

UN NOUVEL ACIDE AMINE ISOLE DE *LYCOPERDON PERLATUM**

NZIRABOBA RHUGENDA-BANGAT, ANDRE WELTER†, JOSEPH JADOTT et JEAN CASIMIR‡

† Chimie organique, Université de Liège, Sart-Tilman par Liège 1, 4000 Belgium; ‡ Chimie organique et biologique, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux 5800, Belgium

(Reçu le 3 juillet 1978)

Key Word Index—*Lycoperdon perlatum*; Basidiomycete; non-protein amino acid; lycoperdic acid; 3-(5(S)-carboxy-2-oxotetrahydrofuran-5(S)-yl)-2(S)-alanine.

INTRODUCTION

Dans le cadre de nos études des acides aminés et peptides libres des champignons*, nous avons identifié un nouvel acide aminé acide dans *Lycoperdon perlatum*. Ce champignon, très commun dans les forêts a fait l'objet de quelques études du métabolisme de l'urée [1-5].

La structure du nouveau composé pour lequel nous proposons le nom 'acide lycoperdique' (ALP) a été élucidée par méthodes chimiques et physiques comme étant la 3-(5(S)-carboxy 2-oxotetrahydrofuran-5(S)-yl)-2(S)-alanine (1). L'acide aminé tricarboxylique 2 correspondant à l'ouverture de la γ -lactone de l'ALP a également été détecté en faible quantité dans le champignon sans qu'il semble que ce soit un artefact de l'isolement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Lors d'une analyse des acides aminés libres du champignon *Lycoperdon perlatum*, un spot non identifié donnant avec la ninhydrine une coloration inhabituelle jaune intense tendant vers le violet pourpre après 24 hr a été repéré à la 2 DPC. L'acide aminé possède un caractère acide très marqué mis en évidence par son comportement sur résines échangeuses d'ions et à HVE ($E_{A_{1\mu}} = 2.61$ à pH 3.6). L'extrait hydroalcoolique des champignons frais a été débarrassé des acides aminés basiques par fixation sur Lewatit S 1080 - H^+ -élution par la pyridine. Les acides aminés élus ont alors été fractionnés sur une colonne de Dowex 1 \times 8, forme AcO^- . Le nouvel acide aminé est élut après l'acide aspartique par HOAc 2 N. Assez peu soluble dans l'eau (0.0047 g/ml), il recristallise facilement dans $H_2O-EtOH$ en cristaux orthorhombiques. Le test de Larsen-Kjaer pour les acides aminés α est positif tandis que les tests au nitroprussiate et à l'isatine pour les acides iminés sont négatifs. Par la méthode de Van Slyke, un seul groupe αNH_2 est dosé. L'analyse élémentaire correspond à la formule brute $C_8H_{11}NO_6$. Le titrage potentiométrique par NaOH 0.1 N fournit une valeur de $pK = ca$ 3.7 et un équivalent de neutralisation égal à 216. Après chauffage de la solution neutralisée, une deuxième fonction acide est titrée. Ce fait ainsi que la vibration à 1770 cm^{-1} en IR indique la présence d'une fonction lactone. A 1730 cm^{-1} se trouve aussi l'absorption d'un groupe carboxylique non ionisé. Le SM de l'acide aminé libre montre un pic à 199 UM correspondant à $M^+ - H_2O$ fragmentation fréquente dans les lactones substituées [6]. La perte d'une deuxième molécule H_2O à 181 UM est

confirmée par le pic métastable à 164.5 UM $\{(181)^2/199 = 164.62\}$. Le pic intense à 99 UM accompagné des fragments à 84, 71 et 70 UM caractérise un cycle lactone substitué [7-11]; le pic à 84 correspondrait à un fragment γ -lactone ayant perdu deux substituants. Les fragments observés à 154 et 129 UM peuvent correspondre à $M^+ - H_2O-COOH$ et $M^+ - [-CH_2-CH(NH_3^+)(COO^-)]$. Les pics à 126 et 98 UM représentent la perte successive de 28 UM à partir du fragment 154 UM ($M^+ = 103.0$ $[(126)^2/154 = 103.09]$ et $M^+ = 76.5$ $[(98)^2/126 = 76.22]$). Ce pic à 98 UM représenterait un fragment méthylène γ -lactone. Les pics à 56 et 55 UM sont attribuables aux fragments $(CH_2CH_2CO)^+$ et $(CH_2CHCO)^+$ trouvés dans la plupart des lactones [7-11].

