

Die Umwandlung von Tropin in Pseudotropin durch Synergismus zweier Bakterien-Stämme

VON NIKOLAUS SEILER und GOTTFRIED WERNER

Aus dem Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Arbeitsgruppe Neurochemie, Frankfurt/Main
(Z. Naturforschg. 19 b, 572—575 [1964]; eingegangen am 26. Februar 1964)

Unter dem synergistischen Einfluß zweier Bakterien-Stämme, eines aeroben Sporenbildners (*Bac. alvei*) und eines Enterococccen-Stammes (*Diplococcus I*) wird Tropin vollständig in Pseudotropin umgewandelt. Der Mechanismus dieser *trans-cis*-Umlagerung wird diskutiert.

Zur Trennung von Tropan-Alkaloiden und deren Derivate werden geeignete chromatographische Laufmittelsysteme angegeben.

Nach dreiwöchigem Bebrüten von Tropin (3 α -Tropanol) unter aeroben, *unsterilen* Bedingungen in einem Rinderhirn-Homogenat, konnte — nach dessen chromatographischer Auftrennung — mit DRAGENDORFF-Reagens¹ das Auftreten eines ziegelrot-gefärbten Fleckes beobachtet werden, während die Tropin-Menge im Homogenat entsprechend abgenommen hatte. Das Umwandlungsprodukt des Tropin wurde durch präparative Papierchromatographie isoliert und durch Elementaranalyse, IR-Spektrum sowie auf Grund seines chromatographischen Verhaltens in mehreren Laufmittel-Systemen (s. Versuchsteil) als Pseudotropin (3 β -Tropanol) charakterisiert.

In gleichartigen, jedoch *steril*-gehaltenen Ansätzen blieb das zugesetzte Tropin unverändert erhalten, so daß die Vermutung nahelag, daß aus der Luft stammende Keime die *trans-cis*-Umlagerung verursacht hatten.

Aus den aerogen-infizierten Ansätzen erhielten wir durch Selektionierung zunächst ein Bakteriengemisch, das die vollständige Umwandlung von Tropin in Pseudotropin schon in drei Tagen bewirkte (Abb. 1). Das Bakteriengemisch konnte später aufgetrennt werden². Es bestand aus einem aeroben Sporenbildner, der die morphologischen Merkmale von *Bacillus alvei* (Beschreibung in BERGEYS Manual, 7th ed. Baltimore 1957) besaß, sowie aus einem Enterococccen-Stamm (als *Diplococcus I* von Prof. SEELEMANN, Kiel, eingeordnet).

Es zeigte sich in weiteren Versuchen die interessante Tatsache, daß weder die Enterococccen noch

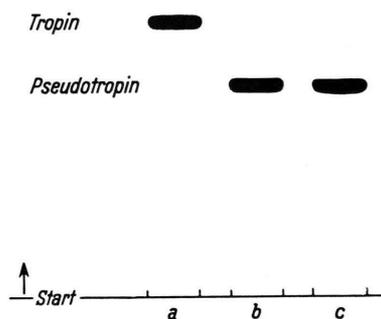


Abb. 1. Papierchromatogramm verschiedener Inkubationsansätze: a) $0,9 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Tropin in Hirnhomogenat unter sterilen Bedingungen. b) Gleicher Ansatz wie a, jedoch mit dem Bakteriengemisch (s. Text) beimpft und vier Tage bei 38 °C inkubiert. c) $0,9 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Pseudotropin in Hirnhomogenat wie Ansatz b behandelt. Auf das Chromatogramm wurden jeweils 20 mm³ der Hirnhomogenate aufgetragen (Laufmittel: n-Butanol + Eisessig + Wasser = 4 + 1 + 5; Laufzeit: 18 Std.).

die Sporenbildner für sich allein die *trans-cis*-Umlagerung des Tropin in Pseudotropin bewirkten (Abb. 2. I → IV); auch waren sie zu keiner anderen Veränderung des Tropin fähig. Zwischenprodukte der Reaktion konnten nicht nachgewiesen werden.

Beimpfte man hingegen mit den beiden Stämmen gleichzeitig, so erfolgte die „Umlagerung“ prompt. *Bacillus alvei* NCTC 7583 bewirkte zusammen mit dem von uns isolierten Enterococcus ebenfalls die beschriebene Stoffwechselleistung, hingegen nicht zusammen mit dem versuchsweise ebenfalls eingesetzten *Streptococcus faecalis* L 49³.

