

# Zur Bildung von Chinolinalkaloiden in Pflanzen

## 2. Die fermentative Umwandlung der *Penicillium*-Alkaloide Cyclophenin und Cyclophenol in Viridicatin und Viridicatol

M. LUCKNER

Pharmakognostisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle (Saale)  
und Institut für Biochemie der Pflanzen der DAdW Halle (Saale)

(Eingegangen am 13. April 1967)

Within the last few years, the quinoline alkaloids viridicatin (I), viridicatol (II) and 3-*O*-methyl viridicatin (III) have been isolated from the mycelium and culture medium of *Penicillium cyclopium* Westling, *Penicillium puberulum* Bainier and *Penicillium viridicatum* Westling. Two further alkaloids found in the culture medium of *P. cyclopium* und *P. viridicatum*, cyclophenine (IV) and cyclophenol (V) are benzodiazepine derivatives. We have shown, using labelled precursors with *P. viridicatum* strain V<sub>41</sub> and *P. cyclopium* strain SM<sub>72</sub> that cyclophenine, cyclophenol, viridicatin and viridicatol are synthesised from anthranilic acid and phenylalanine. These results, together with the easy conversion of cyclophenine and cyclophenol into viridicatin and viridicatol respectively by means of acid or alkali, suggested that an *in vivo* relationship could exist between these two groups of alkaloids.

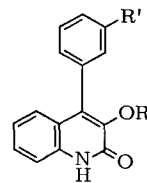
In this paper we show that cyclophenine and cyclophenol are intermediates in the formation of viridicatin and viridicatol and that the transformation of the former to the latter is effected by an enzyme which we have named cyclophenase. This transformation occurs with fresh homogenised mycelium, with dried lyophilised mycelium and with mycelium free extract, that with the dead mycelium being much faster than with the other preparations. Using the mycelium free extract it was shown that the "agent of activity" depends upon pH, is not dialysable and can be destroyed by heating at 60° for 3 min, thus indicating the enzymatic nature of the transformation. Additional products of the transformation are carbon dioxide and methylamine.

Cyclophenase activity is shown to be strongest in the surface cultured mycelium of *P. viridicatum*, strain V<sub>41</sub>. In the surface cultured *P. cyclopium*, strain SM<sub>72</sub> mycelium the activity was much less and in the submerged culture of both strains practically no activity was detected. This agrees with the observation that, under normal conditions, only *P. viridicatum* strain V<sub>41</sub> produces an appreciable amount of viridicatin and viridicatol.

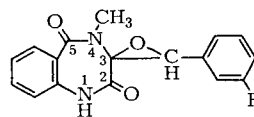
These experiments, together with previous work, indicate that anthranilic acid and a phenylpropane (*e.g.* phenylalanine) combine to give the benzodiazepines, cyclophenine and cyclophenol and these are transformed by the enzyme cyclophenase to the quinoline derivatives viridicatin and viridicatol. The detailed mechanism of this transformation is being investigated.

Aus dem Mycelium und dem Kulturfiltrat von Schimmelpilzen der Gattung *Penicillium* (*Penicillium cyclopium* Westling, *Penicillium puberulum* Bainier und *Penicillium viridicatum* Westling) konnten in den letzten Jahren eine Reihe von Alkaloiden isoliert werden. Von ihnen sind Viridicatin (I), Viridicatol (II) und 3-Methyl-viridicatin (III) Chinolinderivate [1–5], während für die Alkaloide Cyclophenin (IV) und Cyclophenol (V) die Benzodiazepinstruktur wahrscheinlich gemacht werden konnte [6].

Da sich die Alkaloide Cyclophenin und Cyclophenol durch Säuren oder Laugen leicht in Viridicatin bzw. Viridicatol umwandeln lassen [2,3,6] und *in vivo* sowohl Cyclophenin und Cyclophenol als auch Viridicatin und Viridicatol durch Verknüpfung von Anthranilsäure mit einem Phenylpropankörper (z. B.



