

**157. Über die Biosynthese des  $\beta$ -Carotins bei *Mucor hiemalis* Wehmer. Die Beteiligung der Essigsäure am Aufbau der Carotinmolekel, insbesondere in den Stellungen 14–15 bzw. 14'–15' und 10–11 bzw. 10'–11', untersucht mit Hilfe von  $^{14}\text{C}$ -markierter Essigsäure.**

III. Mitteilung<sup>1)</sup>

von E. C. Grob und R. Büttler.

(30. VI. 55.)

Kürzlich haben wir über ein Verfahren berichtet, welches erlaubt, aus  $\beta$ -Carotin Retinin und  $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd in reiner Form zu gewinnen und aus den beiden erhaltenen Spaltprodukten auf hydrolytischem Wege die endständige  $\text{C}_2$ -Gruppe als Acetaldehyd abzuspalten<sup>2)</sup>. Damit haben wir die Möglichkeit, aus dem  $\beta$ -Carotin die C-Atome in Stellung 14–15 bzw. 14'–15' (aus Retinin) und 10–11 bzw. 10'–11' (aus  $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd) als Acetaldehyd zu isolieren. So kann nun mit Hilfe der Tracer-Methode abgeklärt werden, wie die C-Atome des als Kohlenstoffquelle im Nährmilieu des *Mucor hiemalis* verwendeten Na-Acetats in die erwähnten Stellen des  $\beta$ -Carotins eingebaut werden.

Der nach dem beschriebenen Verfahren gewonnene Acetaldehyd wird zu Essigsäure oxydiert, welche, wie schon früher beschrieben<sup>2)</sup>, nach der *Schmidt*'schen Reaktion decarboxyliert wird. Das abgespaltene  $\text{CO}_2$  wird als  $\text{BaCO}_3$  gewonnen. Diese C-Atome entstammen, je nachdem ob Retinin oder  $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd abgebaut wird, den Stellungen 15 bzw. 15' oder 11 bzw. 11' des  $\beta$ -Carotins. Nach dem *Schmidt*'schen Abbau der Essigsäure findet sich ihre Methylgruppe als Methylamin-hydrochlorid vor, dessen C-Atome aus der Stellung 14 bzw. 14' oder 10 bzw. 10' kommen, je nachdem ob das Retinin oder der  $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd abgebaut wurde.

Unsere Untersuchungen in dieser Richtung haben zu den folgenden Ergebnissen geführt:

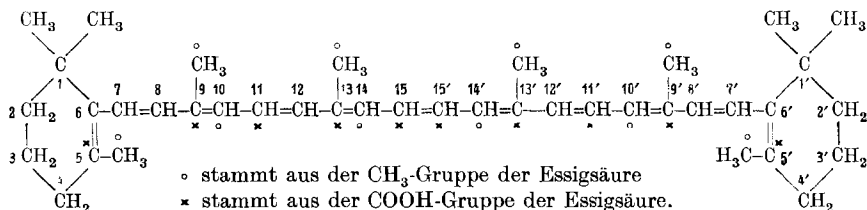
1. Wird der Nährlösung des *Mucor hiemalis* Methyl-markiertes Na-Acetat zugefügt, so erhalten wir beim Abbau des aus dem Pilzkörper gewonnenen  $\beta$ -Carotins Retinin und  $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd, welche durch weiteren Abbau zu radioaktivem Methylamin führen, während das gewonnene  $\text{BaCO}_3$  keinerlei Aktivität aufweist. Daraus folgern wir, dass in den Stellungen 14, 14' und 10, 10' der Carotinmolekel die Methylgruppen der Essigsäure eingebaut werden.

<sup>1)</sup> II. Mitt., E. C. Grob & R. Büttler, *Helv.* **37**, 1908 (1954).

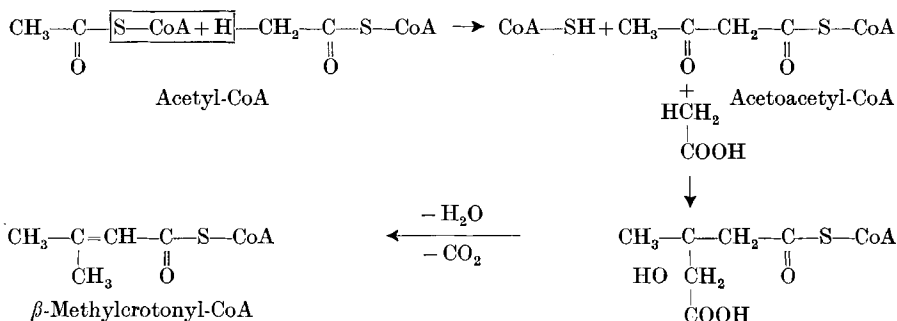
<sup>2)</sup> E. C. Grob & R. Büttler, *Helv.* **38**, 737 (1955).