Les résultats ci-dessus indiquent que ALP est une γ -lactone substituée par un groupe carboxylique et un groupe alanyl-3. Des informations complémentaires sont fournies par l'étude de RMN. En ^{13}C RMN (Tableau 1), est observée la présence de trois groupes carboxyliques, trois groupes méthéniques, un atome de carbone tétrasubstitué et un groupe méthine résonnant à 51.4 ppm ($D_2O + TFA$) et 53.8 ppm (TFA), valeurs caractéristiques d'un carbone α acide aminé [12]. Les attributions des résonances des trois $-CH_2-$ ont été faites par comparaison avec les valeurs disponibles dans la littérature [11-14]. La résonance à champ faible vers 88 ppm correspond à l'atome de carbone tétrasubstitué en position α de l'atome d'oxygène lactonique [11, 14]. Au vu de ces résultats, la structure représentée par la formule 1 est attribuée à ALP. Les spectres 1H RMN confirment cette formule. Les protons sur les atomes de carbone α et β forment un système AMX $J_{\alpha H-\beta H} = 3.36$; $J_{\alpha H-\beta H''} = 10.10$ dont l'existence a été confirmée par double irradiation successivement sur chacune de ces résonances. La non équivalence assez marquée des protons du groupe $-CH_2-$ ($J_{\beta H-\beta H''} = 15.48$) est attribuable à sa position entre deux atomes de carbone asymétriques.

Selon la règle de Clough-Lutz-Jirgensons, la valeur de $[\alpha]_D$, plus positive dans HCl 1 N que dans H_2O , indique une configuration $-S$ du carbone α , si la contribution de C-5 est supposée être peu influencée par la variation de pH. Cela semble être justifié, en ^{13}C RMN par la comparaison des déplacements chimiques dans $D_2O + TFA$ et dans TFA pur et en 1H RMN par le déblindage important du $H-\alpha$ lors de l'addition de TFA [$\Delta\delta = \delta_{TFA} - \delta_{D_2O} = 0.55$]. Ces constatations suggèrent que l'ionisation la plus importante se fait sur l' α -COOH. L'étude de ALP à l'état cristallin par diffraction de RX [15] établit la configuration des atomes de carbones asymétriques: -5(S)2-(S) ou -5(R)2-(R), ce qui permet de retenir la configuration absolue 5-(S)2-(S).

Dans des conditions d'hydrolyse par NaOH 3 N à chaud, ALP disparaît pour donner un nouvel acide

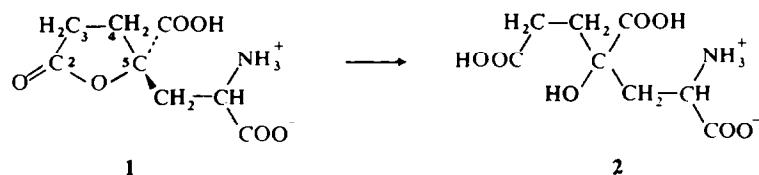
* Part 12 in the series "Amino Acids and Peptides from Mushrooms". For Part 11 see Dardenne, G., Marlier, M., and Welter, A. (1977) *Phytochemistry* 16, 1822.

Tableau 1. ^{13}C RMN déplacements chimiques de l'acide lycoperdique 1 et de l'acide aminé 2

Composé	Solution	δ pour							
		C-2	C-3	C-4	C-5	C- α	C- β	α -COOH	S-COOH
ALP	TFA	172.9(s)	38.5(t)	29.0(t)	88.4(s)	53.8(d)	34.2(t)	175.9(s)	181.6(s)
	D ₂ O + TFA	171.0	38.1	27.9	87.0	51.4	35.4	176.3	178.9
A.A.2*	D ₂ O + TFA	179.0	29.2	37.6	77.2	51.0	32.2	171.0	170.6

Les spectres des composés en solution dans TFA et D₂O + TFA 12% ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER 22.63 MHz avec le dioxane (5% V/V) comme référence interne. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS ($\delta_{\text{TMS}} = \delta_{\text{diox.}} + 67.4$ ppm). Les lettres entre parenthèses indiquent la multiplicité observée dans le spectre 'off resonance'.