¹ I. M. HAIS u. K. MACEK, Handbuch der Papierchromatographie Bd. I. S. 758; Gustav Fischer Verlag, Jena 1958.

² Die Reinzüchtung der beiden Bakterienstämme gelang Dr. W. MANNHEIM (Hygiene-Institut der Universität Marburg), dem wir auch für seine Hilfe und wertvollen Ratschläge an dieser Stelle herzlich danken möchten.

³ Die Stämme von *Bacillus alvei* NCTC 7583 sowie von *Streptococcus faecalis* L 49 wurden uns freundlicherweise von Dr. W. MANNHEIM, Hygiene-Institut der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. R. SIEGERT), zur Verfügung gestellt.

Alle in der Tab. 1 aufgeführten Tropan-Alkaloide inkubierten wir in Hirnhomogenat nach Beimpfen mit unserem Bakteriengemisch. Außer Tropin wurden lediglich Nortropin und 6-Methoxy-tropin in die entsprechenden Pseudo-Verbindungen umgewandelt. Scopin lagerte sich während des Sterilisierens in Scopolin um. Die übrigen Verbindungen blieben unter den Inkubationsbedingungen unverändert. *N*-Methyl-granatolin und seine Derivate konnten noch nicht in unsere Versuche einbezogen werden.

	Inkubation [Tage]	Umwandlung in die Pseudo- verbindungen [%]
Tropin	4	100 (\pm 10)
Nortropin	8	50 (\pm 10)
6-Methoxy-tropin	8	10 (\pm 5)
6-Hydroxy-tropin	8	0*
<i>O</i> -Benzoyl-tropin	8	0
<i>O</i> -Benzoyl-6- methoxytropin	8	0
Atropin	8	0
Scopin	—	—**
Scopolin	8	0

Tab. 1. *Trans-cis*-Umlagerung einiger Tropan-Alkaloide durch eine Mischkultur von einem Sporenbildner (*Bacillus alvei* NCTC 7583) und einem Enterococcen-Stamm (*Diplococcus I*). * 6-Hydroxy-pseudotropin stand uns nicht zur Verfügung; es ist jedoch anzunehmen, daß es sich ebenso wie die Pseudo-Verbindungen der meisten Tropin-Abkömmlinge durch *n*-Butanol + Eisessig + Wasser = 4+1+5 auf Papier von 6-Hydroxy-tropin abtrennen läßt. ** Wird während des Sterilisierens in Scopolin umgewandelt.

Besprechung der Ergebnisse

Wir nehmen an, daß die bei der Umwandlung von Tropin (axiale OH-Gruppe) in das thermodynamisch-stabilere (energieärmere) Pseudotropin (mit äquatorialer OH-Gruppe) freiwerdende Energie von den Bakterienstämmen synergistisch genutzt wird. Wie dies geschieht, müssen weitere Untersuchungen klären. Vorläufige Versuche mit „ruhenden“ Bakterien (in *m*/15-Phosphatpuffer) zeigten keinen erhöhten Stoffwechsel nach Tropin-Zusatz; allerdings war unter diesen Bedingungen innerhalb von 24 Stdn. auch keine Umwandlung von Tropin in Pseudotropin feststellbar.

Vom theoretisch-chemischen Gesichtspunkt aus interessiert der Mechanismus dieser *trans-cis*-Umlagerung. Enzymatische *cis-trans*-Umlagerungen sind relativ selten beobachtet worden⁴, und über deren Mechanismus ist wenig bekannt. In den meisten Fällen dürfte die Umlagerung über Phosphorsäure-enol-ester verlaufen. Die reversible Umwandlung von Galaktose in Glucose (in Form der 1-Phosphate) durch die UDP-Glucose-4-epimerase (Galaktowaldenase) soll nach MAXWELL⁵ wegen der Abhängigkeit dieser Reaktion von NAD eine Redox-Reaktion am C-4 sein.

Aus der Alkaloidchemie sind uns keine Beispiele bakterieller oder enzymatischer Isomerisierungs-Reaktionen bekannt. Die Umwandlung von Tropin in Pseudotropin durch Na-Amylat in siedendem Amylalkohol^{6,7} verläuft vermutlich durch Austausch der Oxydationsstufen zwischen einem durch Dehydrierung entstehenden Tropinon-enolat und Tropin-Natrium⁸.