I Viridicatin (R = H, R' = H)  
II Viridicatol (R = H, R' = OH)  
III 3-Methylviridicatin (R = CH<sub>3</sub>, R' = H)



IV Cyclophenin (R = H)  
V Cyclophenol (R = OH)

Phenylalanin) entstehen' [6—9], lag die Vermutung nahe, daß eine biogenetische Beziehung zwischen den Benzodiazepinderivaten und den Chinolinalkaloiden besteht. Im folgenden soll über Versuche berichtet werden, bei denen nachgewiesen werden konnte, daß Cyclophenin und Cyclophenol biogenetische Vorstufen für die Alkaloide Viridicatin und Viridicatol sind und ihre Umwandlung in diese Chinolinderivate durch ein Ferment katalysiert wird, für das wir den Namen „Cyclophenase“ vorschlagen<sup>1</sup>.

## EXPERIMENTELLES

### *Die verwendeten Pilzstämme*

Zu den Untersuchungen wurden folgende Pilzstämme verwendet: (a) *Penicillium viridicatum*, Stamm V<sub>41</sub> [7] und (b) *Penicillium cyclopium*, Stamm SM<sub>72</sub>.

Stamm SM<sub>72</sub> wurde ausgehend von einer Kultur von *P. cyclopium* LSHTM Nr. 72 [3] durch Isolation einzelner Konidien (vgl. [7]) gewonnen. Konidien der beiden Stämme wurden in der bereits beschriebenen Weise [7] als Konserve aufbewahrt.

### *Die Kultur der Pilze*

Die Nährböden und Nährlösungen wurden, wie unter [7] angegeben, hergestellt. Für die emerse Kultur der Pilze wurden je 500 ml Nährlösung NL I in einem 1000 ml-Fernbachkolben mit einer ausreichenden Menge von Konidien beimpft (vgl. [7]) und unbewegt in einem dunklen Raum bei 24° 6 Tage bebrütet.

Für die submersen Kulturen wurden je 200 ml Nährlösung NLI in einem 500 ml-Langhalsstehkolben mit  $\frac{2}{5}$  der für die emersen Kulturen verwendeten Sporenmenge beimpft und in einem dunklen Raum bei 24° 6 Tage lang auf einem Rundschüttler (VEB Fanal, Mühlenbau, Bad Frankenhausen) bei 150 U./min kultiviert.

### *Die Herstellung von Homogenaten aus Frischmycel*

Die Myceldecken emerser Kulturen wurden von der Nährlösung abgetrennt, mehrmals mit Wasser gewaschen und zwischen Filterpapier möglichst trocken gepreßt. Das Mycel wurde danach pro Myceldecke mit 50 ml Wasser versetzt und bei maximaler Umdrehungszahl in einem Homogenisator der Firma Bühler (Tübingen) 5 min unter Kühlung homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde mit Wasser auf ein Volumen von 500 ml pro Myceldecke verdünnt.

Das submers gewachsene Pilzmycel wurde von der Nährlösung abgesaugt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Die der Hälfte des Inhalts eines Kolbens entsprechende Menge Mycel wurde mit 50 ml Wasser

versetzt und wie angegeben homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde mit Wasser auf ein Volumen von 100 ml verdünnt.

### *Die Herstellung von alkaloidfreiem Myceltrockenpulver*

Das Mycel wurde von der Nährlösung abgetrennt, mehrmals mit Wasser gewaschen und zwischen Filterpapier möglichst trocken gepreßt. Es wurde danach schnell im Vakuum getrocknet und in einer Kugelmühle bis zu einer Teilchengröße von weniger als 0,15 mm Durchmesser zermahlen. Das erhaltene Mycelpulver wurde dreimal mit der zwanzigfachen Menge Aceton verrührt und jeweils nach 5 min abzentrifugiert. Danach waren im Überstand Viridicatin und Viridicatol nicht mehr nachweisbar.