TMS — diox. ppm). Ces autres deux paramètres indiquent que l'espèce en question



aminé réagissant en vert olive devenant violet après 1 hr avec la ninhydrine. Cet acide aminé correspond à l'ouverture du cycle γ -lactone (voir formule 2). Il apparaît également en faibles quantités en équilibre avec ALP dans différentes conditions d'hydrolyse en milieu acide. Après purification sur résine cationique, quelques mg de 2 ont pu être obtenus. Le spectre IR ne présente plus de bande lactonique mais par contre possède une large bande —OH vers 3420 cm^{-1} . Dans une solution de ALP dans $\text{D}_2\text{O} + \text{TFA}$, laissée une nuit à la température ordinaire, le spectre ^{13}C RMN de 2 a pu être observé à côté de celui de ALP (Tableau 1). Les attributions des résonances ont été faites par comparaison avec les valeurs calculées en utilisant les paramètres des substituants —OH , —COOH et —NH_3^+ [12, 13]. Le spot de cet acide aminé 2 est également détecté sur 2 DPC de l'extrait hydroalcoolique de champignons frais. ALP pourrait avoir été formé à partir de 2 lors de la purification par passage sur résine cationique. Mais la 2 DPC d'un extrait frais du champignon, sans purification sur résines, montre toujours le spot jaune très intense de ALP ainsi que le faible spot violet de l'acide aminé 2. ALP est donc un métabolite réel de *Lycoperdon perlatum* qui contient vraisemblablement une faible quantité de l'acide aminé à chaîne ouverte 2.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. *Lycoperdon perlatum* a été récolté en 1976 et 1977 dans les forêts des Ardennes Belges.

Méthodes d'analyses. Les 2 DPC ont été effectuées sur papier Whatman 3 MM en utilisant comme solvants le mélange *n*-BuOH-HCOOH-H₂O (15:3:2) et le phénol saturé par un tampon à pH 4,2. *R*_{APP}: BuOH, 1 = 0,87 2 = 0,72; PhOH, 1 = 1,66 2 = 0,87. HVE a été réalisé pH 3,6; 100 V/cm; 120 min; les mobilités par rapport à l'anode sont en cm: Ac. glut. 1; Ac.Asp 3; 1,70; 2,50.

Isollement de ALP. 750 g de *Lycoperdon perlatum* frais ont été broyés et extraits deux fois par 3 l. d'EtOH 95% par agitation

pendant 72 hr. L'extrait filtré a été purifié sur une colonne de Lewatit S 1080, H^+ , 50-70 mesh, 4×10 cm. Les acides aminés neutres et acides ont été élusés par la pyridine 1 N. Après évaporation à sec, le résidu a été repris par le minimum d'eau puis fixé sur une colonne de Dowex 1×8 , forme AcO^- , 200-400 mesh, 2×22 cm. Les acides aminés neutres ont été élusés par H_2O puis les acides glutamique et aspartique ont été détachés par HOAc 0.5 N. Ensuite, par élution par HOAc 2 N, ALP est obtenu puis recristallisé plusieurs fois dans H_2O (260 mg; 0.034%). Anal.: $C_{18}H_{11}NO_6$. M = 217; trouvé C, 44.24; H, 5.07; N 6.45%. Calculé C, 44.46; H, 5.13; N, 6.57%. $[\alpha]_D^{20'} = +14.9^\circ$ (c 0.47 H_2O); $[\alpha]_D^{20'} = +36.5$ (c 1.37 HCl 1 N).

Un effet Cotton positif a été observé par la mesure de la courbe de dichroïsme circulaire: $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$, $\Delta\epsilon = 0.14$ (0.063 M HCl 1 N). IR $\nu(\text{KBr}) \text{ cm}^{-1}$: 3240, 2950, 2910, 2830, 2780, 2640, 2590, 2500, 2060, 1770, 1730, 1635, 1530, 1210, 1100. $^1\text{H RMN}$ (TFA 20%): δ (ppm, HMDS externe): αH 5.3; $\beta\text{H}'$ 3.23; $\beta\text{H}''$ 2.60; 3-H et 4-H 2.90.

Remerciements—Nous tenons à remercier Monsieur J. Denoël, Directeur du Centre de RMN de l'Université de Liège, pour la prise des spectres de RMN.

REFERENCES

1. Wasternack, C. et Reinbothe, H. (1967) *Flora (Jena) Abt. A.* **158**, 1.
 2. Reinbothe, H. (1964) *Phytochemistry* **3**, 327.
 3. Reinbothe, H. et Tschibersch, B. (1962) *Flora (Jena)* **152**, 423.
 4. Reinbothe, H. (1967) *Flora (Jena) Abt. A.* **158**, 27.
 5. Reinbothe, H. (1964) *Tetrahedron Letters* **37**, 2651.
 6. McFadden, W. H., Day, E. A. et Diamond, M. J. (1965) *Analyt. Chem.* **37**, 89.
 7. Honkanen, E., Moisio, T. et Karvonen, P. (1965) *Acta Chem. Scand.* **19**, 370.
 8. Honkanen, E., Moisio, T. et Karvonen, P. (1969) *Acta Chem. Scand.* **23**, 531.
 9. Long, F. A. et Friedman, L. (1950) *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 3692.
 10. Friedman, L. et Long, F. A. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2832.
 11. Pyvssalo, H., Engqvist, J., Honkanen, E. et Pippuri, A. (1975)