Unter physiologischen Bedingungen kommen unseres Erachtens zwei Mechanismen in Frage:

1. Die Oxydation zum Tropinon und dessen Reduktion zum Pseudotropin (Abb. 2, I \rightarrow II \rightarrow IV). TAMM⁹ konnte durch den Pilz *Fusarium lini* Tropinon zu einem Gemisch von Tropin und Pseudotropin reduzieren. Die Umwandlung von Tropin in Pseudotropin (oder umgekehrt) konnte von ihm nicht beobachtet werden.

Die von uns isolierten Bakterienstämme griffen weder einzeln noch gemeinsam Tropinon an. Durch Zugabe von Ketonfängern (Thiosemicarbazid, Semicarbazid·HCl, Girard-Reagens T, Na₂SO₃, Hydrazinsulfat, Hydroxylamin) in 0,1 und 0,05-*m*. Konzentration zu Inkubationsansätzen von Tropin in Hirnhomogenat versuchten wir entstehendes Keton der Reduktion zu entziehen. In Gegenwart fast aller genannten Carbonyl-Reagenzien blieb jedoch das Tropin unverändert. Lediglich nach Zugabe von 0,1 Mol Na₂SO₃/l Homogenat wurde Tropin zu etwa 10%, in Gegenwart von 0,05 Mol Na₂SO₃/l Homogenat zu etwa 40% in Pseudotropin umgelagert. Tropinon war in keinem Fall nachweisbar.

⁴ K. MYRBÄCK, in: R. AMMON u. W. DIRSCHERL, Fermente, Hormone, Bd. I. S. 410; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959.

⁵ E. S. MAXWELL, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1074 [1956]; J. biol. Chemistry **229**, 139 [1957].

⁶ R. WILLSTÄTTER, Ber. dtsh. chem. Ges. **29**, 936 [1896].

⁷ M. BARROWCLIFF u. F. TUTIN, J. chem. Soc. [London] **95**, 1966 [1909].

⁸ W. HÜCKEL, Theoretische Grundlagen der organischen Chemie Bd. I. S. 394; 6. Aufl. Akademische Verlagsges. Geest und Portig K.G., Leipzig 1949.

⁹ CH. TAMM, Planta med. [Stuttgart] **8**, 331 [1960].

2. Die Abspaltung von Wasser aus Tropin zu Tropen-(1) und dessen Wiederanlagerung an die entstandene Doppelbindung wäre ein weiterer Weg der „Isomerisierung“ (Abb. 2, I \rightarrow III \rightarrow IV).

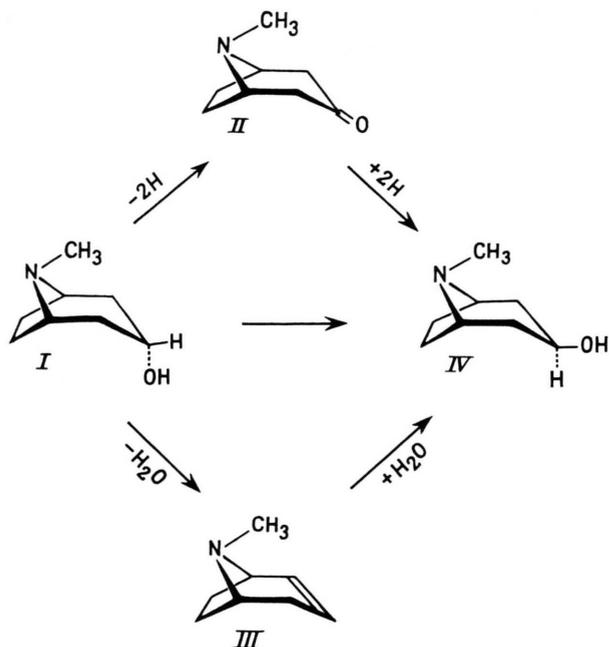


Abb. 2. Potentielle intermediäre Wege der Tropin-Umwandlung: I. Tropin, II. Tropinon, III. Tropen-(1), IV. Pseudotropin.

Aber auch Tropen-(1), das wir nach LADENBURG¹⁰ darstellten, wird von den genannten Bakterienstämmen nicht in Pseudotropin umgewandelt.