### *Die Herstellung zellfreier Extrakte aus Frischmycel*

Das Mycel wurde von der Nährlösung abfiltriert, mehrmals mit Wasser gewaschen und zwischen Filterpapier möglichst trocken gepreßt. 100 g des abgepreßten Mycels wurden mit der doppelten Menge gewaschenem und geglühtem Seesand versetzt und bei -20° in einem mechanisch angetriebenen Mörser 10 min verrieben. Die erhaltene Mischung wurde mit 100 ml Wasser versetzt und weitere 30 min verrieben. Das so hergestellte Homogenat wurde mit 100 ml Wasser verdünnt und über Glaswolle filtriert. Das Filtrat wurde 40 min in einem Schwerefeld von 20000 × g zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde verworfen.

### *Die Dialyse zellfreier Extrakte*

Der erhaltene Überstand (s. vorh. Abschnitt) wurde in einem Dialysierschlauch der Firma Kalle AG, Biebrich (Wiesbaden) bei 0° 48 Std gegen Wasser dialysiert.

### *Die Bestimmung der Cyclophenaseaktivität*

1,75 ml eines Mycelhomogenats, eines zellfreien Extrakts oder einer Suspension von 50—100 mg Myceltrockenpulver in Wasser wurden in einem 10 ml-Erlenmeyerkolben mit 2,5 ml 0,4 M Bernsteinsäure-Natronlauge-Puffer pH 6,0 und 0,75 ml einer Cyclophenin- bzw. Cyclophenollösung versetzt, die 50 mg des jeweiligen Alkaloids in 7,5 ml Methanol gelöst enthielt. Die Ansätze wurden bei 25° aufbewahrt und während der Inkubation geschüttelt. Die eingesetzte Cyclophenaseaktivität wurde so gewählt, daß die Cyclophenin- oder Cyclophenolkonzentration während des Versuches nicht unter 500 µg/ml absank. Bestimmt wurde die Menge des gebildeten Viridicatis bzw. Viridicatols.

Bei der Bestimmung wurde 1 ml der zu prüfenden Lösung zur Denaturierung der Proteine mit 10 ml Methanol versetzt. Nach 5 min wurde die Mischung

<sup>1</sup> Vorläufige Mitteilung [10]; 1. Mitteilung, siehe [7].

filtriert. 8 ml des Filtrates wurden mit 1 ml einer Mischung aus 1 ml wäßriger, 10%iger Eisen(III)-chloridlösung, 19 ml Methanol und 20 ml 1 N Salzsäure versetzt und die Extinktion der erhaltenen Lösung bei 590 nm in einer Schichtdicke von 1 cm gegen Wasser gemessen. Von Viridicatin und Viridicatol wurden unter den angegebenen Bedingungen Eichkurven aufgenommen. Diese verliefen bis zur Extinktion 0,8 linear.

Als 1 Einheit Cyclophenase wurde diejenige Menge an Enzym bezeichnet, die unter diesen Bedingungen je Minute 1  $\mu$ Mol Cyclophenin spaltet.

Die vorhandene Menge an Cyclophenase errechnet sich nach folgender Formel:

$$1 \text{ Einheit} = \frac{\mu\text{Mol gebildetes Viridicatin}}{\text{Inkubationszeit in Minuten}}$$

#### Die quantitative Bestimmung der bei der Cyclophenase-spaltung gebildeten Produkte

Ein 500 ml-Dreihalskolben wurde mit einem bis in die Nähe des Bodens reichenden Gaseinleitungsrohr, einem Scheidetrichter und einem Gasableitungsrohr versehen. In dem Kolben wurden 2 g Mycelpulver (*Penicillium viridicatum* Stamm V<sub>41</sub>, Kultur: emers) in 170 ml Bernsteinsäurepuffer (vgl. vorhergehenden Abschnitt) suspendiert. Nachdem die Luft durch Stickstoff verdrängt war, wurde die Apparatur mit zwei hintereinander geschalteten Gaswaschflaschen verbunden, die je 50 ml gesättigte Bariumhydroxidlösung enthielten. Durch den Scheidetrichter wurde die Suspension mit einer Lösung von 1,5 mMol Cyclophenin (Versuch A) bzw. Cyclophenol (Versuch B) in 25 ml Methanol versetzt und der Scheidetrichter mit 5 ml Methanol nachgespült. Unter langsamen Durchleiten von Stickstoff wurde der Inhalt des Kolbens 3 Std gerührt.