2. Setzen wir der Nährlösung Carboxyl-markiertes Na-Acetat zu, so liefert uns der Abbau des entsprechenden  $\beta$ -Carotins in jedem Falle radioaktives  $\text{BaCO}_3$ . Dies beweist, dass die C-Atome 15, 15' bzw. 11, 11' des  $\beta$ -Carotins einzig aus dem Carboxyl-C der Essigsäure stammen. Leider konnte in dieser Versuchsreihe nicht eindeutig festgestellt werden, ob das Carboxyl-C der Essigsäure sich nicht auch zum Teil am Aufbau der Stellungen 14, 14' und 10, 10' beteiligt oder nicht.

Nach unseren bisherigen Ergebnissen wird die Essigsäure nach folgendem Schema in die Carotinmolekel eingebaut:



Es bestätigt sich somit immer mehr, dass die Essigsäure direkt in die Carotinmolekel eingebaut werden muss. Da im weiteren die Bildung des  $\beta$ -Carotins bei *Mucor hiemalis* von Pantothensäure<sup>1)</sup> abhängig ist, muss angenommen werden, dass in dieser Biosynthese auch dem Coenzym A, welches die Pantothensäure als essentiellen Bestandteil enthält, eine wichtige Rolle zukommen muss. Möglicherweise reagiert die Essigsäure als Acetyl-Coenzym A, wobei durch Kondensation zweier Molekeln Acetoacetyl-Coenzym A gebildet wird, welches ein Glied des Fettsäurecyclus nach *Lynen* darstellt. Man kann sich nun leicht vorstellen, dass sich an das Acetoacetyl-Coenzym A noch eine weitere Essigsäuremolekel anlagert und dass sich durch Dehydratisierung und gleichzeitige Decarboxylierung des entstandenen Produktes die  $\beta$ -Methylcrotonsäure bildet, die ja schon oft als niedere Vorstufe der natürlichen Isoprenenderivate angesehen worden ist. Vgl. z. B.<sup>2)</sup>



<sup>1)</sup> E. C. Grob, V. Grundbacher & W. H. Schopfer, *Experientia* **10**, 378 (1954).

<sup>2)</sup> F. Lipman, *Science* **120**, 855 (1954).

### Experimenteller Teil.

1. Kulturbedingungen: *Mucor hiemalis* *Wehmer* Stamm + wurde in der früher angegebenen Weise gezüchtet<sup>1)</sup>.

2. Die Isolierung des radioaktiven  $\beta$ -Carotins aus dem Pilz erfolgte ebenfalls nach der früher beschriebenen Methode<sup>1)</sup>.

3. Die oxydative Spaltung des  $\beta$ -Carotins zu Retinin und  $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd ist in einer früheren Arbeit<sup>2)</sup> beschrieben worden. In unseren Versuchen haben wir aus je 500 mg  $\beta$ -Carotin Retinin und  $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd in folgenden Ausbeuten erhalten (siehe Tab. 1a).

4. Die hydrolytische Spaltung des Retinins und des  $\beta$ -Jonylidenacetaldehyds zu Acetaldehyd (zu Essigsäure oxydiert) wurde nach <sup>2)</sup> durchgeführt; Ausbeuten siehe Tab. 1b. — Der Zusatz von reinem Na-Acetat zu dem aus dem hydrolytischen Abbau gewonnenen erwies sich als notwendig, um genügend Material für den *Schmidt*'schen Abbau zu haben.

5. Der *Schmidt*'sche Abbau der Essigsäure erfolgte unter den aus <sup>2)</sup> ersichtlichen Bedingungen. Ausbeuten siehe Tab. 1c.

**Tabelle 1.**

| Reaktion                                     | $\beta$ -Carotin aus<br>CH <sub>3</sub> -markiertem<br>Acetat | $\beta$ -Carotin aus<br>COOH-markiertem<br>Acetat |
|--|---|---|
| a) <i>Oxydative Spaltung des Carotins:</i>   |   |   |
| Retinin . . . . .                            | 72,2 mg (14%)   | 70,3 mg (13%)                                     |
| $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd . . . . .      | 90,7 mg (22%)   | 117,8 mg (28%)                                    |
| b) <i>Hydrolytische Spaltung:</i>            |   |   |
| eingesetztes Retinin . . . . .               | 71,2 mg   | 70,3 mg   |
| daraus Na-Acetat . . . . .                   | 3,1 mg (15%)  | 6,8 mg (34%)                                      |
| Zusatz von reinem Acetat . . . . .           | 4,1 mg  | 6,0 mg  |
| eingesetzter $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd . | 89,7 mg   | 117,8 mg  |
| daraus Na-Acetat . . . . .                   | 10,2 mg (30%)   | 9,3 mg (21%)                                      |
| Zusatz von reinem Acetat . . . . .           | 9,3 mg  | 9,1 mg  |
| c) <i>Essigsäureabbau:</i>                   |   |   |
| eingesetztes Na-Acetat aus                   |   |   |
| Retinin + Zugeseztes . . . . .               | 5,1 mg  | 5,5 mg  |
| daraus BaCO <sub>3</sub> . . . . .           | ca. 1 mg  | 1,0 mg (8%)                                       |
| und Methylamin-hydrochlorid . . . .          | 1,0 mg (22%)  | 2,5 mg (55%)                                      |
| eingesetztes Na-Acetat aus                   |   |   |
| $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd + Zugeseztes   | 10,1 mg   | 8,4 mg  |
| daraus BaCO <sub>3</sub> . . . . .           | 7,4 mg (37%)  | 5,6 mg (28%)                                      |
| und Methylamin-hydrochlorid . . . .          | 1,8 mg (22%)  | 1,8 mg (26%)                                      |

