

## Entmethylierung des 4-Methylamino-benzaldehyds durch *Polystictus versicolor* (L.)

Von

Annemarie Schmidt und Rudolf May

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,  
Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena

(Direktor: Prof. Dr. med. H. Knöll)

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. Februar 1965)

Arylmethylamine werden durch Enzymsysteme der Säugetierleber entalkyliert.

Mueller und Miller<sup>1</sup> beobachteten bei der Behandlung methylierter Aminoazoverbindungen mit Leberhomogenaten eine Entmethylierung, bei der primäres Amin und Formaldehyd als Reaktionsprodukte auftreten.

La Du u. a.<sup>2</sup> stellten eine Entmethylierung von Pyrimidon mit Leberhomogenaten fest und wiesen als Reaktionsprodukte ebenfalls Formaldehyd und das entsprechende primäre Amin nach. Das Enzymsystem ist in Lebermikrosomen lokalisiert.

Nach Brodie<sup>3</sup> verläuft die Entalkylierung oxydativ über das N-Oxid. Pettit<sup>4</sup> und Ziegler<sup>5</sup> beobachteten eine rasche Entmethylierung von *N-N*-Dimethylanilin-*N*-oxid durch Lebermikrosomen und wiesen diese Verbindung als Zwischenprodukt nach.

Bisher liegt unseres Wissens kein Bericht über die Entalkylierung von Alkylarylaminen durch Mikroorganismen vor. Ausgangspunkt der Arbeiten waren Stoffwechseluntersuchungen über 4-Methylnitrosamino-benzaldehyd und 4-Methylamino-benzaldehyd, die beide im Kulturfiltrat von *Clitocybe suaveolens* vorkommen.<sup>6</sup> Im folgenden soll über die Entmethylierung des 4-Methylamino-benzaldehyds durch *Polystictus versicolor* (L.) zu 4-Amino-benzaldehyd berichtet werden.

Anzucht des Myzels: Alle Versuche wurden mit *Polystictus versicolor* (L.), St. 24 (Herkunft vgl. l. c.<sup>7</sup>) durchgeführt. Das Myzel wuchs in einer Basidiomyceten-Nährlösung (nach Jennison<sup>8</sup>, modifiziert) folgender Zusammensetzung: 10 g Glucose; 1,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,568 g Asparagin; 10 g Malzextrakt; Spurenelemente: 0,10 mg B, 0,01 mg Cu, 0,05 mg Fe, 0,01 mg Mn, 0,01 mg Mo, 0,07 mg Zn; mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt; pH 5,2–5,5. Als Kultur-

<sup>1</sup> G. C. Mueller u. J. A. Miller, J. biol. Chemistry **202**, 579 [1953].

<sup>2</sup> B. La Du, L. Gaudette, N. Trousof u. B. B. Brodie, J. biol. Chemistry **214**, 714 [1955].

<sup>3</sup> B. B. Brodie, J. R. Gillette u. B. N. La Du, Annu. Rev. Biochem., **27**, 427 [1958].

<sup>4</sup> F. H. Pettit u. D. M. Ziegler, Biochem. biophysic. Res. Commun. **13**, 193 [1963]; F. H. Pettit, W. Orme-Johnson u. D. M. Ziegler, ebenda **16**, 444 [1964].

<sup>5</sup> D. M. Ziegler u. F. H. Pettit, Biochem. biophysic. Res. Commun. **15**, 188 [1964].

<sup>6</sup> H. Herrmann, diese Z. **326**, 13 [1961]; A. Schmidt, Unveröffentlichte Beobachtung [1962].

<sup>7</sup> M. Girbardt, Flora [Jena] **142**, 540 [1955].

<sup>8</sup> W. M. Jennison, M. D. Newcomb u. R. Henderson, Mycologia **47**, 155 [1955].

gefäße dienten Stehkolben, die bei 22° auf einem Rundschwingtisch geschüttelt wurden. Jeder Kolben enthielt 2 Glasperlen ( $\varnothing$  5 mm), um die Bildung größerer Myzel-Pellets zu verhindern. Die Zugabe von 1,5 ml einer 0,1m äthanolischen 4-Methylamino-benzaldehyd-StammLösung zur Schüttelkultur (150 ml) erfolgte während der logarithmischen Wachstumsphase. Nach 3, 6, 9 und 12 Stdn. wurden jeweils 3 ml Kulturlösung entnommen, mit 2 Tropfen säurefreiem Chloroform versetzt und davon 0,1 ml auf Papier (FN 4, VEB Spezialpapierfabrik Niederschlag/Erzgeb.) aufgetragen.