Die Ergebnisse der Versuche mit den hypothetischen Zwischenstufen der Tropin-Umwandlung sind letztlich nicht beweisend. Tropen-(1) oder Tropinon könnte durchaus im Zellinneren der Bakterien als Zwischenstufe auftreten. Doch müßte man dann annehmen, daß diese Verbindungen extrazellulär zugeführt, nicht durch die Zellwand permeieren und so der Metabolisierung entgehen. Wir haben daher Versuche mit Tritium-markiertem Tropin zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus geplant.

Experimentelles

Inkubationsansatz. 100 g frisches (oder bei -20° aufbewahrtes) Rinderhirn wurde mit 200 cm^3 Wasser homogenisiert, danach eine Lösung von $0,5\text{ g}$ Tropin

¹⁰ A. LADENBURG, Liebigs Ann. Chem. **217**, 74 [1883].

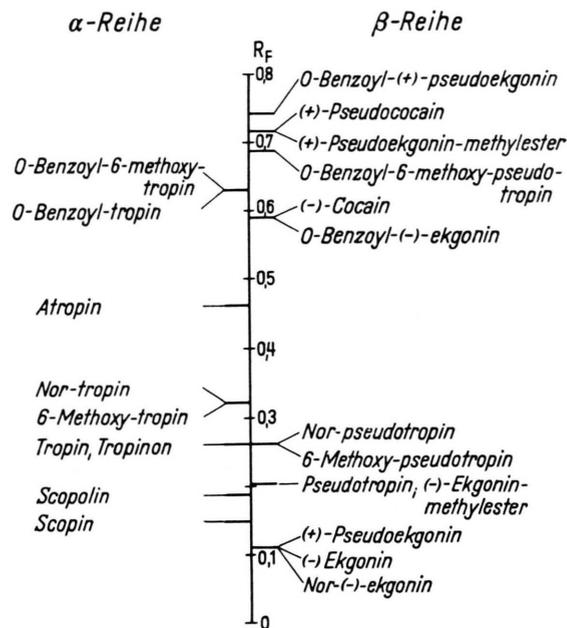


Abb. 3. R_f -Werte einiger Tropan-Alkaloide und Derivate. Laufmittel: n-Butanol + Eisessig + Wasser = 4 + 1 + 5; Papier: Schleicher und Schüll Nr. 2043 b.

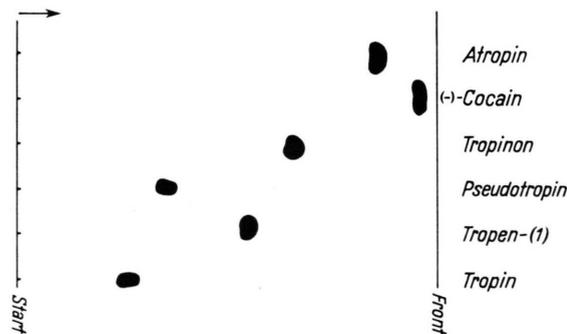


Abb. 4. Dünnschichtchromatogramm von einigen Tropan-Alkaloiden. Laufmittel: Methylacetat + Isopropanol + konz. NH_3 = 45 + 35 + 15; Laufstrecke 13 cm, Kieselgel G-Schicht.

in 100 cm^3 $m/15$ -Phosphatpuffer (pH 7) zugefügt und nochmals homogenisiert. Die Tropinkonzentration entsprach $0,9 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Homogenat. Präparative Ansätze wurden nach dem Sterilisieren und Beimpfen aus den Schrägagarkulturen der Bakterienstämme in großen Petrischalen bei 38°C bis zu 3 Wochen inkubiert. Zur analytischen Verfolgung der Umwandlung von Tropin in Pseudotropin wurden zeitweise 20-mm^3 -Proben des Homogenates auf $1,5\text{ cm}$ lange Startstriche von Papierchromatogrammen aufgetragen. Zur ersten Anzuchtung der wirksamen Bakterien bebrüteten wir nicht-sterilisiertes Hirnhomogenat (je $0,3\text{ cm}^3$) in verschlossenen Reagenzgläsern mehrere Wochen bei 38°C .

Die Hirnextrakt-Agar-Platten bestanden aus einer 2-proz. Lösung von Agar im Zentrifugations-Überstand

(2000 g; 30 Min.) des Hirnhomogenates. Die Lösung wurde filtriert und wie üblich fraktioniert sterilisiert.