- Finn. Chem. Letters* 129.
12. Rabenstein, D. L. et Sayer, Th. L. (1976) *J. Magn. Reson.* **24**, 27.
 13. Stothers, J. B. (1972) *Carbon-13 NMR Spectroscopy*. Academic Press, New York.
 14. Davies, D. I. et Dowle, M. D. (1976) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **21**, 2267.
 15. Lamotte, J., Oleksyn, B., Dupont, L., Dideberg, O., Campesteijn, H., Vermeire, M. et Rhugenda-Banga, Nz. (1979) *Acta Crystallogr. sous presse*.

Phytochemistry, 1979, Vol. 18, pp. 484-485 © Pergamon Press Ltd Printed in England.

0031-9422/79/0301-0484 \$02.00/0

EFFECT OF AMINO ACIDS ON EPHEDRINE PRODUCTION IN *EPHEDRA GERARDIANA* CALLUS CULTURES

KISHAN GOPAL RAMAWAT and HARISH CHANDRA ARYA

Tissue Culture Laboratory, Department of Botany, University of Jodhpur, Jodhpur-342001, India

(Received 23 June 1978)

Key Word Index—*Ephedra gerardiana*; Gnetales; plant tissue culture; precursor amino acids; IBA; ephedrine.

INTRODUCTION

Exogenous amino acids have proved useful in improving the yield of some cell products, particularly alkaloids. Effects of precursor amino acids have been reported in *Datura* [1-3], *Scopolia* [2], *Phaseolus vulgaris* [4] and *Lithospermum* [5] cultures. The addition of phenylalanine to the cultures of *Datura* [3] and *Lithospermum* [5] caused a two to three-fold increase in the amounts of secondary metabolites whereas the use of tryptophan in *Phaseolus vulgaris* [4] cell suspensions produced two new alkaloids, harman and norharman.

Results obtained from previous studies indicated that *Ephedra gerardiana* produced ephedrine in callus cultures while *E. foliata* was devoid of it [6]. Studies with *E. gerardiana* callus tissues showed that indole butyric acid (IBA) was the best auxin for ephedrine production amongst the growth regulators used [7].

In this note we describe the effects of some precursor amino acids (phenylalanine, methionine and glycine) used with NAA or IBA in Murashige and Skoogs (MS) medium [8]. Tissues grown on media supplemented with aspartic acid, serine or leucine could not be analysed due to poor growth or complete failure of tissues to grow on such media.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of amino acids in combination with NAA

Results obtained with precursor amino acids on ephedrine yield in *E. gerardiana* callus tissue are shown in Table 1. Maximum yield of ephedrine was recorded in the callus tissues grown on MS medium supplemented with 0.1 g/l. L-phenylalanine. Moderately high ephedrine contents were recorded with L-phenylalanine (0.4 g/l.), DL-methionine (0.1 and 0.4 g/l.) and glycine (0.1 g/l.), respectively. Tissues grew well on such treatments and growth of tissues did not correlate with ephedrine production.

Effects of amino acids in combination with IBA

On the basis of experience obtained with previous results, the optimal concentration of IBA (10 mg/l.) was used in place of NAA (10 mg/l.) and various amino acids were incorporated in the medium. The results obtained are shown in Table 2. A synergistic effect of IBA and L-phenylalanine and DL-methionine was observed on the yield of ephedrine. Maximum yield of ephedrine was obtained from tissues grown on media supplemented with IBA (10 mg/l.) and phenylalanine (0.1 g/l.). NAA

Table 1. Effect of precursor amino acids on ephedrine production in *E. gerardiana* callus tissues at 8-weeks growth in 16 hr light (1000 lx) at $26 \pm 2^\circ$

MS + amino acid	Concn g/l. medium	Dry wt/culture in mg	% Ephedrine
*MS + L-phenylalanine	0.1	250	0.50
	0.4	230	0.40
MS + DL-methionine	0.1	230	0.43
	0.4	210	0.35
MS + glycine	0.1	225	0.30
	0.4	220	0.21
MS + serine	0.1	60	—
MS + aspartic acid	0.1	50	—
MS alone	—	190	0.17

* MS = Medium with kinetin (0.5 mg/l.) and NAA (10 mg/l.).