Spektren, den Herren *Dr. D. Spitzner* und *G. Schwinger* für die Messung von Massenspektren.

Literatur

- 1 Brewer, J. H. (1942) *Science* 95, 587.
- 2 Hugh, R. & Leifson, E. (1953) *J. Bacteriol.* 66, 24–26.
- 3 Chibata, I., Tosa, T. & Sato, T. (1974) *Appl. Microbiol.* 27, 878–885.
- 4 Krebs, K. G., Heusser, D. & Wimmer, H. (1967) in *Dünnschichtchromatographie* (Stahl, E., Hrsg.) S. 813–861, Verlag Springer, Berlin.
- 5 Hezel, U., Blome, J., Halpaap, H., Jaenichen, D., Kaiser, R. E. & Ripphan, J. (1976) *Einführung in die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie*, Eigenverlag des Instituts für Chromatographie, Bad Dürkheim.
- 6 Kirkland, J. J. (1971) *Modern Practice of Liquid Chromatography*, Wiley Intersci., New York.
- 7 Snyder, L. R. & Kirkland, J. J. (1974) *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley Intersci., New York.
- 8 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edit., (1974) S. 726, f., The Williams & Wilkins Comp., Baltimore.
- 9 Bacyer, A. & Villiger, V. (1899) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 32, 3625–3633.
- 10 Cripps, R. E., Trudgill, P. W. & Whateley, J. G. (1978) *Eur. J. Biochem.* 86, 175–186.
- 11 Rosazza, J. P., Kammer, M., Youel, L., Smith, R. V., Erhardt, P. W., Truong, D. H. & Leslie, S. W. (1977) *Xenobiotica* 7, 133–143.

Prof. Dr. F. Lingens, Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim, Garbenstr. 30, D-7000 Stuttgart 70.