Analyse der Kulturlösung: Der in der Kulturlösung verbliebene 4-Methylamino-benzaldehyd wurde nach papierchromatographischer Trennung vom 4-Amino-benzaldehyd UV-spektrometrisch bestimmt. Der gebildete 4-Amino-benzaldehyd konnte wegen seines starken Polymerisationsbestrebens nur qualitativ nachgewiesen werden.

Papierchromatographie: Das Papier wurde mit Dimethylformamid/Äthanol 1:3 imprägniert und während 12 Stdn. als absteigendes Chromatogramm im Durchlauf bei Raumtemp. mit Tetrachlorkohlenstoff/Cyclohexan/Dimethylformamid 10:14:1 (vgl. 1. c.<sup>9</sup>) entwickelt. Die Laufstrecke betrug für 4-Methylamino-benzaldehyd 10 cm, für 4-Amino-benzaldehyd 2,5 cm (Lokalisation im UV-Licht). Das mit 5 ml Methanol gewonnene 4-Methylamino-benzaldehyd-Eluat wurde bei 333 nm im Spiegelmonochromator vermessen und die Konzentration aus einer mitgeführten Eichkurve ermittelt.

Die Identifizierung des 4-Amino-benzaldehyds ergab sich auf Grund der Übereinstimmung der Laufstrecke und des UV-Absorptionsmaximums (324 nm in Methanol) mit authent. 4-Amino-benzaldehyd (dargestellt aus polymeren 4-Amino-benzaldehyd der Fa. Schuchardt)\*. Das Besprühen der Chromatogramme sowohl mit 4-Dimethylamino-benzaldehyd als auch mit 4-Amino-benzoesäure führte in beiden Fällen zur Bildung Schiffscher Basen (gelbe Flecken), was ebenfalls für die Anwesenheit einer aromatischen primären Aminogruppe und einer aromatischen Aldehydgruppe spricht. Da aus oben erwähntem Grunde eine direkte quantitative Bestimmung des 4-Amino-benzaldehyds nicht möglich war, wurde nach Elution mit 5 ml Methanol die Extinktion am Maximum (324 nm) als relatives Maß für die Konzentration verwendet.

Ergebnisse: Der Abbau des 4-Methylamino-benzaldehyds im zeitlichen Verlauf wird in der Tabelle dargestellt. Dieser Abbau muß mindestens aus einer teilweisen Entmethylierung bestehen, denn die Menge des auftretenden 4-Amino-benzaldehyds erhöht sich mit der Abnahme des Ausgangsstoffes, wie aus der Extinktionszunahme ersichtlich ist (s. Tabelle).

Konzentrationsabnahme des 4-Methylamino-benzaldehyds und Extinktionszunahme des 4-Amino-benzaldehyds während der Kulturdauer; 0,1 ml Kulturfiltrat, papierchromatographisch aufgetrennt.

$t$ [Stdn.]	$\mu\text{g}$ 4-Methylamino- benzaldehyd	Extinktion des 4-Amino-benzaldehyds [324 nm]
0	14,5	—
3	13,5	0,088
6	12,8	0,123
9	9,1	0,318
12	3,7	0,720

\* Der analytischen Abteilung unseres Institutes unter Leitung von Herrn Dr. Herb möchten wir für die Durchführung der spektroskopischen Messungen danken.

<sup>9</sup> E. Breuer, H. Leader u. S. Sarel, Bull. Res. Council Israel, Sect. A 9, 43 [1960].

Eine Erklärung für den langsamen Konzentrationsabfall von 0—6 Stdn. ließ sich mit der beschriebenen Methodik nicht finden.

Die Frage, ob es sich um eine oxydative Entmethylierung oder eine Transmethylierung handelt, kann vorläufig noch nicht beantwortet werden. Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

### Zusammenfassung

4-Methylamino-benzaldehyd wird durch *Polystictus versicolor* (L.) entmethyliert. In der  $10^{-3}M$  Schüttelkultur sind nach 12 Stdn. nur noch etwa 30% des Substrats nachweisbar. 4-Amino-benzaldehyd konnte als Abbauprodukt identifiziert werden.

### Summary

4-Methylamino-benzaldehyde is demethylated by *Polystictus versicolor* (L.) In a shake culture containing  $10^{-3}M$  substrate, there was found only 30% of the substrate after 12 hours. 4-Aminobenzaldehyde was demonstrated to be a degradation product.

*Dipl.-Chem. Annemarie Schmidt, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena, Beutenbergstraße 11.*