Danach wurden die Waschflaschen, bei denen sich in der ersten ein dicker Niederschlag, in der zweiten eine geringe Menge von Bariumcarbonat befand, von der Apparatur abgetrennt und das überschüssige Bariumhydroxid mit 0,1 N Salzsäure gegen Phenolphthalein titriert. Aus den Ergebnissen bei der Titration errechnete sich bei Versuch A eine Bildung von 308 mg Bariumcarbonat, entsprechend 1,56 mMol, bei Versuch B eine Bildung von 300 mg Bariumcarbonat, entsprechend 1,52 mMol.

Von der Reaktionsmischung wurde unter langsamem Durchleiten von Stickstoff im Vakuum das Aceton abdestilliert. Das Mycelpulver und das ausgefallene Viridicatin bzw. Viridicatol wurden abfiltriert, mehrmals mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Soxhletapparat mit Aceton erschöpfend extrahiert. Das nach dem Abdampfen des Acetons bei Versuch A verbleibende rohe Viridicatin (380 mg entsprechend 1,6 mMol) bzw. das bei Versuch B erhaltene rohe Viridicatol (396 mg entsprechend 1,56 mMol) wurden durch Umkristallisieren aus Äthylacetat und

Hochvakuumsublimation gereinigt (F des gereinigten Viridicatin 263–265°; F des gereinigten Viridicatols 267–269°). Die Substanzen gaben mit authentischem Viridicatin bzw. Viridicatol keine Schmelzpunktdepression und bei Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie [3, 7] die gleichen  $R_F$ -Werte.

Das bei der Abtrennung von Mycelpulver und Viridicatin bzw. Viridicatol erhaltene Filtrat wurde mit den Waschwässern vereinigt und mit 40 ml 12 N Natronlauge vermischt. Das durch die Lauge freigesetzte Methylamin wurde durch Wasserdampfdestillation abgetrennt und in 20 ml N Salzsäure aufgefangen. Nachdem 150 ml Destillat entstanden waren, wurde die Destillation beendet. Das Destillat wurde im Vakuum auf etwa 10 ml eingengt und im Exsiccator über festem Kaliumhydroxid zur Trockne eingedunstet. Der verbleibende Rückstand von rohem Methylaminhydrochlorid (Versuch A 98,6 mg, entsprechend 1,46 mMol; Versuch B 103 mg, entsprechend 1,52 mMol) wurde aus wenig Wasser umkristallisiert; F 225–227°. Die erhaltene Substanz gab keine Schmelzpunktdepression mit authentischem Methylaminhydrochlorid.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß sowohl Homogenate als auch Trockenpräparate oder zellfreie Extrakte aus emers gewachsenem Mycel von *Penicillium viridicatum* Stamm V<sub>41</sub> in der Lage sind, die Benzodiazepinderivate Cyclophenin und Cyclophenol in die Chinolinalkaloide Viridicatin bzw. Viridicatol umzuwandeln (Tabelle). In Versuchen ohne

Tabelle. Die Umwandlung von Cyclophenin und Cyclophenol durch Homogenate, Trockenpulver oder zellfreie Extrakte aus emers kultiviertem Mycel von *Penicillium viridicatum* Stamm V<sub>41</sub>