6. Die Messung der Radioaktivität unserer Präparate (siehe Tab. 2) geschah mit dem Tracerlab-windowless-flow-counter, der mit dem Impulsuntersetzer ELA3 (*Lan-dis & Gyr*, Zug) kombiniert ist. Die Präparate wurden in dünner Schicht auf ein poliertes Messingplättchen von 2,1 cm Durchmesser aufpräpariert. Im allgemeinen sind die Aktivitäten der Präparate derart klein, dass eine sehr grosse Zahl von Impulsen gemessen werden müssen, um zuverlässige Werte zu erhalten. Die Zahl der zu messenden Impulse wurde

<sup>1)</sup> II. Mitt., *E. C. Grob & R. Büttler*, *Helv.* **37**, 1908 (1954).

<sup>2)</sup> *E. C. Grob & R. Büttler*, *Helv.* **38**, 737 (1955).

nach den Angaben von A. Thomas<sup>1)</sup> bestimmt, so dass bei allen hier angeführten Absolutwerten der wahrscheinliche Fehler unterhalb 5% liegt und die Standardabweichung weniger als 7,5% beträgt.

Tabelle 2.

|  | $\beta$ -Carotin aus CH <sub>3</sub> -markiertem Acetat | $\beta$ -Carotin aus COOH-markiertem Acetat |
|--|---|---|
| Retinin . . . . .  | A = 250,4 ipm/mg  | A = 175,6 ipm/mg                            |
| Methylamin-HCl aus Retinin . .                             | A = 13,0 ipm/mg   | —   |
| BaCO <sub>3</sub> aus Retinin . . . . .                    | Z = $0,59 \pm 0,66$ ipm/mg                              | A = 3,56 ipm/mg                             |
| $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd . . . . .                    | A = 276 ipm/mg  | A = 90,6 ipm/mg                             |
| Methylamin-HCl aus $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd . . . . . | A = 13,82 ipm/mg  | —   |
| BaCO <sub>3</sub> aus $\beta$ -Jonylidenacetaldehyd        | Z = $0,35 \pm 0,51$ ipm/mg                              | A = 5,6 ipm/mg                              |

ipm = Impulse pro Min.

A = Absolute Zahl der Impulse (Berechnung siehe <sup>2)</sup>).

Z = Zahl der experimentell gezählten Impulse.

Diese Arbeit ist mit Unterstützung des *Schweiz. Nationalfonds* durchgeführt worden.

### Zusammenfassung.

Mit Hilfe von <sup>14</sup>C-markierter Essigsäure wird festgestellt, dass bei der Biosynthese von  $\beta$ -Carotin durch *Mucor hiemalis* Wehmer die C-Atome 14, 14' und 10, 10' mindestens teilweise von den Methylgruppen der Essigsäure geliefert werden, während die benachbarten C-Atome 15, 15' und 11, 11' ausschliesslich von den Carboxylgruppen der Essigsäure stammen. Ob sich die Carboxyl-C-Atome der Essigsäure auch an der Besetzung der erstgenannten Stellen beteiligen, konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

Botanisches Institut der Universität Bern.

## 158. Zur Dehydrobromierung von 7-Brom-cholesteryl-benzoat: Abnorme Produkte

von F. Hunziker, F. X. Müllner, K. G. Reuteler und H. Schaltegger.

(13. VI. 55.)

Die Dehydrobromierung von 7-Brom-cholesteryl-estern (I) zu Derivaten von 7-Dehydro-cholesterin (Provitamin-D<sub>3</sub>) (II) mit tertiären Basen und anorganischen Alkalien oder Carbonaten ist schon

<sup>1)</sup> A. Thomas, Tracerlog No. 65, p. 10 (1954).

<sup>2)</sup> H. Mitt., E. C. Grob & R. Büller, Helv. 37, 1908 (1954).