Isolierung des Pseudotropin aus den Reaktionsansätzen. Da zum Zeitpunkt der präparativen Isolierung des Tropin-Umwandlungsproduktes dessen Identität mit Pseudotropin noch nicht bekannt war, wurde wie folgt verfahren: Das bebrütete Homogenat wurde im Rotationsverdampfer weitgehend eingengt und der Rückstand mit dem dreifachen Volumen Methanol versetzt. Der abzentrifugierte Niederschlag war nach dem Waschen mit Eisessig + Methanol = 3 + 1 frei von Tropin. Den Eindampfungsrückstand der methanol.-essigsäuren Lösung filtrierten wir durch eine kleine Al_2O_3 -Säule und prüften die mit Methanol eluierten Fraktionen mit Dragendorff-Reagens. Die eingengten Eluate trugen wir auf Chromatographiepapier auf und entwickelten die Chromatogramme 30 Stdn. im Durchlauf mit n-Butanol + Eisessig + Wasser = 4 + 1 + 5. Die Pseudotropin-Zonen wurden eluiert und wiederholt chromatographisch gereinigt. Die Lösung der papierchromatographisch einheitlichen Substanz versetzten wir mit einer gesättigten alkoholischen Pikrinsäurelösung. Das ausgefällte Pikrat wurde aus Methanol umkristallisiert. Lange Nadeln, Schmp. 237° (Zers.). Ausbeute: 700 mg (aus 1 g Tropin).

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_8$ (370,3)

Ber. C 45,41 H 4,90 N 15,13¹¹,

Gef. C 45,38 H 5,06 N 15,43.

300 mg des Pikrates wurden in 5 cm^3 1-n. HCl gelöst und die Pikrinsäure mit Methyläthylketon ausgeschüttelt. Der Rückstand der wäßrig-salzsäuren Lösung wurde aus Alkohol umkristallisiert. Schmp. 280° (Zers.).

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{ClNO}$ (177,7)

Ber. C 54,08 H 9,08 N 7,88,

Gef. C 53,76 H 9,03 N 7,92.

¹¹ Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium von Dr.-Ing. A. SCHOELLER, Kronach, ausgeführt.

Das IR-Spektrum dieser Substanz stimmt mit dem von Pseudotropin·HCl völlig überein.

Mit n-Butanol + Eisessig + Wasser = 4 + 1 + 5 und mit Butylacetat + n-Butanol + Eisessig + Wasser = 47 + 9 + 28 + 16 auf Papierchromatogrammen sowie mit Methylacetat + Isopropanol + konz. NH_3 = 45 + 35 + 15 und mit Chloroform + Methanol + Eisessig = 75 + 20 + 5 auf Kieselgel G-Schicht verhielt sich die aus Hirnhomogenat isolierte Substanz wie Pseudotropin. Auch die Färbung mit Dragendorff-Reagens ist identisch.

Chromatographie der Tropan-Alkaloide. Zur Trennung der Verbindungen der α -Reihe von den entsprechenden Pseudo-Verbindungen (β -Reihe) eignete sich n-Butanol + Eisessig + Wasser = 4 + 1 + 5 und Chromatographie-Papier von Schleicher und Schüll Nr. 2043 b. Aus Abb. 3 sind die R_f -Werte verschiedener Tropanabkömmlinge ersichtlich. Es ist auffällig, daß die Vertreter der β -Reihe in diesem Laufmittelgemisch rascher wandern als die Verbindungen der α -Reihe, wenn die OH-Gruppe verestert ist, hingegen langsamer bei unverestertem Hydroxyl. In der Reihe der Ekgonin-Derivate haben die Pseudo-Verbindungen im allgemeinen größere R_f -Werte als die Vertreter mit 2- β -Carboxyl, auch werden sie mit Dragendorff-Reagens viel weniger intensiv angefärbt als die entsprechenden Ekgonin-Derivate.

Zur Trennung von Tropinon, Tropin, Pseudotropin und Tropen-(1) ist das System Methylacetat + Isopropanol + konz. NH_3 = 45 + 35 + 15 und Dünnschichtplatten mit Kieselgel G als Trägerschicht geeignet (Abb. 4).

Frl. MEIKE SCHMIDT, biol.-chem.-techn. Assistentin, danken wir sehr für zuverlässige experimentelle Mitarbeit.