Präparat	Zeitdauer	Gebildetes	Gebildetes
	des Versuches	Viridicatin	Viridicatol
	min	mg/Ansatz	mg/Ansatz
Mycel-homogenat	0	0,00	0,00
	30	0,06	0,06
	60	0,12	0,11
	90	0,18	0,19
Myceltrockenpulver	0	0,00	0,00
	30	0,82	0,80
	60	1,70	1,74
	90	2,45	2,50
Zellfreier Extrakt	0	0,00	0,00
	30	0,21	0,18
	60	0,40	0,38
	90	0,63	0,65

Zusatz von Cyclophenin bzw. Cyclophenol erfolgt dagegen keine Bildung von Viridicatin bzw. Viridicatol. Die Umsetzung von Cyclophenin und Cyclophenol verläuft mit etwa gleicher Geschwindigkeit.

Bei der quantitativen Bestimmung der bei der Reaktion auftretenden Spaltprodukte wurde gefunden, daß je Mol zugesetztes Cyclophenin bzw. Cyclophenol 1 Mol Kohlendioxyd, 1 Mol Methylamin und 1 Mol Viridicatin bzw. Viridicatol gebildet wird. Die Umwandlung der beiden Alkaloide durch die Mycelpräparate scheint deshalb analog der Reaktion bei Einwirkung von Säuren oder Laugen zu verlaufen, bei der die gleichen Spaltprodukte erhalten werden [2,3,6].

Das die Umwandlung katalysierende Prinzip ist wasserlöslich und findet sich nach dem Zentrifugieren von Sandverreibungen, die aus frischen Myceldecken hergestellt wurden, zu einem gewissen Prozentsatz im zellfreien Überstand. Seine Aktivität ist in starkem Maße von dem pH-Wert der Versuchsansätze abhängig und besitzt bei Verwendung von 0,4 M Bern-

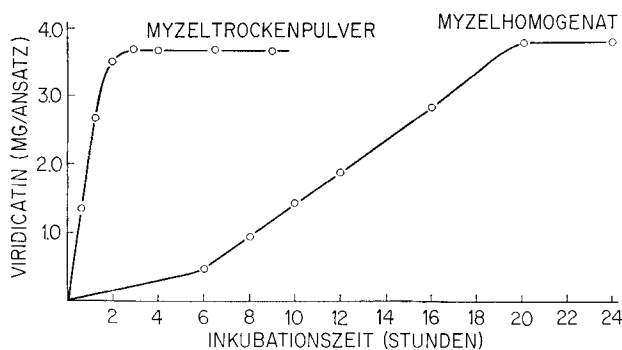


Fig.1. Die Bildung von Viridicatin aus zugesetztem Cyclophenin durch Homogenate und Trockenpulver aus emers kultiviertem Mycel von *Penicillium viridicatum* Stamm  $V_{41}$

steinsäurepuffer bei pH 6,0 ein Maximum. Die Aktivität ist nicht dialysierbar und wird durch dreiminütiges Erhitzen auf 60° zerstört. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Reaktion durch ein Ferment katalysiert wird. Für dieses Ferment schlagen wir den Namen „Cyclophenase“ vor.

Die Geschwindigkeit der Umsetzung von Cyclophenin und Cyclophenol ist bei Verwendung der verschiedenen aus den Myceldecken hergestellten Präparate sehr unterschiedlich. Bei der Verwendung von Myceltrockenpulver begann die Umwandlung sofort mit maximaler Geschwindigkeit und ging etwa zehnmal so schnell vor sich wie bei der Verwendung von homogenisiertem Frischmycel (berechnet auf gleiches Trockengewicht). Bei frisch homogenisierten Pilzdecken, bei denen durch mikroskopische Beobachtung nachgewiesen werden konnte, daß nur ein geringer Teil der Pilzhyphen durch die Zerkleinerung zerstört worden ist, wurde eine etwa 5 Std dauernde Induktionsphase beobachtet, nach deren Verstreichen der Umsatz bis zum Verschwinden des zugesetzten Cyclophenins konstant blieb (Fig.1). Diese Ergebnisse lassen sich erklären, wenn man annimmt, daß in der

lebenden Zelle durch das in hoher Konzentration zugesetzte Cyclophenin zunächst die Bildung einer Permease stimuliert wird und daß die Aufnahme des Alkaloides in die Pilzzellen die Reaktion ist, die die Geschwindigkeit der Umsetzung begrenzt. Wird diese Aufnahmeschranke der lebenden Zelle durch das Trocknen des Mycels zerstört, so kann eine größere Cyclophenaseaktivität nachgewiesen werden.

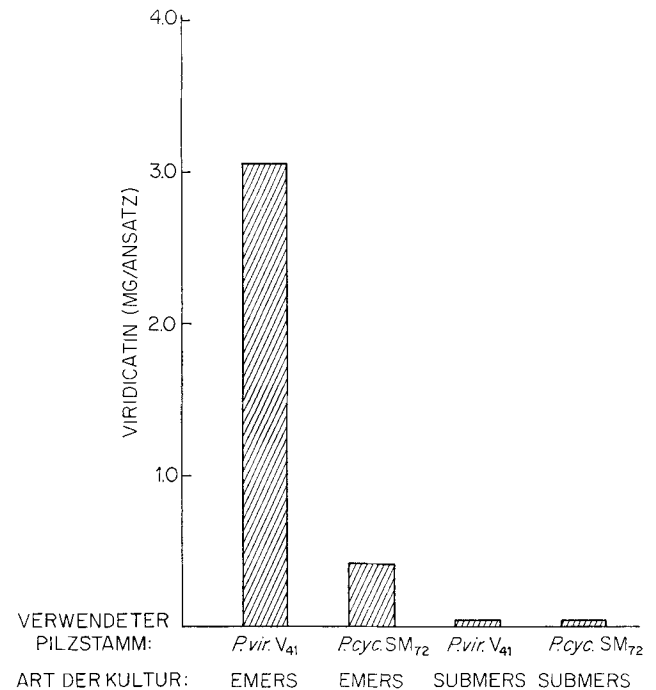
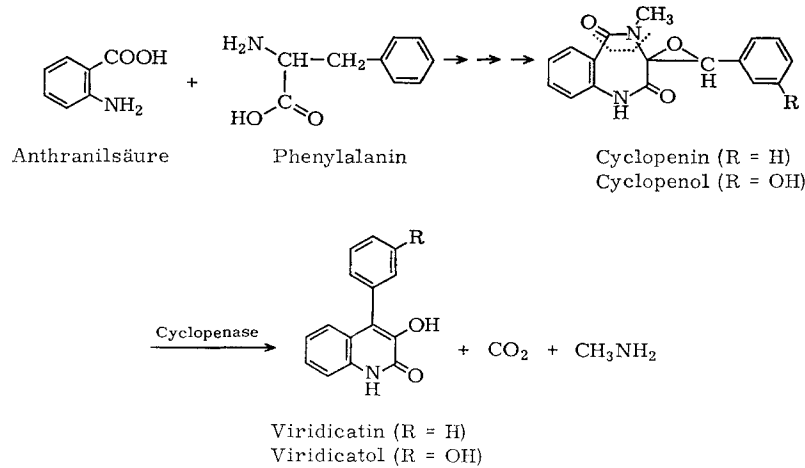


Fig.2. Die Bildung von Viridicatin aus zugesetztem Cyclophenin durch Homogenate aus emers und submers kultiviertem Mycel von *Penicillium viridicatum* Stamm  $V_{41}$  und *Penicillium cyclopium* Stamm  $SM_{72}$ . Inkubationszeit 24 Stunden

Die Untersuchung des unter verschiedenen Kulturbedingungen erhaltenen Mycels zeigte, daß Cyclophenase nur bei emers gewachsenen Myceldecken vorhanden ist. Emers gewachsenes Mycel von *P. viridicatum* Stamm  $V_{41}$  besitzt hierbei eine höhere Aktivität als das Mycel des gleichfalls untersuchten *P. cyclopium* Stamm  $SM_{72}$  (Fig.2). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß emeres Mycel von *P. viridicatum* überwiegend Viridicatin und Viridicatol, emeres Mycel von *P. cyclopium* Stamm  $SM_{72}$  fast ausschließlich Cyclophenin und Cyclophenol synthetisiert [9].

Submers gewachsenes Mycel der beiden untersuchten Pilzstämmen bildet aus zugesetztem Cyclophenin oder Cyclophenol die entsprechenden Chinolinalkaloide nicht (Fig.2). Bei dieser Art der Kultur wird bei den Stämmen auch unter normalen Wachstumsbedingungen weder Cyclophenin bzw. Cyclophenol noch Viridicatin bzw. Viridicatol synthetisiert.

Aus den bereits früher mitgeteilten Ergebnissen [6—9] und den in dieser Mitteilung beschriebenen Befunden ergibt sich für die Biosynthese der Chinolinalkaloide in *P. viridicatum* und *P. cyclopium* folgender Weg (Schema):



Schema. Die Biosynthese der Alkaloide Cyclophenin, Cyclophenol, Viridicatin und Viridicatol

Aus Anthranilsäure und einem Phenylpropankörper (z. B. Phenylalanin) werden über bisher nicht näher bekannte Zwischenstufen zunächst die Benzodiazepinalkaloide Cyclophenin und Cyclophenol gebildet, die als cyclische Dipeptide aufzufassen sind. Die Bildung solcher Peptide ist bei niederen Pilzen bereits mehrfach aufgefunden worden und scheint für diese Klasse von Organismen bezeichnend zu sein. Als natürlich vorkommendes Benzodiazepinderivat wurde vor kurzem auch das Antibioticum Anthramycin erkannt [11].

Enthalten die Pilzstämme das Ferment Cyclophenase, so werden die zunächst gebildeten Alkaloide Cyclophenin und Cyclophenol in einer durch dieses Ferment katalysierten Reaktion in die Chinolinderivate Viridicatin bzw. Viridicatol umgewandelt. Dabei entstehen Methylamin und Kohlendioxyd als Spaltprodukte. Der Mechanismus dieser Umwandlung ist noch ungeklärt. Er wird zur Zeit in unserem Laboratorium untersucht.

Herrn Prof. Dr. K. Mothes möchte ich auch an dieser Stelle für vielfache Anregungen und die ständige Förderung dieser Arbeit herzlichst danken.

#### LITERATUR

1. Cunningham, K. G., und Freeman, G. G., *Biochem. J.* 53 (1953) 328.
2. Bracken, A., Pocker, A., und Raistrick, H., *Biochem. J.* 57 (1954) 587.
3. Birkinshaw, J. H., Luckner, M., Mohammed, Y. S., Mothes, K., und Stickings, C. E., *Biochem. J.* 89 (1963) 196.
4. Luckner, M., und Mohammed, Y. S., *Tetrahedron Letters*, 1964, p. 1987.
5. Austin, D. J., und Meyers, M. B., *J. Chem. Soc.* 1964, p. 1197.
6. Mohammed, Y. S., und Luckner, M., *Tetrahedron Letters*, 1963, p. 1953.
7. Luckner, M., und Mothes, K., *Arch. Pharm.* 296 (1963) 18.
8. Luckner, M., und Mothes, K., *Tetrahedron Letters*, 1962, p. 1035.
9. Luckner, M., Habilitationsschrift, Halle 1965.
10. Luckner, M., *Verh. Ges. exp. Med. DDR*, 6 (1964) 395.
11. Leimgruber, W., Batcho, A. D., und Schenker, F., *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 5793.

M. Luckner  
 Pharmakognostisches Institut der Martin-Luther-Universität  
 Halle/Saale, Weinbergweg, Deutschland (DDR)